



Doctorado en Biomedicina y Farmacia

**Implicación de las vías Nrf2/HO-1 y NADPH oxidasa  
en modelos experimentales de artritis y  
osteoporosis postmenopáusicas**

**Tesis Doctoral presentada por:**

**Lidia Ibáñez Torres  
Valencia, 2012**





VNIVERSITATIS VALÈNCIAE

Facultat de Farmàcia

Departament de Farmacologia

**María José Alcaraz Tormo**, Catedrática de la Universitat de València y **María Luisa Ferrándiz Manglano**, Profesora Titular de la Universitat de València

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo presentado por la Licenciada **Lidia Ibáñez Torres**, titulado “**Implicación de las vías Nrf2/HO-1 y NADPH oxidasa en modelos experimentales de artritis y osteoporosis postmenopáusicas**”, ha sido realizado en el Departament de Farmacologia de la Universitat de València, bajo nuestra dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación de esta Tesis Doctoral para que sea juzgada por el Tribunal correspondiente.

Valencia, 2012.

María José Alcaraz Tormo

María Luisa Ferrándiz Manglano



La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por los siguientes proyectos y ayudas:

Proyecto SAF2010-22048 concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad-Fondo Europeo de desarrollo Regional:

*"Estrategias de protección frente a los procesos degradativos osteoarticulares"*

Programa PROMETEO/2010/047 para grupos de investigación de excelencia, concedido por la Generalitat Valenciana:

*"Mecanismos reguladores en procesos inflamatorios"*

Proyecto RETICEF RD07/0013/2001 concedido por el Instituto de Salud Carlos III:

*"Red de investigación en envejecimiento y fragilidad"*

Beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) concedida por el Ministerio de Economía y Competitividad.



En la vida, todo lo que empieza tiene un final. Pero hay finales que, aunque anunciados y esperados, son difíciles de asimilar. Porque, además del trabajo de laboratorio y de las horas frente al ordenador, esta Tesis no existiría sin el apoyo de la gente que me ha rodeado durante estos 5 años. Por ello, deseo expresar mi agradecimiento a todas esas personas.

En primer lugar a mis directoras M<sup>a</sup> José Alcaraz y M<sup>a</sup> Luisa Ferrándiz. M<sup>a</sup> José, muchísimas gracias por haber confiado en mi y por haber permitido que formara parte de tu grupo de investigación. Sin ello, esta Tesis no hubiese sido posible. Marisa, mil gracias por tu confianza y dedicación, tanto a nivel científico como personal. Tu optimismo me ha ayudado mucho cuando el mío escaseaba.

A los demás profesores del Departamento de Farmacología que durante estos años me han ayudado tanto en el desarrollo de mi Tesis como en el aprendizaje de la docencia. Especialmente a M<sup>a</sup> Carmen Terencio, per guiar-me, al costat de Marisa, en els meus primers passos en la investigació i per haver-me escoltat sempre. A Miguel Payá y a Amalia Úbeda por participar en mi formación y por transmitirme su entusiasmo por la docencia. A Isabel Guillén, por ayudarme con mis dudas inmunológicas y por esas comidas tan entretenidas. A Carmen Montesinos, por sus conversaciones de las que siempre he aprendido algo nuevo.

A mis compañeros de laboratorio. A Diana, muchísimas gracias por estar siempre ahí, por las largas confidencias y por tus sabios consejos. A Isabel, por tu confianza y amistad y por tu paciencia en los últimos meses. A Rosa, por los muchos momentos en los que hemos intentado “arreglar el mundo”. A Nuria, por preocuparte siempre por mí, en lo profesional como en lo personal. A Fermí y Javier, por los buenos momentos dentro y fuera del lab. A Anna, per l’alegria que transmets. A todas las personas con las que empecé y que se han ido marchando, Maria, Edu, Miguel, Nicla y Vanessa; y a todos los que se quedan, Rita, Julia, Jorge y Cris. Gracias por crear tan buen ambiente. A Laia, companya de la 4<sup>a</sup> planta, per eixes converses allà on ens trobarem.

A Mamen, Carlos, Raquel, Irene, Ana Flores e Inma Noguera, gracias por estar siempre disponibles.

I would also like to thank all my overseas colleagues. Firstly, thanks to Rikard Holmdahl for giving me the opportunity to work at the MIR; and Nan, for teaching me and for your help. Secondly, thanks to the MIR people who treated me as one more of you. Especially, Angela, Bruno and Mika, for your help and for spending so great time inside and outside the lab. And Sonja, thanks for your friendship and for showing me a different vision of the world. Last, but not least, thanks to my friends from Stockholm (Laura, Sophie, Solveig, Alex and all Spanish people), for your excellent company.

A mis amigas. Lydia, Ana MN, Bea, Ana PL, Geno y Zara, por vuestro apoyo incondicional. A Ana i Blanca, per totes les vegades (que no son poques) que heu escoltat parlar de la meua Tesi. Gràcies per aquest any. A Ana, Esther i Carol, haver-vos conegut en Estocolm no te preu. A Tamara, por entenderme y apoyarme en todo, siempre serás algo más que una amiga.

Y en último lugar, a mi familia. A mi abuela, de la que tanto he aprendido. A mis hermanos, de sangre y políticos. Gracias por confiar en mí y por no negarme nada de lo que os he pedido. Y por supuesto, a mis padres, por su esfuerzo y sacrificio, sin los cuales nada de esto hubiese sido posible.

A todos, simplemente gracias.



# Abreviaturas

---

<b>AAP</b>	4-aminoantipirina
<b>ABTS</b>	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
<b>AIR</b>	Región autoinhibitoria
<b>ALN</b>	Alendronato
<b>ALP</b>	Fosfatasa alcalina
<b>AR</b>	Artritis reumatoide
<b>ARE</b>	Elementos de respuesta antioxidante
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>BVR</b>	Biliverdina reductasa
<b>CAIA</b>	Artritis inducida por anticuerpos frente al colágeno
<b>CGD</b>	Enfermedad granulomatosa crónica
<b>CCP</b>	Péptido cíclico citrulinado
<b>CIA</b>	Artritis inducida por colágeno
<b>CII</b>	Colágeno tipo II
<b>CO</b>	Monóxido de carbono
<b>COMP</b>	Proteína oligomérica de la matriz extracelular del cartílago
<b>CoPP</b>	Cobalto-protoporfirina IX
<b>CO-RMs</b>	Moléculas liberadoras de CO
<b>CORM-3</b>	Tricarbonilcloro(glicinato) de rutenio (II)
<b>COX</b>	Ciclooxigenasa
<b>CPA</b>	Células presentadoras de antígenos
<b>CTX-I</b>	Telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>dC</b>	Colágeno desnaturalizado
<b>DHR</b>	Dihidrorrodamina

<b>DMEM</b>	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
<b>DMO</b>	Densidad mineral ósea
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGTA</b>	Ácido etilenglicoltetraacético
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
<b>FCA</b>	Adyuvante Completo de Freund
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b>GCL</b>	Glutamato-cisteina ligasa
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>GST</b>	Glutación S-transferasa
<b><sup>3</sup>H</b>	Tritio
<b>H&amp;E</b>	Tinción con hematoxilina de Gil y eosina acuosa
<b>HEPES</b>	Ácido N-[2-hidroietil] piperazina-N'-[2-etanosulfónico]
<b>HO</b>	Hemo oxigenasa
<b>h-PGDS</b>	PGD sintasa de tipo hematopoyética
<b>HRP</b>	Avidina/peroxidasa de rábano
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adhesión intercelular-1
<b>IFA</b>	Adyuvante incompleto de Freund
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>iNOS</b>	Oxido nítrico sintasa inducible
<b>l-PGDS</b>	PGD sintasa tipo hematopoyética
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido bacteriano

<b>MCSF</b>	Factor estimulante de colonias de macrófagos
<b>MHC</b>	Moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad
<b>μ-CT</b>	Tomografía microcomputarizada
<b>MMPs</b>	Metaloproteinasas de matriz
<b>NA</b>	Naïve, animales sanos
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
<b>NCF</b>	Factor citosólico de neutrófilos
<b>NF-E2</b>	Factor nuclear eritroide 2
<b>NFκB</b>	Factor nuclear kappa B
<b>NO</b>	Oxido nítrico
<b>NOX</b>	NADPH oxidasa
<b>NQO1</b>	NAD(P)H:quinona oxido-reductasa-1
<b>Nrf2</b>	Factor de transcripción 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anión superóxido
<b>OA</b>	Osteoartritis
<b>OCT</b>	Compuesto de temperatura óptima de corte
<b>OPG</b>	Osteoprotegerina
<b>OVX</b>	Ovariectomía
<b>OVX-CIA</b>	Animales artríticos ovariectomizados
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PGDS</b>	Prostaglandina D sintasa
<b>PGs</b>	Prostaglandinas
<b>Phox</b>	Oxidasa fagocítica
<b>PINP</b>	Propéptido N-terminal del colágeno tipo I
<b>PMA</b>	Forbol 12-miristato 13-acetato
<b>PMNs</b>	Polimorfonucleares
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

<b>PPAR</b>	Receptor activador del proliferador de peroxisomas
<b>PRR</b>	Región rica en prolinas
<b>r.p.m.</b>	Revoluciones por minuto
<b>RANK</b>	Receptor activador del factor nuclear kappa B
<b>RANKL</b>	Ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B
<b>RF</b>	Factor reumático
<b>RIA</b>	Radioinmunoensayo
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>Runx2</b>	Factor de transcripción 2 relacionado con Runt
<b>s.c.</b>	Subcutánea
<b>S.E.M.</b>	Error estándar de la media
<b>SBF</b>	Suero bovino fetal
<b>SDS</b>	Sodio dodecilsulfato
<b>SFN</b>	Sulforafano
<b>Sham</b>	Operación simulada
<b>SnPP</b>	Estaño-protoporfirina IX
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>TGFβ</b>	Factor de crecimiento transformador beta
<b>TNFα</b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>TRAP</b>	Fosfatasa ácida tartrato resistente
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular
<b>WT</b>	<i>Wild type</i>

---

<b>RESUMEN/ABSTRACT</b> .....	19
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	29
<b>1. ARTRITIS REUMATOIDE Y OSTEOPOROSIS</b> .....	31
<b>1.1. Artritis Reumatoide</b> .....	31
1.1.1. Proceso inflamatorio .....	31
1.1.2. Respuesta inmune .....	32
1.1.3. Citocinas y otros mediadores implicados .....	35
1.1.4. Tratamiento farmacológico .....	36
<b>1.2. Osteoporosis</b> .....	38
1.2.1. Hueso .....	38
1.2.2. Remodelado óseo por el sistema RANK/RANKL/OPG .....	40
1.2.3. Osteoporosis postmenopáusica .....	41
1.2.4. Citocinas y otros mediadores .....	42
1.2.5. Tratamiento farmacológico .....	43
<b>1.3. Artritis reumatoide y osteoporosis</b> .....	45
1.3.1. Influencia de los estrógenos en la artritis reumatoide .....	45
1.3.2. Tratamiento farmacológico .....	46
<b>2. ESTRÉS OXIDATIVO</b> .....	47
<b>2.1. Complejo NADPH oxidasa</b> .....	49
2.1.1. Factor citosólico de neutrófilos 1 (NCF1) .....	51
2.1.2. Papel de la NADPH oxidasa en la artritis reumatoide .....	52
2.1.3. Papel de la NADPH oxidasa en el remodelado óseo .....	53
<b>2.2. Factor de transcripción Nrf2</b> .....	54
2.2.1. Vía de activación de Nrf2 .....	55

2.2.2. Actividad Nrf2 .....	56
<b>2.3. Vía de la Hemo oxigenasa-1 (HO-1) .....</b>	<b>60</b>
2.3.1. Generalidades .....	60
2.3.2. Inducción de la HO-1 .....	60
2.3.3. Papel de la HO-1 en la inflamación .....	61
2.3.4. Papel de la HO-1 en la artritis reumatoide y en el metabolismo óseo .....	62
2.3.5. El monóxido de carbono (CO) .....	63
<b>3. MODELOS ANIMALES .....</b>	<b>66</b>
3.1. Artritis inducida por colágeno en ratón (CIA) .....	67
3.2. Ovariectomía (OVX) en ratón .....	69
3.3. Artritis postmenopáusica (CIA+OVX) en ratón .....	70
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>71</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>75</b>
<b>1. MÉTODOS DE ESTUDIO <i>in vivo</i> .....</b>	<b>77</b>
1.1. Animales utilizados .....	77
1.2. Moléculas en estudio .....	78
1.2.1. Estaño-protoporfirina IX (SnPP) .....	78
1.2.2. Tricarbonilcloro(glicinato) de rutenio (II) (CORM-3) .....	78
1.2.3. Alendronato (ALN) .....	79
1.2.4. Sulforafano (SFN) .....	79
<b>1.3. Protocolo experimental .....</b>	<b>80</b>
1.3.1. OVX+CIA en ratones DBA1/J .....	81
1.3.2. OVX+CIA en ratones B10.Q y B10.Q/Ncf1** .....	84
1.3.3. OVX en ratones C57Black-6 Nrf2 <sup>+/+</sup> y C57Black-6 Nrf2 <sup>-/-</sup> .....	85
<b>2. ANÁLISIS HISTOLÓGICO .....</b>	<b>86</b>

2.1. Deshidratación y montaje en parafina de las rodillas .....	86
2.1.1. Tinciones realizadas .....	87
2.1.2. Evaluación histológica de la articulación .....	88
2.2. Deshidratación y montaje en compuesto OCT de los tobillos .....	89
2.2.1. Tinciones realizadas .....	90
2.2.2. Evaluación histológica de la articulación .....	91
<b>3. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO .....</b>	<b>91</b>
<b>4. ANÁLISIS POR TOMOGRAFÍA MICROCOMPUTARIZADA (<math>\mu</math> -CT) .....</b>	<b>92</b>
<b>5. CUANTIFICACIÓN DE ANALITOS EN SUERO Y PATA .....</b>	<b>94</b>
5.1. <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> (ELISA) .....	95
5.2. EIA competitivo .....	97
5.3. Radioinmunoensayo (RIA) .....	98
5.4. Inmunoensayo de biomarcadores por Multiplex de Luminex .....	99
5.5. <i>Western Blot</i> .....	101
5.6. Ensayo de actividad de fosfatasa alcalina .....	103
<b>6. MÉTODOS DE ESTUDIO <i>in vitro</i> .....</b>	<b>104</b>
6.1. Ensayos de proliferación celular .....	105
6.2. Cuantificación de citocinas en sobrenadantes .....	106
6.3. <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> (FACS) .....	107
6.4. Ensayo de estrés oxidativo .....	108
<b>7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>110</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>113</b>
<b>1. RESULTADOS DEL MODELO DE ARTRITIS POSTMENOPÁUSICA (OVX+CIA) EN RATONES DBA1/J .....</b>	<b>115</b>
1.1. Caracterización del modelo OVX+CIA y efectos del SnPP .....	115
1.1.1. Evolución de la artritis y análisis histológico .....	115

1.1.2. Niveles de mediadores en suero .....	119
1.1.3. Niveles de marcadores del remodelado óseo .....	120
1.1.4. Niveles de mediadores del proceso inflamatorio .....	121
1.1.5. Niveles de mediadores en patas traseras .....	122
1.1.6. Efectos sobre la expresión proteica de COX-2, h-PGDS, l-PGDS y HO-1 .....	124
1.1.7. Efectos sobre la estructura trabecular del hueso .....	126
<b>1.2. Efectos del CORM-3 y del alendronato en el modelo OVX+CIA .....</b>	<b>127</b>
1.2.1. Evolución de la artritis .....	127
1.2.2. Análisis histológico .....	129
1.2.3. Niveles de mediadores en suero .....	132
1.2.4. Niveles de mediadores inflamatorios en patas traseras .....	135
1.2.5. Efectos sobre la estructura trabecular del hueso .....	137
<b>2. RESULTADOS DEL MODELO DE ARTRITIS POSTMENOPÁUSICA (OVX+CIA) EN RATONES B10.Q Y B10.Q/Ncf1** .....</b>	<b>140</b>
<b>2.1. Resultados <i>in vivo</i> .....</b>	<b>140</b>
2.1.1. Evolución de la artritis .....	141
2.1.2. Análisis histomorfométrico de los tobillos .....	142
2.1.3. Niveles séricos de anticuerpos anti-CII .....	144
2.1.4. Estudio de la especificidad de los anticuerpos anti-CII (IgG) .....	145
2.1.5. Niveles séricos de MMP-3 .....	149
2.1.6. Niveles séricos de RANKL y OPG .....	150
2.1.7. Efectos sobre la estructura trabecular del hueso .....	151
<b>2.2. Resultados <i>in vitro</i> .....</b>	<b>152</b>
2.2.1. Estudio de células T .....	153
2.2.2. Estudio de células B .....	154
2.2.3. Estudio del estrés oxidativo .....	157
<b>3. RESULTADOS DEL MODELO DE OVARIECTOMÍA EN RATONES Nrf2<sup>-/-</sup> .....</b>	<b>159</b>



3.1. Peso de los animales .....	160
3.2. Marcadores del remodelado óseo en el suero .....	160
3.1. Expresión proteica de HO-1 en homogeneizado de pata .....	164
3.1. Medida de CTX-I en suero .....	165
3.1. Efectos en la estructura trabecular y cortical del hueso .....	166
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>171</b>
<b>CONCLUSIONES/CONCLUSIONS .....</b>	<b>193</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>199</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>225</b>



## **Resumen/Abstract**

---



La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune que se desarrolla en el 1% de la población mundial. Además de su carácter inflamatorio, esta enfermedad se caracteriza por una pérdida de hueso en la zona articular inflamada. Por otro lado, distintos estudios han demostrado que el déficit de estrógenos, además de incrementar la pérdida de densidad mineral ósea característica de la osteoporosis, también es capaz de aumentar la severidad de la artritis reumatoide. El modelo animal de ovariectomía (OVX) y la posterior inducción de la artritis por colágeno (CIA) es un modelo adecuado para reproducir el proceso de artritis postmenopáusica. Por ello, en primer lugar, llevamos a cabo la puesta a punto y la caracterización del modelo OVX+CIA en ratones DBA/1J. Uno de los procesos más importantes en la artritis postmenopáusica es la inflamación, lo que se confirma en nuestros resultados al observar que la OVX incrementó distintos mediadores inflamatorios como IL-6, PGD<sub>2</sub> y MMP-3 en animales artríticos, así como la expresión de COX-2, h-PGDS y l-PGDS en artríticos y no artríticos. Además, este modelo experimental nos permite valorar las modificaciones del metabolismo óseo producidas por el déficit de estrógenos, observándose que la ovariectomía aumentó la degradación ósea en animales artríticos.

Nuestro siguiente objetivo fue estudiar la participación de la vía hemo oxigenasa 1 (HO-1) en esta patología, tanto en el proceso inflamatorio que se desarrolla como en las alteraciones del remodelado óseo. Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la HO-1 posee efectos protectores en diversas enfermedades inflamatorias y, que éstos pueden ser consecuencia de la actividad del CO liberado tras la degradación del grupo hemo por la HO-1. Para realizar este estudio empleamos SnPP (inhibidor no selectivo de la HO-1) y CORM-3 (molécula liberadora de CO) en el modelo animal de artritis postmenopáusica.

Durante la evaluación de la artritis, ambos tratamientos mostraron ser efectivos en la disminución de la severidad de la enfermedad. Tras la administración de SnPP se observó una reducción de los niveles séricos de mediadores proinflamatorios como IL-6, PGD<sub>2</sub> y MMP-3. Además, a nivel local en la rodilla inflamada, SnPP disminuyó los niveles de TNF $\alpha$ , PGD<sub>2</sub>, MMP-3 y PGE<sub>2</sub>, la expresión de COX-2 y h-PGDS y la pérdida de hueso, mientras que aumentó la expresión proteica de HO-1.

El efecto del CORM-3 se estudió a días 36 y 50 tras la inducción de la artritis y se empleó alendronato (ALN) como fármaco de referencia. A nivel local, el ALN y el CORM-3 disminuyeron los niveles de TNF $\alpha$  y la erosión ósea a días 36 y 50, respectivamente. Ambos tratamientos disminuyeron los niveles séricos de COMP, IL-6, MMP-3, CTX-I, ALP y osteocalcina. Además, el CORM-3 disminuyó los niveles de TNF $\alpha$ , mientras que el ALN disminuyó los de TRAP-5b. Los efectos protectores de estos tratamientos en el hueso trabecular se observaron tras el estudio por  $\mu$ -CT de las tibias, observándose un efecto más pronunciado del CORM-3 en el día 36 y del ALN en el día 50.

Además de la inflamación, el estrés oxidativo es otro de los procesos importantes que participan en la artritis y en la osteoporosis postmenopáusica. Para el estudio de la influencia de este parámetro en el modelo de OVX+CIA, empleamos ratones con el gen Ncf1 modificado (Ncf1\*\*) que poseen inactiva la NADPH oxidasa, de manera que no se genera O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. En los animales Ncf1\*\*, el déficit de estrógenos por OVX incrementó marcadamente la severidad de la artritis. Los animales Ncf1\*\* presentaron mayor título de IgGs anti-CII que sus controles *wild type* y la OVX redujo los niveles de IgG1 en comparación con los Ncf1\*\* Sham. Además de modificar los niveles de IgGs, la ausencia de ROS y la ovariectomía modificaron la respuesta de estos anticuerpos frente a los distintos epítomos del colágeno.

Por otra parte, los estudios *in vitro* realizados con células procedentes del bazo y de sangre de estos animales han demostrado que tanto el déficit de estrógenos como de ROS es capaz de modificar los niveles de IL-10 e IFN $\gamma$ , la cantidad de células B, su activación y proliferación y la capacidad oxidativa de los macrófagos y de las células dendríticas.

Por último, realizamos el estudio del papel del factor de transcripción Nrf2 en el modelo animal de osteoporosis postmenopáusica. Este factor de transcripción ha sido ampliamente estudiado como anticarcinogénico por su papel en el estrés oxidativo y en la regulación de la transcripción génica de enzimas detoxificantes, entre ellas la HO-1. Sin embargo, existen pocos datos sobre la influencia de Nrf2 sobre el remodelado óseo. En la presente Tesis hemos realizado el estudio del

efecto de Nrf2 en la osteoporosis postmenopáusica inducida mediante ovariectomía en ratones C57Black-6 Nrf2<sup>+/+</sup> y C57Black-6 Nrf2<sup>-/-</sup>, comparando con la operación simulada (Sham). Además, administramos sulforafano (inductor de Nrf2) a otro grupo de ratones C57Black-6 Nrf1<sup>+/+</sup> OVX y Sham. En los resultados obtenidos a día 30, observamos que el déficit de Nrf2 aumentó los niveles séricos de ALP, en Sham y OVX, y osteocalcina en OVX. Además, los animales Nrf2<sup>-/-</sup> OVX presentaron un aumento del ratio RANKL/OPG. Tanto los animales Sham como los OVX presentaron una pérdida de la estructura ósea. Por otra parte, la administración de SFN a animales Nrf2<sup>+/+</sup> incrementó los niveles de osteocalcina y disminuyó los de CTX-I y RANKL/OPG en los animales OVX. Sin embargo, éstos presentaron una reducción de BS/TV y Tb.N y un aumento de Tb.Sp, lo que indica una pérdida de la estructura trabecular ósea.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis confirman la implicación de la vía Nrf2/HO-1 y del estrés oxidativo en los modelos animales de artritis y osteoporosis postmenopáusicas, abriendo nuevas posibilidades para el desarrollo de dianas terapéuticas.





Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease that develops in 1% of world population. In addition to its inflammatory nature, the disease is characterized by bone loss in the affected joints. On the other hand, several studies have shown that estrogen deficiency aggravates the bone mineral density loss and the severity of rheumatoid arthritis. The animal model of ovariectomy (OVX) and subsequent induction of collagen arthritis (CIA) is an adequate model to reproduce the process of post-menopausal arthritis. First of all, we performed the set-up and characterization of the OVX+CIA model in DBA/1J mice. Inflammation is one of the most important processes involved in postmenopausal arthritis. In our results, ovariectomy increased inflammatory mediators such as IL-6, PGD<sub>2</sub> and MMP-3 in arthritic animals, as well as COX-2, h-PGDS and l-PGDS expression in arthritic and non-arthritic mice. In addition, this experimental model allows us to measure changes in bone metabolism caused by estrogen deficiency, showing that ovariectomy increased bone degradation in arthritic animals.

Our next objective was to study the involvement of heme oxygenase-1 (HO-1) pathway in this pathology, both in the inflammatory process and in the bone remodeling. *In vivo* and *in vitro* studies have demonstrated that HO-1 has protective effects in different inflammatory diseases, which may result from CO released after the degradation of heme by HO-1. For this study we used SnPP (non-selective inhibitor of HO-1) and CORM-3 (CO-releasing molecule) in the animal model of postmenopausal arthritis.

During the evaluation of arthritis, both treatments were effective in reducing the severity of the disease. After SnPP administration, serum levels of proinflammatory mediators IL-6, PGD<sub>2</sub> and MMP-3 were reduced. In addition, the levels of TNF $\alpha$ , PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> and MMP-3, COX-2 expression and bone loss were reduced in the inflamed knee by SnPP.

The effect of CORM-3 was studied at days 36 and 50 after collagen injection and alendronate (ALN) was used as a reference drug. In the knee, ALN and CORM-3 decreased TNF $\alpha$  levels and bone erosion at days 36 and 50, respectively. Both treatments, ALN and CORM-3, reduced serum levels of COMP, IL-6, MMP-3, CTX-I,

ALP and osteocalcin. In addition, CORM-3 decreased the levels of TNF $\alpha$ , while ALN reduced TRAP-5b levels. The protective effects of these treatments on trabecular bone were observed after the  $\mu$ -CT study of the tibia, showing a more pronounced effect of CORM-3 at day 36 and of ALN at day 50.

Besides inflammation, oxidative stress is another important process involved in arthritis and postmenopausal osteoporosis. To study the influence of this parameter in postmenopausal arthritis, we used mice with a modification in the Ncf1 gen (Ncf1<sup>\*\*</sup>). Ncf1<sup>\*\*</sup> mice have an inactive NADPH oxidase and therefore they do not generate O<sub>2</sub><sup>-</sup>. After OVX, the severity of arthritis increased in Ncf1<sup>\*\*</sup> mice and animals showed higher levels of anti-CII IgGs than their *wild type* controls. OVX of Ncf1<sup>\*\*</sup> mice reduced the levels of IgG1 compared with Ncf1<sup>\*\*</sup> Sham. In addition, the absence of ROS and ovariectomy altered the response of these antibodies to different epitopes of collagen.

On the other hand, we performed *in vitro* studies with spleen and blood cells from these animals. These studies showed that estrogen and ROS deficiency were able to modify the levels of IL-10 and IFN $\gamma$ , the amount of B cells, their activation and proliferation and the oxidative capacity of macrophages and dendritic cells.

Finally, we studied the role of the transcription factor Nrf2 in the animal model of postmenopausal osteoporosis. This transcription factor is able to regulate the oxidative stress and control the expression of cytoprotective and anti-inflammatory genes. Nrf2 has been widely studied because it may protect against carcinogenesis and cancer metastasis. Despite the established antioxidant and anti-inflammatory role of Nrf2, little is known about the involvement of this transcription factor in bone remodeling. We have studied the effect of Nrf2 in postmenopausal osteoporosis by ovariectomy (OVX) of C57Black-6 Nrf2<sup>+/+</sup> mice and C57Black-6 Nrf2<sup>-/-</sup>, compared to sham operated mice (Sham). In addition, we treated C57Black-6 Nrf2<sup>+/+</sup> mice with sulforaphane (inducer of Nrf2). On day 30, Nrf2 deficiency increased serum levels of ALP, in Sham and OVX mice, and osteocalcin in OVX mice. In addition, Nrf2<sup>-/-</sup> OVX mice showed higher RANKL/OPG ratio. Both, OVX and Sham mice, showed loss of bone density and structure. On the

other hand, SFN administration to Nrf2<sup>+/+</sup> mice increased osteocalcin levels and decreased CTX-I and RANKL/OPG ratio in OVX animals. However, these animals showed a reduction in BS/TV and Tb.N accompanied by an increase in Tb.Sp, indicating loss of trabecular bone structure.

The results obtained in this thesis confirm the role of the Nrf2/HO-1 pathway and the oxidative stress in animal models of postmenopausal arthritis and osteoporosis, opening new possibilities for the development of therapeutic targets.



# **Revisión Bibliográfica**

---



## **1. ARTRITIS REUMATOIDE Y OSTEOPOROSIS**

### **1.1. Artritis Reumatoide**

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica de carácter autoinmune que afecta principalmente a la cavidad sinovial de las articulaciones. Esta enfermedad inflamatoria crónica se desarrolla en el 1% de la población mundial.

La artritis reumatoide se caracteriza por la aparición de infiltrado sinovial y de un tejido sinovial de carácter invasivo conocido como pannus que lleva a la destrucción del tejido y a la discapacidad del paciente. Más del 50% de los enfermos sufre discapacidad grave 10 años después del comienzo de la enfermedad (Blumberg y Fox 2001), pudiéndose reducir la esperanza de vida de estos pacientes (Gabriel y cols. 2003).

#### **1.1.1. Proceso inflamatorio**

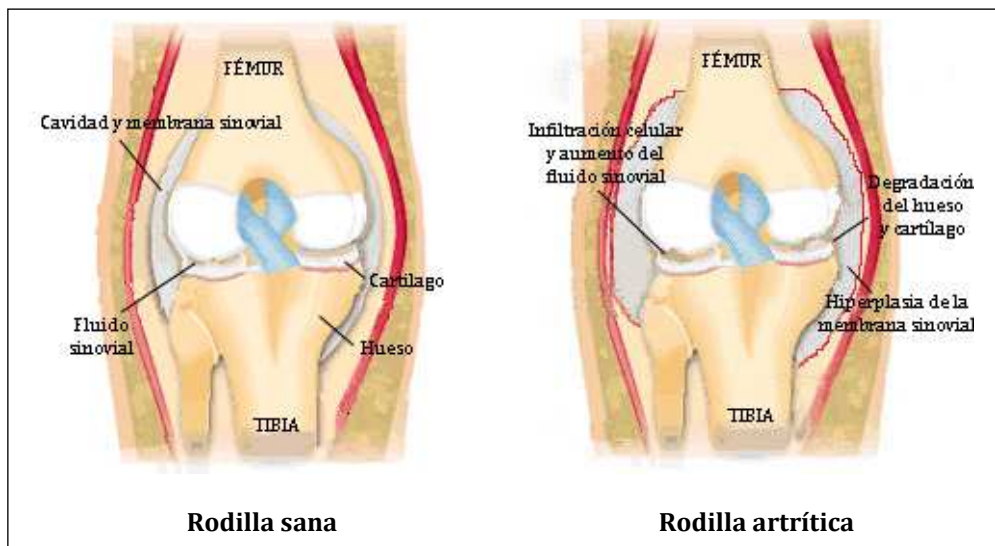
La cavidad sinovial de la articulación está recubierta por la membrana sinovial que produce el fluido sinovial y nutre al cartílago. El sinovio está compuesto por dos tipos de células, las células tipo macrófago y las células tipo fibroblasto. Las células tipo macrófago son las responsables de fagocitar sustancias exógenas así como de actuar como células presentadoras de antígenos. Las células tipo fibroblasto son las responsables del mantenimiento de la matriz sinovial y las principales productoras de fluido sinovial (Iwanaga y cols. 2000).

La principal característica fisiopatológica de la AR es la inflamación del tejido sinovial. Durante este proceso de inflamación crónica de la articulación se produce una proliferación de la membrana sinovial (hiperplasia), una infiltración de células inflamatorias, un aumento del líquido sinovial y una mayor vascularización (figura 1). La presencia de un amplio espectro de células inflamatorias tales como monocitos, macrófagos, fibroblastos, linfocitos T y B, leucocitos polimorfonucleares (PMNs) y células plasmáticas, da lugar a una respuesta inmune continuada en la articulación reumática. La gravedad y progresión de la sinovitis depende de la acumulación y activación local de estas células, que liberan gran

cantidad de mediadores proinflamatorios como citocinas, quimiocinas, especies reactivas de oxígeno (ROS) y enzimas degradativas, responsables de regular la severidad de la sinovitis así como la degradación del cartílago y hueso subcondral.

Otro de los procesos más característicos de la AR es la formación de pannus, que se define como tejido sinovial de carácter invasivo formado por macrófagos, osteoclastos y por células tipo fibroblasto. Estas células liberan citocinas como la interleucina (IL)-1 $\beta$ , la IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). Este tejido es el responsable de la erosión general de la articulación al provocar la degradación del cartílago, del hueso subcondral y de los ligamentos.

**Figura 1.** Características de la articulación de la rodilla sana y artrítica.



### 1.1.2. Respuesta inmune

El mecanismo autoinmune responsable de la artritis reumatoide no está todavía bien descrito. En el sinovio se encuentran presentes tanto células características de la respuesta inmunitaria innata como de la adaptativa.

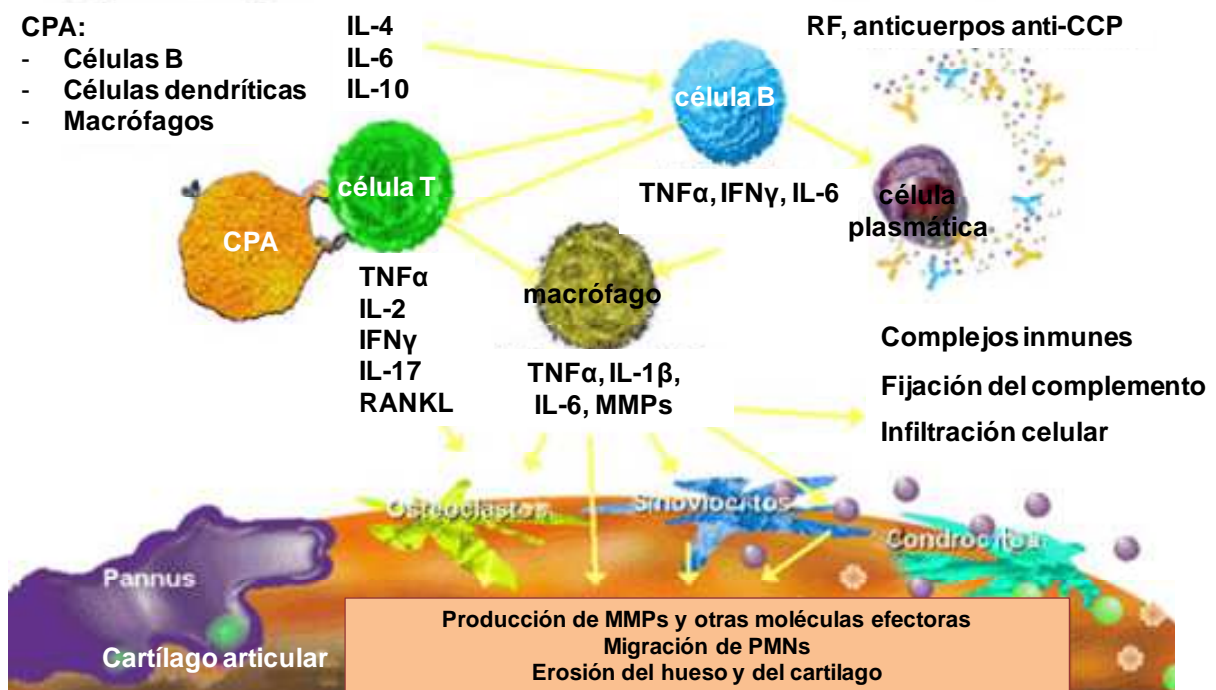
Se conoce que las células T CD4<sup>+</sup> juegan un papel central en esta enfermedad. Aunque el proceso artrítico se ha asociado tradicionalmente a una respuesta Th1 (Miossec y van den Berg 1997), recientemente, se ha identificado una nueva subpoblación linfocitaria Th17, distinta de las subpoblaciones Th1 y Th2, que



puede participar en la patogenia de la enfermedad (Chabaud y cols. 1999, Kotake y cols. 1999, Lubberts 2010).

Las distintas células que actúan como células presentadoras de antígeno (CPA) (linfocitos B, células dendríticas y macrófagos) activan los linfocitos T, los cuales estimulan monocitos/macrófagos, células tipo fibroblasto del sinovio y células B que producen la liberación de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  y metaloproteinasas de matriz (MMPs). Las células B, además de actuar como CPA, son las responsables de la liberación de anticuerpos, mayoritariamente inmunoglobulinas (Ig) de tipo G (Aarvak y Natvig 2001, Mewar y Wilson 2006, Takemura y cols. 2001). Otras células características de la inmunidad innata, como neutrófilos y mastocitos, están presentes en el sinovio. Estas células producen la liberación de citocinas, proteasas y ROS que colaboran en el proceso inflamatorio y en la destrucción del cartílago (Griffiths 2008) (figura 2).

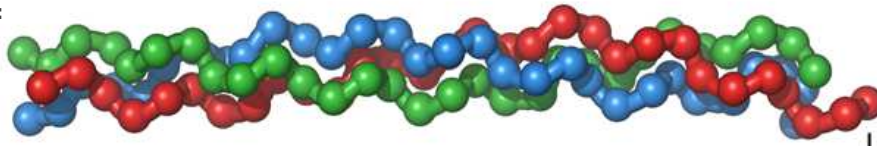
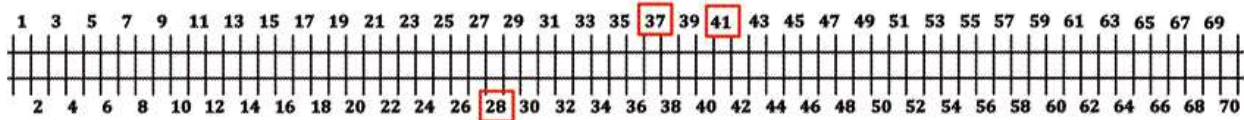
**Figura 2.** Células y mediadores implicados en el proceso inflamatorio durante la artritis reumatoide. Imagen adaptada de Silverman y Carson, 2003 y Smolen y Steiner, 2003.



Abreviaturas indicadas en la figura: CPA, células presentadoras de antígenos, interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B (RANKL), interferón gamma (IFN $\gamma$ ), metaloproteinasas de matriz (MMPs), polimorfonucleares (PMNs), factor reumático (RF) y péptido cíclico citrulinado (CCP).

### **- Respuesta inmune frente al colágeno**

El comienzo de la artritis reumatoide se produce al darse lugar una reacción cruzada autoinmune entre las inmunoglobulinas y el colágeno tipo II (CII) del cartílago, lo que provoca la aparición de los signos inflamatorios de la enfermedad. Estudios realizados con anticuerpos monoclonales han descrito distintas regiones inmunodominantes (péptidos o epítomos) del colágeno del ratón (Andersson y Holmdahl 1990, Schulte y cols. 1998, Terato y cols. 1992) (figura 3). Esta información nos facilita el estudio de la estructura del colágeno, así como el análisis de la especificidad de los anticuerpos anti-CII. Varios estudios han demostrado la existencia de diversos epítomos del CII con actividad artrítogénica que se ven aumentados en pacientes con artritis reumatoide, pero que, sin embargo, están disminuidos en otras enfermedades artríticas como la osteoartritis (Burkhardt y cols. 2002, Nandakumar y cols. 2008). En animales con artritis inducida por colágeno (CIA) se ha observado que varios epítomos (principalmente C1, U1 y J1) presentan una alta respuesta autoinmune y además, en el modelo animal de artritis inducida por anticuerpos frente al colágeno (CAIA), se observa que la inyección de anticuerpos monoclonales frente a esos epítomos provoca el desarrollo de la enfermedad (Nandakumar y Holmdahl 2006, Nandakumar y cols. 2003a, Nandakumar y cols. 2003b). Por otro lado, estudios en humanos han demostrado que la especificidad de la respuesta inmune frente al epítomo C1 aparece al inicio de la enfermedad mientras que la observada frente al U1 se mantiene durante toda la enfermedad y se inhibe por el tratamiento con ciclosporina A o anti-CD4 (Burkhardt y cols. 2005, Kraetsch y cols. 2001).

**Figura 3.** Estructura del colágeno.**A. Triple hélice:****B. Esquema de los distintos péptidos:****C. Secuencia de aminoácidos de distintos epítomos:**

**C1** (Péptido 28): GDPGRPGEPGLPGARGLTGRPGDA  
**U1** (Péptido 37): GDQGIPGEAGAPGLVGPRGERGFP  
**J1** (Péptido 41): GAQGPPGLQGMPGERGAAGIAGPK

**1.1.3. Citocinas y otros mediadores implicados**

Las citocinas juegan un papel crucial en la AR (Lubberts y van den Berg 2003). Las citocinas son moléculas de naturaleza peptídica sintetizadas en respuesta a un estímulo proinflamatorio que ejercen sus acciones de forma coordinada y secuencial (Hanada y Yoshimura 2002).

Las citocinas TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , liberadas principalmente por macrófagos y linfocitos, son responsables de inducir la síntesis de quimiocinas, como IL-8 y moléculas de adhesión, como la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), de aumentar la liberación de ROS, de inducir la expresión de enzimas proinflamatorias, como ciclooxigenasa(COX)-2 y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), y de incrementar la producción de enzimas degradativas, como las MMPs, que degradan la matriz extracelular del cartílago. Estudios en distintos modelos experimentales de artritis muestran el papel primordial de estas dos citocinas en la patogénesis de la enfermedad, contribuyendo a la cronicidad de la misma. La sobreproducción de TNF $\alpha$  en ratones transgénicos y de IL-1 $\beta$  en ratones deficientes en el antagonista del receptor de la IL-1 $\beta$ , causa una artritis progresiva y crónica en los ratones (Horai y cols. 2000, Keffer y cols. 1991). La neutralización del TNF $\alpha$  disminuye la severidad de la enfermedad en el modelo CIA en ratón, especialmente cuando el

tratamiento comienza antes de la fase inicial, indicando que el TNF $\alpha$  tiene un papel crucial durante el inicio de la enfermedad aunque menor en la progresión del proceso. Por el contrario, el bloqueo de IL-1 $\beta$  resulta efectivo tanto en la fase temprana como en estadios avanzados de CIA, reduciendo de forma significativa la progresiva destrucción articular (Joosten y cols. 1996, van den Berg y cols. 1994).

IL-6 es otra citocina expresada abundantemente en las articulaciones inflamadas donde media la sinovitis crónica e induce la formación de pannus y la activación de osteoclastos. IL-6 también participa en la maduración de células B y en la migración leucocitaria. Además, en distintos modelos de enfermedades autoinmunes, esta citocina juega un papel crítico en la generación de linfocitos Th17, pudiendo estar también implicada en las manifestaciones sistémicas extra-articulares del proceso artrítico (Dayer y Choy 2010).

Por otro lado, las citocinas antiinflamatorias Th2, IL-4 e IL-10, pueden ejercer un papel protector durante la artritis experimental (Joosten y cols. 1997, Joosten y cols. 1999, Lubberts y cols. 1999). Estos mediadores Th2 podrían tener un efecto inhibitorio directo de la actividad de macrófagos en el sinovio, así como de la actividad Th1. Además, IL-4 e IL-10 pueden inhibir la actividad Th17 (Heo y cols. 2010, Iwakura y Ishigame 2006, Lubberts y cols. 2000).

#### **1.1.4. Tratamiento farmacológico**

En la actualidad, no existe ningún tratamiento capaz de curar la AR. Los tratamientos empleados se basan en suprimir la inflamación sinovial o lograr la mínima actividad inflamatoria posible para evitar o disminuir el daño estructural articular y el consecuente deterioro funcional del aparato locomotor. Estos tratamientos se dividen en tres grupos:

##### **- Farmacos antiinflamatorios y analgésicos**

Los **antiinflamatorios no esteroideos**, controlan el dolor por inhibición de la formación de prostaglandinas (PGs) pero no son capaces de disminuir la progresión de la enfermedad.

Los **glucocorticoides**, potentes antiinflamatorios e inmunosupresores, regulan la expresión de diferentes genes y son capaces de reducir la progresión de la enfermedad (Kirwan y cols. 2007).

#### - **Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad**

El **metotrexato** es el fármaco de este grupo más ampliamente utilizado una vez diagnosticada la enfermedad. Este fármaco inhibe la proliferación celular, la activación de células T e induce la apoptosis por modulación del estrés oxidativo (Herman y cols. 2008). La **leflunomida** también inhibe el sistema inmunitario y se utiliza sola o en combinación con el metotrexato (Maddison y cols. 2005).

#### - **Fármacos biológicos**

Esta terapia se basa en la utilización de anticuerpos monoclonales o proteínas recombinantes capaces de inhibir o bloquear la acción de una molécula proinflamatoria.

Los primeros fármacos biológicos en desarrollarse fueron el **Infliximab** y el **Adalimumab**, anticuerpos monoclonales frente al TNF $\alpha$  y el **Etanercept**, forma recombinante del receptor p75 del TNF $\alpha$  que está formado por dos copias solubles de ese receptor unidas a la porción constante de la IgG1 humana. Recientemente se han desarrollado otros fármacos anti-TNF $\alpha$ . El **Golimumab**, anticuerpo humano completo frente al TNF $\alpha$ , es capaz de unirse y neutralizar el TNF $\alpha$  soluble y el unido a la membrana. El **Certolizumab-Pegol** es un fragmento Fab' de un anticuerpo humanizado recombinante contra el TNF $\alpha$  al que la PEGilación (unión de péptidos al polietilenglicol) le confiere una mayor biodisponibilidad, un mayor tiempo de circulación en el organismo y una mejora en la penetración y retención del fármaco en el tejido (Tak y Kalden 2011).

Frente a los efectos producidos por la IL-1 $\beta$  existe el **Anakinra**, antagonista del receptor tipo I. Este fármaco no es uno de los de primera elección ya que su eficacia es menor que la de otras terapias biológicas utilizadas (Singh y cols. 2009, Zwerina y cols. 2005a).

Otros anticuerpos monoclonales empleados en el tratamiento de la AR son el anti-IL-6 o **Tocilizumab** y el anti-CD20 conocido como **Rituximab**, que bloquea la actividad de las células B (Nishimoto y cols. 2004, Reff y cols. 1994). A diferencia

del Tocilizumab, el uso de Rituximab en monoterapia no está avalado por ningún estudio en este momento.

Por último, el **Abatacept** es una proteína de fusión CTL<sub>4</sub>Ig capaz de inhibir la activación de las células T (Kremer y cols. 2003). Su uso en la AR está aprobado desde 2005 y ha demostrado su eficacia y seguridad en el tratamiento de esta enfermedad (Tak y Kalden 2011).

## 1.2. Osteoporosis

La Organización Mundial de la Salud define la osteoporosis como una enfermedad sistémica caracterizada por una masa ósea baja y un deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, que conducen a una mayor debilidad ósea y a un aumento de riesgo de fracturas.

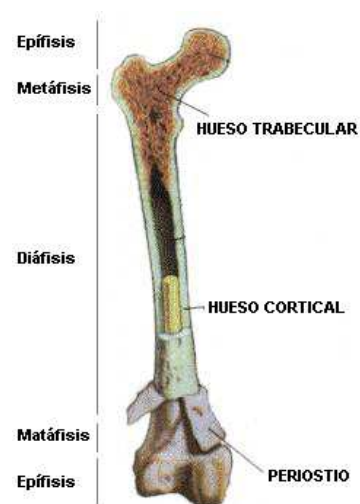
La incidencia de osteoporosis es mayor en mujeres que en hombres, estimándose que afecta a 200 millones de mujeres en el mundo. En España, el 35% de mujeres mayores de 50 años la sufre y este porcentaje se eleva a un 52% en las mayores de 70 años.

### 1.2.1. Hueso

El sistema óseo juega un papel muy importante en el organismo tanto a nivel biomecánico como metabólico. Está formado por huesos y por tejido conectivo que permite la unión de éstos. La composición química de los huesos es un 5-10% de agua, un 45-70% de minerales (fosfato y carbonato cálcico) y un 20-40% de materia orgánica (principalmente colágeno y otras proteínas).

Los huesos son el principal componente del esqueleto y pueden ser de cuatro tipos dependiendo de su forma: hueso corto, hueso largo, hueso plano y hueso irregular. Los huesos largos, como por ejemplo el fémur, se

Figura 4. Estructura del fémur.



caracterizan por tener una forma cilíndrica y ser más largos que anchos. Estos huesos se dividen en tres partes: **diáfisis** (parte central), **epífisis** (extremo) y **metáfisis** (entre la diáfisis y la epífisis). Las estructuras óseas que encontramos en ellos son el **hueso cortical** o rígido y el **hueso trabecular** o esponjoso. El primero es el que se encuentra en la parte externa de los huesos y el último es el que se encuentra en el interior de los huesos, principalmente en los extremos de estos. Además de esas estructuras óseas, el hueso está recubierto por una membrana fibrosa denominada **periostio** que contiene vasos sanguíneos y nervios que lo nutren y le dan sensibilidad (Clarke 2008) (figura 4).

#### - **Componente celular del hueso:**

En el tejido óseo podemos encontrar cuatro tipos de células: osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos.

Las células **osteoprogenitoras** u osteógenas son esencialmente osteoblastos inactivos y las podemos encontrar sobre la superficie ósea.

Los **osteoblastos** derivan de células mesenquimales, se encargan de sintetizar la matriz ósea y participan en la calcificación del hueso. Estas células secretan colágeno tipo I y otras proteínas de matriz (proteoglicanos y proteínas no colagenadas) y se encargan de la síntesis y depósito de los cristales de fosfato cálcico como la hidroxapatita.

La diferenciación de las células mesenquimales en osteoblastos implica la participación de los factores de transcripción Runx2 y Osterix. Runx2 regula la expresión de diferentes genes implicados en el remodelado óseo como el gen de la fosfatasa alcalina (ALP), osteocalcina, colágeno, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), RANKL, osteoprotegerina (OPG) y colagenasa entre otros. Este factor de transcripción es necesario para dirigir la diferenciación de las células mesenquimales progenitoras al estadio de preosteoblasto (Ducy 2000). Además, Runx2 regula la expresión de Osterix, factor de transcripción encargado de dirigir a los preosteoblastos hacia la fase de osteoblasto (Komori 2006, Nishio y cols. 2006). Además de estos mecanismos de activación, existen otros factores que regulan el desarrollo y la maduración de los osteoblastos, como son las proteínas

morfogenéticas óseas, los factores de crecimiento de fibroblastos e insulínico, la parathormona, prostaglandinas y las proteínas Wnt (Eriksen 2010).

Cuando los osteoblastos migran a la matriz que ellos mismos han formado, quedan depositados en las lagunas y es aquí dónde maduran y se transforman en **osteocitos**. Los osteocitos están unidos entre ellos mediante prolongaciones citoplasmáticas por las que intercambian iones y moléculas pequeñas. La principal función de los osteocitos es la de transmitir señales entre las células para controlar el remodelado óseo. Los mecanismos de señalización implicados en este proceso de transmisión incluyen a la PGE<sub>2</sub>, la COX-2, varias cinasas, el Runx2 y el NO (Clarke 2008, Franz-Odenaal y cols. 2006).

Los **osteoclastos** son células multinucleadas procedentes de la fusión de células mononucleares tipo macrófago-monocito y son los encargados de la resorción ósea. La osteoclastogénesis se produce normalmente por la acción de RANKL y MCSF (factor estimulante de colonias de macrófagos), vía canónica, sobre las células precursoras mononucleares. Una vez activados, los osteoclastos se unen a la superficie de la matriz, se polarizan y modifican su estructura presentando unos pliegues en la superficie que está en contacto con la matriz. Por estos pliegues, los osteoclastos secretan iones de hidrógeno que acidifican la zona y disuelven el componente mineral, de manera que se produce la resorción ósea con la formación de una excavación profunda denominada laguna de resorción. Además, los osteoclastos secretan catepsina K, colagenasas e hidrolasas que digieren la matriz y disuelven los cristales de las sales de calcio (Clarke 2008, Vaananen y Laitala-Leinonen 2008).

### **1.2.2. Remodelado óseo por el sistema RANK/RANKL/OPG**

El receptor activador del factor nuclear kappa B (RANK), su ligando (RANKL) y la osteoprotegerina (OPG) son moléculas, de la superfamilia del factor de necrosis tumoral, muy importantes en el control del remodelado óseo (Jabbar y cols. 2011).

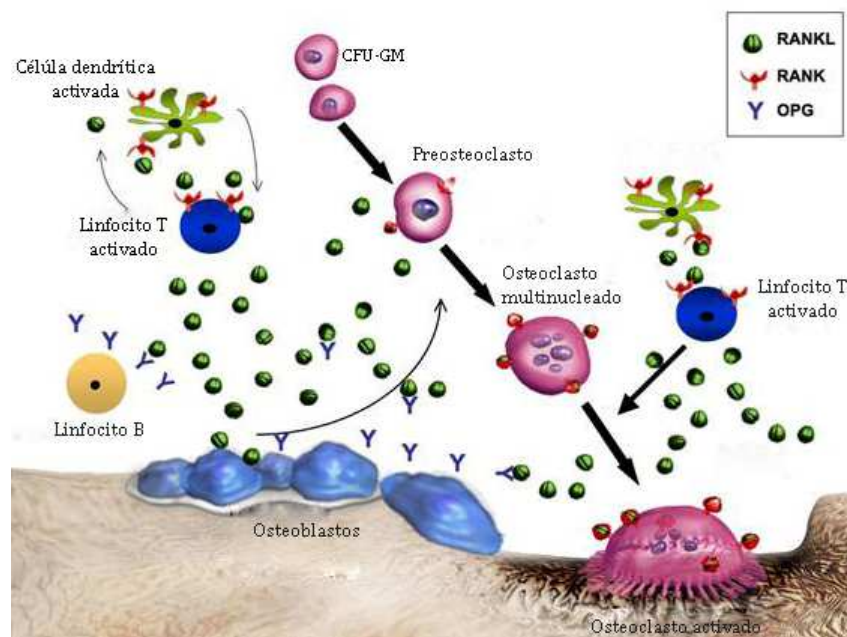
El RANKL está producido por distintos tipos celulares como células T activadas, células B, osteoblastos, macrófagos, fibroblastos del sinovio, condrocitos,



neutrófilos, etc. Esta molécula se une a su receptor (RANK) presente en células progenitoras de osteoclastos y en osteoclastos maduros y regula la osteoclastogénesis, la maduración y activación de estas células y previene su apoptosis (Burgess y cols. 1999). Todo ello produce el incremento del número y actividad de osteoclastos, llevando a una mayor resorción ósea.

La OPG es un receptor soluble producido por osteoblastos, células endoteliales y linfocitos, entre otros, al que también se puede unir el RANKL. La OPG neutraliza la actividad del RANKL al bloquear su unión con el receptor RANK. De esta manera, se impide la activación de los osteoclastos y se inhibe la resorción ósea (Simonet y cols. 1997) (figura 5).

**Figura 5.** Remodelado óseo por la vía RANK/RANKL/OPG. Imagen adaptada de Boyle y cols. 2003.



### 1.2.3. Osteoporosis postmenopáusica

El tipo de osteoporosis más común es la osteoporosis postmenopáusica. La principal causa de esta osteoporosis es la pérdida de estrógenos producida tras la menopausia (Khosla y cols. 2011). Los estrógenos son capaces de regular el remodelado óseo al actuar sobre diferentes células: reducen la resorción ósea por inhibición de la diferenciación y la apoptosis de los osteoclastos, incrementan los niveles de OPG y disminuyen los de RANKL producidos por los osteoblastos e

inhiben la liberación de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  por las células T y macrófagos. Además, los estrógenos pueden modular el balance de Ca<sup>2+</sup> favoreciendo su absorción intestinal y limitando su eliminación renal (Dick y cols. 2005).

En mujeres que presentan osteoporosis y son tratadas con terapia hormonal sustitutiva, se observa una recuperación la densidad mineral ósea (DMO) y una disminución de marcadores de pérdida ósea, confirmándose así el efecto de los estrógenos sobre esta enfermedad (Christiansen y Rodbro 1983, Sornay-Rendu y cols. 2003).

#### **1.2.4. Citocinas y otros mediadores**

Al igual que en la AR, las citocinas proinflamatorias juegan un papel esencial en el desarrollo de la osteoporosis.

Las principales citocinas implicadas en esta enfermedad son la IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-17, IL-23 e IL-6. Los ratones *knock-out* en IL-1 $\beta$  o en TNF $\alpha$  no desarrollan osteoporosis tras extraerles los ovarios (Lorenzo y cols. 1998, Roggia y cols. 2001). Las citocinas IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  incrementan la osteoclastogénesis y la supervivencia de los osteoclastos y además favorecen la apoptosis de los osteoblastos (Jimi y cols. 1998, Robinson y cols. 2007, Tsuboi y cols. 1999, Zhao y cols. 2011a). Estos efectos están regulados por los niveles de RANKL. Por ejemplo, la ausencia del receptor para TNF $\alpha$  en ratones transgénicos provoca una reducción de los niveles de RANKL y, por lo tanto, una reducción en la resorción ósea (Zhang Y. H. y cols. 2001).

Otras de las citocinas implicadas en el metabolismo óseo son la IL-17 e IL-23, citocinas procedentes de células Th17. La inyección de lipopolisacárido (LPS) en ratones *knock-out* en IL-17 o IL-23 provoca una menor destrucción ósea y menor formación de osteoclastos en estos ratones que en sus controles *wild type* (Sato y cols. 2006). El papel de estas citocinas sobre el metabolismo óseo se confirma al aumentar el ratio RANKL/OPG y como consecuencia, estimular la osteoclastogénesis. Además, estas citocinas favorecen la diferenciación y apoptosis de los osteoblastos (Adamopoulos y cols. 2010, Nakashima y cols. 2000).

La citocina IL-6 es muy importante, tanto en la osteoporosis como en la artritis reumatoide, por su efecto directo sobre los niveles de RANKL y por ser capaz de estimular la proliferación de células Th17 (Zhou y cols. 2007). La ausencia de IL-6 protege a los ratones frente al desarrollo de osteoporosis tras ovariectomía (Poli y cols. 1994).

Durante la menopausia, cuando hay un déficit de estrógenos, se produce el aumento de la liberación de estas citocinas proinflamatorias favoreciendo la resorción ósea. Tras el tratamiento con estrógenos los niveles de estas citocinas disminuyen y la densidad ósea se recupera, lo que confirma que la acción de estas citocinas está mediada directamente por los estrógenos (Ralston 1994).

### **1.2.5. Tratamiento farmacológico**

Diferentes terapias son utilizadas en el tratamiento de la osteoporosis. Estas terapias están dirigidas a promover la formación de hueso o a inhibir la resorción ósea.

#### **- Actúan sobre la formación de hueso**

Los fármacos que favorecen la formación de hueso se consideran agentes anabólicos.

La **hormona paratiroidea** es una hormona secretada por las glándulas paratiroides que regula el metabolismo del calcio y del fosfato. Cuando esta hormona es administrada exógenamente es capaz de aumentar el número de osteoblastos y estimular la formación ósea. El tratamiento con esta hormona, reduce la aparición de fracturas y además es capaz de mejorar la resolución de las mismas (Aslan y cols. 2011). Esta hormona también provoca un aumento en los marcadores de formación ósea como el propéptido N-terminal del colágeno tipo I (PINP) y la ALP (Panico y cols. 2011).

El **ranelato de estroncio** se define como la unión de un ácido orgánico, el ácido ranélico, con 2 átomos de estroncio estable. Este fármaco tiene una actividad dual al favorecer la formación ósea e inhibir la resorción. Esta actividad está mediada por la inhibición de la activación del factor nuclear kappa B (NFκB), lo que provoca

la estimulación de la osteoblastogénesis y la inhibición de la formación de osteoclastos (Yamaguchi y Weitzmann 2012).

#### **- Actúan sobre la resorción ósea**

Los **bifosfonatos** son los fármacos más utilizados en el tratamiento de la osteoporosis por inhibir la resorción ósea. Estas moléculas se caracterizan por poseer una estructura P-C-P y se dividen en dos grupos dependiendo de si poseen nitrógeno (alendronato, neridronato, ibandronato, pamidronato, risedronato y ácido zolendrónico) o no (etidronato y tiludronato) en su estructura. Estos fármacos se unen a la superficie ósea y, posteriormente, son internalizados por los osteoclastos. Una vez en el interior de los osteoclastos, los bifosfonatos son capaces de interferir en el metabolismo celular de éstos y de favorecer su apoptosis (Hughes y cols. 1995).

La **terapia hormonal sustitutiva** consiste en administrar a los pacientes estrógenos o estrógenos junto con progestágenos o andrógenos. Diversos estudios han demostrado que los pacientes a los que se les administran estas hormonas presentan una menor pérdida de masa ósea y una menor incidencia de fracturas (Banks y cols. 2004).

Los **moduladores selectivos de los receptores estrogénicos** son fármacos que se unen a los receptores de estrógenos en diferentes tejidos. Estas moléculas tienen actividad agonista, antagonista o ambas, dependiendo del tejido en el que se encuentre el receptor al que se unen (Riggs y Hartmann 2003). Las últimas investigaciones con estos fármacos se basan en intentar conseguir el agente ideal que poseería una actividad agonista sobre el hueso, sistema cardiovascular y sistema nervioso central, y con una actividad antagonista o neutra sobre el tejido mamario y endometrio (Taylor 2009).

#### **- Otros fármacos**

Existen otros fármacos para el tratamiento de la osteoporosis que no están incluidos en la clasificación anterior. Estos tratamientos pueden basarse en suplementos de **calcio** y de **vitamina D<sub>3</sub>** que aumentan la densidad mineral ósea y reducen el número de fracturas, aunque parece ser que ambos efectos no están relacionados (Nordin 2009, Rabenda y cols. 2011).

Otros tratamientos se basan en la terapia inmunológica con anticuerpos frente a mediadores. La administración de **denosumab**, anticuerpo monoclonal frente al RANKL, produce un aumento de la DMO y una menor aparición de fracturas en mujeres postmenopáusicas al inhibir la formación y actividad de los osteoclastos (Bone y cols. 2008, Papapoulos y cols. 2011).

### **1.3. Artritis reumatoide y osteoporosis**

La osteoporosis es una de las principales complicaciones extra-articulares características de la AR que lleva a un aumento de la aparición de fracturas en estos pacientes (Deodhar y Woolf 1996). Uno de los mecanismos más importantes implicados en esta relación es la inflamación. Diversos estudios han demostrado que fármacos que bloquean la liberación de citocinas proinflamatorias son capaces de prevenir la pérdida de densidad ósea (Roux 2011). Además de los mediadores inflamatorios, los estrógenos también juegan un papel esencial en la aparición de la osteoporosis en pacientes artríticos (Islander y cols. 2011a).

#### **1.3.1. Influencia de los estrógenos en la artritis reumatoide**

##### **- Aumento de estrógenos**

Durante el embarazo, los niveles de estrógenos aumentan y actúan directamente sobre los niveles de linfocitos T. Se produce una reducción de la respuesta inmune celular mediada por los linfocitos Th1 y un aumento de la respuesta inmune humoral mediada por los linfocitos Th2. Además, los linfocitos T reguladores también están aumentados. Este desplazamiento hacia la respuesta Th2 y el aumento de linfocitos T reguladores produce una mayor liberación de las citocinas IL-4 e IL-10 y como consecuencia de ello, una mejora del paciente con una disminución en los parámetros artríticos (Doria y cols. 2006, Forger y cols. 2008).

El aumento de estrógenos por la administración de anticonceptivos orales también confirma el efecto de estas hormonas sobre la AR. Diversos estudios han demostrado que el uso de anticonceptivos orales reduce la aparición de la AR y si se administran una vez ya ha aparecido la enfermedad, son capaces de mejorar sus síntomas (Camacho y cols. 2011, Doran y cols. 2004).

### **- Reducción de estrógenos**

La disminución en los niveles de estrógenos puede producirse de manera quirúrgica por extracción de los ovarios o de manera fisiológica durante la menopausia.

Experimentos con ratones artríticos han demostrado que el déficit de estrógenos por intervención quirúrgica (ovariectomía) aumenta la frecuencia y la severidad de la enfermedad. La posterior administración de estrógenos en estos ratones, es capaz de frenar la evolución de la artritis (Holmdahl y cols. 1986a, Holmdahl y cols. 1989, Jansson y Holmdahl 1992).

En mujeres, el pico de incidencia de la AR ocurre durante la menopausia (Goemaere y cols. 1990). Por ello, se considera que la deficiencia de estrógenos durante la menopausia es un factor muy importante en el desarrollo de la AR.

### **1.3.2. Tratamiento farmacológico**

El objetivo del tratamiento de los pacientes artríticos con osteoporosis está dirigido a disminuir la inflamación además de controlar la pérdida ósea. Para controlar la inflamación, el tratamiento de elección es el uso de **glucocorticoides**, pero debido a que el uso prolongado de estos fármacos está asociado a la aparición de osteoporosis y al incremento del riesgo de fracturas, este tratamiento no es de gran utilidad en estos casos (Lafage-Proust y cols. 2003).

La **terapia hormonal sustitutiva** ha demostrado controlar la AR disminuyendo la destrucción ósea y la inflamación e incrementando la densidad mineral ósea (D'Elia y cols. 2003). El problema de este tratamiento es que no puede ser usado de manera crónica debido a sus importantes efectos secundarios (Beral 2003, Beral y cols. 2007, Sare y cols. 2008).

Los **bifosfonatos** son fármacos de elección para el tratamiento de la osteoporosis y además han demostrado ser capaces de prevenirla cuando se produce como consecuencia del uso de glucocorticoides (Kaji y cols. 2010). La mayoría de los estudios indican que estos fármacos disminuyen la pérdida generalizada de hueso pero no la local (Breuil y Euller-Ziegler 2006). Los efectos adversos más comunes de estos fármacos son los problemas gástricos relacionados con su administración

oral o la aparición de fiebre y mialgias tras su administración intravenosa. Recientemente, se ha descrito su posible relación con la aparición de osteonecrosis de mandíbula aunque no hay ninguna evidencia que lo confirme (Reid 2011).

Debido a que no existe un fármaco que controle ambos procesos de manera segura, están siendo estudiadas otras herramientas farmacológicas que combinan el uso de más de un fármaco. Por ejemplo, una alternativa para evitar la pérdida de hueso en pacientes artríticos es la combinación de **bifosfonatos** con **terapia anti-RANKL** o con fármacos que controlan la inflamación y la evolución de la artritis como el **metotrexato** (Dore y cols. 2010, Le Goff y cols. 2009). Además, distintos estudios en animales ovariectomizados y con artritis han demostrado que el **raloxifeno**, un modulador selectivo de los receptores estrogénicos, solo o junto a **dexametasona** es capaz de inhibir el proceso artrítico y la pérdida de hueso (Islander y cols. 2011b, Jochems y cols. 2008).

Aunque algunos de estos tratamientos parecen ser efectivos en el control tanto del proceso artrítico como de la pérdida del hueso, es necesario continuar con la búsqueda de nuevas herramientas terapéuticas para el tratamiento de estas patologías.

## 2. ESTRÉS OXIDATIVO

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), así como las de nitrógeno, son productos del metabolismo fisiológico celular y, a bajas concentraciones, presentan efectos beneficiosos para el organismo al participar en la defensa frente a agentes infecciosos, en la inducción de la respuesta mitogénica, en la generación de energía, en la regulación de la señalización celular, en el control del tono vascular, en la apoptosis celular, etc. (Valko y cols. 2007).

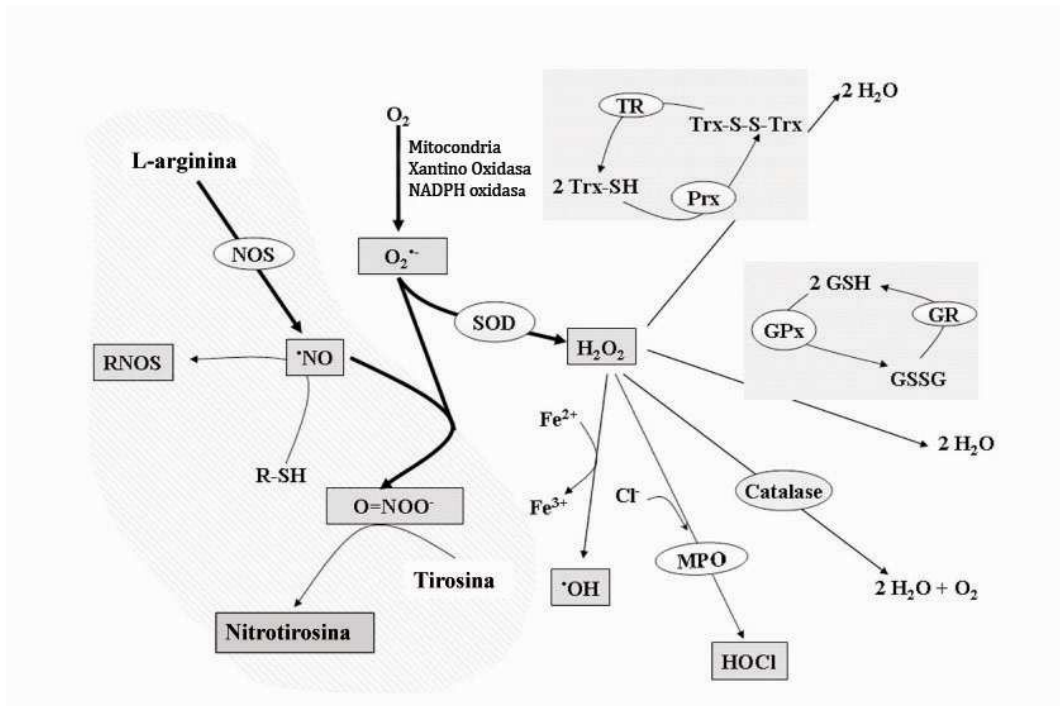
El estrés oxidativo está causado por un desequilibrio entre la formación y la eliminación de ROS, que incluyen radicales libres y peróxidos. Cuando el oxígeno molecular acepta un electrón proveniente de un agente reductor, se forma un radical libre con capacidad oxidante llamado anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). El  $O_2^{\cdot-}$ , mediante una serie de reacciones rápidas y en cadena, da lugar a otros radicales

libres. Estos radicales libres, en condiciones normales no causan daño celular ya que la célula está provista de gran cantidad de mecanismos de defensa, entre ellos mecanismos preventivos, mecanismos de reparación del daño y mecanismos antioxidantes que incluyen sistemas enzimáticos (superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa) y sistemas no enzimáticos (ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, glutatión, carotenoides y flavonoides, entre otros). Sin embargo, cuando la capacidad antioxidante se ve superada por las agresiones oxidantes, es cuando se da lugar al estrés oxidativo (figura 6).

Las altas concentraciones de ROS provocan daño en la estructura celular, en los ácidos nucleicos, en los lípidos y en las proteínas, de manera que se ha comprobado que el estrés oxidativo está implicado en numerosos procesos degenerativos y patológicos, que incluyen el envejecimiento, el cáncer, enfermedades cardiovasculares y metabólicas, enfermedades neurológicas, así como también, procesos inflamatorios (Ma 2010, Valko y cols. 2007). Sin embargo, algunos autores han descrito el efecto antiinflamatorio de ROS. Teissier y cols, han demostrado que la inducción de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida oxidasa (NADPH oxidasa) por PPAR $\alpha$  provoca la inhibición del marcador inflamatorio iNOS en macrófagos humanos y de ratón (Teissier y cols. 2004). Además, en otros estudios *in vivo* se ha observado que la ausencia de estrés oxidativo provoca un aumento de la inflamación en modelos de artritis y de enfermedad granulomatosa crónica (Hultqvist y cols. 2004, Schappi y cols. 2008).



**Figura 6.** Generación de ROS y enzimas antioxidantes. Imagen adaptada de Zhao y cols. 2007.



Abreviaturas indicadas en la figura: GPX, glutatión peroxidasa; GR, glutatión reductasa; GSH, glutatión; GSSG, disulfuro de glutatión; MPO, mieloperoxidasa; NADPH oxidasa, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa; NOS, óxido nítrico sintasa; Prx, peroxirredoxina; RNOS, especies reactivas del nitrógeno; SOD, superóxido dismutasa; TR, tiorredoxina reductasa; Trx, tiorredoxina; Trx-S-S-Trx, disulfuro de tiorredoxina.

Hay distintos sistemas responsables de la síntesis de ROS, entre ellas NADPH oxidasa, la cadena respiratoria mitocondrial, ciclooxigenasas, lipoxigenasas, óxido nítrico sintasa, citocromo P450 y xantina oxidasa. Además, las ROS generadas son capaces de activar diversos factores de transcripción y enzimas, participando así en la regulación de distintas enfermedades. En la presente Tesis nos centraremos en el sistema NADPH oxidasa, en el factor de transcripción Nrf2 y en la hemo oxigenasa-1.

## 2.1. Complejo NADPH oxidasa

La enzima NADPH oxidasa se caracterizó por primera vez en células fagocíticas y se expresa mayoritariamente en neutrófilos. En menor medida, también se expresa en otras células como macrófagos, células dendríticas, células T, células B, neuronas o cardiomiocitos (Bedard y Krause 2007). NADPH oxidasa es una importante fuente biológica de producción del anión superóxido, el cual es muy

inestable y rápidamente puede dar lugar a otras ROS mediante diversas reacciones.

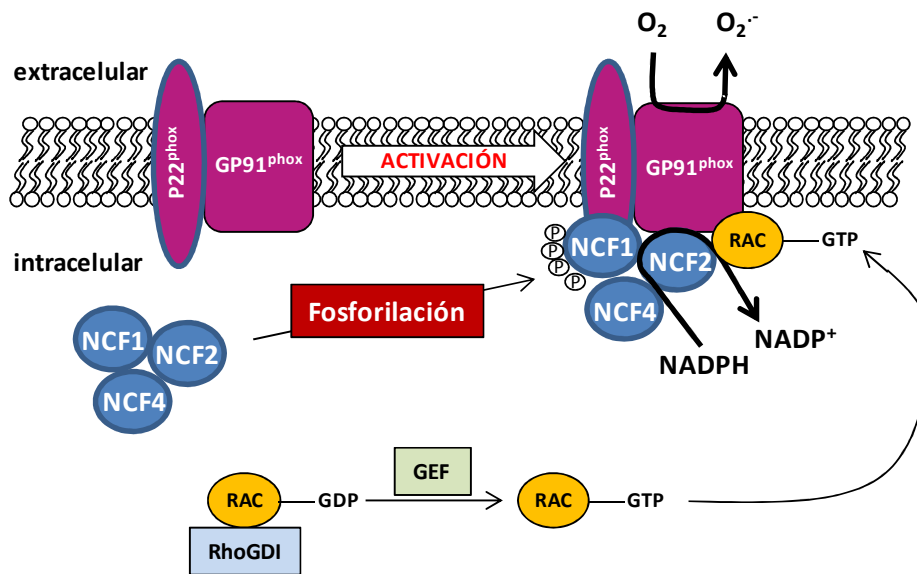
Los primeros estudios dirigidos a la caracterización del complejo NADPH oxidasa se iniciaron tras relacionar a esta enzima con la enfermedad granulomatosa crónica (CGD). En esta enfermedad, los individuos presentan células fagocíticas que no son capaces de matar a los microorganismos de manera que cuando las células mueren, los microorganismos quedan libres. Por ello, los individuos presentan una mayor susceptibilidad a sufrir infecciones por bacterias y hongos. Holmes y cols. sugirieron que esta enfermedad se debía a una deficiencia en una enzima responsable de la función fagocítica de las células (Holmes y cols. 1966). Diversos estudios confirmaron que un defecto en el sistema NADPH es el responsable de que las células fagocíticas de los pacientes con CGD no sean capaces de generar  $O_2\cdot^-$  y por lo tanto, no son capaces de matar a los microorganismos (Curnutte y cols. 1974, Johnston y cols. 1975, Segal y cols. 1978).

La enzima NADPH oxidasa es un complejo multienzimático formado por un dominio con actividad reductasa compuesto por una flavoproteína y un citocromo b558. Dependiendo de qué tipo de proteínas forman el citocromo b558, la NADPH se divide en NOX1, NOX2, NOX3 y NOX4. En el caso de la NOX2, el citocromo b558 está formado por dos proteínas transmembrana, **GP91<sup>phox</sup>** (o NOX2) y **P22<sup>phox</sup>**. Además de estas proteínas transmembrana, NADPH requiere de la presencia de cuatro proteínas citosólicas para su activación: **factor citosólico de neutrófilos (NCF) 1** (o P47<sup>phox</sup>), **NCF2** (o P67<sup>phox</sup>), **NCF4** (o P40<sup>phox</sup>) y la proteína **Rac** con actividad GTPasa. Cuando este complejo está activo, se transfieren electrones del NADPH citosólico al  $O_2$  del espacio extracelular generando  $O_2\cdot^-$  (Cross y Segal 2004) (figura 7).

Para que la activación del complejo NOX2 se lleve a cabo, el primer paso que debe ocurrir es la fosforilación de NCF1, que pasa así a su conformación activa (Johnson y cols. 1998). En esta conformación, NCF1 puede translocarse a la membrana y unirse a P22<sup>phox</sup> (Sumimoto y cols. 1996). Debido a que NCF1 está unido a las otras proteínas citosólicas, NCF2 y NCF4, su activación provoca que estos factores se transloquen a la membrana junto a él (Clark y cols. 1990, Wientjes y cols. 1993).

NCF2 es el responsable directo de la activación de NOX2, ya que cuando se transloca a la membrana se une a GP91<sup>phox</sup> y la activa (Han y cols. 1998, Takeya y cols. 2003). En último lugar, la proteína Rac interactúa directamente con NCF2 y GP91<sup>phox</sup> (Diebold y Bokoch 2001, Koga y cols. 1999). La acción de NCF4 sobre la actividad NADPH oxidasa no está del todo clara, pero estudios con ratones P40<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> o con una mutación en su gen han demostrado que esta proteína posee un papel importante en la activación de este sistema (Ellson y cols. 2006a, 2006b).

Figura 7. Formación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> por activación de NADPH oxidasa.



### 2.1.1. Factor citosólico de neutrófilos 1 (NCF1)

El NCF1 o p47<sup>phox</sup> es una proteína citosólica no glicosilada de 47KDa. Esta proteína es la encargada de la regulación de la actividad NOX2 y es esencial para su funcionamiento.

El NCF1 está compuesto por un dominio PX N-terminal, que interactúa con los fosfolípidos de membrana, una región rica en prolinas (PRR), una región autoinhibitoria C-terminal (AIR) y dos dominios SH3 (figura 8). Estos últimos interactúan con PRR en estado inactivo y con AIR cuando se activa (Leto y cols. 1994). Una vez activado NCF1 por fosforilación, PRR queda libre e interactúa con NCF2. Todo el complejo se transloca a la membrana donde se une e interacciona con GP91<sup>phox</sup> y P22<sup>phox</sup> (Sumimoto y cols. 1996, Takeya y cols. 2003).

Figura 8. Estructura de NCF1.



Se ha demostrado que el déficit de esta proteína o alguna modificación en su gen puede modificar la actividad NADPH oxidasa e influir en el desarrollo de enfermedades. Los ratones deficientes en NCF1 (Ncf1<sup>-/-</sup>) presentan infecciones bacterianas espontáneas, de manera que estos ratones están aceptados como modelo animal de la CGD (Jackson y cols. 1995). Otros modelos animales han permitido identificar la participación de esta proteína en enfermedades como la artritis o la enfermedad de Guillain-Barré (Huberle y cols. 2009, Hultqvist y Holmdahl 2005).

### 2.1.2. Papel de la NADPH oxidasa en la artritis reumatoide

La artritis reumatoide se caracteriza por una infiltración en el tejido de células inmunes mononucleares, que incluyen monocitos y macrófagos. Estas células presentan una gran actividad NADPH oxidasa y por lo tanto, producen una gran liberación de ROS y generan un marcado estrés oxidativo.

Diversos estudios han demostrado que, en pacientes artríticos, los niveles de marcadores de estrés oxidativo están aumentados (Hassan y cols. 2011, Seven y cols. 2008, Shah y cols. 2011). Además, estudios en condrocitos humanos y en un modelo animal de inflamación por zimosán, han demostrado que el inhibidor de la NADPH oxidasa apocinina es capaz de inhibir la destrucción del cartílago (Hougee y cols. 2006, Lafeber y cols. 1999). Por ello, tradicionalmente, se ha considerado que la producción de ROS durante el transcurso de la artritis reumatoide está relacionada con el daño y la alteración de los tejidos.

Sin embargo, esta idea ha cambiado desde que se observó que la disminución de ROS provoca un aumento en la incidencia y la severidad de la artritis. *In vivo*, diversos modelos animales han demostrado la participación de la proteína NCF1 en el control de la artritis reumatoide. El grupo de van de Loo demostró que los ratones P47<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> y GP91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> presentan un mayor destrucción ósea y del

cartilago, así como una mayor inflamación tras la inducción de la artritis por zimosán o por inmunocomplejos (van de Loo y cols. 2003). En otros modelos de artritis, se observó que los animales con un polimorfismo en el gen para NCF1, que inhibe la producción de ROS, presentaban un incremento en la incidencia y severidad de la misma (Hultqvist y cols. 2004, Olofsson y cols. 2003). Además, la administración de sustancias inductoras de la enzima NADPH oxidasa que aumentan la liberación de ROS, son capaces de prevenir y reducir los síntomas de la artritis (Hultqvist y cols. 2006).

### **2.1.3. Papel de la NADPH oxidasa en el remodelado óseo**

La proteína NADPH oxidasa se puede localizar en las células responsables del remodelado óseo como son los osteoblastos y los osteoclastos.

Se ha sugerido que las ROS producidas por la NADPH oxidasa en los osteoclastos son esenciales para su diferenciación y para la resorción ósea. Los osteoclastos expresan NOX2 en condiciones fisiológicas, por lo que cabría pensar que esta enzima es responsable de la regulación de la osteoclastogénesis y de la resorción ósea inducidas por ROS (Steinbeck y cols. 1994). Sin embargo, los ratones deficientes en NOX2 no presentan ninguna alteración en su estructura ósea (Yang y cols. 2001), así como tampoco se han descrito casos de variaciones óseas en pacientes con CGD.

Debido a que los niveles de NOX2 varían en los osteoclastos en función del estímulo y del tipo de células empleadas, se pensó que posiblemente esta enzima no era la única responsable de la regulación de ROS en los osteoclastos (Sasaki y cols. 2009, Yang y cols. 2002). Yang y cols. describieron un aumento de la expresión de NOX4 en ratones NOX2<sup>-/-</sup> como la responsable de la pérdida de hueso dependiente de ROS (Yang y cols. 2001).

Además de su función en los osteoclastos, se ha descrito también la expresión de NADPH oxidasa en osteoblastos. En un modelo animal de pérdida de hueso por EtOH se ha asociado la pérdida de hueso con un aumento de la expresión de NOXs en los osteoblastos. El aumento de la expresión de estas proteínas produce un aumento en la liberación de ROS por los osteoblastos, que son las responsables del

aumento del factor osteoclastogénico RANKL. Además, este efecto fue inhibido por la administración de estradiol, lo que indica la participación de los estrógenos en este mecanismo (Chen y cols. 2011).

Así pues, aunque es evidente el papel de las especies reactivas de oxígeno generadas por NADPH oxidasa en el control del remodelado óseo, son necesarios más estudios para comprender el papel de cada tipo de NOX en este proceso, así como las vías en las que intervienen. En la presente Tesis utilizaremos ratones *Ncf1*<sup>\*\*</sup>, los cuales presentan inactiva la NADPH oxidasa al poseer una modificación en el gen *Ncf1*, que nos permitirán estudiar el efecto del déficit de la actividad NOX2 en el remodelado óseo.

## 2.2. Factor de transcripción Nrf2

El factor de transcripción 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (NF-E2) (*Nrf2*) pertenece a una familia de factores de transcripción *Cap'n'collar* con una característica cremallera de leucina (bZip) en la región C-terminal. La región básica corriente arriba de bZip es la responsable de la unión al ADN, mientras que la región ácida al parecer, se requiere para la activación transcripcional (Itoh y cols. 1999).

*Nrf2* contiene 605 aminoácidos y está formado por 6 dominios, **Neh1-6**. **Neh-1** contiene la región bZip que es la responsable de la unión al ADN (Itoh y cols. 1995, Itoh y cols. 1997, Katsuoka y cols. 2005, Marini y cols. 1997). **Neh-2** posee una actividad de regulación negativa al unirse a Keap1 (Itoh y cols. 1999). Los dominios **Neh3**, **Neh4** y **Neh5** se unen a otras proteínas con actividad co-activadoras que promueven la transcripción de diversos genes (Katoh y cols. 2001, Nioi y cols. 2005). Por último, el **Neh6** controla la autorregulación de *Nrf2* independientemente de Keap1 (McMahon y cols. 2004) (figura 9).

*Nrf2* se une a los elementos de respuesta antioxidante (ARE) presentes en la región promotora de una gran cantidad de genes que codifican para enzimas citoprotectoras, antioxidantes y detoxificantes de fase II, como NAD(P)H:quinona oxido-reductasa-1 (NQO1), SOD, glutatión S-transferasa (GST), glutatión

peroxidasa (GPx), glutamato-cisteína ligasa (GCL), hemo oxigenasa-1 (HO-1), catalasa y tioredoxina, regulando así su expresión (Baird y Dinkova-Kostova 2011).

**Figura 9.** Estructura del Nrf2.



### 2.2.1. Vía de activación de Nrf2

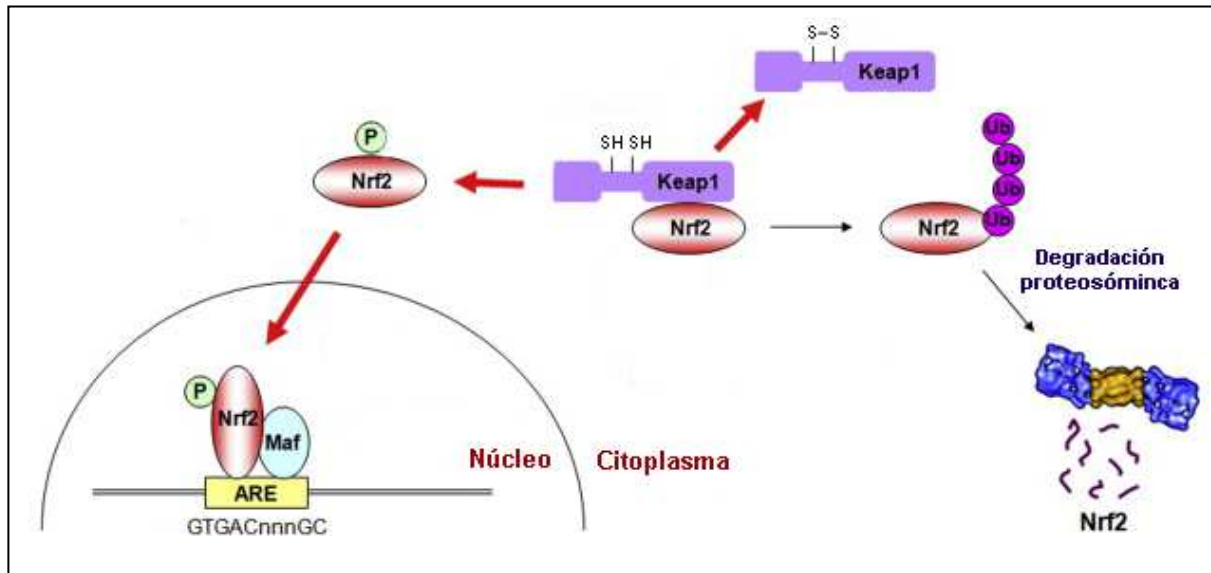
En condiciones fisiológicas normales, Nrf2 se encuentra unido a la proteína Keap-1 y se retiene en el citosol por interacciones con el citoesqueleto (Itoh y cols. 1999, Kang y cols. 2004). El complejo Nrf2-Keap1 actúa como sensor celular de estrés oxidativo. En condiciones de estrés oxidativo, Nrf2 se activa y es liberado de su unión con la proteína Keap-1. Posteriormente, se transloca al núcleo y se une a una proteína Maf pequeña (sMaf), formando el heterodímero Nrf2-sMaf. Este heterodímero es el que se une a los AREs localizados en la región promotora de diversos genes (Kensler y cols. 2007).

Desde que se descubrió la interacción entre Nrf2 y Keap-1, distintos modelos han sido descritos para explicar el mecanismo por el cual Nrf2 se activa y se disocia de Keap-1.

Un modelo ampliamente aceptado para explicar la activación y acumulación nuclear de Nrf2 implica la alteración estructural de la proteína Keap-1 mediante oxidación o modificación covalente de cisteínas presentes en Keap-1. En condiciones de estrés, Keap-1 se oxida formando un puente disulfuro intermolecular y separándose así de Nrf2 (Wakabayashi y cols. 2004). Además, la actividad de diversas cinasas como proteín cinasa C, fosfatidilinositol-3 cinasa, proteín cinasas activadas por mitógenos, c-Jun N-terminal cinasa o la proteín cinasa regulada por señales extracelulares producen la fosforilación de serinas y

treoninas presentes en Nrf2 (Itoh y cols. 2004) (figura 10). Nrf2 se transloca entonces al núcleo y regula la transcripción génica de enzimas indispensables en la defensa celular.

**Figura 10.** Activación y translocación de Nrf2. Imagen adaptada de Hur y cols. 2010.



### 2.2.2. Actividad de Nrf2

Venugopal y Jaiswal demostraron por primera vez en 1996 que Nrf2 poseía un papel esencial en la protección del organismo contra el estrés oxidativo. Observaron que una sobreexpresión de ADNc de Nrf2 aumentaba la expresión e inducción de la NQO1 en respuesta a antioxidantes y xenobióticos (Venugopal y Jaiswal 1996). El papel de Nrf2 se confirmó cuando se obtuvieron los primeros ratones modificados genéticamente que carecían de este factor (Nrf2<sup>-/-</sup>). Estos animales presentaban un fenotipo normal. No obstante, no podían inducir la expresión génica de agentes detoxificantes y de protección contra el estrés oxidativo, en particular de las enzimas de fase II (Chan y cols. 1996, Itoh y cols. 1997).

Su papel en el estrés oxidativo y sobre la transcripción génica de enzimas detoxificantes ha creado un gran interés en el estudio de Nrf2 en determinadas enfermedades como cáncer, enfermedades autoinmunes como AR y en



enfermedades inflamatorias como osteoartritis (OA), asma, gastritis, colitis, aterosclerosis, Alzheimer y Parkinson (Kim y cols. 2010, Niture y Jaiswal 2012, Ramos-Gomez y cols. 2001).

La función protectora de este factor está relacionada con la capacidad que tiene de regular la transcripción génica de distintas enzimas como NADPH oxidasa I, GST, GCL y HO-1 entre otras. En la presente Tesis nos centraremos en la inducción de HO-1 mediada por Nrf2, ya que esta enzima está ampliamente implicada en el proceso artrítico, así como en el de remodelado óseo (ver apartado 2.3.3 y 2.3.4).

### **- Papel del Nrf2 en la inflamación y en el sistema inmune**

La inflamación ocurre como parte de una serie de reacciones inmunes y es uno de los estímulos responsables de la producción de ROS para combatir infecciones.

En respuesta al estrés oxidativo y nitrosativo, se activa el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) que produce la síntesis de citocinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-1, IL-2 e IL-6. Estas citocinas son capaces de activar la generación de nuevas ROS, las cuales activarían de nuevo al NF- $\kappa$ B, que produciría más citocinas proinflamatorias. Este ciclo vicioso entre el estrés oxidativo y la producción de citocinas proinflamatorias puede ser inhibido por activación del sistema Nrf2/ARE (Surh y cols. 2009).

Diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la activación del factor Nrf2 puede bloquear la expresión de enzimas proinflamatorias, como COX-2 e iNOS (vía inhibición NF- $\kappa$ B), y la expresión de una gran variedad de mediadores implicados en el proceso inflamatorio, como citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión celular y metaloproteinasas (Ho y cols. 2007, Kim y cols. 2010, Lee y cols. 2007, Pae y cols. 2006).

El efecto de Nrf2 sobre la inflamación tiene además, un efecto colateral sobre la respuesta inmune innata, ya que la regulación de la expresión de genes que participan en el proceso inflamatorio afecta a la activación de células implicadas en la respuesta inmune.

La idea de la implicación del factor Nrf2 en el desarrollo de enfermedades autoinmunes surgió cuando Mao y cols. observaron, en ratones deficientes en Nrf2,

la aparición de lesiones inflamatorias multiorgánicas junto con el desarrollo de una glomerulonefritis y deposición de Igs en los vasos sanguíneos, síntomas que se asemejan a las características patológicas del lupus eritematoso en humanos (Ma y cols. 2006).

El papel del Nrf2 sobre la regulación del sistema inmune se confirmó al observar un aumento de las células Th2 (CD4<sup>+</sup>) y una disminución de las Th1 (CD1<sup>+</sup>) en ratones Nrf2<sup>-/-</sup> en comparación con sus *wild type*, así como un aumento en la producción de citocinas Th2 como IL-4 e IL-13 (Ma y cols. 2006, Rangasamy y cols. 2005). Esta variación en el balance de células inmunitarias sería responsable del desarrollo de enfermedades autoinmunes en estos ratones.

#### **- Papel del Nrf2 en la artritis reumatoide**

Aunque son muchos los estudios realizados sobre el papel antioxidante y antiinflamatorio del factor Nrf2, se conoce poco sobre su participación en la AR.

Nuestro grupo de investigación ha descrito recientemente la participación de este factor en la fase efectora del proceso artrítico. En un modelo de artritis por transferencia de suero K/BxN, los ratones deficientes en Nrf2 desarrollaron una artritis más severa que sus controles *wild type*. Este empeoramiento de la enfermedad fue acompañado por un aumento en los niveles de CXCL-1, COX-2, iNOS y peroxinitrito (Maicas y cols. 2011). En otro modelo animal de artritis, como el inducido por anticuerpos más la inyección de LPS, el déficit de Nrf2 provocó una mayor degradación del cartílago por un aumento del daño oxidativo (Wruck y cols. 2011).

Otros estudios, dirigidos al estudio de la activación de Nrf2 por distintas moléculas, confirman el papel protector de este factor sobre la AR. El uso de sulforafano (SFN) o cilostazol (activadores de Nrf2), provocó una reducción de los signos artríticos en ratones tras su inducción por colágeno. Además, la activación de Nrf2 por estos compuestos, disminuyó el infiltrado celular, la hiperplasia sinovial y la formación de pannus, así como los niveles de IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en suero y los de IL-6, IL-17, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  en células aisladas de bazo y nódulos linfáticos (Kong y cols. 2010, Park y cols. 2010). En el modelo de artritis por transferencia de anticuerpos

(CAIA), el uso de SFN también disminuyó los signos clínicos de la artritis. Además, los animales tratados con el compuesto activador de Nrf2 presentaron una menor erosión del cartílago y del hueso (Kong y cols. 2010).

#### **- Papel del Nrf2 en el remodelado óseo**

El remodelado óseo se lleva a cabo por la actividad de los osteoclastos y los osteoblastos. Pocos son los estudios realizados en estas células para investigar el posible papel del factor de transcripción Nrf2 en el proceso de remodelado óseo.

Hinoi y cols demostraron que el déficit de estrógenos por ovariectomía aumenta la expresión del ARNm de Nrf2 en el fémur de los animales y que este Nrf2 se encuentra principalmente localizado en los osteoblastos del hueso cortical, relacionando así el papel del Nrf2 con el remodelado óseo. Además, mediante la infección de células MC3T3-E1 con Nrf2 observaron que este factor inhibía la diferenciación a osteoblastos al bloquear la actividad transcripcional del factor Runx2 (Hinoi y cols. 2006). Otro estudio con células MC3T3-E1 confirmó el efecto de Nrf2 sobre los osteoblastos. Arai y cols, observaron un aumento en la expresión de Nrf2 y una inhibición de la diferenciación de osteoblastos tras el tratamiento de las células con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este efecto, al igual que en el estudio de Hinoi y cols, se relaciona con la disminución de la expresión de Runx2, así como de la expresión génica de osteocalcina (Arai y cols. 2007).

El uso de SFN, activador de Nrf2, demuestra que este factor, además de inhibir la diferenciación de osteoblastos, también inhibe la osteoclastogénesis por inhibición de la vía NF-κB (Kim y cols. 2005).

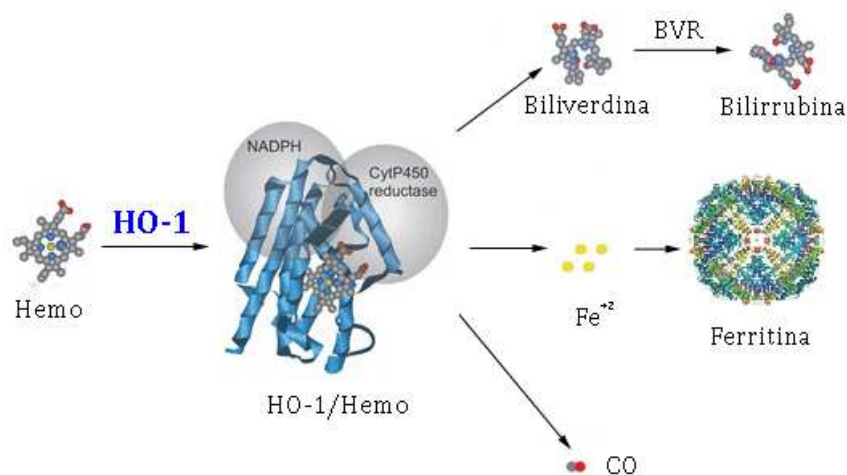
Según estos resultados, queda claro que el Nrf2 ejerce un papel regulador del remodelado óseo controlando la diferenciación tanto de osteoblastos como de osteoclastos. En el trabajo de Hinoi y cols, el déficit de estrógenos (factor responsable de pérdida ósea y aparición de fracturas) aumenta la expresión de Nrf2. Sin embargo, recientemente se ha observado que el déficit de Nrf2 provoca un elevado porcentaje de fracturas en ratones artríticos (Wruck y cols. 2011).

## 2.3. Vía de la Hemo oxigenasa-1 (HO-1)

### 2.3.1. Generalidades

La hemo oxigenasa es la enzima que cataliza la degradación oxidativa del grupo hemo, con liberación de hierro y formación de monóxido de carbono (CO) y biliverdina, que se reduce rápidamente a bilirrubina por acción de la enzima biliverdina reductasa (BVR) (Tenhunen y cols. 1968) (figura 11). El hierro es utilizado en el metabolismo o secuestrado por la ferritina (Eisenstein y cols. 1991) y el CO se une a la hemoglobina para formar carboxihemoglobina (Weaver 1999). Se conocen dos isoformas de la hemo oxigenasa: la HO-1, de carácter inducible y la HO-2 de carácter constitutivo. La HO-1 es una proteína microsomal que se localiza principalmente en tejidos y órganos relacionados directamente con el metabolismo de la hemoglobina y de los eritrocitos como el bazo, hígado y médula ósea. La HO-2 se expresa en elevadas concentraciones en cerebro y testículos, aunque también se detecta en bazo e hígado.

**Figura 11.** La vía de la HO-1. Imagen adaptada de Gozzelino y cols. 2010.



### 2.3.2. Inducción de la HO-1

La HO-1 se expresa a niveles basales en una gran variedad de tipos celulares (células endoteliales, monocitos/macrófagos, neutrófilos, condrocitos, sinoviocitos, fibroblastos y células del músculo liso). Múltiples estímulos son capaces de inducir

su expresión y entre ellos hay que destacar el estrés oxidativo y nitrosativo, las condiciones de hipoxia e hiperoxia, hormonas, factores de crecimiento, citocinas y otros mediadores producidos en la respuesta inflamatoria (Ryter y cols. 2006). La inducción de esta enzima, como consecuencia de los estímulos anteriormente mencionados, se relaciona con un papel citoprotector, antioxidante y antiinflamatorio.

Diversos estudios han demostrado el papel beneficioso de la inducción de HO-1 en distintas patologías. La inducción de esta enzima es capaz de inhibir el desarrollo de enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis o el infarto de miocardio, así como también ha resultado ser beneficioso en el trasplante de órganos (Wu y cols. 2011). Además, también ha demostrado su papel beneficioso en enfermedades pulmonares (An y cols. 2011) y en casos de shock endotóxico (Tamion y cols. 2006).

Estos efectos protectores frente al estrés oxidativo y al proceso inflamatorio podrían estar mediados por la disminución de los niveles del grupo hemo o por el aumento de los niveles de biliverdina, bilirrubina o CO. El grupo hemo produce un aumento en la generación de ROS y de la oxidación de componentes celulares, efectos que pueden verse inhibidos al disminuir su disponibilidad al ser degradado por la HO-1 (Paine y cols. 2010). Por otro lado, la biliverdina y la bilirrubina presentan propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anti-proliferativas (Stocker y Peterhans 1989, Stocker y cols. 1987). Los efectos del CO los veremos más detalladamente en el apartado 2.3.5.

### **2.3.3. Papel de la HO-1 en la inflamación**

Diferentes modelos *in vivo* e *in vitro* han demostrado el papel de la HO-1 en el proceso inflamatorio agudo y crónico. Esta proteína podría ejercer un efecto antiinflamatorio al formar parte de un mecanismo adaptativo frente al daño producido durante la inflamación (Alcaraz y cols. 2003).

La expresión de HO-1 es máxima durante la fase de resolución de la respuesta inflamatoria. Esta enzima ejerce efectos antiinflamatorios *in vivo* al disminuir la

migración celular, la exudación y la producción de diferentes mediadores inflamatorios (Vicente y cols. 2003b).

La inhibición de HO-1 por distintos compuestos aumenta el rodamiento y la adhesión de los leucocitos sobre las células endoteliales, así como la migración de los neutrófilos hacia el foco inflamatorio. El efecto de esta enzima sobre la migración celular se confirma al observar una inhibición de estos parámetros en ratones *knock-out* en HO-1 (Freitas y cols. 2006, Seldon y cols. 2007). El efecto de esta enzima, y de algunos de sus metabolitos como el CO, sobre la migración celular está relacionado con su capacidad para disminuir diversas moléculas de adhesión como selectinas e ICAM-1 (Dal-Secco y cols. 2010, Vachharajani y cols. 2000).

La HO-1 también regula la expresión y liberación de distintos mediadores inflamatorios. La inducción de esta enzima reduce la expresión de COX-2 y los niveles de PGE<sub>2</sub> en el modelo experimental de bolsa de aire en ratón (Vicente y cols. 2003a). En otros modelos experimentales, esta inducción disminuye los niveles de citocinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-2 (Benallaoua y cols. 2007, Devesa y cols. 2005b).

#### **2.3.4. Papel de la HO-1 en la artritis reumatoide y en el metabolismo óseo**

Algunos estudios han demostrado que la HO-1 se induce durante el desarrollo de la artritis experimental. La administración de un inhibidor de la HO-1 como el estaño protoporfirina IX (SnPP) en la artritis por adyuvante en rata y en un modelo de CIA, disminuyó los signos clínicos de la enfermedad, así como la destrucción del cartílago. Además, el tratamiento con cobalto-protoporfirina IX (CoPP), un inductor de la HO-1, produce una protección parcial en este modelo (Devesa y cols. 2005a, Devesa y cols. 2005b).

Sin embargo, otros estudios *in vivo* e *in vitro* relacionan la HO-1 con efectos protectores frente a la artritis reumatoide. La administración de CoPP en el modelo animal de artritis por transferencia de suero de K/BxN inhibe la fase aguda de la enfermedad, disminuyendo distintos mediadores inflamatorios como la liberación

de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , PGE<sub>2</sub> y la actividad MMP-9 (Benallaoua y cols. 2007). En sinoviocitos procedentes de pacientes artríticos, la inducción de HO-1 por hemina o la transfección de ADNc redujo significativamente la expresión de TNF $\alpha$  y la producción de IL-6 e IL-8 (Kobayashi y cols. 2006). Por otra parte, se ha sugerido el efecto protector de la HO-1 en un estudio del polimorfismo en el promotor de la enzima, ya que los pacientes que lo presentaron tenían una mayor susceptibilidad de sufrir la enfermedad (Rueda y cols. 2007).

La HO-1 también interfiere en los mecanismos implicados en el remodelado óseo, aunque al igual que en la AR, su papel no está del todo claro. Esta enzima se encuentra expresada en células óseas como osteoblastos y en algunos casos también en osteoclastos. Algunos estudios relacionan la inducción de la HO-1 con efectos beneficiosos frente al metabolismo óseo. Zwerina y cols demostraron que esta enzima es capaz de inhibir la osteoclastogénesis en un modelo *in vivo* de artritis mediada por TNF $\alpha$  y que además, los niveles de bilirrubina, metabolito de la vía HO-1, están directamente relacionados con la disminución de la erosión ósea (Zwerina y cols. 2005b). Sobre los osteoblastos, la inducción de esta enzima por CoPP o por el péptido de crecimiento osteogénico es capaz de favorecer la diferenciación de estas células a partir de células madre mesenquimales (Barbagallo y cols. 2010, Vanella y cols. 2010). Además, el CO generado por la acción de la HO-1 es capaz de inhibir la apoptosis de osteoblastos murinos al inhibir la vía del TNF $\alpha$  (Chae y cols. 2006).

Sin embargo, Lin y cols demostraron que la sobreexpresión de HO-1 inhibe la diferenciación y maduración de osteoblastos de rata, mecanismo que podría estar relacionado con la capacidad de la bilirrubina y del CO de inhibir la ALP, osteocalcina y Runx2 (Lin y cols. 2010).

### **2.3.5. El monóxido de carbono (CO)**

El monóxido de carbono es un gas inodoro, incoloro, insípido y altamente inflamable que, a altas concentraciones, resulta letal por su alta afinidad a la hemoglobina, lo que lleva a una disminución de los niveles de oxígeno en los tejidos. Sin embargo, a bajas concentraciones, el CO juega un papel fundamental en

diversos procesos fisiológicos y de señalización intracelular que culminan en acciones antiproliferativas, antiapoptóticas y antiinflamatorias. Estos efectos beneficiosos se han relacionado con la actividad HO-1, ya que esta enzima es capaz de aumentar endógenamente los niveles de CO. De esta manera, la vía HO-1/CO ha demostrado tener un papel protector en numerosos modelos experimentales de inflamación, daño tisular y enfermedad cardiovascular (Ryter y cols. 2006).

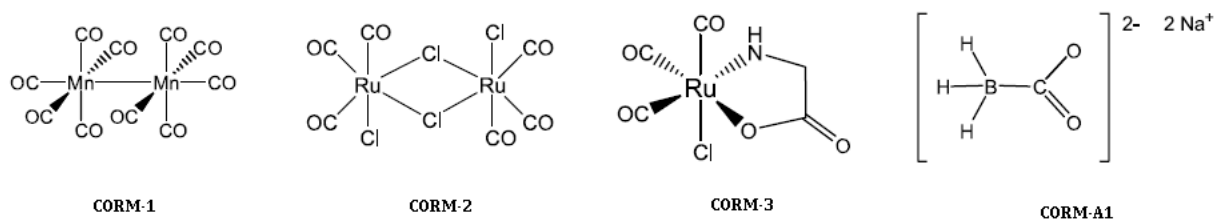
Debido a su efecto protector a diversos niveles, muchos son los estudios dirigidos a la investigación de nuevas moléculas capaces de aumentar los niveles de CO. Algunos de estos ensayos se basan en el uso de moléculas inductoras de HO-1 (como el CoPP), de compuestos capaces de transportar y liberar CO (CO-RMs) o incluso, en la aplicación exógena de CO, método capaz de reproducir de manera muy similar los efectos de la HO-1 en diversos modelos experimentales.

#### - Moléculas liberadoras de CO (CO-RMs)

Las moléculas liberadoras de CO o CO-RMs son un grupo de compuestos desarrollados por el grupo del Dr. Motterlini, capaces de liberar CO en el organismo y mimetizar las acciones biológicas derivadas de la actividad HO-1 de esta molécula (Motterlini y cols. 2002).

Existen distintos tipos de CO-RMs que se diferencian principalmente en el metal de transición que poseen en su estructura, lo que les confiere diferentes propiedades físico-químicas. El CORM-1 y el CORM-2, primeras moléculas en desarrollarse, son solubles en disolventes orgánicos. Posteriormente, se sintetizaron el CORM-3 y el CORM-A1, moléculas solubles en agua (figura 12).

Figura 12. Estructura química de los CO-RMs.





Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado las propiedades vasoactivas y cardioprotectoras de estas moléculas (Clark y cols. 2003, Foresti y cols. 2004, Motterlini y cols. 2002). Además, han demostrado propiedades antiinflamatorias y citoprotectoras en células de microglia (Bani-Hani y cols. 2006a, b), así como en una línea celular de enterocitos humanos (Caco-2) (Megias y cols. 2007) y en condrocitos y sinoviocitos osteoartríticos humanos (Garcia-Arnandis y cols. 2011, Guillen y cols. 2008, Megias y cols. 2008).

El CORM-3, compuesto utilizado en la presente Tesis, es un complejo que combina un átomo de rutenio con el aminoácido glicina, lo que le confiere una menor toxicidad, una mayor solubilidad en agua y una mejor modulación de la liberación de CO. Nuestro grupo de investigación ha demostrado recientemente que esta molécula es capaz de reducir la inflamación y la degradación articular en modelos *in vivo* de artritis (Ferrandiz y cols. 2008, Maicas y cols. 2010). Otros modelos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que su efecto antiinflamatorio está relacionado con su capacidad para modular la interacción entre los leucocitos y el endotelio (Mizuguchi y cols. 2009, Urquhart y cols. 2007), pudiendo inhibir la expresión de moléculas de adhesión celular, como ICAM-1 y selectina-E (Song y cols. 2011, Song y cols. 2009).

Además de esta actividad antiinflamatoria se ha observado que, en modelos de isquemia-reperfusión, el CORM-3 es capaz de reducir el daño renal (Bagul y cols. 2008) y de miocardio (Stein y cols. 2012). Además, es capaz de proteger frente al daño endotelial y mejorar la función vascular en un modelo de trasplante de aorta (Song y cols. 2010).

Aunque muchos son los estudios de esta molécula en distintos modelos animales de enfermedades, no se ha descrito su papel en el metabolismo óseo. Por ello y debido a su actividad antiinflamatoria y su capacidad inhibitoria en la artritis experimental, en la presente Tesis se ha estudiado el posible papel del CORM-3 en el modelo animal de artritis postmenopáusica.

### 3. MODELOS ANIMALES

Para poder desarrollar un nuevo tratamiento efectivo frente a una enfermedad es necesario conocer los mecanismos implicados en la misma. Existen numerosos factores que dificultan el estudio de estos mecanismos en humanos, como son la gran variedad interindividual a nivel genético y medioambiental, así como la existencia de numerosas restricciones éticas. Además, en el caso de la osteoporosis y de la AR, el estudio de la fase temprana de la enfermedad es prácticamente imposible debido a que es una etapa asintomática y una vez diagnosticada la enfermedad el proceso fisiopatológico ya se encuentra en estado avanzado.

Los modelos *in vivo* o modelos animales presentan similitudes clínicas con la enfermedad en humanos y son de gran utilidad en investigación. Es indudable la necesidad de los sistemas *in vitro* para poder establecer los mecanismos de acción de los fármacos pero estos sistemas no siempre reproducen lo que ocurre en el organismo como un todo, por lo que es imprescindible confirmar los resultados en modelos *in vivo*.

En las investigaciones farmacológicas, los ensayos con animales de experimentación resultan imprescindibles para la búsqueda y aplicación de posibles medidas terapéuticas encaminadas tanto a la prevención como al tratamiento de enfermedades. Los ensayos *in vivo* nos permiten analizar los efectos de estos compuestos sometidos a todas las interacciones que se dan en un organismo vivo y nos permiten medir la eficacia y seguridad de los mismos. Además, la investigación *in vivo* nos permite controlar las variaciones medioambientales como temperatura, luz y alimentación al tener a los animales en estabularios. Otra ventaja de la utilización de estos modelos, es que gracias a las nuevas tecnologías genéticas podemos obtener y trabajar con animales transgénicos o *knock-out*, lo que nos permite controlar y entender mejor cómo afectan las variaciones genéticas a las distintas enfermedades.

Como ya he mencionado antes, los modelos animales tienen similitudes con las enfermedades en humanos, pero también presentan algunas diferencias. Por ello, el conocimiento de las similitudes y diferencias del modelo animal con respecto a

la enfermedad en humanos es sumamente importante para la correcta interpretación de los resultados. En el caso de modelos animales de AR, las articulaciones presentan una hiperplasia sinovial junto con una infiltración masiva de células inflamatorias, rasgos característicos de la enfermedad en humanos. Sin embargo, presentan diferencias en cuanto a la gravedad de la inflamación articular, en las articulaciones afectadas y en el perfil de desarrollo de la enfermedad (van den Berg 2009). En el caso de modelos animales para el estudio de la osteoporosis, la ovariectomía reduce las propiedades mecánicas de manera muy similar a lo que ocurre en humanos, pero dependiendo de en qué especie se realice, afecta en mayor o menor medida la densidad mineral ósea, que no llega a reducirse a niveles comparables con lo observado en humanos (Egermann y cols. 2005, Reinwald y Burr 2008).

### **3.1. Artritis inducida por colágeno en ratón (CIA)**

El modelo de artritis inducida por colágeno está basado en la autoinmunorreactividad al colágeno tipo II del cartílago y fue descrito por primera vez en rata por Trentham y colaboradores en 1977 (Trentham y cols. 1977). Posteriormente, este modelo ha sido ampliamente descrito y utilizado en ratón.

La susceptibilidad de los animales a sufrir artritis mediante este modelo está muy relacionada con la expresión de las moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC clase II). Por ejemplo, los ratones con haplotipo H-2<sup>q</sup> o H-2<sup>r</sup> son susceptibles a la artritis y otros haplotipos presentan resistencias (Wooley y cols. 1981). Una de las cepas más utilizada para llevar a cabo este modelo son los ratones DBA-1/J que presentan haplotipo H-2<sup>q</sup>.

El modelo de CIA consiste en la inmunización de los animales con CII en Adyuvante Completo de Freund (FCA), lo que induce una respuesta inmunológica frente a ese colágeno exógeno que conlleva una reacción cruzada autoinmune frente al colágeno homólogo del cartílago. Los síntomas de la enfermedad empiezan a aparecer 3-4 semanas después de la inmunización, con una inflamación crónica en las articulaciones que produce una progresiva y severa erosión del cartílago y del hueso.

La inducción del CIA está mediada tanto por las células B como por las células T. Las células B son las responsables de la producción de Igs anti-CII que son fundamentales para la patogénesis de la enfermedad. El isotipo IgG2 es el predominante en el modelo de CIA y, además, este modelo requiere la activación de la cascada del complemento para poder desarrollarse (Watson y Townes 1985). En cuanto a la respuesta mediada por las células T, las citocinas que encontramos tras la inmunización con CII son predominantemente citocinas Th1 (Mauri y cols. 1996), aunque distintos estudios demuestran también la participación de IL-23/Th17 en este modelo experimental (Lubberts y cols. 2004, Murphy y cols. 2003, Nakae y cols. 2003).

Tras la segunda inmunización con CII, se produce la aparición de edema en las patas traseras y delanteras, afectando a los compartimentos del tobillo y rodilla (figura 13). En este modelo aparece un exudado en la cavidad sinovial que contiene una gran cantidad de granulocitos, produciéndose una destrucción progresiva del cartílago articular. En las primeras semanas del desarrollo de la enfermedad encontramos numerosos linfocitos y macrófagos, junto con una presencia predominante de PMNs. Durante la progresión de la patología aparece una severa degradación en los márgenes del cartílago articular y formación de nuevo hueso (osteofito). Esta dramática destrucción del cartílago y la presencia de un proceso inflamatorio crónico en el tejido sinovial conllevan la aparición de una mezcla de infiltrado celular y una pronunciada fibrosis (van den Berg y Joosten 1999).

**Figura 13.** Patas traseras de ratones.



### 3.2. Ovariectomía (OVX) en ratón

A finales de 1809, el médico americano Ephraim McDowel realizó por primera vez una ovariectomía (OVX) en humanos. La OVX es el proceso quirúrgico mediante el cual se extraen uno o ambos ovarios. Los ovarios son los responsables de la liberación de estrógeno, progesterona e inhibina en el organismo. Al realizar esta técnica, se observa una reducción de los niveles de estas hormonas y como consecuencia de ello se provoca una menopausia quirúrgica. Una característica de la ovariectomía es que la pérdida de hueso trabecular se produce de una manera rápida tras la cirugía, y sin embargo la respuesta del hueso cortical es menos pronunciada (Li y cols. 1997).

La OVX no es capaz de reproducir fielmente los efectos de la menopausia natural. Este proceso quirúrgico produce un rápido y dramático cese de la función ovárica mientras que en la menopausia natural, es un proceso que se produce poco a poco a lo largo del tiempo. Además, en el caso de la menopausia natural, los ovarios siguen produciendo niveles bajos de androstenediona (precursor de la testosterona, estrona y estradiol) que tienen un papel protector frente a la pérdida de hueso (Ohta y cols. 1992, Rannevik y cols. 2008).

La deficiencia de estrógenos provocada por la ovariectomía actúa directamente sobre la activación de las células T. Tras la ovariectomía, se produce un aumento del número de células T activadas, así como un aumento de los niveles de TNF $\alpha$  liberado por ellas. Esto se produce como consecuencia de que la deficiencia de estrógenos promueve la presentación de antígenos y la liberación de IL-7 e interferón- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) y disminuye los niveles de factor de crecimiento transformador  $\beta$  (TGF $\beta$ ). Además, este proceso quirúrgico provoca la inhibición de vías antioxidantes y como consecuencia de ello, aumenta los niveles de ROS que también favorecen la activación de las células T (Pacifi 2012).

A pesar de las diferencias entre la menopausia quirúrgica provocada por la OVX y la menopausia natural, la OVX está aceptada como un modelo animal que reproduce el proceso de osteoporosis postmenopáusica.

### **3.3. Artritis postmenopáusica (CIA+OVX) en ratón**

El modelo de artritis postmenopáusica combina el uso de los dos modelos animales descritos anteriormente, CIA y OVX. Primero se realiza la ovariectomía de los animales y tras unas semanas, se induce la artritis por colágeno.

Holmdahl y cols. observaron que la artritis producida por CIA en ratones DBA/1J era más severa en machos que en hembras. La ovariectomía en las hembras provocó, de una manera dependiente de células T, que éstas desarrollaran una artritis similar a la de los machos, lo que inició el estudio del posible papel de los estrógenos sobre el desarrollo de la artritis reumatoide (Holmdahl y cols. 1986a).

Estudios posteriores en ratas demostraron que los animales ovariectomizados desarrollaban una artritis más severa que los animales con operación simulada (Sham). El efecto de la ovariectomía se revirtió con la administración de estrógenos, por lo que el aumento de la severidad de la artritis se asoció a la falta del efecto antiinflamatorio de los estrógenos, así como a la supresión de la respuesta autoinmune frente al colágeno II y a la falta de la respuesta inmune de las células T (Holmdahl y Jansson 1988, Larsson y Holmdahl 1987, Yamasaki y cols. 2001).

La realización de este modelo en ratas y ratones ha demostrado que la pérdida de DMO observada en este modelo es debida tanto a la OVX como al CIA, observándose un efecto aditivo (Jochems y cols. 2005, Yamasaki y cols. 2001).

Aunque OVX-CIA es un modelo adecuado para reproducir la artritis postmenopáusica, no son muchos los datos sobre cómo interaccionan ambos procesos. El déficit de estrógenos provoca un aumento de las citocinas proinflamatorias que favorecerían el desarrollo de la artritis (apartado 1.2.4). Sin embargo, en el modelo de artritis postmenopáusica en ratones llevado a cabo por Jochems y cols., la citocina proinflamatoria IL-6 no se vió modificada por este proceso (Jochems y cols. 2005).

## Objetivos

---





La artritis reumatoide forma parte de las enfermedades autoinmunes más prevalentes a nivel mundial y la osteoporosis postmenopáusica es una de sus principales complicaciones extra-articulares que lleva a un aumento de la aparición de fracturas en los pacientes artríticos. Aunque la combinación de distintos fármacos para estas enfermedades ha conseguido mejorar la calidad de vida de los pacientes, no existe un tratamiento efectivo capaz de remitirlas. Además, los fármacos empleados en la actualidad presentan distintas reacciones adversas que ponen de manifiesto la importancia de la búsqueda de nuevas terapias.

El estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria tienen una importante participación en la artritis y la osteoporosis postmenopáusicas. Por ello, el estudio de distintas vías relacionadas con estos procesos, como la vía Nrf2/HO-1, el estrés oxidativo o NADPH oxidasa, pueden aportar datos de interés para comprender mejor estas patologías.

Para el estudio de enfermedades, así como el de nuevos fármacos, es necesario el empleo de modelos animales capaces de reproducir las características de las enfermedades en humanos. En la presente Tesis se ha empleado la combinación de los modelos animales de ovariectomía (OVX) y de artritis inducida por colágeno (CIA) para el estudio de la artritis postmenopáusica, y el de ovariectomía para la osteoporosis postmenopáusica.

Por todo ello, los objetivos de la presente Tesis han sido:

1. Poner a punto y caracterizar el modelo animal de artritis postmenopáusica mediante ovariectomía y CIA (OVX-CIA) en ratón.
2. Determinar los posibles efectos del inhibidor de HO-1 SnPP y del CO liberado por el CORM-3, en este modelo.

3. Estudiar la influencia del estrés oxidativo en el modelo de OVX-CIA, utilizando para ello ratones Ncf1\*\*, los cuales presentan la enzima NADPH oxidasa no funcional.
4. Estudiar el papel de la vía Nrf2/HO-1 en ratones ovariectomizados.

# **Material y Métodos**

---



## 1. MÉTODOS DE ESTUDIO *in vivo*

En la presente Tesis hemos utilizado el modelo animal de artritis postmenopáusica que combina un modelo de ovariectomía (OVX) con un modelo de artritis inducida por colágeno (CIA). Este modelo animal (OVX+CIA) ha sido utilizado para el estudio de la influencia del déficit de estrógenos sobre el desarrollo de la artritis, la posible actividad farmacológica de diferentes moléculas y el estudio de la implicación de la proteína Ncf1.

Además, realizamos el estudio del factor de transcripción Nrf2 en el modelo animal de osteoporosis postmenopáusica mediante OVX.

### 1.1. Animales utilizados

- **DBA1/J** (Janvier, Le Genest St Isle, Francia): ratones genéticamente susceptibles a desarrollar CIA (Holmdahl y cols. 1986b). Empleamos ratones hembra de 19-25 gramos de peso y de 9-12 semanas de edad. Estos ratones fueron utilizados para la caracterización del modelo de OVX+CIA y para el estudio de los efectos de SnPP, CORM-3 y alendronato (ALN).

- **B10.Q y B10.Q/Ncf1<sup>\*/\*</sup>** ("Medical Inflammation Research", *Karolinska Institutet*, Estocolmo, Suecia). La mutación del gen que codifica para Ncf1 provoca una artritis más severa que la observada en los animales *wild type* (Olofsson y cols. 2003). Utilizamos ratones hembra de 19-25 gramos de peso y de 12-20 semanas de edad. En estos ratones se estudió la influencia de la mutación del gen que codifica para el Ncf1, así como la modificación de la respuesta inmune frente a los distintos epítomos del colágeno en el modelo animal de OVX+CIA.

- **C57Black-6 Nrf2<sup>+/+</sup> y C57Black-6 Nrf2<sup>-/-</sup>** (Instituto de Investigación Biomédica (CSIC) "Alberto Sols", Universidad Autónoma de Madrid, España). Se utilizaron hembras de 19-25 gramos de peso y de 23-38 semanas de edad. Estos animales se emplearon para el estudio preliminar del papel del factor de transcripción Nrf2 en el modelo animal de OVX y del efecto del sulforafano (SFN) en este modelo.

## **1.2. Moléculas en estudio.**

En la presente Tesis se ha realizado el estudio del efecto, sobre la artritis postmenopáusica, de distintas moléculas con efecto ya conocido en la artritis inducida por colágeno (SnPP y CORM-3) o en la osteoporosis (ALN), así como el efecto del sulforafano (SFN) en la ovariectomía (figura 14).

### **1.2.1. Estaño-protoporfirina IX (SnPP)**

Molécula con estructura porfirínica que contiene un átomo de Sn.

El SnPP es un potente inhibidor reversible de la actividad de la hemo oxigenasa (HO) (Yoshinaga y cols. 1982). La inhibición del metabolismo del grupo hemo provoca la inhibición de la liberación de bilirrubina, lo que representa una estrategia útil para el tratamiento de ictericias (Drummond y Kappas 1981).

En modelos animales de artritis reumatoide y de osteoartritis, el SnPP ha demostrado su capacidad antiinflamatoria al reducir los niveles de mediadores proinflamatorios como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y PGE<sub>2</sub>, además de disminuir la degradación de las articulaciones (Devesa y cols. 2005b, Braza-Boils y cols. 2011).

### **1.2.2. Tricarbonilcloro(glicinato) de rutenio (II) (CORM-3)**

Las moléculas liberadoras de CO (*CO-releasing molecules*, CO-RMs) son una serie de fármacos capaces de liberar grupos CO presentes en su estructura. Estos grupos, son capaces de reproducir las acciones biológicas del CO derivado de la actividad HO-1 (Motterlini y cols. 2002).

El grupo del Dr. Motterlini ha sintetizado distintas moléculas liberadoras de CO, algunas de ellas solubles en disolventes orgánicos y otras solubles en agua (Foresti y cols. 2008). El CORM-3 es un complejo que combina un átomo de rutenio con el aminoácido glicina, lo que le confiere una menor toxicidad, una mayor solubilidad en agua y una mejor modulación de la liberación de CO.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado recientemente que esta molécula es capaz de reducir la inflamación y la degradación articular en modelos *in vivo* de artritis (Ferrandiz y cols. 2008, Maicas y cols. 2010). Otros modelos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que su efecto antiinflamatorio está relacionado con su capacidad para modular la interacción entre los leucocitos y el endotelio (Mizuguchi y cols. 2009, Urquhart y cols. 2007), pudiendo inhibir la expresión de moléculas de adhesión celular, como ICAM-1 y selectina-E (Song y cols. 2011, Song y cols. 2009).

### **1.2.3. Alendronato (ALN)**

El ALN es un bifosfonato de segunda generación (contiene nitrógeno en su estructura) con una potente acción inhibitoria de la resorción ósea. Los bifosfonatos se unen a la superficie ósea y, posteriormente, son internalizados por los osteoclastos. Una vez en el interior de los osteoclastos, son capaces de interferir en el metabolismo celular de éstos y de favorecer su apoptosis (Hughes y cols. 1995).

El ALN es el bifosfonato más utilizado para el tratamiento de la osteoporosis pero su uso crónico, así como el de los demás bifosfonatos, puede dar lugar a diversos efectos secundarios como la aparición de problemas gástricos o de osteonecrosis en la mandíbula (Reid 2011).

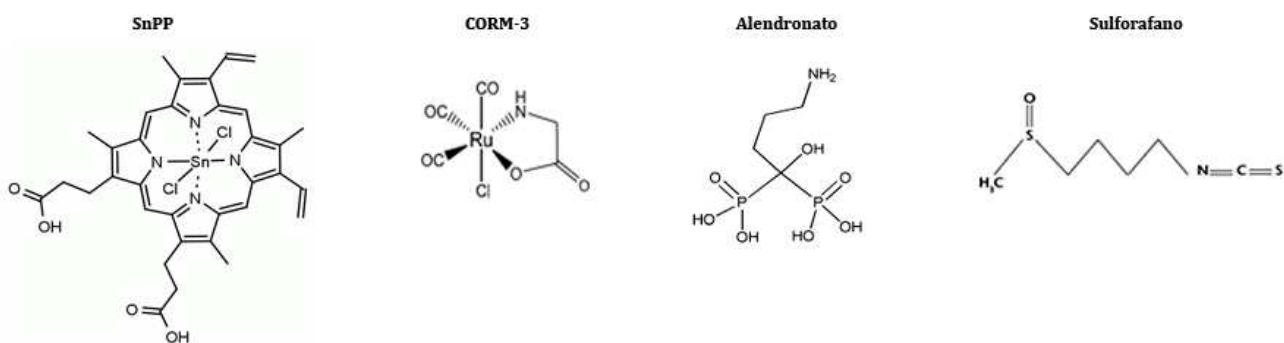
### **1.2.4. Sulforafano (SFN)**

El sulforafano es un isotiocianato que se encuentra en una amplia variedad de vegetales del género *Brassica oleracea*, considerándose las más importantes el brécol y el repollo. Esta molécula es conocida principalmente, por su actividad anticarcinogénica. Varios estudios en roedores han demostrado que la administración de SFN disminuye la aparición de adenoma gastrointestinal y de tumores en próstata (Hu y cols. 2006, Keum y cols. 2009). Además su aplicación tópica es capaz de inhibir la aparición de papilomas en la piel de los ratones (Xu y cols. 2006a). Zhang y cols. han demostrado la existencia de una relación inversa

entre el consumo de vegetales con isotiocyanatos y la incidencia de tumores en humanos (Zhang Y. 2004). Además de sus efectos como anticarcinogénico, recientemente Kong y cols. han descrito el efecto beneficioso del SFN en un modelo de artritis reumatoide. En ratones con artritis inducida por colágeno, el tratamiento con SFN incrementó la apoptosis de los sinoviocitos y disminuyó la sinovitis crónica, la formación de anticuerpos anti-CII y la proliferación de células T (Kong y cols. 2010).

Los efectos de esta molécula están atribuidos principalmente a su capacidad de activar las enzimas detoxificantes de fase II (Zhang Y. y cols. 1994), aunque también se ha demostrado que el SFN tiene actividad antioxidante al bloquear los radicales libres (Dinkova-Kostova y Talalay 2000, Gamet-Payraastre y cols. 2000) y además, es capaz de inducir la apoptosis celular por varias vías (Fimognari y cols. 2003, Karmakar y cols. 2006, Xu y cols. 2006b).

Figura 14. Moléculas en estudio.



### 1.3. Protocolo experimental

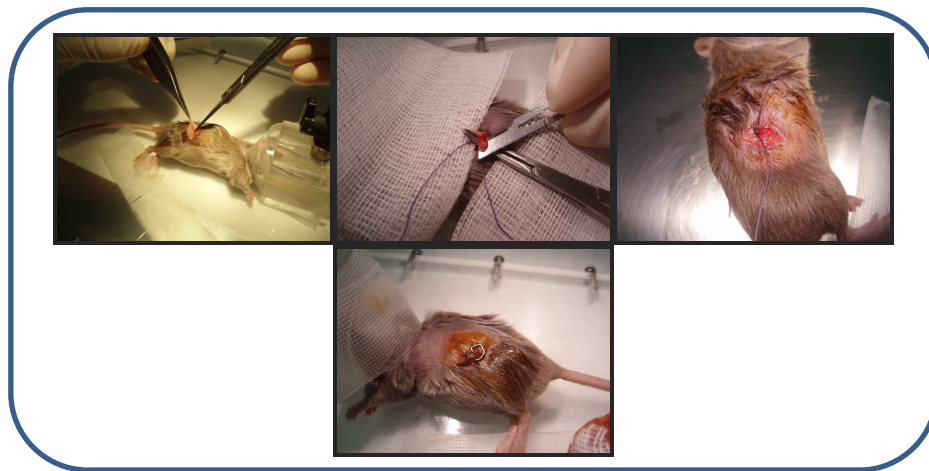
La ovariectomía (OVX) se realizó a todos los animales mediante el mismo procedimiento en cada experimento. Se extrajeron los ovarios mediante incisiones laterales en la zona del peritoneo. Posteriormente, se cerró la piel con grapas metálicas (figura 15). Durante el proceso quirúrgico los animales fueron anestesiados con isofluorano y tratados con butorfanol (2 mg/kg, s.c.) como



analgésico. Las heridas fueron tratadas con povidona iodada y tras 10 días se retiraron las grapas.

Dos semanas después de la OVX (día 0) se realizó la inducción de la artritis. Debido a que cada cepa de ratones presenta una susceptibilidad diferente frente al desarrollo de la artritis y que en cada una de ellas se realizaron distintos estudios, se llevó a cabo un protocolo diferente en cada cepa.

**Figura 15.** Imágenes del proceso quirúrgico de ovariectomía.



### 1.3.1. OVX+CIA en ratones DBA1/J

Utilizamos colágeno bovino tipo II a la concentración de 2 mg/ml (Joosten y cols. 1997) para la preparación de una emulsión con un volumen equivalente de adyuvante completo de Freund (FCA) (2 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis*, cepa H37Ra; Difco, Detroit, MI, USA). A día 0 se inmunizaron los ratones vía s.c. en la base de la cola con 100  $\mu$ l de dicha emulsión. A día 21, se reinmunizaron los animales i.p. con 100  $\mu$ g/100  $\mu$ l de colágeno bovino tipo II en suero fisiológico.

Se considera que los ratones comienzan a desarrollar la artritis cuando se observan signos externos de hinchazón y/o enrojecimiento de las extremidades anteriores y posteriores. La inflamación articular de cada pata se puntuó visualmente utilizando una escala de 0-2, siendo 8 la puntuación máxima posible en cada animal. La puntuación se llevó a cabo por 2 observadores independientes sin conocimiento de los grupos experimentales, según los siguientes criterios:

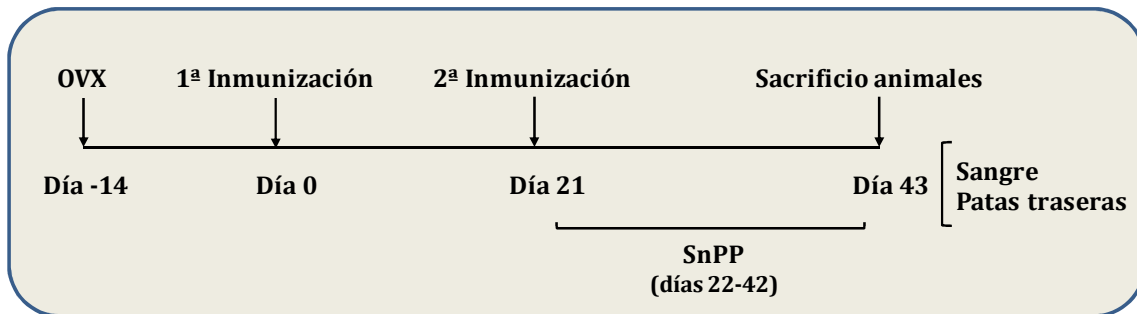
**Tabla 1.** Criterios de puntuación macroscópica de la artritis.

<b>Puntuación</b>	<b>Descripción</b>
0,25	1-2 dedos inflamados
0,5	3-4 dedos inflamados/muñeca, palma o tobillo ligeramente inflamado
0,75	Muñeca, palma o tobillo notablemente inflamado
1	Muñeca o tobillo muy inflamado
1,25	Muñeca, tobillo y dedos ligeramente inflamados
1,5	Muñeca, tobillo y dedos notablemente inflamados
1,75	Muñeca, tobillo y dedos muy inflamados
2	Muñeca, tobillo y todos los dedos muy inflamados/deformidad de las patas

### - Estudio del SnPP

En el día 22 del experimento, los animales fueron distribuidos de manera aleatoria en diferentes grupos (n=10) dependiendo de la operación, el tratamiento y el CIA. Así pues, diferenciamos 5 grupos: NA (animales sanos), OVX (ratones ovariectomizados), CIA (ratones artríticos), OVX-CIA (ratones artríticos ovariectomizados) y SnPP (ratones artríticos ovariectomizados tratados con SnPP).

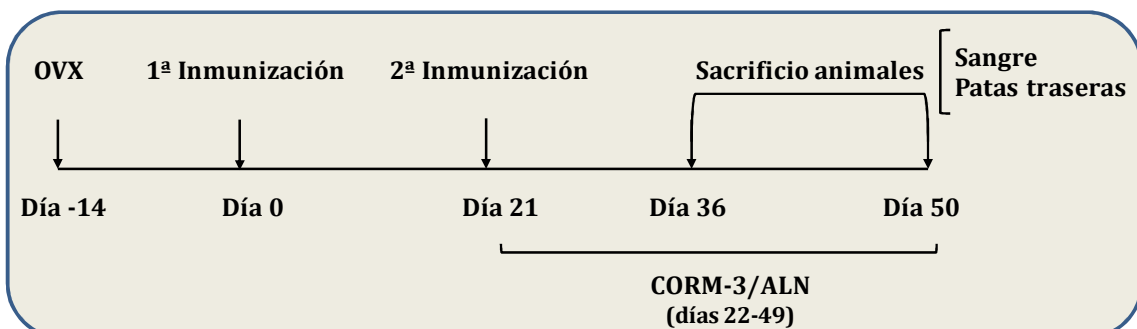
El SnPP (12 mg/kg/día, vía i.p, disuelto en 1% DMSO en suero fisiológico) se administró desde el día 22 hasta el día 42 después de la primera inmunización con colágeno. La dosis fue seleccionada según estudios preliminares. A los animales de los grupos NA, OVX, CIA y OVX-CIA se les administró el vehículo por la misma vía que el SnPP. A día 43, se extrajo sangre a los animales por el plexo retro-orbital y posteriormente se sacrificaron por dislocación cervical. Tras el sacrificio, se les amputaron las patas traseras para el posterior estudio histológico y por  $\mu$ -CT, así como para el estudio de mediadores presentes en el homogeneizado (figura 16).

**Figura 16.** Protocolo experimental del estudio del SnPP en ratones DBA1/J.

### - Estudio del CORM-3 y del alendronato

En el día 22 del experimento los animales fueron distribuidos de manera aleatoria en 4 grupos diferentes (n=20) dependiendo de la operación, el CIA y el tratamiento: NA (ratones sanos), OVX-CIA (ratones artríticos ovariectomizados), CORM-3 (ratones OVX-CIA tratados con CORM-3) y ALN (ratones OVX-CIA tratados con ALN).

El CORM-3 (10 mg/kg/día vía i.p., disuelto en suero fisiológico) y el ALN (100 µg/kg/día, vía oral, en suero fisiológico) se administraron desde el día 22 hasta el día 49 del experimento. Para estudiar el efecto de estos tratamientos a dos tiempos distintos, la mitad de los ratones de cada grupo fueron sacrificados por dislocación cervical en los días 36 y 50. A ambos tiempos, se extrajo sangre a los animales por el plexo retro-orbital y tras su sacrificio, se les amputaron las patas traseras para el estudio histológico, inmunohistoquímico y por µ-CT, así como para el estudio de mediadores presentes en el homogeneizado (figura 17).

**Figura 17.** Protocolo experimental del estudio del CORM-3 y del ALN en ratones DBA1/J.

### 1.3.2. OVX+CIA en ratones B10.Q y B10.Q/Ncf1\*\*

En esta cepa de animales la inducción de la artritis se consigue al inyectar colágeno tipo II de rata.

Dos semanas después de la ovariectomía (día 0), se inmunizó a los ratones en la base de la cola con 100 µg de colágeno tipo II de rata (Smith y cols. 1975) diluido en ácido acético 0,1 M a la concentración de 100 µg/100 µl. Este colágeno se emulsionó en un volumen equivalente de FCA. A día 35, se reinmunizó a los animales en la base de la cola con 50 µg/50 µl de CII de rata disuelto en tampón fosfato salino (PBS) y emulsionado en un volumen equivalente de adyuvante incompleto de Freund (IFA).

Se considera que los ratones comienzan a desarrollar la artritis cuando se observan signos externos de hinchazón y/o enrojecimiento de las extremidades anteriores y posteriores de los animales. La inflamación articular de cada pata se puntuó visualmente utilizando una escala de 0-15, siendo 60 la puntuación máxima posible en cada animal. La puntuación se llevó a cabo por 2 observadores independientes sin conocimiento de los grupos experimentales, según los siguientes criterios:

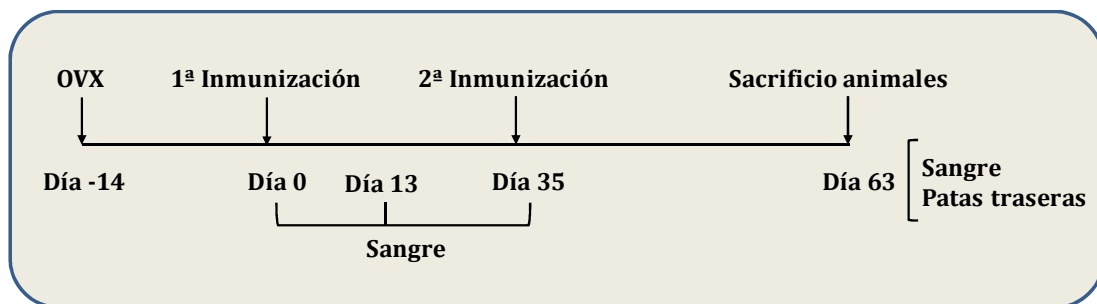
**Tabla 2.** Criterios de puntuación macroscópica de la artritis.

<b>Puntuación</b>	<b>Descripción</b>
+ 1	Por cada dedo rojo o inflamado
+ 1-5	Según la inflamación de la palma
+ 1-5	Según la inflamación de la muñeca o tobillo

Los animales se dividieron en 4 grupos (n=10-12) dependiendo de la cirugía y del CIA: Sham (ratones a los que se les realiza la simulación de la OVX), OVX (ratones ovariectomizados), Sham-CIA (ratones artríticos con operación simulada) y OVX-CIA (ratones artríticos ovariectomizados).

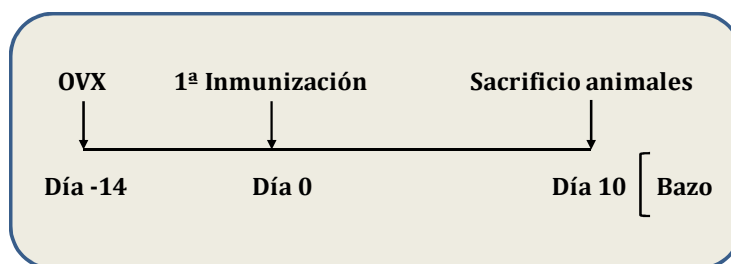
A días 0, 13, 35 y 63 se extrajo sangre a los animales por el plexo retro-orbital para la medida de diferentes mediadores en suero y para el estudio de la generación de ROS (ver apartado 6.5). A día 63, tras sacrificar a los animales por dislocación cervical, se les amputaron las patas para el posterior análisis histológico y por  $\mu$ -CT (figura 18).

**Figura 18.** Protocolo experimental en ratones B10.Q y B10.Q/Ncf1\*\*.



El mismo protocolo de ovariectomía y CIA se llevó a cabo en otro grupo de animales (n=3-8). En este caso, los animales se sacrificaron el día 10 después de la primera inmunización con CII. A estos animales se les extrajo el bazo para la realización de ensayos de proliferación de células B y T y para el estudio celular por citometría de flujo FACS (figura 19) (ver apartado 6).

**Figura 19.** Protocolo experimental para el posterior estudio *in vitro*.



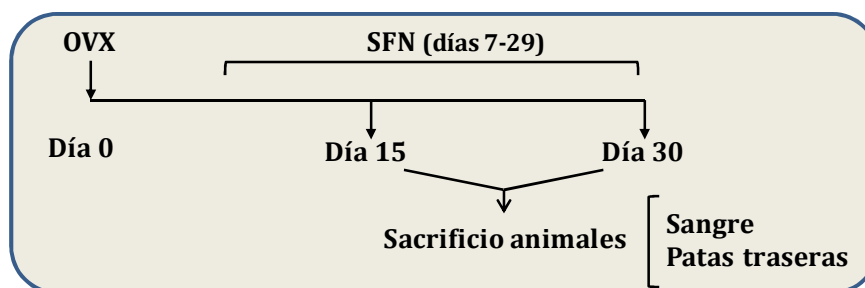
### 1.3.3. OVX en ratones C57Black-6 Nrf2<sup>+/+</sup> y C57Black-6 Nrf2<sup>-/-</sup>

En estos animales se ha realizado únicamente la ovariectomía o la operación simulada (día 0) para el estudio de la posible relación entre el factor Nrf2 y el déficit de estrógenos, así como con el metabolismo óseo. Para llevar a cabo la inducción de Nrf2 *in vivo*, a un grupo de animales C57Black-6 Nrf2<sup>+/+</sup> se les

administró SFN tres veces a la semana desde el día 7 al día 29 (50 mg/kg, i.p., disuelto en 5% EtOH en suero fisiológico).

En este experimento los animales se dividieron en 6 grupos (n=16-20) dependiendo de la cepa, el proceso quirúrgico y la administración o no de SFN: Nrf2<sup>+/+</sup> Sham, Nrf2<sup>+/+</sup> OVX, Nrf2<sup>+/+</sup> Sham SFN, Nrf2<sup>+/+</sup> OVX SFN, Nrf2<sup>-/-</sup> Sham y Nrf2<sup>-/-</sup> OVX. A días 15 y 30 después de la ovariectomía o de la operación simulada, se extrajo sangre a los animales por el plexo retro-orbital para el estudio de mediadores en suero y a cada tiempo se sacrificaron la mitad de los animales. Tras el sacrificio, se conservaron las patas traseras para el estudio por  $\mu$ -CT y para el estudio de mediadores en su homogeneizado (figura 20).

**Figura 20.** Protocolo experimental en ratones C57Black-6 Nrf2<sup>+/+</sup> y C57Black-6 Nrf2<sup>-/-</sup>.



## 2. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

### 2.1. Deshidratación y montaje en parafina de las rodillas

Tras sacrificar a los animales, se amputaron las patas traseras y se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS (pH 7,4) durante al menos 4 días. A continuación, se realizó la descalcificación de las muestras con ácido fórmico al 5% en agua destilada (pH 7,4) durante una semana, en agitación y a temperatura ambiente; o con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 10% [Tris (hidroximetilaminometano) 12,1 g, EDTA 100 g, NaOH 10 N 20 ml y agua milli Q (c.s.p. 1 litro), pH 7,3] durante 2 semanas, en agitación y a 4°C.

Una vez descalcificadas las rodillas se lavaron en agua ultrapura. A continuación se realizó su deshidratación utilizando un protocolo con un gradiente creciente de etanol y se finalizó con dos baños de xileno. Al finalizar el protocolo de deshidratación, se realizaron dos baños de parafina de 8 horas cada uno y un último baño durante toda la noche. Tras los baños de parafina se procedió a su orientación e inclusión en la misma. Una vez enfriados los bloques, se realizaron los cortes de las muestras (7  $\mu\text{m}$ ) empleando un micrótomo *Leica RM 2255* (Leica Biosystems, Nussloch, Alemania) y se montaron en portas *SuperFrost® Plus* (Menzel-Gläser, Braunschweig, Alemania).

Antes de realizar cualquier tinción o inmunohistoquímica se desparafinaron los cortes con xileno y se rehidrataron con un gradiente decreciente de etanol.

### **2.1.1. Tinciones realizadas**

**Hematoxilina de Gill y eosina acuosa (H&E)** (Panreac, Barcelona, España) para la tinción celular. El núcleo es teñido por la hematoxilina de color azulado y el citoplasma de color rosa por la eosina. Se emplearon muestras descalcificadas con ácido fórmico.

**Safranina O y *fast green*** para la visualización del cartílago. La safranina tiñe de rojo el cartílago y las zonas de crecimiento. El *fast green* tiñe de azul verdoso el tejido óseo. Se emplearon muestras descalcificadas con ácido fórmico.

**Fostatasa ácida tartrato resistente (TRAP)** para la visualización de osteoclastos. Esta tinción se basa en la actividad fosfatasa ácida tartrato resistente que presentan los osteoclastos. Al realizar esta tinción, los osteoclastos se marcan de color rojo y las demás células tienen coloreados sus núcleos de azul-morado por la hematoxilina y el citoplasma de azul claro por el azul de anilina. Se emplearon muestras descalcificadas con EDTA.

Una vez realizadas las tinciones de H&E y safranina O-*fast green*, se deshidrataron las muestras con un gradiente creciente de etanol y dos baños de xileno. Al final, los portas se montaron con medio de montaje no acuoso *DPX* (Panreac, Barcelona,

España). En el caso de la tinción TRAP, las muestras se lavaron con agua destilada y se montaron en medio acuoso (Dako North America, Inc., Carpinteria, CA, EE.UU.) Las muestras se observaron en un microscopio *Nikon Eclipse E600FN* (Nikon Instruments, Amstelveen, Países Bajos).

### 2.1.2. Evaluación histológica de la articulación

La evaluación histológica de la rodilla se llevó a cabo en la rótula (R) y en el fémur (F) de muestras teñidas con H&E (figura 21). La puntuación de cada parámetro en cada una de las zonas fue de 1,5, siendo la puntuación máxima de 3 por rodilla.

La **infiltración celular** se evaluó en una escala de 0-3 de acuerdo con el número de células inflamatorias en la cavidad sinovial (CS) (exudado) y en el tejido sinovial (TS) (infiltrado), donde 0=ninguna célula y 3=número más elevado de células en una muestra artrítica.

El cartílago articular (CA) se caracteriza por poseer dos zonas diferenciadas dependiendo de su posición en la articulación. El cartílago externo es más fácilmente destruible y el interno o calcificado es más resistente. La integridad del cartílago articular se evaluó teniendo en cuenta dos parámetros: disminución en el número de condrocitos y erosión en la superficie del cartílago. El grado de **condrocitos muertos** se evaluó de 0 (no pérdida de la densidad de células ni aparición de cavidades vacías) a 3 (pérdida completa de condrocitos en la capa del cartílago). La **erosión de la superficie del cartílago** se evaluó teniendo en

Figura 21. Tinción H&E de la rodilla (aumento x100).

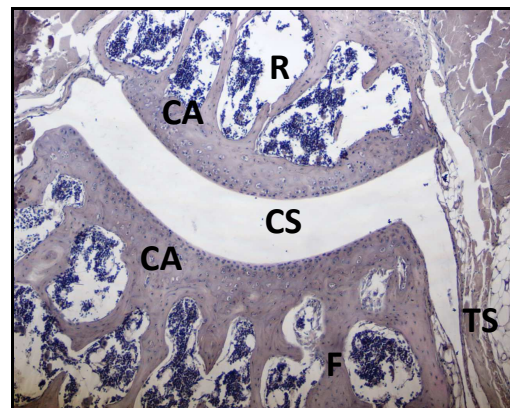
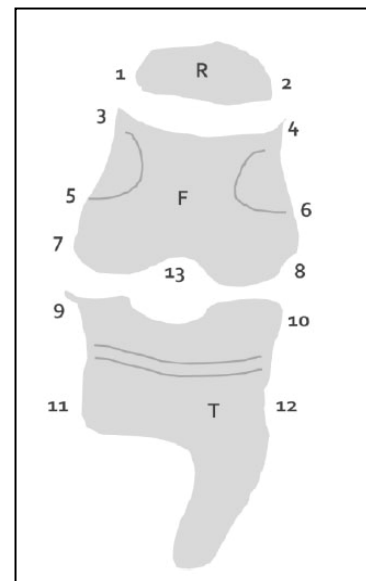


Figura 22. Zonas de evaluación de la erosión ósea.



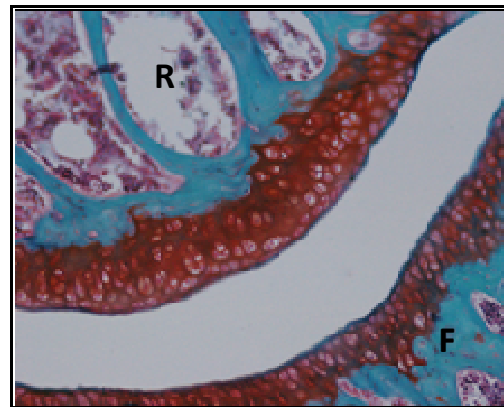


cuenta la pérdida de la continuidad de la misma. Se siguió una escala de 0-3, donde 0=no pérdida del cartílago y 3=una pérdida completa del cartílago articular.

Además de la evaluación del cartílago, se evaluó la **erosión ósea** en 13 zonas distintas de la articulación (R=rótula, F=fémur y T=tibia) (figura 22). Se utilizó una puntuación de 0-3 dependiendo del grado de erosión por parte del infiltrado, donde 0=no erosión ósea y 3=el infiltrado consigue atravesar el hueso y llegar a la médula.

En las secciones teñidas con safranina O-*fast green* se evaluó la **pérdida de proteoglicano** (figura 23). El proteoglicano es un componente de la matriz extracelular del cartílago producida por los condrocitos que se tiñe de color rojo-anaranjado. Durante el proceso artrítico se produce una pérdida de condrocitos y por lo tanto una pérdida de matriz extracelular, que se observa por una pérdida progresiva de coloración. La pérdida de proteoglicano se evaluó utilizando una escala de 0-3, donde 0=tinción completa del cartílago y 3=no tinción o pérdida completa de la capa externa del cartílago articular.

**Figura 23.** Tinción safranina O-*fast green* del proteoglicano (aumento x200).



Todas las puntuaciones se llevaron a cabo por dos observadores independientes sin conocimiento de los grupos experimentales.

## 2.2. Deshidratación y montaje en compuesto OCT de los tobillos

Tras sacrificar a los animales, se amputaron las patas traseras y se descalcificaron con EDTA al 10% en agua milli Q (pH 6,95) durante 3 semanas, en agitación y a 4°C. Una vez descalcificadas, los tobillos se lavaron en agua ultrapura y se montaron en compuesto OCT (Histolab Products AB, Gotemburgo, Suecia). Las muestras se mantuvieron a -80°C hasta su uso.

Una vez congelados los bloques, se realizaron los cortes de las muestras (9  $\mu\text{m}$ ) empleando un criostato *Microm HM 500 OM* (Cellylab Nordia AB, Estocolmo, Suecia) y se montaron en portas SuperFrost® Plus (Menzel-Gläser, Braunschweig, Alemania).

Antes de realizar cualquier tinción se desparafinaron los cortes con xileno y se rehidrataron con un gradiente decreciente de etanol.

### 2.2.1. Tinciones realizadas

**Hematoxilina de Gill y eosina acuosa (H&E)** para la tinción celular. El núcleo es teñido por la hematoxilina de color azulado y el citoplasma de color rosa por la eosina. Utilizamos una máquina de tinción automática *Tissue Stainer TST 33* (Meditate medizintechnik, Burgdorf, Alemania) (figura 24).

**Fostasa ácida tartrato resistente (TRAP)** para la visualización de osteoclastos (descrita anteriormente en el apartado 2.1.1) (figura 25).

Una vez realizadas las tinciones, las muestras con H&E se deshidrataron con un gradiente creciente de etanol y dos baños de xileno y se montaron con medio de montaje no acuoso *Pertex®* (Histolab Products AB, Gotemburgo, Suecia). En el caso de la tinción TRAP, las muestras se lavaron con agua destilada y se montaron con medio acuoso (Dako North America, Inc., Carpinteria, CA, EE.UU.). Una vez montados los cortes, las muestras se observaron en un microscopio *Zeiss Axioplan* (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemania) y las fotos fueron tomadas en una cámara *SPOT RT* (Diagnostic instruments, Inc., Sterling Heights, MI, EE.UU.).

**Figura 24.** Tinción H&E del tobillo (aumento x100).



**Figura 25.** Tinción TRAP del tobillo (aumento x100).



### 2.2.2. Evaluación histológica de la articulación

La evaluación histológica de los tobillos teñidos con H&E se llevó a cabo en la zona de la tibia (T) y el calcáneo (C). En esta zona se evaluó como nula, media o severa la presencia o no de 11 parámetros distintos: hiperplasia, infiltración, angiogénesis, necrosis y pannus en el **sinovio**; erosión y formación de nuevo **cartílago** y **hueso**; y destrucción de la **estructura articular** y aparición de anquilosis.

Todas las valoraciones se llevaron a cabo por dos observadores independientes sin conocimiento de los grupos experimentales.

## 3. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

El análisis inmunohistoquímico se realizó para visualizar proteínas presentes en los cortes parafinados de las rodillas mediante un sistema de detección colorimétrico.

### - Protocolo experimental

En este análisis, las rodillas fijadas en paraformaldehído fueron descalcificadas con EDTA al 10% en agua milli Q (pH 7,3) durante 2 semanas en agitación y a 4°C (renovando el descalcificante a la semana).

Una vez descalcificadas las muestras, se realizó el mismo proceso que durante el análisis histológico para el montaje de las muestras en parafina, la realización de los cortes y el montaje y desparafinado de los mismos. Tras desparafinar, se lavaron los cortes histológicos con PBS-Tween 20 (0,1%) y se incubaron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2% en metanol durante 10 minutos a temperatura ambiente para bloquear la actividad peroxidasa endógena. Después de lavar abundantemente, se bloquearon las uniones inespecíficas con suero de cabra (1/10) durante 15 minutos. Tras varios lavados, se incubó con el anticuerpo primario correspondiente durante 2 horas (tabla 3). Después de lavar, las muestras se incubaron durante 30 minutos con el anticuerpo secundario biotinilado (Dako, Glostrup, Dinamarca, 1/250). Posteriormente, se añadió la avidina/peroxidasa de rábano (HRP) (Dako, Glostrup,

Dinamarca, 1/1.000) y tras 30 minutos, se añadió el sustrato diaminobenzidina (DAB) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Finalmente se realizó una tinción de contraste con hematoxilina (1/10). A continuación las muestras se deshidrataron, se montaron con medio de montaje no acuoso *DPX* (Panreac, Barcelona, España) y se observaron en un microscopio *Nikon Eclipse E600FN* (Nikon Instruments, Amstelveen, Países Bajos).

**Tabla 3.** Anticuerpos utilizados para el análisis inmunohistoquímico.

Anticuerpo	Fabricante	Dilución
<b>COX-2</b>	Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EE.UU.)	1/150
<b>HO-1</b>	Stressgen (Victoria, Canadá)	1/100
<b>h-PGDS</b>	Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EE.UU.)	1/250
<b>l-PGDS</b>	Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EE.UU.)	1/300

El análisis se realizó en la zona de la rótula-fémur de la articulación. El conteo celular se realizó seleccionando la misma área en las distintas muestras para que los resultados obtenidos fueran comparables.

#### 4. ANÁLISIS POR TOMOGRAFÍA MICROCOMPUTARIZADA ( $\mu$ -CT)

La  $\mu$ -CT es una técnica de rayos X no invasiva y no destructiva que proporciona imágenes tridimensionales de la estructura interna de un objeto, en nuestro caso del hueso. Esta técnica utiliza datos en 3D, lo que permite cuantificar directamente la microarquitectura ósea trabecular.

Tras sacrificar a los animales, se les amputaron las patas traseras y se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las muestras fueron analizadas mediante un equipo *SkyScan 1172* que posee una cámara de rayos X de 100kV y con una corriente de 100  $\mu\text{A}$  (Trabeculae SL, Ourense, España). El tamaño del vóxel analizado fue de 6  $\mu\text{m}$ .

El análisis por  $\mu$ -CT de las muestras de ratones DBA1/J y B10.Q se realizó en la zona proximal de la tibia, concretamente en el hueso trabecular subcondral y metafisario.

En el caso de los ratones C57Black-6 Nrf2<sup>+/+</sup> y C57Black-6 Nrf2<sup>-/-</sup> se realizó el análisis de un compartimento de hueso trabecular y de un compartimento de hueso cortical en la parte distal del fémur de los animales.

Los índices morfométricos estudiados por esta técnica se describen en la tabla 4.

**Tabla 4.** Índices morfométricos estudiados por  $\mu$ -CT **A**, en el hueso trabecular de la tibia y del fémur; **B**, en el hueso cortical del fémur.

A

Parámetro	Descripción
<b>BV/TV</b>	<i>Fración volumétrica ósea:</i> porcentaje de volumen de hueso por volumen de área total
<b>BS/BV</b>	<i>Superficie específica de hueso:</i> relación entre la superficie total del hueso trabecular y el volumen de interés analizado
<b>BS/TV</b>	<i>Superficie específica ósea:</i> relación entre la superficie total del hueso trabecular con el volumen ocupado por hueso mineralizado
<b>Tb.Th</b>	<i>Grosor trabecular:</i> grosor medio tridimensional de las trabéculas
<b>Tb.Sp</b>	<i>Separación trabecular:</i> grosor del espacio entre las trabéculas
<b>Tb.N</b>	<i>Número trabecular:</i> número de veces que se atraviesan las trabéculas por unidad de longitud
<b>Tb.Pf</b>	<i>Factor de patrón trabecular:</i> a mayor Tb.Pf, menor conectividad entre las trabéculas
<b>DMOv</b>	<i>Densidad mineral ósea volumétrica:</i> medida de la cantidad de minerales que contiene un cierto volumen de hueso

B

Parámetro	Descripción
<b>Ct.Th</b>	<i>Grosor cortical:</i> grosor de la pared cortical en el volumen de interés analizado
<b>Ct.V</b>	<i>Volumen cortical:</i> Es el volumen de hueso cortical total en el volumen de interés analizado
<b>MV</b>	<i>Volumen medular:</i> Se obtiene sustrayendo al volumen de interés analizado el volumen cortical
<b>Cs.Th</b>	<i>Grosor de la sección transversal:</i> Se excluyen los espacios entre las secciones transversales analizando solamente el grosor de cada sección
<b>B.Ar</b>	<i>Área de hueso media de las secciones transversales:</i> media de las áreas de hueso de cada una de las secciones transversales
<b>Ct.En.Pm</b>	<i>Perímetro periosteal:</i> perímetro de la cara externa de la pared cortical
<b>MMI (polar)</b>	<i>Momento de inercia polar medio:</i> Indica la resistencia a la rotación de una sección transversal en un eje determinado
<b>DMOv</b>	<i>Densidad mineral ósea volumétrica:</i> medida de la cantidad de minerales que contiene un cierto volumen de hueso

## 5. CUANTIFICACIÓN DE ANALITOS EN SUERO Y PATA

En los distintos experimentos, se extrajo sangre a los animales a diferentes tiempos. La sangre se introdujo en tubos *STT<sup>TM</sup>* (*BD Microtainer<sup>®</sup>*, Franklin Lakes, NJ, UU.EE.) y se dejó en reposo durante media hora a temperatura ambiente. Tras su centrifugación (12.800 r.p.m., 5 minutos, 4°C) se recogió el sobrenadante y se congeló a -80°C hasta su uso para la determinación de distintos mediadores en suero.

Una vez sacrificados los animales, se amputaron las patas y se congelaron a -80°C. Posteriormente, las patas se pulverizaron en N<sub>2</sub> líquido y se introdujeron en tubos de ensayo con tampón A, el cual lleva distintos inhibidores de proteasas para impedir la degradación proteica [para 100 ml: 100 µl de HEPES 1M (pH 8), 100 µl de EDTA 0,1M, 100 µl de EGTA 0,01M, 100 µl de KCl 1M, 10 µl de ditioneitol (DTT)]

1mM, 100 µl de NaF 5mM, 20 µl de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM, 10 µl de leupeptina (1 µg/ml), 10 µl de aprotinina (0,1 µg/ml), 25 µl de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,5 mM y 8.700 µl de agua destilada]. El homogeneizado de pata se sonicó en 3 ciclos de 10 segundos y se incubó durante 10 minutos a 4°C. A continuación se centrifugó el homogeneizado a 2.500 r.p.m., durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se congeló a -80°C hasta su utilización.

### **5.1. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)**

La técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) es un ensayo que se basa en la detección de antígenos mediante el uso de anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Dependiendo de qué sustrato reconozca la enzima, el resultado de la reacción enzimática será detectado mediante detección colorimétrica o fluorescente. Para la **detección colorimétrica**, se utiliza un anticuerpo secundario o de detección biotinilado y el sistema conjugado estreptavidina-peroxidasa. Sin embargo, para la **detección fluorescente**, la enzima convierte el sustrato en un producto de reacción que emite fluorescencia cuando es excitado a una determinada longitud de onda, siendo las unidades relativas de fluorescencia (fotones de luz emitidos) proporcionales a la cantidad de producto analizado. En este tipo de ELISA, tras el anticuerpo secundario biotinilado se añade el complejo europeo-streptavidina y una solución intensificadora de la fluorescencia (*Delfia*<sup>®</sup>, Turku, Finlandia).

Dependiendo de cuantos anticuerpos se emplean, los ELISAs se dividen en directos o indirectos. El **ELISA directo** se basa en que el antígeno a cuantificar se une a un anticuerpo primario específico que lleva unida la enzima. En el **ELISA indirecto**, el antígeno también es reconocido por el anticuerpo primario que en este caso no lleva la enzima. Una vez unidos antígeno-anticuerpo primario, el anticuerpo primario es reconocido por el anticuerpo secundario que es el portador de la enzima.

En la tabla 5 se indican los ELISAs comerciales empleados en la presente Tesis que fueron realizados siguiendo estrictamente las recomendaciones del fabricante. Todos los ELISAs fueron de tipo indirecto y de detección colorimétrica, excepto los ELISAs para IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  que fueron de detección fluorométrica. La intensidad de color o de fluorescencia obtenida se midió en un contador *VICTOR 2 Wallac 1430 multilabel counter* (Perkin Elmer, Turku, Finlandia) a la longitud de onda indicada por el fabricante.

**Tabla 5.** Sistemas de ELISA utilizados.

Proteína	Muestra estudiada	Fabricante	Sensibilidad
<b>Ac anti-CII (IgG)</b>	Suero	MD Bioscience (Zürich, Suiza)	0,375 ng/ml
<b>COMP</b>	Suero	MD Bioscience (Zürich, Suiza)	0,2 U/l
<b>CTX-I</b>	Suero	IDS (Paris, Francia)	2,0 ng/ml
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Homogeneizado	R&D Systems Inc (Minneapolis, MN, EE.UU.)	5,1 pg/ml
<b>IL-6</b>	Homogeneizado Suero	eBioscience (San Diego, CA, EE.UU.)	6,5 pg/ml
<b>MMP-3</b>	Homogeneizado Suero	RayBiotech, Inc. (Norcross, GA, EE.UU.)	10,0 pg/ml
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Homogeneizado	R&D Systems Inc (Minneapolis, MN, EE.UU.)	3,0 pg/ml
<b>TRAP-5b</b>	Suero	IDS (Paris, Francia)	0,1 U/l

Es sabido que la unión de los anticuerpos anti-CII a determinados epítomos del colágeno se correlaciona con el desarrollo de la artritis. Así pues, los epítomos 28 (C1), 37 (U1) y 41 (J1) se consideran artritogénicos. Por el contrario, el epítomo 66 (F4) no lo es (Burkhardt y cols. 2002). En nuestro estudio, seleccionamos una serie de epítomos (9, 10, 13-38, 41, 42, 53, 66, 70) basándonos en resultados previos.



Para llevar a cabo el estudio de la unión específica de los anticuerpos IgG a los distintos **epítomos** del colágeno se usó suero de los ratones B10.Q y B10.Q/Ncf1\*\* y se realizó el siguiente protocolo. Se incubaron placas de ELISA (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con 10 µg/ml de avidina toda la noche a 4°C. Posteriormente, se lavaron con 2% BSA/PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez eliminado completamente el BSA/PBS, se añadió 5 µg/ml de cada péptido estudiado (9, 10, 13-38, 41, 42, 53, 66, 70) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar, se añadieron las muestras diluidas en PBS (1/500) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. La unión específica del anticuerpo se detectó usando un anticuerpo IgG-peroxidasa (Jackson ImmunoResearch laboratories, West Grove, PA EE.UU.). Además de la especificidad de los epítomos del colágeno, la **respuesta frente al colágeno II** de estos animales también se estudió por ELISA. Las placas se incubaron toda la noche con 10 µg/ml de colágeno II de rata. Después de lavar las placas, se incubó el suero durante 1 hora a temperatura ambiente. Como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos específicos para IgG, IgG1, IgG2b e IgG2c conjugados con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA EE.UU, 1/5.000). En todos los casos se utilizó ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) como sustrato (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y la absorbancia se midió a 405 nm en un espectrofotómetro *Synergy 2* (BioTek®, Winooski, VT, EE.UU.).

## 5.2. EIA competitivo

El EIA competitivo es un enzimoimmunoanálisis que se basa en la competición entre el antígeno presente en la muestra problema y una cantidad fija de antígeno conjugado con acetilcolinesterasa (Ag-AchE) por una cantidad conocida de anticuerpo monoclonal. La cantidad de Ag-AchE que se unirá al anticuerpo monoclonal será inversamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra problema.

Este tipo de ensayo ha sido empleado en la presente Tesis para determinar niveles de PGD<sub>2</sub> en suero y homogeneizado, siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EE.UU; sensibilidad: 200 pg/ml).

A las placas de 96 pocillos se les ha adherido previamente un anticuerpo policlonal de cabra. En estas placas, se incubaba a la vez la muestra en estudio, el antígeno conjugado con acetilcolinesterasa (PGD<sub>2</sub>-AChE) y el anticuerpo anti-PGD<sub>2</sub>. Tras incubarse toda la noche a 4°C se lava la placa y el complejo formado por anticuerpo-PGD<sub>2</sub> (libre o conjugada con AChE) quedará unido al anticuerpo policlonal de cabra. Una vez lavada la placa, se añade el Reactivo de Ellman que contiene acetilcolina y ácido 2-nitrobenzoico. La tiocolina, producida por la degradación de la acetilcolina por la AChE, reacciona con el ácido 2-nitrobenzoico dando lugar a un compuesto de color amarillo (5-tio-2-nitrobenzoico). La intensidad del color amarillo se midió a 412 nm en un contador *VICTOR 2 Wallac 1420 multilabel counter* (Perkin Elmer, Turku, Finlandia). Por lo tanto, la intensidad de color amarillo será inversamente proporcional a la cantidad de PGD<sub>2</sub> libre en el pocillo.

### 5.3. Radioinmunoensayo (RIA)

El radioinmunoensayo se basa en la competición entre un antígeno presente en la muestra problema y una cantidad fija de ese antígeno marcado con tritio (H<sup>3</sup>) por una cantidad conocida de anticuerpo específico para ese antígeno. La cantidad de radioactividad detectada (emisiones β) será inversamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra problema. Cuanto mayor sea la emisión, menor será la cantidad de PGE<sub>2</sub> en la muestra y viceversa.

En la presente Tesis se ha empleado el RIA para la detección del ecosanoide PGE<sub>2</sub> en homogeneizado de pata. Este ecosanoide competirá con la PGE<sub>2</sub> tritiada (PGE<sub>2</sub>\*) por la unión al anticuerpo anti-PGE<sub>2</sub>.

Como se describe en la tabla 6, en los distintos tubos se añadieron determinados volúmenes de tampón A1 [NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (1,19 g/l), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (4,6 g/l), BSA (5,1 g/l) y azida sódica (0,1%), pH 7,4], tampón B1 [Tampón A1 + NaCl (9g/l), pH 7,4],

muestras o patrón, anticuerpo, PGE<sub>2</sub>\* y carbón activo-dextrano (0,5g de Dextrano en 100 ml de Tampón A1 + 1g de Carbón activo).

**Tabla 6.** Protocolo del RIA.

TUBO V (μl)	Tampón A1	Tampón B1	Muestras o Patrón	Anti-PGE <sub>2</sub>	PGE <sub>2</sub> *	Carbón activo-Dextrano
<b>Totales</b>	400	100	NO	NO	100	NO
<b>NSB</b>	200	100	NO	NO	100	200
<b>B0</b>	100	100	NO	100	100	200
<b>Patrón</b>	NO	100	100	100	100	200
<b>Muestras</b>	NO	100	100	100	100	200

En primer lugar, se añadió a cada tubo correspondiente las muestras y los patrones de la curva estándar. Estas muestras se diluyeron con los volúmenes correspondientes de los tampones A1 y B1. A continuación, se añadió el anticuerpo anti-PGE<sub>2</sub> (Sigma Aldrich, St. Louis; MO, EE.UU.) y la PGE<sub>2</sub>\*. Tras agitar los tubos, éstos se incubaron durante 18-24 horas a 4°C. Una vez transcurrido ese tiempo, se añadió carbón activo-dextrano, se agitaron los tubos y se dejaron en reposo durante 10 minutos a 4°C. A continuación se centrifugaron a 2.500 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C, para precipitar todo lo que no está unido al anticuerpo. Tras la centrifugación, se recogieron 400 μl de los sobrenadantes en 3 ml de líquido de centelleo *Optiphase Supermix* (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE.UU.). Después de agitar la mezcla, la emisión β se midió en un contador de centelleo líquido *Microbeta Trilux* (Wallac, Turku, Finlandia).

#### 5.4. Inmunoensayo de biomarcadores por Multiplex de Luminex

Los inmunoensayos de *Multiplex* de *Luminex*<sup>®</sup> (Millipore, Corporation, Billerica, MA, EE.UU.) se basan en la tecnología *xMap*<sup>®</sup> la cual utiliza microesferas de poliestireno que contienen distintas proporciones de dos fluorocromos en su interior que al ser excitadas por el láser del citómetro de flujo emiten señales

diferentes, siendo así posible separar las distintas poblaciones de microesferas por la composición de fluorocromos. Usando unas proporciones precisas de ambos fluorocromos, podemos llegar a distinguir hasta 100 grupos de microesferas distintas. Cada grupo de microesferas tiene en su superficie un anticuerpo específico al que se unirá el analito en estudio. La adición de un anticuerpo secundario biotilado frente al analito y la adición posterior de estreptavidina conjugada con ficoeritrina provocan la emisión de fluorescencia tras la excitación. La cuantificación de las moléculas que emiten fluorescencia se realiza mediante el uso de un citómetro de 2 láseres: uno de ellos discrimina entre los distintos tipos de poblaciones de microesferas y el segundo láser excita la ficoeritrina produciendo la fluorescencia, la cual será proporcional a la cantidad de analito unido a la microesfera.

**- Protocolo experimental:**

Durante el desarrollo de la presente Tesis, esta técnica se utilizó para medir los niveles de RANKL, OPG, osteocalcina, IL-6, IL-17 y TNF $\alpha$  en el suero de los ratones. Antes de empezar el ensayo, los sueros fueron centrifugados a 3.300 r.p.m. durante 10 minutos y la placa se hidrató con el tampón proporcionado por el fabricante durante 10 minutos. Tras eliminar los restos de tampón, se añadieron la curva estándar, los controles de calidad internos y los sueros. A continuación, se añadió a cada pocillo la mezcla de microesferas marcadas con el anticuerpo específico para el biomarcador en estudio. Tras incubar la placa toda la noche a 4°C en agitación, se lavó la misma y se añadió a cada pocillo el anticuerpo de detección. Se incubó la placa 1 hora y a continuación, se añadió a cada pocillo un volumen fijo de estreptavidina-ficoeritrina. La placa se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, en agitación y en oscuridad. Tras el lavado de la placa, se añadieron 100  $\mu$ l de líquido de sistema y, en oscuridad, se agitó durante 10 minutos para resuspender las microesferas y asegurar una distribución homogénea de éstas en el pocillo. El citómetro de flujo contó las primeras 50 microesferas que pasaron por el lector.

**Tabla 7.** Sistemas Luminex utilizados.

Biomarcador	Sensibilidad
IL-6	0,6 pg/ml
IL-17	0,5 pg/ml
Osteocalcina	7,0 pg/ml
Osteoprotegerina	2,3 pg/ml
RANKL	3,3 pg/ml
TNF $\alpha$	0,8 pg/ml

### 5.5. *Western Blot*

Esta técnica permite separar electroforéticamente proteínas en función de su peso molecular sobre un gel de poliacrilamida después de establecer una diferencia de potencial. Una vez separadas las proteínas en el gel, éstas se transfieren a una membrana mediante la aplicación de un campo eléctrico. La identificación de las proteínas se consigue mediante el empleo de anticuerpos específicos y la posterior detección de los mismos por una reacción de quimioluminiscencia.

#### - Protocolo experimental:

En esta técnica experimental hemos utilizado el homogeneizado de las patas traseras de los animales. El homogeneizado, una vez descongelado, fue sonificado a 4°C durante 2 ciclos de 10 segundos. A continuación, se centrifugaron las muestras a 10.500 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos corresponden al extracto total de proteína. La enzima HO-1 es de localización microsomal, por lo que para determinar su expresión es necesario separar la fracción microsomal. Para ello, el extracto total de proteína se sometió a ultracentrifugación a 40.000 r.p.m. (1 hora y 40 minutos a 4°C) quedando la fracción citosólica en el sobrenadante y la microsomal en el *pellet*. La proteína se cuantificó mediante el método Bradford (Bradford 1976), utilizando el kit comercial de determinación de proteínas *Bio-Rad Dc Protein Assay* (Bio-Rad

Laboratories, Hercules CA, EE.UU.), método adaptado para muestras solubilizadas en tampones que contienen altas concentraciones de detergentes.

Una vez cuantificadas las proteínas de cada muestra, las muestras se mezclaron a partes iguales con tampón de carga desnaturante de Laemmli [Tris-HCl 1 M (pH 6,8) al 16% (v/v), sodio dodecilsulfato (SDS) al 4% (p/v), glicerol al 20% (v/v), DTT al 3,08% (p/v) y azul bromofenol al 4% (v/v)] (1:1) conteniendo cada muestra la misma cantidad de proteína (30 µg proteína). Una vez obtenida la mezcla, las muestras se hirvieron durante 5 minutos para facilitar la desnaturación de las proteínas y se cargaron en un gel de acrilamida-bisacrilamida-SDS al 10%. Al aplicar una diferencia de potencial constante de 100-120V durante aproximadamente 2 horas, las proteínas de cada muestra se separaron en función de su peso molecular. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de polivinilideno difluoruro (GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, España) mediante un sistema de transferencia con intensidad de corriente constante de 125 mA durante 2 horas. A continuación, la membrana se trató con leche desnatada al 4% en tampón PBS-Tween-20 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente con suave agitación para bloquear posibles sitios de unión inespecíficos. Seguidamente, las membranas se lavaron con PBS-Tween-20 0,1% y se incubaron con el anticuerpo específico anti-HO-1 (1/1.000) (Stressgen, Victoria, Canadá) durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras lavar la membrana varias veces, se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente con la inmunoglobulina IgG de cabra anti-conejo acoplada a peroxidasa de rábano (1/5.000) (Dako, Glostrup, Dinamarca). Finalmente, las bandas se visualizaron mediante un sistema de quimioluminiscencia *ECL* (GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, España). La membrana se trató durante 1 minuto con una solución que contenía luminol y peróxido de hidrógeno a partes iguales. De esta manera, la peroxidasa, en presencia de peróxido de hidrógeno, provoca la oxidación del luminol y éste emite luz que es detectada por el sistema computerizado de revelado *Autochemi™ System* (UPV Inc., Upland, CA, EE.UU.). Este sistema está acoplado al programa *Labworks™ 4.6* que permite la adquisición y análisis de las imágenes.

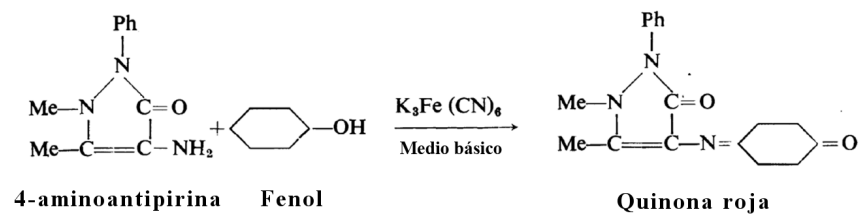
A modo de control interno, las membranas se reincubaron posteriormente durante 45 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-GAPDH (1/10.000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) para visualizar las proteínas totales y así poder normalizar las posibles diferencias entre la cantidad de proteínas de las muestras.

## 5.6. Ensayo de actividad de fosfatasa alcalina

Los osteoblastos son ricos en fosfatasa alcalina, enzima encargada de liberar grupos fosfato. La función específica de esta enzima no está del todo clara aunque se ha demostrado que es un indicador bioquímico del remodelado óseo, ya que los grupos fosfato que libera pueden unirse al calcio dando lugar al fosfato de calcio (cristal de hidroxiapatita).

En presencia de 4-aminoantipirina (AAP),  $K_3Fe(CN)_6$  y medio básico, los fenoles libres en el medio reaccionan con la AAP y dan lugar a una quinona roja (Kind y King 1954) (figura 26). El protocolo empleado en este método se basa en la medida de la intensidad del color de este compuesto a una longitud de onda de 505 nm.

Figura 26. Reacción de detección de grupos fenol.



En nuestro ensayo añadimos un sustrato (fenil fosfato disódico) que en presencia de ALP, da lugar a la liberación de grupos fosfato y grupos fenoles. Los grupos fenoles libres generados son detectados colorimétricamente al reaccionar con la AAP.

**- Protocolo experimental:**

En este método vamos a emplear los sueros obtenidos a los distintos tiempos de los experimentos realizados con ratones DBA1/J y C57Black-6.

En primer lugar, añadimos 0,25 ml de sustrato a 0,25 ml de tampón [ $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,636 g,  $\text{NaHCO}_3$  0,336 g y agua destilada (c.s.p. 100 ml), pH 10] y tras incubar a 37°C durante 3 minutos añadimos 0,025 ml de suero. Dejamos incubar 15 minutos a 37°C y añadimos 0,2 ml NaOH (0,5N), 0,3 ml  $\text{NaHCO}_3$  (0,5M), 0,25 ml AAP (0,6%) y 0,25 ml  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  (2,4%) para que se lleve a cabo la reacción entre AAP y los grupos fenol. Al añadir  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  observamos cómo las muestras se colorean de rojo. Dejamos reposar las muestras 10 minutos y pasamos a medir su coloración. Como estándar utilizamos 0,01 g/ml de fenol. En esta muestra, se añade la solución de fenol (0,25ml) a 0,275 ml de tampón. A continuación, al igual que en las muestras problema, se añade NaOH,  $\text{NaHCO}_3$ , AAP y  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ . Además del estándar realizamos un blanco, en el que en lugar de añadir la solución de fenol, añadimos 0,5 ml de agua destilada. Por último, y como control interno, realizamos una última muestra en la que, tras incubar durante 15 minutos a 37°C el sustrato junto con el tampón, añadimos suero, NaOH,  $\text{NaHCO}_3$ , AAP y  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ . La diferencia entre esta muestra y las muestras problema, es que en las últimas, tras añadir el suero, hay una incubación de 15 minutos y en el control no.

La coloración obtenida es estable durante 1 hora. Antes de ese tiempo, todas las muestras se leyeron en un espectrofotómetro *Cary 50 Scan UV-Vis Spectrophotometer* (Varian Australia Pty Ltd, Victoria, Australia). Una vez leídas todas las muestras, las unidades de fosfatasa (Unidades K.A.) se calculan de la siguiente manera:

$$\text{Unidades K.A.} = ((\text{Test-Control}) / (\text{Estándar-Blanco})) * 10$$

## **6. MÉTODOS DE ESTUDIO *in vitro***

Todos los ensayos *in vitro* se realizaron con sangre o células del bazo procedentes de ratones B10.Q y B10.Q/Ncf1\*\* (ver apartado 1.3.2).



## 6.1. Ensayos de proliferación celular

Este tipo de ensayos se realizaron en células de bazo para estudiar la proliferación tanto de células B como de células T. Cuando las células son estimuladas, producen una serie de citocinas. Al medir las citocinas características de las células B o T, podremos saber el nivel de proliferación de dichas células tras el estímulo.

### - Protocolo experimental:

Los animales se sacrificaron el día 10 después de la primera inmunización con CII. Los bazos se homogeneizaron en PBS. La suspensión celular resultante se centrifugó a 1.500 r.p.m. durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en tampón ACK [ $\text{NH}_4\text{Cl}$  4,125 g, EDTA 0,185 g,  $\text{KHCO}_3$  0,5 g y agua destilada (c.s.p. 500 ml), pH 7,9] durante 1 minuto para lisar las células rojas. Tras lavar dos veces con PBS, las células se resuspendieron en DMEM (*Gibco*<sup>®</sup>, Life Technologies Ltd, Paisley, Reino Unido) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF), 1% de 2-mercaptoetanol y 50 mg/ml estreptomycin (medio completo). Una vez resuspendidas las células, se sembraron  $1 \times 10^6$  células/pocillo (100  $\mu\text{l}$ ) en placas de 96 pocillos.

Para medir la proliferación de **células B**, se sembraron seis pocillos por muestra. A tres pocillos se les añadió 100  $\mu\text{l}$  de medio completo y a los tres restantes 100  $\mu\text{l}$  de LPS (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Las placas se incubaron durante 90 horas en un incubador a 37°C, con atmósfera controlada al 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de humedad. A las 48 horas de haber añadido el medio completo o el LPS, se recogió el sobrenadante para la posterior medida de IL-10 por ELISA. A las 72 horas, se añadió 10  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}^3$ -Timidina por pocillo. Tras 16-18 horas se recogieron las células y la incorporación de  $\text{H}^3$ -Timidina se midió en un contador de emisión  $\beta$  (*Matrix 96 Direct Beta Counter*, Packard Instrument Company, Meriden, Conn, EE.UU).

Para el estudio de proliferación de **células T**, las células del bazo se procesaron de igual modo al anteriormente descrito. Se sembraron  $1 \times 10^6$  células/pocillo (100  $\mu\text{l}$ ) en placas de 96 pocillos. Por cada muestra se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de 4 estímulos por triplicado: anti-CD3 (5  $\mu\text{g/ml}$ , BD Bioscience Pharmingen, Franklin Lakes, NJ,

EE.UU.), CII (100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , producido por el laboratorio *Medical Inflammation Research, Karolinska Institutet*, Estocolmo, Suecia), CII desnaturalizado (dCII) (100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) y medio completo. A las 24 y 72 horas de incubación, se recogió el sobrenadante para la posterior medida de IL-2 e IFN- $\gamma$ , respectivamente.

## 6.2. Cuantificación de citocinas en sobrenadantes

En los sobrenadantes obtenidos de los ensayos de proliferación de células B y T se realizó la medida de los niveles de distintas citocinas (Tabla 8).

**Tabla 8.** Citocinas medidas en sobrenadantes.

Ensayo	Citocina	Anticuerpo primario (concentración/pocillo)	Anticuerpo secundario (concentración/pocillo)
<b>Proliferación células B</b>	IL-10	Jes5-2A5 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Biolegend, San Diego, CA, EE.UU.)	anti-rata IgG de cabra (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, EE.UU.)
<b>Proliferación células T</b>	IL-2	Jes6-1A12 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (MIR, Karolinska Institutet, Estocolmo, Suecia)	Jes6-5H4 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Mabtech AB, Nacka Strand, Suecia)
	IFN $\gamma$	R46-A2 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (MIR, Karolinska Institutet, Estocolmo, Suecia)	AN18 (0,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Mabtech AB, Nacka Strand, Suecia)

Las placas de 96 pocillos se incubaron toda la noche con 50  $\mu\text{l}/\text{pocillo}$  del anticuerpo primario correspondiente diluido en PBS. A continuación, se lavaron las placas 3 veces con PBS-Tween-20 0,1% y se añadieron las muestras (50  $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ ). Se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar las placas 3 veces, se añadieron 50  $\mu\text{l}/\text{pocillo}$  del anticuerpo secundario biotinilado correspondiente diluido en PBS/Tween 0,1%/0,1% BSA. Tras incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, las placas se lavaron varias veces y se añadió el complejo europeo-estreptavidina y una solución intensificadora de la fluorescencia (*Delfia*<sup>®</sup>, Turku, Finlandia). La intensidad de la

fluorescencia se midió en un contador *VICTOR 2 Wallac 1420 multilabel counter* (Perkin Elmer, Turku, Finlandia).

### 6.3. *Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)*

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico que nos permite conocer el tamaño y complejidad de las células, así como alguno de sus componentes al emplear anticuerpos fluorescentes.

Las células se hacen pasar en forma de suspensión, una a una, a través de un rayo de luz. Al atravesar el haz, las células provocan una dispersión de la luz de forma que al medir la difracción de la luz en sentido frontal, *forward scatter*, se evalúa el tamaño de la célula y, al medir la reflexión de manera lateral, *side scatter*, se mide su granularidad o complejidad. De esta forma podemos diferenciar los tipos de poblaciones celulares presentes en una muestra. Además, si a la muestra le añadimos anticuerpos marcados con un fluorocromo, cuando las células pasan a través del haz de luz se produce la emisión de una longitud de onda que nos permite conocer qué células poseen los antígenos complementarios a ese anticuerpo. A este tipo de citometría de flujo se le denomina FACS.

Esta técnica se empleó para el estudio de la activación de células B y para la detección de moléculas del complejo de histocompatibilidad de clase II (MHC clase II). Los anticuerpos empleados en este ensayo se describen en la tabla 9.

Tabla 9. Anticuerpos empleados en la citometría de flujo.

Anticuerpo (clon)	Fabricante	Dilución
<b>PB-anti-CD45R/B220 (RA3-6B2)</b>	BD Biosciences Pharmingen (Franklin Lakes, NJ USA)	1/1.000
<b>PE-anti-CD19 (ID3)</b>	BD Biosciences Pharmingen (Franklin Lakes, NJ USA)	1/500
<b>FITC-anti-H-2,I-Aq (PCQ6/KH116)</b>	BD Biosciences Pharmingen (Franklin Lakes, NJ USA)	1/200
<b>bio-anti-CD80 (16-10A1)</b>	BD Biosciences Pharmingen (Franklin Lakes, NJ USA)	1/1.000

**- Protocolo experimental:**

Al igual que en los ensayos anteriores, los animales se sacrificaron diez días después de la primera inmunización con CII y los bazos de los animales se trataron como se ha descrito anteriormente.

Una vez obtenidas las células, se añadieron  $1 \times 10^6$  células/pocillo (100  $\mu$ l) en placas de 96 pocillos. A cada pocillo se añadió 1,5  $\mu$ l de anti-FcR 24G2 (30 $\mu$ g/ml, producido por el laboratorio *Medical Inflammation Research, Karolinska Institutet*, Estocolmo, Suecia) para bloquear las posibles interacciones con el receptor Fc. Los eritrocitos se lisaron con tampón ACK durante 10 minutos. Tras lavar varias veces con PBS, se añadieron los distintos anticuerpos y se incubaron las placas durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Después de lavar, se añadieron 1,5  $\mu$ l del fluorocromo conjugado con estreptavidina-APC (BD Bioscience Pharmingen, Franklin Lakes, NJ USA, 1/400) para detectar el anticuerpo biotinilado anti-CD80 y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar varias veces con PBS, las células se resuspendieron en 200  $\mu$ l de PBS y los diferentes fluorocromos se estudiaron en un citómetro de flujo *BD LSRII* (BD Biosciences, San Jose, California, EE.UU.). Los resultados fueron analizados con el software *FlowJo* (version 8.8.7, Stanford, CA, EE.UU.).

#### **6.4. Ensayo de estrés oxidativo**

Este ensayo se realiza mediante citometría de flujo y se basa en que los polimorfonucleares se pueden estimular de forma artificial, utilizando un compuesto no fluorescente, el cual debe ingresar al interior del fagocito, para ser transformado en fluorescente por parte de diversas ROS. La fluorescencia así emitida, es detectada por el citómetro de flujo. El fluorocromo más utilizado para medir  $H_2O_2$  intracelular es 123-Dihidrorrodamina (123-DHR). Esta molécula es directamente oxidada a 123-Rodamina, la cual es excitable a 488 nm y emite a 515 nm. La entrada a la célula de 123-DHR es como un cromógeno permeable que es convertido a 123-Rodamina y subsecuentemente localizado en las mitocondrias. La conversión de molécula no fluorescente a fluorescente depende completamente de

los productos de oxidación y no requiere catálisis enzimática (Robinson y Babcock 1998). Además de detectar la producción de 123-Rodamina, la citometría de flujo nos permite identificar qué células son responsables de su producción mediante el uso de anticuerpos de superficie, marcados fluorescentemente, específicos para cada tipo celular.

En este ensayo hemos estudiado la capacidad que tienen los macrófagos, los neutrófilos, las células B y las células dendríticas de generar 123-Rodamida.

#### **- Protocolo experimental:**

Se extrajo sangre de los animales a días 0, 28 y 63 después de la primera inmunización con CII y se añadieron 15  $\mu$ l de sangre por pocillo. A cada pocillo se añadieron 1,5  $\mu$ l de anti-FcR 24G2 (30  $\mu$ g/ml, producido por el laboratorio *Medical Inflammation Research, Karolinska Institutet*) para bloquear las posibles interacciones con el receptor Fc. A continuación se añadieron los distintos anticuerpos (tabla 10) y se incubaron las placas durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Los eritrocitos se lisaron con tampón ACK durante 10 minutos y tras lavar varias veces con PBS, se añadieron 1,5  $\mu$ l del fluorocromo conjugado con estreptavidina-APC (BD Bioscience Pharmingen, Franklin Lakes, NJ USA, 1/400) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se volvió a lavar con PBS y las células se resuspendieron con 200  $\mu$ l de DMEM. A continuación se añadieron 25  $\mu$ l/pocillo de 123-DHR (3 $\mu$ M, *Molecular Probes*<sup>®</sup>, Life Technologies Ltd, Paisley, Reino Unido) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, se añadió como estímulo 25  $\mu$ l/pocillo de Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (200 ng/ml, Sigma) o 25  $\mu$ l/pocillo de DMEM como control. Las placas se incubaron a 37°C durante 20 minutos y a continuación se lavó 2 veces con PBS. Finalmente, las células se resuspendieron en 200  $\mu$ l de PBS y la solución celular se filtro y se transfirió a placas *Falcon*<sup>™</sup> 96-well U-bottom (BD Biosciences, San Jose, California, USA). La fluorescencia se midió en un citómetro de flujo *BD LSRII* (BD Biosciences, San Jose, California, USA) y los resultados fueron analizados con el software FlowJo (version 8.8.7, Inc. Stanford, CA, EE.UU.).

**Tabla 10.** Anticuerpos utilizados en el ensayo de estrés oxidativo.

Anticuerpo (clon)	Fabricante	Dilución
<b>APC-anti-Ly-6G (RB6-8C5)</b>	BD Biosciences Pharmingen (Franklin Lakes, NJ USA)	1/1.000
<b>PB-anti-CD11b (M1/70)</b>	BD Biosciences Pharmingen (Franklin Lakes, NJ USA)	1/500
<b>PECy7-anti-CD11c (N418/HL3)</b>	BD Biosciences Pharmingen (Franklin Lakes, NJ USA)	1/200
<b>bio-anti- CD45R/B220 (RA3-6B2)</b>	BD Biosciences Pharmingen (Franklin Lakes, NJ USA)	1/1.000

## 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se han expresado como media aritmética de los valores  $\pm$  error estándar de la media (S.E.M.  $\epsilon$ );  $n$  representa el número de animales utilizado por grupo. Los resultados obtenidos se sometieron a distintos tratamientos estadísticos en función de los datos analizados:

1. Para comparar distintos grupos experimentales con respecto a un grupo control, los resultados fueron sometidos a un tratamiento estadístico empleando el método ANOVA simple de una vía y la  $t$  de Dunnet para comparaciones múltiples. El método de Dunnet (Dunnet 1964) permite comparar los valores medios obtenidos para varios grupos problema respecto a un único grupo control en un mismo experimento, teniendo en cuenta el error asociado a las comparaciones múltiples. Se considera que la diferencia entre los grupos tratados y el grupo control es significativo ( $P < 0,05$ ) cuando el valor  $t$  obtenido es mayor que el tabulado para un margen de confianza del 95% y muy significativo ( $P < 0,01$ ) cuando es mayor del 99%.

2. Para la comparación de varios tratamientos/genotipos a lo largo del tiempo se utilizó el método ANOVA de dos vías (variable 1: tiempo; variable 2: tratamiento o genotipo) seguido del test de Bonferroni.

3. Para la comparación de una misma muestra varias veces, considerando un factor con varios niveles (tratamientos/genotipo) y una variable respuesta, se utilizó el método ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni.
4. Para las comparaciones entre dos medidas muestrales independientes se empleó la *t* de Student, cuando los resultados seguían una desviación Gaussiana, o el test Mann-Whitney, cuando no la seguían.
5. Para las comparaciones entre los porcentajes de incidencia de la artritis se utilizó el test exacto de Fisher. Este test se emplea en tablas de contingencia de dos vías y permite analizar si dos variables dicotómicas están asociadas cuando la muestra a estudiar es demasiado pequeña y no se cumplen las condiciones necesarias para que la aplicación del test  $\chi^2$  sea adecuada.





## Resultados

---



## **1. RESULTADOS DEL MODELO DE ARTRITIS POSTMENOPÁUSICA (OVX+CIA) EN RATONES DBA1/J**

Con el objetivo de estudiar el efecto de la ovariectomía en el modelo animal de artritis inducida por colágeno llevamos a cabo un primer experimento en el que realizamos, por primera vez en nuestro laboratorio, el modelo animal de artritis postmenopáusica mediante OVX+CIA en ratones DBA1/J. Además de estudiar y caracterizar este modelo animal, realizamos el estudio del efecto de la administración del inhibidor de la actividad HO-1 estaño-protoporfirina IX (SnPP).

Una vez caracterizado el modelo OVX+CIA realizamos un segundo experimento en el que estudiamos el efecto del CORM-3 (agente dador de CO) y del alendronato (fármaco ampliamente utilizado en osteoporosis) en la artritis postmenopáusica.

### **1.1. Caracterización del modelo OVX+CIA y efectos del SnPP**

Para caracterizar el modelo de artritis postmenopáusica OVX-CIA utilizamos cuatro grupos de ratones: NA, animales sanos; OVX, animales ovariectomizados, CIA, animales artríticos; OVX-CIA, animales artríticos ovariectomizados. Durante este experimento, los parámetros estudiados de los grupos OVX y CIA se compararon con los de los grupos NA y OVX-CIA.

Además de los cuatro grupos anteriormente descritos, utilizamos un quinto grupo para el estudio del SnPP en animales OVX-CIA (SnPP, 12 mg/kg/día desde el día 22 al 42 después de la primera inmunización con colágeno). El grupo OVX-CIA se consideró el control del grupo SnPP para los análisis estadísticos.

#### **1.1.1. Evolución de la artritis y análisis histológico**

En primer lugar estudiamos el efecto de la OVX en la evolución clínica e histológica de la artritis.

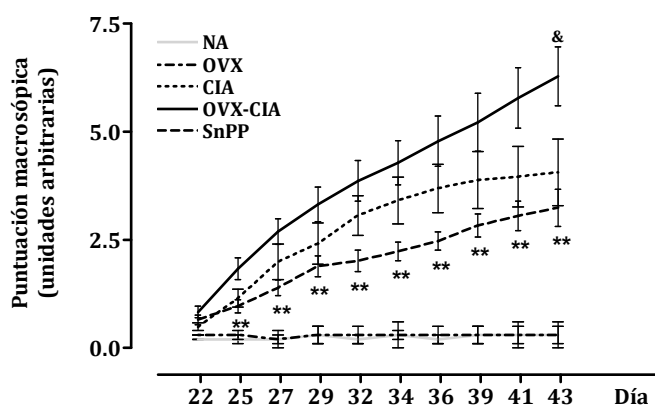
La ovariectomía indujo un aumento de las manifestaciones inflamatorias, produciendo que los animales OVX-CIA presentaran una mayor puntuación macroscópica que los animales artríticos (CIA) a día 43. La administración de SnPP

fue capaz de reducir estas manifestaciones inflamatorias con respecto a su control, OVX-CIA, desde el tercer día de su administración (día 25) hasta el final del experimento (día 43) (figura 27.A). Aunque se observaron cambios en la puntuación macroscópica, no se observó ninguna diferencia significativa en la incidencia de la artritis, siendo en todos los grupos del 100%.

En cuanto al peso de los animales, los animales artríticos CIA y OVX-CIA sufrieron una pérdida de peso significativa en comparación con los animales NA y OVX, respectivamente. El tratamiento con SnPP inhibió significativamente la pérdida de peso en los animales OVX-CIA (figura 27.B).

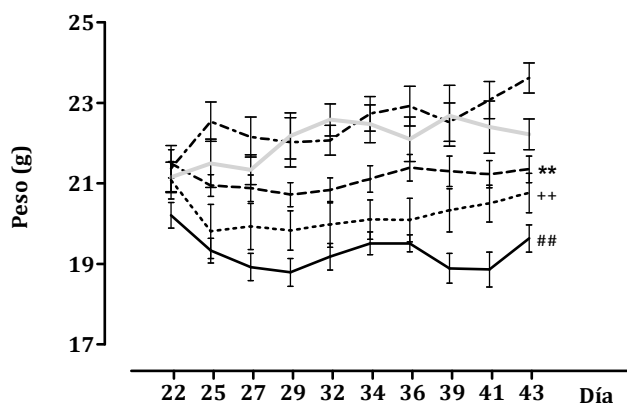
**Figura 27.** Evolución clínica de la artritis: puntuación macroscópica y peso de los animales.

**A.** Puntuación macroscópica.



**A.** Puntuación macroscópica. Se llevó a cabo visualmente utilizando una escala de 0-2 para cada pata. **B.** Evolución del peso de los animales. NA: animales sanos; OVX: animales ovariectomizados; CIA: animales artríticos; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados; SnPP: animales OVX-CIA tratados con SnPP (12 mg/kg/día desde el día 22 al 42 después de la primera inmunización con colágeno). Resultados expresados como media  $\pm$  S.E.M, n=10. &P<0.05 con respecto al grupo CIA; \*\*P<0.01 con respecto al grupo OVX-CIA; ++P<0.01 con respecto al grupo NA; ##P<0.01 con respecto al grupo OVX. ANOVA (dos vías) seguido del test de Bonferroni.

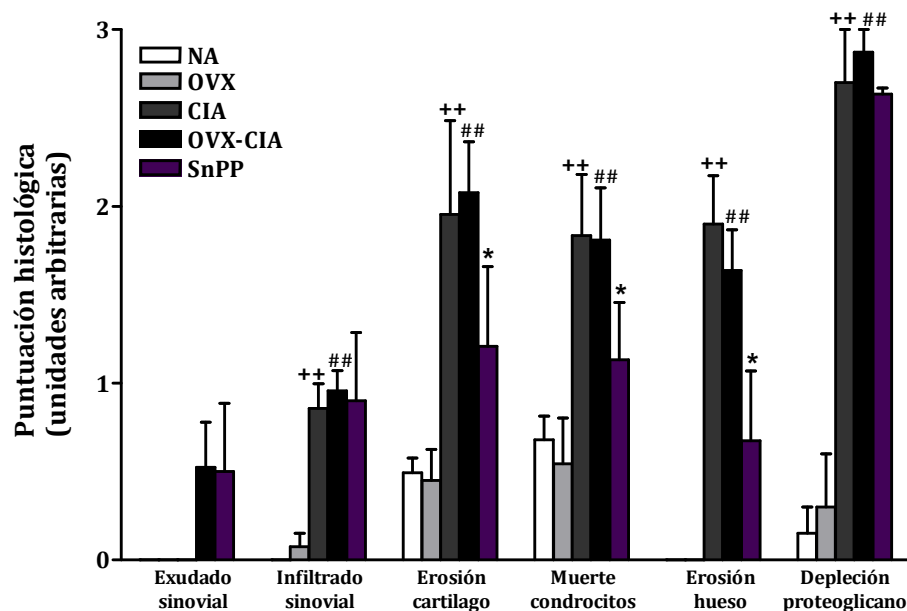
**B.** Evolución del peso de los animales.



En el análisis histológico, los ratones artríticos CIA y OVX-CIA presentaron, respecto a los ratones NA y OVX respectivamente, un aumento significativo de la infiltración celular, así como un aumento en la depleción de proteoglicano, en la erosión del cartílago, en la muerte de condrocitos y en la erosión ósea, sin diferencias significativas entre ambos grupos. El tratamiento con SnPP redujo significativamente la muerte de condrocitos y la erosión ósea y del cartílago respecto a su control, OVX-CIA (figura 28).

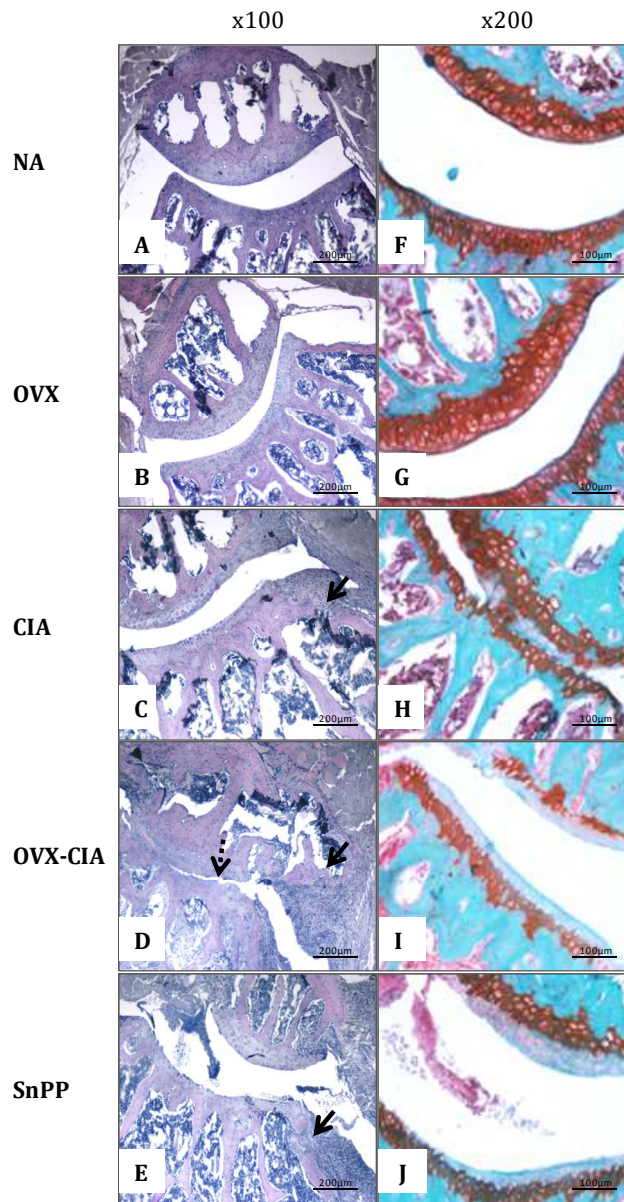
**Figura 28.** Análisis histológico de la articulación de la rodilla en el día 43.

A. Puntuación histológica.



Todos los parámetros fueron evaluados de una escala de 0-3. NA: animales sanos; OVX: animales ovariectomizados; CIA: animales artríticos; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados; SnPP: animales OVX-CIA tratados con SnPP (12 mg/kg/día desde el día 22 al 42 después de la primera inmunización con colágeno). Resultados expresados como media  $\pm$  S.E.M, n=5-8. ++ $P$ <0.01 con respecto al grupo NA; ## $P$ <0.01 con respecto al grupo OVX; \* $P$ <0.05 con respecto al grupo OVX-CIA. ANOVA (una vía) seguido del test de Bonferroni.

B. Secciones tisulares frontales de rodilla.



Secciones tisulares frontales de rodilla teñidas con hematoxilina-eosina (A-E) y con safranina O-*fast green* (F-J). Flecha continua, degradación ósea. Flecha discontinua, degradación del cartílago. NA: animales sanos; OVX: animales ovariectomizados; CIA: animales artríticos; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados; SnPP: animales OVX-CIA tratados con SnPP (12 mg/kg/día desde el día 22 al 42 después de la primera inmunización con colágeno).

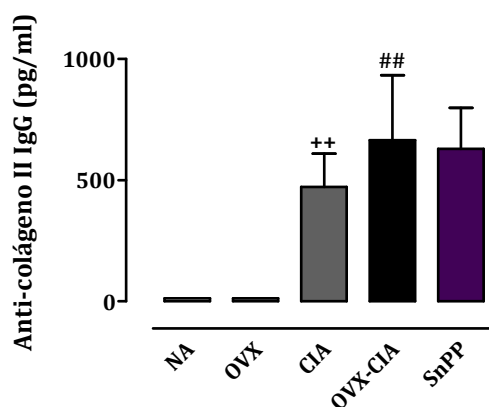
### 1.1.2. Niveles de mediadores en suero

Al final del experimento (día 43) se midieron distintos mediadores y marcadores del proceso inflamatorio y de la degradación del cartílago, así como del remodelado óseo.

#### - Niveles de anticuerpos anti-colágeno II

La figura 29 muestra cómo los animales artríticos (CIA y OVX-CIA) presentaron un aumento significativo de los niveles de anticuerpos anti-CII en el suero. El tratamiento con SnPP no fue capaz de inhibir este aumento.

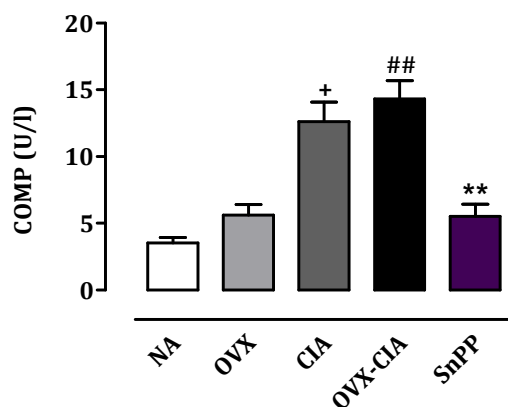
Figura 29. Niveles séricos de anticuerpo anti-CII en el día 43.



NA: animales sanos; OVX: animales ovariectomizados; CIA: animales artríticos; CIA-OVX: animales artríticos ovariectomizados; SnPP: animales tratados con SnPP (12 mg/kg/día desde el día 22 al 42 después de la primera inmunización con colágeno). Resultados expresados como media  $\pm$  S.E.M, n=10. \*\* $P$ <0.01 con respecto al grupo NA; ## $P$ <0.01 con respecto al grupo OVX. ANOVA (una vía) seguido del test de Bonferroni.

#### - Niveles de COMP

El aumento del marcador de la degradación del cartílago, COMP, es característico de las enfermedades artríticas. En nuestro experimento, los animales artríticos, tanto del grupo CIA como del OVX-CIA, presentaron un aumento significativo de este marcador. La administración de SnPP inhibió significativamente ese aumento (figura 30).

**Figura 30.** Niveles séricos de COMP en el día 43.

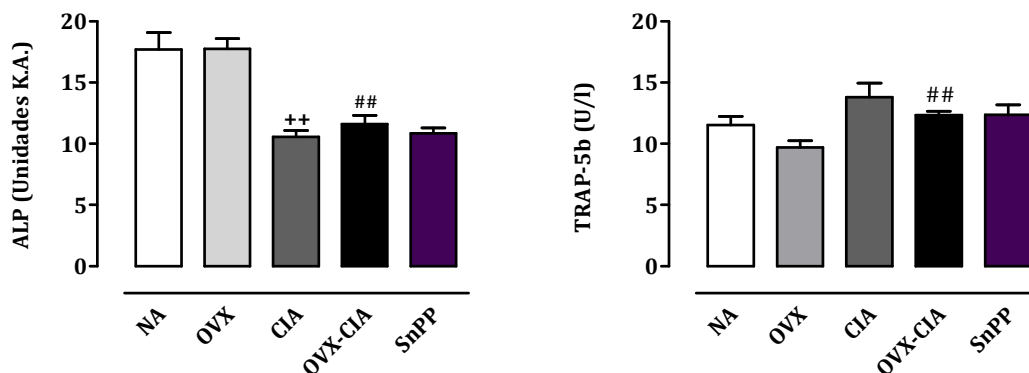
NA: animales sanos; OVX: animales ovariectomizados; CIA: animales artríticos; CIA-OVX: animales artríticos ovariectomizados; SnPP: animales tratados con SnPP (12 mg/kg/día desde el día 22 al 42 después de la primera inmunización con colágeno). Resultados expresados como media  $\pm$  S.E.M, n=10.  $^+P<0.05$  con respecto al grupo NA;  $##P<0.01$  con respecto al grupo OVX;  $**P<0.01$  con respecto al grupo OVX-CIA. ANOVA (una vía) seguido del test de Bonferroni.

### 1.1.3. Niveles de marcadores del remodelado óseo

En cuanto a marcadores del remodelado óseo, en este experimento realizamos la medida de los niveles séricos del marcador de formación ósea fosfatasa alcalina (ALP) y del marcador de degradación ósea TRAP-5b en el día 43 del experimento (figura 31).

La ovariectomía por sí sola no indujo ningún cambio en los niveles de estos marcadores. En cambio, la artritis provocó una reducción de los niveles de ALP en los animales de los grupos CIA y OVX-CIA. Los niveles de TRAP-5b se vieron aumentados en el grupo OVX-CIA en comparación con el grupo OVX. El tratamiento con SnPP no tuvo ningún efecto sobre ninguno de los marcadores estudiados (figura 31).



**Figura 31.** Niveles séricos de ALP y TRAP-5b en el día 43.

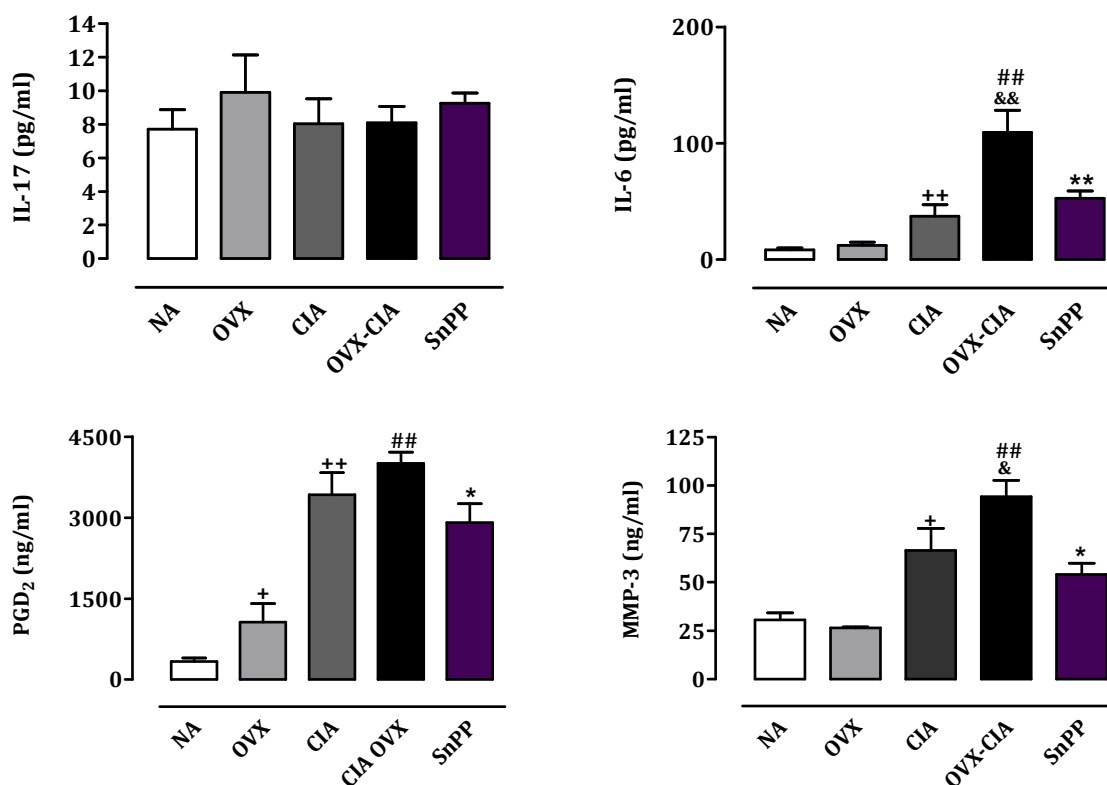
NA: animales sanos; OVX: animales ovariectomizados; CIA: animales artríticos; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados; SnPP: animales OVX-CIA tratados con SnPP (12 mg/kg/día desde el día 22 al 42 después de la primera inmunización con colágeno). Resultados expresados como media  $\pm$  S.E.M, n=10. <sup>++</sup> $P < 0.01$  con respecto al grupo NA; <sup>##</sup> $P < 0.01$  con respecto al grupo OVX. ANOVA (una vía) seguido del test de Bonferroni.

#### 1.1.4. Niveles de mediadores del proceso inflamatorio

Al final del experimento se evaluó el efecto de la OVX, del CIA y de la administración de SnPP en los niveles séricos de distintos mediadores inflamatorios como IL-17, IL-6, PGD<sub>2</sub> y MMP-3 (figura 32).

La ovariectomía en animales no artríticos (OVX) aumentó significativamente los niveles séricos de PGD<sub>2</sub>. La inducción de la artritis, grupo CIA y grupo OVX-CIA, incrementó significativamente la liberación de IL-6, PGD<sub>2</sub> y MMP-3. El grupo OVX-CIA presentó un incremento significativo de los niveles de IL-6 y MMP-3 con respecto al grupo CIA. La administración de SnPP inhibió de manera significativa el aumento de la liberación de estos tres mediadores en los animales OVX-CIA. En cuanto a la IL-17, no se observó diferencia alguna entre ningún grupo.

Figura 32. Niveles séricos de mediadores inflamatorios en el día 43.



NA: animales sanos; OVX: animales ovariectomizados; CIA: animales artríticos; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados; SnPP: animales OVX-CIA tratados con SnPP (12 mg/kg/día desde el día 22 al 42 después de la primera inmunización con colágeno). Resultados expresados como media  $\pm$  S.E.M, n=10. \* $P$ <0.05 y \*\* $P$ <0.01 con respecto al grupo NA; ## $P$ <0.01 con respecto al grupo OVX; & $P$ <0.05 y && $P$ <0.01 con respecto al grupo CIA; \* $P$ <0.05 y \*\* $P$ <0.01 con respecto al grupo OVX-CIA. ANOVA (una vía) seguido del test de Bonferroni.

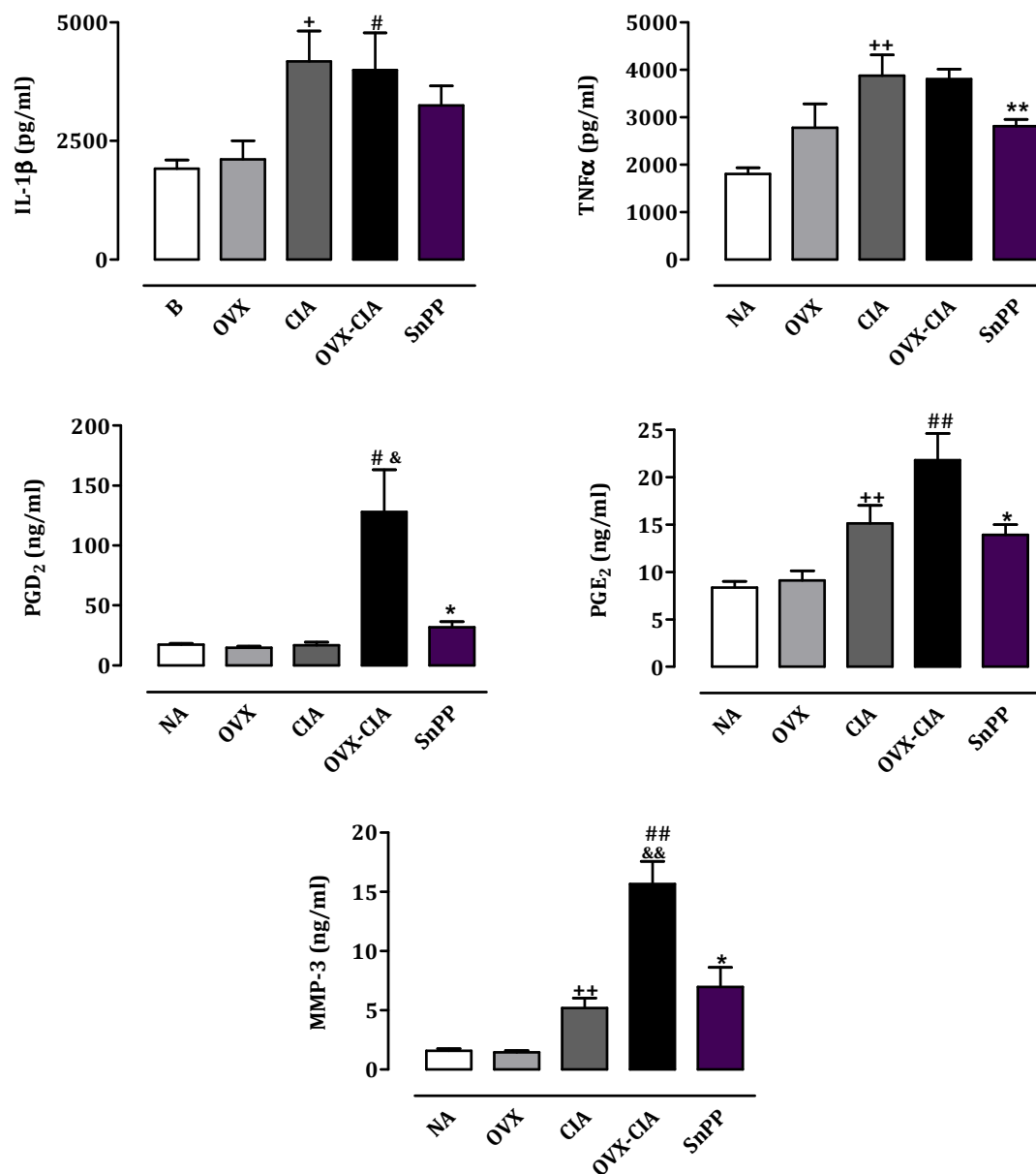
### 1.1.5. Niveles de mediadores en patas traseras

A día final del experimento (día 43) se midieron los mediadores inflamatorios IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> y MMP-3 en los homogeneizados de las patas traseras de los animales.

Los animales con CIA, presentaron un incremento significativo de los niveles de las citocinas IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , del prostanoide PGE<sub>2</sub> y de la MMP-3. Los animales artríticos con OVX (OVX-CIA) también presentaron un aumento significativo en los niveles de IL-1 $\beta$  y PGE<sub>2</sub> respecto al grupo OVX, pero sin presentar ninguna diferencia con los animales del grupo CIA. Sin embargo, los niveles de MMP-3 y de PGD<sub>2</sub> aumentaron significativamente en los animales OVX-CIA en comparación

tanto con el grupo OVX como con el grupo CIA. El tratamiento con SnPP disminuyó significativamente los niveles de  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGD}_2$  y MMP-3 (figura 33).

Figura 33. Niveles de mediadores inflamatorios en los homogeneizados en el día 43.



Resultados expresados como media  $\pm$  S.E.M, n=10. NA: animales sanos; OVX: animales ovariectomizados; CIA: animales artríticos; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados; SnPP: animales OVX-CIA tratados con SnPP (12 mg/kg/día desde el día 22 al 42 después de la primera inmunización con colágeno). \* $P$ <0.05 y \*\* $P$ <0.01 con respecto al grupo NA; # $P$ <0.05 y ## $P$ <0.01 con respecto al grupo OVX; & $P$ <0.05 y && $P$ <0.01 con respecto al grupo CIA; \* $P$ <0.05 y \*\* $P$ <0.01 con respecto al grupo OVX-CIA. ANOVA (una vía) seguido del test de Bonferroni.

### 1.1.6. Efectos sobre la expresión proteica de COX-2, h-PGDS, l-PGDS y HO-1

La expresión proteica de distintas enzimas implicadas en el proceso inflamatorio se determinó mediante inmunohistoquímica en secciones tisulares frontales de la articulación de la rodilla. Además, se estudió si la administración de SnPP afectó a dicha expresión.

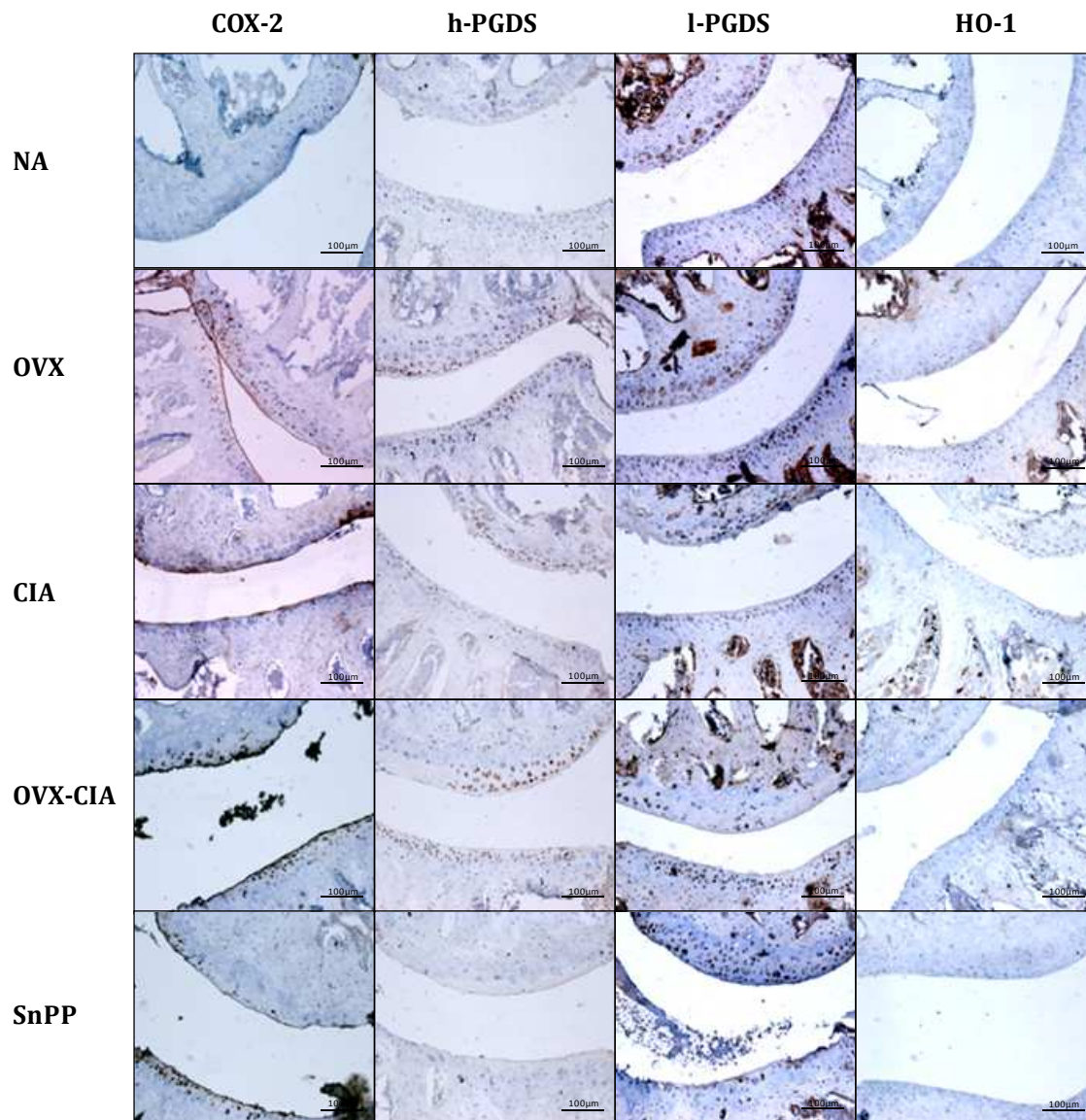
En la tabla 11 y en la figura 34 se observa como la ovariectomía tendió a incrementar la expresión proteica de COX-2 e incrementó significativamente la expresión de h-PGDs, l-PGDS y HO-1 en animales no artríticos. La inducción del CIA aumentó significativamente la expresión de COX-2 en animales no ovariectomizados en comparación con el grupo NA. Sin embargo, la inducción de la artritis en animales ovariectomizados disminuyó de manera significativa la expresión de h-PGDs, l-PGDS y HO-1 en comparación con el grupo OVX. En estos animales, el tratamiento con SnPP provocó una disminución significativa de la expresión de COX-2 y h-PGDS y un aumento significativo de la de HO-1 en comparación con los animales OVX-CIA.

**Tabla 11.** Número de células positivas para COX-2, h-PGDS, l-PGDS y HO-1.

	COX-2	h-PGDS	l-PGDS	HO-1
<b>NA</b>	12,8±7,2	37,0±7,5	54,7±10,4	47,4±6,9
<b>OVX</b>	20,8±8,8	121,6±6,1 <sup>++</sup>	81,8±4,2 <sup>+</sup>	72,8±8,0 <sup>+</sup>
<b>CIA</b>	37,0±1,0 <sup>+</sup>	58±4,0	45,8±9,8	50,6±15,9
<b>OVX-CIA</b>	39,2±4,8	72,5±17,0 <sup>##</sup>	39,3±15,0 <sup>#</sup>	25,4±4,1 <sup>##</sup>
<b>SnPP</b>	12,5±7,9 <sup>*</sup>	17,7±12,2 <sup>*</sup>	46,7±9,6	62,0±14,3 <sup>*</sup>

El conteo de células se realizó en la zona de la rótula-fémur de la articulación, seleccionando la misma área en cada muestra para que los resultados obtenidos fueran comparables. NA: animales sanos; OVX: animales ovariectomizados; CIA: animales artríticos; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados; SnPP: animales OVX-CIA tratados con SnPP (12 mg/kg/día desde el día 22 al 42 después de la primera inmunización con colágeno). Resultados expresados como media ± S.E.M, n=4-8. <sup>\*</sup>P<0.05 y <sup>++</sup>P<0.01 con respecto al grupo NA; <sup>#</sup>P<0.05 y <sup>##</sup>P<0.01 con respecto al grupo OVX; <sup>\*</sup>P<0.05 con respecto al grupo OVX-CIA. ANOVA (una vía) seguido del test de Bonferroni.

**Figura 34.** Imágenes representativas de la expresión proteica de COX-2, h-PGDS, l-PGDS y HO-1 en el día 43.



Las secciones tisulares frontales de rodilla fueron tratadas con un anticuerpo específico para COX-2, h-PGDS, l-PGDS y HO-1. El conteo de células se realizó en la zona de la rótula-fémur de la articulación, seleccionando la misma área en cada muestra para que los resultados obtenidos fueran comparables. NA: animales sanos; OVX: animales ovariectomizados; CIA: animales artríticos; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados; SnPP: animales OVX-CIA tratados con SnPP (12 mg/kg/día desde el día 22 al 42 después de la primera inmunización con colágeno). Aumento x200.

### 1.1.7. Efectos sobre la estructura trabecular del hueso

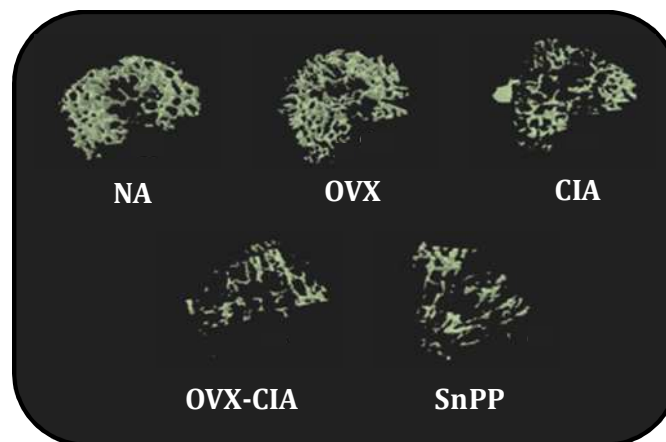
El estudio preliminar de la estructura ósea de las tibias por  $\mu$ -CT nos muestra cómo la ovariectomía (grupo OVX) provocó una reducción de la fracción volumétrica ósea (BV/TV), de la superficie específica ósea (BS/TV), del grosor y número trabecular (Tb.Th y Tb.N) y que incrementó la superficie específica de hueso (BS/BV). Los efectos causados por la artritis sobre estos parámetros fueron más marcados que los de la ovariectomía, como se observa en los datos del grupo CIA. Sin embargo, la ovariectomía en los animales artríticos (CIA-OVX) agravó los efectos del CIA sobre el hueso trabecular. La administración de SnPP provocó la disminución de la fracción volumétrica ósea (BV/TV) e incrementó la densidad de la superficie ósea (BS/TV), la superficie específica de hueso (BS/BV) y el número y separación trabecular (Tb.N y Tb.Sp) en comparación con el grupo OVX-CIA (tabla 12 y figura 35).

**Tabla 12.** Índices morfométricos del hueso trabecular de la tibia en el día 43.

	NA	OVX	CIA	OVX-CIA	SnPP
<b>BV/TV (%)</b>	20,8601	18,287	12,624	8,4794	7,7802
<b>BS/BV (mm<sup>-1</sup>)</b>	76,6497	84,3344	97,9927	97,6979	108,7833
<b>BS/TV (mm<sup>-1</sup>)</b>	15,9892	15,4222	12,3706	8,2842	8,4635
<b>Tb.Th (mm)</b>	0,0539	0,0492	0,0473	0,0475	0,0422
<b>Tb.Sp (mm)</b>	0,2189	0,2182	0,2318	0,3018	0,3965
<b>Tb.N (mm<sup>-1</sup>)</b>	3,8721	3,7141	2,6718	1,7857	1,8439

Los resultados se obtuvieron de las medidas realizadas en la región trabecular de la diáfisis proximal de la tibia, entre la placa subcondral y la placa de crecimiento. NA: animales sanos; OVX: animales ovariectomizados; CIA: animales artríticos; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados; SnPP: animales OVX-CIA tratados con SnPP (12 mg/kg/día desde el día 22 al 42 después de la primera inmunización con colágeno). Valores representativos del experimento.

**Figura 35.** Imágenes representativas de la estructura trabecular ósea.



NA: animales sanos; OVX: animales ovariectomizados; CIA: animales artríticos; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados; SnPP: animales OVX-CIA tratados con SnPP (12 mg/kg/día desde el día 22 al 42 después de la primera inmunización con colágeno).

## 1.2. Efectos del CORM-3 y del alendronato en el modelo OVX+CIA

Una vez realizado el estudio del modelo animal de artritis postmenopáusica en ratones DBA1/J y del efecto del SnPP en él, realizamos un nuevo experimento en el que estudiamos el efecto de la administración de CORM-3 o de alendronato en animales OVX-CIA. En este estudio los animales se separaron en 4 grupos: NA, animales sanos; OVX-CIA, animales artríticos ovariectomizados; ALN, animales OVX-CIA tratados con ALN (100 µg/kg/día, vía oral desde el día 22 hasta el día 49); CORM-3, animales OVX-CIA tratados con CORM-3 (10 mg/kg/día, i.p. desde el día 22 hasta el día 49). Los animales se sacrificaron a días 36 y 50 después de la primera inmunización con colágeno.

### 1.2.1. Evolución de la artritis

En primer lugar se realizó el estudio de la severidad de la artritis mediante la puntuación macroscópica de sus signos clínicos, el cálculo de la incidencia de la enfermedad y mediante el control del peso de los animales.

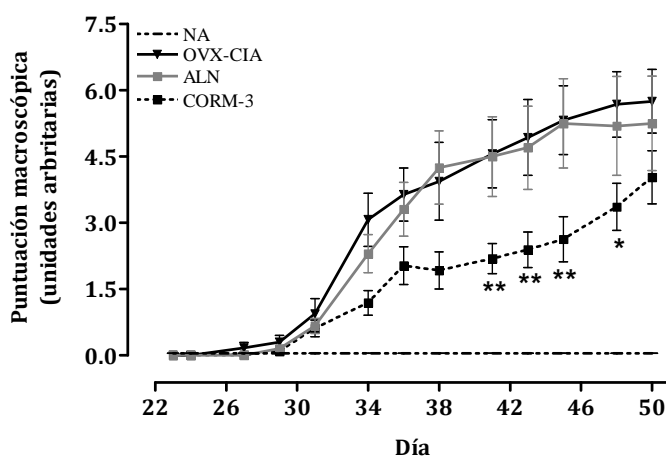
En la figura 36.A se observa cómo los animales del grupo OVX-CIA presentan un aumento en los signos clínicos de la artritis. La administración de CORM-3 atenuó

de manera significativa la aparición de estos signos clínicos desde el día 40 al 48. Sin embargo, la administración de ALN no tuvo ningún efecto sobre los signos macroscópicos de la artritis, observándose una progresión de la enfermedad similar a la del grupo control OVX-CIA. Aunque el ALN no fue capaz de inhibir la severidad de la artritis, observamos que este tratamiento disminuyó la incidencia de la enfermedad desde el día 38 hasta el final del experimento (figura 36.B).

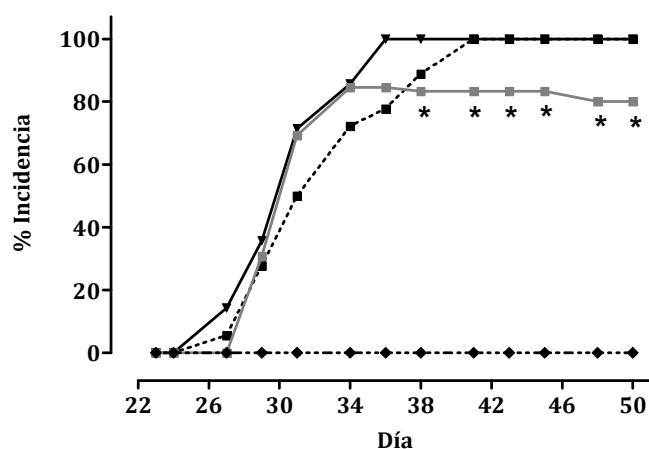
En la figura 36.C observamos que la administración de CORM-3 o de ALN no tuvo ningún efecto sobre la evolución del peso de los animales OVX-CIA.

**Figura 36.** Evolución clínica de la artritis: puntuación macroscópica, incidencia y peso de los animales.

A. Puntuación macroscópica.

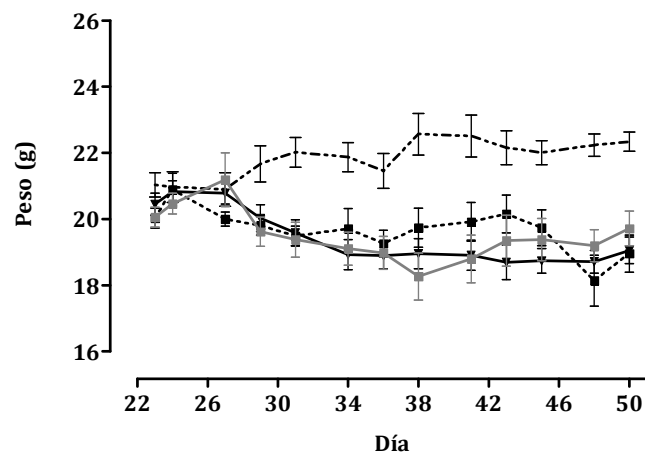


B. Incidencia de la artritis.





## C. Evolución del peso de los animales.



**A.** Puntuación macroscópica. Se llevó a cabo visualmente utilizando una escala de 0-2 para cada pata. **B.** Porcentaje de incidencia de la artritis. **C.** Evolución del peso de los animales. NA: animales sanos; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados; ALN: animales OVX-CIA tratados con ALN desde el día 22 hasta el día 49 (100  $\mu$ g/kg/día, vía oral); CORM-3: animales OVX-CIA tratados con CORM-3 desde el día 22 hasta el día 49 (10 mg/kg/día, i.p.). Resultados expresados como media  $\pm$  S.E.M, n=10-12. \* $P$ <0.05 y \*\* $P$ <0.01 con respecto al grupo OVX-CIA. **A** y **C**, ANOVA (dos vías) seguido del test de Bonferroni. **B**, Test exacto de Fisher (dos vías).

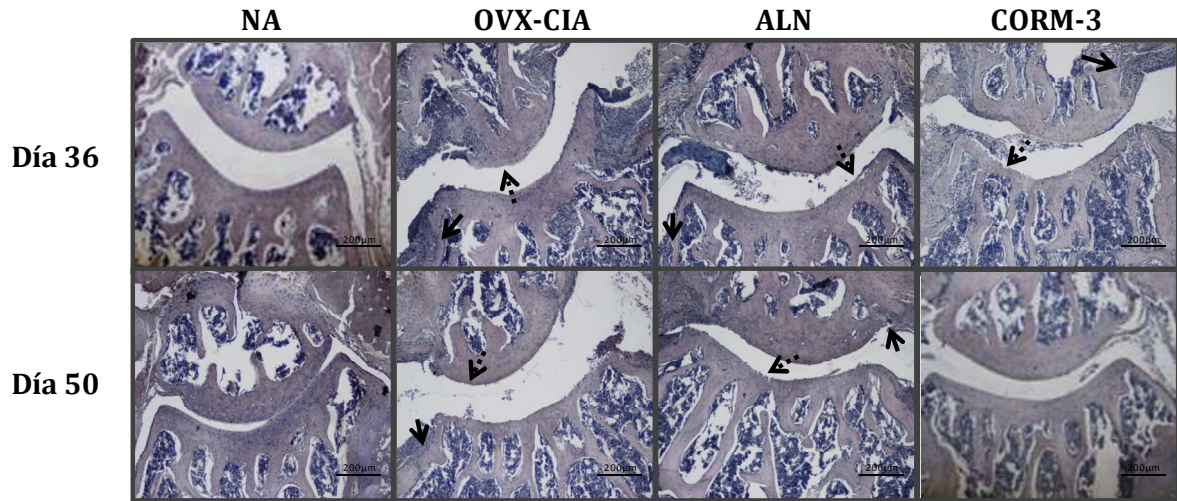
### 1.2.2. Análisis histológico

Una vez sacrificados los animales, se realizó el estudio histológico de las rodillas mediante tinción hematoxilina-eosina.

En el análisis histológico (figura 37) observamos cómo los animales del grupo control (OVX-CIA) presentaron un aumento del exudado sinovial en la fase temprana de la enfermedad. Tanto la administración de CORM-3 como la de ALN disminuyeron significativamente el exudado sinovial a día 36. El grupo control, además de aumentar el exudado sinovial, presentó un mayor incremento de la muerte de condrocitos y de la erosión del cartílago y del hueso en los días 36 y 50. El CORM-3 y el ALN disminuyeron significativamente la erosión del cartílago a ambos tiempos. Aunque se observó una tendencia a disminuir la muerte de condrocitos, no se encontraron diferencias significativas en ningún caso. Además del efecto sobre el cartílago, la erosión del hueso disminuyó significativamente a día 36 en el grupo tratado con ALN y en el día 50 en el tratado con CORM-3.

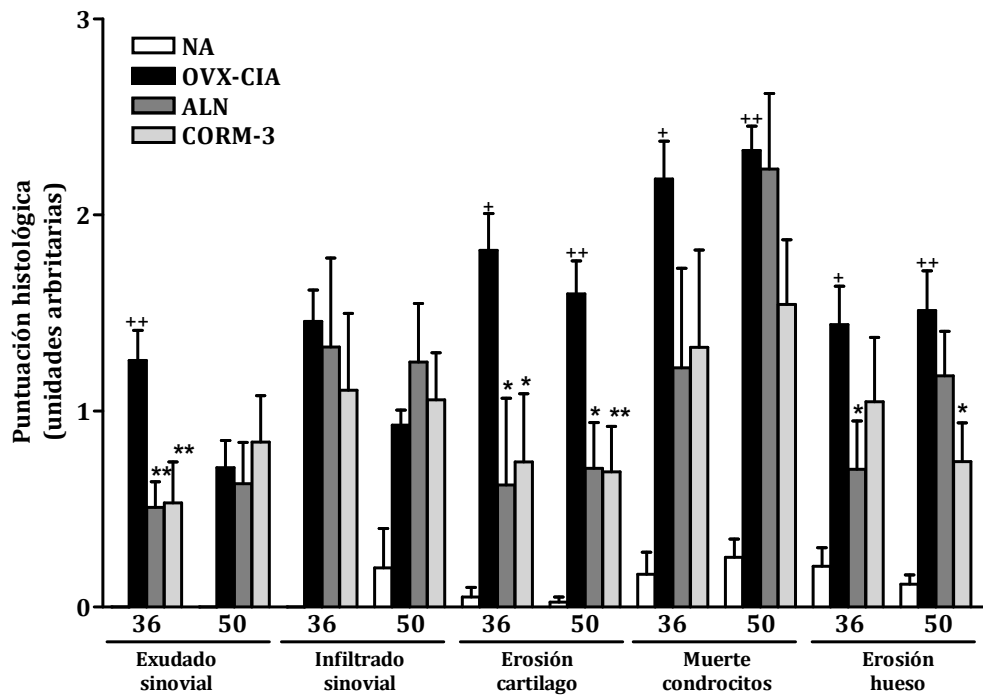
**Figura 37.** Análisis histológico de la articulación de la rodilla.

A. Secciones tisulares frontales de rodilla.



Secciones tisulares frontales de rodilla teñidas con hematoxilina-eosina (A-E). Flecha continua, degradación ósea. Flecha discontinua, degradación del cartílago. Aumento x100.

B. Puntuación histológica.



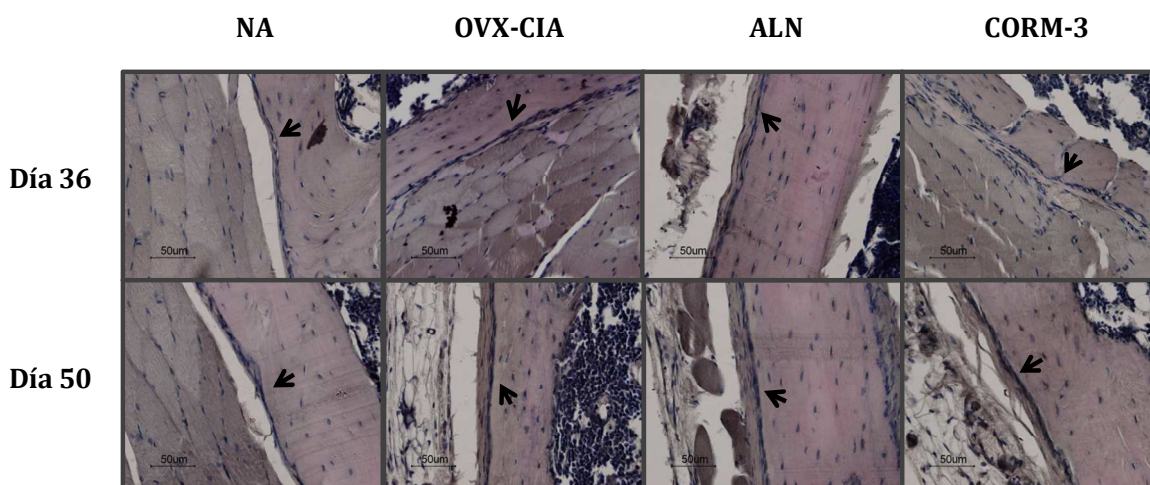
Todos los parámetros fueron evaluados de una escala de 0-3. NA: animales sanos; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados; ALN: animales OVX-CIA tratados con ALN desde el día 22 hasta el día 49 (100 µg/kg/día, vía oral); CORM-3: animales OVX-CIA tratados con CORM-3 desde el día 22 hasta el día 49 (10 mg/kg/día, i.p.). Resultados expresados como media ± S.E.M, n=5-8. †P<0.05 y ††P<0.01 con respecto al grupo NA; \*P<0.05 y \*\*P<0.01 con respecto al grupo OVX-CIA. ANOVA (una vía) seguido del test de la t de Dunnett.

Además de los cambios descritos anteriormente, también se estudió la presencia de osteoblastos y osteoclastos en las secciones tisulares frontales de las tibias. Los osteoblastos se estudiaron en secciones teñidas con hematoxilina-eosina (figura 38.A) y los osteoclastos se detectaron por la tinción TRAP (figura 38.B).

En la figura 38.A se observa que ni el grupo control ni la administración de ningún compuesto tuvieron efecto sobre la superficie de osteoblastos. Tampoco se observó ningún cambio significativo en la superficie de osteoclastos a día 36. Sin embargo, a día 50 el grupo OVX-CIA presentó un aumento significativo en comparación con el grupo NA. Este aumento se vio inhibido por la administración de CORM-3, no siendo efectivo a este nivel el tratamiento con ALN (figura 38.B y tabla 13).

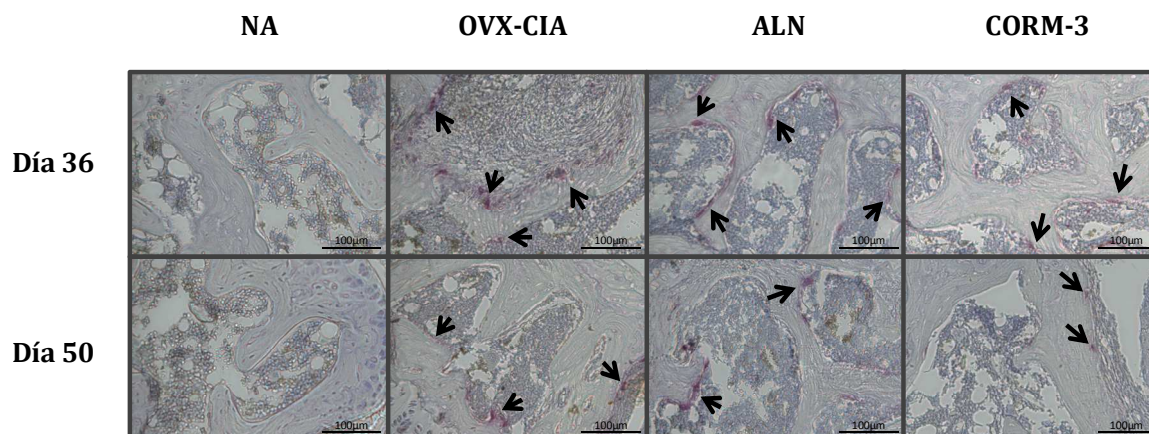
**Figura 38.** Análisis histomorfométrico de las tibias.

A. Estudio de la presencia de osteoblastos.



Secciones tisulares frontales de tibia teñidas con hematoxilina-eosina (aumento x400). Los osteoblastos se detectaron en la parte externa de la tibia de los animales. Flecha continua, osteoblastos. NA: animales sanos; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados; ALN: animales OVX-CIA tratados con ALN desde el día 22 hasta el día 49 (100 µg/kg/día, vía oral); CORM-3 animales OVX-CIA tratados con CORM-3 desde el día 22 hasta el día 49 (10 mg/kg/día, i.p.).

B. Estudio de la presencia de osteoclastos.



Tinción TRAP en secciones tisulares frontales de tibia (aumento x400). Flecha continua, osteoclastos. NA: animales sanos; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados; ALN: animales OVX-CIA tratados con ALN desde el día 22 hasta el día 49 (100 µg/kg/día, vía oral); CORM-3 animales OVX-CIA tratados con CORM-3 desde el día 22 hasta el día 49 (10 mg/kg/día, i.p.).

**Tabla 13.** Porcentaje de superficie ósea cubierta por osteoclastos (Oc.S/BS; %).

	NA	OVX-CIA	ALN	CORM-3
<b>Día 36</b>	0,075±0,006	2,403±0,935	0,823±0,397	1,271±0,547
<b>Día 50</b>	0,074±0,014	0,899±0,174 <sup>+</sup>	1,183±0,294	0,258±0,160 <sup>*</sup>

El conteo de la superficie ocupada por osteoclastos se realizó en la zona entre el cartílago y la placa de crecimiento. NA: animales sanos; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados; ALN: animales OVX-CIA tratados con ALN desde el día 22 hasta el día 49 (100 µg/kg/día, vía oral); CORM-3: animales OVX-CIA tratados con CORM-3 desde el día 22 hasta el día 49 (10 mg/kg/día, i.p.). Resultados expresados como media ± S.E.M, n=4-8. <sup>\*</sup>P<0.05 con respecto al grupo NA; <sup>+</sup>P<0.05 con respecto al grupo OVX-CIA. ANOVA (una vía) seguido del test de la *t* de Dunnett.

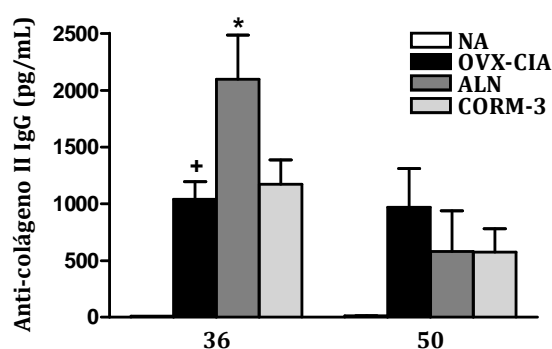
### 1.2.3. Niveles de mediadores en suero

En este experimento extrajimos sangre a los animales en los días 36 y 50 después de la primera inmunización con colágeno. En el suero obtenido realizamos la medida de los niveles de anticuerpos anti-CII y de marcadores de la degradación del colágeno, del proceso inflamatorio y del remodelado óseo.

### - Niveles de anticuerpos anti-CII

En la figura 39 se observa que la inducción del CIA en animales ovariectomizados aumentó significativamente los niveles de anticuerpos anti-CII a día 36. Además, el tratamiento de estos animales con ALN incrementó significativamente los niveles de estos anticuerpos en comparación con el grupo OVX-CIA. El tratamiento con CORM-3 no tuvo ningún efecto sobre los anticuerpos anti-CII.

Figura 39. Niveles séricos de anticuerpo anti-CII.



NA: animales sanos; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados; ALN: animales OVX-CIA tratados con ALN desde el día 22 hasta el día 49 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ , vía oral); CORM-3: animales OVX-CIA tratados con CORM-3 desde el día 22 hasta el día 49 (10  $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$ , i.p.). Resultados expresados como media  $\pm$  S.E.M,  $n=10$ . \* $P<0.05$  con respecto al grupo OVX-CIA. ANOVA (una vía) seguido del test de la  $t$  de Dunnett.

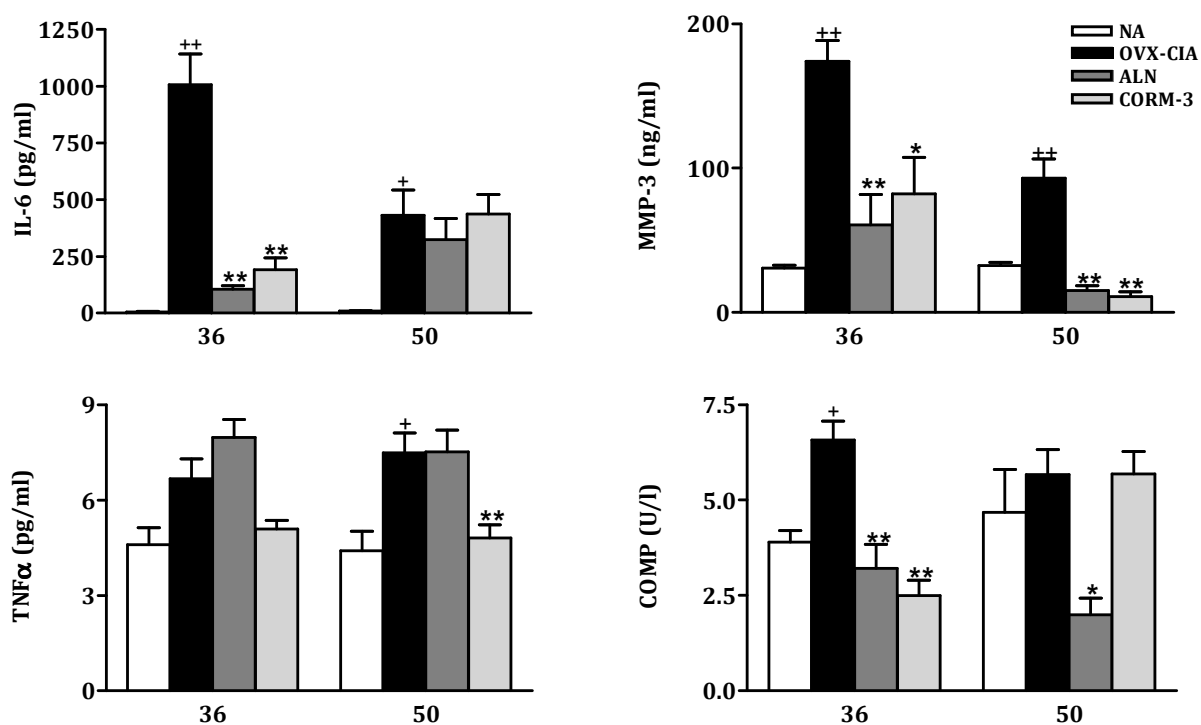
### - Niveles de biomarcadores en el suero

Los niveles de los marcadores inflamatorios MMP-3 y IL-6 se vieron aumentados de manera significativa en el suero de los animales OVX-CIA a ambos tiempos, observándose niveles más altos a día 36. El tratamiento con ALN y CORM-3 disminuyó significativamente el aumento de MMP-3 a días 36 y 50. Sin embargo, estos tratamientos sólo fueron capaces de inhibir el aumento de IL-6 a día 36. También se observó un aumento de la citocina  $\text{TNF}\alpha$ , siendo únicamente significativo este aumento a día 50. El aumento de  $\text{TNF}\alpha$  se inhibió de manera significativa a día 50 por la administración de CORM-3 (figura 40).

Los niveles séricos de COMP aumentaron significativamente a día 36 en los animales OVX-CIA. Tanto el tratamiento con CORM-3 como con ALN disminuyeron

significativamente estos niveles a día 36. Además, el ALN redujo también los niveles de COMP a día 50 (figura 40).

Figura 40. Niveles séricos de biomarcadores.



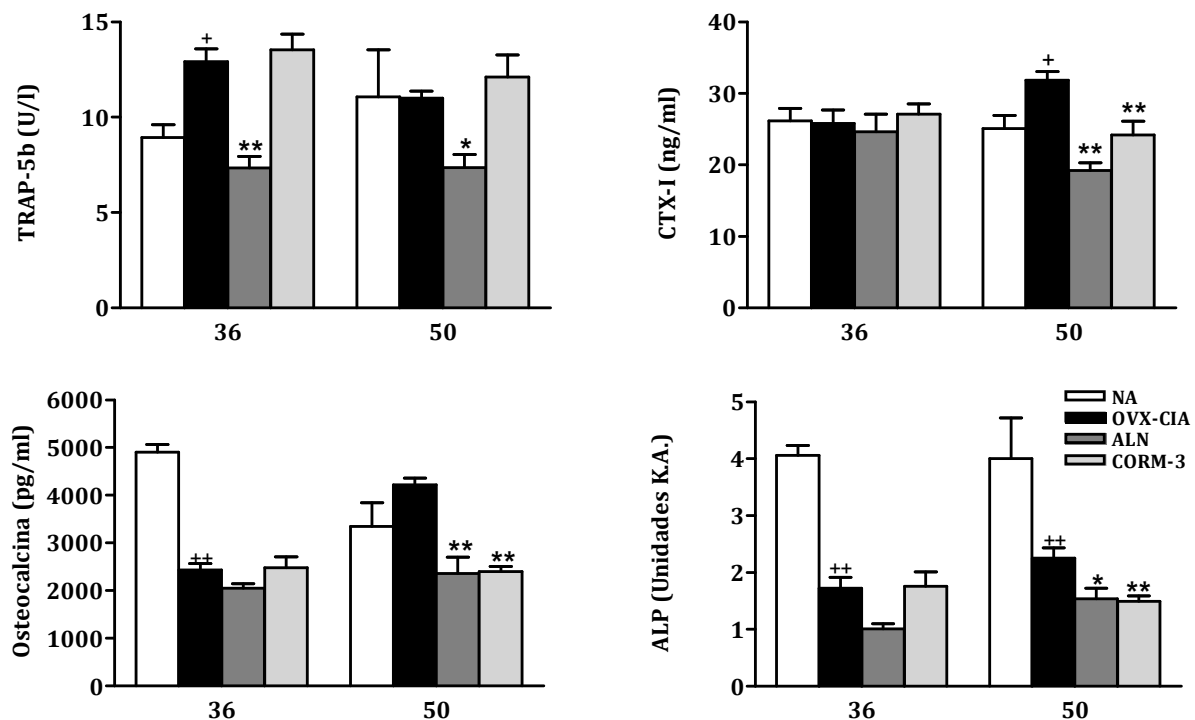
NA: animales sanos; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados; ALN: animales OVX-CIA tratados con ALN desde el día 22 hasta el día 49 (100 µg/kg/día, vía oral); CORM-3: animales OVX-CIA tratados con CORM-3 desde el día 22 hasta el día 49 (10 mg/kg/día, i.p.). Resultados expresados como media ± S.E.M, n=10. \* $P < 0.05$  y \*\* $P < 0.01$  con respecto al grupo NA; \* $P < 0.05$  y \*\* $P < 0.01$  con respecto al grupo OVX-CIA. ANOVA (una vía) seguido del test de la *t* de Dunnett.

### - Niveles de marcadores del remodelado óseo en el suero

TRAP-5b y CTX-I son marcadores de osteoclastos, el primero es indicativo de la cantidad de osteoclastos y el segundo de su actividad. El grupo OVX-CIA presentó un aumento significativo de TRAP-5b y de CTX-I a días 36 y 50, respectivamente. Como era de esperar, el ALN redujo significativamente los niveles de TRAP-5b a ambos tiempos. Los niveles de CTX-I fueron disminuidos a día 50 por el ALN y por el CORM-3. Por el contrario, la inducción del CIA en animales ovariectomizados disminuyó significativamente los niveles de los marcadores de formación ósea osteocalcina y ALP, a día 36 y a días 36 y 50, respectivamente. El tratamiento de los

animales con ALN o con CORM-3 disminuyó significativamente los niveles de ambos marcadores a día 50 (figura 41).

Figura 41. Niveles séricos de marcadores del remodelado óseo.



NA: animales sanos; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados; ALN: animales OVX-CIA tratados con ALN desde el día 22 hasta el día 49 (100  $\mu$ g/kg/día, vía oral); CORM-3: animales OVX-CIA tratados con CORM-3 desde el día 22 hasta el día 49 (10 mg/kg/día, i.p.). Resultados expresados como media  $\pm$  S.E.M, n=10. <sup>+</sup>P<0.05 y <sup>\*\*</sup>P<0.01 con respecto al grupo NA; <sup>\*</sup>P<0.05 y <sup>\*\*</sup>P<0.01 con respecto al grupo OVX-CIA. ANOVA (una vía) seguido del test de la t de Dunnett.

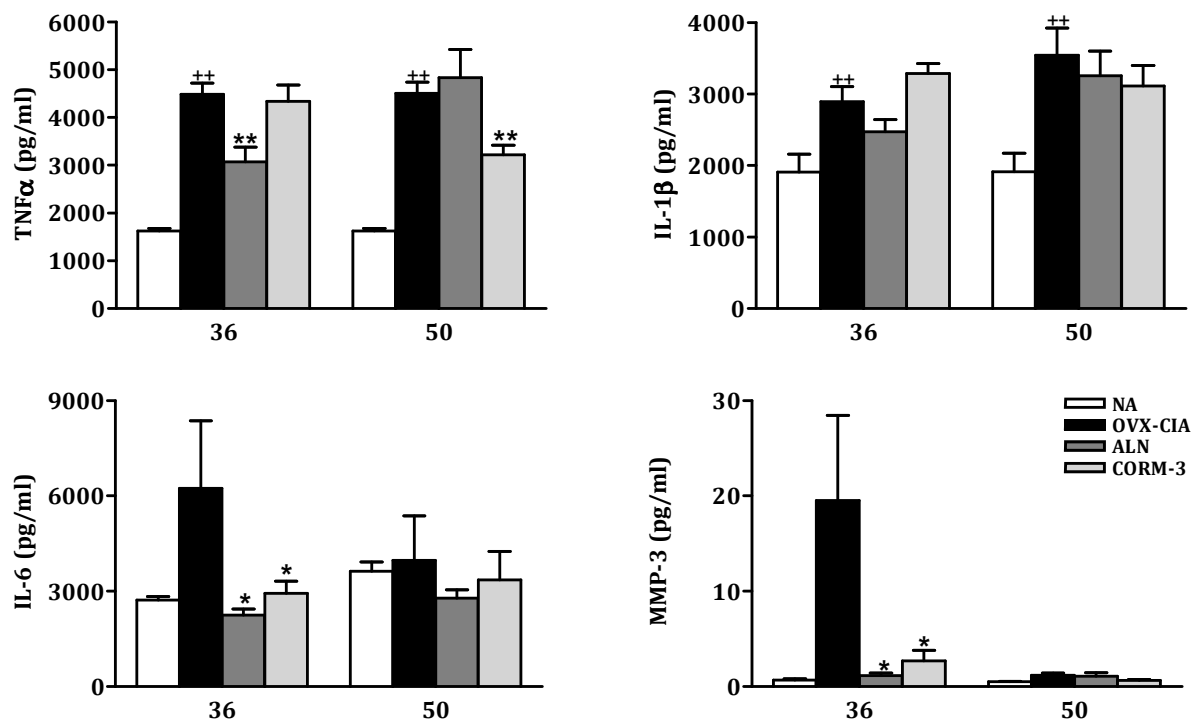
#### 1.2.4. Niveles de mediadores inflamatorios en patas traseras

En los días 36 y 50, después de sacrificar a los animales, se les amputaron las patas traseras. En el homogeneizado de las patas se realizó la medida de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MMP-3, IL-6 y HO-1.

En la figura 42 se observa que los niveles de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  aumentaron significativamente en el grupo OVX-CIA a ambos días. Los niveles de TNF $\alpha$  se redujeron por la administración de ALN a día 36 y por la de CORM-3 a día 50. Sin embargo, los niveles de IL-1 $\beta$  no se vieron modificados por ningún tratamiento.

Además de su efecto sobre el TNF $\alpha$  y la IL-1 $\beta$ , la artritis inducida en animales previamente ovariectomizados (OVX-CIA) aumentó los niveles de IL-6 y MMP-3 en el día 36. Tanto el ALN como el CORM-3 disminuyeron significativamente el aumento de ambos mediadores a este tiempo.

Figura 42. Niveles de mediadores inflamatorios en patas traseras.

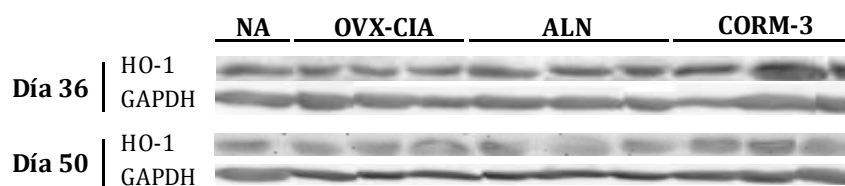


NA: animales sanos; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados; ALN: animales OVX-CIA tratados con ALN desde el día 22 hasta el día 49 (100  $\mu$ g/kg/día, vía oral); CORM-3: animales OVX-CIA tratados con CORM-3 desde el día 22 hasta el día 49 (10 mg/kg/día, i.p.). Resultados expresados como media  $\pm$  S.E.M, n=10. ††P<0.01 con respecto al grupo NA; \*P<0.05 y ††\*P<0.01 con respecto al grupo OVX-CIA. ANOVA (una vía) seguido del test de la t de Dunnett.

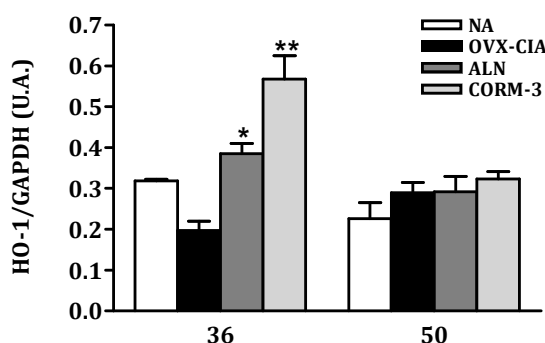
Además del estudio de los mediadores anteriormente nombrados, se realizó la medida de la expresión proteica de la HO-1 por *western blot*.

La administración de ALN y de CORM-3 incrementó significativamente los niveles de HO-1 a día 36, con un mayor efecto de CORM-3. Sin embargo, ninguno de los tratamientos tuvo efecto a día 50 (figura 43).



**Figura 43** Expresión proteica de HO-1 en homogeneizado de pata.A. Imagen de *Western Blot*.

B. Expresión relativa de HO-1y de GAPDH.



NA: animales sanos; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados; ALN: animales OVX-CIA tratados con ALN desde el día 22 hasta el día 49 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ , vía oral); CORM-3: animales OVX-CIA tratados con CORM-3 desde el día 22 hasta el día 49 (10  $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$ , i.p.). Resultados expresados como media  $\pm$  S.E.M, n=2-3. \* $P < 0.05$  y \*\* $P < 0.01$  con respecto al grupo OVX-CIA. ANOVA (una vía) seguido del test de la *t* de Dunnett.

### 1.2.5. Efectos sobre la estructura trabecular del hueso

El grupo OVX-CIA mostró una importante pérdida de hueso y una alteración en la estructura ósea a lo largo del tiempo (tabla 14, tabla 15 y figura 44). Se observó una disminución de la fracción volumétrica ósea (BV/TV) en comparación con el grupo NA, lo que indica una pérdida de hueso y una disminución de la DMO. El deterioro de la calidad del hueso se observó en la disminución del grosor y número trabecular (Tb.Th y Tb.N). Estos cambios tuvieron como consecuencia la pérdida de la conectividad trabecular, con un incremento del factor de patrón trabecular (Tb.Pf, índice de conectividad inverso). Estos cambios observados fueron similares en la epífisis y en la metáfisis de la tibia (tabla 14 y tabla 15). En el día 36, el ALN aumentó la superficie específica ósea (BS/TV) y Tb.N en la zona de la epífisis (tabla 14.A). A día 50, el ALN tuvo efecto sobre la epífisis y la metáfisis aumentando los

parámetros anteriormente nombrados, además de BV/TV y de la densidad mineral ósea (tabla 14.B y tabla 15.B). El tratamiento con CORM-3 a día 36 mantuvo la calidad y estructura ósea observándose una mejor microestructura trabecular en la metafisis y en la epífisis de la tibia. Además, este tratamiento presentó un efecto protector frente a la pérdida de la densidad mineral ósea. Por el contrario, el CORM-3 no fue capaz de mantener su efecto sobre el hueso a día 50 (tabla 14 y tabla 15).

**Tabla 14.** Análisis del hueso trabecular en la epífisis de la tibia.

A. Medidas en el día 36.

	NA	OVX-CIA	ALN	CORM-3
<b>BV/TV (%)</b>	26,60 ± 0,88	15,98 ± 0,65 <sup>++</sup>	18,46 ± 0,53	25,43 ± 0,42 <sup>**</sup>
<b>BS/TV (mm<sup>-1</sup>)</b>	21,19 ± 0,54	16,70 ± 0,23 <sup>++</sup>	21,27 ± 0,34 <sup>*</sup>	22,37 ± 0,95 <sup>**</sup>
<b>Tb.Th (mm)</b>	0,0517 ± 0,0005	0,0415 ± 0,0013 <sup>++</sup>	0,0386 ± 0,0001	0,0484 ± 0,0021
<b>Tb.N (mm<sup>-1</sup>)</b>	5,14 ± 0,12	3,85 ± 0,03 <sup>++</sup>	4,79 ± 0,16 <sup>*</sup>	5,27 ± 0,14 <sup>**</sup>
<b>Tb.Pf (mm<sup>-1</sup>)</b>	24,24 ± 0,74	35,36 ± 4,13 <sup>+</sup>	36,38 ± 2,19	27,76 ± 3,07
<b>DMOv (mg/cm<sup>3</sup>)</b>	280,26 ± 18,34	141,35 ± 3,00 <sup>++</sup>	166,98 ± 1,61	255,06 ± 2,27 <sup>**</sup>

B. Medidas en el día 50.

	NA	OVX-CIA	ALN	CORM-3
<b>BV/TV (%)</b>	26,60 ± 0,88	14,30 ± 0,81 <sup>++</sup>	21,35 ± 1,14 <sup>*</sup>	16,98 ± 2,36
<b>BS/TV (mm<sup>-1</sup>)</b>	21,19 ± 0,54	15,17 ± 0,27 <sup>++</sup>	18,99 ± 0,32 <sup>*</sup>	16,63 ± 1,74
<b>Tb.Th (mm)</b>	0,0517 ± 0,0005	0,0423 ± 0,0016 <sup>++</sup>	0,0464 ± 0,0023	0,0439 ± 0,0020
<b>Tb.N (mm<sup>-1</sup>)</b>	5,14 ± 0,12	3,38 ± 0,06 <sup>++</sup>	4,60 ± 0,02 <sup>**</sup>	3,82 ± 0,36
<b>Tb.Pf (mm<sup>-1</sup>)</b>	24,24 ± 0,74	39,94 ± 0,82 <sup>++</sup>	36,52 ± 0,33	26,74 ± 0,04 <sup>*</sup>
<b>DMOv (mg/cm<sup>3</sup>)</b>	280,26 ± 18,34	121,35 ± 17,09 <sup>++</sup>	204,03 ± 18,42 <sup>*</sup>	164,88 ± 34,20

NA: animales sanos; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados; ALN: animales OVX-CIA tratados con ALN desde el día 22 hasta el día 49 (100 µg/kg/día, vía oral); CORM-3: animales OVX-CIA tratados con CORM-3 desde el día 22 hasta el día 49 (10 mg/kg/día, i.p.). Resultados expresados como media ± S.E.M, n=2. <sup>+</sup>P<0.05 y <sup>++</sup>P<0.01 con respecto al grupo NA. <sup>\*</sup>P<0.05 y <sup>\*\*</sup>P<0.01 con respecto al grupo OVX-CIA. ANOVA (una vía) seguido del test de la *t* de Dunnett.

**Tabla 15.** Análisis del hueso trabecular en la metáfisis de la tibia.

A. Medidas en el día 36.

	NA	OVX-CIA	ALN	CORM-3
<b>BV/TV (%)</b>	9,93 ± 0,36	4,39 ± 0,41 <sup>+</sup>	5,42 ± 0,03	7,78 ± 0,09 <sup>**</sup>
<b>BS/TV (mm<sup>-1</sup>)</b>	9,06 ± 0,39	5,34 ± 0,18 <sup>++</sup>	6,24 ± 0,06	7,68 ± 0,28 <sup>**</sup>
<b>Tb.Th (mm)</b>	0,0440 ± 0,0001	0,0360 ± 0,0018 <sup>++</sup>	0,0396 ± 0,0001	0,0426 ± 0,0004 <sup>**</sup>
<b>Tb.N (mm<sup>-1</sup>)</b>	2,28 ± 0,09	1,21 ± 0,05 <sup>++</sup>	1,37 ± 0,01	1,83 ± 0,04 <sup>**</sup>
<b>Tb.Pf (mm<sup>-1</sup>)</b>	30,72 ± 0,80	51,05 ± 3,93 <sup>++</sup>	48,99 ± 0,34	36,83 ± 2,23 <sup>*</sup>

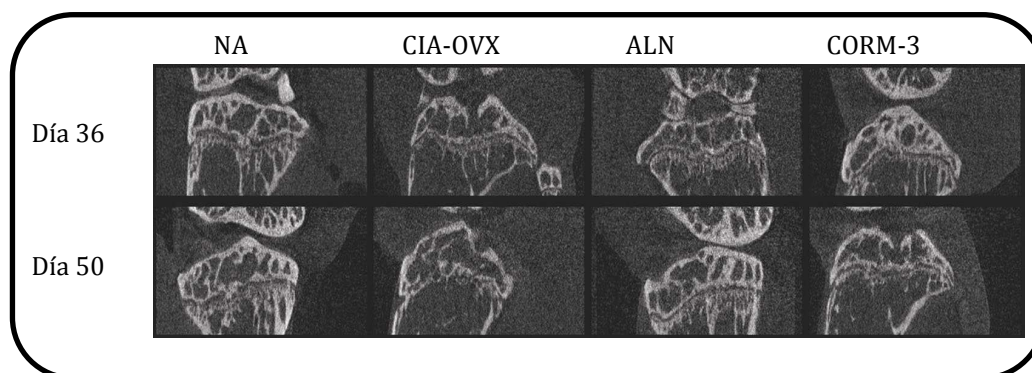
B. Medidas en el día 50.

	NA	OVX-CIA	ALN	CORM-3
<b>BV/TV (%)</b>	9,93 ± 0,36	3,17 ± 0,17 <sup>++</sup>	6,06 ± 0,42 <sup>**</sup>	4,19 ± 0,97
<b>BS/TV (mm<sup>-1</sup>)</b>	9,06 ± 0,39	4,31 ± 0,48 <sup>++</sup>	6,53 ± 0,01 <sup>*</sup>	4,54 ± 0,79
<b>Tb.Th (mm)</b>	0,044 ± 0,00005	0,0347 ± 0,0024 <sup>+</sup>	0,0393 ± 0,0023	0,0379 ± 0,0014
<b>Tb.N (mm<sup>-1</sup>)</b>	2,28 ± 0,09	0,94 ± 0,11 <sup>++</sup>	1,54 ± 0,02 <sup>*</sup>	1,08 ± 0,22
<b>Tb.Pf (mm<sup>-1</sup>)</b>	30,72 ± 0,80	56,42 ± 1,64 <sup>++</sup>	40,99 ± 3,49 <sup>*</sup>	44,18 ± 5,35

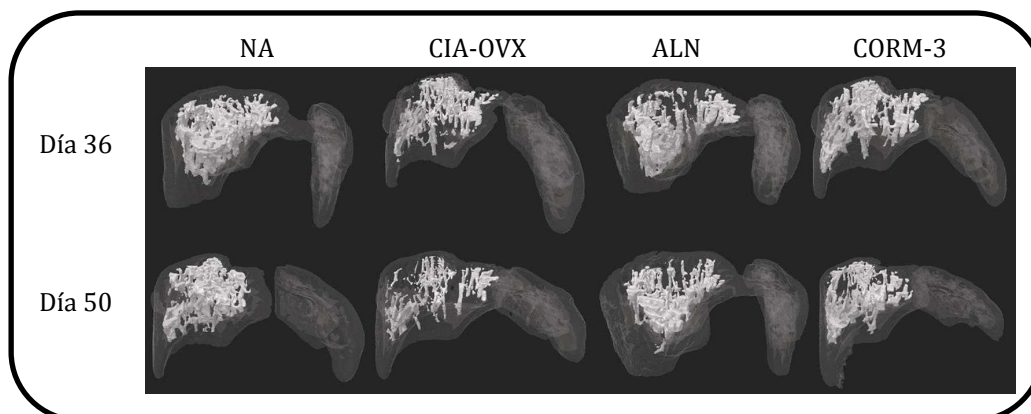
NA: animales sanos; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados; ALN: animales OVX-CIA tratados con ALN desde el día 22 hasta el día 49 (100 µg/kg/día, vía oral); CORM-3: animales OVX-CIA tratados con CORM-3 desde el día 22 hasta el día 49 (10 mg/kg/día, i.p.). Resultados expresados como media ± S.E.M, n=2. <sup>+</sup>P<0.05 y <sup>++</sup>P<0.01 con respecto al grupo NA. <sup>\*</sup>P<0.05 y <sup>\*\*</sup>P<0.01 con respecto al grupo OVX-CIA. ANOVA (una vía) seguido del test de la *t* de Dunnett.

**Figura 44.** Imágenes del hueso trabecular de la tibia.

A. Imágenes representativas del hueso subcondral trabecular (modelo 2D).



B. Imágenes representativas del hueso trabecular de la zona metafisaria (modelo 3D).



## 2. RESULTADOS DEL MODELO DE ARTRITIS POSTMENOPÁUSICA (OVX-CIA) EN RATONES B10.Q Y B10.Q/Ncf1\*\*

Además del estudio de distintas moléculas en el modelo animal de artritis postmenopáusica, realizamos el estudio del posible papel de la proteína Ncf1 en el desarrollo de esta patología. Para ello empleamos animales modificados genéticamente (Ncf1\*\*) de manera que Ncf1 es inactivo y no se lleva a cabo la producción de ROS por la NADPH oxidasa. Además de estos animales, utilizamos los *wild type* correspondientes (B10.Q) como controles.

### 2.1. Resultados *in vivo*

A ambas cepas de animales, se les realizó la ovariectomía (OVX) o la operación simulada (Sham) y posteriormente se les indujo el CIA. La duración del experimento fue de 63 días (después de la primera inmunización con colágeno) y se extrajo sangre a los animales a días 0, 13, 35 y 63 para el posterior estudio de distintos mediadores.

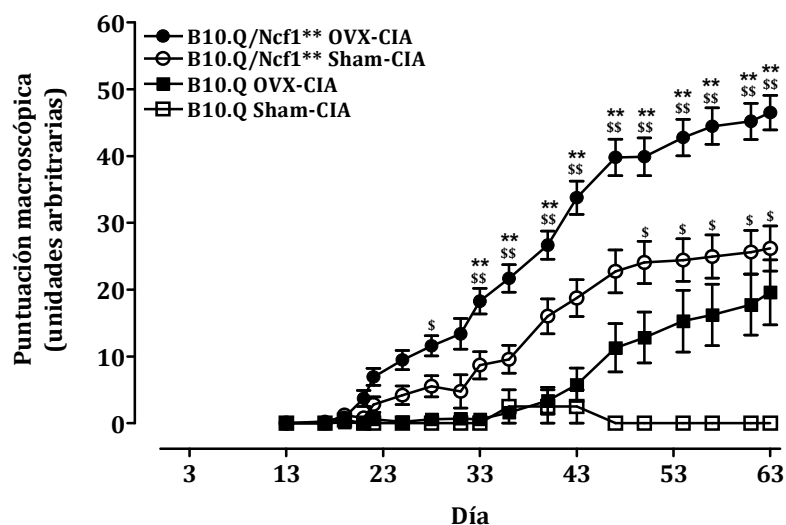
### 2.1.1. Evolución de la artritis

En primer lugar se realizó el seguimiento de la severidad de la artritis por puntuación macroscópica del hinchazón y enrojecimiento de las patas delanteras y traseras. Además, se estudió la incidencia de la enfermedad en los distintos grupos.

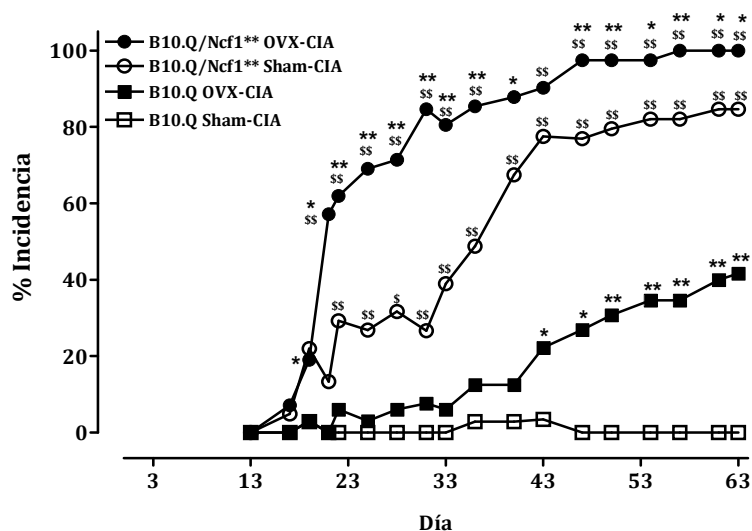
Como podemos ver en la figura 45, la modificación del gen que codifica para *Ncf1* (*Ncf1*<sup>\*\*</sup>) aumentó significativamente los signos clínicos de la artritis al comparar los animales *Ncf1*<sup>\*\*</sup> (OVX-CIA o Sham-CIA) con los correspondientes controles *wild type*. Además, los animales *Ncf1*<sup>\*\*</sup> ovariectomizados (OVX-CIA) presentaron un aumento significativo de la severidad de la artritis en comparación con los animales Sham-CIA. Sin embargo, esta diferencia no se observó en los animales sin modificación genética (B10.Q) (figura 45.A).

Figura 45. Evolución de la artritis

A. Puntuación macroscópica de la artritis.



## B. Porcentaje de incidencia de la artritis.



A. Puntuación macroscópica. Se llevó a cabo visualmente utilizando una escala de 0-15 para cada pata. B. Porcentaje de incidencia de la artritis. Ncf1\*\* OVX-CIA: animales con modificación genética en Ncf1 artríticos ovariectomizados; Ncf1\*\* Sham-CIA: animales con modificación genética en Ncf1 artríticos con operación simulada; B10.Q OVX-CIA: *wild type* ovariectomizados artríticos; B10.Q Sham-CIA: *wild type* artríticos con operación simulada. Resultados expresados como media  $\pm$  S.E.M, n=15-20.  $^*P<0.05$  y  $^{**}P<0.01$  con respecto al control *wild type*.  $^*P<0.05$ ,  $^{**}P<0.01$  con respecto al correspondiente control Sham-CIA. A, ANOVA (dos vías) seguido del test de Bonferroni. B, Test exacto de Fisher (dos vías).

La incidencia de la artritis en animales Ncf1\*\* fue significativamente mayor que la observada en los animales B10.Q, llegando a desarrollar la enfermedad el 100% de los animales. Además, la incidencia de los animales Ncf1\*\* OVX-CIA fue significativamente mayor que la de los Sham-CIA desde el día 21 hasta el final del experimento. En los animales B10.Q, se observó un incremento de la incidencia de la enfermedad en animales OVX-CIA en comparación con los Sham-CIA (figura 45.B).

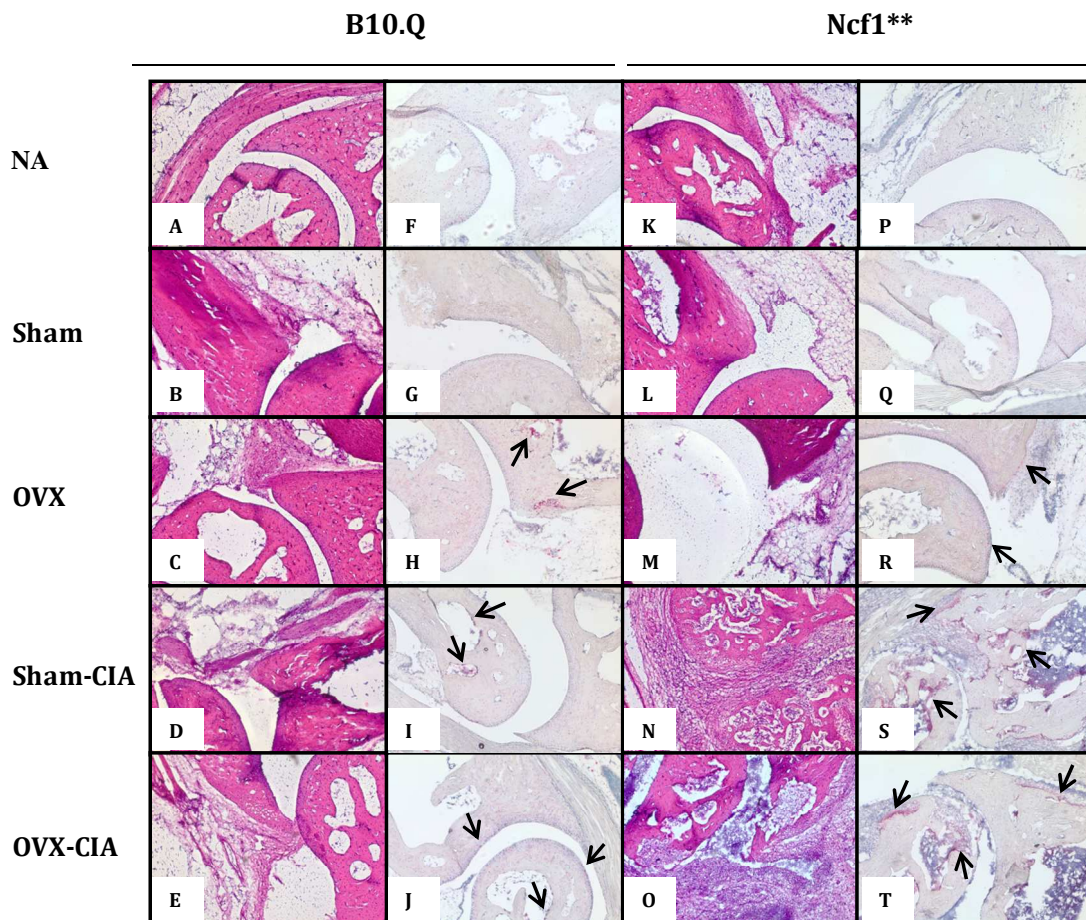
### 2.1.2. Análisis histomorfométrico de los tobillos

Tras sacrificar a los animales, se realizó el estudio histológico de los tobillos tras la tinción hematoxilina-eosina de los mismos. Además, se llevó a cabo el estudio de la presencia de osteoclastos por tinción TRAP de las secciones tisulares frontales de los tobillos.

En línea con los resultados obtenidos en la puntuación macroscópica, los ratones artríticos *Ncf1\*\** (Sham-CIA y OVX-CIA) presentaron una masiva infiltración celular, la formación de pannus y una degradación importante del hueso y del cartílago en los tobillos estudiados (figura 46, N-O). Sin embargo no se apreciaron diferencias entre ambos grupos. Los animales *wild type* artríticos presentaron pequeños cambios en la puntuación macroscópica y no se observaron cambios en su histología (figura 46, D-E). En ambas cepas de ratones, la ovariectomía por sí sola no provocó ninguna modificación (figura 46, C y M) a este nivel.

En la tinción TRAP se observa que tanto la ovariectomía como el CIA provocaron un aumento de osteoclastos en ambas cepas (figura 46, F-J y P-T). Sin embargo, este aumento fue más pronunciado en los *Ncf1\*\** artríticos. El déficit de estrógenos por la ovariectomía no parece incrementar el efecto del CIA en estos animales al compararlos con los Sham-CIA.

Figura 46. Análisis histomorfométrico de los tobillos.



Secciones tisulares frontales de tobillos (zona calcáneo-tibia) teñidas con hematoxilina-eosina (A-E y K-O) y con la tinción TRAP (F-J y P-T). Aumento x100. Flecha continua, osteoclastos.

### 2.1.3. Niveles séricos de anticuerpos anti-CII

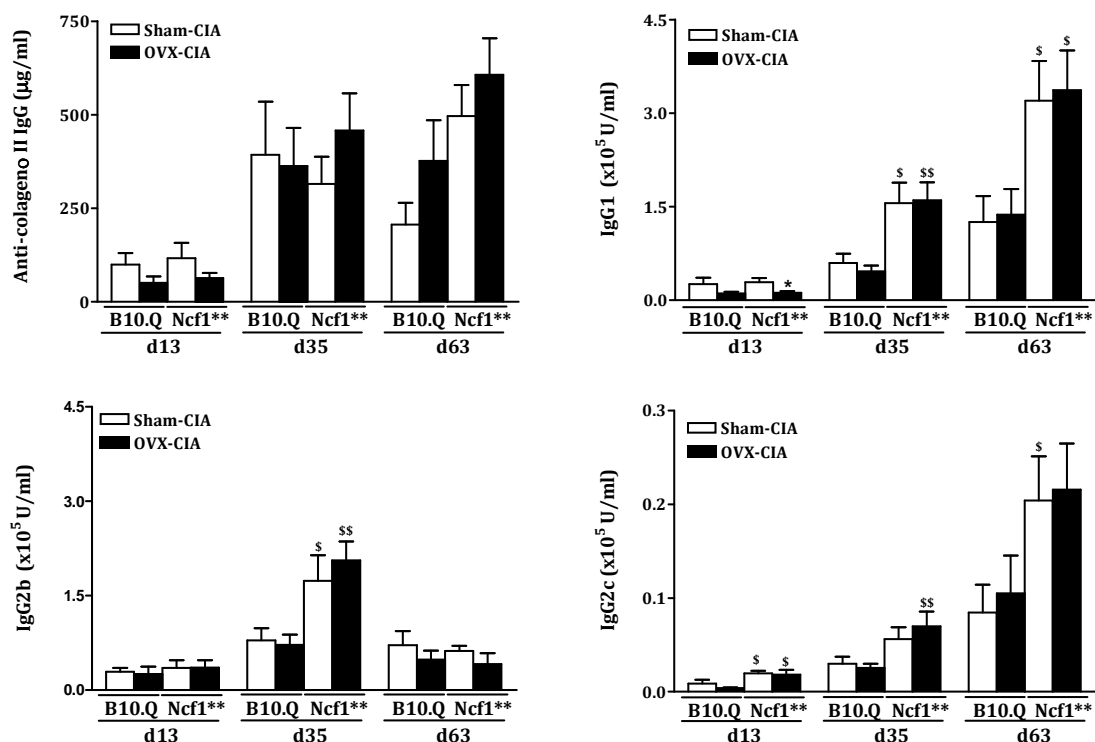
En este experimento realizamos la medida de los niveles de anticuerpos anti-CII en el suero de los animales en los días 13, 35 y 63 después de la primera inmunización con colágeno (figura 47).

Al estudiar la inmunoglobulina IgG total no se observó ninguna diferencia significativa entre las distintas cepas ni entre los animales artríticos ovariectomizados (OVX-CIA) y los Sham-CIA. Cuando realizamos el estudio de los distintos isotipos de IgG que participan en el proceso artrítico observamos que los niveles de IgG1, IgG2b e IgG2c incrementaron significativamente en los distintos tiempos en los animales Ncf1\*\* en comparación de los animales B10.Q. Cuando



estudiamos el efecto de la ovariectomía sobre estas inmunoglobulinas se observó, en el día 13, una reducción significativa de los niveles de IgG1 en animales Ncf1\*\* (OVX-CIA) en comparación con los Sham-CIA. Al estudiar la IgG2b y la IgG2c no se detectó ninguna modificación de sus niveles por la ovariectomía.

Figura 47. Niveles séricos de anticuerpos anti-CII.



Sham-CIA: animales artríticos con operación simulada; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados; B10.Q: ratones *wild type*; Ncf1\*\*: ratones con el gen Ncf1 modificado. Resultados expresados como media  $\pm$  S.E.M, n=10-15. \$ $P$ <0.05 y \$\$ $P$ <0.01 con respecto al control *wild type*. \* $P$ <0.05 con respecto al correspondiente control Sham-CIA. ANOVA (una vía) seguido del test de Bonferroni.

#### 2.1.4. Estudio de la especificidad de los anticuerpos anti-CII (IgG)

El colágeno está formado por distintos péptidos (epítomos) los cuales actúan como antígeno frente a los anticuerpos anti-CII. Estos epítomos no son reconocidos de igual manera por los anticuerpos anti-CII y alguno de ellos son de carácter artritogénico (epítomos 28, 37 y 41) y sin embargo, otros no (66). Así pues, resulta de gran interés el estudio de la influencia de la OVX en la modificación o no de la especificidad de los anticuerpos anti-CII en el CIA.

Mediante ELISA se detectó la especificidad de la unión de los anticuerpos IgG a los distintos epítomos del colágeno en el suero obtenido a días 0, 13, 35 y 63 después de la primera inmunización con colágeno II. Basándonos en estudios previos, los epítomos estudiados en la presente Tesis fueron: 9, 10, 13-38, 41, 42, 53, 66, 70. En las tablas siguientes se muestran únicamente los epítomos en los que se detectaron diferencias significativas entre los grupos Sham-CIA y OVX-CIA.

En los animales B10.Q (tabla 16.A), antes de la inyección de colágeno (día 0) se observa que la ovariectomía redujo la respuesta frente a los epítomos 17 y 18 en comparación con los Sham-CIA. A día 13, los animales OVX-CIA presentaron un aumento significativo en la respuesta frente al epítomo 14 y una disminución significativa frente a los epítomos 17, 31, 32, 34, 35 y 53. A día 35, los OVX-CIA presentaron una disminución significativa en la unión a los epítomos 15, 18, 19, 21, 25, 30, 31, 32 y 34. Por último, a día 63 aumentó significativamente la unión al epítomo 26 y disminuyó significativamente la del 31 en los OVX-CIA.

En los animales Ncf1\*\* (tabla 16.B), a día 0 se observó un aumento significativo de la respuesta frente a los epítomos 33 y 35 en los animales OVX-CIA frente a los Sham-CIA. A día 13 disminuyó significativamente la respuesta frente al epítomo 13 y aumentó significativamente frente a los epítomos 15, 16, 17, 18, 37, 41 y 42 en los OVX-CIA. A día 35 no se observó ningún cambio significativo entre los animales OVX-CIA y los Sham-CIA. Por último, a día 63 aumentó significativamente la unión frente a los epítomos 15, 23, 32, 35 y 53 en los OVX-CIA en comparación con los Sham-CIA.

**Tabla 16.** Respuesta de los anticuerpos anti-CII frente a los distintos epítomos del colágeno.

A. Medidas realizadas en animales B10.Q.

Epítopo	Grupo	d0	d13	d35	d63
14	Sham-CIA	3586 ± 517,5	2227 ± 109,0	5004 ± 451,3	4598 ± 663,0
	OVX-CIA	3221 ± 487,3	4034 ± 604,3*	4195 ± 801,4	3586 ± 394,8
15	Sham-CIA	1013 ± 69,94	2203 ± 240,2	2797 ± 243,8	2911 ± 529,8
	OVX-CIA	1076 ± 111,5	1899 ± 228,8	2098 ± 262,5*	2380 ± 356,8
17	Sham-CIA	2355 ± 282,2	14751 ± 3615	3521 ± 430,3	2627 ± 280,5
	OVX-CIA	1326 ± 198,6*	5739 ± 107,4*	3611 ± 596,8	3147 ± 480,6
18	Sham-CIA	2125 ± 260,6	4635 ± 1172	6857 ± 831,6	7627 ± 1723
	OVX-CIA	1203 ± 145,0**	2309 ± 392,1	4169 ± 681,8**	6105 ± 2160
19	Sham-CIA	2772 ± 465,4	4500 ± 850,9	4358 ± 415,2	5451 ± 1586
	OVX-CIA	2622 ± 434,4	2788 ± 641,2	2627 ± 350,0**	2775 ± 534,3
21	Sham-CIA	840,3 ± 90,47	1081 ± 223,5	5336 ± 1782	19952 ± 4748
	OVX-CIA	673,8 ± 58,41	640,7 ± 103,1	1258 ± 313,2**	16552 ± 5551
25	Sham-CIA	1030 ± 0,009	1965 ± 762,6	3280 ± 679,5	3909 ± 1240
	OVX-CIA	1030 ± 0,038	411,1 ± 134,5	727,6 ± 267,9**	5195 ± 1307
26	Sham-CIA	116 4 ± 29,55	1672 ± 488,1	3006 ± 407,3	2355 ± 615,0
	OVX-CIA	1134 ± 0,0077	528,1 ± 271,1	2081 ± 373,3	16812 ± 6466*
30	Sham-CIA	2308 ± 334,5	3339 ± 518,3	6073 ± 927,1	3376 ± 956,4
	OVX-CIA	2104 ± 333,1	1931 ± 572,0	3260 ± 644,1*	3957 ± 896,3
31	Sham-CIA	1401 ± 240,0	5216 ± 102,7	6255 ± 977,1	3337 ± 493,2
	OVX-CIA	1288 ± 275,5	751,6 ± 387,4*	2603 ± 785,4**	1837 ± 297,0*
32	Sham-CIA	2308 ± 275,9	4093 ± 349,6	6327 ± 979,9	4953 ± 970,7
	OVX-CIA	1931 ± 192,6	1986 ± 467,8*	2034 ± 177,0**	2906 ± 277,1
34	Sham-CIA	2502 ± 381,7	4827 ± 175,1	3544 ± 639,3	5184 ± 1064
	OVX-CIA	2355 ± 301,9	2151 ± 706,9*	1326 ± 170,3**	2950 ± 571,8
35	Sham-CIA	3020 ± 301,9	3613 ± 307,4	4555 ± 349,1	8669 ± 1548
	OVX-CIA	2770 ± 308,8	2013 ± 616,7*	3142 ± 742,7	5938 ± 2940
53	Sham-CIA	2226 ± 211,9	4333 ± 805,4	2841 ± 396,5	3103 ± 560,2
	OVX-CIA	1912 ± 179,8	2318 ± 304,6*	2581 ± 341,4	2291 ± 600,6

## B. Medidas realizadas en animales Ncf1\*\*.

Epítopo	Grupo	d0	d13	d35	d63
13	Sham-CIA	2792 ± 432,5	7147 ± 796,7	6208 ± 686,4	8905 ± 2209
	OVX-CIA	2883 ± 362,5	4335 ± 633,9**	7735 ± 1593	6353 ± 1977
15	Sham-CIA	3086 ± 469,9	4149 ± 641,4	4417 ± 503,6	4773 ± 1244
	OVX-CIA	2470 ± 707,9	9508 ± 2851*	7154 ± 1750	17012 ± 4300*
16	Sham-CIA	3718 ± 890,8	4144 ± 680,0	7409 ± 1212	7256 ± 1417
	OVX-CIA	6028 ± 1560	9731 ± 2026*	9865 ± 2651	14438 ± 2973
17	Sham-CIA	5220 ± 411,7	4886 ± 916,3	7483 ± 1149	4774 ± 383,7
	OVX-CIA	8094 ± 1938	13149 ± 3502*	8340 ± 2295	9501 ± 1800
18	Sham-CIA	4324 ± 599,1	4281 ± 736,5	6224 ± 821,5	9958 ± 2235
	OVX-CIA	6204 ± 1663	12344 ± 2926**	9063 ± 2224	12314 ± 2282
23	Sham-CIA	3500 ± 531,4	11626 ± 2758	5280 ± 743,4	6379 ± 1233
	OVX-CIA	4479 ± 886,4	21757 ± 4270	9018 ± 2098	19565 ± 4660**
32	Sham-CIA	3902 ± 560,5	5878 ± 1380	9822 ± 1632	7336 ± 999,2
	OVX-CIA	5590 ± 1310	8682 ± 2000	16204 ± 3844	16038 ± 3678*
33	Sham-CIA	3443 ± 758,8	6754 ± 1878	5861 ± 882,8	11926 ± 4364
	OVX-CIA	6989 ± 1430*	9588 ± 3957	8840 ± 1597	17725 ± 3451
35	Sham-CIA	2674 ± 314,2	3824 ± 459,5	4100 ± 486,5	5112 ± 989,2
	OVX-CIA	6524 ± 1133**	6329 ± 1089	6728 ± 1834	11597 ± 1749**
37	Sham-CIA	1852 ± 346,0	2320 ± 339,7	4250 ± 637,2	4932 ± 1180
	OVX-CIA	2918 ± 688,5	7455 ± 553,2**	6157 ± 1810	6008 ± 1060
41	Sham-CIA	1973 ± 256,8	1704 ± 425,0	2214 ± 242,8	3455 ± 695,9
	OVX-CIA	1738 ± 370,1	3856 ± 758,8*	5266 ± 1865	3056 ± 565,4
42	Sham-CIA	2623 ± 197,3	2634 ± 365,4	4888 ± 1327	12717 ± 2733
	OVX-CIA	4680 ± 932,0	6233 ± 1662*	4651 ± 843,4	12053 ± 2170
53	Sham-CIA	3295 ± 429,2	4280 ± 620,0	3625 ± 484,2	7990 ± 2387
	OVX-CIA	4923 ± 1021	9834 ± 2922	4042 ± 528,4	16129 ± 3234*

Sham-CIA: animales artríticos con operación simulada; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados. Resultados expresados como media ± S.E.M (unidades arbitrarias), n=10-15. \*P<0.05 y \*\*P<0.01 con respecto a Sham-CIA. *t* de Student.

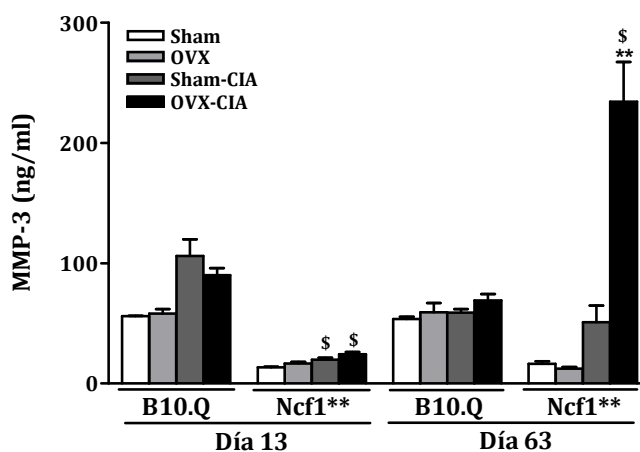
### 2.1.5. Niveles séricos de MMP-3

La MMP-3 degrada diferentes compuestos de la matriz extracelular, existiendo una importante relación entre los niveles de esta proteína y el desarrollo de la artritis.

Los niveles de esta enzima se midieron en los días 13 y 63 después de la primera inyección con colágeno para estudiar el efecto de la OVX y del CIA sobre sus niveles.

En la figura 48 se observa que a día 13, el polimorfismo del gen *Ncf1* disminuyó significativamente los niveles de MMP-3 después de la inducción de la artritis en animales Sham y en OVX en comparación con los B10.Q. A día 63, se observó un incremento de los niveles de MMP-3 en los animales *Ncf1*\*\* artríticos (OVX-CIA) siendo significativo en comparación con los B10.Q OVX-CIA. Además, el aumento de MMP-3 en los animales OVX-CIA fue mucho mayor que en los Sham-CIA observándose diferencias significativas entre ellos.

Figura 48. Niveles séricos de MMP-3.



Sham-CIA: animales sanos con operación simulada; OVX: animales ovariectomizados; Sham-CIA: animales artríticos con operación simulada; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados; B10.Q: ratones *wild type*; *Ncf1*\*\* : ratones con el gen *Ncf1* modificado. Resultados expresados como media  $\pm$  S.E.M, n=10.  $^{\$}P<0.05$  con respecto al control *wild type*;  $^{**}P<0.01$  con respecto al correspondiente control Sham-CIA. ANOVA (una vía) seguido del test de Bonferroni..

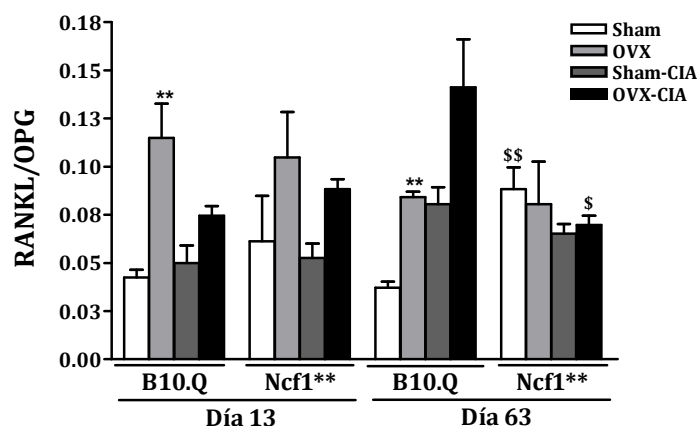
### 2.1.6. Niveles séricos de RANKL y OPG

El ratio entre los niveles de RANKL y de OPG es indicativo de la degradación ósea. En nuestro experimento realizamos la medida de los niveles de estos marcadores en el suero de los animales a días 13 y 63 después de la primera inyección de colágeno (figura 49).

En los animales B10.Q la ovariectomía (OVX) provocó un incremento significativo del ratio RANKL/OPG a ambos tiempos. En el caso de los animales Ncf1\*\* no se observaron estas diferencias. Al inducir el CIA en los animales ovariectomizados (OVX-CIA), tanto B10.Q como Ncf1\*\*, se observó una tendencia a aumentar el ratio estudiado aunque no se obtuvieron diferencias significativas en comparación con los Sham-CIA.

La presencia de Ncf1\*\* en el día 63, provocó un incremento de RANKL/OPG en animales Sham en comparación con los animales B10.Q Sham. Sin embargo, los animales Ncf1\*\* OVX-CIA presentaron una reducción de RANKL/OPG en el día 63 en comparación de los animales B10.Q OVX-CIA.

Figura 49. Ratio RANKL/OPG en suero.



Sham: animales sanos con operación simulada; OVX: animales ovariectomizados; Sham-CIA: animales artríticos con operación simulada; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados; B10.Q: ratones *wild type*; Ncf1\*\*: ratones con el gen Ncf1 modificado. Resultados expresados como media  $\pm$  S.E.M, n=10. \$ $P$ <0.05 y \$\$ $P$ <0.01 con respecto al control *wild type* \*\* $P$ <0.01 con respecto al correspondiente control Sham. ANOVA (una vía) seguido del test de Bonferroni.

### 2.1.7. Efectos sobre la estructura trabecular del hueso

Al final del experimento (día 63) se realizó el estudio tridimensional de la microestructura trabecular de la tibia en la epífisis proximal (entre el plato subcondral y la placa de crecimiento epifisaria).

Los animales B10.Q presentaron ligeros cambios en la estructura trabecular de la tibia por la OVX y por el CIA, pero estos cambios no fueron significativos respecto al Sham (tabla 17.A). En los ratones Ncf1\*\*, la artritis provocó una reducción de densidad mineral ósea (DMOv), de la fracción volumétrica ósea (BV/TV), de la superficie específica ósea (BS/TV) y del número de trabeculas (Tb.N). En estos animales, la ovariectomía por si sola provocó un ligero deterioro de la calidad del hueso. Sin embargo, en animales artríticos los efectos de la ovariectomía fueron más intensos, observándose incrementos en la pérdida de DMOv, BS/TV y Tb.N (tabla 17.B). Estos cambios provocaron una pérdida de la estructura trabecular del hueso y por tanto, de la calidad ósea (figura 50).

**Tabla 17.** Análisis del hueso trabecular en el día 63.

A. Medidas realizadas en animales B10.Q.

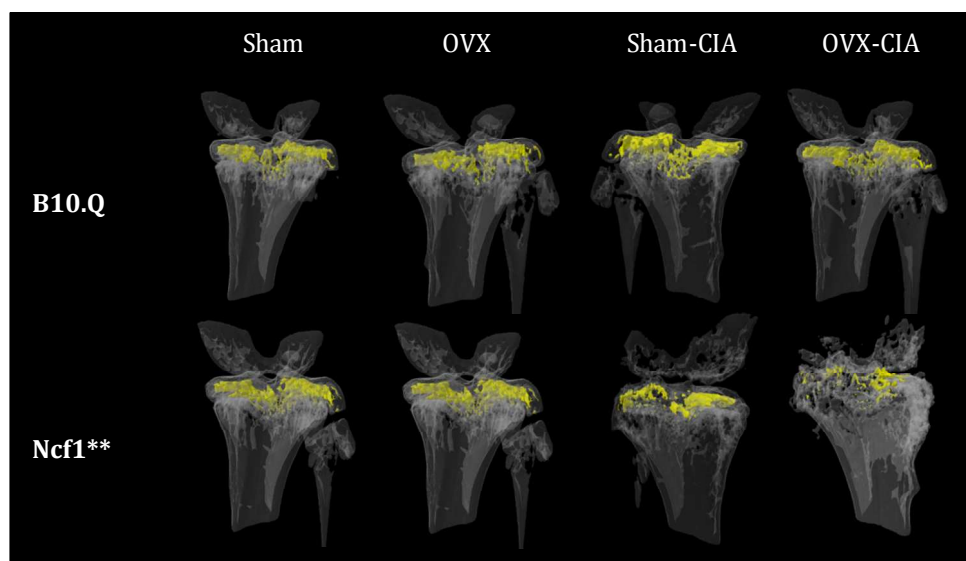
	Sham	OVX	Sham-CIA	OVX-CIA
<b>BV/TV (%)</b>	18,89 ± 0,63	17,01 ± 1,83	22,98 ± 3,11	19,52 ± 0,22
<b>BS/TV (mm<sup>-1</sup>)</b>	13,58 ± 0,33	12,45 ± 1,53	15,89 ± 1,18	14,13 ± 0,04
<b>Tb.Th (mm)</b>	58,93 ± 2,86	56,62 ± 0,73	61,88 ± 2,77	56,47 ± 0,17
<b>Tb.N (mm<sup>-1</sup>)</b>	3,21 ± 0,05	3,01 ± 0,36	3,70 ± 0,34	3,49 ± 0,01
<b>Tb.Pf (mm<sup>-1</sup>)</b>	22,63 ± 1,10	24,86 ± 1,49	20,40 ± 2,92	22,41 ± 0,21
<b>DMOv (mg/cm<sup>3</sup>)</b>	388,00 ± 1,53	332,50 ± 33,96	431,50 ± 41,95	377,70 ± 0,93

## B. Medidas realizadas en animales Ncf1\*\*.

	Sham	OVX	Sham-CIA	OVX-CIA
<b>BV/TV (%)</b>	20,28 ± 0,10	18,26 ± 1,11	9,18 ± 2,12 <sup>\$</sup>	6,16 ± 0,16 <sup>\$\$</sup>
<b>BS/TV(mm<sup>-1</sup>)</b>	14,13 ± 0,22	14,74 ± 0,60	10,42 ± 0,69 <sup>\$</sup>	7,27 ± 0,45* <sup>\$\$</sup>
<b>Tb.Th (mm)</b>	59,86 ± 0,03	50,62 ± 1,49*	40,48 ± 7,15	39,18 ± 3,46
<b>Tb.N (mm<sup>-1</sup>)</b>	3,39 ± 0,02	3,61 ± 0,12	2,24 ± 0,18 <sup>\$</sup>	1,59 ± 0,10* <sup>\$\$</sup>
<b>Tb.Pf (mm<sup>-1</sup>)</b>	20,87 ± 0,33	25,01 ± 1,82	49,60 ± 11,87	50,47 ± 3,16 <sup>\$\$</sup>
<b>DMOv (mg/cm<sup>3</sup>)</b>	390,7 ± 4,6	369,5 ± 9,94	269,8 ± 17,87 <sup>\$</sup>	202,5 ± 5,51* <sup>\$\$</sup>

Sham: animales sanos con operación simulada; OVX: animales ovariectomizados; Sham-CIA: animales artríticos con operación simulada; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados. Resultados expresados como media ± S.E.M, n=2. \* $P < 0.05$  OVX y OVX-CIA con respecto al grupo Sham y Sham-CIA, respectivamente.  $^{\$}P < 0.05$  y  $^{$$}P < 0.01$  Sham-CIA y OVX-CIA con respecto al grupo Sham y OVX, respectivamente. ANOVA (una vía) seguido del test de Bonferroni.

**Figura 50.** Imágenes representativas de la estructura trabecular de la tibia.



## 2.2. Resultados *in vitro*

Para poder estudiar si la modificación de Ncf1 afecta a distintas células del proceso inmune en la artritis postmenopáusica, se llevaron a cabo una serie de experimentos *in vitro*. En estos experimentos se emplearon células procedentes del bazo o de la sangre de animales OVX y Sham que fueron sacrificados 10 días después de la primera inmunización con colágeno.



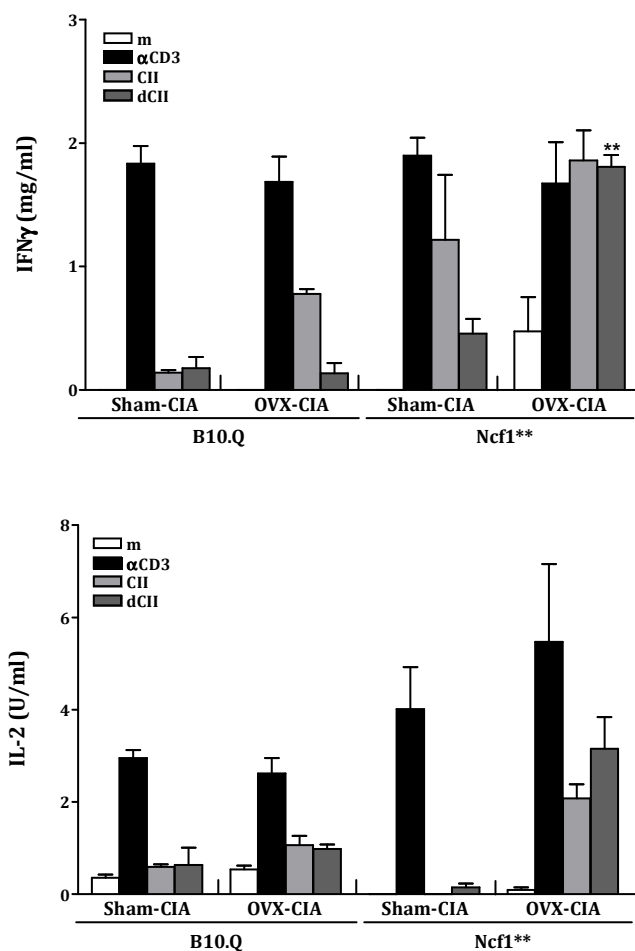
### **2.2.1. Estudio de células T**

Para realizar el estudio de células T, se emplearon células del bazo de los animales. Como marcadores de la proliferación de células T se estudiaron los niveles de IFN $\gamma$  e IL-2.

En la figura 51 se observa que el estímulo de las células con colágeno provocó un aumento de la liberación de IFN $\gamma$  aunque no se observaron diferencias significativas entre los animales OVX-CIA y los Sham-CIA. Sin embargo, el estímulo con dCII provocó un aumento de la liberación de esta citocina, siendo significativamente mayor en los animales Ncf1\*\* OVX-CIA que en los Sham-CIA.

Sobre la liberación de IL-2, se observaron cambios similares a los de la liberación de IFN $\gamma$  pero en este caso no se obtuvieron diferencias significativas.

Figura 51. Proliferación de células T.



Sham-CIA: animales artríticos con operación simulada; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados; B10.Q: ratones *wild type*; Ncf1\*\*: ratones con el gen Ncf1 modificado. m: medio;  $\alpha$ CD3: anticuerpo anti-CD3; CII: colágeno II; dCII: colágeno II desnaturalizado. Resultados expresados como media  $\pm$  S.E.M, n=3. \*\* $P$ <0.01 con respecto al correspondiente control Sham-CIA. ANOVA (una vía) seguido del test de Bonferroni.

### 2.2.2. Estudio de células B

Las células B estudiadas en estos experimentos fueron extraídas del bazo de los animales 10 días después de la primera inmunización con colágeno.

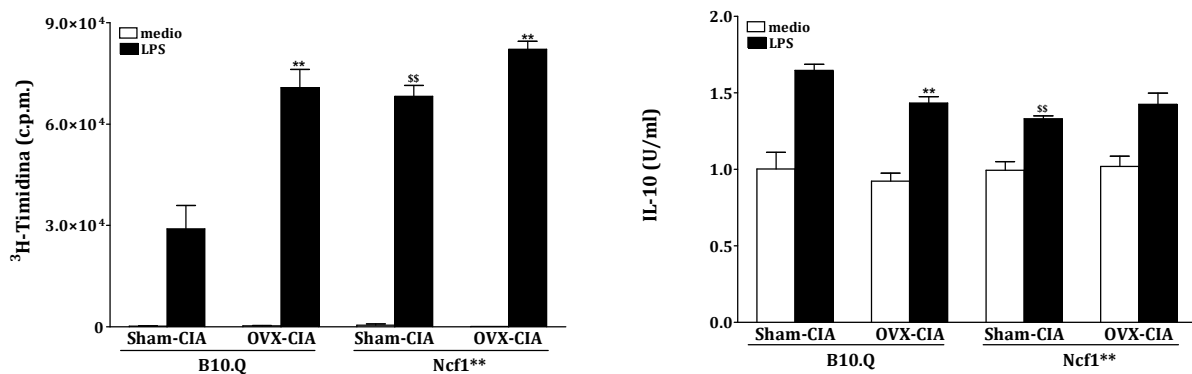
Para el estudio de la proliferación celular, tras el estímulo con LPS, se estudió la incorporación de H<sup>3</sup>-Timidina y la liberación de IL-10.

Como se observa en la figura 52, las células de todos los animales OVX-CIA presentaban aumentada de manera significativa su proliferación en comparación

con los Sham-CIA. Curiosamente, las células B de los animales Ncf1\*\* Sham-CIA presentaban una mayor proliferación que las de los B10.Q pero, sin embargo, entre los OVX-CIA de ambas cepas no se observaron diferencias.

Al medir la IL-10 en el sobrenadante de las células, se observó que la OVX disminuyó la liberación de esta citocina en los animales B10.Q en comparación con su control Sham. Aunque no se observaron diferencias entre los Sham-CIA y OVX-CIA de los Ncf1\*\*, se observó que los Ncf1\*\* Sham-CIA presentaban una disminución significativa de los niveles de IL-10 en comparación con los B10.Q Sham-CIA.

Figura 52. Proliferación de células B.



Sham-CIA: animales artríticos con operación simulada; OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados; B10.Q: ratones *wild type*; Ncf1\*\*: ratones con el gen Ncf1 modificado. Resultados expresados como media  $\pm$  S.E.M, n=3. \*\* $P$ <0.01 OVX-CIA con respecto a Sham-CIA. \$\$ $P$ <0.01 con respecto al control *wild type*. ANOVA (una vía) seguido del test de Bonferroni.

Además del estudio de la proliferación de las células B, se realizó un estudio para ver la activación de estas células y la presencia de MHC de clase II. Para ello, las células B se marcaron con anticuerpos antiCD19 y antiB220 para identificarlas, con el anticuerpo antiCD80 para detectar su activación y con el anti H2,IAq para detectar la presencia de MHC clase II en su superficie.

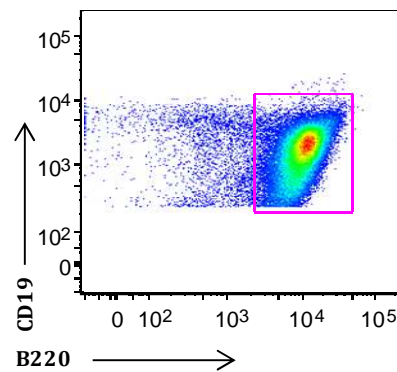
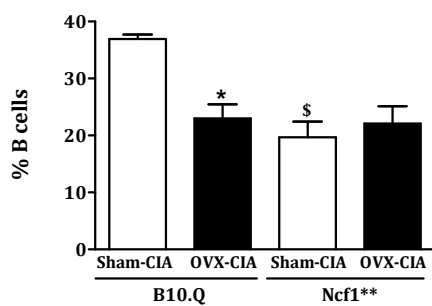
Como se observa en la figura 53.A, los animales Ncf1\*\* Sham-CIA presentaron un menor porcentaje de células B que los B10.Q Sham-CIA. La OVX de los B10.Q artríticos disminuyó significativamente el porcentaje de estas células aunque, sin

embargo, la OVX no modificó ese porcentaje en los Ncf1\*\* artríticos. Además de presentar menor porcentaje de células B, los animales B10.Q OVX-CIA presentaron un porcentaje significativamente menor de células activadas que los B10.Q Sham-CIA. En los Ncf1\*\* no se observó ninguna diferencia en cuanto al porcentaje de células activadas (figura 53.B).

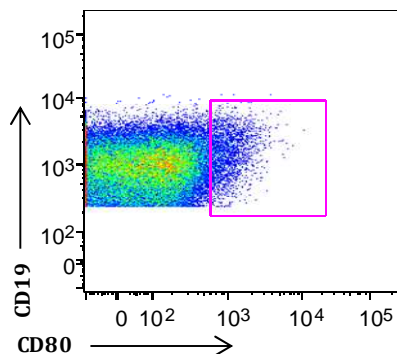
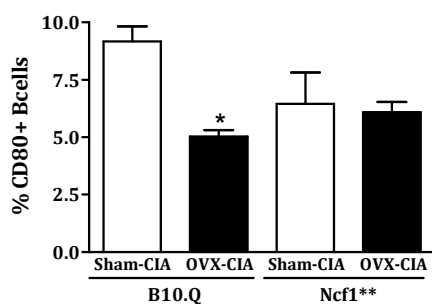
Por último, los animales OVX-CIA (B10.Q y Ncf1\*\*) presentaron una disminución significativa del porcentaje de MHC clase II en comparación con los Sham-CIA. Al igual que en el porcentaje de células B totales, los Ncf1\*\* Sham-CIA presentaron una disminución significativa en el porcentaje de MHC clase II en comparación con los B10.Q Sham-CIA (figura 53.C).

**Figura 53.** Estudio de las células B por FACS.

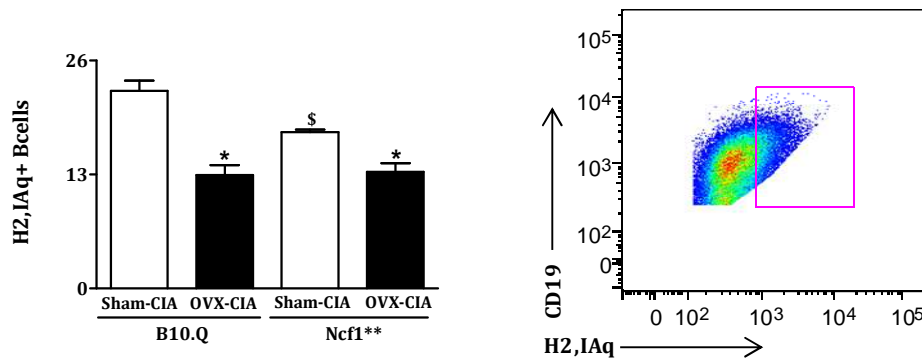
**A.** Porcentaje de células B.



**B.** Porcentaje de células B activadas.



## C. Expresión de MHC en células B.



Sham-CIA: animales artríticos con operación simulada; OVX: animales artríticos ovariectomizados; B10.Q: ratones *wild type*; Ncf1\*\*: ratones con el gen Ncf1 modificado. Resultados expresados como media  $\pm$  S.E.M, n=8-10. \* $P < 0.05$  con respecto al correspondiente control Sham.  $^{\$}P < 0.05$  con respecto al control *wild type*. ANOVA (una vía) seguido del test de Bonferroni.

### 2.2.3. Estudio del estrés oxidativo

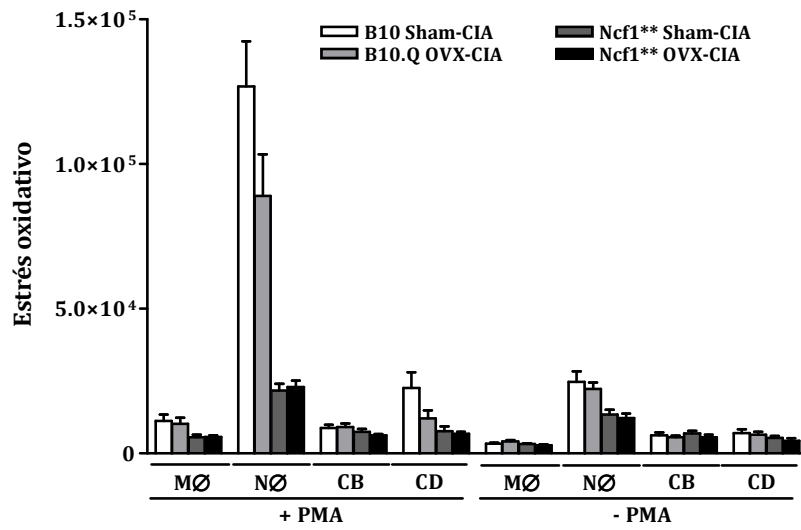
La capacidad oxidativa de los macrófagos, neutrófilos, células B y células dendríticas presentes en la sangre se estudió por detección de la generación de 123-Rodamina. Este ensayo se realizó en los días 0, 28 y 63 después de la primera inmunización con el colágeno (figura 54).

En los tres días estudiados, se observó un incremento de la generación de ROS por los neutrófilos de animales B10.Q. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los animales OVX-CIA y los Sham-CIA. Las células dendríticas y los macrófagos de los animales B10.Q OVX-CIA presentaron una disminución significativa en la generación de ROS a días 28 y 63, respectivamente.

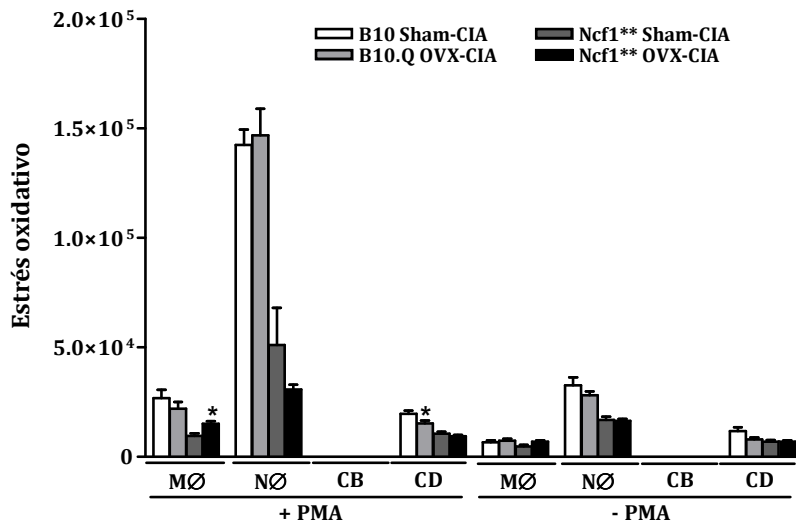
Curiosamente, los animales Ncf1\*\* OVX-CIA presentaron un aumento en la generación de ROS por los macrófagos a día 28 en comparación con los Sham-CIA.

Figura 54. Generación de 123-Rodamina.

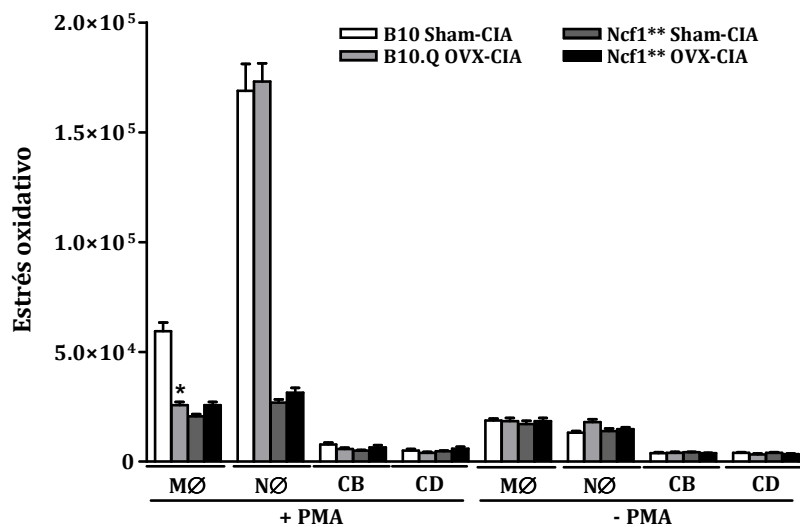
A. Día 0.



B. Día 28.



C. Día 63.



B10.Q Sham-CIA: animales artríticos *wild type* con operación simulada; B10.Q OVX-CIA: animales artríticos ovariectomizados *wild type*; Ncf1\*\* Sham-CIA: ratones artríticos con operación simulada con el gen Ncf1; Ncf1\*\* OVX-CIA: ratones artríticos ovariectomizados con el gen Ncf1. Mφ: macrófagos; Nφ: neutrófilos; CB: células B; CD: células dendríticas. Resultados expresados como media  $\pm$  S.E.M, n=8. \*P<0.05 con respecto al correspondiente Sham-CIA. Mann-Whitney *U* test.

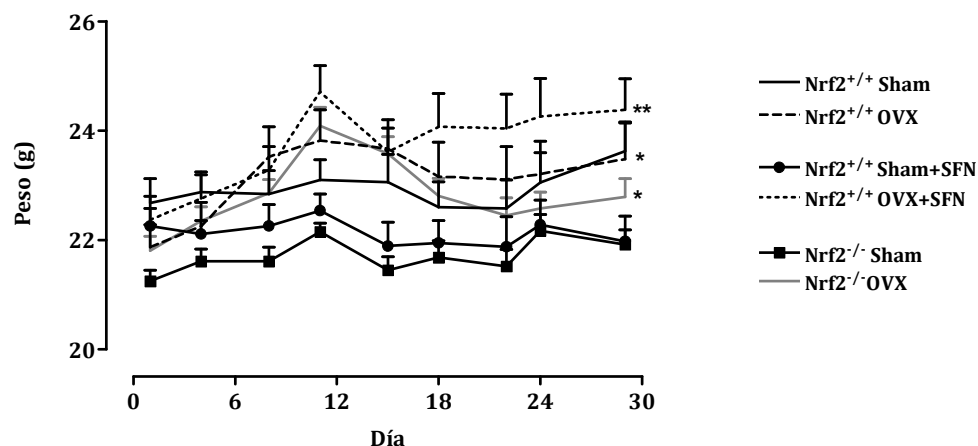
### 3. RESULTADOS DEL MODELO DE OVARIECTOMÍA EN RATONES *Nrf2*<sup>-/-</sup>

Nuestro grupo de investigación ha demostrado recientemente que la deficiencia en el factor de transcripción *Nrf2* acelera la fase efectora de la artritis en el modelo animal de transferencia de suero K/BxN. En la presente Tesis hemos estudiado el efecto de la deficiencia de este factor, así como de su estímulo por la administración de sulforafano (SFN), en animales ovariectomizados. Para ello hemos utilizado ratones C57Black-6 *knock-out* en el factor de transcripción *Nrf2* (*Nrf2*<sup>-/-</sup>) y los correspondientes *wild type* C57Black-6 *Nrf2*<sup>+/+</sup> (WT) con o sin sulforafano (SFN, 50 mg/kg/día i.p. durante 29 días). Estos grupos de ratones se dividieron en dos subgrupos dependiendo en si habían sido ovariectomizados (OVX) o habían sufrido la operación simulada (Sham).

### 3.1. Peso de los animales

Lo primero que hemos observado ha sido que los animales ovariectomizados *Nrf2*<sup>-/-</sup> y WT, con o sin SFN, han presentado un aumento significativo de peso a lo largo del experimento (figura 55).

Figura 55. Evolución del peso de los animales.



*Nrf2*<sup>-/-</sup>: ratones C57Black-6 *knock-out* en el factor de transcripción *Nrf2*; *Nrf2*<sup>+/+</sup>: ratones C57Black-6; Sham: animales con la operación simulada; OVX: animales ovariectomizados; SFN: ratones C57Black-6 con sulforafano (50 mg/kg/día, i.p.). Resultados expresados como media  $\pm$  S.E.M, n=10. \* $P$ <0.05; \*\* $P$ <0.01 comparando el peso a día 0 con el peso a día 30. ANOVA (dos vías) seguido del test de Bonferroni.

### 3.2. Marcadores del remodelado óseo en suero

Para realizar las medidas de distintos marcadores del remodelado óseo, se extrajo suero a los animales en los días 15 y 30 del experimento. Los marcadores del remodelado óseo estudiados fueron marcadores de osteoblastos (ALP y osteocalcina) y de osteoclastos (TRAP-5b), así como también se estudió el ratio RANKL/OPG.

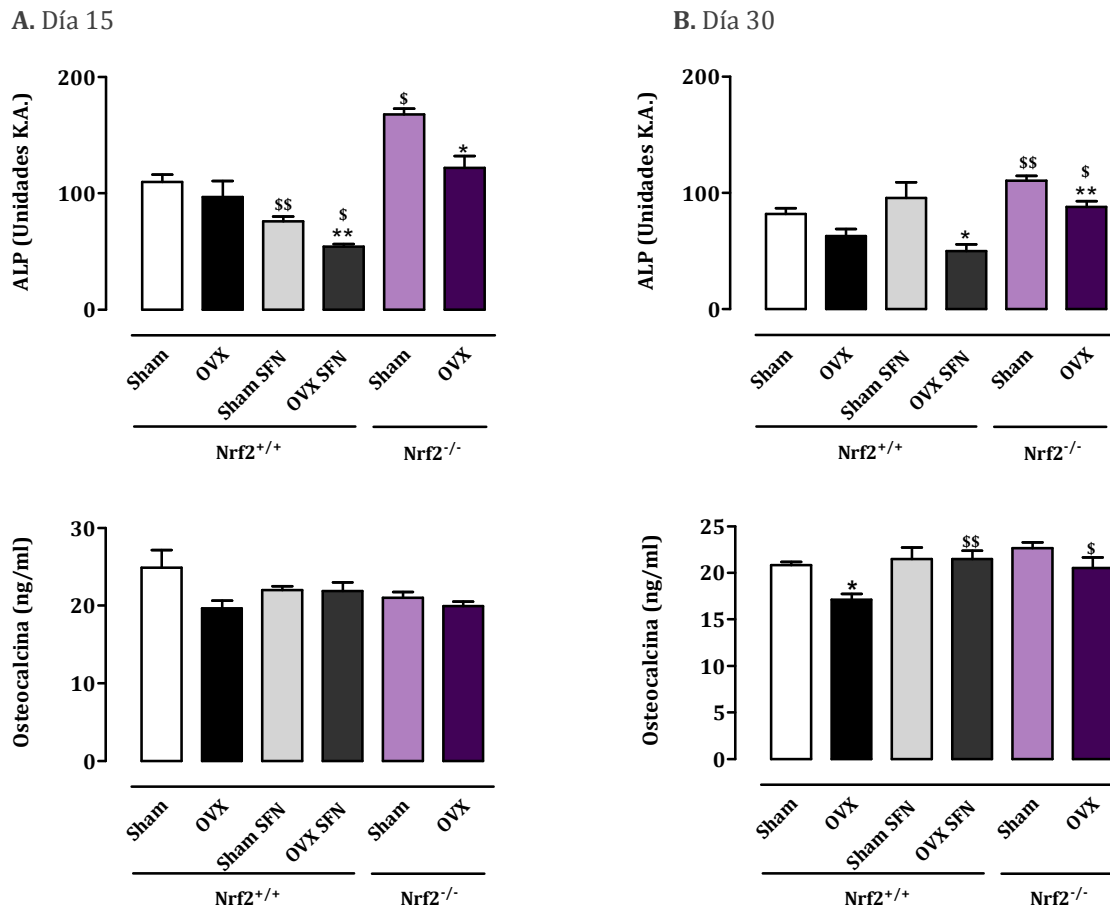
A día 15, la ovariectomía no modificó los niveles de ALP en los animales WT. Sin embargo, el tratamiento de los animales WT con SFN disminuyó significativamente los niveles de este marcador en comparación con los WT. Por el contrario, la ausencia de *Nrf2* en los animales Sham provocó un aumento significativo de este marcador en comparación con los WT Sham. Tanto en los animales *knock-out* como



en los animales WT tratados con SFN, la ovariectomía disminuyó significativamente los niveles de ALP en comparación con los correspondientes Sham (figura 56.A). Además, también se observó a día 30 un aumento de los niveles de ALP por la ausencia de Nrf2 y su disminución por la ovariectomía en animales WT tratados con SFN y en animales Nrf2<sup>-/-</sup> (figura 56.B).

Los niveles de osteocalcina no se vieron afectados en el día 15 por ninguna de las condiciones estudiadas. Sin embargo, a día 30 la OVX disminuyó los niveles de este mediador en los animales WT en comparación con los Sham, mientras que en los animales Nrf2<sup>-/-</sup> no se observó este efecto. Además, tanto la administración de SFN como la ausencia de Nrf2 en los animales OVX impidieron esa reducción al observarse un aumento significativo de osteocalcina en esos animales en comparación con los WT OVX (figura 56.B).

**Figura 56.** Niveles séricos de marcadores de osteoblastos a días 15 y 30.

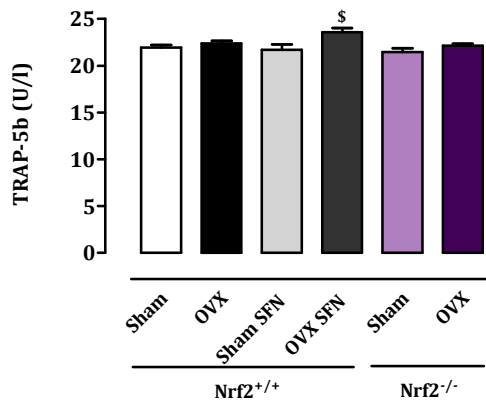


Nrf2<sup>-/-</sup>: ratones C57Black-6 *knock-out* en el factor de transcripción Nrf2; Nrf2<sup>+/+</sup>: ratones C57Black-6; Sham: animales con la operación simulada; OVX: animales ovariectomizados; SFN: ratones C57Black-6 con sulforafano (50 mg/kg/día, i.p.). Resultados expresados como media ± S.E.M, n=10. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$  con respecto al correspondiente Sham.  $^{\$}P < 0.05$ ;  $^{\$\$}P < 0.01$  con respecto al correspondiente control WT. ANOVA (una vía) seguido del test de Bonferroni.

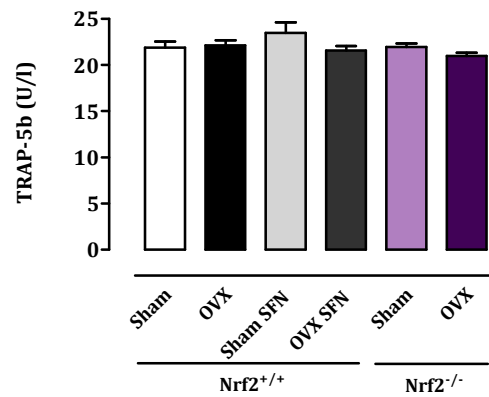
Como marcador de la actividad de los osteoclastos se estudió TRAP-5b. Los niveles de este marcador en el suero de los animales únicamente se vieron aumentados significativamente a día 15 en animales OVX tratados con SFN en comparación con los animales WT OVX (figura 57).

**Figura 57.** Niveles séricos de TRAP-5b.

A. Día 15.



B. Día 30.

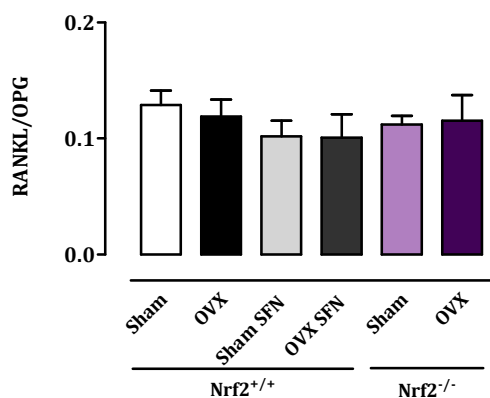


Nrf2<sup>-/-</sup>: ratones C57Black-6 *knock-out* en el factor de transcripción Nrf2; Nrf2<sup>+/+</sup>: ratones C57Black-6; Sham: animales con la operación simulada; OVX: animales ovariectomizados; SFN: ratones C57Black-6 con sulforafano (50 mg/kg/día, i.p.). Resultados expresados como media  $\pm$  S.E.M, n=10. <sup>s</sup>P<0.05 con respecto al correspondiente control WT. ANOVA (una vía) seguido del test de Bonferroni.

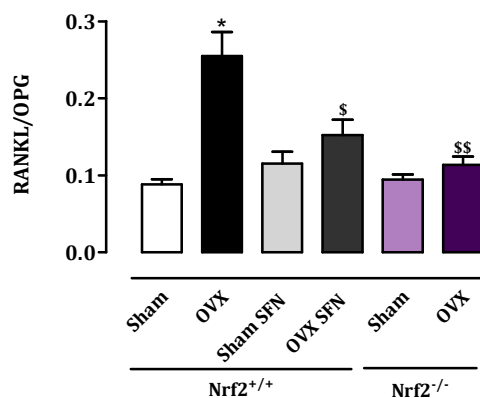
Al estudiar el ratio RANKL/OPG no se observó ningún cambio en el día 15 del experimento (figura 58.A). Sin embargo a día 30, la ovariectomía de los animales WT incrementó significativamente este ratio. Además, el tratamiento con SFN o la ausencia del factor de transcripción Nrf2 en los animales OVX inhibió ese aumento observándose diferencias significativas entre estos animales y los WT OVX (figura 58.B).

Figura 58. Ratio RANKL/OPG.

A. Día 15.



B. Día 30.



Nrf2<sup>-/-</sup>: ratones C57Black-6 *knock-out* en el factor de transcripción Nrf2; Nrf2<sup>+/+</sup>: ratones C57Black-6; Sham: animales con la operación simulada; OVX: animales ovariectomizados; SFN: ratones C57Black-6 con sulforafano (50 mg/kg/día, i.p.). Resultados expresados como media  $\pm$  S.E.M, n=10. \* $P$ <0.05 con respecto al correspondiente Sham. \$ $P$ <0.05; \$\$ $P$ <0.01 con respecto al correspondiente control WT. ANOVA (una vía) seguido del test de Bonferroni.

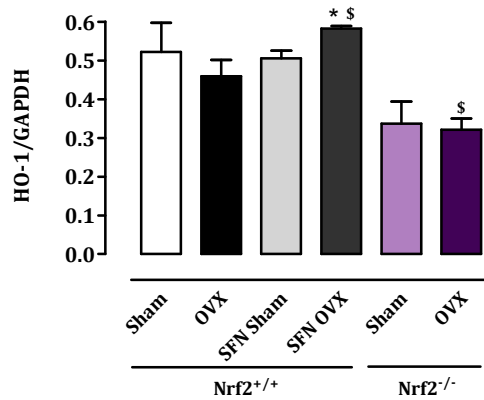
### 3.3. Expresión proteica de HO-1 en homogeneizado de pata

Además del estudio en suero de los mediadores anteriormente nombrados, se realizó la medida de la expresión proteica de la HO-1 por *western blot* (figura 59).

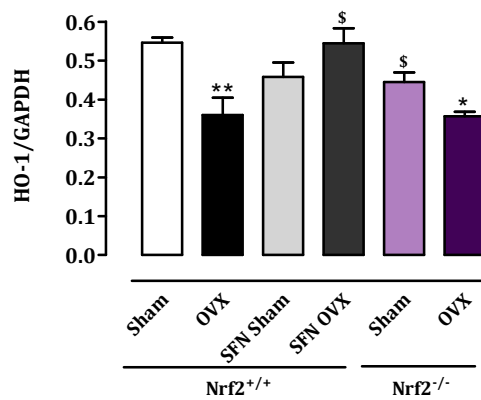
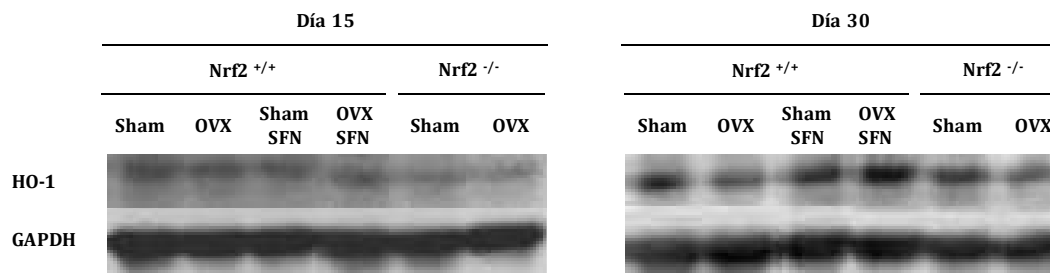
En el día 15 se observa que la administración de SFN a los animales OVX incrementó significativamente la expresión de HO-1 en comparación con los WT OVX. Además, en los animales tratados con SFN se observa que el déficit de estrógenos aumentó la expresión de esta enzima. A este tiempo, los animales Nrf2<sup>-/-</sup> OVX presentaron una disminución significativa de la expresión de HO-1 en comparación con los WT OVX. A día 30, la OVX redujo significativamente la expresión de HO-1 tanto en animales WT como en los Nrf2<sup>-/-</sup>. La administración de SFN a los animales OVX impidió esta disminución al observarse diferencias significativas entre los WT y los tratados con SFN. El déficit de Nrf2 en los animales Sham disminuyó significativamente la expresión de HO-1 en comparación con los WT Sham.

**Figura 59.** Expresión proteica de HO-1 en homogeneizado de pata.

A. Día 15.



B. Día 30.

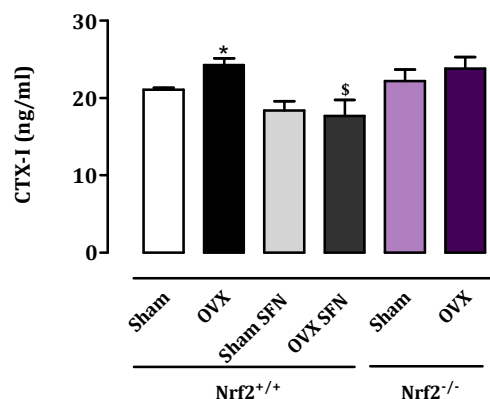
C. Imagen de *Western Blot*.

A y B, Expresión relativa de HO-1 y GAPDH en los homogeneizados de rodilla a días 15 y 30, respectivamente. C. Imagen representativa de *western blot*. Nrf2<sup>-/-</sup>: ratones C57Black-6 *knock-out* en el factor de transcripción Nrf2; Nrf2<sup>+/+</sup>: ratones C57Black-6; Sham: animales con la operación simulada; OVX: animales ovariectomizados; SFN: ratones C57Black-6 con sulforafano (50 mg/kg/día, i.p.). Resultados expresados como media  $\pm$  S.E.M, n=2. \*\* $P$ <0.01 con respecto al correspondiente Sham. \$ $P$ <0.05 con respecto al correspondiente control WT. ANOVA (una vía) seguido del test de Bonferroni.

### 3.4. Medida del CTX-I en suero

Tras observar que los niveles de RANKL/OPG estaban modificados únicamente a día 30 y que la expresión de HO-1 mostró mayores diferencias en este día, realizamos la medida de los niveles séricos del marcador de actividad de osteoclastos CTX-I a ese tiempo.

A día 30, los niveles de CTX-I aumentaron por la ovariectomía en los animales *wild type*. El tratamiento de estos animales con SFN disminuyó los niveles de este marcador en animales OVX pero no en los Sham (figura 60).

**Figura 60.** Niveles séricos de CTX-I en el día 30.

Nrf2<sup>-/-</sup>: ratones C57Black-6 *knock-out* en el factor de transcripción Nrf2; Nrf2<sup>+/+</sup>: ratones C57Black-6; Sham: animales con la operación simulada; OVX: animales ovariectomizados; SFN: ratones C57Black-6 con sulforafano (50 mg/kg/día, i.p.). Resultados expresados como media  $\pm$  S.E.M, n=10. \* $P < 0.05$  con respecto al correspondiente Sham. \$ $P < 0.05$  con respecto al correspondiente control WT. ANOVA (una vía) seguido del test de Bonferroni.

### 3.5. Efectos en la estructura trabecular y cortical del hueso

Tras el estudio de los distintos marcadores, y al observar un mayor efecto en el día 30, realizamos el estudio de la estructura trabecular y cortical ósea del fémur a éste tiempo mediante el empleo de  $\mu$ -CT.

A día 30, la OVX provocó la pérdida de hueso cortical al disminuir el grosor cortical (Ct.Th) y el grosor de la sección transversal (Cs.Th) en animales WT. La administración de SFN en animales Sham disminuyó Cs.Th en comparación con los WT Sham, mientras que en los animales ovariectomizados provocó una reducción de la superficie específica ósea (BS/TV) y del número de trabéculas (Tb.N) e incrementó la separación trabecular (Tb.Sp) en comparación con los WT OVX. Esto indica que la administración de SFN induce la pérdida de la estructura cortical ósea en los animales Sham y de la estructura trabecular ósea en los animales ovariectomizados.

La ausencia del factor de transcripción Nrf2 en animales Sham disminuyó la DMO trabecular y en el hueso cortical, el área de hueso media de las secciones transversales (B.Ar), el volumen cortical (Ct.V) y el momento de inercia polar medio (MMI) en comparación con los WT Sham. La ausencia de Nrf2 en los

animales OVX incrementó Tb.Sp en comparación con los animales WT OVX. Según estos datos, la ausencia del factor de transcripción Nrf2 podría empeorar la estructura ósea (tabla 18 y figura 61).

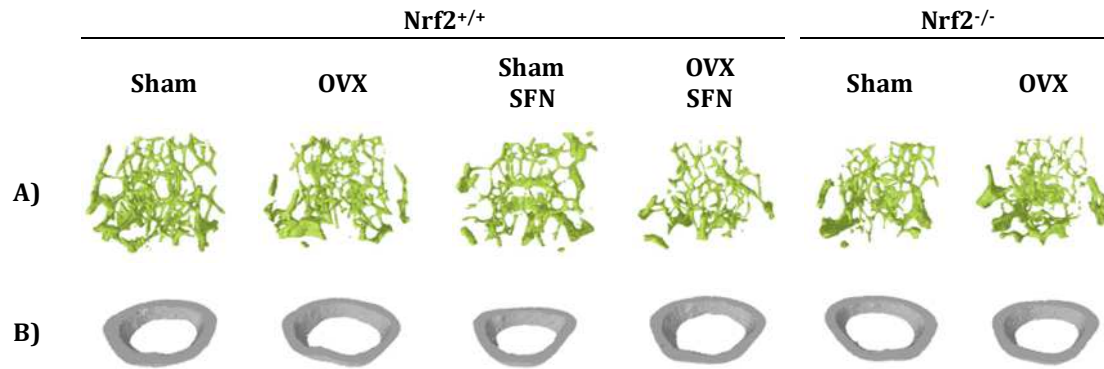
Tabla 18. Análisis de la estructura ósea del fémur a día 30.

	Nrf2 <sup>+/+</sup>				Nrf2 <sup>-/-</sup>		
	Sham	OvX	Sham SFN	OvX SFN	Sham	OvX	
<b>Trabecular</b>	BV/TV (%)	5,15 ± 1,04	8,13 ± 1,56	4,05 ± 1,02	3,39 ± 1,23	5,48 ± 0,46	
	BS/TV(mm <sup>-1</sup> )	3,65 ± 0,65	4,97 ± 0,53	2,79 ± 0,56	2,29 ± 0,49 <sup>§</sup>	3,62 ± 0,12	
	Tb.Th(mm)	60,29 ± 4,35	64,86 ± 5,03	65,71 ± 0,81	57,62 ± 4,53	58,75 ± 4,58	60,46 ± 3,06
	Tb.N(mm <sup>-1</sup> )	0,86 ± 0,17	1,23 ± 0,15	0,63 ± 0,09	0,54 ± 0,14 <sup>§</sup>	0,58 ± 0,14	0,90 ± 0,04
	Tb.Pf (mm <sup>-1</sup> )	34,92 ± 3,47	27,37 ± 4,14	36,93 ± 4,90	38,01 ± 6,70	39,13 ± 4,61	29,40 ± 1,38
	Tb.Sp (µm)	325,50 ± 21,85	307,90 ± 3,34	346,50 ± 4,51	379,40 ± 13,19 <sup>§§</sup>	361,70 ± 22,43	341,50 ± 1,22 <sup>§§</sup>
<b>Cortical</b>	DMOV (mg/cm <sup>3</sup> )	89,91 ± 13,87	79,35 ± 11,98	65,46 ± 0,98	37,58 ± 17,26	35,52 ± 11,44 <sup>§</sup>	56,42 ± 5,02
	Ct.En.Pm (mm)	4,09 ± 0,12	4,12 ± 0,08	3,84 ± 0,28	4,11 ± 0,03	3,78 ± 0,15	4,00 ± 0,23
	Ct.Th (µm)	169,80 ± 3,76	154,10 ± 0,57 <sup>*</sup>	153,00 ± 10,45	157,20 ± 7,89	158,00 ± 2,94	159,90 ± 5,01
	Cs.Th (µm)	155,50 ± 2,18	143,50 ± 2,44 <sup>*</sup>	142,60 ± 2,57 <sup>§</sup>	145,90 ± 2,93	147,60 ± 5,79	149,00 ± 5,36
	B.Ar (mm <sup>2</sup> )	0,87 ± 0,02	0,79 ± 0,04	0,78 ± 0,12	0,80 ± 0,01	0,77 ± 0,01 <sup>§§</sup>	0,80 ± 0,02
	MV (mm <sup>3</sup> )	0,63 ± 0,03	0,63 ± 0,02	0,53 ± 0,07	0,63 ± 0,00	0,54 ± 0,04	0,59 ± 0,06
<b>DMOV</b>	CtV (mm <sup>3</sup> )	0,43 ± 0,01	0,40 ± 0,02	0,39 ± 0,06	0,40 ± 0,01	0,39 ± 0,00 <sup>§</sup>	0,41 ± 0,01
	MMI (mm <sup>4</sup> )	0,50 ± 0,02	0,46 ± 0,04	0,41 ± 0,12	0,46 ± 0,01	0,39 ± 0,02 <sup>§</sup>	0,45 ± 0,04
	DMOV (mg/cm <sup>3</sup> )	1593,00 ± 5,23	1498,00 ± 6,466	1509,00 ± 57,77	1493,00 ± 29,23	1444,00 ± 4,34	1485,00 ± 10,69

Nrf2<sup>-/-</sup>: ratones C57Black-6 *knock-out* en el factor de transcripción Nrf2; Nrf2<sup>+/+</sup>: ratones C57Black-6; Sham: animales con la operación simulada; OvX: animales ovariectomizados; SFN: ratones C57Black-6 con sulforafano (50 mg/kg/día, i.p.). Resultados expresados como media ± S.E.M, n=3. \*P<0,05 con respecto al correspondiente Sham. §P<0,05 con respecto al correspondiente control WT. ANOVA (una vía) seguido del test de Bonferroni.



**Figura 61.** Imágenes representativas de la estructura trabecular y cortical del fémur.



**A**, estructura trabecular. **B**, estructura cortical. *Nrf2*<sup>-/-</sup>: ratones C57Black-6 *knock-out* en el factor de transcripción *Nrf2*; *Nrf2*<sup>+/+</sup>: ratones C57Black-6; Sham: animales con la operación simulada; OVX: animales ovariectomizados. SFN: ratones C57Black-6 con sulforafano (50 mg/kg/día, i.p.).



## Discusión

---



## **1. Modelo animal de artritis postmenopáusica. Efectos de SnPP, CORM-3 y ALN.**

En la presente Tesis se ha estudiado la influencia de la falta de estrógenos en la artritis experimental inducida por colágeno, mediante el desarrollo, por primera vez en nuestro laboratorio, del modelo animal de artritis postmenopáusica en ratones DBA-1/J. En este modelo, se realiza una ovariectomía bilateral a los ratones hembra dos semanas antes de inducirles el proceso artrítico por inyección repetida de colágeno tipo II. Para poder caracterizar bien el modelo experimental de OVX+CIA y poder analizar los cambios que eran debidos a la privación de estrógenos, trabajamos con 4 grupos de animales: animales sanos (NA) a los que no se les realizó ninguna intervención, animales ovariectomizados (OVX) a los que sólo se les realizó la ovariectomía bilateral, animales artríticos (CIA) a los que sólo se les indujo la artritis por colágeno y animales ovariectomizados artríticos (OVX-CIA) a los que se les realizó la ovariectomía y se les indujo la artritis.

Como era de esperar, los animales que habían sido sólo ovariectomizados (OVX) no mostraron signos externos de inflamación en las extremidades ni alteraciones en el análisis histológico. Sin embargo, estos animales presentaron una ligera modificación de la estructura trabecular ósea de la tibia y un aumento, a nivel articular, de la expresión de varias enzimas de la vía de los prostanoides como la COX-2, h-PGDS y l-PGDS así como de la HO-1, en comparación con los animales sanos. Además, en nuestros resultados se observó un incremento de los niveles séricos de PGD<sub>2</sub>.

La realización previa de la ovariectomía en animales con CIA aumentó la severidad de la enfermedad en todos los experimentos realizados, como se observa en la puntuación macroscópica del grupo OVX-CIA, que es significativamente mayor que la de los animales artríticos (CIA). Por otra parte, la inducción de la artritis provocó un aumento de los niveles séricos de los anticuerpos anti-CII y de COMP así como cambios histológicos en la articulación, tanto en los animales del grupo CIA como en los del grupo OVX-CIA, sin observarse cambios significativos entre ambos grupos.

En nuestros resultados observamos cambios importantes en los niveles séricos y locales de la MMP-3 por la inducción del modelo OVX-CIA. Las MMPs son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc capaces de degradar todos los componentes de la matriz extracelular y su acción está controlada por diferentes mecanismos, como la síntesis hormonal, diversas citocinas y factores del crecimiento. Una de las MMPs más características de la AR es la MMP-3 que se encuentra aumentada en el sinovio de pacientes artríticos, lo que sugiere su participación en la degradación del cartílago en esta enfermedad (Hembry y cols. 1995). Recientemente, se ha demostrado la existencia de una asociación entre los niveles séricos de MMP-3 y de todas las características del CIA incluyendo la inflamación, la destrucción del cartílago y la erosión ósea (Seeuws y cols. 2010). Diversos estudios en ratones han demostrado que el déficit de estrógenos está asociado a un incremento de la expresión de IL-6 (Jilka y cols. 1992) y de MMP-3 (Kusano y cols. 1998). En nuestros resultados se observa que la ovariectomía en animales artríticos (OVX-CIA) incrementó los niveles de MMP-3 en la articulación y en el suero en comparación con los animales OVX y con los CIA. Los niveles de IL-6 se ven aumentados, además de por el déficit de estrógenos, por el proceso inflamatorio de la artritis, contribuyendo al desarrollo de la enfermedad (Dayer y Choy 2010). Esta citocina produce un incremento de la osteoclastogénesis y de la actividad de los osteoclastos, lo que favorece la resorción ósea (Jilka y cols. 1992). En nuestros resultados, los niveles de IL-6 en suero aumentaron por la inducción del CIA, y la OVX en los animales artríticos incrementó aún más los niveles de esta citocina.

Diversas citocinas promueven la activación del NF- $\kappa$ B y la transcripción de un gran número de mediadores proinflamatorios y catabólicos. Así, la expresión de COX-2 y la producción de PGs están reguladas por citocinas que participan en la inflamación y en los mecanismos de destrucción de la articulación (Bingham 2002). Estudios en ratones deficientes en COX-2 indican que esta enzima juega un papel crítico en la resorción ósea estimulada por la 1,25-dihidroxi vitamina D<sub>3</sub> y por la hormona paratiroidea (Okada y cols. 2000). Además, la PGE<sub>2</sub> generada vía COX-2 también ejerce una serie de acciones complejas en el metabolismo del

hueso, con un importante papel en el remodelado óseo. Este prostanoides tiene actividad tanto en la formación como en la resorción ósea. La PGE<sub>2</sub> media la formación ósea *in vitro* por estimulación de la proliferación y diferenciación de osteoblastos (Hikiji y cols. 2008). De hecho, la administración de PGE<sub>2</sub> estimula la formación ósea en ratones ovariectomizados (Keila y cols. 2001). Además, el efecto de la PGE<sub>2</sub> depende de su unión a diversos receptores. Por ejemplo, la activación de EP4 induce el remodelado óseo *in vivo* (Yoshida y cols. 2002), aunque no es esencial para el mantenimiento del remodelado óseo (Gao y cols. 2009), y el antagonismo selectivo de EP1 inhibe la formación de osteoclastos inducida por RANKL (Tsujisawa y cols. 2005). Se ha confirmado que la PGE<sub>2</sub> media la formación de osteoclastos y la resorción ósea inducida por IL-1 $\beta$  e IL-6 (Hikiji y cols. 2008, Liu y cols. 2005). Además, el aumento de PGE<sub>2</sub> vía COX-2 favorece la diferenciación de osteoclastos, incrementa la liberación de RANKL e inhibe la de OPG tras el estímulo de osteoblastos con LPS (Suda y cols. 2004). Sin embargo, la administración de un inhibidor selectivo de COX-2 reduce los niveles del marcador de resorción ósea CTX-I en ratones ovariectomizados sin afectar a la estructura ósea (Kasukawa y cols. 2007). En nuestros resultados, la inducción del CIA incrementó la expresión de COX-2 en la rodilla, tanto en animales no ovariectomizados (CIA) como en ovariectomizados (OVX-CIA), sin diferencias significativas entre ambos grupos. Este aumento se correlaciona con el aumento de los niveles de PGE<sub>2</sub> en el homogeneizado de pata y puede estar relacionado con la pérdida de hueso que se observó en ambos grupos.

El papel del prostanoides PGD<sub>2</sub> en el proceso inflamatorio y en el proceso de remodelado óseo es bastante complejo. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha demostrado el papel antiinflamatorio que ejerce el prostanoides PGD<sub>2</sub> en el CIA, vía receptor DP1 (Maicas y cols. 2012). Sin embargo, cuando este prostanoides se une a su receptor CRTH2 induce la quimiotaxis y la producción de citocinas proinflamatorias Th2 e inhibe la apoptosis de las células T (Hirai y cols. 2001, Xue y cols. 2009). Por otro lado, su papel en el metabolismo óseo es poco conocido. Gallant y colaboradores han observado una correlación positiva entre los niveles urinarios del metabolito de la PGD<sub>2</sub> 11epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  y los niveles de fosfatasa

alcalina en pacientes con fracturas en fase de recuperación, sugiriendo un papel regulador de la PGD<sub>2</sub> en la reparación del tejido óseo fracturado y en el control del anabolismo (Gallant y cols. 2010). En un experimento con ratas ovariectomizadas, la administración de PGD<sub>2</sub> previene la osteopenia y aumenta la densidad mineral ósea femoral (Takagi y cols. 1993). Además, la estimulación de osteoblastos con citocinas proinflamatorias aumenta la producción de PGD<sub>2</sub> que, al unirse a su receptor DP2, inhibe el RANKL y estimula la quimiotaxis de osteoblastos pero sin embargo, al unirse al receptor DP1, disminuye la producción de OPG ejerciendo así efectos negativos sobre el remodelado óseo (Gallant y cols. 2005). En otros estudios *in vitro* en células mononucleares de sangre periférica se ha observado que este prostanoides, vía DP1 y DP2, ejerce efectos inhibitorios de la osteoclastogénesis (Durand y cols. 2008). En nuestros resultados se ha observado el aumento de los niveles séricos de PGD<sub>2</sub> en los grupos OVX, CIA y OVX-CIA, siendo más relevante la influencia de la inducción de la artritis que de la ovariectomía. Sin embargo, a nivel articular únicamente se observó el aumento de los niveles de este prostanoides en el grupo OVX-CIA. Curiosamente, la expresión de h-PGDS y l-PGDS a nivel articular en el grupo OVX-CIA fue significativamente menor que en el grupo OVX. Estos datos nos confirman la participación del prostanoides PGD<sub>2</sub> en el remodelado óseo y su regulación tanto por el proceso inflamatorio como por el déficit de estrógenos.

Además del aumento de la expresión de las proteínas COX-2 y PGDS, la ovariectomía aumentó la expresión de HO-1. Al igual que se observó con la PGDS, la inducción del CIA en animales ovariectomizados provocó la disminución de la expresión de HO-1. Varios son los estudios que sugieren el papel antiinflamatorio y protector frente a la pérdida de hueso de la HO-1. Zwerina y cols demostraron que esta enzima es capaz de inhibir la osteoclastogénesis y que además, los niveles de bilirrubina (metabolito de la vía HO-1) están directamente relacionados con la disminución de la erosión ósea (Zwerina y cols. 2005b). Sobre los osteoblastos, la inducción de esta enzima por diversas vías es capaz de favorecer la proliferación y diferenciación de estas células a partir de células madre mesenquimales (Barbagallo y cols. 2010, Vanella y cols. 2010) y el CO generado por la HO-1 es



capaz de inhibir su apoptosis (Chae y cols. 2006). En nuestros resultados, se observa que los animales OVX-CIA, que presentan menor expresión de HO-1, tienen una mayor pérdida de la estructura ósea. En cuanto al proceso artrítico, la inducción de la HO-1 o la administración de CORM-3 disminuye la producción de TNF $\alpha$  e IL-2, la expresión de COX-2 y la liberación de PGE $_2$  en el modelo de CIA en ratón (Devesa y cols. 2005b, Ferrandiz y cols. 2008). Además, la sobreexpresión de esta enzima en sinoviocitos artríticos disminuye los niveles de TNF $\alpha$  e IL-6, así como la expresión de COX-2 (Kobayashi y cols. 2006). En nuestros resultados, se observa una menor expresión de HO-1 a nivel articular y un aumento de la expresión de COX-2 y de los niveles de PGE $_2$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-6 en los animales OVX-CIA respecto a los NA.

Además de la puesta a punto y de la caracterización del modelo animal de OVX+CIA en ratones DBA-1/J, realizamos el estudio del efecto del estaño-protoporfirina IX (SnPP) y del CORM-3 y del alendronato en este modelo.

#### **- Efectos del SnPP**

SnPP es un inhibidor competitivo de la actividad de la hemo oxigenasa (Yoshinaga y cols. 1982). Su administración en el modelo animal de artritis inducida por adjuvante en rata y en el modelo de CIA disminuyó los signos clínicos de la enfermedad, así como la destrucción del cartílago (Devesa y cols. 2005a, Devesa y cols. 2005b). En el modelo de artritis postmenopáusica utilizado en la presente Tesis, la administración de SnPP después del comienzo de la enfermedad protegió frente a la pérdida de peso y disminuyó la progresión y la severidad de la misma. Sin embargo, no disminuyó la infiltración celular en la articulación ni modificó los niveles séricos de anticuerpos anti-colágeno II. En los resultados también observamos que el SnPP tuvo efectos protectores sobre el cartílago ya que su administración disminuyó la degradación del mismo y los niveles séricos de COMP.

En nuestro modelo experimental hemos corroborado la actividad antiinflamatoria de SnPP. En diversos modelos de artritis reumatoide y osteoartritis, la administración de esta molécula disminuyó los niveles de los mediadores

proinflamatorios TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y PGE<sub>2</sub>, además de disminuir la degradación de las articulaciones (Braza-Boils y cols. 2011, Devesa y cols. 2005b). En nuestros resultados, hemos observado que SnPP disminuyó los niveles de IL-6 y MMP-3 en suero y de MMP-3, TNF $\alpha$  y PGE<sub>2</sub> en la articulación. Además, a nivel articular se observó una disminución de la pérdida de hueso, que podría estar relacionada con la disminución de los mediadores inflamatorios IL-6, MMP-3, TNF $\alpha$  y PGE<sub>2</sub>. Aunque SnPP inhibió la pérdida de hueso a nivel articular, su administración no modificó los niveles séricos de los marcadores del remodelado óseo ni controló los cambios en el metabolismo óseo, al no observarse diferencias significativas en la estructura trabecular de las tibias de los animales. Así pues, nuestros resultados sugieren que la pérdida de hueso local y sistémica pueden ser independientes en este modelo experimental y que la reducción de la respuesta inflamatoria no es suficiente para controlar el metabolismo óseo sistémico.

Además del estudio de los distintos mediadores en suero y homogenizado y del estudio de la estructura trabecular ósea, se realizó el estudio de la expresión de diversas enzimas relacionadas con el proceso inflamatorio y metabólico del hueso en secciones frontales de la articulación de la rodilla. En los resultados obtenidos se ha observado que SnPP disminuyó la expresión de COX-2, lo que se tradujo en menores niveles de PGE<sub>2</sub> en la articulación de la rodilla. Esta protoporfirina también redujo la expresión de h-PGDS, traduciéndose en una inhibición del aumento de los niveles de PGD<sub>2</sub> en suero y en la articulación. Por último, se ha observado que el tratamiento con SnPP indujo la expresión de HO-1 en el tejido articular. Aunque esta molécula es un inhibidor de la actividad de esta enzima, otros mecanismos no específicos pueden estar relacionados en los efectos biológicos de esta clase de moléculas (Grundemar y Ny 1997) y hay evidencias experimentales que sugieren que el efecto protector de esta protoporfirina podría estar relacionado con la inducción de la HO-1 (Kaizu y cols. 2003). Las modificaciones de la expresión de estas enzimas así como de los niveles de los prostanoideos PGE<sub>2</sub> y PGD<sub>2</sub> podrían estar relacionadas con los efectos antiinflamatorios e inhibitorios de la pérdida de hueso en la articulación observados en el tratamiento con SnPP.

### - Efectos del CORM-3 y del ALN

En la segunda serie de experimentos realizados en la presente Tesis, estudiamos el efecto del CORM-3 y del alendronato en el modelo animal de artritis postmenopáusica a días 36 y 50.

El CORM-3 es una molécula dadora de grupos CO que ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de la artritis. En diferentes modelos animales de artritis, la administración de CORM-3 redujo la severidad de la enfermedad, lo que se correlacionó con la disminución del infiltrado y del exudado celular en las articulaciones artríticas (Ferrandiz y cols. 2008, Maicas y cols. 2010). Por ello, creímos de interés analizar la posible actividad de este dador de CO en el modelo de artritis postmenopáusica. En nuestro modelo experimental, la administración de CORM-3 disminuyó la severidad de la artritis y el exudado sinovial de las rodillas, sin afectar a los niveles de anticuerpos anti-CII.

El alendronato es un bifosfonato de segunda generación con una potente acción inhibitoria de la resorción ósea. Aunque esta molécula es conocida por su efecto sobre el metabolismo óseo, se han realizado algunos estudios para comprobar su efecto sobre el proceso inflamatorio. Así pues, se ha demostrado que la administración de ALN incrementa la liberación de IL-1 $\beta$  en macrófagos RAW 264 tras el estímulo con LPS (Makkonen y cols. 1999) y la síntesis de histamina en ratones (Nakamura y cols. 1996), lo que podría ser dependiente de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  (Deng y cols. 2007). En un estudio en humanos, se observó una respuesta aguda con aumento de la proteína C reactiva y con estados febriles tras la administración de ALN en pacientes que nunca antes lo habían tomado (Adami y cols. 1987). Además, durante el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusica con ALN se ha observado un incremento transitorio de los niveles de TNF $\alpha$  (D'Amelio y cols. 2010). En nuestros resultados el ALN, aunque no fue capaz de reducir los signos externos de la artritis (puntuación macroscópica), inhibió la producción de exudado sinovial en la rodilla y, curiosamente, aumentó los niveles séricos de IgG anti-CII. Además, la administración de este fármaco disminuyó los niveles séricos

de IL-6 y MMP-3. Estas modificaciones sugieren un incremento de la respuesta inmune y un ligero efecto antiinflamatorio tras la administración de ALN.

La expresión de MMPs en el pannus está inducida por varias citocinas proinflamatorias y el aumento de estas enzimas es el responsable, en parte, de la degradación del cartílago y del hueso. En particular y como se ha comentado anteriormente, MMP-3 es un marcador de la inflamación sinovial que, junto con otras MMPs, destruye todas las proteínas estructurales de la articulación (Okada y cols. 1987, Ribbens y cols. 2002). De hecho, los niveles séricos de MMP-3 al comienzo de la artritis reumatoide sirven para predecir la progresión del daño articular (Mamehara y cols. 2010). En nuestros resultados se observa que el tratamiento con CORM-3 y con ALN disminuye los niveles séricos y articulares de MMP-3. Además del aumento de MMPs, la inflamación sinovial también provoca el incremento de los niveles de COMP en el suero, reflejando el daño articular en la fase temprana de la AR, y mostrando una correlación positiva entre los niveles séricos de MMP-3, COMP y erosión ósea (Fujikawa y cols. 2009). En la presente Tesis hemos demostrado que el CORM-3 disminuye la erosión del cartílago a ambos tiempos y los niveles de COMP a día 36. Además, nuestros datos confirman observaciones previas en mujeres postmenopáusicas (Lehmann y cols. 2002), así como en modelos animales de osteoartritis (Shirai y cols. 2011), sugiriendo un efecto protector del ALN sobre el cartílago, probablemente relacionado con la reducción de los niveles de MMP-3.

Los bifosfonatos son moléculas efectivas en la supresión de la actividad osteoclástica y de la resorción ósea. Sin embargo, en la AR los amino bifosfonatos no han mostrado eficacia en el control de la progresión de la erosión ósea periarticular adyacente a la zona inflamada aunque sí que inhiben la erosión ósea y la osteoporosis sistémica (Ralston y cols. 1989). El escaso efecto de los bifosfonatos sobre la erosión ósea puede deberse a que, tras su administración, se han observado niveles elevados de TNF $\alpha$  a nivel local, los cuales inducen la expresión de Ets-2 y de Bcl-xl en los osteoclastos, protegiéndolos así de la apoptosis inducida por estas moléculas (Zhang Q. y cols. 2005). Nuestros resultados indican que el ALN disminuyó la erosión ósea de la articulación y los

niveles de TNF $\alpha$  después del tratamiento en el día 36, pero no mantuvo este efecto en el día 50. Por el contrario, la erosión ósea de la rodilla fue reducida por el CORM-3 en el día 50 del tratamiento. Estos resultados coinciden con la reducción de la superficie de osteoclastos y de los niveles de TNF $\alpha$  sérico y articular que provoca la administración de esta molécula.

El déficit de estrógenos provoca un aumento de citocinas proinflamatorias que puede incrementar la osteoclastogénesis (Kitazawa y cols. 1994). La pérdida de hueso después de la OVX ha estado relacionada con el incremento de la liberación de TNF $\alpha$  por las células T en la médula ósea, ya que esta citocina estimula la osteoclastogénesis inducida por MCSF y por RANKL (Cenci y cols. 2000a). El TNF $\alpha$  también suprime el reclutamiento de osteoblastos por las células progenitoras e inhibe la expresión de genes de proteínas de matriz (Nanes 2003). Además, esta citocina contribuye a la pérdida ósea inflamatoria por aumento del potencial osteoclastogénico de las células precursoras de osteoclastos, al inducir el receptor coestimulador de RANK, PIR-A (*paired Ig-like receptor-A*) (Ochi y cols. 2007). Por tanto, la inhibición de la señal de TNF $\alpha$  se ha propuesto como una importante diana en el desarrollo de nuevas terapias contra la pérdida ósea en la osteoporosis y en la artritis reumatoide (Nanes 2003). Otra citocina importante en el remodelado óseo es la IL-6. Se ha descrito que la IL-6 participa en la activación de la proliferación de granulocitos y monocitos en la médula ósea y que incrementa el número de osteoclastos en el hueso trabecular (Jilka y cols. 1992). De hecho, el bloqueo del receptor de IL-6 reduce la formación de osteoclastos y la resorción ósea independientemente de sus efectos antiinflamatorios (Axmann y cols. 2009). En este modelo experimental, el incremento temprano de los niveles de IL-6 en suero, así como sus niveles locales, fueron reducidos por la administración de ALN y de CORM-3, mientras que los niveles séricos de TNF $\alpha$  fueron disminuidos únicamente por el tratamiento con CORM-3 a día 50. Se ha descrito que el CORM-3 es capaz de suprimir la activación de NF $\kappa$ B, lo que reduce los niveles de TNF $\alpha$  (Song y cols. 2009, Wei y cols. 2010). Por tanto, nuestros resultados sugieren que el efecto protector del CORM-3 en el hueso trabecular podría estar relacionado con

la disminución de la respuesta inflamatoria sistémica, la cual inhibe los efectos tempranos de la OVX-CIA en la masa y microestructura ósea.

El remodelado óseo es dependiente del balance entre la resorción y la formación de hueso. En patologías como la osteoporosis postmenopáusica y la AR, la resorción ósea por los osteoclastos es mayor que la formación producida por los osteoblastos (Martin y cols. 2009). Ambos tratamientos disminuyeron los niveles de CTX-I, osteocalcina y ALP en el día 50. Pero el ALN fue el único tratamiento capaz de disminuir los niveles de TRAP-5b a días 36 y 50 y de revertir los efectos de OVX-CIA en la calidad trabecular ósea en el día 50. Estos efectos estuvieron acompañados por una reducción del remodelado óseo en este modelo experimental de artritis postmenopáusica, lo que está en línea con los resultados observados en la artritis reumatoide temprana (Cantatore y cols. 1999).

Nuestros resultados indican que el CORM-3, y en menor medida el ALN, induce la expresión de HO-1 en la rodilla. La sobreexpresión de esta proteína está relacionada con efectos antiinflamatorios y antioxidantes (Alcaraz y cols. 2003). Además, datos de un modelo animal de artritis mediada por TNF $\alpha$  y de pacientes artríticos sugieren que HO-1 regula negativamente la osteoclastogénesis, llevando a un balance positivo en el hueso (Zwerina y cols. 2005b). Por el contrario, se ha descrito que el aumento de HO-1 *in vitro* inhibe la maduración de osteoblastos de rata (Lin y cols. 2010) mientras que en osteoblastos humanos la favorece (Clerigues y cols. 2012). Aunque son necesarios más estudios para determinar el posible papel de la vía HO-1 en el metabolismo óseo, nuestros resultados indican que el CORM-3 induce la HO-1 en este modelo experimental sugiriendo un mecanismo de acción diferente al del ALN y que podría estar relacionado con su efecto antiinflamatorio a nivel local y sistémico.

## **2. Efecto de Ncf1\*\* en el modelo animal de artritis postmenopáusica.**

Tras estudiar el modelo animal de OVX+CIA en ratones DBA/1J, decidimos estudiar el efecto de la ausencia de la actividad de NADPH oxidasa en este modelo mediante

el uso de ratones B10.Q que poseen modificado el gen que codifica para Ncf1 (Ncf1\*\*). En estos ratones, la NADPH oxidasa no es capaz de generar  $O_2^{\cdot-}$ . Además, hemos empleado la cepa B10.Q como control de los Ncf1\*\*. En ambas cepas, se han realizado distintos grupos dependiendo de si han sido ovariectomizados (OVX) o no (Sham) y si se les ha inducido la artritis por colágeno (CIA) o no.

Hultqvist y cols. demostraron que la modificación de Ncf1 aumenta la severidad de la artritis y además, observaron que los ratones hembra desarrollan artritis tras el parto de manera espontánea (Hultqvist y cols. 2004). Es sabido que durante el embarazo las mujeres con AR presentan una remisión de la enfermedad, pero que sin embargo, tras el post-parto las pacientes recaen. Los efectos del embarazo en la artritis reumatoide están relacionados con las variaciones hormonales que se producen durante él y en el post-parto (Barrett y cols. 1999, Ostensen y cols. 2005). Por ello, la aparición espontánea de AR en los animales Ncf1\*\* tras el parto puede estar relacionada con las variaciones hormonales. Así pues, hemos considerado de interés el estudio de la relación entre la inactividad de NADPH oxidasa y el déficit de estrógenos, mediante el uso del modelo animal de OVX+CIA en ratones Ncf1\*\*.

En nuestros resultados, hemos observado que la deficiencia de estrógenos en los animales Ncf1\*\* incrementó la severidad e incidencia de la artritis, así como la aparición de infiltrado celular y la degradación de la articulación en comparación con los Ncf1\*\* Sham-CIA y con los B10.Q OVX-CIA. Como era de esperar tras los resultados obtenidos por Hultqvist y cols. (Hultqvist y cols. 2004), la ovariectomía de los animales *wild type* (B10.Q) no provocó un incremento significativo de la severidad de la enfermedad ni de la degradación de la articulación, en comparación con los B10.Q Sham-CIA.

El incremento de la severidad de la artritis en los animales Ncf1\*\* en comparación con los B10.Q se confirmó con los resultados obtenidos de las distintas IgGs. La presencia de Ncf1\*\* aumentó los niveles de IgG1, IgG2b e IgG2c en comparación con los niveles obtenidos en los animales B10.Q. Curiosamente, aunque la ovariectomía de los Ncf1\*\* incrementó marcadamente la severidad de la artritis,

únicamente se observaron diferencias significativas en la IgG1 al inicio de la enfermedad (día 13), cuando los Ncf1\*\* OVX-CIA presentaron niveles menores que los Sham-CIA. La reducción de los niveles de IgG1 por la OVX podría estar relacionada con los resultados obtenidos por Latham y cols., en los que la administración de estrógenos a ratones DBA/1J artríticos disminuyó la severidad y la incidencia de la enfermedad y además, incrementó los niveles de esta inmunoglobulina (Latham y cols. 2003).

El desarrollo de la artritis está relacionado con la respuesta de anticuerpos anti-CII frente a los distintos epítomos del colágeno. Aunque se suele asociar el aumento de la severidad de la enfermedad con el aumento de los niveles de anticuerpos, no siempre existe esta relación (Holmdahl y cols. 1985). Por ello, en los últimos años ha aumentado el interés por estudiar la especificidad de los anticuerpos anti-CII frente a los distintos epítomos del colágeno. Así pues, diversos autores han demostrado que la severidad de la artritis está relacionada con determinados epítomos, considerándose los más importante el C1 (28), el U1 (37) y el J1 (41) (Bajtner y cols. 2005, Burkhardt y cols. 2002). Además, se ha demostrado que la inmunización de ratones con anticuerpos específicos frente a estos epítomos es capaz de inducir artritis (Holmdahl y cols. 1986c, Nandakumar y cols. 2003a, Terato y cols. 1992). Considerando que el déficit de estrógenos es capaz de modificar los niveles de IgGs, nos planteamos la posibilidad de que también fuese capaz de modificar la respuesta de las IgGs frente a los distintos epítomos. Por ello, en la presente Tesis realizamos el estudio de la respuesta de las IgGs frente a distintos epítomos del colágeno y su modificación por la ovariectomía y por la modificación de Ncf1. En nuestro estudio observamos que la ovariectomía de los animales B10.Q artríticos (OVX-CIA) disminuyó significativamente la respuesta frente a los epítomos 17 y 18 en el día 0; 17, 31, 32, 34, 35 y 53 en el día 13; 15, 18, 19, 21, 25, 30, 31, 32 y 34 en el día 35; y frente al epítomo 31 en el día 63 en comparación con los Sham-CIA. Además, se observó un aumento de la respuesta frente a los epítomos 14 y 26 en los días 13 y 63, respectivamente. En el caso de los animales Ncf1\*\* OVX-CIA, la ovariectomía incrementó la respuesta frente a los epítomos 33 y 35 en el día 0; 15, 16, 17, 18, 37, 41 y 42 en el día 13; y frente a los



epítomos 15, 23, 32, 35 y 53 en el día 63 en comparación con los Sham-CIA. Además, se observó una disminución por la ovariectomía en la respuesta frente al epítomo 13 en el día 13. Hay que destacar que en el día 13 del experimento, los animales Ncf1\*\* OVX-CIA presentaron un aumento de la respuesta frente a los epítomos 37 (U1) y 41 (J1), epítomos considerados como artritogénicos. Curiosamente, se observó que la respuesta frente a los péptidos 32, 35 y 53 aumentó por la ovariectomía en los animales Ncf1\*\* pero sin embargo, el déficit de estrógenos disminuyó la respuesta frente a ellos en los B10.Q. Estos resultados demuestran que el déficit de estrógenos es capaz de modificar la respuesta de los anticuerpos anti-CII frente a los distintos epítomos del colágeno en el modelo de artritis postmenopáusica, observándose que los animales Ncf1\*\* OVX-CIA, que desarrollaron una artritis más severa, presentan un aumento de esa respuesta.

Varios estudios han demostrado el efecto del estrés oxidativo en el metabolismo óseo y su relación con la osteoporosis (Basu y cols. 2001, Lean y cols. 2005, Lean y cols. 2003). Se ha confirmado que las ROS son responsables, en parte, del aumento de la osteoclastogénesis y de la actividad de los osteoclastos vía NFκB, así como de la inhibición de la diferenciación de los osteoblastos (Almeida y cols. 2007, Asagiri y Takayanagi 2007, Boyce y cols. 2005). Por ello, cabría pensar que los animales Ncf1\*\*, que presentan déficit de ROS, estuviesen protegidos frente a la pérdida de hueso. En nuestros resultados, se observa que únicamente los animales B10.Q no artríticos presentan un aumento significativo del ratio RANKL/OPG tras la ovariectomía. Sin embargo, esta cepa no presentó las pérdidas esperadas, tras la ovariectomía y el CIA, de la estructura trabecular ósea ni de la DMO. No obstante, la modificación de Ncf1, aunque no modificó el ratio RANKL/OPG, provocó un aumento de la pérdida de la estructura trabecular y de la DMO en animales artríticos (Sham-CIA) al compararlos con su control Sham. Además, la ovariectomía de los animales artríticos Ncf1\*\* indujo un aumento más marcado de esas pérdidas. El aumento de la pérdida de DMO en animales Ncf1\*\* OVX-CIA coincide con los resultados de Jochems y cols., en los que estos animales, además de desarrollar una artritis más severa, presentaban una menor DMO que los Ncf1\*\* Sham-CIA (Jochems y cols. 2010). Estos resultados podrían estar relacionados con

los resultados observados en la tinción TRAP de los cortes histológicos. Está aceptado que el incremento de TRAP está relacionado con un aumento del número de osteoclastos los cuales son responsables de la degradación ósea (Rissanen y cols. 2008). En pacientes con enfermedades óseas, los niveles de TRAP-5b en suero están elevados y disminuyen por el tratamiento con fármacos anticatabólicos (Halleen y cols. 2006). En nuestros resultados, los animales B10.Q presentaron un ligero aumento en la tinción TRAP en los animales OVX, así como en los artríticos (Sham-CIA y OVX-CIA). En los animales Ncf1\*\* se observó un aumento de la tinción TRAP por la artritis.

Como se ha comentado anteriormente, la MMP-3 es una de las metaloproteinasas de matriz más importantes del proceso inflamatorio y además, se ha demostrado la existencia de una asociación entre sus niveles séricos y todas las características del CIA (Seeuws y cols. 2010). Como en los resultados anteriores, los niveles de este mediador se han visto aumentados en los animales que presentaron un aumento en la severidad de la artritis. Los animales Ncf1\*\* OVX-CIA presentaron un aumento significativo de MMP-3 en el día 63, en comparación con los niveles de Ncf1\*\* Sham-CIA y B10.Q OVX-CIA, coincidiendo con las diferencias observadas en la puntuación de los signos macroscópicos de la enfermedad.

Además de las medidas realizadas en el suero, también realizamos ensayos in vitro con las células procedentes del bazo. Estos ensayos se llevaron a cabo en la fase temprana de la enfermedad, 10 días después de la primera inyección con colágeno y se realizaron para observar la posible modificación de la respuesta de las células T y B durante la artritis postmenopáusica en animales Ncf1\*\*.

La artritis reumatoide se ha asociado tradicionalmente a una respuesta Th1 (Miossec y van den Berg 1997) y durante el embarazo, en el que los niveles de estrógenos se ven aumentados, se produce una disminución de esta respuesta y un aumento de la respuesta humoral mediada por las Th2 (Doria y cols. 2006). Además de las células T, las células B también juegan un papel fundamental en esta enfermedad al actuar como células presentadoras de antígenos y ser las responsables de la liberación de IgGs y de citocinas como la IL-10 (Aarvak y Natvig

2001, Klinker y Lundy 2012, Mewar y Wilson 2006, Takemura y cols. 2001). La IL-10 se considera antiinflamatoria ya que es capaz de inhibir la liberación de citocinas proinflamatorias como el  $\text{TFN}\alpha$  o la  $\text{IL-1}\beta$  y además se cree que es capaz de inhibir la proliferación de las células T (Del Prete y cols. 1993, Fiorentino y cols. 1991, Groux y cols. 1996). En los resultados obtenidos con los sobrenadantes celulares, se observa que los animales  $\text{Ncf1}^{**}$  Sham-CIA presentan una disminución de los niveles de IL-10 en comparación con los de los animales B10.Q Sham-CIA y que, en estos últimos, esos niveles se vieron reducidos por la ovariectomía. Además, los animales B10.Q no presentaron diferencias entre los OVX-CIA y los Sham-CIA en cuanto a niveles de las citocinas Th1  $\text{IFN}\gamma$  e IL-2, aunque se observó un aumento no significativo de los niveles de  $\text{IFN}\gamma$  por la ovariectomía. Sin embargo, en los animales  $\text{Ncf1}^{**}$ , la ovariectomía incrementó los niveles de  $\text{IFN}\gamma$  en animales artríticos. Aunque no se observaron diferencias significativas en los niveles de  $\text{IFN}\gamma$  entre las dos cepas, se observó una tendencia a aumentar en los animales  $\text{Ncf1}^{**}$  OVX-CIA comparándolos con los B10.Q OVX-CIA. Estos datos nos indican que la ovariectomía y el déficit de ROS por  $\text{Ncf1}^{**}$  incrementan los niveles de  $\text{IFN}\gamma$  en el inicio de la enfermedad, lo que indicaría un aumento de la actividad de las células T.

Grimaldi y cols., han demostrado la presencia de receptores de estrógenos en los diferentes estadios de las células B del bazo y que la activación y proliferación de estas células se ve modificada por la administración de estradiol (Grimaldi y cols. 2002). En nuestros resultados, la ovariectomía y la modificación de  $\text{Ncf1}$  incrementaron la proliferación celular al observarse un aumento de la incorporación de  $^3\text{H}$ -Timidina. En animales con artritis postmenopáusica, ni la ovariectomía ni el tratamiento con raloxifeno (modulador selectivo de los receptores estrogénicos) modificaron los niveles de células B (Islander y cols. 2011b). Sin embargo, en la presente Tesis hemos observado que los animales B10.Q OVX-CIA presentaban menor porcentaje de células B y de célula B activadas respecto a los Sham-CIA. Los animales  $\text{Ncf1}^{**}$  no presentaron diferencias por la OVX, aunque se observó que el porcentaje de células B en animales Sham-CIA era significativamente menor que el de los B10.Q. Además, la expresión de MHC de

clase II en la superficie de las células B se vio disminuida por la OVX en ambas cepas. La modificación de Ncf1 también disminuyó esa expresión en los animales Sham-CIA.

Por último, estudiamos el posible papel del estrés oxidativo sobre la evolución de la artritis postmenopáusica. Para ello, extrajimos sangre a los animales a días 0, 28 y 63 después de la primera inmunización con colágeno y vimos la capacidad de distintas células de generar 123-Rodamina a partir de 123-DHR. En estos resultados comprobamos que los neutrófilos son las células que mayor capacidad oxidativa presentan, pero esta capacidad no se ve modificada por la OVX. En los ratones con el gen que codifica para Ncf1 modificado (Ncf1\*\*), y que por lo tanto tienen inactiva la NADPH oxidasa, no se observó ningún aumento en la generación de 123-Rodamina excepto en los macrófagos a día 28. Estas células presentaron un aumento en la generación de 123-Rodamina por la ovariectomía, el cual no estaría relacionado con la actividad NADPH oxidasa. En el caso de los animales B10.Q presentan una disminución de la capacidad oxidativa de las células dendríticas y de los macrófagos por la OVX a días 28 y 63, respectivamente. En el trabajo de Gelderman y cols. se ha comprobado que las ROS producidas por los macrófagos son capaces de inhibir el desarrollo de la artritis reumatoide al suprimir la respuesta de las células T (Gelderman y cols. 2007). En nuestros resultados, aunque los animales B10.Q no desarrollaron diferencias significativas en la severidad de la enfermedad entre los OVX-CIA y los Sham-CIA, sí que se observó un incremento significativo de la incidencia de la enfermedad desde el día 43 hasta el día 63.

### **3. Efecto de Nrf2 en el modelo animal de osteoporosis postmenopáusica.**

El esqueleto se encuentra en una situación continua de remodelado que comienza con el reclutamiento y la activación de los osteoclastos (fase de resorción), seguidos de la fase de formación ósea dependiente de los osteoblastos. El balance entre ambos procesos determina el estado óseo (Raisz 1999). Uno de los factores que alteran dicho balance es el estrés oxidativo, favoreciendo la fase de resorción.

De esta forma, se ha demostrado que las alteraciones redox, por ejemplo en ratones deficientes en SOD1, contribuyen a la fragilidad ósea (Nojiri y cols 2011). En el envejecimiento y en la deficiencia estrogénica se produce un aumento en la producción de ROS y una disminución en las defensas antioxidantes, como glutatión reductasa, que lleva a la disminución del número de osteoblastos y osteoclastos. El aumento de ROS disminuye la proliferación y favorece la muerte celular en los osteoblastos y ocasiona la disminución de la señalización osteoclastogénica en el hueso, con una tasa menor de síntesis y de remodelado óseos (Almeida y cols. 2007).

La activación de Nrf2 es un mecanismo general de protección frente al estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria (Kim y cols 2010). Por el contrario, la deficiencia de Nrf2 favorecería la generación de ROS, aumentando la susceptibilidad de las células frente a los efectos nocivos de estos agentes. Estudios anteriores indican que la exposición *in vitro* de los osteoblastos a sustancias oxidantes, determina la inducción de Nrf2 y una disminución de la expresión de marcadores osteogénicos y del proceso de mineralización (Arai y cols. 2007). Nuestros resultados confirman *in vivo* la observación de que la activación de Nrf2 regula negativamente la diferenciación de los osteoblastos *in vitro* (Hinoi y cols 2006), ya que en los animales Nrf2<sup>-/-</sup>, aumentaron los niveles del marcador inicial de la maduración de los osteoblastos, ALP. Por el contrario, la administración de SFN, inductor de Nrf2, produjo el efecto opuesto. Estas modificaciones se observaron tanto en los animales sometidos a ovariectomía como en los animales no operados.

La pérdida de estrógenos estimula la diferenciación de los osteoclastos, al inducir la producción de MCSF vía un mecanismo dependiente de Egr-1, que tiene un importante papel en la pérdida ósea producida por la ovariectomía (Cenci y cols. 2000b). Se ha demostrado que la ovariectomía ocasiona la activación de las células T de la médula ósea, con producción de factores como TNF $\alpha$ , que actuando sobre su receptor p55, favorece la osteoclastogénesis inducida por RANKL y MCSF (Cenci y cols. 2000a; Grassi y cols 2007). Por el contrario, los estrógenos previenen la

pérdida ósea por varios mecanismos, como la inhibición de la osteoclastogénesis, mediante la reducción de la producción de RANKL o de la capacidad de respuesta celular a este agente al disminuir la activación de c-Jun N-terminal cinasa (Srivastava y cols 2001), y la inhibición de la producción de TNF $\alpha$  (Srivastava y cols 1999). En nuestro modelo experimental, la ovariectomía aumentó el ratio RANKL/OPG y los niveles de CTX-I, mientras que disminuyó los niveles de osteocalcina en el suero de los animales, a día 30, indicando un aumento del metabolismo óseo con un predominio de la resorción. La deficiencia en Nrf2 disminuyó el ratio RANKL/OPG, aunque este efecto no fue suficiente para modificar el aumento de los niveles del marcador de resorción ósea CTX-I inducido por la ovariectomía y aumentó los niveles de osteocalcina en animales ovariectomizados. Esta proteína es sintetizada por los osteoblastos e incorporada a la matriz extracelular ósea, sirviendo como un marcador de diferenciación tardía de los osteoblastos. Sus niveles en suero aumentan en condiciones caracterizadas por una elevada tasa de metabolismo óseo, como en la osteoporosis (Brown y cols. 1984). Sin embargo, tanto las moléculas de osteocalcina como los fragmentos producidos por su degradación, no sólo derivan de la formación de hueso, sino también de la resorción ósea, siendo por ello considerada como un marcador del recambio óseo (Ivaska y cols 2004).

Se conoce que la deficiencia en Nrf2 potencia la respuesta inflamatoria en diferentes modelos experimentales, por ejemplo, en la artritis por transferencia de suero K/BxN (Maicas y cols 2011). Ello podría repercutir en un empeoramiento de las alteraciones óseas. Además, en un modelo de artritis inducida por anticuerpos anti-colágeno II, se observó una tasa mayor de fracturas espontáneas en los animales artríticos deficientes en Nrf2 (Wruck y cols 2010), lo que sugiere un efecto positivo de este factor de transcripción sobre la resistencia ósea. Nuestros resultados demuestran que la deficiencia de Nrf2 empeora la estructura ósea, con una alteración de la estructura cortical y trabecular en animales ovariectomizados y en los no operados, además de producir una disminución de la DMO que es significativa estadísticamente en el segundo grupo. Por tanto, nuestros resultados indican que el factor de transcripción Nrf2 tiene un papel relevante en el control

del metabolismo óseo, tanto en condiciones fisiológicas como en la deficiencia estrogénica.

Se ha descrito que SFN y otros compuestos considerados como fitonutrientes, pueden favorecer la transactivación del elemento de respuesta estrogénica en líneas osteoblásticas, mientras que en líneas celulares de cáncer de mama tendrían un efecto contrario. Dichos efectos dependerían, al menos en parte, de la activación Nrf2/ARE (Veprik y cols 2011). Nuestros resultados indican que los efectos de SFN sobre el metabolismo óseo *in vivo* son complejos. SFN es un agente muy reactivo que puede afectar a diferentes vías de señalización. Además de la activación de Nrf2 y la inducción de las enzimas de fase 2, su capacidad de interactuar con grupos tiol determina que interfiera con numerosos sistemas que regulan la supervivencia y la proliferación celulares (Clarke y cols. 2008), la dimerización y activación del receptor TLR4 (Zhao y cols 2011b), o la actividad del factor inhibidor de la migración de macrófagos (Cross y cols. 2009). Por este mecanismo, SFN puede impedir la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, lo que determinaría la inhibición de la osteoclastogénesis inducida por RANKL y MCSF a partir de células precursoras, como se ha demostrado *in vitro* (Kim y cols 2005). Además, la inhibición de NF- $\kappa$ B podría favorecer efectos anabólicos a nivel óseo (Alles y cols. 2010). En nuestro estudio *in vivo*, SFN aumentó a día 15 los niveles séricos de TRAP-5b, sugiriendo un aumento inicial del número de osteoclastos. TRAP5b es producido por los osteoclastos activos (Alatalo y cols. 2000) y sus niveles en el suero reflejan el proceso de resorción ósea (Halleen y cols 2000). Al mismo tiempo, la administración de SFN disminuyó los niveles séricos del marcador de osteoblastos ALP.

SFN indujo de forma significativa la expresión de HO-1 en los animales OVX, lo que podría tener un efecto negativo sobre la osteoclastogénesis (Zwerina y cols 2005, Sakai y cols 2012). A día 30, desapareció la modificación de TRAP-5b por SFN, mientras que este agente disminuyó el ratio RANKL/OPG, lo que sugiere una menor capacidad de diferenciación osteoclástica inducida por los osteoblastos. También se observó que los efectos sobre ALP fueron menos acusados que a día 15

y contrarrestó la influencia de la ovariectomía sobre los niveles de CTX-I y de osteocalcina. Por tanto, nuestros resultados sugieren que la administración de SFN favorecería en una primera fase la actividad osteoclástica y que esta influencia desaparecería a tiempo posterior. El estudio por  $\mu$ -CT indica que el efecto neto de SFN fue un empeoramiento de los parámetros estructurales óseos, tanto en los animales OVX como en los Sham, a nivel trabecular y cortical, respectivamente.

Se conoce que SFN puede tener efectos duales y divergentes según la dosis, ya que a dosis bajas ha demostrado efectos protectores frente al estrés oxidativo en células madre mesenquimales, mientras que a dosis altas, tiene efectos citotóxicos (Zanichelli y cols 2012). Los resultados obtenidos *in vivo* indican que la administración de SFN afecta negativamente la estructura ósea, aunque se requieren nuevos estudios para caracterizar sus efectos sobre las modificaciones óseas producidas por el déficit de estrógenos, que podrían ser variables dependiendo de parámetros temporales y de la dosificación.



## **Conclusiones/Conclusions**

---



1. En la caracterización del modelo de artritis postmenopáusica, OVX-CIA, se ha demostrado que el déficit de estrógenos potencia la respuesta inflamatoria y facilita el desarrollo de la lesión articular. Esto podría estar relacionado con los niveles de IL-6, PGD<sub>2</sub> y MMP-3 en suero y/o homogeneizado de pata y con la modificación del patrón de expresión de las proteínas COX-2, h-PGDS, l-PGDS y HO-1.
2. La ovariectomía en animales no artríticos modifica la estructura trabecular de la tibia y aumenta a nivel articular la expresión de las enzimas anteriormente mencionadas, así como los niveles séricos de PGD<sub>2</sub>, lo que indica el inicio de una respuesta inflamatoria.
3. La administración terapéutica de SnPP en el modelo de OVX-CIA protege frente a la pérdida de peso, la severidad de la enfermedad y la erosión ósea en la articulación. Además de reducir los niveles de mediadores característicos de la artritis como IL-6, MMP-3, PGD<sub>2</sub>, TNF $\alpha$  y PGE<sub>2</sub>, SnPP disminuye la expresión proteica de h-PGDS e incrementa la de HO-1 en las rodillas de los animales.
4. La administración terapéutica de CORM-3 disminuye, a diferencia del ALN, los signos clínicos de la artritis postmenopáusica, la superficie de osteoclastos y los niveles de TNF $\alpha$  a tiempo final, protegiendo frente a la erosión ósea a nivel articular.
5. La mutación del gen Ncf1 incrementa la severidad de la artritis, con un mayor efecto en los animales OVX. Los niveles de IgGs aumentan en estos animales y se produce una modificación de su respuesta frente a los distintos epítomos del colágeno. La presencia de esta mutación y el déficit de estrógenos modifican la respuesta de las células B y T.
6. En el modelo de ovariectomía en ratón, el déficit del factor de transcripción Nrf2 altera la estructura ósea con una disminución del ratio RANKL/OPG y un aumento de los niveles de osteocalcina y de ALP. Estos datos indican un papel relevante de este factor en el control del metabolismo óseo.

7. La administración de SFN tiene efectos duales en el metabolismo óseo. A día 15 favorece la actividad osteoclástica al reducir los niveles de ALP y al aumentar los de TRAP-5b, mientras que a día 30 disminuye el ratio RANKL/OPG y los niveles de CTX-I. Sin embargo, los resultados observados por  $\mu$ -CT indican un efecto neto negativo de este tratamiento en la estructura ósea.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis confirman la implicación de la vía Nrf2/HO-1 y del estrés oxidativo en los modelos animales de artritis y osteoporosis postmenopáusicas, abriendo nuevas posibilidades para el desarrollo de dianas terapéuticas.

1. In the OVX-CIA model of postmenopausal arthritis, we have shown that estrogen deficiency enhances the inflammatory response and facilitates the development of joint lesions. This may be related to levels of IL-6, PGD<sub>2</sub> and MMP-3 in serum and/or paws homogenate and to modification of COX-2, h-PGDS, l-PGDS and HO-1 expression.
2. Ovariectomy in non-arthritic animals modifies the trabecular structure of the tibia and increases the expression of the enzymes mentioned above, as well as serum levels of PGD<sub>2</sub>, indicating the onset of an inflammatory response.
3. Therapeutic administration of SFN to OVX-CIA mice protects against weight loss, severity of disease and joint bone erosion. SFN reduces the levels of arthritic mediators such as IL-6, MMP-3, PGD<sub>2</sub>, TNF $\alpha$  and PGE<sub>2</sub>. In addition, its administration decreases h-PGDS and increases HO-1 protein expression in the knees of the animals.
4. Therapeutic administration of CORM-3 decreases the clinical profile of postmenopausal arthritis, osteoclast surface and TNF $\alpha$  levels at the end of the experiment, with a reduction of the articular bone erosion.
5. Ncf1 mutation aggravates the severity of arthritis with a higher effect in ovariectomized mice and increased levels of IgGs. Ncf1 mutation and estrogen deficiency alter IgG reaction against collagen epitopes and B and T cells responses.
6. In the mouse model of ovariectomy, deficiency of Nrf2 transcription factor modifies bone structure. These animals show a reduction in the RANKL/OPG ratio and an increase of osteocalcin and ALP levels. These data indicate that Nrf2 plays a role in the control of bone metabolism.

7. SFN administration has a dual effect on bone metabolism. At day 15, SFN reduces ALP levels while increasing TRAP-5b and osteoclast activity. At day 30 RANKL/OPG ratio and CTX-I levels are reduced. However, the  $\mu$ -CT results indicate a negative effect of this treatment on bone structure.

The results obtained in this thesis confirm the role of the Nrf2/HO-1 pathway and the oxidative stress in animal models of postmenopausal arthritis and osteoporosis, opening new possibilities for the development of therapeutic targets.

## **Bibliografía**

---





- Aarvak T, Natvig JB. (2001). Cell-cell interactions in synovitis: antigen presenting cells and T cell interaction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 3: 13-17.
- Adami S, Bhalla AK, Dorizzi R, Montesanti F, Rosini S, Salvagno G, Lo Cascio V. (1987). The acute-phase response after bisphosphonate administration. *Calcif Tissue Int* 41: 326-331.
- Adamopoulos IE, Chao CC, Geissler R, Laface D, Blumenschein W, Iwakura Y, McClanahan T, Bowman EP. (2010). Interleukin-17A upregulates receptor activator of NF-kappaB on osteoclast precursors. *Arthritis Res Ther* 12: R29.
- Alatalo SL, Halleen JM, Hentunen TA, Monkkonen J, Vaananen HK. (2000). Rapid screening method for osteoclast differentiation in vitro that measures tartrate-resistant acid phosphatase 5b activity secreted into the culture medium. *Clin Chem* 46:1751-1754.
- Alcaraz MJ, Fernandez P, Guillen MI. (2003). Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. *Curr Pharm Des* 9: 2541-2551.
- Alles N, Soysa NS, Hayashi J, Khan M, Shimoda A, Shimokawa H, Ritzeler O, Akiyoshi K, Aoki K, Ohya K. (2010). Suppression of NF-kappaB increases bone formation and ameliorates osteopenia in ovariectomized mice. *Endocrinology* 151:4626-4634.
- Almeida M, Han L, Martin-Millan M, Plotkin LI, Stewart SA, Roberson PK, Kousteni S, O'Brien CA, Bellido T, Parfitt AM, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC. (2007). Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. *J Biol Chem* 282: 27285-27297.
- An L, Liu CT, Qin XB, Liu QH, Liu Y, Yu SY. (2011). Protective effects of hemin in an experimental model of ventilator-induced lung injury. *Eur J Pharmacol* 661: 102-108.
- Andersson M, Holmdahl R. (1990). Analysis of type II collagen-reactive T cells in the mouse. I. Different regulation of autoreactive vs. non-autoreactive anti-type II collagen T cells in the DBA/1 mouse. *Eur J Immunol* 20: 1061-1066.
- Arai M, Shibata Y, Pugdee K, Abiko Y, Ogata Y. (2007). Effects of reactive oxygen species (ROS) on antioxidant system and osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *IUBMB Life* 59: 27-33.
- Asagiri M, Takayanagi H. (2007). The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* 40: 251-264.
- Aslan D, Andersen MD, Gede LB, de Franca TK, SR JR, Schwarz P, NR JR. (2011). Mechanisms for the bone anabolic effect of parathyroid hormone treatment in humans. *Scand J Clin Lab Invest*.
- Axmann R, Bohm C, Kronke G, Zwerina J, Smolen J, Schett G. (2009). Inhibition of interleukin-6 receptor directly blocks osteoclast formation in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum* 60: 2747-2756.
- Bagul A, Hosgood SA, Kaushik M, Nicholson ML. (2008). Carbon monoxide protects against ischemia-reperfusion injury in an experimental model of controlled nonheartbeating donor kidney. *Transplantation* 85: 576-581.
- Baird L, Dinkova-Kostova AT. (2011). The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol* 85: 241-272.
- Bajtner E, Nandakumar KS, Engstrom A, Holmdahl R. (2005). Chronic development of collagen-induced arthritis is associated with arthritogenic antibodies against specific epitopes on type II collagen. *Arthritis Res Ther* 7: R1148-1157.

- Bani-Hani MG, Greenstein D, Mann BE, Green CJ, Motterlini R. (2006a). A carbon monoxide-releasing molecule (CORM-3) attenuates lipopolysaccharide- and interferon-gamma-induced inflammation in microglia. *Pharmacol Rep* 58 Suppl: 132-144.
- Bani-Hani MG, Greenstein D, Mann BE, Green CJ, Motterlini R. (2006b). Modulation of thrombin-induced neuroinflammation in BV-2 microglia by carbon monoxide-releasing molecule 3. *J Pharmacol Exp Ther* 318: 1315-1322.
- Banks E, Beral V, Reeves G, Balkwill A, Barnes I. (2004). Fracture incidence in relation to the pattern of use of hormone therapy in postmenopausal women. *JAMA* 291: 2212-2220.
- Barbagallo I, Vanella A, Peterson SJ, Kim DH, Tibullo D, Giallongo C, Vanella L, Parrinello N, Palumbo GA, Di Raimondo F, Abraham NG, Asprinio D. (2010). Overexpression of heme oxygenase-1 increases human osteoblast stem cell differentiation. *J Bone Miner Metab* 28: 276-288.
- Barrett JH, Brennan P, Fiddler M, Silman AJ. (1999). Does rheumatoid arthritis remit during pregnancy and relapse postpartum? Results from a nationwide study in the United Kingdom performed prospectively from late pregnancy. *Arthritis Rheum* 42: 1219-1227.
- Basu S, Michaelsson K, Olofsson H, Johansson S, Melhus H. (2001). Association between oxidative stress and bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 275-279.
- Bedard K, Krause KH. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87: 245-313.
- Benallaoua M, Francois M, Batteux F, Thelier N, Shyy JY, Fitting C, Tsagris L, Boczkowski J, Savouret JF, Corvol MT, Poiraudou S, Rannou F. (2007). Pharmacologic induction of heme oxygenase 1 reduces acute inflammatory arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 56: 2585-2594.
- Beral V. (2003). Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362: 419-427.
- Beral V, Bull D, Green J, Reeves G. (2007). Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 369: 1703-1710.
- Bingham CO, 3rd. (2002). The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. *J Rheumatol Suppl* 65: 3-9.
- Blumberg SN, Fox DA. (2001). Rheumatoid arthritis: guidelines for emerging therapies. *Am J Manag Care* 7: 617-626.
- Bone HG, Bolognese MA, Yuen CK, Kendler DL, Wang H, Liu Y, San Martin J. (2008). Effects of denosumab on bone mineral density and bone turnover in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 2149-2157.
- Boyce BF, Yamashita T, Yao Z, Zhang Q, Li F, Xing L. (2005). Roles for NF-kappaB and c-Fos in osteoclasts. *J Bone Miner Metab* 23 Suppl: 11-15.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337-342.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Braza-Boils A, Alcaraz MJ, Ferrandiz ML. (2011). Regulation of the inflammatory response by tin protoporphyrin IX in the rat anterior cruciate ligament transection model of osteoarthritis. *J Orthop Res* 29: 1375-1382.

- Breuil V, Euller-Ziegler L. (2006). Bisphosphonate therapy in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 73: 349-354.
- Brown JP, Delmas PD, Malaval L, Edouard C, Chapuy MC, Meunier PJ. (1984). Serum bone Gla-protein: a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 1:1091-1093.
- Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, Kelley M, Hsu H, Boyle WJ, Dunstan CR, Hu S, Lacey DL. (1999). The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol* 145: 527-538.
- Burkhardt H, Koller T, Engstrom A, Nandakumar KS, Turnay J, Kraetsch HG, Kalden JR, Holmdahl R. (2002). Epitope-specific recognition of type II collagen by rheumatoid arthritis antibodies is shared with recognition by antibodies that are arthritogenic in collagen-induced arthritis in the mouse. *Arthritis Rheum* 46: 2339-2348.
- Burkhardt H, Sehnert B, Bockermann R, Engstrom A, Kalden JR, Holmdahl R. (2005). Humoral immune response to citrullinated collagen type II determinants in early rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 35: 1643-1652.
- Camacho EM, Lunt M, Farragher TM, Verstappen SM, Bunn DK, Symmons DP. (2011). The relationship between oral contraceptive use and functional outcome in women with recent-onset inflammatory polyarthritis: results from the Norfolk Arthritis Register. *Arthritis Rheum* 63: 2183-2191.
- Cantatore FP, Acquista CA, Pipitone V. (1999). Evaluation of bone turnover and osteoclastic cytokines in early rheumatoid arthritis treated with alendronate. *J Rheumatol* 26: 2318-2323.
- Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novack D, Woodring J, Pacifici R. (2000a). Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *J Clin Invest* 106: 1229-1237.
- Cenci S, Weitzmann MN, Gentile MA, Aisa MC, Pacifici R. (2000b). M-CSF neutralization and egr-1 deficiency prevent ovariectomy-induced bone loss. *J Clin Invest* 105:1279-1287.
- Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, Miossec P. (1999). Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 42: 963-970.
- Chae HJ, Chin HY, Lee GY, Park HR, Yang SK, Chung HT, Pae HO, Kim HM, Chae SW, Kim HR. (2006). Carbon monoxide and nitric oxide protect against tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in osteoblasts: HO-1 is necessary to mediate the protection. *Clin Chim Acta* 365: 270-278.
- Chan K, Lu R, Chang JC, Kan YW. (1996). NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13943-13948.
- Chen JR, Lazarenko OP, Shankar K, Blackburn ML, Lumpkin CK, Badger TM, Ronis MJ. (2011). Inhibition of NADPH oxidases prevents chronic ethanol-induced bone loss in female rats. *J Pharmacol Exp Ther* 336: 734-742.
- Cheung KL, Kong AN. (2010). Molecular targets of dietary phenethyl isothiocyanate and sulforaphane for cancer chemoprevention. *AAPS J* 12: 87-97.
- Christiansen C, Rodbro P. (1983). Does postmenopausal bone loss respond to estrogen replacement therapy independent of bone loss rate? *Calcif Tissue Int* 35: 720-722.

- Clark JE, Naughton P, Shurey S, Green CJ, Johnson TR, Mann BE, Foresti R, Motterlini R. (2003). Cardioprotective actions by a water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. *Circ Res* 93: e2-8.
- Clark RA, Volpp BD, Leidal KG, Nauseef WM. (1990). Two cytosolic components of the human neutrophil respiratory burst oxidase translocate to the plasma membrane during cell activation. *J Clin Invest* 85: 714-721.
- Clarke B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 3 Suppl 3: S131-139.
- Clarke JD, Dashwood RH, Ho E. (2008). Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane. *Cancer Letters* 269:291-304.
- Clerigues V, Guillen MI, Castejon MA, Gomar F, Mirabet V, Alcaraz MJ. (2012). Heme oxygenase-1 mediates protective effects on inflammatory, catabolic and senescence responses induced by interleukin-1beta in osteoarthritic osteoblasts. *Biochem Pharmacol* 83: 395-405.
- Cross AR, Segal AW. (2004). The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta* 1657: 1-22.
- Cross JV, Rady JM, Foss FW, Lyons CE, Macdonald TL, Templeton DJ. (2009). Nutrient isothiocyanates covalently modify and inhibit the inflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Biochemical Journal* 423:315-321.
- Curnutte JT, Whitten DM, Babior BM. (1974). Defective superoxide production by granulocytes from patients with chronic granulomatous disease. *N Engl J Med* 290: 593-597.
- D'Amelio P, Grimaldi A, Cristofaro MA, Ravazzoli M, Molinatti PA, Pescarmona GP, Isaia GC. (2010). Alendronate reduces osteoclast precursors in osteoporosis. *Osteoporos Int* 21: 1741-1750.
- D'Elia HF, Larsen A, Mattsson LA, Waltbrand E, Kvist G, Mellstrom D, Saxne T, Ohlsson C, Nordborg E, Carlsten H. (2003). Influence of hormone replacement therapy on disease progression and bone mineral density in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 30: 1456-1463.
- Dal-Secco D, Freitas A, Abreu MA, Garlet TP, Rossi MA, Ferreira SH, Silva JS, Alves-Filho JC, Cunha FQ. (2010). Reduction of ICAM-1 expression by carbon monoxide via soluble guanylate cyclase activation accounts for modulation of neutrophil migration. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 381: 483-493.
- Dayer JM, Choy E. (2010). Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor. *Rheumatology (Oxford)* 49: 15-24.
- Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S. (1993). Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* 150: 353-360.
- Deng X, Yu Z, Funayama H, Yamaguchi K, Sasano T, Sugawara S, Endo Y. (2007). Histidine decarboxylase-stimulating and inflammatory effects of alendronate in mice: involvement of mevalonate pathway, TNFalpha, macrophages, and T-cells. *Int Immunopharmacol* 7: 152-161.
- Deodhar AA, Woolf AD. (1996). Bone mass measurement and bone metabolism in rheumatoid arthritis: a review. *Br J Rheumatol* 35: 309-322.
- Devesa I, Ferrandiz ML, Guillen I, Cerda JM, Alcaraz MJ. (2005a). Potential role of heme oxygenase-1 in the progression of rat adjuvant arthritis. *Lab Invest* 85: 34-44.

- Devesa I, Ferrandiz ML, Terencio MC, Joosten LA, van den Berg WB, Alcaraz MJ. (2005b). Influence of heme oxygenase 1 modulation on the progression of murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 52: 3230-3238.
- Dick IM, Devine A, Beilby J, Prince RL. (2005). Effects of endogenous estrogen on renal calcium and phosphate handling in elderly women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E430-435.
- Diebold BA, Bokoch GM. (2001). Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nat Immunol* 2: 211-215.
- Dinkova-Kostova AT, Talalay P. (2000). Persuasive evidence that quinone reductase type 1 (DT diaphorase) protects cells against the toxicity of electrophiles and reactive forms of oxygen. *Free Radic Biol Med* 29: 231-240.
- Doran MF, Crowson CS, O'Fallon WM, Gabriel SE. (2004). The effect of oral contraceptives and estrogen replacement therapy on the risk of rheumatoid arthritis: a population based study. *J Rheumatol* 31: 207-213.
- Dore RK, Cohen SB, Lane NE, Palmer W, Shergy W, Zhou L, Wang H, Tsuji W, Newmark R. (2010). Effects of denosumab on bone mineral density and bone turnover in patients with rheumatoid arthritis receiving concurrent glucocorticoids or bisphosphonates. *Ann Rheum Dis* 69: 872-875.
- Doria A, Iaccarino L, Arienti S, Ghirardello A, Zampieri S, Rampudda ME, Cutolo M, Tincani A, Todesco S. (2006). Th2 immune deviation induced by pregnancy: the two faces of autoimmune rheumatic diseases. *Reprod Toxicol* 22: 234-241.
- Drummond GS, Kappas A. (1981). Prevention of neonatal hyperbilirubinemia by tin protoporphyrin IX, a potent competitive inhibitor of heme oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 6466-6470.
- Ducy P. (2000). Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn* 219: 461-471.
- Dunnett CW. (1964). New tables for multiple comparison with a control. *Biometrics* 20: 482-491.
- Durand M, Gallant MA, de Brum-Fernandes AJ. (2008). Prostaglandin D2 receptors control osteoclastogenesis and the activity of human osteoclasts. *J Bone Miner Res* 23: 1097-1105.
- Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. (2005). Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int* 16 Suppl 2: S129-138.
- Eisenstein RS, Garcia-Mayol D, Pettingell W, Munro HN. (1991). Regulation of ferritin and heme oxygenase synthesis in rat fibroblasts by different forms of iron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 688-692.
- Ellson C, Davidson K, Anderson K, Stephens LR, Hawkins PT. (2006a). PtdIns3P binding to the PX domain of p40phox is a physiological signal in NADPH oxidase activation. *EMBO J* 25: 4468-4478.
- Ellson C, Davidson K, Ferguson GJ, O'Connor R, Stephens LR, Hawkins PT. (2006b). Neutrophils from p40phox<sup>-/-</sup> mice exhibit severe defects in NADPH oxidase regulation and oxidant-dependent bacterial killing. *J Exp Med* 203: 1927-1937.
- Eriksen EF. (2010). Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord* 11: 219-227.
- Ferrandiz ML, Maicas N, Garcia-Arnandis I, Terencio MC, Motterlini R, Devesa I, Joosten LA, van den Berg WB, Alcaraz MJ. (2008). Treatment with a CO-releasing molecule (CORM-3) reduces joint inflammation and erosion in murine collagen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis* 67: 1211-1217.

- Fimognari C, Nusse M, Berti F, Iori R, Cantelli-Forti G, Hrelia P. (2003). Sulforaphane modulates cell cycle and apoptosis in transformed and non-transformed human T lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1010: 393-398.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. (1991). IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 147: 3815-3822.
- Foresti R, Hammad J, Clark JE, Johnson TR, Mann BE, Friebe A, Green CJ, Motterlini R. (2004). Vasoactive properties of CORM-3, a novel water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. *Br J Pharmacol* 142: 453-460.
- Foresti R, Bani-Hani MG, Motterlini R. (2008). Use of carbon monoxide as a therapeutic agent: promises and challenges. *Intensive Care Med* 34: 649-658.
- Forger F, Marcoli N, Gadola S, Moller B, Villiger PM, Ostensen M. (2008). Pregnancy induces numerical and functional changes of CD4+CD25 high regulatory T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 67: 984-990.
- Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. (2006). Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* 235: 176-190.
- Freitas A, Alves-Filho JC, Secco DD, Neto AF, Ferreira SH, Barja-Fidalgo C, Cunha FQ. (2006). Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation. *Br J Pharmacol* 149: 345-354.
- Fujikawa K, Kawakami A, Tamai M, Uetani M, Takao S, Arima K, Iwamoto N, Aramaki T, Kawashiri S, Ichinose K, Kamachi M, Nakamura H, Origuchi T, Ida H, Aoyagi K, Eguchi K. (2009). High serum cartilage oligomeric matrix protein determines the subset of patients with early-stage rheumatoid arthritis with high serum C-reactive protein, matrix metalloproteinase-3, and MRI-proven bone erosion. *J Rheumatol* 36: 1126-1129.
- Gabriel SE, Crowson CS, Kremers HM, Doran MF, Turesson C, O'Fallon WM, Matteson EL. (2003). Survival in rheumatoid arthritis: a population-based analysis of trends over 40 years. *Arthritis Rheum* 48: 54-58.
- Gallant MA, Samadifam R, Hackett JA, Antoniou J, Parent JL, de Brum-Fernandes AJ. (2005). Production of prostaglandin D<sub>2</sub> by human osteoblasts and modulation of osteoprotegerin, RANKL, and cellular migration by DP and CRTH2 receptors. *J Bone Miner Res* 20: 672-681.
- Gallant MA, Chamoux E, Bisson M, Wolsen C, Parent JL, Roux S, de Brum-Fernandes AJ. (2010). Increased concentrations of prostaglandin D<sub>2</sub> during post-fracture bone remodeling. *J Rheumatol* 37: 644-649.
- Gamet-Payraastre L, Li P, Lumeau S, Cassar G, Dupont MA, Chevolleau S, Gasc N, Tulliez J, Terce F. (2000). Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res* 60: 1426-1433.
- Gao Q, Zhan P, Alander CB, Kream BE, Hao C, Breyer MD, Pilbeam CC, Raisz LG. (2009). Effects of global or targeted deletion of the EP4 receptor on the response of osteoblasts to prostaglandin in vitro and on bone histomorphometry in aged mice. *Bone* 45: 98-103.
- Garcia-Arnandis I, Guillen MI, Gomar F, Castejon MA, Alcaraz MJ. (2011). Control of cell migration and inflammatory mediators production by CORM-2 in osteoarthritic synoviocytes. *PLoS One* 6: e24591.

- Gelderman KA, Hultqvist M, Pizzolla A, Zhao M, Nandakumar KS, Mattsson R, Holmdahl R. (2007). Macrophages suppress T cell responses and arthritis development in mice by producing reactive oxygen species. *J Clin Invest* 117: 3020-3028.
- Goemaere S, Ackerman C, Goethals K, De Keyser F, Van der Straeten C, Verbruggen G, Mielants H, Veys EM. (1990). Onset of symptoms of rheumatoid arthritis in relation to age, sex and menopausal transition. *J Rheumatol* 17: 1620-1622.
- Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. (2010). Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50: 323-354.
- Grassi F, Tell G, Robbie-Ryan M, Gao Y, Terauchi M, Yang X, Romanello M, Jones DP, Weitzmann MN, Pacifici R. (2007). Oxidative stress causes bone loss in estrogen-deficient mice through enhanced bone marrow dendritic cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15087-15092.
- Griffiths HR. (2008). Is the generation of neo-antigenic determinants by free radicals central to the development of autoimmune rheumatoid disease? *Autoimmun Rev* 7: 544-549.
- Grimaldi CM, Cleary J, Dagtas AS, Moussai D, Diamond B. (2002). Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation. *J Clin Invest* 109: 1625-1633.
- Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. (1996). Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med* 184: 19-29.
- Grundemar L, Ny L. (1997). Pitfalls using metalloporphyrins in carbon monoxide research. *Trends Pharmacol Sci* 18: 193-195.
- Guillen MI, Megias J, Clerigues V, Gomar F, Alcaraz MJ. (2008). The CO-releasing molecule CORM-2 is a novel regulator of the inflammatory process in osteoarthritic chondrocytes. *Rheumatology (Oxford)* 47: 1323-1328.
- Halleen JM, Tiitinen SL, Ylipahkala H, Fagerlund KM, Vaananen HK. (2006). Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. *Clin Lab* 52: 499-509.
- Han CH, Freeman JL, Lee T, Motalebi SA, Lambeth JD. (1998). Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox). *J Biol Chem* 273: 16663-16668.
- Hanada T, Yoshimura A. (2002). Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* 13: 413-421.
- Hassan SZ, Gheita TA, Kenawy SA, Fahim AT, El-Sorougy IM, Abdou MS. (2011). Oxidative stress in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients: relationship to disease manifestations and activity. *Int J Rheum Dis* 14: 325-331.
- Hembry RM, Bagga MR, Reynolds JJ, Hamblen DL. (1995). Immunolocalisation studies on six matrix metalloproteinases and their inhibitors, TIMP-1 and TIMP-2, in synovia from patients with osteo- and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 54: 25-32.
- Heo YJ, Joo YB, Oh HJ, Park MK, Heo YM, Cho ML, Kwok SK, Ju JH, Park KS, Cho SG, Park SH, Kim HY, Min JK. (2010). IL-10 suppresses Th17 cells and promotes regulatory T cells in the CD4+ T cell population of rheumatoid arthritis patients. *Immunol Lett* 127: 150-156.
- Herman S, Zurgil N, Langevitz P, Ehrenfeld M, Deutsch M. (2008). Methotrexate selectively modulates TH1/TH2 balance in active rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol* 26: 317-323.

- Hikiji H, Takato T, Shimizu T, Ishii S. (2008). The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. *Prog Lipid Res* 47: 107-126.
- Hinoi E, Fujimori S, Wang L, Hojo H, Uno K, Yoneda Y. (2006). Nrf2 negatively regulates osteoblast differentiation via interfering with Runx2-dependent transcriptional activation. *J Biol Chem* 281: 18015-18024.
- Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, Ichimasa M, Sugamura K, Nakamura M, Takano S, Nagata K. (2001). Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med* 193: 255-261.
- Ho FM, Kang HC, Lee ST, Chao Y, Chen YC, Huang LJ, Lin WW. (2007). The anti-inflammatory actions of LCY-2-CHO, a carbazole analogue, in vascular smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 74: 298-308.
- Holmdahl R, Jansson L, Gullberg D, Rubin K, Forsberg PO, Klareskog L. (1985). Incidence of arthritis and autoreactivity of anti-collagen antibodies after immunization of DBA/1 mice with heterologous and autologous collagen II. *Clin Exp Immunol* 62: 639-646.
- Holmdahl R, Jansson L, Andersson M. (1986a). Female sex hormones suppress development of collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 29: 1501-1509.
- Holmdahl R, Klareskog L, Andersson M, Hansen C. (1986b). High antibody response to autologous type II collagen is restricted to H-2q. *Immunogenetics* 24: 84-89.
- Holmdahl R, Rubin K, Klareskog L, Larsson E, Wigzell H. (1986c). Characterization of the antibody response in mice with type II collagen-induced arthritis, using monoclonal anti-type II collagen antibodies. *Arthritis Rheum* 29: 400-410.
- Holmdahl R, Jansson L. (1988). Oestrogen-induced suppression of collagen arthritis. III. Adult thymectomy does not affect the course of arthritis or the oestrogen-mediated suppression of T-cell immunity. *Brain Behav Immunol* 2: 123-132.
- Holmdahl R, Carlsten H, Jansson L, Larsson P. (1989). Oestrogen is a potent immunomodulator of murine experimental rheumatoid disease. *Br J Rheumatol* 28 Suppl 1: 54-58; discussion 69-71.
- Holmes B, Quie PG, Windhorst DB, Good RA. (1966). Fatal granulomatous disease of childhood. An inborn abnormality of phagocytic function. *Lancet* 1: 1225-1228.
- Horai R, Saijo S, Tanioka H, Nakae S, Sudo K, Okahara A, Ikuse T, Asano M, Iwakura Y. (2000). Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J Exp Med* 191: 313-320.
- Hougee S, Hartog A, Sanders A, Graus YM, Hoijer MA, Garssen J, van den Berg WB, van Beuningen HM, Smit HF. (2006). Oral administration of the NADPH-oxidase inhibitor apocynin partially restores diminished cartilage proteoglycan synthesis and reduces inflammation in mice. *Eur J Pharmacol* 531: 264-269.
- Hu R, Khor TO, Shen G, Jeong WS, Hebbar V, Chen C, Xu C, Reddy B, Chada K, Kong AN. (2006). Cancer chemoprevention of intestinal polyposis in ApcMin/+ mice by sulforaphane, a natural product derived from cruciferous vegetable. *Carcinogenesis* 27: 2038-2046.



- Huberle A, Beyeen AD, Ockinger J, Ayturan M, Jagodic M, de Graaf KL, Fissolo N, Marta M, Olofsson P, Hultqvist M, Holmdahl R, Olsson T, Weissert R. (2009). Advanced intercross line mapping suggests that *ncf1* (*ean6*) regulates severity in an animal model of guillain-barre syndrome. *J Immunol* 182: 4432-4438.
- Hughes DE, Wright KR, Uy HL, Sasaki A, Yoneda T, Roodman GD, Mundy GR, Boyce BF. (1995). Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 10: 1478-1487.
- Hultqvist M, Olofsson P, Holmberg J, Backstrom BT, Tordsson J, Holmdahl R. (2004). Enhanced autoimmunity, arthritis, and encephalomyelitis in mice with a reduced oxidative burst due to a mutation in the *Ncf1* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 12646-12651.
- Hultqvist M, Holmdahl R. (2005). *Ncf1* (p47phox) polymorphism determines oxidative burst and the severity of arthritis in rats and mice. *Cell Immunol* 233: 97-101.
- Hultqvist M, Olofsson P, Gelderman KA, Holmberg J, Holmdahl R. (2006). A new arthritis therapy with oxidative burst inducers. *PLoS Med* 3: e348.
- Hur W, Sun Z, Jiang T, Mason DE, Peters EC, Zhang DD, Luesch H, Schultz PG, Gray NS. (2010). A small-molecule inducer of the antioxidant response element. *Chem Biol* 17: 537-547.
- Islander U, Jochems C, Lagerquist MK, Forsblad-d'Elia H, Carlsten H. (2011a). Estrogens in rheumatoid arthritis; the immune system and bone. *Mol Cell Endocrinol* 335: 14-29.
- Islander U, Jochems C, Stubelius A, Andersson A, Lagerquist MK, Ohlsson C, Carlsten H. (2011b). Combined treatment with dexamethasone and raloxifene totally abrogates osteoporosis and joint destruction in experimental postmenopausal arthritis. *Arthritis Res Ther* 13: R96.
- Itoh K, Igarashi K, Hayashi N, Nishizawa M, Yamamoto M. (1995). Cloning and characterization of a novel erythroid cell-derived CNC family transcription factor heterodimerizing with the small Maf family proteins. *Mol Cell Biol* 15: 4184-4193.
- Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y. (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 313-322.
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 13: 76-86.
- Itoh K, Tong KI, Yamamoto M. (2004). Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med* 36: 1208-1213.
- Ivaska KK, Hentunen TA, Vaaraniemi J, Ylipahkala H, Pettersson K, Vaananen HK. (2004). Release of intact and fragmented osteocalcin molecules from bone matrix during bone resorption in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 279:18361-18369.
- Iwakura Y, Ishigame H. (2006). The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 116: 1218-1222.
- Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H, Nozawa-Inoue K. (2000). Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch Histol Cytol* 63: 17-31.
- Jabbar S, Drury J, Fordham JN, Datta HK, Francis RM, Tuck SP. (2011). Osteoprotegerin, RANKL and bone turnover in postmenopausal osteoporosis. *J Clin Pathol* 64: 354-357.

Jackson SH, Gallin JI, Holland SM. (1995). The p47phox mouse knock-out model of chronic granulomatous disease. *J Exp Med* 182: 751-758.

Jansson L, Holmdahl R. (1992). Oestrogen-induced suppression of collagen arthritis; 17 beta-oestradiol is therapeutically active in normal and castrated F1 hybrid mice of both sexes. *Clin Exp Immunol* 89: 446-451.

Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H, Manolagas SC. (1992). Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science* 257: 88-91.

Jimi E, Nakamura I, Ikebe T, Akiyama S, Takahashi N, Suda T. (1998). Activation of NF-kappaB is involved in the survival of osteoclasts promoted by interleukin-1. *J Biol Chem* 273: 8799-8805.

Jochems C, Islander U, Erlandsson M, Verdrengh M, Ohlsson C, Carlsten H. (2005). Osteoporosis in experimental postmenopausal polyarthritis: the relative contributions of estrogen deficiency and inflammation. *Arthritis Res Ther* 7: R837-843.

Jochems C, Lagerquist M, Hakansson C, Ohlsson C, Carlsten H. (2008). Long-term anti-arthritic and anti-osteoporotic effects of raloxifene in established experimental postmenopausal polyarthritis. *Clin Exp Immunol* 152: 593-597.

Jochems C, Islander U, Erlandsson M, Engdahl C, Lagerquist M, Gjertsson I, Ohlsson C, Holmdahl R, Carlsten H. (2010). Role of endogenous and exogenous female sex hormones in arthritis and osteoporosis development in B10.Q-ncf1<sup>\*/\*</sup> mice with collagen-induced chronic arthritis. *BMC Musculoskelet Disord* 11: 284.

Johnson JL, Park JW, Benna JE, Faust LP, Inanami O, Babior BM. (1998). Activation of p47(PHOX), a cytosolic subunit of the leukocyte NADPH oxidase. Phosphorylation of ser-359 or ser-370 precedes phosphorylation at other sites and is required for activity. *J Biol Chem* 273: 35147-35152.

Johnston RB, Jr., Keele BB, Jr., Misra HP, Lehmeyer JE, Webb LS, Baehner RL, Rajagopalan KV. (1975). The role of superoxide anion generation in phagocytic bactericidal activity. Studies with normal and chronic granulomatous disease leukocytes. *J Clin Invest* 55: 1357-1372.

Joosten LA, Helsen MM, van de Loo FA, van den Berg WB. (1996). Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A comparative study using anti-TNF alpha, anti-IL-1 alpha/beta, and IL-1Ra. *Arthritis Rheum* 39: 797-809.

Joosten LA, Lubberts E, Durez P, Helsen MM, Jacobs MJ, Goldman M, van den Berg WB. (1997). Role of interleukin-4 and interleukin-10 in murine collagen-induced arthritis. Protective effect of interleukin-4 and interleukin-10 treatment on cartilage destruction. *Arthritis Rheum* 40: 249-260.

Joosten LA, Lubberts E, Helsen MM, Saxne T, Coenen-de Roo CJ, Heinegard D, van den Berg WB. (1999). Protection against cartilage and bone destruction by systemic interleukin-4 treatment in established murine type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Res* 1: 81-91.

Kaizu T, Tamaki T, Tanaka M, Uchida Y, Tsuchihashi S, Kawamura A, Kakita A. (2003). Preconditioning with tin-protoporphyrin IX attenuates ischemia/reperfusion injury in the rat kidney. *Kidney Int* 63: 1393-1403.

Kaji H, Kuroki Y, Murakawa Y, Funakawa I, Funasaka Y, Kanda F, Sugimoto T. (2010). Effect of alendronate on bone metabolic indices and bone mineral density in patients treated with high-dose glucocorticoid: a prospective study. *Osteoporos Int* 21: 1565-1571.

- Kang MI, Kobayashi A, Wakabayashi N, Kim SG, Yamamoto M. (2004). Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2046-2051.
- Karmakar S, Weinberg MS, Banik NL, Patel SJ, Ray SK. (2006). Activation of multiple molecular mechanisms for apoptosis in human malignant glioblastoma T98G and U87MG cells treated with sulforaphane. *Neuroscience* 141: 1265-1280.
- Kasukawa Y, Miyakoshi N, Srivastava AK, Nozaka K, Maekawa S, Baylink DJ, Mohan S, Itoi E. (2007). The selective cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib reduces bone resorption, but not bone formation, in ovariectomized mice in vivo. *Tohoku J Exp Med* 211: 275-283.
- Katoh Y, Itoh K, Yoshida E, Miyagishi M, Fukamizu A, Yamamoto M. (2001). Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes Cells* 6: 857-868.
- Katsuoka F, Motohashi H, Ishii T, Aburatani H, Engel JD, Yamamoto M. (2005). Genetic evidence that small maf proteins are essential for the activation of antioxidant response element-dependent genes. *Mol Cell Biol* 25: 8044-8051.
- Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, Kollias G. (1991). Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 10: 4025-4031.
- Keila S, Kelner A, Weinreb M. (2001). Systemic prostaglandin E2 increases cancellous bone formation and mass in aging rats and stimulates their bone marrow osteogenic capacity in vivo and in vitro. *J Endocrinol* 168: 131-139.
- Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 89-116.
- Keum YS, Khor TO, Lin W, Shen G, Kwon KH, Barve A, Li W, Kong AN. (2009). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of broccoli sprouts on the suppression of prostate cancer in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) mice: implication of induction of Nrf2, HO-1 and apoptosis and the suppression of Akt-dependent kinase pathway. *Pharm Res* 26: 2324-2331.
- Khosla S, Melton LJ, 3rd, Riggs BL. (2011). The unitary model for estrogen deficiency and the pathogenesis of osteoporosis: is a revision needed? *J Bone Miner Res* 26: 441-451.
- Kim SJ, Kang SY, Shin HH, Choi HS. (2005). Sulforaphane inhibits osteoclastogenesis by inhibiting nuclear factor-kappaB. *Mol Cells* 20: 364-370.
- Kim J, Cha YN, Surh YJ. (2010). A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutat Res* 690: 12-23.
- Kind PR, King EJ. (1954). Estimation of plasma phosphatase by determination of hydrolysed phenol with amino-antipyrine. *J Clin Pathol* 7: 322-326.
- Kirwan JR, Bijlsma JW, Boers M, Shea BJ. (2007). Effects of glucocorticoids on radiological progression in rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev*: CD006356.
- Kitazawa R, Kimble RB, Vannice JL, Kung VT, Pacifici R. (1994). Interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein decrease osteoclast formation and bone resorption in ovariectomized mice. *J Clin Invest* 94: 2397-2406.

Klinker MW, Lundy SK. (2012). Multiple mechanisms of immune suppression by B lymphocytes. *Mol Med* 18: 123-137.

Kobayashi H, Takeno M, Saito T, Takeda Y, Kirino Y, Noyori K, Hayashi T, Ueda A, Ishigatsubo Y. (2006). Regulatory role of heme oxygenase 1 in inflammation of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54: 1132-1142.

Koga H, Terasawa H, Nunoi H, Takeshige K, Inagaki F, Sumimoto H. (1999). Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* 274: 25051-25060.

Komori T. (2006). Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem* 99: 1233-1239.

Kong JS, Yoo SA, Kim HS, Kim HA, Yea K, Ryu SH, Chung YJ, Cho CS, Kim WU. (2010). Inhibition of synovial hyperplasia, rheumatoid T cell activation, and experimental arthritis in mice by sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate. *Arthritis Rheum* 62: 159-170.

Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T. (1999). IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 103: 1345-1352.

Kraetsch HG, Unger C, Wernhoff P, Schneider C, Kalden JR, Holmdahl R, Burkhardt H. (2001). Cartilage-specific autoimmunity in rheumatoid arthritis: characterization of a triple helical B cell epitope in the integrin-binding-domain of collagen type II. *Eur J Immunol* 31: 1666-1673.

Kremer JM, Westhovens R, Leon M, Di Giorgio E, Alten R, Steinfeld S, Russell A, Dougados M, Emery P, Nuamah IF, Williams GR, Becker JC, Hagerty DT, Moreland LW. (2003). Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. *N Engl J Med* 349: 1907-1915.

Kusano K, Miyaura C, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, Kamoi K, Suda T. (1998). Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology* 139: 1338-1345.

Lafage-Proust MH, Boudignon B, Thomas T. (2003). Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiological data and recent treatments. *Joint Bone Spine* 70: 109-118.

Lafeber FP, Beukelman CJ, van den Worm E, van Roy JL, Vianen ME, van Roon JA, van Dijk H, Bijlsma JW. (1999). Apocynin, a plant-derived, cartilage-saving drug, might be useful in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 38: 1088-1093.

Larsson P, Holmdahl R. (1987). Oestrogen-induced suppression of collagen arthritis. II. Treatment of rats suppresses development of arthritis but does not affect the anti-type II collagen humoral response. *Scand J Immunol* 26: 579-583.

Latham KA, Zamora A, Drought H, Subramanian S, Matejuk A, Offner H, Rosloniec EF. (2003). Estradiol treatment redirects the isotype of the autoantibody response and prevents the development of autoimmune arthritis. *J Immunol* 171: 5820-5827.

Le Goff B, Soltner E, Charrier C, Maugars Y, Redini F, Heymann D, Berthelot JM. (2009). A combination of methotrexate and zoledronic acid prevents bone erosions and systemic bone mass loss in collagen induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 11: R185.

Lean JM, Davies JT, Fuller K, Jagger CJ, Kirstein B, Partington GA, Urry ZL, Chambers TJ. (2003). A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss. *J Clin Invest* 112: 915-923.

- Lean JM, Jagger CJ, Kirstein B, Fuller K, Chambers TJ. (2005). Hydrogen peroxide is essential for estrogen-deficiency bone loss and osteoclast formation. *Endocrinology* 146: 728-735.
- Lee SH, Sohn DH, Jin XY, Kim SW, Choi SC, Seo GS. (2007). 2',4',6'-tris(methoxymethoxy) chalcone protects against trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis and blocks tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced intestinal epithelial inflammation via heme oxygenase 1-dependent and independent pathways. *Biochem Pharmacol* 74: 870-880.
- Lehmann HJ, Mouritzen U, Christgau S, Cloos PA, Christiansen C. (2002). Effect of bisphosphonates on cartilage turnover assessed with a newly developed assay for collagen type II degradation products. *Ann Rheum Dis* 61: 530-533.
- Leto TL, Adams AG, de Mendez I. (1994). Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 10650-10654.
- Li M, Shen Y, Wronski TJ. (1997). Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. *Bone* 20: 55-61.
- Lian JB, Gundberg CM. (1988). Osteocalcin. Biochemical considerations and clinical applications. *Clin Orthop Relat Res*: 267-291.
- Lin TH, Tang CH, Hung SY, Liu SH, Lin YM, Fu WM, Yang RS. (2010). Upregulation of heme oxygenase-1 inhibits the maturation and mineralization of osteoblasts. *J Cell Physiol* 222: 757-768.
- Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Levine AC. (2005). Cross-talk between the interleukin-6 and prostaglandin E(2) signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (RANK) ligand/RANK system. *Endocrinology* 146(4): 1991-1998.
- Lorenzo JA, Naprta A, Rao Y, Alander C, Glaccum M, Widmer M, Gronowicz G, Kalinowski J, Pilbeam CC. (1998). Mice lacking the type I interleukin-1 receptor do not lose bone mass after ovariectomy. *Endocrinology* 139: 3022-3025.
- Lubberts E, Joosten LA, van Den Bersselaar L, Helsen MM, Bakker AC, van Meurs JB, Graham FL, Richards CD, van Den Berg WB. (1999). Adenoviral vector-mediated overexpression of IL-4 in the knee joint of mice with collagen-induced arthritis prevents cartilage destruction. *J Immunol* 163: 4546-4556.
- Lubberts E, Joosten LA, Chabaud M, van Den Bersselaar L, Oppers B, Coenen-De Roo CJ, Richards CD, Miossec P, van Den Berg WB. (2000). IL-4 gene therapy for collagen arthritis suppresses synovial IL-17 and osteoprotegerin ligand and prevents bone erosion. *J Clin Invest* 105: 1697-1710.
- Lubberts E, van den Berg WB. (2003). Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and collagen-induced arthritis. *Adv Exp Med Biol* 520: 194-202.
- Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJ, Joosten LA, van den Berg WB. (2004). Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum* 50: 650-659.
- Lubberts E. (2010). Th17 cytokines and arthritis. *Semin Immunopathol* 32: 43-53.
- Ma Q, Battelli L, Hubbs AF. (2006). Multiorgan autoimmune inflammation, enhanced lymphoproliferation, and impaired homeostasis of reactive oxygen species in mice lacking the antioxidant-activated transcription factor Nrf2. *Am J Pathol* 168: 1960-1974.

Ma Q. (2010). Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications. *Pharmacol Ther* 125: 376-393.

Maddison P, Kiely P, Kirkham B, Lawson T, Moots R, Proudfoot D, Reece R, Scott D, Sword R, Taggart A, Thwaites C, Williams E. (2005). Leflunomide in rheumatoid arthritis: recommendations through a process of consensus. *Rheumatology (Oxford)* 44: 280-286.

Maicas N, Ferrandiz ML, Devesa I, Motterlini R, Koenders MI, van den Berg WB, Alcaraz MJ. (2010). The CO-releasing molecule CORM-3 protects against articular degradation in the K/BxN serum transfer arthritis model. *Eur J Pharmacol* 634: 184-191.

Maicas N, Ferrandiz ML, Brines R, Ibanez L, Cuadrado A, Koenders MI, van den Berg WB, Alcaraz MJ. (2011). Deficiency of Nrf2 accelerates the effector phase of arthritis and aggravates joint disease. *Antioxid Redox Signal* 15: 889-901.

Maicas N, Ibanez L, Alcaraz MJ, Ubeda A, Ferrandiz ML. (2012). Prostaglandin D2 regulates joint inflammation and destruction in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 64: 130-140.

Makkonen N, Salminen A, Rogers MJ, Frith JC, Urtti A, Azhayeva E, Monkkonen J. (1999). Contrasting effects of alendronate and clodronate on RAW 264 macrophages: the role of a bisphosphonate metabolite. *Eur J Pharm Sci* 8: 109-118.

Mamehara A, Sugimoto T, Sugiyama D, Morinobu S, Tsuji G, Kawano S, Morinobu A, Kumagai S. (2010). Serum matrix metalloproteinase-3 as predictor of joint destruction in rheumatoid arthritis, treated with non-biological disease modifying anti-rheumatic drugs. *Kobe J Med Sci* 56: E98-107.

Marcus R, Feldman D, Nelson D, Rosen CJ. (2009). *Fundamentals of Osteoporosis*: Academic Press. 72-75.

Marini MG, Chan K, Casula L, Kan YW, Cao A, Moi P. (1997). hMAF, a small human transcription factor that heterodimerizes specifically with Nrf1 and Nrf2. *J Biol Chem* 272: 16490-16497.

Martin T, Gooi JH, Sims NA. (2009). Molecular mechanisms in coupling of bone formation to resorption. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 19: 73-88.

Mauri C, Williams RO, Walmsley M, Feldmann M. (1996). Relationship between Th1/Th2 cytokine patterns and the arthritogenic response in collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol* 26: 1511-1518.

McMahon M, Thomas N, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. (2004). Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. *J Biol Chem* 279: 31556-31567.

Megias J, Busserolles J, Alcaraz MJ. (2007). The carbon monoxide-releasing molecule CORM-2 inhibits the inflammatory response induced by cytokines in Caco-2 cells. *Br J Pharmacol* 150: 977-986.

Megias J, Guillen MI, Bru A, Gomar F, Alcaraz MJ. (2008). The carbon monoxide-releasing molecule tricarbonyldichlororuthenium(II) dimer protects human osteoarthritic chondrocytes and cartilage from the catabolic actions of interleukin-1beta. *J Pharmacol Exp Ther* 325: 56-61.

Mewar D, Wilson AG. (2006). Autoantibodies in rheumatoid arthritis: a review. *Biomed Pharmacother* 60: 648-655.

Miossec P, van den Berg W. (1997). Th1/Th2 cytokine balance in arthritis. *Arthritis Rheum* 40: 2105-2115.

- Mizuguchi S, Stephen J, Bihari R, Markovic N, Suehiro S, Capretta A, Potter RF, Cepinskas G. (2009). CORM-3-derived CO modulates polymorphonuclear leukocyte migration across the vascular endothelium by reducing levels of cell surface-bound elastase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H920-929.
- Motterlini R, Clark JE, Foresti R, Sarathchandra P, Mann BE, Green CJ. (2002). Carbon monoxide-releasing molecules: characterization of biochemical and vascular activities. *Circ Res* 90: E17-24.
- Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD, Cua DJ. (2003). Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 198: 1951-1957.
- Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y. (2003). Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 171: 6173-6177.
- Nakamura M, Ando T, Abe M, Kumagai K, Endo Y. (1996). Contrast between effects of aminobisphosphonates and non-aminobisphosphonates on collagen-induced arthritis in mice. *Br J Pharmacol* 119: 205-212.
- Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, Sakai H. (2000). Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 768-775.
- Nandakumar KS, Svensson L, Holmdahl R. (2003a). Collagen type II-specific monoclonal antibody-induced arthritis in mice: description of the disease and the influence of age, sex, and genes. *Am J Pathol* 163: 1827-1837.
- Nandakumar KS, Andren M, Martinsson P, Bajtner E, Hellstrom S, Holmdahl R, Kleinau S. (2003b). Induction of arthritis by single monoclonal IgG anti-collagen type II antibodies and enhancement of arthritis in mice lacking inhibitory Fc gammaRIIB. *Eur J Immunol* 33: 2269-2277.
- Nandakumar KS, Holmdahl R. (2006). Antibody-induced arthritis: disease mechanisms and genes involved at the effector phase of arthritis. *Arthritis Res Ther* 8: 223.
- Nandakumar KS, Bajtner E, Hill L, Bohm B, Rowley MJ, Burkhardt H, Holmdahl R. (2008). Arthritogenic antibodies specific for a major type II collagen triple-helical epitope bind and destabilize cartilage independent of inflammation. *Arthritis Rheum* 58: 184-196.
- Nanes MS. (2003). Tumor necrosis factor-alpha: molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. *Gene* 321: 1-15.
- Nioi P, Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. (2005). The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 25: 10895-10906.
- Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, Hashimoto J, Azuma J, Kishimoto T. (2004). Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 50: 1761-1769.
- Nishio Y, Dong Y, Paris M, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Drissi H. (2006). Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. *Gene* 372: 62-70.
- Niture SK, Jaiswal AK. (2012). Nrf2 up-regulates anti-apoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis. *J Biol Chem*.

Nojiri H, Saita Y, Morikawa D, Kobayashi K, Tsuda C, Miyazaki T, Saito M, Marumo K, Yonezawa I, Kaneko K, Shirasawa T, Shimizu T. (2011). Cytoplasmic superoxide causes bone fragility owing to low-turnover osteoporosis and impaired collagen cross-linking. *J Bone Miner Res* 26:2682-2694.

Nordin BE. (2009). The effect of calcium supplementation on bone loss in 32 controlled trials in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 20: 2135-2143.

Ochi S, Shinohara M, Sato K, Gober HJ, Koga T, Kodama T, Takai T, Miyasaka N, Takayanagi H. (2007). Pathological role of osteoclast costimulation in arthritis-induced bone loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 11394-11399.

Ohta H, Masuzawa T, Ikeda T, Suda Y, Makita K, Nozawa S. (1992). Which is more osteoporosis-inducing, menopause or oophorectomy? *Bone Miner* 19: 273-285.

Okada Y, Nagase H, Harris ED, Jr. (1987). Matrix metalloproteinases 1, 2, and 3 from rheumatoid synovial cells are sufficient to destroy joints. *J Rheumatol* 14 Spec No: 41-42.

Okada Y, Lorenzo JA, Freeman AM, Tomita M, Morham SG, Raisz LG, Pilbeam CC. (2000). Prostaglandin G/H synthase-2 is required for maximal formation of osteoclast-like cells in culture. *J Clin Invest* 105: 823-832.

Olofsson P, Holmberg J, Tordsson J, Lu S, Akerstrom B, Holmdahl R. (2003). Positional identification of *Ncf1* as a gene that regulates arthritis severity in rats. *Nat Genet* 33: 25-32.

Ostensen M, Forger F, Nelson JL, Schuhmacher A, Hebisch G, Villiger PM. (2005). Pregnancy in patients with rheumatic disease: anti-inflammatory cytokines increase in pregnancy and decrease post partum. *Ann Rheum Dis* 64: 839-844.

Pacifici R. (2012). Role of T cells in ovariectomy induced bone loss-revisited. *J Bone Miner Res* 27: 231-239.

Pae HO, Oh GS, Lee BS, Rim JS, Kim YM, Chung HT. (2006). 3-Hydroxyanthranilic acid, one of L-tryptophan metabolites, inhibits monocyte chemoattractant protein-1 secretion and vascular cell adhesion molecule-1 expression via heme oxygenase-1 induction in human umbilical vein endothelial cells. *Atherosclerosis* 187: 274-284.

Paine A, Eiz-Vesper B, Blasczyk R, Immenschuh S. (2010). Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochem Pharmacol* 80: 1895-1903.

Panico A, Lupoli GA, Marciello F, Lupoli R, Cacciapuoti M, Martinelli A, Granieri L, Iacono D, Lupoli G. (2011). Teriparatide vs. alendronate as a treatment for osteoporosis: changes in biochemical markers of bone turnover, BMD and quality of life. *Med Sci Monit* 17: CR442-448.

Papapoulos S, Chapurlat R, Libanati C, Brandi M, Brown J, Czerwinski E, Krieg MA, Man Z, Mellstrom D, Radominski S, Reginster JY, Resch H, Roman J, Roux C, Vittinghoff, E, Austin M, Daizadeh N, Bradley M, Grauer A, Cummings S, Bone H. (2011). Five years of denosumab exposure in women with postmenopausal osteoporosis: Results from the first two years of the FREEDOM extension. *J Bone Miner Res*.

Park SY, Lee SW, Shin HK, Chung WT, Lee WS, Rhim BY, Hong KW, Kim CD. (2010). Cilostazol enhances apoptosis of synovial cells from rheumatoid arthritis patients with inhibition of cytokine formation via Nrf2-linked heme oxygenase 1 induction. *Arthritis Rheum* 62: 732-741.



- Poli V, Balena R, Fattori E, Markatos A, Yamamoto M, Tanaka H, Ciliberto G, Rodan GA, Costantini F. (1994). Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. *EMBO J* 13: 1189-1196.
- Rabenda V, Bruyere O, Reginster JY. (2011). Relationship between bone mineral density changes and risk of fractures among patients receiving calcium with or without vitamin D supplementation: a meta-regression. *Osteoporos Int* 22: 893-901.
- Raisz LG. (1999). Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem* 45:1353-1358.
- Ralston SH, Hacking L, Willocks L, Bruce F, Pitkeathly DA. (1989). Clinical, biochemical, and radiographic effects of aminohydroxypropylidene bisphosphonate treatment in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 48: 396-399.
- Ralston SH. (1994). Analysis of gene expression in human bone biopsies by polymerase chain reaction: evidence for enhanced cytokine expression in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 9: 883-890.
- Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, Talalay P, Kensler TW. (2001). Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 3410-3415.
- Rangasamy T, Guo J, Mitzner WA, Roman J, Singh A, Fryer AD, Yamamoto M, Kensler TW, Tudor RM, Georas SN, Biswal S. (2005). Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice. *J Exp Med* 202: 47-59.
- Rannevik G, Jeppsson S, Johnell O, Bjerre B, Laurell-Borulf Y, Svanberg L. (2008). A longitudinal study of the perimenopausal transition: altered profiles of steroid and pituitary hormones, SHBG and bone mineral density. *Maturitas* 61: 67-77.
- Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, Newman RA, Hanna N, Anderson DR. (1994). Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 83: 435-445.
- Reid IR. (2011). Bisphosphonates in the treatment of osteoporosis: a review of their contribution and controversies. *Skeletal Radiol* 40: 1191-1196.
- Reinwald S, Burr D. (2008). Review of nonprimate, large animal models for osteoporosis research. *J Bone Miner Res* 23: 1353-1368.
- Ribbens C, Martin y Porras M, Franchimont N, Kaiser MJ, Jaspar JM, Damas P, Houssiau FA, Malaise MG. (2002). Increased matrix metalloproteinase-3 serum levels in rheumatic diseases: relationship with synovitis and steroid treatment. *Ann Rheum Dis* 61: 161-166.
- Riggs BL, Hartmann LC. (2003). Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med* 348: 618-629.
- Rissanen JP, Suominen MI, Peng Z, Halleen JM. (2008). Secreted tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a Marker of osteoclast number in human osteoclast cultures and the rat ovariectomy model. *Calcif Tissue Int* 82: 108-115.
- Robinson J, Babcock G. (1998). *Phagocyte function: A Guide for Research and Clinical Evaluation*. United States of America: Wiley-Liss Publications. 224-235.

Robinson LJ, Borysenko CW, Blair HC. (2007). Tumor necrosis factor family receptors regulating bone turnover: new observations in osteoblastic and osteoclastic cell lines. *Ann N Y Acad Sci* 1116: 432-443.

Roggia C, Gao Y, Cenci S, Weitzmann MN, Toraldo G, Isaia G, Pacifici R. (2001). Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13960-13965.

Roux C. (2011). Osteoporosis in inflammatory joint diseases. *Osteoporos Int* 22: 421-433.

Rueda B, Oliver J, Robledo G, Lopez-Nevot MA, Balsa A, Pascual-Salcedo D, Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Escribano MF, Martin J. (2007). HO-1 promoter polymorphism associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 56: 3953-3958.

Ryter SW, Alam J, Choi AM. (2006). Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 86: 583-650.

Sakai E, Shimada-Sugawara M, Nishishita K, Fukuma Y, Naito M, Okamoto K, Nakayama K, Tsukuba T. (2012). Suppression of RANKL-dependent heme oxygenase-1 is required for high mobility group box 1 release and osteoclastogenesis. *J Cell Biochem* 113:486-498.

Sare GM, Gray LJ, Bath PM. (2008). Association between hormone replacement therapy and subsequent arterial and venous vascular events: a meta-analysis. *Eur Heart J* 29: 2031-2041.

Sasaki H, Yamamoto H, Tominaga K, Masuda K, Kawai T, Teshima-Kondo S, Rokutan K. (2009). NADPH oxidase-derived reactive oxygen species are essential for differentiation of a mouse macrophage cell line (RAW264.7) into osteoclasts. *J Med Invest* 56: 33-41.

Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, Tanaka S, Kodama T, Akira S, Iwakura Y, Cua DJ, Takayanagi H. (2006). Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 203: 2673-2682.

Schappi MG, Jaquet V, Belli DC, Krause KH. (2008). Hyperinflammation in chronic granulomatous disease and anti-inflammatory role of the phagocyte NADPH oxidase. *Semin Immunopathol* 30: 255-271.

Schulte S, Unger C, Mo JA, Wendler O, Bauer E, Frischholz S, von der Mark K, Kalden JR, Holmdahl R, Burkhardt H. (1998). Arthritis-related B cell epitopes in collagen II are conformation-dependent and sterically privileged in accessible sites of cartilage collagen fibrils. *J Biol Chem* 273: 1551-1561.

Seeuws S, Jacques P, Van Praet J, Drennan M, Coudens J, Decruy T, Deschepper E, Lepascheux L, Pujuguet P, Oste L, Vandeghinste N, Brys R, Verbruggen G, Elewaut D. (2010). A multiparameter approach to monitor disease activity in collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 12: R160.

Segal AW, Jones OT, Webster D, Allison AC. (1978). Absence of a newly described cytochrome b from neutrophils of patients with chronic granulomatous disease. *Lancet* 2: 446-449.

Seldon MP, Silva G, Pejanovic N, Larsen R, Gregoire IP, Filipe J, Anrather J, Soares MP. (2007). Heme oxygenase-1 inhibits the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation via inhibition of NF-kappaB RelA phosphorylation at serine 276. *J Immunol* 179: 7840-7851.

Seven A, Guzel S, Aslan M, Hamuryudan V. (2008). Lipid, protein, DNA oxidation and antioxidant status in rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* 41: 538-543.

- Shah D, Wanchu A, Bhatnagar A. (2011). Interaction between oxidative stress and chemokines: possible pathogenic role in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Immunobiology* 216: 1010-1017.
- Shirai T, Kobayashi M, Nishitani K, Satake T, Kuroki H, Nakagawa Y, Nakamura T. (2011). Chondroprotective effect of alendronate in a rabbit model of osteoarthritis. *J Orthop Res* 29: 1572-1577.
- Silverman GJ, Carson DA. (2003). Roles of B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 5 Suppl 4: S1-6.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy 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. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89: 309-319.
- Singh JA, Christensen R, Wells GA, Suarez-Almazor ME, Buchbinder R, Lopez-Olivo MA, Tanjong Ghogomu E, Tugwell P. (2009). Biologics for rheumatoid arthritis: an overview of Cochrane reviews. *Cochrane Database Syst Rev*: CD007848.
- Slocum SL, Kensler TW. (2011). Nrf2: control of sensitivity to carcinogens. *Arch Toxicol* 85: 273-284.
- Smith BD, Martin GR, Miller EJ, Dorfman A, Swarm R. (1975). Nature of the collagen synthesized by a transplanted chondrosarcoma. *Arch Biochem Biophys* 166: 181-186.
- Smolen JS, Steiner G. (2003). Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov* 2: 473-488.
- Song H, Bergstrasser C, Rafat N, Hoger S, Schmidt M, Endres N, Goebeler M, Hillebrands JL, Brigelius-Flohe R, Banning A, Beck G, Loesel R, Yard BA. (2009). The carbon monoxide releasing molecule (CORM-3) inhibits expression of vascular cell adhesion molecule-1 and E-selectin independently of haem oxygenase-1 expression. *Br J Pharmacol* 157: 769-780.
- Song H, Hoeger S, Hillebrands JL, Mandel I, Loesel R, Beck G, Schilling L, Schnuelle P, Yard B. (2010). CORMs protect endothelial cells during cold preservation, resulting in inhibition of intimal hyperplasia after aorta transplantation in rats. *Transpl Int* 23: 1144-1153.
- Song H, Zhao H, Qu Y, Sun Q, Zhang F, Du Z, Liang W, Qi Y, Yang P. (2011). Carbon monoxide releasing molecule-3 inhibits concurrent tumor necrosis factor-alpha- and interleukin-1beta-induced expression of adhesion molecules on human gingival fibroblasts. *J Periodontol Res* 46: 48-57.
- Sornay-Rendu E, Garnero P, Munoz F, Duboeuf F, Delmas PD. (2003). Effect of withdrawal of hormone replacement therapy on bone mass and bone turnover: the OFELY study. *Bone* 33: 159-166.
- Srivastava S, Toraldo G, Weitzmann MN, Cenci S, Ross FP, Pacifici R. (2001). Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation. *Journal of Biological Chemistry* 276:8836-8840.
- Srivastava S, Weitzmann MN, Cenci S, Ross FP, Adler S, Pacifici R. (1999). Estrogen decreases TNF gene expression by blocking JNK activity and the resulting production of c-Jun and JunD. *Journal of Clinical Investigation* 104:503-513.

Stein AB, Bolli R, Dawn B, Sanganalmath SK, Zhu Y, Wang OL, Guo Y, Motterlini R, Xuan YT. (2012). Carbon monoxide induces a late preconditioning-mimetic cardioprotective and antiapoptotic milieu in the myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 52: 228-236.

Steinbeck MJ, Appel WH, Jr., Verhoeven AJ, Karnovsky MJ. (1994). NADPH-oxidase expression and in situ production of superoxide by osteoclasts actively resorbing bone. *J Cell Biol* 126: 765-772.

Stocker R, Peterhans E. (1989). Antioxidant properties of conjugated bilirubin and biliverdin: biologically relevant scavenging of hypochlorous acid. *Free Radic Res Commun* 6: 57-66.

Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. (1987). Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235: 1043-1046.

Suda K, Udagawa N, Sato N, Takami M, Itoh K, Woo JT, Takahashi N, Nagai K. (2004). Suppression of osteoprotegerin expression by prostaglandin E2 is crucially involved in lipopolysaccharide-induced osteoclast formation. *J Immunol* 172: 2504-2510.

Sumimoto H, Hata K, Mizuki K, Ito T, Kage Y, Sakaki Y, Fukumaki Y, Nakamura M, Takeshige K. (1996). Assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. Specific interaction of the N-terminal Src homology 3 domain of p47phox with p22phox is required for activation of the NADPH oxidase. *J Biol Chem* 271: 22152-22158.

Surh YJ, Kundu JK, Li MH, Na HK, Cha YN. (2009). Role of Nrf2-mediated heme oxygenase-1 upregulation in adaptive survival response to nitrosative stress. *Arch Pharm Res* 32: 1163-1176.

Tak PP, Kalden JR. (2011). Advances in rheumatology: new targeted therapeutics. *Arthritis Res Ther* 13 Suppl 1: S5.

Takagi T, Yamamoto T, Asano S, Tamaki H. (1993). Effect of prostaglandin D2 on the femoral bone mineral density in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 52: 442-446.

Takemura S, Klimiuk PA, Braun A, Goronzy JJ, Weyand CM. (2001). T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J Immunol* 167: 4710-4718.

Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, Nuno H, Sumimoto H. (2003). Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem* 278: 25234-25246.

Tamion F, Richard V, Renet S, Thuillez C. (2006). Protective effects of heme-oxygenase expression against endotoxic shock: inhibition of tumor necrosis factor-alpha and augmentation of interleukin-10. *J Trauma* 61: 1078-1084.

Taylor HS. (2009). Designing the ideal selective estrogen receptor modulator--an achievable goal? *Menopause* 16: 609-615.

Teissier E, Nohara A, Chinetti G, Paumelle R, Cariou B, Fruchart JC, Brandes RP, Shah A, Staels B. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha induces NADPH oxidase activity in macrophages, leading to the generation of LDL with PPAR-alpha activation properties. *Circ Res* 95: 1174-1182.

Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. (1968). The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61: 748-755.

Terato K, Hasty KA, Reife RA, Cremer MA, Kang AH, Stuart JM. (1992). Induction of arthritis with monoclonal antibodies to collagen. *J Immunol* 148: 2103-2108.

- Trentham DE, Townes AS, Kang AH. (1977). Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med* 146: 857-868.
- Tsuboi M, Kawakami A, Nakashima T, Matsuoka N, Urayama S, Kawabe Y, Fujiyama K, Kiriya T, Aoyagi T, Maeda K, Eguchi K. (1999). Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta increase the Fas-mediated apoptosis of human osteoblasts. *J Lab Clin Med* 134: 222-231.
- Tsujisawa T, Inoue H, Nishihara T. (2005). SC-19220, antagonist of prostaglandin E2 receptor EP1, inhibits osteoclastogenesis by RANKL. *J Bone Miner Res* 20: 15-22.
- Urquhart P, Rosignoli G, Cooper D, Motterlini R, Perretti M. (2007). Carbon monoxide-releasing molecules modulate leukocyte-endothelial interactions under flow. *J Pharmacol Exp Ther* 321: 656-662.
- Vaananen HK, Laitala-Leinonen T. (2008). Osteoclast lineage and function. *Arch Biochem Biophys* 473: 132-138.
- Vachharajani TJ, Work J, Issekutz AC, Granger DN. (2000). Heme oxygenase modulates selectin expression in different regional vascular beds. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H1613-1617.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84.
- van de Loo FA, Bennink MB, Arntz OJ, Smeets RL, Lubberts E, Joosten LA, van Lent PL, Coenen-de Roo CJ, Cuzzocrea S, Segal BH, Holland SM, van den Berg WB. (2003). Deficiency of NADPH oxidase components p47phox and gp91phox caused granulomatous synovitis and increased connective tissue destruction in experimental arthritis models. *Am J Pathol* 163: 1525-1537.
- van den Berg WB, Joosten LA, Helsen M, van de Loo FA. (1994). Amelioration of established murine collagen-induced arthritis with anti-IL-1 treatment. *Clin Exp Immunol* 95: 237-243.
- van den Berg WB, Joosten LA. (1999). Murine collagen-induced arthritis, chronicity and cartilage destruction. *Textbook of In Vivo Models of inflammation*. Birkhäuser Verlag/Switzerland: Eds. Morgan DW Morgan, Marshall LA. 51-75.
- van den Berg WB. (2009). Lessons from animal models of arthritis over the past decade. *Arthritis Res Ther* 11: 250.
- Vanella L, Kim DH, Asprinio D, Peterson SJ, Barbagallo I, Vanella A, Goldstein D, Ikehara S, Kappas A, Abraham NG. (2010). HO-1 expression increases mesenchymal stem cell-derived osteoblasts but decreases adipocyte lineage. *Bone* 46: 236-243.
- Venugopal R, Jaiswal AK. (1996). Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 14960-14965.
- Veprík A, Khanin M, Linnewiel Hermoni K, Danilenko M, Levy Y, Sharoni Y. (2011). Polyphenols, isothiocyanates and carotenoid derivatives enhance estrogenic activity in bone cells but inhibit it in breast cancer cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.
- Vicente AM, Guillen MI, Alcaraz MJ. (2003a). Participation of heme oxygenase-1 in a model of acute inflammation. *Exp Biol Med (Maywood)* 228: 514-516.
- Vicente AM, Guillen MI, Habib A, Alcaraz MJ. (2003b). Beneficial effects of heme oxygenase-1 up-regulation in the development of experimental inflammation induced by zymosan. *J Pharmacol Exp Ther* 307: 1030-1037.

Wakabayashi N, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Kang MI, Kobayashi A, Yamamoto M, Kensler TW, Talalay P. (2004). Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2040-2045.

Watson WC, Townes AS. (1985). Genetic susceptibility to murine collagen II autoimmune arthritis. Proposed relationship to the IgG2 autoantibody subclass response, complement C5, major histocompatibility complex (MHC) and non-MHC loci. *J Exp Med* 162: 1878-1891.

Weaver LK. (1999). Carbon monoxide poisoning. *Crit Care Clin* 15: 297-317, viii.

Wei Y, Chen P, de Bruyn M, Zhang W, Bremer E, Helfrich W. (2010). Carbon monoxide-releasing molecule-2 (CORM-2) attenuates acute hepatic ischemia reperfusion injury in rats. *BMC Gastroenterol* 10: 42.

Wientjes FB, Hsuan JJ, Totty NF, Segal AW. (1993). p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem J* 296 ( Pt 3): 557-561.

Wooley PH, Luthra HS, Stuart JM, David CS. (1981). Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates. *J Exp Med* 154: 688-700.

Wruck CJ, Fragoulis A, Gurzynski A, Brandenburg LO, Kan YW, Chan K, Hassenpflug J, Freitag-Wolf S, Varoga D, Lippross S, Pufe T. (2011). Role of oxidative stress in rheumatoid arthritis: insights from the Nrf2-knockout mice. *Ann Rheum Dis* 70: 844-850.

Wu ML, Ho YC, Lin CY, Yet SF. (2011). Heme oxygenase-1 in inflammation and cardiovascular disease. *Am J Cardiovasc Dis* 1: 150-158.

Xu C, Huang MT, Shen G, Yuan X, Lin W, Khor TO, Conney AH, Kong AN. (2006a). Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced skin tumorigenesis in C57BL/6 mice by sulforaphane is mediated by nuclear factor E2-related factor 2. *Cancer Res* 66: 8293-8296.

Xu C, Shen G, Yuan X, Kim JH, Gopalkrishnan A, Keum YS, Nair S, Kong AN. (2006b). ERK and JNK signaling pathways are involved in the regulation of activator protein 1 and cell death elicited by three isothiocyanates in human prostate cancer PC-3 cells. *Carcinogenesis* 27: 437-445.

Xue L, Barrow A, Pettipher R. (2009). Novel function of CRTH2 in preventing apoptosis of human Th2 cells through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Immunol* 182: 7580-7586.

Yamaguchi M, Weitzmann MN. (2012). The intact strontium ranelate complex stimulates osteoblastogenesis and suppresses osteoclastogenesis by antagonizing NF-kappaB activation. *Mol Cell Biochem* 359: 399-407.

Yamasaki D, Enokida M, Okano T, Hagino H, Teshima R. (2001). Effects of ovariectomy and estrogen replacement therapy on arthritis and bone mineral density in rats with collagen-induced arthritis. *Bone* 28: 634-640.

Yang S, Madyastha P, Bingel S, Ries W, Key L. (2001). A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts. *J Biol Chem* 276: 5452-5458.

Yang S, Madyastha P, Ries W, Key LL. (2002). Characterization of interferon gamma receptors on osteoclasts: effect of interferon gamma on osteoclastic superoxide generation. *J Cell Biochem* 84: 645-654.

- Yoshida K, Oida H, Kobayashi T, Maruyama T, Tanaka M, Katayama T, Yamaguchi K, Segi E, Tsuboyama T, Matsushita M, Ito K, Ito Y, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ohuchida S, Kondo K, Nakamura T, Narumiya S. (2002). Stimulation of bone formation and prevention of bone loss by prostaglandin E EP4 receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 4580-4585.
- Yoshinaga T, Sassa S, Kappas A. (1982). Purification and properties of bovine spleen heme oxygenase. Amino acid composition and sites of action of inhibitors of heme oxidation. *J Biol Chem* 257: 7778-7785.
- Zanichelli F, Capasso S, Di Bernardo G, Cipollaro M, Pagnotta E, Carteni M, Casale F, Iori R, Giordano A, Galderisi U. (2012). Low concentrations of isothiocyanates protect mesenchymal stem cells from oxidative injuries, while high concentrations exacerbate DNA damage. Apoptosis.
- Zhang Q, Badell IR, Schwarz EM, Boulukos KE, Yao Z, Boyce BF, Xing L. (2005). Tumor necrosis factor prevents alendronate-induced osteoclast apoptosis in vivo by stimulating Bcl-xL expression through Ets-2. *Arthritis Rheum* 52: 2708-2718.
- Zhang Y, Kensler TW, Cho CG, Posner GH, Talalay P. (1994). Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 3147-3150.
- Zhang Y. (2004). Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutat Res* 555: 173-190.
- Zhang YH, Heulsmann A, Tondravi MM, Mukherjee A, Abu-Amer Y. (2001). Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. *J Biol Chem* 276: 563-568.
- Zhao L, Huang J, Zhang H, Wang Y, Matesic LE, Takahata M, Awad H, Chen D, Xing L. (2011a). Tumor necrosis factor inhibits mesenchymal stem cell differentiation into osteoblasts via the ubiquitin E3 ligase Wwp1. *Stem Cells* 29: 1601-1610.
- Zhao L, Lee JY, Hwang DH. (2011b). Inhibition of pattern recognition receptor-mediated inflammation by bioactive phytochemicals. *Nutr Rev* 69:310-320.
- Zhao W, Diz DI, Robbins ME. (2007). Oxidative damage pathways in relation to normal tissue injury. *Br J Radiol* 80 Spec No 1: S23-31.
- Zhou L, Ivanov, II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR. (2007). IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 8: 967-974.
- Zwerina J, Redlich K, Schett G, Smolen JS. (2005a). Pathogenesis of rheumatoid arthritis: targeting cytokines. *Ann N Y Acad Sci* 1051: 716-729.
- Zwerina J, Tzima S, Hayer S, Redlich K, Hoffmann O, Hanslik-Schnabel B, Smolen JS, Kollias G, Schett G. (2005b). Heme oxygenase 1 (HO-1) regulates osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB J* 19: 2011-2013.





## **Anexos**

---



## Artículos publicados durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral

---

1. *Up-Regulation of the Inflammatory Response by Ovariectomy in Collagen-Induced Arthritis. Effects of Tin Protoporphyrin IX.*
  - **Autores:** Lidia Ibáñez, María José Alcaraz, Nuria Maicas, David Guede, José Ramón Caeiro, Marije I. Koenders, Wim B. van den Berg, María Luisa Ferrándiz
  - **Revista:** *Inflammation* 34:585-596 (2011)
2. *Deficiency of Nrf2 accelerates the effector phase of arthritis and aggravates joint disease.*
  - **Autores:** Nuria Maicas, María Luisa Ferrándiz, Rita Brines, Lidia Ibáñez, Antonio Cuadrado, Marije I. Koenders, Wim B. van den Berg, María José Alcaraz
  - **Revista:** *Antioxidants & Redox signaling* 15:889-901 (2011)
3. *Down-regulation of the inflammatory response by CORM-3 in protective effects in a model of postmenopausal arthritis.*
  - **Autores:** Lidia Ibáñez, María José Alcaraz, Nuria Maicas, David Guede, José Ramón Caeiro, Roberto Motterlini, María Luisa Ferrándiz
  - **Revista:** *Calcified Tissue International* 91:69-80 (2012)
4. *Prostaglandin D<sub>2</sub> regulates joint inflammation and destruction in murine collagen-induced arthritis.*
  - **Autores:** Nuria Maicas, Lidia Ibáñez, María José Alcaraz, Amalia Úbeda, María Luisa Ferrándiz
  - **Revista:** *Arthritis & Rheumatism* 64:130-140 (2012)



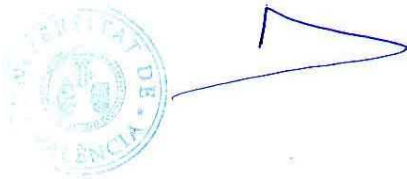
VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA  
Vicerektorat d'Investigació i Política Científica

**DR. PEDRO CARRASCO SORLÍ**  
Presidente del Comit  Ético de Experimentación y Bienestar Animal de la  
Universitat de València

CERTIFICA:

Que, reunido el Comit  Ético de Experimentación y Bienestar Animal el día 9 de febrero de 2009, acordó informar FAVORABLEMENTE la realización en sus instalaciones del protocolo de experimentación animal, presentado en el proyecto titulado "**Modelos pre-clínicos en la evaluación de nuevos fármacos para enfermedades osteoarticulares**", presentado por el Dra. M<sup>a</sup> Luisa Ferrándiz Manglano.

En Valencia, a 9 de febrero de 2009.

A handwritten signature in blue ink is written over a circular blue stamp. The stamp contains the text 'UNIVERSITAT DE VALÈNCIA' around the perimeter and a central emblem. The signature is a stylized, elongated shape.

Carrer: Blasco Ib nez, 13  
VALENCIA 46071

Tel fon: (96) 386 41 09  
Fax: (96) 386 42 24

**D<sup>a</sup>. MARÍA MORALES SUAREZ-VARELA**

*Secretaria del Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Facultat  
de Farmàcia de la Universitat de València*

**I N F O R M A:**

Que, reunido el Comité Etico de Experimentación Animal el día 13 de octubre de 2005, acordó informar FAVORABLEMENTE el proyecto titulado "DADORES DE CO EN LA REGULACIÓN DE LA ARTRITIS REUMATOIDE" presentado por la Dra. M<sup>a</sup> Luisa FERRÁNDIZ MANGLANO.

En Burjassot a trece de octubre de dos mil cinco.



V<sup>o</sup>.B<sup>o</sup>

EL PRESIDENTE

María Morales Suarez-Varela



