

**“Efectos de la hemo oxigenasa-1 en  
modelos celulares de patologías  
inflamatorias crónicas”**

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA BCA. DE CIÈNCIES EDUARD BOSCA DATA: 19-07-2010 SIGNATURA: TD FARMACIA 287 Nº ITEM: 121582610
---

*24 amb*

Tesis doctoral presentada por:

Javier Megías Vericat  
Valencia, junio de 2009



UMI Number: U607777

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607777

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346



**UNIVERSIDAD DE VALENCIA      FACULTAD DE FARMACIA**

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha, acordó otorgar, a esta Tesis doctoral de D. ....JAVIER HEGIAS VERICAT..... la calificación de.....EXCELENT CUM LAUDE Valencia, a...16 de DICIEMBRE de...2009

El Secretario,

El Presidente,

*[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*







## DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA

**María José Alcaraz Tormo**, Catedrática de la *Universitat de València* y  
**María Isabel Guillén Salazar**, Profesora Adjunta de la Universidad Cardenal-  
Herrera-CEU

### CERTIFICAN:

Que el trabajo presentado por el Licenciado **Javier Megías Vericat**, titulado: “Efectos de la hemo oxigenasa-1 en modelos celulares de patologías inflamatorias crónicas” 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, a 29 de junio de 2009**

María José Alcaraz Tormo

María Isabel Guillén Salazar



La presente tesis doctoral ha sido financiada por las siguientes ayudas:

Proyecto Grupos 03/201 concedido por la *Generalitat Valenciana*:

*"Farmacología de la inflamación"*

Proyecto SAF2004-03835 concedido por el Ministerio de Educación y Ciencia-Fondo Europeo de Desarrollo Regional:

*"Mecanismos reguladores de la producción de lesión tisular en la inflamación crónica"*

Proyecto ACOMP06/023 concedido por la *Generalitat Valenciana*:

*"Mecanismos reguladores de la producción de lesión tisular en la inflamación crónica"*

Proyecto ACOMP2007/066 concedido por la *Generalitat Valenciana*:

*"Mecanismos reguladores de la producción de lesión tisular en la inflamación crónica"*

Proyecto SAF2007-61769 concedido por el Ministerio de Educación y Ciencia-Fondo Europeo de Desarrollo Regional:

*"Mecanismos moleculares de activación de las células inflamatorias en la lesión articular"*

Beca predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (FPU) concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia.





## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todos aquellos que han colaborado directa o indirectamente en mi Tesis Doctoral y a los que me han acompañado durante mis años de investigación en el laboratorio:

A mis directoras, las doctoras María José Alcaraz e Isabel Guillén. Por su ayuda constante y su brillante dirección. Por compartir sus conocimientos y experiencia conmigo. Por ser tan exigentes y por haber querido siempre lo mejor para mí. Por confiar en mi forma de trabajar y por su trato personal cercano y afectuoso. Sin su tutela, el desarrollo de esta tesis habría sido imposible.

A los profesores del Departamento de Farmacología, especialmente a los del grupo de inflamación. Al doctor Miguel Payá, que me animó y me motivó a hacer la tesis. A las doctoras Mari Carmen Terencio, Marisa Ferrándiz, Amalia Úbeda y Carmen Montesinos, que han colaborado con su ayuda y asesoramiento al desarrollo de mi tesis doctoral y a mi aprendizaje como estudiante de doctorado y como profesor de prácticas.

Al doctor Jérôme Buserolles, con quien trabajé los primeros años de mi tesis y de quien tanto aprendí. A los doctores Miguel Ángel Castejón, Francisco Gomar y Antonio Bru, por su colaboración desde el hospital. Al doctor Antonio Cuadrado, por su donación de vectores plasmídicos y su instrucción en la transducción de virus. A Ana Flores, por su ayuda en la sección de cultivos celulares. Al personal administrativo y a los técnicos de laboratorio, especialmente a Mamen Arce, que me ha ayudado en las cuestiones burocráticas desde que llegué al departamento.

Al doctor Thomas Aigner y a su equipo en Leipzig: Jochen Haag, Pia Gebhard y Stephan Söder. Por haberme acogido en su laboratorio y en su hogar. Por haberme

dado su amistad y por las enseñanzas que me transmitieron durante mi estancia en Alemania. Por ser un ejemplo de dedicación y entrega a la ciencia.

A la doctora Johanne Martel-Pelletier por acogerme en su grupo y por permitirme participar en sus proyectos, durante mi estancia en Montréal. Por su amabilidad en el trato personal y su accesibilidad, tenacidad y firmeza en lo profesional. A los doctores Jean-Pierre Pelletier, Daniel Lajeunesse, Christelle Boileau, Ginette Tardif y Pascal Reboul y a su equipo técnico: François Mineau, François-Cyril Jolicoeur y Changshan Geng.

A los miembros del tribunal de la tesis y a los expertos evaluadores de la misma, por su esfuerzo en la lectura y la valoración de la tesis y por su amabilidad al aceptar dichas tareas.

A mis compañeros y amigos del laboratorio. Por tantos buenos momentos que hemos pasado juntos y que han dejado muchas veces a la ciencia en un segundo plano. A mi querido grupo de inflamación: María, Nuria, Lidia, Aitana y Rosa, con mención aparte para mis hermanas científicas: Isabel y Victoria. A mis amigas y ya doctoras: Marieta y María Dolores. A todos los compañeros de los otros grupos del Departamento: Vanessa, Nicla, Isabel, Diana, Inma, Nouredinne, a todos los que han pasado por el departamento durante estos años y a los que están empezando la tesis. Y, cómo no, a mis amigos de la CFV: Eduardo, Fermí, Miguel y José Miguel.

Y finalmente a mi familia, sin la cual no sería nadie. Por haber apoyado siempre mis decisiones y por haber estado presentes siempre que les he necesitado.

Gracias a todos.





## **ABREVIATURAS**

---

**ADAMTS:** Desintegrina y metaloproteinasa con dominios de trombospondina

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico

**AP:** Proteína activadora

**Apaf-1:** Factor activador de proteasas de apoptosis-1

**APMA:** Acetato p-aminofenil mercúrico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**ATM:** Ataxia telangiectasia mutada

**ATP:** Adenosín trifosfato

**ATR:** Proteína relacionada con ATM y Rad3

**BMP:** Proteína morfogénica ósea

**BR:** Bilirrubina

**BSA:** Albúmina sérica bovina

**BV:** Biliverdina

**C/EBP:** Proteína de unión e intensificación-CCAAT

**CDK:** Cinasa dependiente de ciclinas

**CEIC:** Comité Ético de Investigación Clínica

**CHK:** Cinasa de punto de control

**Ci:** Curio

**CM:** Cambio de medio

**cols.:** Colaboradores

CORM: Molécula liberadora de monóxido de carbono

CoPP: Cobaltoprotoporfirina IX

CORM-2: Molécula liberadora de CO-2, dímero tricarbonildiclororrutenio (II)

cpm: Cuentas por minuto

CTP: Citidín trifosfato

CXC: Cisteína-aminoácido X-cisteína

Da: Dalton

DAB: Diaminobencidina

DAN: 2, 3-Diaminonaftaleno

DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetilsulfóxido

DO: Densidad óptica

DTT: Ditioneitol

e: Error estándar de la media

ECACC: Colección europea de cultivos celulares

ECL: Sistema de quimioluminiscencia intensificado

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGR-1: Proteína de respuesta de crecimiento temprano-1

EGTA: Ácido etilenglicol-bis ( $\beta$ -aminoetil éter)-N, N, N', N'-tetraacético

EII: Enfermedad inflamatoria intestinal

EMSA: Ensayo de retardo de la movilidad electroforética

EP: Receptor de prostaglandina E

ERK: Cinasa regulada por señales extracelulares

FRET: Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia

GAG: Glicosaminoglicano

GMP:	Guanosín monofosfato
GSK3- $\beta$ :	Glicógeno sintetasa cinasa 3- $\beta$
GTP:	Guanosín trifosfato
h:	Hora
HBSS:	Solución salina equilibrada de Hanks
HeBS:	Tampón salino HEPES
HEPES:	Ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2'-etanesulfónico
HIF-1 $\alpha$ :	Factor inducible por hipoxia-1 $\alpha$
HO:	Hemo oxigenasa
HRP:	Peroxidasa de rábano
IAP:	Proteína inhibidora de apoptosis
ICAM:	Molécula de adhesión intercelular-1
IFN- $\gamma$ :	Interferón- $\gamma$
IgG:	Inmunoglobulina G
IGF:	Factor de crecimiento semejante a la insulina
IGFBP:	Proteína de unión al factor de crecimiento semejante a la insulina
I $\kappa$ B:	Proteína inhibidora de NF- $\kappa$ B
IKK:	Cinasa de I $\kappa$ B
IL:	Interleucina
IL-1Ra:	Antagonista del receptor de IL-1
Indo:	Indometacina
JNK:	Cinasa N-terminal de c-Jun
LPS:	Lipopolisacárido
LSC:	Citometría por láser
LV:	Vector lentiviral





LV-: Vector lentiviral vacío

M-CSF: Factor estimulador de colonias de macrófagos

MAPK: Proteína cinasa activada por mitógenos, MAP cinasa

MEK: Cinasa de la MAPK-ERK

MEM: Medio modificado de Eagle

MKK: Cinasa de la MAPK

MKKK: Cinasa de la cinasa de la MAPK

MKP: Fosfatasa de la MAPK

MLK: Cinasa de linaje mezclado

MMP: Metaloproteínasa de matriz, metaloproteasa de matriz

MMP-1: Colagenasa-1, colagenasa intersticial, metaloproteínasa-1

MMP-2: Gelatinasa A, metaloproteínasa-2

MMP-3: Estromelisina-1, metaloproteínasa-3

MMP-7: Matrilisina-1, metaloproteínasa-7

MMP-8: Colagenasa de neutrófilo, metaloproteínasa-8

MMP-9: Gelatinasa B, metaloproteínasa-9

MMP-10: Estromelisina-2, metaloproteínasa-10

MMP-11: Estromelisina-3, metaloproteínasa-11

MMP-12: Elastasa de macrófago, metaloproteínasa-12

MMP-13: Colagenasa-3, metaloproteínasa-13

mPGES-1: Prostaglandina E sintasa microsomal-1

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

NAT: 1-(H)-Naftotriazol

NE: No específico

NF- $\kappa$ B:	Factor nuclear- $\kappa$ B
NFAT:	Factor nuclear de las células T activadas
NK:	Asesina natural
NOS-2:	Óxido nítrico sintasa-2
Nrf2:	Factor relacionado con el factor eritroide 2
OA:	Osteoartritis, osteoartrítico
p38:	Cinasa p38
PAI-1:	Inhibidor del activador de plasminógeno-1
PBS:	Tampón fosfato salino
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PCNA:	Antígeno nuclear de proliferación celular
PDK	Cinasa dependiente de PIP-3
PGE <sub>2</sub> :	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGES:	Prostaglandina E sintasa
PI3-K:	Fosfatidil-inositol-3 cinasa
PIP-2:	Fosfatidil inositol bifosfato
PIP-3:	Fosfatidil inositol trifosfato
PK:	Proteína cinasa
PMSF:	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPAR- $\gamma$ :	Receptor activado por proliferador de peroxisomas- $\gamma$
PVDF:	Polivinilideno difluoruro
Rb:	Proteína del retinoblastoma
RISC:	Complejo de silenciamiento inducido por ARN
RNS:	Especies reactivas de nitrógeno
ROS:	Especies reactivas de oxígeno

Rpm:	Revoluciones por minuto
SAPK:	Proteína cinasa activada por estrés
SBF:	Suero bovino fetal
SDS:	Sodio dodecilsulfato
siRNA:	ARN de interferencia de tamaño pequeño
SLRP:	Proteoglicano pequeño rico en leucina
SOD:	Superóxido dismutasa
STAT:	Transductor de señal y activador de transcripción
sTNFR:	Receptor soluble de TNF
TAB1 :	Proteína fijadora de proteín cinasa activada por TGF- $\beta$ 1
TACE:	Enzima de conversión del TNF- $\alpha$
TdT:	Desoxinucleotidil transferasa terminal
TGF- $\beta$ :	Factor de crecimiento transformador- $\beta$
Th:	T-colaborador
TIMP:	Inhibidor tisular de metaloproteinasas
TK:	Tirosina cinasa
Tm:	Temperatura de fusión
TNF- $\alpha$ :	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$
TS:	Semejante a trombospondina tipo I
TTP:	Timidín trifosfato
TUNEL:	Marcaje del extremo libre con dUTP y mediado por TdT
U:	Unidad
VCAM-1:	Molécula de adhesión celular vascular
VEGF:	Factor de crecimiento endotelial vascular

# ÍNDICE

---

1. RESUMEN/ABSTRACT.....	23
2. INTRODUCCIÓN.....	29
2.1. La hemo oxigenasa-1.....	31
2.1.1. Descripción e isoformas de la enzima.....	31
2.1.2. La inducción de HO-1.....	32
2.1.3. El CO y los CORM.....	33
2.2. La enfermedad inflamatoria intestinal.....	36
2.2.1. La apoptosis.....	36
2.2.2. Las alteraciones en el ciclo celular.....	40
2.2.3. La inflamación.....	45
2.2.4. Las metaloproteinasas de matriz.....	51
2.2.5. La cascada de las MAP cinasas.....	54
2.2.6. Los factores de transcripción.....	56
2.2.6.1. El factor nuclear- $\kappa$ B.....	56
2.2.6.2. La proteína activadora-1.....	58
2.2.6.3. El factor inducible por hipoxia-1.....	59
2.2.6.4. La proteína de respuesta de crecimiento temprano-1.....	60
2.2.6.5. La proteína de unión e intensificación-CCAAT.....	60
2.2.7. Papel de la HO-1 en las EII.....	61
2.3. La osteoartritis.....	63
2.3.1. Fisiología del cartílago sano.....	63
2.3.1.1. Las articulaciones sinoviales.....	63
2.3.1.2. El cartílago articular.....	64
2.3.1.3. Composición del cartílago articular.....	65
2.3.1.4. El colágeno.....	66
2.3.1.5. El agregano.....	67
2.3.2. Fisiopatología del cartílago OA.....	69

2.3.2.1. Las MMP en la OA.....	69
2.3.2.2. La degradación de la matriz extracelular en la OA.....	71
2.3.2.3. Los factores de crecimiento.....	73
2.3.3. La inflamación.....	74
2.3.4. El estrés oxidativo.....	78
2.3.5. La cascada de las MAP cinasas y los factores de transcripción....	82
2.3.6. Papel de la HO-1 en la OA.....	83
3. OBJETIVOS.....	85
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	89
4.1. Cultivos celulares.....	91
4.1.1. Cultivo de la línea celular Caco-2.....	91
4.1.2. Cultivo primario de condrocitos en monocapa.....	93
4.1.3. Cultivo tridimensional de condrocitos en alginato.....	95
4.1.4. Cultivo de explantes de cartílago.....	97
4.2. Tratamientos de los cultivos celulares.....	99
4.2.1. Inhibición de la expresión génica por interferencia de ARN.....	99
4.2.2. Transducción de vectores virales en cultivos tridimensionales de condrocitos.....	101
4.2.3. Productos y estímulos.....	104
4.3. Técnicas experimentales.....	107
4.3.1. Evaluación de la citotoxicidad de los productos por el ensayo del MTT.....	107
4.3.2. Ensayo de apoptosis y necrosis por citometría láser.....	110
4.3.3. Medida de la apoptosis por la técnica TUNEL.....	111
4.3.4. Ensayo de ciclo celular.....	112
4.3.5. Ensayo de degradación de glicosaminoglicanos.....	114
4.3.6. Ensayo de síntesis de proteoglicanos.....	115
4.3.7. Inmunocitoquímica.....	116
4.3.8. Medida del estrés oxidativo.....	118

4.3.9. Determinación de la actividad metaloproteínasa.....	119
4.3.10. Determinación de la producción de nitrito.....	120
4.3.11. Determinación de la producción de PGE <sub>2</sub> .....	121
4.3.12. Cuantificación de proteínas por ELISA.....	122
4.3.13. Análisis por Western blot.....	125
4.3.14. Transfección transitoria de plásmidos para ensayos de actividad luciferasa.....	131
4.3.15. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética.....	133
4.3.16. Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.....	135
4.3.17. Análisis estadístico y expresión de resultados.....	139
<b>5. RESULTADOS EN LA LÍNEA CELULAR Caco-2.....</b>	<b>141</b>
5.1. Efectos de la CoPP y del CORM-2 sobre la respuesta inflamatoria en la línea celular Caco-2.....	143
5.1.1. Estudio comparativo de los efectos de la CoPP y el CORM-2 sobre la producción de mediadores inflamatorios en células Caco-2 estimuladas con citocinas.....	143
5.1.2. Efecto del CORM-2 sobre la producción de óxido nítrico.....	144
5.1.3. Efecto del CORM-2 sobre la producción de IL-8.....	146
5.1.4. Efecto del CORM-2 sobre la inducción de MMP-7.....	147
5.1.5. Efecto del CORM-2 sobre la IL-6.....	148
5.1.6. Efecto del CORM-2 sobre la activación de NF-κB, AP-1 y C/EBP.....	151
5.1.7. Efecto del CORM-2 sobre la activación de las enzimas MAPK...	154
5.2. Efectos citoprotectores de la CoPP y el CORM-2 en la línea celular Caco-2.....	156
5.2.1. Efectos de la inducción de HO-1 por CoPP y del CORM-2 sobre la apoptosis inducida por la privación de suero.....	156
5.2.2. Efectos de la inducción de HO-1 por CoPP y del CORM-2 sobre las alteraciones del ciclo celular inducidas por la privación de suero.....	157

5.2.3. Efectos de la inducción de HO-1 por CoPP y del CORM-2 sobre la expresión de proteínas reguladoras de la apoptosis.....	159
5.2.4. Efecto del siRNA para HO-1, la bilirrubina y la biliverdina sobre la apoptosis y la activación de Akt.....	162
<b>6. RESULTADOS EN CONDROCITOS OSTEOARTRÍTICOS.....</b>	<b>165</b>
6.1. Efectos de la inducción de HO-1 por CoPP en el metabolismo del condrocito osteoartrítico.....	167
6.1.1. Inducción de HO-1 por CoPP en condrocitos primarios.....	167
6.1.2. Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre la degradación y síntesis de la matriz extracelular.....	168
6.1.3. Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre las enzimas degradativas del cartílago.....	172
6.1.4. Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre la producción de IGF-1.....	175
6.1.5. Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre la apoptosis.....	176
6.1.6. Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre el estrés oxidativo.....	177
6.1.7. Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre la producción de NO y PGE <sub>2</sub> .....	179
6.1.8. Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre la producción de TNF- $\alpha$ e IL-1Ra.....	184
6.1.9. Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre la activación de las enzimas MAPK.....	185
6.1.10. Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre la activación de factores de transcripción.....	186
6.2. Efectos de la molécula liberadora de CO CORM-2 sobre el metabolismo del condrocito osteoartrítico.....	189
6.2.1. Efecto del CORM-2 sobre la degradación y síntesis de la matriz extracelular.....	189
6.2.2. Efecto del CORM-2 sobre las enzimas degradativas del cartílago.....	192

6.2.3. Efecto del CORM-2 sobre la producción de IGF-1.....	195
6.2.4. Efecto del CORM-2 sobre la apoptosis.....	196
6.2.5. Efecto del CORM-2 sobre el estrés oxidativo.....	196
6.2.6. Efecto del CORM-2 sobre la producción de NO y PGE <sub>2</sub> .....	197
6.2.7. Efecto del CORM-2 sobre la producción de TNF- $\alpha$ e IL-1Ra.....	199
6.2.8. Efecto del CORM-2 sobre la activación de las enzimas MAPK...	200
6.2.9. Efecto del CORM-2 sobre la activación de factores de trans- cripción.....	201
7. DISCUSIÓN.....	205
7.1. Efectos de la CoPP y el CORM-2 en la línea celular Caco-2.....	207
7.2. Efectos de la CoPP y del CORM-2 en el metabolismo del condrocito osteoartrítico.....	211
8. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	219
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	223
10. ANEXOS.....	277
10.1. Artículos publicados durante el desarrollo de la presente tesis doctoral...	
10.2. Informe del Comité Ético de Investigación Clínica.....	281





## ***1. RESUMEN/ABSTRACT***



La actividad de la enzima hemo oxigenasa-1 (HO-1) cataliza la degradación del grupo hemo originando: monóxido de carbono (CO), biliverdina y hierro. La HO-1 se induce por estrés oxidativo o nitrosativo, citocinas y otros mediadores producidos durante los procesos inflamatorios. La HO-1 ha demostrado tener un papel protector en diferentes modelos de enfermedades inflamatorias, *in vivo* e *in vitro*. Nuestro objetivo fue estudiar los potenciales efectos protectores de esta enzima en dos modelos celulares relacionados con patologías inflamatorias crónicas como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y la osteoartritis (OA). En este estudio, la HO-1 fue inducida por cobalto protoporfirina IX (CoPP). También empleamos una molécula liberadora de CO (CORM-2) para evaluar los efectos de este metabolito derivado de la actividad HO-1.

Como modelo *in vitro* de inflamación intestinal se utilizó la línea celular enterocítica Caco-2 en dos condiciones experimentales diferentes: con estimulación por citocinas proinflamatorias y en condiciones de estrés celular, por incubación en medio de cultivo sin suero durante periodos de tiempo prolongados.

En condiciones proinflamatorias, las células se estimularon con interleucina (IL)-1 $\beta$ , factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interferón- $\gamma$  a diferentes tiempos. El CORM-2 disminuyó la expresión de ARNm de la óxido nítrico sintasa-2 (NOS-2) y la producción de nitrito, así como la expresión de ARNm y proteína de IL-8, IL-6 y metaloproteínasa-7 (MMP-7). Los estudios de cinética y el uso de ARN de interferencia mostraron que la inhibición de IL-6 tiene un papel en la regulación de la expresión de MMP-7 por CORM-2. Estos efectos del CORM-2 podrían ser dependientes de la modulación de NF- $\kappa$ B, AP-1 y C/EBP; y de la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$ , JNK1/2, p38 y ERK1/2. Estos hallazgos muestran las propiedades antiinflamatorias de los CORM y sus posibles aplicaciones en la EII.

En condiciones de estrés celular, las células se incubaron en medio sin suero durante 168 horas. La privación de suero indujo apoptosis, redujo la fosforilación de Akt y p38, e incrementó los niveles de p21<sup>Cip/WAF1</sup>. La inducción de HO-1 por tratamiento con CoPP aumentó la resistencia a la apoptosis, activó al Akt, redujo los niveles de p21<sup>Cip/WAF1</sup> y modificó la razón Bcl-2/Bax hacia la supervivencia. Por el contrario, el CORM-2 no produjo efectos significativos. La cronificación de la inflamación intestinal puede provocar cáncer colorrectal. Nuestros resultados apoyan una función antiapoptótica de la HO-1 en estas células. De este modo, la

expresión aumentada de HO-1 podría favorecer la resistencia de los enterocitos al estrés inducido por limitación de nutrientes.

Como modelo *in vitro* de OA, se utilizaron cultivos primarios de condrocitos osteoartroíticos. En la OA, la elevada expresión de enzimas catabólicas y la producción endógena de mediadores inflamatorios implica la pérdida de la homeostasis del cartílago. La IL-1 $\beta$ , un inductor catabólico e inflamatorio importante en la OA, se empleó como estímulo en nuestros ensayos. El aumento de la expresión de HO-1 por la CoPP y la liberación de CO por el CORM-2 redujeron significativamente la degradación de glicosaminoglicanos provocada por la IL-1 $\beta$  en explantes de cartílago OA e incrementó su síntesis en condrocitos primarios OA. Estos efectos fueron acompañados por la inhibición en la expresión de las colagenasas MMP-1 y MMP-13 y un incremento en el contenido de agrecano y colágeno II. Además, el CORM-2 redujo la actividad agrecanasa y disminuyó la expresión de MMP-3, MMP-10 y ADAMTS-5, mientras que la inducción de HO-1 por CoPP incrementó el factor anabólico IGF-1. Tanto la CoPP como el CORM-2 fueron capaces de reducir la apoptosis, el estrés oxidativo y la producción de mediadores inflamatorios en nuestro modelo. Ambos disminuyeron la producción de PGE<sub>2</sub> por inhibición de la expresión de mPGES-1, aunque sin efectos notables sobre la COX-2. De hecho, sólo el CORM-2 mostró un leve efecto sobre la expresión de COX-2. Además, el CORM-2 disminuyó la producción de NO al inhibir la NOS-2, redujo la expresión de TNF- $\alpha$  y aumentó la producción de IL-1Ra. El CORM-2 y la CoPP redujeron la activación de NF- $\kappa$ B y de HIF-1 $\alpha$ , y la CoPP también redujo la activación de EGR-1. La inhibición de la activación de ERK1/2 y p38 por CoPP y CORM-2 podría mediar los efectos observados en condrocitos OA. Estos resultados confirman el efecto protector de la inducción de HO-1 y de la liberación de CO en condrocitos OA, lo cual tiene un interés potencial en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y degenerativas de la articulación.

*Palabras clave:* hemo oxigenasa-1, cobalto protoporfirina IX, moléculas liberadoras de monóxido de carbono, células Caco-2, condrocito, osteoartritis, citocinas, interleucina-1 $\beta$ , inflamación.

Heme oxygenase (HO) activity catalyzes the degradation of heme into carbon monoxide (CO), biliverdin and iron. HO-1 is induced by oxidative or nitrosative stress, cytokines and other mediators produced during inflammatory processes. HO-1 has demonstrated a protective role in different *in vivo* and *in vitro* models of inflammatory diseases. Our objective was studying the potential protective effects of this enzyme in two cellular models related with chronic inflammatory diseases like inflammatory bowel disease (IBD) and osteoarthritis (OA). In this study, HO-1 was induced by cobalt protoporphyrin IX (CoPP). We also used a carbon monoxide-releasing compound (CORM-2) to assess the effects of CO, metabolite derived from HO activity.

As an *in vitro* model of bowel inflammation we used the enterocytic cell line Caco-2 in two different experimental conditions: stimulation with pro-inflammatory cytokines and in cellular stress conditions, by incubating with culture medium without serum for long periods of time.

In pro-inflammatory conditions, cells were stimulated with interleukin (IL)-1 $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interferon- $\gamma$  for different times. CORM-2 significantly decreased the mRNA expression of nitric oxide synthase-2 (NOS-2) and the production of nitrite. IL-8, IL-6 and matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) mRNA and protein were also significantly reduced by CORM-2. Time-course and small interfering RNA studies suggested that inhibition of IL-6 plays a role in the regulation of MMP-7 expression by CORM-2. These effects of CORM-2 can be dependent on the modulation of NF- $\kappa$ B, AP-1, C/EBP and the phosphorylated forms of I $\kappa$ B $\alpha$ , JNK1/2, p38 and ERK1/2. These findings provide new insights into the anti-inflammatory properties of CORMs and their potential applications in the control of intestinal inflammatory processes.

In cellular stress conditions, cells were incubated in medium without serum during 168 hours. Serum deprivation induced apoptosis, reduced Akt and p38 phosphorylation, and increased p21<sup>Cip/WAF1</sup> levels. HO-1 induction by treatment with CoPP resulted in resistance to apoptosis, activation of Akt, reduction in p21<sup>Cip/WAF1</sup> levels and modification of Bcl-2/Bax ratio towards survival. In contrast, CORM-2 did not exert significant effects. Chronification of the bowel inflammation is a cause of appearance of colorectal cancer. Our results support an antiapoptotic role for HO-1 in these cells and provide a mechanism by which

overexpression of HO-1 may promote enterocyte resistance to stress in conditions of limited nutrient supply.

As an *in vitro* OA model, we used primary cultures of osteoarthritic chondrocytes. In OA, the increased expression of catabolic enzymes and the endogenous production of inflammatory mediators leads to the dysregulation of cartilage homeostasis. IL-1 $\beta$ , an important catabolic and inflammatory inducer in OA, was used as a stimulus in our experiments. Up-regulation of HO-1 by CoPP and release of CO by CORM-2 significantly reduced glycosaminoglycan degradation elicited by IL-1 $\beta$  in OA cartilage explants but increased glycosaminoglycan synthesis in OA chondrocytes in primary culture. This was accompanied by a significant inhibition in the expression of collagenases MMP-1 and MMP-13 and an increase of the aggrecan and collagen II content. Moreover, CORM-2 reduced aggrecanase activity and down-regulated MMP-3, MMP-10 and ADAMTS-5 in OA chondrocytes, whereas HO-1 induction by CoPP increased the anabolic factor IGF-1. Both CoPP and CORM-2 inhibited apoptosis and oxidative stress, and reduced the production of pro-inflammatory mediators in our model. They decreased PGE<sub>2</sub> production by inhibiting the expression of mPGES-1 but with no relevant effects on COX-2. In fact, only CORM-2 showed low effects on COX-2 expression. In addition, CORM-2 diminished NO production by inhibiting NOS-2 and reduced TNF- $\alpha$  expression but enhanced IL-1Ra production. CORM-2 and CoPP significantly reduced the activation of NF- $\kappa$ B and HIF-1 $\alpha$ , and CoPP also reduced the activation of EGR-1. Our results indicate that the inhibition of ERK1/2 and p38 activation by CoPP and CORM-2 may mediate the effects observed on OA chondrocytes. These results confirm the protective role of HO-1 induction and CO release in OA chondrocytes and suggest the potential interest of this strategy in the development of therapeutical approaches for inflammatory and degenerative joint diseases.

*Keywords:* heme oxygenase-1, cobalt protoporphyrin IX, carbon monoxide-releasing molecules, Caco-2 cells, chondrocyte, osteoarthritis, cytokines, interleukin-1 $\beta$ , inflammation.

## ***2. INTRODUCCIÓN***





## **2.1. LA HEMO OXIGENASA-1**

### **2.1.1. Descripción e isoformas de la enzima**

La hemo oxigenasa (HO) es la enzima que cataliza la degradación oxidativa del grupo hemo procedente del metabolismo de las hemoproteínas, generando biliverdina, monóxido de carbono (CO) y hierro (Tenhunen y cols., 1968). La biliverdina es reducida posteriormente a bilirrubina por la biliverdina reductasa (Tenhunen y cols., 1968), 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 la carboxihemoglobina (revisado en Weaver y cols., 1999).

Han sido descritas tres isoformas de la HO: una inducible denominada hemo oxigenasa-1 (HO-1) y dos constitutivas, HO-2 y HO-3. La HO-1 fue la primera identificada como una enzima microsomal que podía ser regulada por iones metálicos (Maines y Kappas, 1974; Kutty y Maines, 1989). Posteriormente se identificó la HO-2 (Maines y cols., 1986; McCoubrey, Jr. y cols., 1992), que se encuentra en elevadas concentraciones en cerebro y testículos, aunque también ha sido localizada en endotelio, músculo liso vascular, hepatocitos y en el epitelio tubular de riñón de rata (Grozdanovic y Gossrau, 1996). La HO-2 podría participar en el mantenimiento de la homeostasis del organismo mediante la formación de CO, que tendría un papel como mediador en la señalización celular (Snyder y cols., 1998). El papel fisiológico de la HO-3 no está bien caracterizado y ha sido muy poco estudiado. Algunos estudios demostraron una actividad catalítica bastante menor que las otras dos isoformas y sugirieron un papel regulador en procesos celulares que dependen del grupo hemo (McCoubrey, Jr. y cols., 1997). Más recientemente, se describió que no existen genes HO-3 funcionales en la rata (Hayashi y cols., 2004).

A pesar de que tanto la bilirrubina como el CO son tóxicos a altas concentraciones y de que el hierro libre cataliza la formación de radicales libres e induce estrés oxidativo, existen numerosas evidencias de que la inducción de HO-1 tiene un papel protector y puede ser considerada como parte de una respuesta

defensiva frente al estrés (Alcaraz y cols., 2003). De hecho, tanto la bilirrubina como la biliverdina han demostrado propiedades antioxidantes (Stocker y Peterhans, 1989; Stocker y cols., 1987). Además, ambos pigmentos biliares ejercen efectos antimutagénicos por captación de radicales libres e inhibición de los efectos de agentes como hidrocarburos aromáticos policíclicos o aminas heterocíclicas (revisado en Bulmer y cols., 2008).

La HO-1 es inducida y expresada por gran variedad de estímulos como pueden ser: el grupo hemo y otros oxidantes, endotoxina, citocinas proinflamatorias, especies oxigenadas reactivas, hipoxia, hiperoxia, metales pesados, etc. La inducción de HO-1 es una defensa frente al estrés oxidativo (Stocker, 1990), previniendo el daño oxidativo al ADN tras la exposición de las células al shock por calor, especies oxigenadas reactivas (Minisini y cols., 1994) o alteraciones en el ADN y el ciclo celular (Kushida y cols., 2002). La expresión de esta enzima se ha asociado a un gran número de situaciones patológicas incluyendo inflamación, fiebre, shock endotóxico, etc. La presencia de la HO-1 en ellas podría ser parte de una respuesta adaptativa frente al daño producido en procesos inflamatorios, como queda patente en numerosos modelos tanto *in vivo* como *in vitro* (revisado en Alcaraz y cols., 2003). Evidencias recientes indican también el papel beneficioso de la HO-1 y de uno de sus metabolitos, la bilirrubina, en la aterosclerosis y la reestenosis tras angioplastia (Ishikawa, 2003). Además, la HO-1 puede inhibir la apoptosis en muchos tipos celulares como las células T (Pae y cols., 2004; Choi y cols., 2004) y células endoteliales (Brouard y cols., 2000). También existen datos que apoyan la hipótesis de que la HO-1 tiene un papel importante en la función cardiovascular, con efectos reguladores de la presión arterial y protectores en el daño por isquemia-reperfusión (revisado en Perrella y Yet, 2003).

### **2.1.2. La inducción de HO-1**

La HO-1 puede ser inducida por diferentes agentes tanto *in vivo* en animales como *in vitro* en cultivos celulares por su sustrato, la hemo, y por diversas sustancias no relacionadas con el grupo hemo, como son ciertos elementos de

transición y metales pesados como el cobalto, el cadmio, el zinc, el estaño o el plomo (Mitani y cols., 1993). El mecanismo de acción por el cual el grupo hemo induce HO-1 implica la estabilización de la actividad del factor de transcripción Nrf2 (Alam y cols., 2003), mientras que los metales pesados mediarían la inducción de la enzima por interacción con un fragmento del gen de HO-1 denominado SX2 (Alam, 1994).

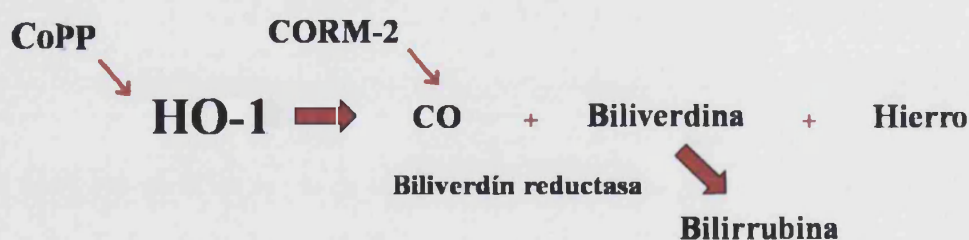
La molécula inductora de HO-1 cobaltoprotoporfirina IX (CoPP) posee una estructura de porfirina y contiene un átomo de cobalto central. Como se ha mencionado previamente, los iones de metales pesados como el  $\text{Co}^{2+}$  son inductores de HO-1 (Maines y Kappas, 1974). Además, la molécula de protoporfirina IX, como precursora natural del grupo hemo, también actúa por sí misma como inductora de dicha enzima (Alam y cols., 1989). Por todo ello, la CoPP, resulta un potente inductor de HO-1. La HO-1 también es inducida por agentes que producen estrés oxidativo, como el peróxido de hidrógeno, por lo que la inducción de HO-1 se ha identificado como una respuesta del organismo frente al daño producido por los agentes oxidantes. El óxido nítrico, las radiaciones UV o la menadiona también pueden tener efectos inductores sobre la HO-1 en determinadas condiciones (revisado en Ryter y cols., 2006).

### **2.1.3. El CO y los CORM**

El CO es un gas incoloro e inodoro que, a dosis altas, resulta letal. No obstante, el CO no es únicamente un gas tóxico, ya que durante los últimos años numerosos estudios han puesto de manifiesto su participación en diversos procesos fisiológicos, gracias a su potente actividad como bi mensajero. Estos efectos fisiológicos de señalización del CO se han relacionado con su producción endógena por la actividad HO, tanto basal como inducida. A estos niveles de producción, el CO ha mostrado efectos antiinflamatorios, antiproliferativos y antiapoptóticos (Ryter y cols., 2006), como inhibidor de la agregación plaquetaria (Wagner y cols., 1997), modulador del tono cardiovascular (Motterlini y cols., 1998) y gastrointestinal (Watkins y cols., 2004), inhibidor de la contracción uterina durante

el embarazo (Acevedo y Ahmed, 1998) o regulador de la función endocrina de los islotes pancreáticos (Henningsson y cols., 1999). La aplicación exógena de CO produce efectos similares a los de la HO-1 en diversos modelos experimentales, aunque resulta complicado determinar si las dosis de CO en estudio representan los niveles de CO liberados por esta enzima o difieren de los fisiológicos. Los efectos de la señalización por CO implican varios mecanismos bien definidos, siendo la modulación de la actividad guanilato ciclasa, con la subsiguiente producción de GMP cíclico uno de los más comunes. Otros mecanismos incluyen la modulación de la activación de MAP cinasas y la estimulación de la actividad de canales de potasio dependientes de calcio (Ryter y Otterbein, 2004).

**Esquema 1.** Reacción enzimática de la HO-1. Inducción de HO-1 por CoPP y liberación de CO por CORM-2.



Las moléculas liberadoras de monóxido de carbono (CORM) son una clase de fármacos, desarrollados por el Dr. Motterlini y sus colaboradores (Clark y cols., 2003; Motterlini y cols., 2002), capaces de reproducir las acciones biológicas del CO derivado de la actividad de la HO-1 (revisado en Foresti y cols., 2005). Estos compuestos contienen un átomo central de un elemento metálico, que está coordinado con grupos carbonilo. Uno de los prototipos de esta serie de moléculas, que ha sido estudiado en la presente tesis, se denomina CORM-2 o  $[\text{Ru}(\text{CO}_3\text{Cl}_2)]$ , con rutenio como átomo central y con carácter hidrofóbico. Estudios recientes han mostrado las propiedades vasoactivas (Foresti y cols., 2004) y cardioprotectoras (Clark y cols., 2003) de este grupo. Es interesante mencionar que dichos CORM han mostrado propiedades antiinflamatorias en algunas líneas celulares, incluidas

## *Introducción*

---

los macrófagos RAW 264.7 (Sawle y cols., 2005) y microglía (Bani-Hani y cols., 2006). También pueden regular las interacciones leucocito-célula endotelial (Urquhart y cols., 2007) y han demostrado efectos antiinflamatorios en el modelo de artritis inducida por colágeno en ratón (Ferrándiz y cols., 2008).



## **2.2. LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL**

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un trastorno caracterizado por una inflamación crónica del tracto intestinal, que evoluciona de modo recurrente y que se debe a una respuesta inmunitaria exagerada frente a la flora bacteriana en la mucosa intestinal, en la que intervienen factores ambientales y genéticos.

La EII se manifiesta como dos entidades clínicas distintas, la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, aunque a veces se expresan de manera solapada. La primera afecta al colon y es una enfermedad ulcerativa superficial, mientras que la segunda es una enfermedad transmural de carácter granulomatoso que afecta preferentemente al íleon terminal y el colon, aunque puede afectar a cualquier parte del tubo digestivo (Blumberg y Strober, 2001). Ambas formas pueden asociarse con manifestaciones extraintestinales como: fiebre, pérdida de peso, retraso en el crecimiento, lesiones mucocutáneas y una mayor incidencia de cáncer gastrointestinal. Estas enfermedades se presentan relativamente pronto en individuos jóvenes y persisten durante largos periodos, afectando a la calidad de vida y aumentando la morbimortalidad. Su incidencia es mayor en países occidentales desarrollados y sus factores de riesgo más destacados serían el medio ambiente, la dieta y las prácticas culturales (Thoreson y Cullen, 2007). A continuación describiremos, de manera general, algunos de los procesos fisiopatológicos de importancia en estas enfermedades.

### **2.2.1. La apoptosis**

La muerte celular puede dividirse en dos procesos de acuerdo con las características morfológicas y bioquímicas que se den en el momento de la misma. Estos dos procesos son la necrosis y la apoptosis.

La necrosis es la muerte celular accidental, provocada por múltiples factores como toxinas bacterianas, daño traumático-tóxico, isquemia o hiperactivación enzimática focal. En la necrosis, la célula y las mitocondrias se hinchan hasta que se rompe la membrana, observándose una picnosis nuclear. La rotura de la

membrana libera enzimas al exterior que a su vez matan a sus células vecinas, produciéndose un proceso inflamatorio y una cicatriz fibrosa. La degeneración del ADN y la alteración de la homeostasis iónica son también características de la necrosis. Es un proceso que puede llegar a ser reversible a nivel tisular si se elimina el estímulo inductor.

La apoptosis es conocida como “muerte celular programada” y es un proceso muy diferente a la necrosis. En un periodo de tiempo muy corto mueren gran cantidad de células sin que se produzcan reacciones inflamatorias ni lesiones en los tejidos en los que ocurre. La célula se separa de sus células vecinas al perder sus moléculas de adhesión, se condensa el núcleo y se fragmenta, se altera la integridad de membrana mitocondrial, los cromosomas se parten en fragmentos regulares y finalmente, por acción de las proteasas sobre las proteínas citoesqueléticas, se forman vesículas con restos celulares denominadas cuerpos apoptóticos, que son rápidamente absorbidos por las células contiguas. La apoptosis es esencial en la embriogénesis, el desarrollo fetal, en la maduración del sistema inmune y en la homeostasis inmune. A diferencia de la necrosis, la apoptosis es un proceso irreversible (revisado en Marchetti, 2005). El proceso apoptótico se puede desencadenar por la carencia de factores de crecimiento (como la ausencia de suero en nuestro modelo experimental), por modificación de moléculas de membrana (Fas, el receptor del factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , entre otras), al recibir radiaciones ionizantes, por agentes químicos, etc.

Las cisteín-proteasas, comúnmente llamadas caspasas (Alnemri y cols., 1996) son enzimas cuya actividad es necesaria para la activación de la apoptosis. Se denominan caspasas por ser cisteín-proteasas que hidrolizan su sustrato junto a un residuo de ácido aspártico. La mayoría de las caspasas están relacionadas con la apoptosis, si bien seis de ellas se asocian a procesos inflamatorios. Las que participan en la apoptosis se dividen en dos grandes grupos: caspasas iniciadoras (8, 9, 2 y 10), que se activan en respuesta a señales apoptóticas y activan a las caspasas efectoras (3, 6 y 7), que degradan los sustratos celulares (Thornberry y Lazebnik, 1998).



## *Introducción*

---

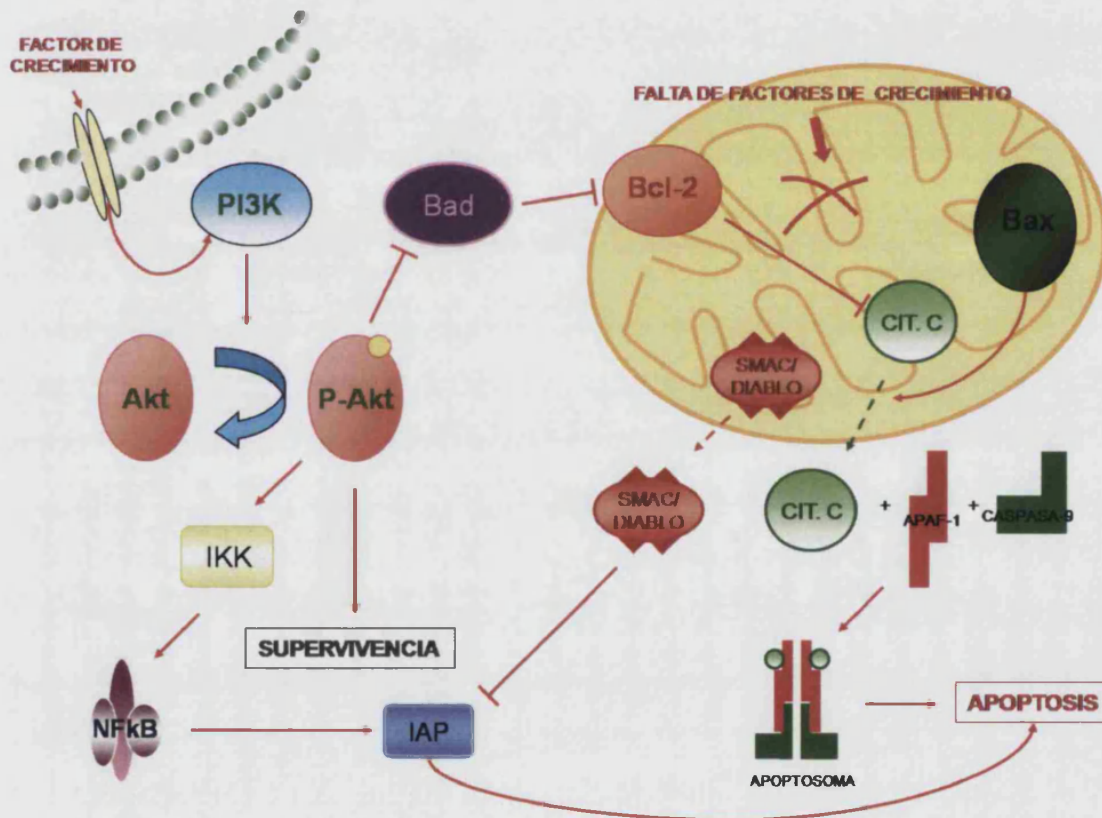
Los principales reguladores intracelulares de la apoptosis son los miembros de la familia Bcl-2, algunos de los cuales inhiben la muerte celular (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1), mientras que otros la activan (Bax, Bad, Bak, Bid) (Adams y Cory, 1998). Ambos tipos pueden heterodimerizar, de modo que su concentración nos puede indicar si la célula se encamina a la apoptosis o a la supervivencia (Oltvai y cols., 1993). Estas proteínas se anclan en la cara citoplásmica de las membranas de la mitocondria, retículo endoplásmico y envoltura nuclear, de manera que pueden registrarse los daños producidos en dichos organelos (Green y Reed, 1998).

Existen diferentes procesos celulares que conducen a la apoptosis, uno de ellos es por alteraciones en la mitocondria (ver figura 1). Así, el daño mitocondrial (por falta de factores de crecimiento o por toxinas, por ejemplo) libera al citocromo C y a la proteína Smac/DIABLO, ambas moléculas proapoptóticas, en el citoplasma. El citocromo C forma un complejo con Apaf-1 (factor activador de proteasas de la apoptosis-1) y con la procaspasa-9 denominado apoptosoma, lo cual lleva a la activación de la caspasa-9. La caspasa-9 activa a la caspasa-3 y finalmente se activan los sustratos de la muerte celular como la gelsolina, actina y otros, se produce la fragmentación de ADN y la muerte por apoptosis. La proteína Smac/DIABLO bloquea a las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP), una familia de inhibidores de caspasas. Ambos procesos contribuyen a una fuerte activación de caspasas y, por tanto, a la apoptosis (Jiang y Wang, 2004).

La función proapoptótica de la proteína Bax (y otras como Bad, Bim, Noxa o Puma) está relacionada con la integridad de la mitocondria, ya que podría formar poros en la membrana mitocondrial externa por donde se liberaría el citocromo C (De Giorgi y cols., 2002), desencadenándose el proceso anteriormente descrito. La presencia de Bcl-2 o de Bcl-X<sub>L</sub> en la mitocondria podría inhibir el desplazamiento del citocromo C de la misma al citosol, ejerciendo su papel antiapoptótico (Kluck y cols., 1997; Cheng y cols., 2001). No obstante, las proteínas Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> no sólo podrían prevenir la liberación del citocromo C sino que podrían prevenir también la activación de caspasas, ya que se ha comprobado que la sobreexpresión de Bcl-2 o Bcl-X<sub>L</sub> bloquea la apoptosis desencadenada por microinyección de citocromo C

(Brustugun y cols., 1998). Además, Bcl-2 prolonga la supervivencia después de la salida del citocromo C de la mitocondria inducida por Bax (Rosse y cols., 1998).

**Figura 1.** Proceso apoptótico desencadenado por daño mitocondrial y contrarrestado por factores de crecimiento.



Los defectos en los procesos apoptóticos son una característica de la patogénesis de la EII, tanto en la enfermedad de Crohn como en la colitis ulcerosa (revisado en Verstege y cols., 2006). En la EII, los linfocitos T de la lámina propia se encuentran en un elevado grado de activación y presentan una mayor resistencia a la apoptosis, lo que conduce a una acumulación local de células T y a la perpetuación de la respuesta inflamatoria (Boirivant y cols., 1999) y un mayor riesgo de aparición de cáncer (revisado en Sturm y cols., 2008). Esta resistencia se ha atribuido a la IL-6, que se expresa en las EII y que estimula la cascada de expresión de genes de acción antiapoptótica en células T del intestino (Atreya y cols., 2000).

### 2.2.2. Las alteraciones en el ciclo celular

El ciclo celular se compone de dos etapas fundamentales, llamadas *interfase* y *fase M* o fase de división. La *interfase* es la parte más larga del ciclo y en ella la célula crece continuamente, mientras que durante la *fase M* la célula se divide.

La *interfase* se divide en:

- Fase  $G_1$ : Es el intervalo entre la consumación de la mitosis y el comienzo de la síntesis de ADN. Durante  $G_1$  la célula supervisa su entorno y su propio tamaño y, cuando llega el momento, da un paso decisivo que le conducirá a la replicación del ADN y a la consumación del ciclo de división celular. Las células en  $G_1$  pueden, si no han iniciado la replicación de ADN, detener su progresión en el ciclo y entrar en un estado de reposo especial, llamado  $G_0$ , donde pueden permanecer durante un tiempo indefinido antes de volver a proliferar.

- Fase S: Es la parte de la interfase en la que se produce la replicación del ADN.

- Fase  $G_2$ : Es el lapso entre el final de la síntesis de ADN y el principio de la mitosis. Proporciona un tiempo de seguridad, que permite a la célula asegurarse de que la replicación de ADN se ha completado, antes de comenzar la mitosis. Tanto  $G_1$  como  $G_2$  proporcionan un tiempo adicional para el crecimiento: si la interfase sólo durara lo necesario para que se produjera la replicación de ADN, la célula no tendría tiempo suficiente para duplicar su masa antes de dividirse.

La *fase M* se compone de la mitosis (división nuclear) y citocinesis (fisión celular), y ocupa una fracción pequeña del ciclo celular total.

- La mitosis se compone de profase, metafase, anafase y telofase. El material sintetizado en la fase S se separa para dar lugar a dos células hijas idénticas.

- La citocinesis, considerada como el fin de la fase M, consiste en la división de la célula por el centro en dos (Alberts y cols., 1996).

Se sabe que el ciclo celular tiene dos puntos de control, uno en la fase  $G_1$  y otro en la fase  $G_2$ . Estas fases constituyen lapsos que permiten solventar problemas como reparar daños en el ADN y corregir errores en la replicación. Muchos factores metabólicos, de estrés y ambientales son integrados e interpretados durante estos periodos, y en respuesta a ellos la célula decide detener su ciclo o avanzar hacia las fases S y M, respectivamente. La interpretación y ejecución de estas señales por parte de la célula es una labor delicada y no es de extrañar que los errores producidos en este proceso impliquen problemas mayores como el desarrollo de tumores.

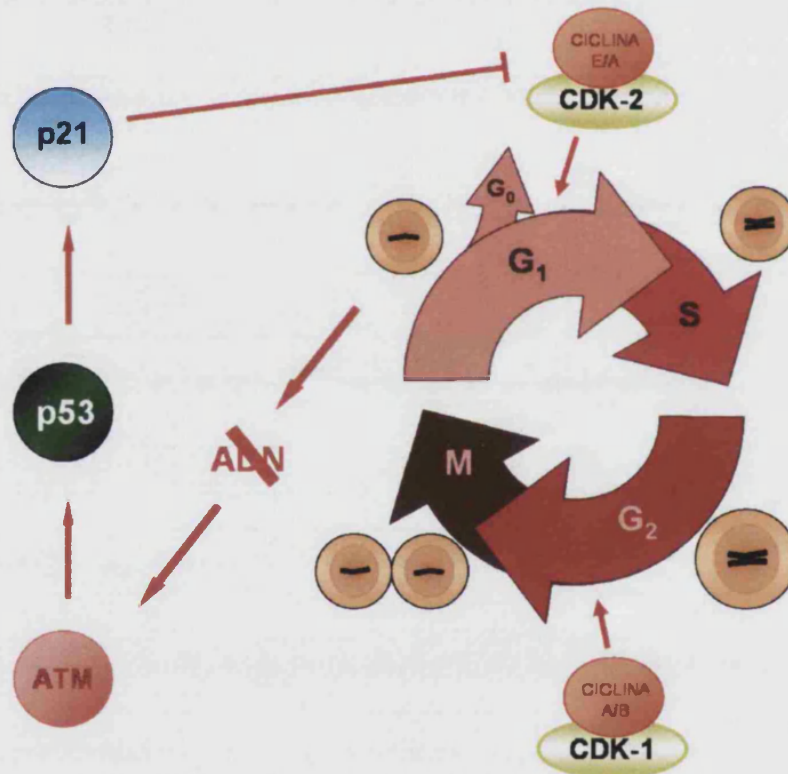
Las cinasas dependientes de ciclinas o CDK, son enzimas que requieren la unión a una ciclina para ser catalíticamente competentes. Los complejos CDK-ciclina permiten la transición de las fases  $G_1$  y  $G_2$  del ciclo a las fases S y M respectivamente, y son regulados por fosforilación y por interacción de proteínas. La asociación de la cinasa CDK2 con la ciclina E o la ciclina A es el motor de la transición de  $G_1$  a S mientras que el complejo CDK1-ciclina A o CDK1-ciclina B impulsa el paso de  $G_2$  a M (Murray, 2004).

Durante la fase  $G_1$ , la falta de ciclina E limita la entrada en fase S en células que acaban de emerger de la mitosis y en células en reposo mitótico. Los factores de transcripción E2F de cuya actividad depende la expresión de ciclina E, están secuestrados por la proteína Rb (proteína del retinoblastoma), mientras la proteína p27 Kip1 inhibe a la CDK2. La llegada de un estímulo mitogénico aumenta las cantidades de ciclina D, que forma un complejo con las cinasas CDK4/6. Esta unión CDK4/6-ciclina D neutraliza a p27 Kip1 y fosforila e inactiva a Rb, liberando los factores E2F que aumentan la expresión de ciclina E y favoreciendo el entrada del ciclo en fase S. El daño en el ADN activa la vía ATM (ataxia telangiectasia mutada)-p53, que previene la activación del complejo CDK2-ciclinaE/A a través de la proteína p21<sup>Waf1/Cip1</sup>, deteniendo el ciclo en  $G_1$  (figura 2).

En la fase  $G_2$  el complejo CDK1-ciclina A/B hace posible la entrada en mitosis, y la drástica degradación de las ciclinas A y B al comienzo de la anafase media la salida de la misma. La replicación defectuosa del ADN durante la fase S activa la

vía ATR-CHK1 (proteína relacionada con ATM y Rad3-cinasa de punto de control 1) que previene la activación de CDK1 y la mitosis prematura (Massagué, 2004).

**Figura 2.** Parada del ciclo celular en fase G1 por alteraciones en el ADN y activación de la cascada de ATM/p53.



La enzima ATM cinasa reconoce roturas en el ADN y activa a CHK2 (cinasa de punto de control 2), iniciándose así la vía ATM-p53. El gen supresor tumoral p53 codifica para una proteína llamada p53. La función de la proteína p53 es detectar la existencia de daños en el ADN, detener el ciclo celular para que éstos sean reparados y conducir a la célula a la apoptosis, en caso de que estos daños sean peligrosos para las futuras células hijas. Así, evita que el material genético acumule mutaciones que podrían desencadenar un proceso canceroso. Si el gen supresor de tumores p53 quedara dañado o mutara, la célula perdería este sistema de control, quedando expuesta a posibles mutaciones que se acumularían y se transmitirían a

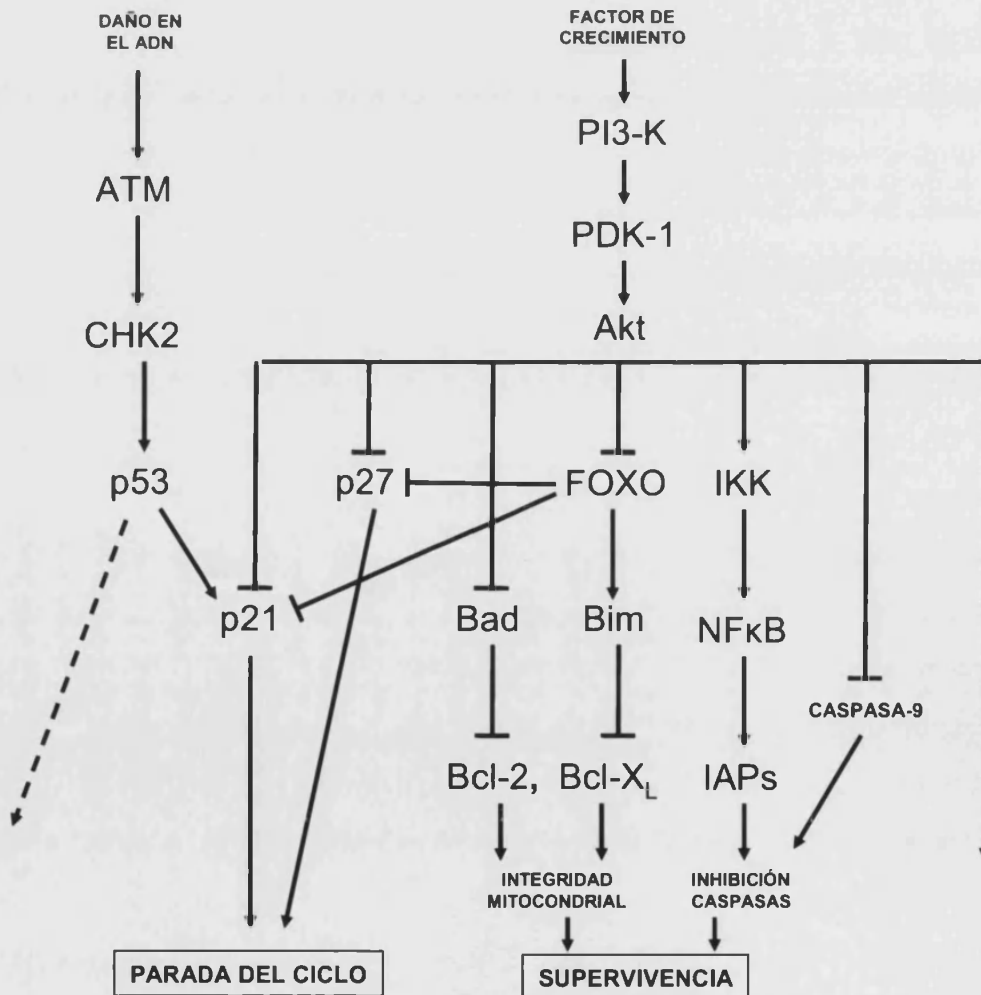
su descendencia. Si estas mutaciones llegaran a afectar a algún protooncogén se generaría un proceso canceroso.

Las especies reactivas de oxígeno son activadores potentes de p53 (Martindale y Holbrook, 2002), que actúa como un sensor de estrés genotóxico y aumenta la expresión de genes que median la detención del ciclo celular y la apoptosis (revisado en Colman y cols., 2000). Entre estos genes se incluye WAF1 (o Cip1) (el Deiry y cols., 1993), cuyo producto de 21 kDa, la proteína p21<sup>Waf1/Cip1</sup> parece ser un inhibidor universal de la actividad de las CDK, y forma complejos con CDK-ciclinas y con el antígeno PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular). Esta unión de p21<sup>Waf1/Cip1</sup> al complejo CDK2-ciclina E/A previene la fosforilación de la proteína Rb por el complejo y la subsiguiente inactivación de Rb, la cual es esencial para el progreso del ciclo celular. La proteína p21<sup>Waf1/Cip1</sup> es un inhibidor potente y reversible del progreso del ciclo celular en los puntos de control G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, presumiblemente para dar suficiente tiempo a la reparación completa del ADN. No obstante, la inducción de p21<sup>Waf1/Cip1</sup> como respuesta a daño en el ADN puede ser dependiente de p53 o independiente (Zhang y cols., 2000). La inducción de p21<sup>Waf1/Cip1</sup> dependiente de p53 produce la detención del ciclo celular en la fase G<sub>1</sub>, debido a la inhibición de la actividad CDK y de la replicación de ADN dependiente de PCNA. El gen WAF1 ha sido identificado como un gen implicado en la senescencia celular y la expresión aumentada de p21<sup>Waf1/Cip1</sup> tiene como consecuencia la supresión de tumores por su inhibición de las enzimas CDK.

Cabe destacar la participación de la proteína Akt (o proteína-quinasa-B) en los procesos relacionados con la regulación del ciclo celular y la apoptosis. La activación de esta proteína se inicia con la unión de factores de crecimiento a sus receptores de membrana (ver figura 1), lo cual activa la vía de la PI3-K (fosfatidilinositol-3 cinasa) (Kulik y Weber, 1998). La cinasa PI3-K activada fosforila a varios fosfolípidos de membrana para generar fosfatidilinositol trifosfato (PIP-3). El PIP-3 es el encargado de fijar a la membrana a dos cinasas: PDK-1 (cinasa dependiente de PIP-3-1) y Akt. La proteína Akt sufre entonces un cambio conformacional y su centro activo queda expuesto. La cinasa PDK-1 fosforila a la proteína Akt activándola, que a su vez fosforila a la proteína Bad y a la caspasa-9,

comprometiendo su función apoptótica. La fosforilación de Bad libera a Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> de su unión a la misma, y les permite que ejerzan su acción antiapoptótica. De manera opuesta a este proceso, con la ausencia de factores de crecimiento la proteína Akt permanecerá defosforilada y por tanto inactivada, y Bad unida a Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub>, impidiendo de este modo sus acciones antiapoptóticas y favoreciendo la muerte celular.

Esquema 2. Cascadas de ATM/p53 y PI3-K/Akt.



La proteína Akt participa además en la activación de cinasas CDK de dos modos:

- Previene la proteólisis de ciclina D por fosforilación de la glicógeno sintetasa cinasa-3 beta (GSK3-β).
- Inhibe a los factores de transcripción FOXO, evitando la expresión de proteínas como p21<sup>Waf1/Cip1</sup>, p27 Kip1 o la proapoptótica Bim.

La proteína Akt fosforilada también inhibe directamente a p21 y p27 evitando la parada del ciclo celular en la fase G<sub>1</sub> y, por lo tanto, promoviendo la supervivencia celular. Además la proteína Akt actúa por medio del complejo de IκB cinasa (IKK). Estas enzimas activan el factor nuclear-κB (NF-κB), que induce la expresión de Bcl-X<sub>L</sub> para la preservación de la integridad mitocondrial y de las proteínas IAP para inhibir caspasas. IKK también fosforila a FOXO, marcándolo para su salida del núcleo y su destrucción (Massagué, 2004). Las fosfatasas PTEN y SHIP inhiben esta ruta mediante la desfosforilación de la posición 3 de los PIP-3. La inhibición del gen supresor de tumores PTEN está relacionada con la actividad Akt aumentada en muchos cánceres (Stiles y cols., 2002).

### 2.2.3. La inflamación

La inflamación es una respuesta fisiológica e inespecífica del organismo ante estímulos de tipo mecánico, químico o microbiano. Es una respuesta protectora, controlada por el organismo, que intenta aislar y destruir al agente dañino y limitar y reparar la lesión producida, aunque en ocasiones la falta de control autolimitante puede traer consigo la cronificación de los procesos inflamatorios, dando lugar a patologías crónicas como son la enfermedad inflamatoria intestinal o la osteoartritis.

La activación de los principales tipos celulares implicados en la inflamación (neutrófilos y monocitos/macrófagos) conlleva la generación de toda una serie de mediadores inflamatorios, que actúan de manera conjunta mediante un mecanismo de cooperación de gran complejidad. Entre estos mediadores inflamatorios



## *Introducción*

---

destacan: las citocinas proinflamatorias, los metabolitos de la ruta del ácido araquidónico y el óxido nítrico.

En el ser humano, la respuesta inmunitaria normal del intestino está dirigida hacia la vía Th1 (Macdonald y Monteleone, 2001). Tanto en la enfermedad de Crohn como en la colitis ulcerosa, se liberan gran cantidad de citocinas por parte de células diferentes dentro de la misma cascada inflamatoria que, en muchas ocasiones, actúan de forma sinérgica. De entre las células productoras de citocinas en el tejido de la EII destacan: macrófagos, linfocitos y células epiteliales (Kakazu y cols., 1999).

Las citocinas son autacoides polipeptídicos que tienen un papel clave en la respuesta inmune, en la respuesta inflamatoria y en la hematopoyesis. Se sintetizan en respuesta a un estímulo activador y ejercen su actividad de un modo secuencial y coordinado, con el fin de mantener la homeostasis (Hanada y Yoshimura, 2002). En la EII, se encuentran aumentadas las concentraciones de las citocinas proinflamatorias: IL-1 $\beta$ , factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-6, IL-8, IL-2, IL-15, IL-18, y los miembros de la familia de la IL-12 entre otros (Autschbach y cols., 2002). A pesar de que hay diferencias en el perfil de citocinas de los linfocitos T activados en ambas enfermedades inflamatorias, causantes del inicio y del mantenimiento de la inflamación, una vez que se produce el reclutamiento de macrófagos y de linfocitos de sangre periférica los mediadores inflamatorios son comunes a ambos trastornos (Autschbach y cols., 2002). En células del epitelio intestinal, las citocinas proinflamatorias activan al NF- $\kappa$ B, que regula la transcripción de óxido nítrico sintasa-2, IL-8, IL-6, metaloproteinasas de matriz (MMP) y otras moléculas implicadas en inflamación crónica intestinal y cáncer (Roebuck, 1999; Jobin y Sartor, 2000). Además, también aumentan sus oponentes antiinflamatorios y el equilibrio entre ambos grupos es lo que finalmente determina el curso de la enfermedad (Strober y cols., 1997).

Se ha observado que el IFN- $\gamma$  es uno de los mediadores más importantes de la inflamación en el intestino y su expresión se ha relacionado directamente con el daño tisular en varios procesos inflamatorios propios de este tejido (Macdonald, 1999; León y cols., 2005). El IFN- $\gamma$ , principal inductor de la actividad bactericida

de los macrófagos, es capaz de estimular la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (clases I y II) y de moléculas coestimuladoras en las células presentadoras de antígeno (como macrófagos y células dendríticas). Con el proceso inflamatorio instaurado, el IFN- $\gamma$  también participa en la estimulación recíproca entre macrófagos y linfocitos T, mediante la producción por parte de estas células de IFN- $\gamma$  y de IL-12, respectivamente. Otro efecto del IFN- $\gamma$  es inducir la diferenciación de las células Th vírgenes hacia el fenotipo Th1 y la inhibición de la proliferación de la subpoblación Th2 (Boehm y cols., 1997). Estos efectos biológicos del IFN- $\gamma$  dependen de la actividad de una cascada de factores activadores de la transcripción, entre los que se encuentra el transductor de señal y activador de transcripción 1 (STAT1), que regulan la expresión génica al unirse a las regiones promotoras en el núcleo (Schreiber y cols., 2002).

Otra citocina de gran importancia en los procesos inflamatorios es el TNF- $\alpha$ . Los macrófagos activados son los principales productores de TNF- $\alpha$ , que interviene en múltiples actividades como la acumulación de neutrófilos, formación de granulomas, inducción de la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio y otros muchos efectos. El TNF- $\alpha$  actúa de forma sinérgica con la IL-1 $\beta$ , si bien el TNF- $\alpha$  siempre se ha relacionado con la inflamación aguda y la IL-1 $\beta$  tendría un papel más preponderante en mantener la inflamación de manera crónica. El TNF- $\alpha$  se produce como un precursor inactivo unido a la membrana. Para que se active es necesaria la presencia de la enzima de conversión del TNF- $\alpha$  (TACE). Se han descubierto dos receptores solubles distintos para el TNF- $\alpha$ , de 55 y 75 kDa (sTNFR55 y sTNFR75). El significado biológico de estos receptores depende de su concentración en los tejidos. Pequeñas concentraciones pueden actuar estabilizando la molécula del TNF- $\alpha$ , al aumentar su vida media. Sin embargo, concentraciones altas pueden reducir la actividad biológica del TNF- $\alpha$ , al competir con los receptores de membrana por unirse a éste (revisado en López-Armada y cols., 2007). En la EII, los macrófagos, localizados en la lámina propia, son la principal fuente de TNF- $\alpha$  (Rugtveit y cols., 1997). Esta citocina participa activamente en

## *Introducción*

---

los procesos inflamatorios de las EII, aumentando la permeabilidad de la mucosa intestinal (Gibson, 2004) y ejerciendo efectos citostáticos sobre las células epiteliales, pudiendo inducir la apoptosis de los enterocitos cuando actúa sinérgicamente con el IFN- $\gamma$  (Guy-Grand y cols., 1998; Kaiser y Polk, 1997). El aumento de la expresión de TNF- $\alpha$  es proporcional al grado de lesión en la enfermedad de Crohn, pero no en la colitis ulcerosa (Breese y cols., 1994) y se ha descrito una relación directa entre el aumento de la expresión de TNF- $\alpha$  y el de IL-1 $\beta$  en la enfermedad de Crohn (Reimund y cols., 1996).

La IL-1 incluye dos proteínas diferentes, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , que juegan papeles centrales en la inflamación crónica y aguda, tanto localmente como sistémicamente (Dinarello, 2005). La IL-1 $\beta$  humana se sintetiza en muy diversos tipos celulares (Wewers y cols., 1997; da Cunha y cols., 1993; Skundric y cols., 1997), y lo hace como procitocina (269 aminoácidos), que es escindida por la enzima convertidora de IL-1 $\beta$  en la forma madura de la IL-1 $\beta$  (153 aminoácidos, 17 kDa) y en un prosegmento (Thornberry y cols., 1992). La función más extensamente estudiada de la IL-1 $\beta$  es el inicio de la inflamación. La endotoxina bacteriana y una gran variedad de sustancias inflamatorias no microbianas inducen la producción de IL-1 $\beta$ , la cual induce a las células del endotelio capilar a secretar quimiocinas y a incrementar la expresión de moléculas de adhesión (como E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1) (Kupper y Groves, 1995). Junto con la IL-12, la IL-1 $\beta$  induce secreción de INF- $\gamma$  por parte de las células asesinas naturales o “natural killer” (NK), resultando en una activación de macrófagos dependiente de INF- $\gamma$  (Billiau y Matthys, 2009). La IL-1 $\beta$  también induce la expresión de MMP, conduciendo a la degradación de la matriz extracelular y a la migración de los monocitos, además de catalizar la degradación de las metaloproteinasas como sistema de retroalimentación negativa de la propia citocina. No obstante, los efectos de la IL-1 $\beta$  no se limitan únicamente a la inflamación sino que esta citocina también está asociada a otras condiciones como la regulación fisiológica de IGF/GH (factor de crecimiento semejante a la insulina/hormona de crecimiento), la formación y

remodelación del hueso o la inducción de fiebre, entre otras (Delhanty, 1998; Kusano y cols., 1998; Hansen y cols., 1998).

La IL-1 $\beta$ , presente en la EII, comparte muchos efectos con el TNF- $\alpha$ . Es producida principalmente por los granulocitos y los macrófagos de la lámina propia y su expresión es especialmente intensa en las ulceraciones (Autschbach y cols., 1998). Cuando se realiza un cultivo *in vitro* de biopsias (Reimund y cols., 1996), se observa una correlación entre el grado de afectación de la mucosa y la cantidad de IL-1 $\beta$  detectada en el sobrenadante del cultivo en las dos patologías, lo que indica que las células mononucleares se encuentran en un elevado grado de activación en ambas situaciones.

La IL-6 se produce en diversos tipos celulares y ejerce sus efectos en diferentes órganos (Kallen, 2002). La IL-6 se identificó como inductora de la proliferación de células B (Hirano y cols., 1985) y de la respuesta de fase aguda en el hígado (Baumann y Gauldie, 1990). Se han encontrado niveles elevados de esta citocina en inflamación aguda y crónica, y en patologías inflamatorias crónicas como la EII (Podolsky, 2002). La participación de la IL-6 en la EII es clave, ya que induce al factor de transcripción STAT3, que induce a los factores antiapoptóticos Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub>. Así, se produce un círculo vicioso en el que aumenta la resistencia a la apoptosis de las células T, lo que implica una acumulación de las mismas y la cronificación de los procesos inflamatorios (Mudter y Neurath, 2007). Otras citocinas proinflamatorias relevantes en las patologías intestinales son la IL-12, factor inductor clave de las respuestas Th1, y la IL-18, capaz de potenciar la expresión de IFN- $\gamma$  sinérgicamente con la IL-12 (Yoshimoto y cols., 1998).

Las quimiocinas son un conjunto de citocinas de pequeño tamaño que desempeñan una función central en muchos procesos homeostáticos y patológicos de la biología humana. Las quimiocinas coordinan el reclutamiento, activación y hospedaje de leucocitos durante las diferentes fases, innata y adaptativa, de la inflamación (Rot y von Andrian, 2004). Una alteración de su expresión o función puede provocar la cronificación de la inflamación. La IL-8, un miembro de la subfamilia de quimiocinas CXC (con dos cisteínas separadas por otro aminoácido cerca del extremo amino terminal) específica de neutrófilos, es un potente factor

## *Introducción*

---

activador y quimiotáctico de dichos neutrófilos. Se produce por diferentes tipos celulares como monocitos/macrófagos, fibroblastos o condrocitos en respuesta a estímulos proinflamatorios como la IL-1 $\beta$  o el TNF- $\alpha$ . Su función principal es atraer a los neutrófilos al lugar de la inflamación (Aukrust y cols., 2008).

Frente a los procesos desencadenados por las citocinas proinflamatorias se encuentran las citocinas antiinflamatorias, que regulan y contrarrestan esas acciones. Entre ellas cabe destacar el TGF- $\beta$ , que promueve la restitución del epitelio intestinal y estimula el crecimiento y la diferenciación de células del mesénquima, tales como los fibroblastos (Pierce y cols., 1989), y la IL-10 que inhibe la síntesis de citocinas inflamatorias y actúa sobre la proliferación y diferenciación de las células T (Fiorentino y cols., 1991).

El óxido nítrico (NO) actúa como mediador en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos en el cuerpo humano y, en concreto, es uno de los mediadores más importantes que participan en el proceso inflamatorio. Se sintetiza por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) a partir de L-arginina, oxígeno molecular y NADPH. Se han identificado tres isoformas de la enzima NOS. Las NOS constitutivas se aislaron inicialmente en el cerebro (NOS-1) y en el endotelio vascular (NOS-3), son dependientes de calcio y calmodulina y desarrollan funciones fisiológicas. La tercera isoforma es la NOS inducible, conocida como NOS-2 o iNOS. La NOS-2 está implicada en acciones fisiopatológicas y el NO sintetizado por ella tiene funciones reguladoras, proinflamatorias o degradativas. Se expresa en diversos tipos celulares como enterocitos, condrocitos, macrófagos o fibroblastos en respuesta a estímulos inflamatorios e inmunológicos como citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) (revisado en Knowles y Moncada, 1994; Payá y cols., 1997). La activación de la NOS-2 da lugar a un aumento de la producción de NO en el foco inflamatorio, produciendo vasodilatación y aumento del flujo sanguíneo y de la permeabilidad de los vasos. Además, el NO reacciona con el anión superóxido formando peroxinitrito (ONOO $^-$ ), una especie reactiva de nitrógeno, que junto con las especies reactivas de oxígeno contribuye al aumento del estrés celular con reacciones de oxidación, nitración o nitrosación, provocando alteraciones a nivel celular y generando toxicidad (revisado en Liaudet y cols., 2000). En la EII, la

inducción aumentada de NOS-2 produce elevados niveles de NO, que tienen un papel importante en la patogénesis de la enfermedad (Middleton y cols., 1993; Boughton-Smith y cols., 1993) y que aumentarían el daño tisular por estrés oxidativo debido a la formación de radicales peroxinitrito y a la nitración de proteínas celulares (Singer y cols., 1996).

#### 2.2.4. Las metaloproteinasas de matriz

El catabolismo proteico se lleva a cabo por enzimas proteolíticas denominadas proteasas, entre las cuales destacan las MMP. Las MMP son un conjunto de enzimas endopeptidasas dependientes de calcio y cinc sintetizadas por diferentes células del tejido conectivo, que juegan un papel importante en procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo la remodelación de la matriz extracelular, embriogénesis, curación de heridas, inflamación, artritis y cáncer. En la matriz extracelular, por tanto, cumplen una función fisiológica, si bien un aumento de su síntesis y de su función puede dar lugar a la degradación excesiva de sus componentes y, por tanto, provocar la lesión tisular.

**Figura 3.** Estructura general de las MMP. Basado en Medina y cols., 2004.



Funcionalmente, las MMP se definen por las siguientes características: por su dependencia del cinc e inhibición por parte de sus quelantes, por ser secretadas al espacio extracelular como zimógenos inactivos (proformas), por requerir un proceso proteolítico para su activación y por ser reguladas por los inhibidores

## *Introducción*

---

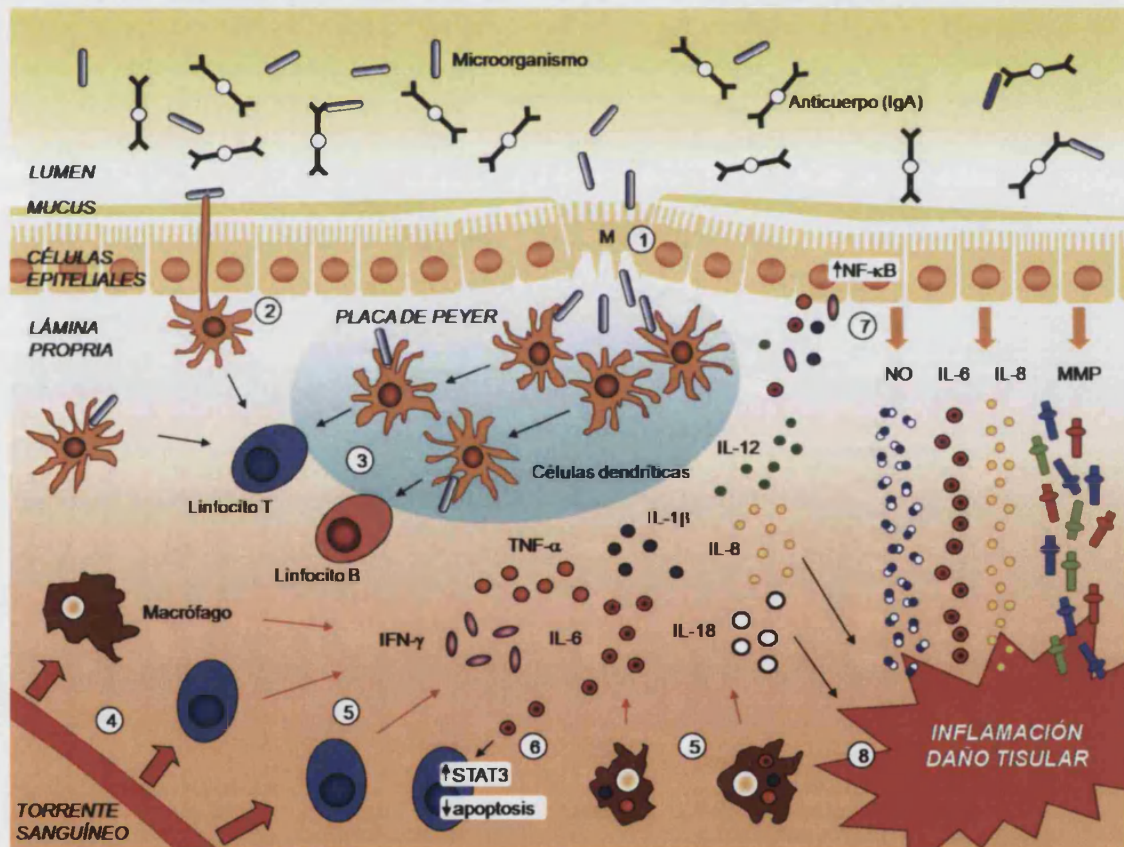
tisulares de MMP (TIMP) y por  $\alpha$ 2-macroglobulina (Nagase y Woessner, Jr, 1999). Las MMP tienen una estructura molecular similar: un dominio propeptídico, que mantiene en latencia a la enzima hasta la activación por alguna señal bioquímica; el dominio catalítico, por donde se une al sustrato; y la región C-terminal, implicada en el reconocimiento específico del sustrato (Medina y cols., 2004).

Existen diferentes tipos de MMP según su localización celular y especificidad de sustrato y están clasificadas en cinco grandes grupos: colagenasas, gelatinasas, estromelisininas, agrecanasas y metaloproteinasas de membrana (Nagase y cols., 1992). Las colagenasas, entre ellas la MMP-1 (colagenasa intersticial) y la MMP-8 (colagenasa neutrofilica), tienen capacidad de digerir colágeno intersticial de los tipos I, II y III. Las gelatinasas, como la MMP-2 (gelatinasa A) y la MMP-9 (gelatinasa B), pueden degradar colágeno tipo IV y gelatina. Las estromelisininas, entre ellas la MMP-3 (estromelisinina 1), pueden degradar una gran variedad de componentes de la matriz extracelular, como proteoglicanos, colágeno tipo IV, fibronectina y laminina (Borkakoti, 1998). Las agrecanasas, como las del subgrupo ADAMTS (que podríamos traducir como “desintegrina y metaloproteinasas con dominios de trombospondina”), se encargan de la degradación del proteoglicano agrecano. Finalmente, las denominadas metaloproteinasas de membrana (MT-MMP), tienen por función activar las MMP liberadas al espacio extracelular, particularmente a la MMP-2 y a la colagenasa 3 (Knauper y cols., 1996b).

Las MMP y sus inhibidores endógenos se han relacionado con diversas enfermedades del tracto gastrointestinal, tales como la EII (Baugh y cols., 1999) y los estadios tempranos del cáncer colorrectal (Nosho y cols., 2005). Varias citocinas proinflamatorias, como la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ , pueden estimular la síntesis y la liberación de las MMP por parte de células del tejido conectivo, como se ha demostrado en diversas enfermedades inflamatorias (revisado en Medina y cols., 2004). De hecho, se ha demostrado la presencia de concentraciones elevadas de MMP en zonas intestinales inflamadas de pacientes con EII (von Lampe y cols., 2000) y el aumento de su actividad y expresión en modelos animales (Tarlton y cols., 2000; Medina y cols., 2003). En estas patologías intestinales, la activación de

los linfocitos T de la lámina propia de la mucosa intestinal produce una destrucción importante de las vellosidades mediada por la activación de las MMP (Pender y cols., 1997).

**Figura 4.** Procesos que desencadenan la inflamación crónica en la EII.



En la EII, se produce una reacción inmunitaria anormal frente a una gran variedad de antígenos luminales y microorganismos. Las células dendríticas (presentadoras de antígenos) captan los antígenos desde el lumen hasta las placas de Peyer a través de las células M (1), o de manera directa (2). Las células dendríticas presentan dichos antígenos a linfocitos vírgenes B y T (3). Se produce el reclutamiento de linfocitos y macrófagos de la sangre periférica (4). Tanto los linfocitos como los macrófagos liberan mediadores inflamatorios (5). La IL-6 induce al factor de transcripción STAT3, que induce factores antiapoptóticos, aumentando la resistencia a la apoptosis de las células T (6). Las citocinas proinflamatorias inducen al factor NF- $\kappa$ B en las células epiteliales, produciéndose la liberación de NO, citocinas y MMP (7). Los procesos de liberación de mediadores inflamatorios por parte de macrófagos, linfocitos y células epiteliales contribuyen a la cronificación de la inflamación y el daño tisular (8).

En concreto, la MMP-7 se produce por células epiteliales en el tracto digestivo y podría mediar muy diversas respuestas celulares. Esta enzima podría participar en la curación de heridas, dirigiendo la migración de células epiteliales tras el daño tisular (Salmela y cols., 2004). Se cree que la MMP-7 podría ser un mediador clave



en la inflamación intestinal (Wielockx y cols., 2004) y cáncer de colon (Witty y cols., 1994; Newell y cols., 2002), así como marcador de actividad relacionado con la displasia y cáncer en pacientes con colitis ulcerosa (Matsuno y cols., 2003). No en vano, la inhibición de MMP-7 como diana ha sido propuesta como nueva opción terapéutica para la inflamación intestinal asociada a enterocolitis necrotizante (Bister y cols., 2005) y algunos otros trastornos inflamatorios (Wielockx y cols., 2004).

### **2.2.5. La cascada de las MAP cinasas**

Las proteín-cinasas activadas por mitógenos o MAP cinasas (MAPK) son enzimas capaces de regular las vías de señalización intracelulares que controlan procesos como la apoptosis, proliferación, diferenciación, expresión génica de MMP o inducción génica de citocinas. Para ello, estas moléculas funcionan conectando los receptores de la superficie celular con los factores de transcripción en el núcleo, los cuales regulan los procesos celulares. Dentro de esta familia de cinasas, podemos destacar tres: la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK), la cinasa N-terminal de c-Jun (JNK) y la cinasa p38 (p38) (Malemud, 2007). La activación de la cascada de las MAPK se lleva a cabo por, al menos, siete proteín-cinasas (PK) pertenecientes a la familia de proteínas MEK (cinasas de las MAPK-ERK) y MKK (cinasas de las MAPK) (Malemud, 2004). El proceso de activación comienza cuando el complejo Ras-GTP activo se fija al dominio regulador de una enzima MKKK (cinasa de la cinasa de la MAPK), una serín treonín cinasa que, de este modo, queda activada. La activación de esta enzima provoca su liberación y la siguiente fosforilación y activación de una cinasa MKK. Finalmente, la MKK fosforila y activa a la MAPK, que es capaz de fosforilar a muy diversos sustratos, hasta ser inactivada por las fosfatasa de la MAPK o MKP (Malemud, 2004).

De las enzimas MAPK conocidas como ERK, los subtipos ERK1 y ERK2 son los más abundantes y los que más han sido estudiados (Chang y Karin, 2001; Pouyssegur y cols., 2002), si bien existen otras formas como ERK3, 5, 7 y 8

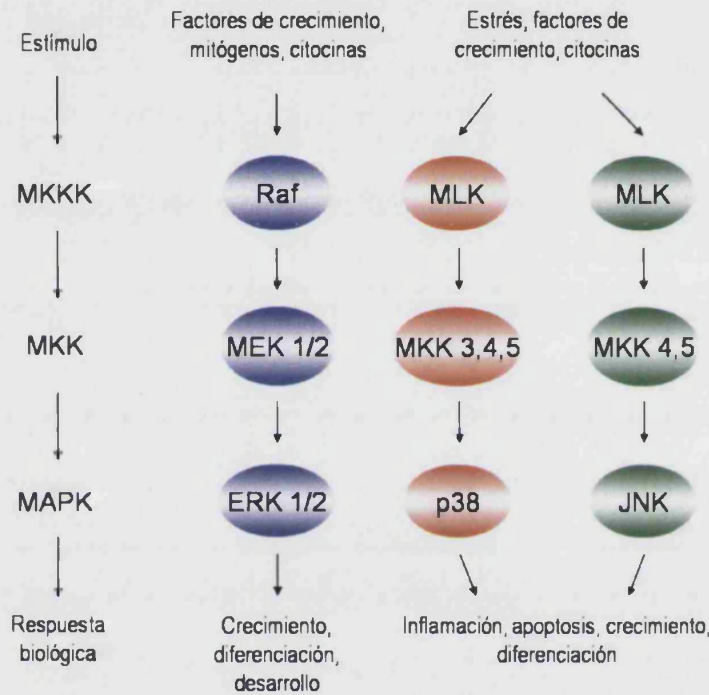
(Boulton y cols., 1991). Las cinasas ERK1 y 2 (también llamadas p44 y p42, respectivamente) pueden ser estimuladas por citocinas, factores de crecimiento o estrés físico, entre otros estímulos. Las MAPK anteriores en la vía de señalización, MEK1 y MEK2 activan a ERK1 y ERK2 por fosforilación de ambas.

La cinasa p38 tiene varias formas homólogas: p38 $\alpha$ , p38 $\beta$  y p38 $\beta$ 2, entre otras (Hale y cols., 1999). La proteína p38 se activa como respuesta a una gran variedad de estímulos extracelulares: citocinas proinflamatorias, lipopolisacárido, radiación U.V., anisomicina, y factores de crecimiento. La activación de la MAPK p38 está mediada por otras cinasas entre las que se incluyen MKK3, MKK4 y MKK6 (Han y cols., 1996). Existen otras vías alternativas de activación de p38, como la interacción con TAB1 (proteína fijadora de proteín cinasa activada por factor de crecimiento transformador- $\beta$ -1) y autofosforilación de p38 $\alpha$  (Ge y cols., 2002). La vía de la p38 juega un papel esencial en la regulación de ciertos procesos como son inflamación, diferenciación celular, crecimiento celular y apoptosis (revisado en Ono y Han, 2000). La isoforma más estudiada de esta cinasa es p38 $\alpha$ , dada su implicación en la inflamación, con su papel modulador de la expresión génica de COX-2 y de NOS-2, así como el control de la producción de NO inducida por citocinas (Guan y cols., 1999b; Guan y cols., 1999a). En relación con la apoptosis, p38 puede estar implicada en la fosforilación de Akt en células epiteliales (Shiue y cols., 2005).

La cinasa JNK, también conocida como proteín-cinasa activada por estrés (SAPK), se encuentra en tres formas llamadas JNK1, JNK2 y JNK3. JNK1 y 2 se encuentran distribuidas en muchos tejidos, mientras que JNK3 se encuentra expresada mayoritariamente en el cerebro (Malemud, 2006). Las cinasas JNK son activadas por fosforilación vía MKK4 y MKK7. La importancia fisiológica de JNK se sustenta en su capacidad de unirse y fosforilar a la proteína de unión al ADN c-Jun, aumentando la actividad transcripcional de la misma (Kallunki y cols., 1994). La proteína c-Jun es un componente del complejo de la proteína activadora-1 (AP-1), crítico en la regulación génica de citocinas y MMP (Burrage y cols., 2006; Malemud, 2007).



Esquema 3. Esquema simplificado de las cascadas de las MAPK.



### 2.2.6. Los factores de transcripción

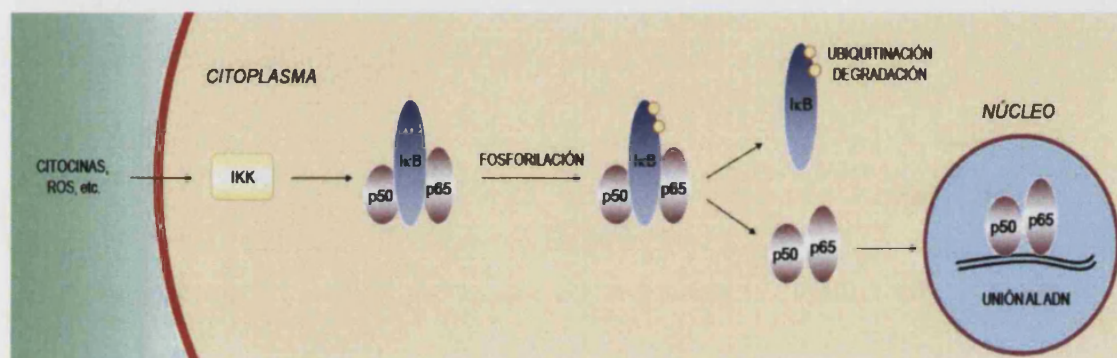
Los factores de transcripción son proteínas que regulan los procesos de transcripción del ADN. Los factores de transcripción pueden actuar reconociendo y uniéndose a secuencias concretas de ADN, uniéndose a otros factores, o uniéndose directamente a la enzima ARN polimerasa. Estos factores se estimulan por señales citoplasmáticas y al ser activados adquieren la capacidad de regular la expresión génica en el núcleo celular, activando o reprimiendo la transcripción de diversos genes.

#### 2.2.6.1. El factor nuclear- $\kappa$ B

El NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción implicado en la regulación de genes que codifican para mediadores de las respuestas inflamatoria, inmune y de fase aguda.

El complejo proteico de unión al ADN reconoce una secuencia de nucleótidos concreta de toda una serie de genes de respuesta, tanto celulares como virales (Abraham, 2000). El NF- $\kappa$ B está compuesto por complejos homo- y heterodiméricos de miembros de la familia Rel (NF- $\kappa$ B). Existen cinco subunidades de la familia NF- $\kappa$ B en mamíferos: p50, p65 (RelA), c-Rel, p52 y RelB. Estas proteínas comparten una secuencia conservada de 300 aminoácidos en la región N-terminal, conocida como el dominio de homología Rel, que media la unión al ADN, la dimerización de la proteína y la localización nuclear. Este dominio es también una diana para las proteínas inhibidoras de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B), que incluyen I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , Bcl-3, p105 y p100. Distintas combinaciones de dímeros de las subunidades de NF- $\kappa$ B tienen distinta especificidad de unión al ADN y podrían funcionar activando grupos de genes como citocinas, inmunorreceptores y moléculas de adhesión. Los heterodímeros p50/p65 (NF- $\kappa$ B1/RelA) y los homodímeros p50 son los dímeros más comunes en la vía de señalización del NF- $\kappa$ B (Baldwin, Jr., 1996). En la mayoría de células, el NF- $\kappa$ B existe como una forma inactiva en el citoplasma, unido a las proteínas inhibidoras I $\kappa$ B (Beg y cols., 1992). El tratamiento de las células con diferentes inductores resulta en la fosforilación de I $\kappa$ B por parte de la cinasa de I $\kappa$ B (IKK) (Karin y Delhase, 2000), para su posterior ubiquitinación y degradación (Chen y cols., 1995). Esto tiene como consecuencia la liberación de los dímeros de NF- $\kappa$ B, que se desplazan al núcleo (Birbach y cols., 2002), donde activan a los genes diana correspondiente.

Figura 5. Activación del NF- $\kappa$ B.



El NF- $\kappa$ B puede ser activado por diferentes estímulos como son citocinas inflamatorias (IL-1 $\beta$  o el TNF- $\alpha$ ) (Beg y cols., 1993) o el lipopolisacárido bacteriano, entre otros, y su tiene un papel central como factor de transcripción en enfermedades como el cáncer (Viatour y cols., 2005) o en patologías inflamatorias crónicas (Tak y Firestein, 2001; Brown y cols., 2008; Barnes y Karin, 1997). El NF- $\kappa$ B es esencial en la transcripción de NOS-2 e IL-8 en células epiteliales humanas (Jobin y cols., 1998).

#### **2.2.6.2. La proteína activadora-1**

La proteína AP-1 es un regulador transcripcional consistente en dímeros compuestos por miembros de las familias de proteínas de unión al ADN Fos y Jun. Mientras que los miembros de la familia Jun (Jun, JunB y JunD) pueden homodimerizar entre ellos o heterodimerizar con los miembros de la familia Fos, los de la familia Fos (Fos, FosB, Fra-1 y Fra-2) sólo pueden dimerizar con un miembro de la familia Jun (revisado en Zenz y Wagner, 2006). Además, algunos miembros de las proteínas de unión de la familia del AMPc pueden a su vez dimerizar con los componentes de AP-1 para la regulación de gran variedad de genes (Wagner y Eferl, 2005). Aunque los miembros de las familias Jun y Fos comparten un alto grado de homología estructural, los diferentes dímeros de AP-1 que se forman a partir de ellos presentan diferencias significativas en su afinidad de unión al ADN y en su capacidad de activar o suprimir la expresión génica (Shaulian y Karin, 2002). El factor AP-1 convierte las señales extracelulares procedentes de vías de señalización como la de las MAPK o el TGF- $\beta$  en cambios de la expresión de los genes diana correspondientes. La proteína AP-1 puede ser activada por citocinas, factores de crecimiento, neurotransmisores, hormonas, infecciones bacterianas y víricas, etc. Muchos genes que codifican para citocinas son regulados de forma cooperativa por un complejo de factores de transcripción formado por AP-1 y NFAT (factor nuclear de las células T activadas). Entre estas citocinas se encuentran: TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-3 o IL-5 (Zenz y cols., 2008). La

estimulación de células Caco-2 con citocinas proinflamatorias está relacionada con la actividad de AP-1 (Hungness y cols., 2000).

### **2.2.6.3. El factor inducible por hipoxia-1**

El factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1) es un factor de transcripción activado en respuesta a bajos niveles de oxígeno, lo cual ocurre en circunstancias tales como hipertensión pulmonar hipóxica, isquemia cerebral o isquemia miocárdica. Este factor tiene un papel importante en la homeostasis del oxígeno en células de mamíferos (Semenza, 2000). El HIF-1 consiste en una subunidad HIF-1 $\beta$ , expresada de manera constitutiva y otras tres subunidades denominadas HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  y HIF-3 $\alpha$  (Wang y Semenza, 1993). En condiciones de normoxia, la subunidad HIF-1 $\alpha$  es degradada rápidamente, aunque se sabe que algunos factores de crecimiento y citocinas estabilizan a este factor en normoxia: insulina, IGF, TGF o IL-1 $\beta$  (Gorlach y cols., 2001; Stiehl y cols., 2002). También se ha descrito que el NO podría estabilizar al HIF-1 $\alpha$  en condiciones de normoxia (Palmer y cols., 2000). Por el contrario, en condiciones de hipoxia, la subunidad HIF-1 $\alpha$  se estabiliza e interactúa con coactivadores como el p300/CBP para modular su actividad transcripcional. De hecho, el HIF-1 actúa como un regulador clave de la transcripción de muchos genes relacionados con condiciones hipóxicas. La angiogénesis es la respuesta fisiológica más común relacionada con el aumento de expresión de HIF-1 $\alpha$ , pero también la proliferación celular y el metabolismo de glucosa y hierro. Por todo ello, el bloqueo del HIF-1 $\alpha$  o de las moléculas que interactúan con él, inhibe el crecimiento tumoral. El HIF-1 induce la transcripción de más de 60 proteínas, relacionadas con diferentes funciones biológicas como: la proliferación celular (IGF, IGFBP-2, IGFBP-3, TGF), la eritropoyesis (eritropoyetina), la angiogénesis (VEGF), el tono vascular (HO-1, NOS-2), el metabolismo de la matriz extracelular o la apoptosis (revisado en Lee y cols., 2004).

#### **2.2.6.4. La proteína de respuesta de crecimiento temprano-1**

La proteína de respuesta de crecimiento temprano-1 (EGR-1) es un factor de transcripción dependiente de la vía de señalización Ras-Raf-MEK-ERK1/2. EGR-1 se induce como respuesta a distintos agonistas entre los que se encuentran: la hipoxia, el lipopolisacárido bacteriano o la trombina (Guha y cols., 2001; Yan y cols., 1999). El EGR-1 es un regulador capaz de controlar la expresión de una gran variedad de genes que podemos agrupar como: factores de transcripción, factores de señalización, factores de crecimiento, citocinas, reguladores del ciclo celular, proteínas de matriz y reguladores de canales iónicos. La expresión génica dependiente de EGR-1 se lleva a cabo mediante la cooperatividad funcional entre el EGR-1 y otros factores de transcripción o de regulación como NFAT, AP-2, p53 o el receptor glucocorticoide. Es, por lo tanto, bastante probable que el factor EGR-1 no actúe solo, sino conjuntamente con otros factores (Khachigian, 2006).

#### **2.2.6.5. La proteína de unión e intensificación-CCAAT**

La proteína de unión e intensificación-CCAAT (C/EBP) pertenece a la superfamilia formada por los factores de transcripción CREB, Fos, AP-1, ATF y Maf/Nrf (Kalvakolanu, 2003). Estos factores participan en numerosas actividades fisiológicas, incluyendo el metabolismo energético, depósito de grasa, diferenciación tisular, hematopoyesis, respuesta inmune, defensa frente a bacterias y sistema reproductivo (revisado en Li y cols., 2007). La subfamilia C/EBP incluye proteínas estructuralmente similares pero genética y funcionalmente diferentes: C/EBP- $\alpha$ , C/EBP- $\beta$ , C/EBP- $\gamma$ , C/EBP- $\delta$ , C/EBP- $\epsilon$  y C/EBP- $\zeta$ . La mayoría de éstas poseen un extremo C-terminal esencial para su unión al ADN y para las interacciones de tipo homo o heterodimérico entre miembros de la familia (Williams y cols., 1995). Su expresión está elevada de forma constitutiva en algunos tejidos como en el intestino, pulmones o tejido adiposo. Algunas de las actividades del C/EBP son la de regular a la IL-6 y la expresión inducida por IL-6

de IL-1, IL-8 y TNF- $\alpha$  (Akira y Kishimoto, 1997) o la de inducir la transcripción de diversos genes por estimulación del IFN- $\gamma$  (Roy y cols., 2000).

### **2.2.7. Papel de la HO-1 en la EII**

En la EII, la infiltración leucocitaria y la activación celular lleva a la producción de niveles elevados de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, proteasas y mediadores inflamatorios, que son factores determinantes en la muerte celular y la disfunción mucosal (Hermanowicz y cols., 1985; Kruidenier y cols., 2003; Singer y cols., 1996). Aunque la resistencia a la apoptosis de las células T de la lámina propia puede ser un factor en la cronificación de la inflamación en la EII (Neurath y cols., 2001), en la colitis ulcerosa existe un aumento de la apoptosis en las células epiteliales, que puede llevar a la alteración de la barrera epitelial del intestino y facilitar la invasión de microorganismos patógenos (Strater y cols., 1997).

La inducción de HO-1 puede tener un papel protector frente a la lesión en situaciones de estrés celular, actuando sobre la producción de especies reactivas y mediadores inflamatorios y controlando en ocasiones procesos como la proliferación o la viabilidad celulares. En particular, la apoptosis puede ser un factor importante en los efectos citoprotectores de HO-1 a nivel intestinal, ya que diversos estudios han demostrado que la inducción de HO-1 inhibe la apoptosis en muchos tipos celulares, por ejemplo, en fibroblastos (Petrache y cols., 2000), células endoteliales (Soares y cols., 2002), células Jurkat (Choi y cols., 2004), o en monocitos sometidos a privación de suero (Lang y cols., 2005).

La inducción de HO-1 inhibe la respuesta inflamatoria en modelos animales de inflamación intestinal, como la colitis inducida por ácido trinitrobencenosulfónico en ratas (Wang y cols., 2001) o por dextrano sulfato sódico en ratones (Berberat y cols., 2005). Entre los mecanismos implicados estarían la disminución de la producción de especies reactivas de oxígeno y NO (Wang y cols., 2001). Los productos derivados de la actividad HO, biliverdina, bilirrubina y CO, podrían ser los responsables de estos efectos antioxidantes y antiinflamatorios. Así, se ha demostrado que la administración de biliverdina regula la producción de



## *Introducción*

---

mediadores inflamatorios en la colitis experimental (Berberat y cols., 2005) y en la sepsis inducida por perforación cecal (Overhaus y cols., 2006). También el CO ha demostrado efectos antiinflamatorios a nivel intestinal en diferentes modelos experimentales (Hegazi y cols., 2005; Scott y cols., 2009; De Backer y cols., 2009).

En modelos animales, la inducción de HO-1 tiene además un efecto protector frente a la lesión intestinal producida por etanol y calor (Li y cols., 2008), radiaciones ionizantes (Giris y cols., 2006), isquemia-reperfusión (Tamion y cols., 2007) o shock hemorrágico (Inoue y cols., 2008). Además, estudios recientes indican que la inducción de HO-1 podría ser un mecanismo en la protección de la mucosa gástrica por algunos fármacos antiulcerosos (Tracz y cols., 2007).

En humanos, la HO-1 se expresa de forma constitutiva en la mucosa gástrica y colónica y su nivel de expresión aumenta de forma significativa en gastritis y en la EII (Paul y cols., 2005; Barton y cols., 2003). Además, se ha detectado la presencia de HO-2 y de biliverdina reductasa en las células epiteliales del tracto gastrointestinal (Colpaert y cols., 2002).

Se ha demostrado que la HO-1 se induce por estrés oxidativo en las células epiteliales del colon (Dijkstra y cols., 2004) y que el CO inhibe la expresión de NOS-2 inducida por citocinas inflamatorias en la línea celular DLD-1 (Dijkstra y cols., 2004). En la línea celular epitelial intestinal Caco-2, la actividad HO-1 es mayor en células indiferenciadas y la inhibición de dicha actividad produce una disminución en la viabilidad celular (Uc y Britigan, 2003), mientras que en la línea celular HT-29, la inducción de HO-1 reduce la expresión de caspasa-3 e inhibe la apoptosis (Paul y cols., 2005).

Por todo ello, algunos autores han propuesto que la HO-1 podría ser una diana en la prevención y tratamiento de algunos trastornos digestivos, como la gastropatía por antiinflamatorios no esteroídicos (Becker y cols., 2006; Becker y cols., 2003) y la EII (Naito y cols., 2004). Los datos existentes apoyan el interés del estudio de los mecanismos antiinflamatorios y citoprotectores de la vía HO-1 en procesos inflamatorios intestinales.

## **2.3. LA OSTEOARTRITIS**

La osteoartritis (OA), también conocida como artrosis, es una enfermedad reumática asociada a los procesos de envejecimiento, que afecta a las articulaciones diartrodiales por medio de una compleja interacción de procesos mecánicos y biológicos. La OA representa un problema de salud pública creciente a nivel mundial y, dado que la enfermedad no tiene cura, supone además un problema sanitario y económico de gran relevancia. La etiología de la OA es multifactorial y se caracteriza por toda una serie de cambios estructurales en la articulación, incluyendo la destrucción del cartílago y alteraciones tanto en la membrana sinovial como en el hueso subcondral, lo cual produce dolor a quien padece esta patología y modifica el movimiento natural de la articulación (Martel-Pelletier y Pelletier, 2007).

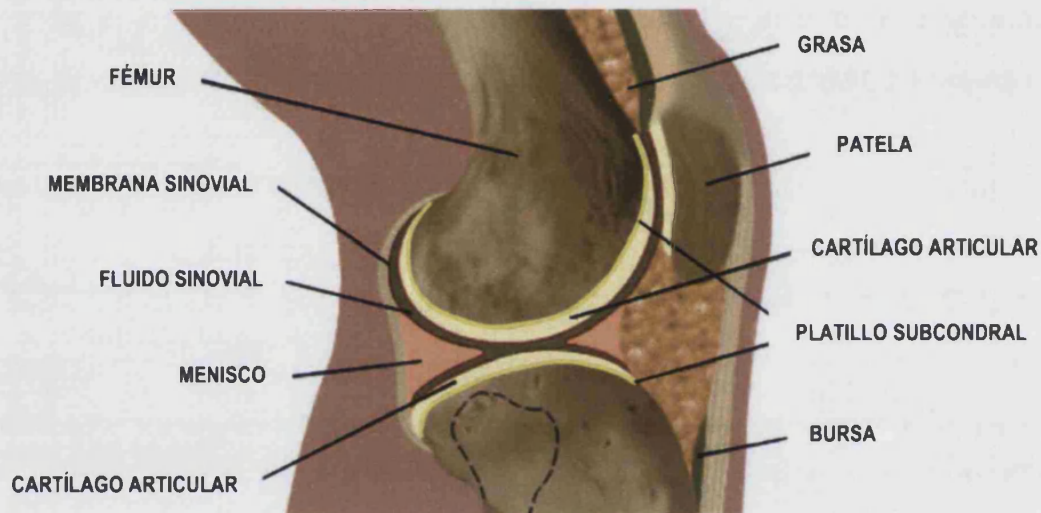
### **2.3.1. Fisiología del cartílago sano**

#### **2.3.1.1. Las articulaciones sinoviales**

Las articulaciones sinoviales o diartrodiales, como la articulación de la rodilla, son órganos cuyo propósito es facilitar el movimiento controlado del esqueleto. Estas articulaciones se caracterizan por su variedad de movimientos y la prácticamente nula fricción a la que se ven sometidas. Las superficies óseas articulares están compuestas por una base de hueso esponjoso aplanado, cubierto por una capa fina y densa de hueso cortical (el platillo subcondral), que a su vez está recubierto por cartílago articular (ver figura 6). La cavidad existente entre los huesos de la articulación alberga a la membrana sinovial, que recubre las superficies óseas y que produce el fluido sinovial. Este fluido ocupa la cavidad articular y su finalidad es lubricar y facilitar el movimiento articular, absorber los choques y transportar nutrientes. La cápsula, los ligamentos, el menisco y los músculos, que mueven y estabilizan la estructura, son también componentes de la articulación. En la articulación de la rodilla existen además las bursas o cavidades

con líquido que reducen la fricción entre músculos y hueso, y la patela o rótula, hueso de la parte anterior de la rodilla (Wooley y cols., 2005).

**Figura 6.** *La articulación sinovial de la rodilla.*



### **2.3.1.2. El cartílago articular**

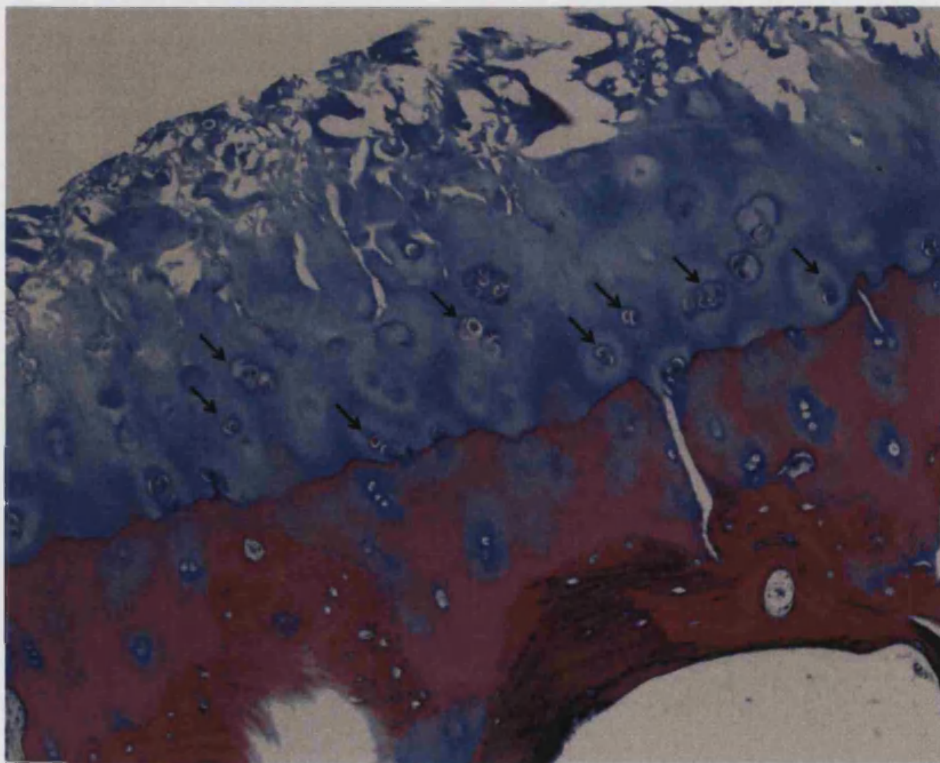
El cartílago articular hialino es una forma especializada de tejido conectivo liso y elástico que sirve como superficie de soporte de las articulaciones diartrodiales y facilita el deslizamiento de los huesos, minimizando la fricción entre las superficies de la articulación. El cartílago mide menos de 5 mm de grosor en las articulaciones humanas y es, a simple vista, blanco y denso, tendiendo a hacerse amarillo con la edad (Van der Korst y cols., 1968) y de tacto semirrígido, pese a su alto contenido en agua (Mankin y Thrasher, 1975). En adultos, el cartílago articular es aneural, avascular y alinfático. El cartílago articular se nutre gracias a un sistema de doble difusión (Castillo y Casán, 2006). El platillo subcondral en el hombre sano es impermeable a los vasos sanguíneos, por lo que los vasos sanguíneos que nutren al cartílago se encuentran en el sinovio, de modo que los nutrientes difunden a través de la membrana sinovial al fluido sinovial y de ahí a través de la densa matriz que compone el cartílago hasta alcanzar a las únicas células del cartílago, los condrocitos. Debido a que no hay nervios en el cartílago articular, los vertebrados

dependen de las terminaciones nerviosas de la cápsula, los músculos y el hueso subcondral para la apreciación del dolor (Hogervorst y Brand, 1998).

### 2.3.1.3. Composición del cartilago articular

Los análisis histológicos demuestran que el cartilago está compuesto mayoritariamente por una matriz extracelular y por un número escaso de células, los condrocitos, responsables del mantenimiento y síntesis de dicha matriz. La distribución de los condrocitos no es aleatoria, ya que se han descrito tres zonas diferenciadas: una zona tangencial, más externa, donde las células alargadas yacen con sus largos ejes paralelos a la superficie; una zona transicional, en la que las células son más redondeadas y aparecen distribuidas al azar y una zona radial, en la que las células parecen alinearse en columnas cortas e irregulares (Mankin y Thrasher, 1975). Los condrocitos son escasos en número y, en los adultos, se encuentran muy separados entre ellos.

**Figura 7.** Corte histológico de cartilago (en azul) y hueso subcondral (en fucsia) OA. Las flechas señalan a los condrocitos, solos o alineados en grupos. Tricrómico de Masson x100.



La matriz extracelular está compuesta por agua con sales inorgánicas y un entramado de fibras de colágeno, proteoglicanos y otras proteínas. El contenido en agua del cartílago articular puede ser de hasta un 80% (Mankin y Thrasher, 1975). La mayor parte del agua es intercambiable con el fluido sinovial. Este exudado acuoso de la superficie del cartílago, bajo compresión, puede causar una pérdida temporal de grosor de hasta el 20%. Finalizada la presión, el agua del fluido articular es absorbida, y el cartílago crece hasta su tamaño original (Wooley y cols., 2005).

#### **2.3.1.4. El colágeno**

El constituyente orgánico más abundante de la matriz extracelular del cartílago articular es el colágeno, ya que es el 50% del material presente. La molécula de colágeno es una estructura única compuesta por 3 cadenas  $\alpha$  que forman una estructura de triple hélice, la cual confiere a esta macromolécula su flexibilidad y resistencia a la tracción características. Existen 26 tipos de colágeno diferentes, todos con una estructura y secuencia de aminoácidos similar. Sus características estructurales dan a las moléculas de colágeno una gran estabilidad, alta resistencia a la degradación proteolítica, al calor y a las sustancias químicas. En el cartílago, las fibras de colágeno más superficiales se distribuyen en haces y láminas paralelos a la superficie del tejido, formando una capa de colágeno. Sin embargo, las fibras más cercanas al hueso subcondral adoptan una posición vertical, es decir, perpendicular a la superficie y las más profundas están fijadas al hueso. El colágeno de las capas intermedias parece estar orientado al azar. Esta distribución fue observada por primera vez por Benninghoff en 1925 (Benninghoff, 1925). En este tejido articular, las fibras de colágeno son más gruesas y están compuestas casi en su totalidad por colágeno tipo II (Eyre y cols., 1987), que forma estructuras de triple hélice y es resistente a la acción de la mayoría de las proteasas, si bien puede ser escindido por acción de las colagenasas. Las fibras que componen esta red están altamente entrecruzadas y unidas en los cruces por los grupos amino de los residuos de lisina. Otros tipos de colágeno presentes en la matriz extracelular son los

colágenos tipo IX, X y XI, específicos del cartílago, o el colágeno tipo VI, común a otros tejidos conectivos (Mayne y Ala-Kokko, 2005).

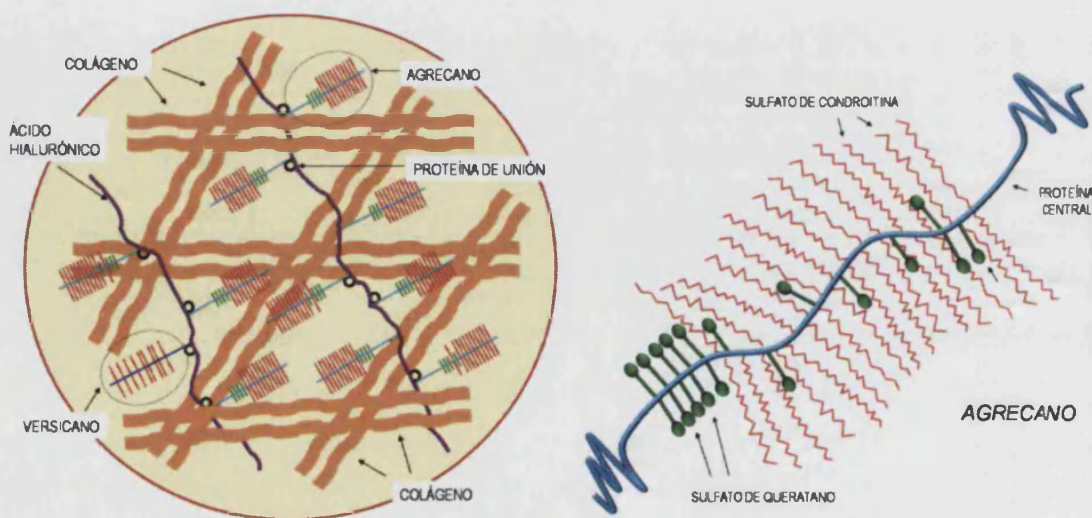
#### **2.3.1.5. El agrecano**

La organización de las fibras de colágeno en su red atrapa al proteoglicano agrecano, previniendo su difusión y escape del tejido. El agrecano es una molécula de tipo proteoglicano que alcanza los 2 millones de Daltons de peso molecular, debido a las cerca de 130 cadenas de glicosaminoglicanos que están unidas al núcleo de la proteína. En la molécula de agrecano se pueden distinguir 3 dominios globulares G1, G2 y G3. Los dominios G1 y G2 están conectados con un polipéptido llamado dominio interglobular, mientras que la secuencia entre los dominios G2 y G3 contiene regiones de unión para las cadenas de sulfato de queratano y sulfato de condroitina. Casi el 80% de la masa del agrecano consiste en cadenas del glicosaminoglicano sulfato de condroitina. Estos polisacáridos están constituidos por una gran cantidad de azúcares cargados negativamente, conteniendo unas 100 moléculas de sulfato de condroitina por cada molécula de agrecano. Esta carga negativa entre moléculas de glicosaminoglicanos adyacentes es de gran importancia en el mantenimiento de la forma del cartílago frente a las presiones mecánicas. El agrecano interacciona por medio del dominio G1 con ácido hialurónico y la proteína de unión para formar agregados de gran tamaño. Tales agregados pueden contener de 50 a 100 monómeros de agrecano unidos de manera no covalente a una cadena simple de ácido hialurónico a través de dos proteínas de unión. Aparentemente, el citoesqueleto de los condrocitos siente las deformaciones y reacciona induciendo los cambios metabólicos que determinan la composición química del tejido extracelular (Guilak y cols., 1999).

Además del agrecano, cabe destacar la presencia en la matriz extracelular del cartílago de la fibronectina y de algunos proteoglicanos minoritarios como el versicano, el perlecano o los proteoglicanos pequeños ricos en leucina (SLRP) (revisado en Martel-Pelletier y cols., 2008). La fibronectina es una glicoproteína dimerica adhesiva presente en la matriz, cuya abundancia se encuentra elevada en

la OA (Brown y Jones, 1990). Su degradación por diversas proteasas libera fragmentos de 30 a 200 kDa que ejercen propiedades catalíticas sobre los proteoglicanos y disminuyen su síntesis (Homandberg y cols., 1993; Xie y cols., 1993). El versicano es un proteoglicano semejante al agrecano, aunque su presencia en el cartilago es muy inferior. Al igual que el agrecano, el versicano posee tres dominios globulares: G1, G2 y G3, y contiene en su estructura un único tipo de glicosaminoglicano: el sulfato de condroitina. La degradación proteolítica del versicano probablemente se lleve a cabo por enzimas de tipo MMP y agrecanasa (Sztrolovics y cols., 2002). El perlecano ha demostrado poder interactuar con otros componentes de la matriz y ser esencial para el desarrollo normal del cartilago (Arikawa-Hirasawa y cols., 1999). Los proteoglicanos SLRP son un subtipo de proteoglicanos entre los que destacan: la decorina, el biglicano, la fibromodulina y el lumicano, los cuales contribuyen al mantenimiento de la integridad del tejido y a modular su metabolismo (Geng y cols., 2006).

**Figura 8.** Esquema de la composición de la matriz extracelular del cartilago (izquierda) y detalle de la molécula de agrecano (derecha).



### **2.3.2. Fisiopatología del cartílago OA**

En la OA, tras una reacción anabólica inicial de reparación de los daños, la primera alteración histopatológica que sucede en el cartílago es la liberación de dos macromoléculas componentes de la matriz extracelular: el colágeno y el agrecano. Se cree que la liberación del agrecano podría ser el evento inicial que desencadena el proceso de degradación del cartílago. La rotura del colágeno también es de especial importancia, ya que supone la pérdida de la integridad del tejido. Estas alteraciones en el agrecano y en el entramado de colágeno, parecen ser consecuencia de los niveles aumentados de enzimas proteolíticas sintetizadas por los condrocitos. La mayor parte de este proceso de degradación se debe a la familia de las MMP (Martel-Pelletier y cols., 2001; Goldring, 2000b), de la que forman parte las colagenasas (enzimas responsables de la degradación de colágeno) y las agrecanasas (enzimas responsables de la escisión del agrecano, detectable en el fluido sinovial). Los niveles incrementados de colagenasas como MMP-1, MMP-13 y MMP-8 encontradas en cartílago humano OA son la evidencia de la importancia de la familia de las MMP en estos procesos degradativos. Teniendo en cuenta la especificidad de cada una de estas colagenasas, parece ser que la mejor estrategia para prevenir la destrucción del cartílago sería neutralizar la síntesis o actividad de MMP-13, al ser esta enzima la más activa en la degradación (Tardif y cols., 2004). En cuanto a las agrecanasas, las dos predominantes en el proceso degradativo OA son ADAMTS-4 y ADAMTS-5 (Glasson y cols., 2005; Stanton y cols., 2005). Otras enzimas minoritarias implicadas serían las del sistema plasminógeno/plasmina o las catepsinas (revisado en Martel-Pelletier y cols., 2008).

#### **2.3.2.1. Las MMP en la OA**

En cuanto a las enzimas degradativas de la matriz extracelular (ver generalidades en la sección 2.2.4.), en la OA se encuentran altos niveles de expresión y síntesis de tres colagenasas, MMP-1, MMP-8 y MMP-13 (Martel-



## *Introducción*

---

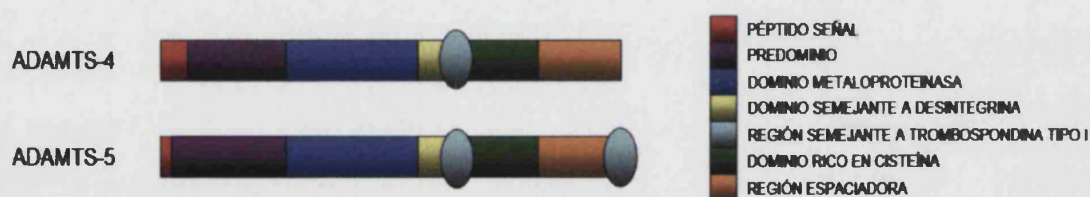
Pelletier y cols., 2008). Aunque las tres colagenasas son activas frente a las fibras de colágeno, la especificidad de cada una por un tipo específico de colágeno difiere. En el cartílago OA, MMP-1 y MMP-8 se localizan predominantemente en las capas más superficiales, mientras que la MMP-13 se encuentra principalmente en las capas intermedias y profundas (Moldovan y cols., 1997). Los datos también sugieren que la MMP-1 está implicada en la fase inflamatoria y la MMP-13 en la fase de remodelación de la OA. Además, en el cartílago humano, la MMP-13 muestra un rasgo diferencial por el cual podemos distinguir dos categorías de condrocitos humanos OA. Por un lado, en algunos condrocitos OA la MMP-13 presenta expresión basal baja y alta inducibilidad por IL-1 $\beta$ /TGF- $\beta$ , mientras que otros condrocitos muestran altos niveles basales de MMP-13 y baja inducibilidad por IL-1 $\beta$ /TGF- $\beta$ . Estas categorías han sido denominadas condrocitos OA-bajos y -altos, respectivamente (Tardif y cols., 1999).

Se han descrito tres estromelisininas en tejidos humanos: MMP-3, MMP-10 y MMP-11. Entre sus sustratos se encuentran proteoglicanos, fibronectina, elastina y laminina. La estromelisinina que se expresa de manera predominante en el cartílago normal es la MMP-3, que se considera crucial en los procesos degradativos de la matriz extracelular. La MMP-3, que también actúa sobre el colágeno IX (Okada y cols., 1989), se expresa más en las fases iniciales de la OA y disminuye su expresión en las etapas finales (Aigner y cols., 2003). También se han encontrado en tejidos articulares las gelatinasas MMP-9 y MMP-2 y hasta seis miembros de la familia de las MMP de membrana (MT-MMP) (revisado en Martel-Pelletier y cols., 2008).

El agregano se degrada por dos o más agreganasas de la familia de proteasas ADAMTS. Estas macromoléculas son una familia de proteasas compuesta por 19 miembros que cumplen funciones como la rotura del agregano y otros proteoglicanos como el versicano, la inhibición de la angiogénesis o el mantenimiento de la homeostasis de la coagulación sanguínea. Las ADAMTS son sintetizadas inicialmente como pre-proenzimas. Su estructura comprende, desde el extremo N-terminal hasta el C-terminal: un péptido señal; un dominio, la presencia del cual preserva a la enzima en estado de latencia; un dominio catalítico

de metaloproteínasa; un dominio semejante a desintegrina; una región central TS (semejante a trombospondina tipo I); un dominio rico en cisteína con alta homología entre las distintas ADAMTS; una región espaciadora sin rasgos estructurales característicos y un número variable de dominios TS repetidos en la región terminal (revisado en Porter y cols., 2005). Las ADAMTS pueden degradar el agregano proteolíticamente en su dominio interglobular, entre sus dominios G1 y G2 (Sandy y cols., 1992). Estudios recientes apoyan un papel clave de la agreganolisis mediada por ADAMTS en la destrucción del cartílago (Malfait y cols., 2002; Sandy, 2006). Dos enzimas de tipo agreganasa han sido descritas en el cartílago OA: ADAMTS-4 y ADAMTS-5. De estas dos enzimas, ADAMTS-5, que puede ser secuestrada por el ácido hialurónico en lo que supondría un mecanismo regulador de su actividad, (Plaas y cols., 2007) es la agreganasa predominante en los procesos degradativos de la OA en ratón (Stanton y cols., 2005; Glasson y cols., 2005). En humanos, ADAMTS-4 y ADAMTS-5 parecen tener un papel importante en la degradación del cartílago articular durante la progresión de la OA (Song y cols., 2007).

**Figura 9.** Estructura de las agreganasas ADAMTS-4 y ADAMTS-5. Basado en Porter y cols., 2005).



### 2.3.2.2. La degradación de la matriz extracelular en la OA

En la OA, se pueden producir cambios en la abundancia de los diferentes tipos de colágeno. Esta alteración se debe a la degradación aumentada de las fibras basadas en colágeno tipo II, respecto a los otros tipos de colágeno. Las colagenasas cortan sólo en la triple hélice de las fibras de colágeno II, pero no en las de los



colágenos tipo IX y XI (Byers, 2001). Es probable que la proteólisis de estos colágenos en las regiones no helicoidales sea la responsable de su degradación. La actuación al unísono de múltiples miembros de la familia MMP es responsable de la degradación de las fibras de colágeno, lo que tiene como resultado la degradación irreversible del cartilago articular OA. El daño proteolítico a las fibras de colágeno durante la fase inicial de la OA contribuye a la hipertrofia del cartilago y a su hidratación incrementada. Esto es debido a que la red de fibras de colágeno, estando debilitada, puede no resistir adecuadamente la capacidad de retención de agua de los proteoglicanos presentes (Martel-Pelletier y cols., 2008).

El agrecano es probablemente el primer constituyente de la matriz afectado en la OA y su proporción en el cartilago va disminuyendo progresivamente a medida que avanza la enfermedad. A partir de cierta etapa de la evolución de la OA, los condrocitos parecen incapaces de compensar la pérdida de proteoglicano, incluso con los procesos de síntesis aumentados, con una pérdida neta de matriz como consecuencia. Además, la estructura de los proteoglicanos que permanecen se ve alterada de diferentes maneras (Sandy y cols., 1992; Cs-Szabo y cols., 1995). Con la degradación, los productos liberados son totalmente degradados por las enzimas del condrocito o difundidos rápidamente al fluido sinovial. La pérdida de ácido hialurónico implica la disminución de tamaño de los agregados de agrecano, lo que podría repercutir en la disminución de la liberación de estos productos del cartilago. Los responsables de la rotura del agrecano son las MMP y las agrecanasas, que escinden mayoritariamente en el dominio interglobular del agrecano (Struglics y cols., 2006). Existen dos sitios de escisión en el dominio interglobular del agrecano: el de MMP (<sup>341</sup>Asn-<sup>342</sup>Phe) y el de agrecanasa (<sup>373</sup>Glu-<sup>374</sup>Ala) (Naito y cols., 2007). La rotura en este dominio provoca la máxima pérdida posible de función del agrecano, ya que se separa toda la región de unión a glicosaminoglicanos de la región G1, que ancla la macromolécula al tejido (Martel-Pelletier y cols., 2008). En el cartilago OA se sintetiza agrecano *de novo*, en un intento de los condrocitos de reparar el tejido dañado. Este nuevo agrecano tiene una composición más parecida al cartilago juvenil que al adulto, con menor contenido de sulfato de queratano (Cs-Szabo y cols., 1995). Los proteoglicanos

SLRP se fragmentan en la OA, si bien, a diferencia del agregano, la síntesis de SLRP es capaz de compensar las pérdidas por degradación (Witsch-Prehm y cols., 1992).

### **2.3.2.3. Los factores de crecimiento**

Los factores de crecimiento son polipéptidos que se requieren para la síntesis y mantenimiento de la matriz extracelular. Los niveles de estos factores son bajos normalmente en el cartílago del adulto sano. De la lista de factores de crecimiento que muestran efectos en el cartílago articular, los más caracterizados en el contexto de formación de cartílago y su mantenimiento son los factores IGF, el factor de crecimiento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y las proteínas morfogénicas óseas (BMP).

Los IGF participan en el crecimiento y desarrollo de muchos tejidos. El IGF-1 es un factor homeostático de gran importancia, capaz de controlar la síntesis de matriz y la actividad mitótica. Está presente en el cartílago normal y su expresión se ve considerablemente aumentada en el cartílago OA (Iwanaga y cols., 2005; Middleton y Tyler, 1992), considerándose un potente regulador anabólico de condrocitos (McQuillan y cols., 1986; Luyten y cols., 1988). *In vivo*, el IGF-1 promueve la síntesis de proteoglicanos (Mi y cols., 2000), mientras que en explantes estimula la formación de una capa de tejido que contiene colágeno tipo II y proteoglicanos (Madry y cols., 2001) y protege el cartílago reduciendo los niveles de MMP y aumentando los de TIMP (Rogachefsky y cols., 1994). Diversos estudios indican que este factor de crecimiento es capaz de revertir los efectos catabólicos de la IL-1 $\beta$  sobre el cartílago en modelos experimentales de degradación de cartílago (Tyler, 1989). Además, el IGF-1 aumenta la expresión del receptor de IL-1 tipo II, cuya expresión es muy baja en el cartílago OA (Wang y cols., 2003). Este tipo de receptor se une a la IL-1 $\alpha$  y a la IL-1 $\beta$ , pero no transmite la señal intracelular correspondiente.

A pesar de su capacidad de regulación sobre los condrocitos OA, el IGF-1 puede resultar en ocasiones poco reactivo frente a este tipo celular. Este fenómeno no parece estar relacionado con su receptor específico sino con los elevados niveles

## Introducción

---

de las proteínas de unión a IGF (IGFBP) producidas por los condrocitos (Morales, 2008; Tardif y cols., 1996). Las proteínas IGFBP forman un complejo con el IGF-1, previniendo su señalización y, por tanto, su actividad anabólica. Se han identificado seis proteínas IGFBP (IGFBP-1 a -6), que se unen a las proteínas IGF con mayor afinidad que su propio receptor (Clemmons, 1998). Además, las IGFBP-2 a -5 se sintetizan y secretan por condrocitos humanos articulares *in vitro* (Olney y cols., 1996) y se han detectado elevados niveles de IGFBP-3 y -4 en el fluido sinovial de pacientes con OA (Kanety y cols., 1996). En las articulaciones OA se han descrito alteraciones en el balance entre el IGF-1 y las IGFBP (Tavera y cols., 1996). En el cartílago OA, las proteínas IGFBP-3, -4, -5 están aumentadas respecto al cartílago normal (Iwanaga y cols., 2005). En concreto, la proteína IGFBP-3 resulta de especial interés en la OA. La IGFBP-3 está aumentada en esta patología y tiene un sistema de producción autocrino en el cartílago OA (Morales, 2002). Esta proteína se localiza tanto en la matriz extracelular del cartílago como en el citoplasma y núcleo de los condrocitos, lo que podría indicar un papel independiente de IGF-1 en el núcleo, pudiendo regular receptores hormonales o complejos transcripcionales (Hunziker y cols., 2008).

### 2.3.3. La inflamación

Los procesos catabólicos propios de la OA van acompañados de una respuesta inflamatoria. Es el estrés biomecánico el que probablemente inicia la producción de mediadores inflamatorios, producción que posteriormente se cronificará, llevando a la pérdida de la regulación de la homeostasis del cartílago en la OA (Goldring y Goldring, 2007). Las citocinas inflamatorias son, sin lugar a dudas, cruciales en la mediación de la inflamación y en la destrucción de tejido en la OA, ya que estimulan la producción de especies reactivas de oxígeno, NO, prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y enzimas degradativas (Attur y cols., 1998; Tetlow y cols., 2001) y a la vez inhiben la síntesis de proteínas de la matriz del cartílago (Goldring y cols., 1988). Se ha descrito que el cartílago OA en condiciones *ex vivo* libera, de manera espontánea, IL-1 $\beta$ , NO, PGE<sub>2</sub>, IL-6 e IL-8 (Attur y cols., 1998).

De todas las citocinas proinflamatorias, la IL-1 $\beta$  ha demostrado ser la de mayor importancia en la destrucción del cartílago OA y se considera el principal motor del sistema enzimático que promueve el catabolismo (Pelletier y Martel-Pelletier, 1989). La IL-1 $\beta$  está presente tanto en el fluido sinovial como en los condrocitos de pacientes con OA y sus efectos son múltiples: es capaz de estimular su propia producción, de dirigir la degradación del colágeno y el agregano (Dodge y Poole, 1989; van der Kraan y van den Berg, 2000) al incrementar la síntesis de enzimas degradativas como las MMP (Chevalier, 1997; Mengshol y cols., 2000) o el activador de plasminógeno/plasmina (Kamio y cols., 2007), de inhibir la síntesis de los principales inhibidores de estas enzimas: TIMP (Li y cols., 2006) y PAI-1 (Dong y cols., 2007), de inhibir la síntesis de constituyentes de la matriz extracelular como el colágeno (Goldring y cols., 1988) y los proteoglicanos (Gouze y cols., 2001) y de estimular la síntesis y liberación de IL-6 (Bender y cols., 1990) y de algunos eicosanoides como las prostaglandinas o los leucotrienos (Longo y cols., 1998). La acción de la IL-1 $\beta$  sobre el proceso enzimático combinada con la supresión de la síntesis de matriz tiene como resultado la degradación severa de los tejidos articulares (van den Berg, 2001).

Uno de los mecanismos de control de la activación de IL-1 $\beta$  es un inhibidor fisiológico de sus receptores conocido como el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra). El IL-1Ra es un derivado estructural de IL-1, que se une a los receptores de IL-1 pero no activa a las células diana (Arend y cols., 1998). De este modo el antagonista IL-1Ra bloquea los efectos de la IL-1 $\beta$  en el entorno de la célula al competir por la unión a los receptores de la superficie celular (Arend y cols., 1990). La familia de antagonistas IL-1Ra está formada por una forma secretada (sIL-1Ra) y tres variantes intracelulares (icIL-1Ra1, 2, 3), que son sintetizadas en el citoplasma pero no son secretadas por las células. La administración de IL-1Ra o de su gen en modelos experimentales de OA *in vivo* (Caron y cols., 1996; Fernandes y cols., 1999) y su administración intraarticular en pacientes con OA (Chevalier y cols., 2005) mostraron beneficios terapéuticos. En la actualidad, el IL-1Ra recombinante humano denominado “anakinra” está comercializado para el tratamiento de la artritis reumatoide.

## *Introducción*

---

Otras citocinas proinflamatorias, como el TNF- $\alpha$ , la IL-6, la oncostatina M, la IL-17, la IL-18 o algunas quimiocinas como la IL-8, son también consideradas factores que participan en la OA, ya que están expresadas en los tejidos afectados, si bien el papel exacto y la importancia de cada uno no están bien establecidos. El TNF- $\alpha$  es una citocina potente que ejerce diversos efectos por estimulación de diferentes células. El aspecto mejor estudiado del TNF- $\alpha$  es su capacidad de promover la inflamación. El TNF- $\alpha$  está presente en los estadios avanzados de la OA y es responsable junto con la IL-1 $\beta$  del inicio y progreso de la misma (Goldring, 2000a). Además, el TNF- $\alpha$  es capaz de inhibir la síntesis de proteoglicanos y de colágeno II en el cartílago articular (Goldring, 2000a). También está presente en esta patología la IL-6, aunque su papel en la inflamación todavía genera dudas ya que, siendo considerada una citocina proinflamatoria y estando aumentada su producción en la OA (Shinmei y cols., 1991), la IL-6 también induce la producción de TIMP-1, del receptor soluble 55 de TNF y la del antagonista IL-1Ra en condrocitos articulares humanos (Palmer y cols., 2002). Se ha demostrado que la IL-6 inducida por IL-1 $\beta$  es necesaria para mediar la inhibición de la síntesis de proteoglicano por IL-1 $\beta$  (Nietfeld y cols., 1990). Un miembro de la familia de IL-6, la oncostatina M se ha mostrado como el único miembro de dicha familia capaz de causar la liberación proteolítica de proteoglicanos y colágeno del cartílago articular humano, además de potenciar la actividad de otros mediadores inflamatorios como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Hui y cols., 2005; Barksby y cols., 2006a). Las interleucinas IL-17 e IL-18, que comparten algunas propiedades con la IL-1, están implicadas en la inflamación de las fases tempranas de la OA, promoviendo la destrucción del cartílago y la inflamación sinovial (Lubberts y cols., 2001) e induciendo la expresión de otras citocinas proinflamatorias (Saha y cols., 1999), respectivamente.

Las citocinas antiinflamatorias como IL-10, IL-4 o IL-13 se producen en grandes cantidades en la membrana sinovial y el cartílago OA. Estas citocinas son capaces de disminuir la producción de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y MMP, de inhibir la

liberación de PGE<sub>2</sub> y de aumentar la producción de IL-1Ra y TIMP-1 (Martel-Pelletier, 1999).

La PGE<sub>2</sub> es el prostanoides más abundante en el organismo humano y un mediador de la inflamación y el dolor. Es sintetizado por la vía del ácido araquidónico gracias a la acción coordinada de las enzimas ciclooxigenasas (COX) y prostaglandina E sintasas (PGES), de manera constitutiva o en respuesta a determinados estímulos, moléculas de señalización o daño celular. Dependiendo del contexto, la PGE<sub>2</sub> ejerce efectos homeostáticos, inflamatorios o, en el cartílago OA, efectos catabólicos a través del receptor EP4 (Attur y cols., 2008). Como prostanoides proinflamatorio, la PGE<sub>2</sub> contribuye en gran medida a promover los signos de la inflamación aguda estimulando la vasodilatación, incrementando la permeabilidad vascular, participando en la respuesta febril y produciendo hiperalgesia (revisado en Lubberts y cols., 2001). La producción de PGE<sub>2</sub> por parte de sinoviocitos humanos estimulados por IL-1β ha demostrado regular la producción de IL-6, M-CSF y VEGF (Inoue y cols., 2002), y la degradación de proteoglicano (Hardy y cols., 2002). Por otro lado, se ha descrito que las prostaglandinas pueden inhibir la síntesis y secreción de IL-1 (Dingle, 1993).

La enzima ciclooxigenasa (COX) se caracteriza por su capacidad de metabolizar el ácido araquidónico, un ácido graso escindido de los fosfolípidos de membrana por acción de las enzimas fosfolipasas A<sub>2</sub>. La metabolización de esta molécula por parte de la COX genera el intermediario inestable PGG<sub>2</sub>, que es reducido por la misma enzima a PGH<sub>2</sub>, que puede ser a su vez metabolizado por las diferentes enzimas sintasas en PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>α, PGI<sub>2</sub> (prostaciclina) o TXA<sub>2</sub> (tromboxano A<sub>2</sub>). Existen dos isoformas principales de la COX, una constitutiva o COX-1 y otra inducible o COX-2 (O'Neill y Ford-Hutchinson, 1993).

Se ha sugerido la existencia de al menos tres enzimas del tipo PGES, denominadas PGES citosólica (cPGES), PGES microsomal-1 (mPGES-1) y PGES microsomal-2 (mPGES-2) (Jakobsson y cols., 1999; Murakami y cols., 2000; Tanioka y cols., 2000). En la OA, la PGE<sub>2</sub> no sólo potencia los efectos de otros mediadores inflamatorios, sino que además contribuye a la destrucción de la articulación promoviendo la producción de MMP, aumentando la resorción ósea y



## *Introducción*

---

produciendo angiogénesis. La producción de PGE<sub>2</sub> en la OA, que se atribuía únicamente a la actividad de la enzima inducible COX-2, se atribuye en la actualidad a la inducción coordinada de las enzimas COX-2 y mPGES-1, ambas inducibles por IL-1 $\beta$  (Thomas y cols., 2000; Li y cols., 2005). La expresión de mPGES-1 se ve aumentada en condrocitos OA por citocinas inflamatorias (Kojima y cols., 2004), y la evidencia apunta a que la mPGES-1 está implicada en la patogénesis de la OA y a que actúa como enzima inducible en la producción de PGE<sub>2</sub> en patologías artríticas (Trebino y cols., 2003).

De hecho, la mPGES-1 se encuentra en el cartílago OA en las capas más superficiales, al igual que la IL-1 $\beta$ , lo cual concuerda con el papel inductor de la IL-1 $\beta$  sobre esta enzima (Kojima y cols., 2004). A pesar de que algunos estudios han descrito que los ratones sin el gen de la mPGES-1 no muestran diferencias significativas respecto a los animales con el gen en OA inducida por procedimientos quirúrgicos (Yamakawa y cols., 2008), es interesante destacar que la deficiencia de mPGES-1 resulta en una atenuación de la artritis y una menor degradación del cartílago en ratones (Trebino y cols., 2003). Otra evidencia de la importancia de la mPGES-1 como diana potencial en la OA sería que tanto dicha enzima como la COX-2 se inducen por compresión en explantes de cartílago humano (Gosset y cols., 2006).

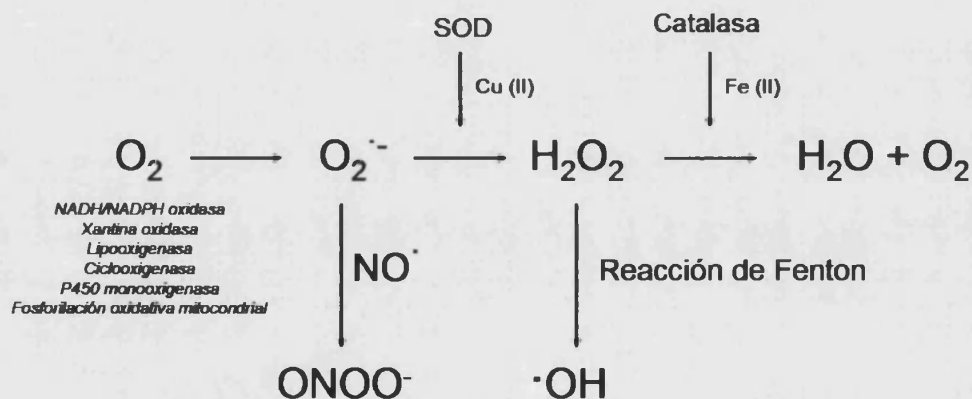
### **2.3.4. El estrés oxidativo**

El estrés oxidativo es el aumento de los radicales libres en las células, que se acumulan hasta alcanzar concentraciones más altas de lo normal, produciéndose un desequilibrio significativo entre la producción de agentes oxidantes y las defensas antioxidantes. Las causas más frecuentes de estrés oxidativo incluyen la inflamación, la toxemia o las infecciones. Cuando la producción de radicales libres es excesiva o inadecuada, se dañan las células y los tejidos, específicamente las mitocondrias, las membranas celulares, el ADN, las proteínas y los lípidos. Estas alteraciones provocadas por el estrés oxidativo pueden inducir la muerte celular por

apoptosis y contribuyen a agravar los procesos de senescencia (revisado en Sastre y cols., 2000).

La mayoría de los radicales libres presentes en el organismo se producen de manera endógena y son derivados del oxígeno, denominados especies reactivas de oxígeno (ROS), o derivados del nitrógeno, denominados especies reactivas de nitrógeno (RNS). Son moléculas que contienen uno o más electrones no apareados y son capaces de existir de forma independiente. Según la teoría del radical libre sobre el envejecimiento, éste estaría causado por las reacciones de los radicales libres sobre nuestro organismo (Harmann, 1956).

Esquema 4. Origen de las ROS generadas de forma endógena por las células.



El radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) se crea por la reducción del  $\text{O}_2$  con un electrón. Aunque el sistema de reducción/oxidación mitocondrial y la enzima citocromo P450 monooxigenasa son elementos bien conocidos que producen  $\text{O}_2^{\cdot -}$ , existen otros productores de ROS, como la xantina oxidasa, la COX, la lipoxigenasa, la oxidasa mitocondrial, la NOS y la NADPH oxidasa. El  $\text{O}_2^{\cdot -}$  sólo es reactivo en contacto con otros radicales, como el NO o ciertos metales como el hierro. El  $\text{O}_2^{\cdot -}$  sufre una dismutación en presencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD), para formar peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), molécula que ejerce tanto efectos beneficiosos como perjudiciales sobre los tejidos (Salo y cols., 1990). El  $\text{H}_2\text{O}_2$

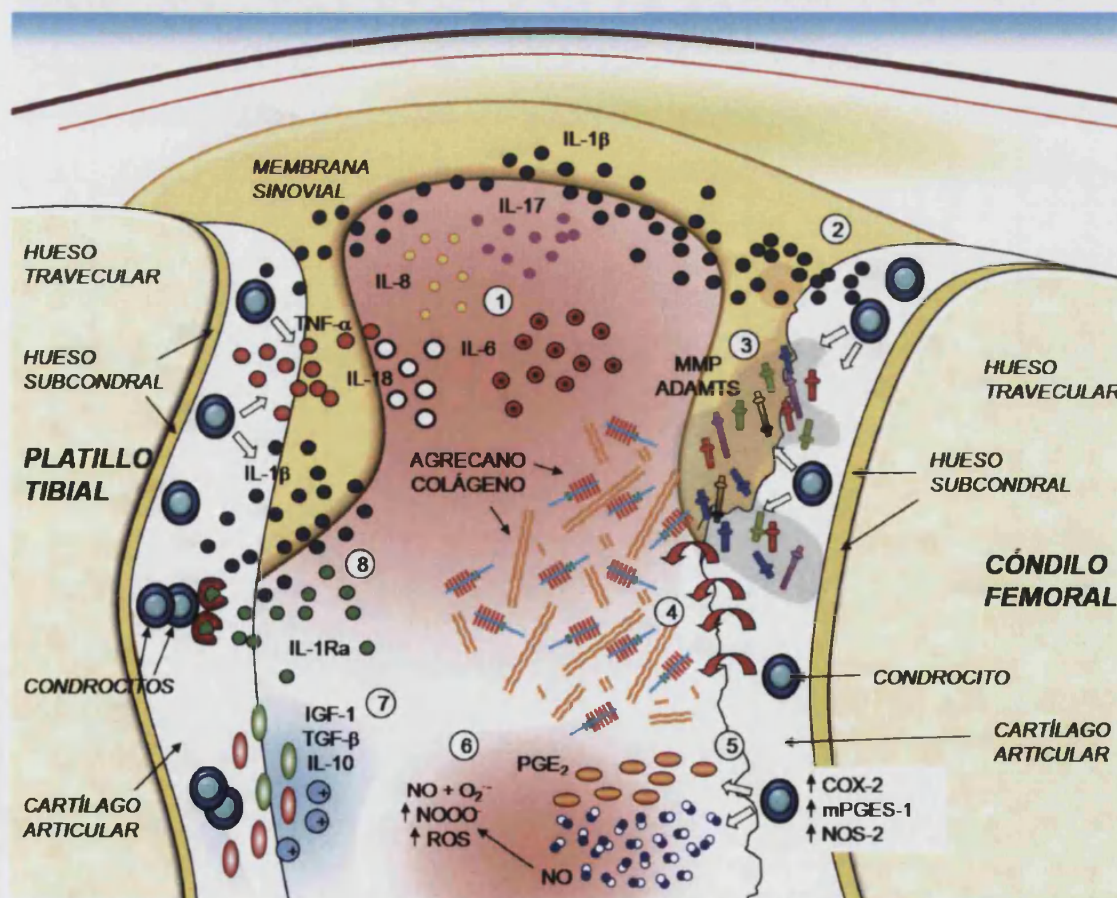
puede degradar a las hemoproteínas para liberar hierro y, lo que es más importante, puede generar más radicales libres peligrosos a través de la reacción de Fenton. El  $H_2O_2$ , que no se considera un radical al tener los electrones apareados, se descompone por acción de la catalasa o por la peroxidasa generando agua y oxígeno. La reacción de Fenton produce un radical más potente, el hidroxilo ( $\cdot OH$ ), que ataca y lesiona la mayoría de componentes celulares. El NO, producido por la enzimas NOS (ver sección 2.2.3.4.), también es peligroso en cantidades excesivas, pero esto se atribuye más a su metabolito activo peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) que al propio NO. El  $ONOO^-$  se forma en la reacción entre el  $O_2^{\cdot -}$  y el NO. El  $ONOO^-$  es una sustancia oxidante y nitrante, causante de daños a un gran número de biomoléculas que incluyen proteínas y ADN. Otros radicales libres de interés son los generados en las reacciones de peroxidación lipídica, como son los radicales alcoxi ( $RO\cdot$ ) y los radicales peroxi ( $ROO\cdot$ ) (Mandelker, 2008).

En los procesos inflamatorios, el estrés oxidativo está aumentado, con el consiguiente daño celular en el foco inflamatorio. Citocinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  estimulan la producción de ROS (Gloire y cols., 2006). Además, la activación de los neutrófilos implica un aumento de NADPH y un brusco incremento del consumo de oxígeno, lo que se traduce en la generación masiva de ROS por activación del complejo NADPH oxidasa asociado a la membrana plasmática. Por otro lado, la activación posterior de los macrófagos también tiene como resultado la generación de ROS. Asimismo, en la apoptosis se encuentran aumentadas las especies de oxígeno, destacando el radical superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). Tanto las ROS como las enzimas liberadas en el proceso de desgranulación leucocitaria son consideradas como principales responsables del daño tisular asociado a los procesos inflamatorios (Lee y cols., 2000).

En la OA, la elevada producción de NO producido por la enzima NOS-2 aumenta los niveles de estrés oxidativo, por su interacción con el anión superóxido para formar peroxinitrito. Este producto citotóxico y un gran número de especies reactivas derivadas de él pueden oxidar componentes celulares y liberar antioxidantes endógenos (Radi y cols., 1991). El NO es, además, uno de los

principales mediadores inflamatorios en la OA y en la artritis reumatoide (Grabowski y cols., 1997). El cartílago OA genera grandes cantidades de NO y se han hallado niveles altos de nitratos y nitritos (derivados del NO) en el fluido sinovial de pacientes artríticos. El NO está implicado en la destrucción del cartílago OA por distintos mecanismos: puede inhibir la síntesis de macromoléculas de la matriz extracelular del cartílago, como el agregano, incrementar la actividad MMP y reducir la síntesis de IL-1Ra por parte de los condrocitos. El NO también tiene efectos sobre la apoptosis en condrocitos e induce a la COX-2 y, por lo tanto, la síntesis de PGE<sub>2</sub>.

Figura 10. Inflamación y procesos metabólicos en el cartílago OA de la articulación de la rodilla.



En la OA, las citocinas proinflamatorias IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-17, IL-18 e IL-8, se encuentran presentes a elevadas concentraciones (1). La IL-1β procedente mayoritariamente del fluido sinovial (2), induce la producción de MMP y ADAMTS en los condrocitos (3), dirigiendo la degradación de colágeno y proteoglicanos del cartílago (4). Las citocinas proinflamatorias estimulan la producción PGE<sub>2</sub> y de NO, al inducir la expresión de las enzimas COX-2, mPGES-1 y NOS-2 en el condrocito (5). El NO y otras ROS aumentan el estrés oxidativo (6). Los factores anabólicos como el IGF-1 o el TGF-β y la citocina antiinflamatoria IL-10, tratan de compensar los procesos de degradación y la inflamación en el cartílago (7). Los antagonistas del receptor de IL-1 IL-1Ra se unen a sus receptores bloqueando los efectos de la IL-1β (8).

En general, el NO inducible (procedente de la NOS-2) actúa reduciendo los principales procesos anabólicos e incrementando los catabólicos, pudiéndose considerar como un factor netamente destructor de la articulación. De hecho, los conocimientos presentes apuntan a un posible valor terapéutico de los inhibidores de la NOS-2 en el tratamiento de la OA como condroprotectores, analgésicos y antiinflamatorios (Martel-Pelletier y Pelletier, 2007).

En general, las ROS ejercen efectos dañinos en el cartílago como consecuencia de la degradación de la matriz extracelular o la apoptosis de los condrocitos (Burkhardt y cols., 1986; Yoon y cols., 2002a; Henrotin y cols., 2003). Se ha descrito que el estrés oxidativo se correlaciona con la cantidad de IL-1 $\beta$  y con la resistencia a IGF-1 en condrocitos humanos (Loeser y cols., 2002). Además, algunos estudios que han examinado la esperanza de vida de los condrocitos articulares han demostrado que el estrés oxidativo está relacionado con la senescencia prematura y podría ser responsable del desarrollo de la OA (Yudoh y cols., 2005b; Dai y cols., 2006).

### **2.3.5. La cascada de las MAP cinasas y los factores de transcripción**

La transcripción génica de la IL-1 $\beta$ , elevada en el cartílago y sinovio OA (Attur y cols., 2002) y sus actividades biológicas son reguladas por activación de MKK y MAPK (Eder, 1997). En la OA, la activación de la vía de señalización de ERK1 y ERK2 regula a la baja la proliferación de los condrocitos, con una disminución de la expresión de agregano y colágeno II (Fan y cols., 2006; Yoon y cols., 2002b). También cabe destacar que la inducción de IL-6 por parte de la IL-1 $\beta$  implica a las vías de señalización de ERK, p38 y NF- $\kappa$ B (Fan y cols., 2004). Además, se ha descrito que las ERK1 y 2 pueden inducir la enzima mPGES-1 en condrocitos humanos (Masuko-Hongo y cols., 2004). La vía de la p38 también tiene un papel esencial en la OA, regulando las actividades metabólicas de los condrocitos articulares humanos (Fan y cols., 2007; Fan y cols., 2006). De hecho, la inducción de MMP-13 por IL-1 $\beta$  requiere de las vías de p38 y de NF- $\kappa$ B (Mengshol y cols.,

2000). En la patogénesis de la OA, una de las vías de señalización mayoritarias inducida por citocinas implica al factor NF- $\kappa$ B, responsable de la transcripción de muchos genes relevantes en la inflamación de la articulación (Barnes y Karin, 1997). La regulación del NF- $\kappa$ B podría prevenir el progreso de la lesión articular. Así, algunos fármacos aprobados para el tratamiento de la OA inhiben la activación de este factor de transcripción por IL-1 $\beta$  en condrocitos OA, como la “glucosamina” o la “diacereína” (Largo y cols., 2003; Domagala y cols., 2006). Además, estudios en los que se administra siRNA de NF- $\kappa$ B p65-específico durante OA experimental han corroborado la importancia de este factor (Chen y cols., 2008). También cabe destacar la función del factor HIF-1 $\alpha$  en vías de la inflamación y en el metabolismo del cartílago OA (Grimmer y cols., 2007). En condrocitos OA, el estrés catabólico u oxidativo y citocinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  inducen la expresión de HIF-1 $\alpha$  (Yudoh y cols., 2005 $\alpha$ ). El factor de transcripción AP-1, por su implicación en la expresión de genes proinflamatorios, también actúa en la OA (Liacini y cols., 2002), mientras que el EGR-1 podría ser un regulador clave en la transcripción de la mPGES-1 en respuesta a la estimulación por citocinas (Naraba y cols., 2002).

### 2.3.6. Papel de la HO-1 en la OA

Nuestro grupo de investigación ha estudiado en trabajos previos el posible papel de la vía HO-1 en modelos animales de artritis reumatoide. Así, se observó que la inducción de HO-1 reduce parcialmente la respuesta inflamatoria en la artritis por adyuvante en rata (Devesa y cols., 2005). En el modelo de artritis por colágeno en ratón, la inducción de HO-1 tuvo efectos preventivos y terapéuticos, siendo capaz de reducir la inflamación articular y los niveles de citocinas, además de la erosión del cartílago (Devesa y cols., 2005). Estos efectos inhibidores fueron más acusados con la liberación de CO, mediante la administración de CORM-3, que demostró ejercer potentes efectos antiinflamatorios y protectores frente a la lesión articular en el mismo modelo experimental (Ferrándiz y cols., 2008). Otros autores han



## Introducción

---

demostrado que la HO-1 podría regular negativamente la osteoclastogénesis en la artritis inflamatoria experimental (Zwerina y cols., 2005).

En la artritis reumatoide humana, la HO-1 se expresa en tejidos sinoviales artríticos y puede tener un papel antiinflamatorio (Kobayashi y cols., 2006). También se ha indicado que la existencia de un polimorfismo genético en el promotor de HO-1 puede ser un marcador genético de esta enfermedad (Rueda y cols., 2007).

Existen pocos datos sobre el posible papel de la vía HO-1 en la OA. Nuestro grupo ha demostrado que la expresión de HO-1 está aumentada en condrocitos OA y que dicha expresión es regulada de forma negativa por citocinas inflamatorias, como IL-1 $\beta$ , IL-17 y TNF- $\alpha$ , y de forma positiva por la citocina antiinflamatoria IL-10 (Fernández y cols., 2003). También se observó que la inducción de HO-1 podría ser parte de los mecanismos protectores de un nuevo inhibidor de COX-2, que inhibe la producción de mediadores catabólicos en explantes de cartílago OA (Fernández y cols., 2004). Además, otros autores han puesto de manifiesto que la inducción de HO-1 en condrocitos OA por concentraciones bajas de nitroprusiato sódico, protege frente a la apoptosis inducida por altas concentraciones de este agente (Kim y cols., 2005).

Los conocimientos previos y los resultados anteriores nos llevaron a proponer la hipótesis de que la activación de la vía HO-1 podría tener como resultado efectos antiinflamatorios y protectores en modelos *in vitro* de OA.

### ***3. OBJETIVOS***





Dada la importancia de la inflamación en el desarrollo de procesos crónicos, el objetivo de la presente tesis fue **la determinación del posible papel protector de la vía HO-1 en dos modelos *in vitro* de respuesta inflamatoria intestinal y de osteoartritis:**

- Como modelo de inflamación intestinal se utilizaron cultivos de células de la línea Caco-2 estimuladas con citocinas proinflamatorias o sometidas a privación de suero.
- En el estudio de los procesos implicados en la degeneración del cartílago articular se emplearon cultivos primarios de condrocitos y explantes de cartílago procedentes de enfermos osteoartrosicos sometidos a intervención quirúrgica para la implantación de una prótesis de rodilla.

En estos modelos se determinaron los efectos de la inducción de HO-1 (con el fármaco cobalto protoporfirina IX) y de la liberación de CO (con el fármaco CORM-2) sobre la respuesta inflamatoria y el estrés celular. Se consideraron aspectos como el metabolismo celular, la producción de mediadores inflamatorios y la inducción de enzimas degradativas. También se establecieron los mecanismos de acción responsables de estos efectos, estudiando las vías de señalización implicadas.



## ***4. MATERIAL Y MÉTODOS***



## **4.1. CULTIVOS CELULARES**

### **4.1.1. Cultivo de la línea celular Caco-2**

La línea celular Caco-2, es una línea de células humanas de epitelio intestinal con cáncer de colon. Procede de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC 86010202, Salisbury, Reino Unido). Estas células en cultivo crecen en monocapa adheridas a un sustrato y tras alcanzar la confluencia, se diferencian espontáneamente como enterocitos maduros, adquiriendo una clara polaridad morfológica y funcional (figura 11). El cultivo se realizó en frascos de 75 cm<sup>2</sup> de superficie, en un incubador celular con atmósfera controlada al 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de humedad y 37° C, empleando el medio de Eagle modificado *MEM* (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10%, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin, fungizona 1 mM, glutamina 2 mM, HEPES 10 mM y piruvato sódico 1 mM, hasta alcanzar el 80% de confluencia (tiempo promedio: 5-7 días), cambiando el medio en días alternos. A continuación se procedió a lavar la monocapa celular con 5 mL de tampón PBS (tampón fosfato salino a 0,02 M y pH 7,4) y a desprender las células del fondo del frasco con 5 mL de una solución de tripsina (0,25%)/EDTA (0,53 mM), dejando actuar a la enzima durante aproximadamente un minuto a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró la solución de tripsina del frasco y se mantuvieron las células en el incubador durante 10-15 minutos a las condiciones conocidas de 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de humedad y 37° C. Transcurrido ese tiempo, las células despegadas se recogieron en medio de cultivo, se cuantificaron en una cámara cuentaglobulos de Neubauer y se procedió a la siembra. Las células fueron utilizadas entre los pases 20° y 40°.

### *CONDICIONES DE EXPERIMENTACIÓN*

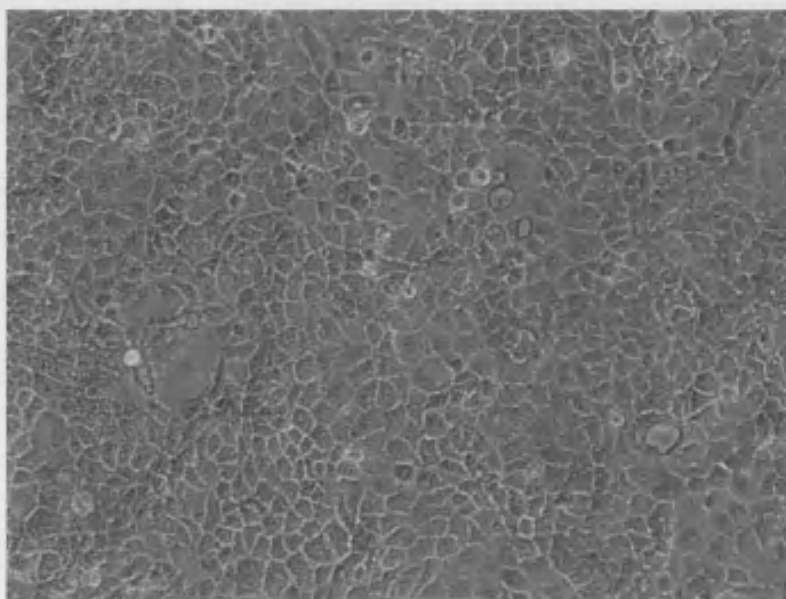
Las células de la línea Caco-2 fueron sembradas en placas de 6 pocillos o en microcámaras tipo *Chamber Slide*, dependiendo del experimento a realizar. Tras la

siembra se dejaron crecer las células durante tres días coincidiendo con el principio de la fase proliferativa. Transcurrido ese tiempo se sustituyó el medio completo por medio sin SBF y se añadieron los productos.

En los ensayos de apoptosis-necrosis y en los de ciclo celular estas condiciones de restricción de suero se mantuvieron durante todo el experimento (7 días), con cambio del medio de cultivo y los productos en días alternos. La finalidad de la privación de suero durante 168 horas fue la de inducir apoptosis en las células, pudiendo así observar los efectos de la inducción de la HO-1 y de sus metabolitos en dicho proceso.

En los experimentos relacionados con los efectos del inductor de HO-1 CoPP y del dador de monóxido de carbono CORM-2 sobre la respuesta inflamatoria, las células se sembraron y dejaron crecer durante 3 días para, posteriormente, sustituir el medio completo por medio sin SBF y añadir los productos. Transcurridos 30 minutos después de la adición de los productos, las células se estimularon con una mezcla de citocinas proinflamatorias denominada “citomix” y que contenía: IFN- $\gamma$  (1000 U/mL), IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) y TNF- $\alpha$  (10 ng/mL). Los tiempos de estimulación fueron diferentes dependiendo del experimento a realizar. Los efectos del citomix sobre los enterocitos Caco-2 podrían recrear las condiciones que se dan en patologías inflamatorias intestinales (Jobin y Sartor, 2000).

**Figura 11.** *Monocapa de células Caco-2 en cultivo.*



#### 4.1.2. Cultivo primario de condrocitos en monocapa

Los especímenes de cartílago (figura 12) se obtuvieron de pacientes con diagnóstico de OA avanzada (61 mujeres y 30 hombres, edad  $73 \pm 5$ , media  $\pm \epsilon$ ). Dichos pacientes fueron sometidos a cirugía en la cual se les sustituyó la articulación de la rodilla por una prótesis. El diagnóstico de la OA se basó en una evaluación clínica, radiológica y de laboratorio. El diseño del trabajo fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Clínico Universitario de Valencia y se realizó con el consentimiento de los pacientes de acuerdo con la declaración de Helsinki (ver informe del CEIC en los anexos, sección 10).

**Figura 12.** *Especímenes de rodilla humana.*



Fragmentos de rodilla procedentes de pacientes con OA. La zona blanca superior constituye el cartílago articular, la zona anaranjada inferior corresponde al hueso subcondral y trabecular.

Con la ayuda de un escalpelo y en condiciones de esterilidad se diseccionó el cartílago procedente del cóndilo femoral y del platillo tibial de los especímenes en pequeños fragmentos. Posteriormente se aislaron los condrocitos del cartílago mediante digestión enzimática secuencial. Los fragmentos de cartílago fueron expuestos primero a una dilución de hialuronidasa 0,1 mg/mL (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) en medio de Eagle modificado por Dulbecco *DMEM/Ham's F-12* con penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100  $\mu$ g/mL) durante 1 hora en un incubador con atmósfera al 5% de  $\text{CO}_2$ , 95% de humedad y 37° C. Después se sustituyó el medio por una dilución de colagenasa tipo IA (Sigma Aldrich, St. Louis,



### *Material y métodos*

---

MO, EE.UU.) a 1 mg/mL durante 12 horas en el mismo tipo de medio de cultivo y en las condiciones anteriores. Transcurrido ese tiempo, el cartílago digerido se filtró a través de una malla de nylon estéril de 70 µm de tamaño de poro. Se realizaron dos lavados con *DMEM* suplementado con SBF al 10%, penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 µg/mL (*DMEM* completo). Se resuspendieron las células en 1 mL de medio completo y se llevó a cabo el método de exclusión de azul de tripano (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) con el fin de diferenciar las células vivas de las no viables. Para ello se preparó una dilución 1:1 del medio con las células en suspensión con azul de tripano (0,4% en suero fisiológico estéril) y se cuantificaron las células viables con ayuda de una cámara cuentaglobulos de Neubauer. El azul de tripano es un colorante que se introduce en el interior de las células, dando una coloración azul a sus citoplasmas. Las células vivas, excluyen a estos colorantes por medio de un mecanismo de transporte activo, de modo que las células que muestran color azul se consideran no viables y no se tienen en cuenta en el recuento. En las siembras sólo fueron utilizadas aquellas suspensiones con una viabilidad superior al 90%.

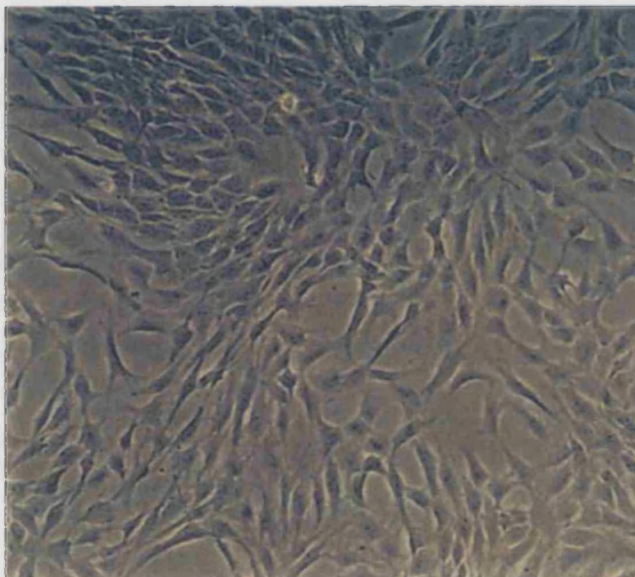
### *CONDICIONES DE EXPERIMENTACIÓN*

Los condrocitos aislados se sembraron en placas de Petri o en placas multipocillo y a diferentes concentraciones, dependiendo del experimento a realizar. Las células fueron cultivadas en medio *DMEM* completo en un incubador humidificado, en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y a 37° C. Los cultivos primarios de condrocitos se dejaron crecer hasta aproximarse la confluencia, con cambios de medio en días alternos. Al alcanzar una confluencia cercana al 80%, los condrocitos se incubaron en presencia de los productos a diferentes concentraciones durante 30 minutos antes de la adición del estímulo. El estímulo utilizado fue IL-1β, utilizada a la concentración de 100 U/mL. El tiempo de estimulación varió en función del experimento.

La elección de la IL-1β como estímulo se debió a que dicha citocina proinflamatoria está presente tanto en el fluido sinovial como en los condrocitos de pacientes con OA y participa en procesos relacionados con el catabolismo del cartílago (Dodge y Poole, 1989; van der Kraan y van den Berg, 2000; Elson y cols.,

1998) y los procesos inflamatorios en la OA (Attur y cols., 1998; Tetlow y cols., 2001).

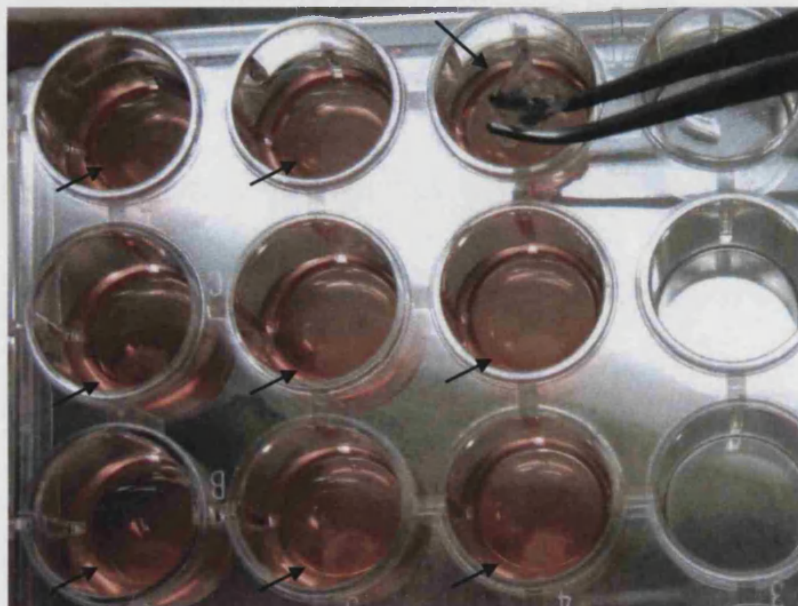
**Figura 13.** Cultivo primario de condrocitos OA.



#### **4.1.3. Cultivo tridimensional de condrocitos en alginato**

El alginato es un polisacárido derivado del ácido algínico, que se obtiene de algas marinas pardas. Esta molécula polimeriza en presencia de  $\text{CaCl}_2$  formando una estructura semisólida. Los condrocitos primarios, procedentes del cartílago articular, fueron aislados por digestión enzimática y lavados con medio completo, tal y como se indica en el apartado 4.1.2. de esta sección. Tras el segundo lavado, las células se resuspendieron en 1 mL de medio *DMEM* completo y se procedió al recuento celular en una cámara de Neubauer. En este recuento se aplicó el método de exclusión de azul de tripano anteriormente detallado. Las células se centrifugaron y se eliminó el sobrenadante. El pellet celular fue resuspendido en esta ocasión con 1 mL de una disolución de alginato estéril (2% en una solución 0,15 M de NaCl, en agitación 2 horas y filtrado a través de un tamiz de  $0,45 \mu\text{m}$ ), precalentada a  $37^\circ \text{C}$ .

**Figura 14.** Cultivo tridimensional de condrocitos primarios en lechos de alginato.



Los cultivos primarios de condrocitos en alginato se emplearon con el fin de aumentar el rendimiento de infección con lentivirus (ver sección 4.2.2.). Las flechas señalan los lechos de alginato.

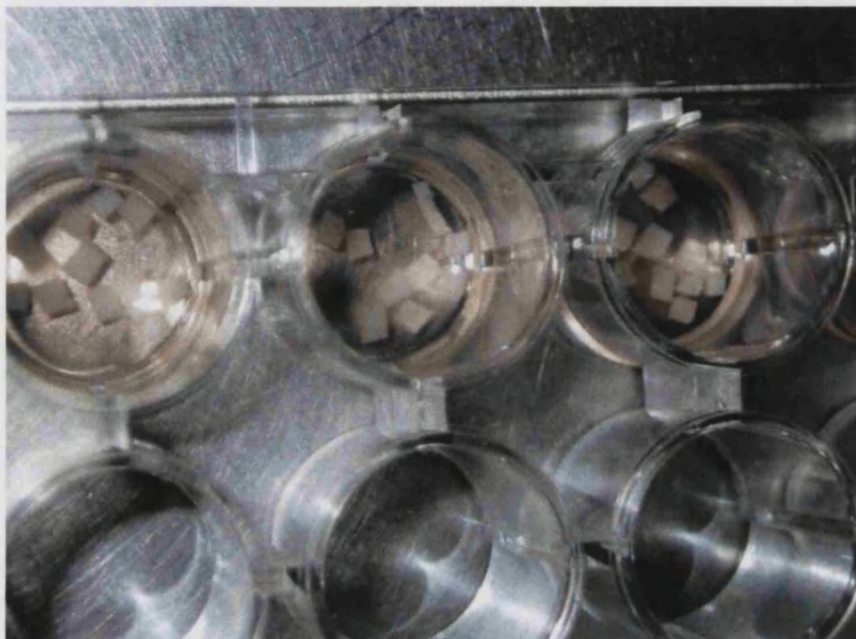
### CONDICIONES DE EXPERIMENTACIÓN

La suspensión celular se diluyó en la solución de alginato hasta alcanzar una concentración de  $1,5 \times 10^6$  células/mL, y se sembró en placas multipocillo a  $4 \times 10^5$  células/pocillo. Para conseguir la polimerización, se añadió una solución estéril de  $\text{CaCl}_2$  100 mM. Tras 10 minutos de incubación en el incubador celular a las condiciones habituales, el alginato polimerizó, quedando las células embebidas en la estructura tridimensional. Los lechos de alginato se lavaron 3 veces con NaCl 0,15 M y 2 veces con *DMEM* completo suplementado con 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ácido ascórbico. El cultivo de condrocitos en alginato se mantuvo durante 12 días, con cambios de medio completo con ácido ascórbico los días alternos. Este soporte mantiene a las células en su forma tridimensional, frente al cultivo en placa, en el que la adherencia a la misma implica aplanamiento, pérdida de superficie celular y pérdida del fenotipo condrocítico a largo plazo.

#### 4.1.4. Cultivo de explantes de cartilago

Al igual que para el aislamiento de condrocitos, los especímenes de cartilago se obtuvieron de pacientes con diagnóstico de OA avanzada que fueron sometidos a cirugía con la sustitución total de la articulación de la rodilla por una prótesis. En este caso los especímenes proceden de 14 pacientes con OA (9 mujeres y 5 hombres, edad  $71 \pm 8$ , media  $\pm \epsilon$ ), previa aprobación del trabajo por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia y con el consentimiento de los mismos. Los explantes son pequeñas porciones de cartilago con forma de cubo irregular extraídas del cóndilo femoral. Estos explantes fueron diseccionados del tejido cartilaginoso con la ayuda de un escalpelo y en condiciones de esterilidad. Cada porción midió 2 mm de largo, por 2 mm de ancho, por 2 mm de alto, aproximadamente.

**Figura 15.** *Cultivo de explantes de cartilago OA.*



### *CONDICIONES DE EXPERIMENTACIÓN*

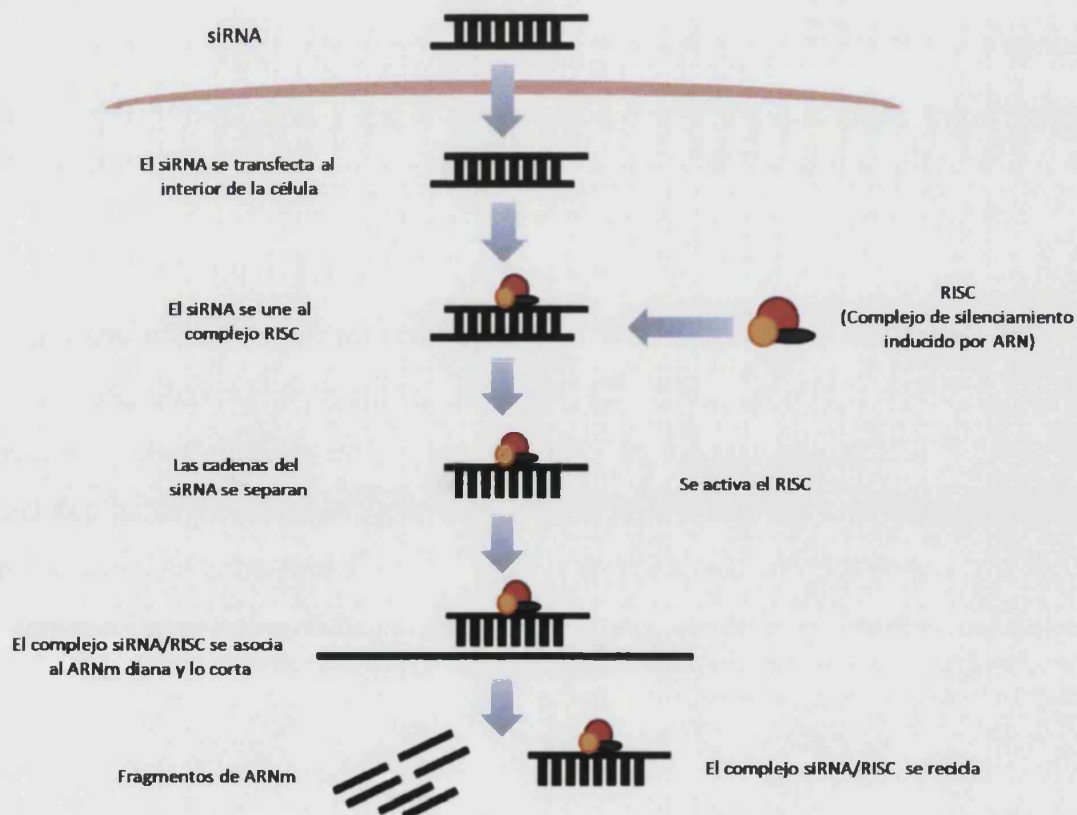
Los explantes fueron transferidos a placas estériles de 24 pocillos, repartiéndose el mismo número de explantes en cada pocillo (figura 15). Se les adicionó medio *DMEM* completo y se incubaron en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>, con un 95% de humedad y a 37° C durante 2 días, antes de comenzar los experimentos, para permitirles estabilizarse. Los cultivos de explantes se emplearon en el ensayo de degradación de glicosaminoglicanos, como se detalla en la sección 4.3.5.

## 4.2. TRATAMIENTOS DE LOS CULTIVOS CELULARES

### 4.2.1. Inhibición de la expresión génica por interferencia de ARN

Con el objetivo de inhibir la expresión de determinados genes, se emplearon moléculas de ARN de interferencia de tamaño pequeño o “silenciadores” (siRNA), sintetizadas por Ambion (Austin, TX, EE.UU.). Los siRNA son oligonucleótidos que, tras ser transfectados, se incorporan a un complejo de proteínas que contiene nucleasas (complejo de silenciamiento inducido por ARN). Una vez activado el complejo, la hebra antisentido del siRNA se une a la hebra complementaria del ARNm y se induce la degradación enzimática de éste (Aigner, 2006).

Figura 16. Silenciamiento de la expresión génica por siRNA.



De esta forma, con el uso de un siRNA específico de HO-1 se consiguió inhibir la expresión de HO-1 inducida por CoPP, evidenciando así posibles efectos de dicha porfirina independientes de la inducción de HO-1. La secuencia y la concentración adecuadas fueron seleccionadas tras diversos experimentos que confirmaron la inhibición de la expresión del ARNm de HO-1 inducida por CoPP, en más del 90 % (determinado por PCR a tiempo real en células Caco-2 y en condrocitos primarios). Las concentraciones requeridas para conseguir tales niveles de inhibición fueron de 80 nM en el caso de las células Caco-2 y de 100 nM en condrocitos primarios. Además, en ciertos experimentos con células Caco-2 se empleó un silenciador de la expresión de IL-6 a la concentración de 80 nM. Como control negativo de IL-6 y HO-1 se empleó un oligonucleótido inespecífico a la misma concentración de los respectivos silenciadores.

#### *PROTOCOLO*

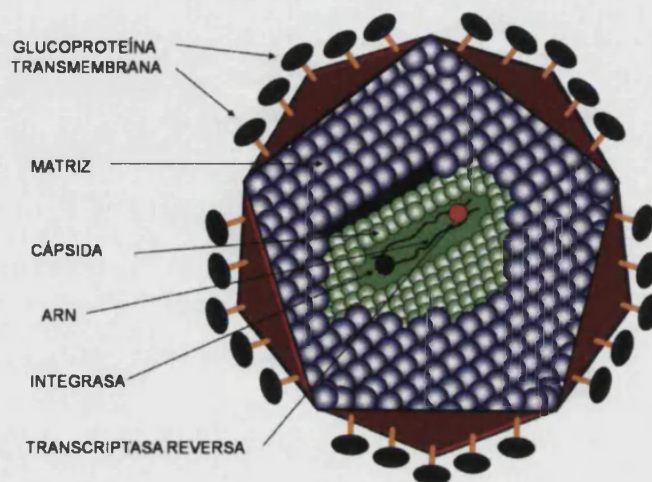
En los experimentos de apoptosis-necrosis llevados a cabo en la línea celular Caco-2, el siRNA (80 nM) se transfectó 12 horas antes del inicio de la privación de SBF y nuevamente 12 horas antes del día 4 de la restricción de suero.

En los experimentos realizados en condrocitos, el siRNA (100 nM) se transfectó 24 horas antes de la estimulación con IL-1 $\beta$ . El agente de transfección utilizado fue siPORT<sup>TM</sup> Amine (Ambion, Austin, TX, EE.UU.). El complejo formado por el siRNA y el siPORT<sup>TM</sup> Amine se preparó en medio de cultivo no suplementado y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, se adicionó a las células en cultivo y se incubó durante 12 ó 24 horas (5% CO<sub>2</sub>/95% humedad/37° C) con el fin de conseguir el máximo rendimiento de transfección, siguiendo las especificaciones del fabricante.

#### 4.2.2. Transducción de vectores virales en cultivos tridimensionales de condrocitos

En la terapia génica, los vectores son vehículos que se utilizan para transferir genes a las células. En concreto, los vectores de tipo vírico son de gran utilidad, ya que pueden penetrar en las células insertando en ellas su material genético. En la transducción de genes, uno de los tipos de virus más utilizados son los lentivirus, ya que son capaces de mediar de forma eficiente la inserción, integración y expresión de transgenes, tanto en células que se dividen como en las que no lo hacen. Los lentivirus pertenecen a la familia de los retrovirus e insertan su genoma en la célula hospedadora gracias a enzimas transcriptasas reversas, que se encargan de la retrotranscripción, y de integrasas, que insertan su ADN en el genoma del hospedador. Utilizamos lentivirus que fueron producidos con el material genético de la HO-1, capaces de penetrar en los condrocitos primarios en cultivo tridimensional e integrar en el genoma celular la secuencia génica de la enzima. El gen de HO-1 fue marcado con un marcador Flag, que permitió el reconocimiento de la proteína en posteriores análisis inmunocitoquímicos.

Figura 17. Estructura y componentes de un lentivirus.





## *PROTOCOLO*

Para la producción de los lentivirus con el ADN de HO-1 utilizamos células de la línea celular HEK-293 (Colección Europea de Cultivos Celulares ECACC 85120602, Porton Down, Reino Unido), a las que transfectamos los componentes necesarios para la formación del virus dentro de ellas. Las células embrionarias de riñón humano HEK-293 fueron incubadas en medio de cultivo *DMEM* suplementado con SBF al 10%, penicilina 100 U/mL y estreptomycinina 100 µg/mL (*DMEM* completo), en un incubador al 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de humedad y 37° C de temperatura. Fueron sembradas en placas de Petri de 10 cm de diámetro a 10<sup>6</sup> células/placa y tras 24 horas de incubación (5% CO<sub>2</sub>/95% humedad/37° C) se procedió a la transfección de todos los elementos constituyentes del virus. Para la producción de los lentivirus se utilizaron los vectores de expresión psPAX2, pMD2G y pWXL (Dr. T. Didier, School of Life Sciences, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, Suiza).

La producción de vectores lentivirales en células HEK-293-T se llevó a cabo por transfección transitoria mediada por fosfato cálcico de los tres plásmidos siguientes:

- pWXL-Flag-hHO-1, el plásmido del vector de transferencia
- psPAX2, el plásmido del vector de empaquetamiento para lentivirus
- pMD2G, correspondiente a la proteína que codifica para la envoltura del virus: es una proteína VSV-G o proteína G del virus de la estomatitis vesicular que se utiliza por su alta estabilidad y amplio tropismo.

El plásmido pWXL (carente de proteína de fluorescencia verde “GFP”) con el inserto Flag-hHO-1 (pWXL-Flag-hHO-1) fue generado en dos pasos:

- primero, la secuencia de pWXL que codifica para GFP fue sustituida por un oligonucleótido que fue clonado entre los sitios de BamHI y EcoRI de pWXL (sentido: 5'-CGCGTATTCGGTCACCGTAAG-3' y antisentido: 5'-AATTCTTACGGTGACCGAATA-3').
- segundo, el producto de la amplificación resultante de utilizar pFlag-hHO-1 como hebra molde y los siguientes cebadores (sentido: 5'-TCGCGGATCCATGGACTACAAAGACGATGA-3' y antisentido: 5'-

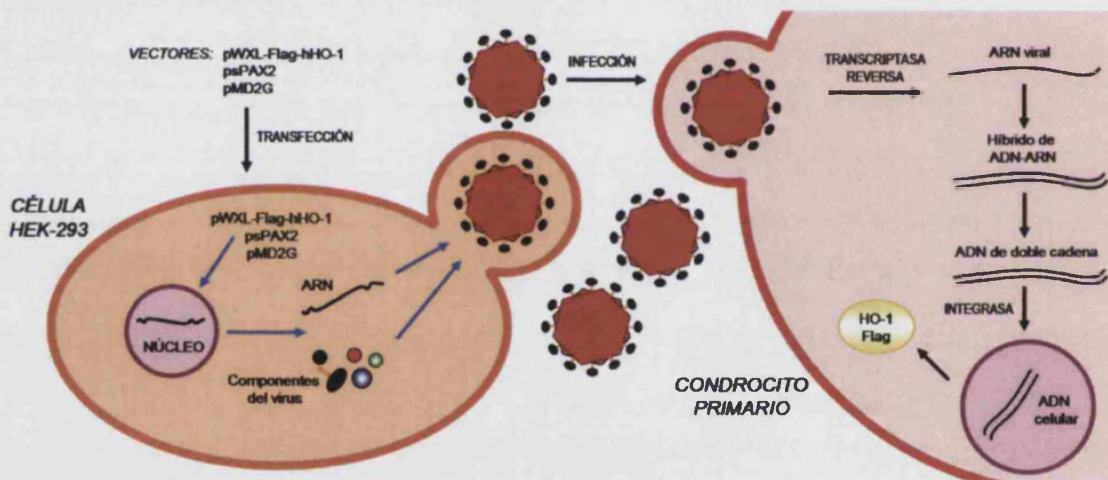
TCCGGAATTCTGGTACCGATATCAGATCTAT-3') fue digerido por las enzimas BamHI / EcoRI y subclonado en los mismos sitios de pWXL (carente de GFP), obteniéndose el plásmido pWXL-Flag-hHO-1.

Para la transfección mediada por fosfato cálcico se preparó una mezcla de los plásmidos en HEPES 2,5 mM a la que se añadió una solución de CaCl<sub>2</sub> 0,5 M en una relación 1:1 (v/v). A su vez esta mezcla se combinó con un tampón HeBS 2x (NaCl 0,28 M, HEPES 0,05 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 mM, pH 7) en una relación 1:1 (v/v). La mezcla final se añadió a las células en cultivo en presencia de medio *DMEM* completo y se mantuvo en el incubador celular (5% CO<sub>2</sub>/95% humedad/37° C) durante la noche. Transcurrido ese tiempo se realizó un cambio de medio para eliminar los precipitados de fosfato cálcico y se añadieron 5 mL de medio completo. Las células HEK-293-T transfectadas con los tres plásmidos produjeron los correspondientes virus y éstos fueron liberados al medio. Durante las 24 y 48 horas siguientes se recogieron los sobrenadantes celulares con la producción de lentivirus de HO-1 (LV-HO-1), se centrifugaron a 700 x g durante 10 minutos a 4° C, se filtraron a través de filtros con un tamaño de poro de 45 µm y se congelaron a -80° C. Las alícuotas de lentivirus presentaron una concentración de virus en el rango de 3 a 5 x 10<sup>5</sup> UI/mL tal y como se determinó por análisis inmunocitoquímicos de células HEK-293-T infectadas (Rojo y cols., 2008). También se produjeron lentivirus con los plásmidos psPAX2 y pMD2G pero sin el gen de HO-1, los cuales denominamos lentivirus vacíos (LV-). Los lentivirus LV-HO-1 se emplearon para infectar cultivos de condrocitos primarios y aumentar la expresión de la enzima HO-1 marcada con Flag, detectable por técnicas inmunocitoquímicas de fluorescencia. La infección con el lentivirus vacío se utilizó como control negativo de la expresión de HO-1.

Con el fin de optimizar el rendimiento de infección en condrocitos primarios, estas células se cultivaron en lechos de alginato (ver sección 4.1.3). Este soporte es más fisiológico que el cultivo en placa y permite a las células mantener su estructura tridimensional, aumentando la superficie celular expuesta a la infección. El cultivo en tres dimensiones de alginato se infectó con el producto lentiviral en presencia de polibreno, un polielectrolito que facilita la penetración de los lentivirus en la célula (utilizado a la concentración final 0,5 mg/mL). El cultivo se incubó en presencia de los

virus durante 24 horas en un incubador al 5% de CO<sub>2</sub>, humidificado y a 37° C. Tras la infección, se realizó un cambio de medio y las células se mantuvieron en reposo durante 48 horas, transcurridas las cuales fueron estimuladas con IL-1β (100 U/mL) durante 24 horas. Finalmente, la expresión de HO-1 y mPGES-1 fue evaluada por análisis inmunocitoquímicos (ver sección 4.3.7.).

**Figura 18.** Producción de lentivirus por células HEK-293 y transducción a condrocitos primarios.



#### 4.2.3. Productos y estímulos

- *Cobalto protoporfirina IX* (CoPP). Molécula inductora de la expresión de HO-1 (figura 19). El sólido fue disuelto en etanol y luego diluido en metanol para preparar la solución de trabajo. Se empleó a las concentraciones de 1, 5 y 10 μM. A la máxima concentración final empleada (10 μM), la concentración final de metanol en el medio de cultivo fue inferior al 1% (v/v) y la de etanol de 0,01% (v/v), aproximadamente. Procede de Frontier Scientific Europe Ltd. (Carnforth, Reino Unido).

- *Tricarbonildiclororrutenio (II), dímero* (CORM-2). Molécula liberadora de CO (figura 19). El sólido fue disuelto en DMSO y luego diluido en medio de cultivo para preparar la solución de trabajo. Se utilizó a las concentraciones finales de 50, 100

y 150  $\mu\text{M}$ . A la máxima concentración final empleada (150  $\mu\text{M}$ ), la concentración final de DMSO en el medio de cultivo fue de 0,01% (v/v), aproximadamente. Fue comprado a Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.).

- *Cloruro de Rutenio* ( $\text{RuCl}_3$ ). Análogo inactivo del CORM-2, fue utilizado como control negativo de la actividad del CORM-2. El sólido fue disuelto en DMSO y luego diluido en medio de cultivo para preparar la solución de trabajo. Se utilizó a la concentración final de 150  $\mu\text{M}$ . A dicha concentración de producto, la concentración final de DMSO en el medio de cultivo fue de 0,01% (v/v), aproximadamente. Procede de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.).

- *Bilirrubina* (BR). Metabolito indirecto de la HO-1. El sólido fue disuelto en DMSO y diluido en *MEM* para preparar la solución de trabajo. Se trabajó con este producto a las concentraciones de 1 y 5  $\mu\text{M}$ . A la máxima concentración final empleada (5  $\mu\text{M}$ ), la concentración de DMSO en el medio de cultivo fue de 0,5% (v/v), aproximadamente. Procede de Frontier Scientific Europe Ltd. (Carnforth, Reino Unido).

- *Biliverdina* (BV). Metabolito de la HO-1. El sólido fue disuelto en DMSO para preparar la solución de trabajo. Se utilizó a las concentraciones de 1 y 5  $\mu\text{M}$ . A la máxima concentración final empleada (5  $\mu\text{M}$ ), la concentración de DMSO en el medio de cultivo fue de 0,5% (v/v), aproximadamente. Obtenido de Frontier Scientific Europe Ltd. (Carnforth, Reino Unido).

- *Indometacina* (INDO). Antiinflamatorio no esteroídico. El sólido fue disuelto en etanol absoluto. La concentración final de indometacina en el medio de cultivo fue de 50  $\mu\text{M}$ . A esta concentración final, la concentración de etanol en el medio de cultivo fue de 0,5% (v/v), aproximadamente. Procede de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.).

- *Citomix* (CIT). Combinación de citocinas proinflamatorias, diluidas en suero fisiológico estéril y a una dilución final en el medio de cultivo de 1/100 (v/v):

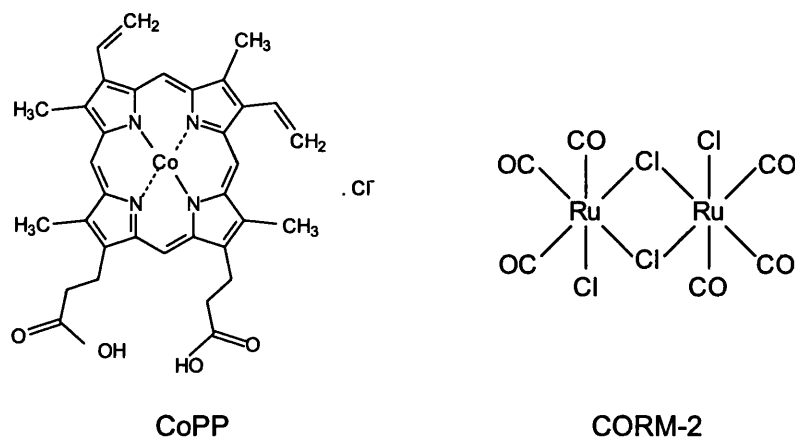
- IFN- $\gamma$  a la concentración final de 1000 U/mL
- IL-1 $\beta$  a 10 ng/mL
- TNF- $\alpha$  a 10 ng/mL

## Material y métodos

Las citocinas componentes del citomix procedieron de Peptotech EC Ltd. (Londres, Reino Unido).

- *IL-1 $\beta$* . Citocina proinflamatoria, se usó como estímulo en los experimentos con condrocitos primarios OA. Disuelta en suero fisiológico estéril. Fue utilizada a la concentración final de 100 U/mL (dilución en el medio de cultivo 1/100) y comprada a Peptotech EC Ltd. (Londres, Reino Unido).
- *IL-6*. Citocina proinflamatoria. Disuelta en suero fisiológico estéril. Se utilizó a las concentraciones de 0,2 y 1 ng/mL (dilución mínima en el medio de cultivo 1/1000). Procedente de Peptotech EC Ltd. (Londres, Reino Unido).

Figura 19. Estructuras químicas de la CoPP y el CORM-2.



El inductor de HO-1 cobaltoproporfirina IX (CoPP) es una molécula con estructura de porfirina que contiene un átomo de cobalto. El grupo hemo y los iones de metales pesados como el Co<sup>2+</sup> son potentes inductores de HO-1 (Alam y cols., 1989; Mitani y cols., 1993).

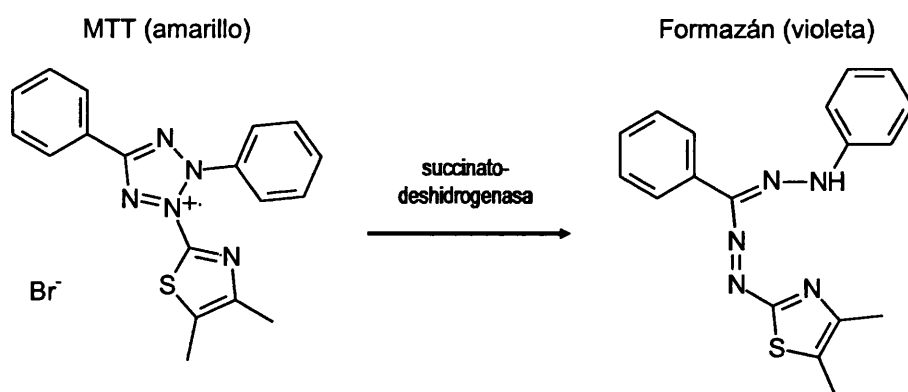
El dímero tricarbonildiclororrutenio (II) o CORM-2 presenta seis moléculas de CO en su estructura. Los CORM ("CO-releasing molecules") son moléculas liberadoras de monóxido de carbono, capaces de transportar y suministrar pequeñas cantidades de CO en sistemas biológicos (Motterlini y cols., 2002).

### 4.3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

#### 4.3.1. Evaluación de la citotoxicidad de los productos por el ensayo del MTT

La prueba de actividad de la succinato-deshidrogenasa o ensayo del MTT consiste en la adición a las células en cultivo de una sal amarilla de tetrazolio, el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT), que es metabolizada gracias a la actividad succinato-deshidrogenasa de las células en proliferación para producir un producto de color violeta llamado formazán. El ensayo fue originalmente concebido para medir la proliferación celular, aunque posteriormente fue modificado y adaptado para medir la citotoxicidad de determinados productos (Jiao y cols., 1992; van de Loosdrecht y cols., 1991). La intensidad colorimétrica resultante es directamente proporcional a la viabilidad celular. Por lo tanto, la disminución de dicha intensidad en las células expuestas a los productos evaluados respecto de sus controles nos dará el porcentaje de toxicidad de dichos productos.

Figura 20. Reducción del MTT a formazán.



PROTOCOLO

Los experimentos se llevaron a cabo en placas de 24 pocillos a  $2,5 \times 10^5$  células/pocillo en el caso de las células Caco-2 y a  $8 \times 10^4$  células/pocillo en los condrocitos primarios. Transcurrido el tiempo de estimulación correspondiente, se sustituyó el medio de los pocillos por una dilución de MTT a 200  $\mu\text{g/mL}$  en medio de cultivo y se incubó durante 2 horas en las condiciones habituales. Posteriormente, se retiró el medio y se solubilizaron las células con 100  $\mu\text{L}$  de DMSO por pocillo (Gross y Levi, 1992). Finalmente se cuantificó el formazán producido con la ayuda de un espectrofotómetro *VICTOR 3<sup>TM</sup> V 1420 multilabel counter*, midiendo a una longitud de onda de 490 nm. En este ensayo se consideró como el 100% de viabilidad (ó 0% de toxicidad) a la viabilidad de las células no estimuladas, estableciéndose los diferentes porcentajes de viabilidad frente a éstas.

**Tabla 1.** Ensayo de viabilidad por MTT en células Caco-2 estimuladas con citomix durante 24 horas.

Tratamiento	% de viabilidad $\pm \epsilon$
B	100,0%
CIT	95,9% $\pm$ 1,6
CoPP 1 $\mu\text{M}$	97,2% $\pm$ 0,8
CoPP 1 $\mu\text{M}$ + CIT	95,1% $\pm$ 1,5
CoPP 5 $\mu\text{M}$	96,5% $\pm$ 2,0
CoPP 5 $\mu\text{M}$ + CIT	95,3% $\pm$ 2,1
CORM-2 50 $\mu\text{M}$	96,3% $\pm$ 0,6
CORM-2 100 $\mu\text{M}$	93,2% $\pm$ 0,9
CORM-2 150 $\mu\text{M}$	92,4% $\pm$ 3,2
CORM-2 50 $\mu\text{M}$ + CIT	96,0% $\pm$ 2,5
CORM-2 100 $\mu\text{M}$ + CIT	92,6% $\pm$ 1,4
CORM-2 150 $\mu\text{M}$ + CIT	93,1% $\pm$ 1,0
RuCl <sub>3</sub> 150 $\mu\text{M}$	97,8% $\pm$ 4,0
RuCl <sub>3</sub> 150 $\mu\text{M}$ + CIT	93,3% $\pm$ 0,5

**TABLA 1:** Las células Caco-2 fueron incubadas con los compuestos a evaluar durante 24 horas en presencia o ausencia de citomix (IFN- $\gamma$  1000 U/mL, IL-1 $\beta$  10 ng/mL y TNF- $\alpha$  10 ng/mL). La viabilidad se expresó como porcentaje respecto a la viabilidad de las células no estimuladas, que se consideró del 100%. Los resultados son la media  $\pm \epsilon$  de 3 experimentos independientes.

**ABREVIATURAS:** CoPP: cobalto protoporfirina IX, CORM-2: dímero tricarbonildiclororrutenio (II), CIT: citomix, B: células no estimuladas.

Siguiendo esta técnica, se procedió a evaluar la toxicidad de los productos, las citocinas y los ARN de interferencia empleados en cultivos de células Caco-2 y en condrocitos primarios. En una primera serie de experimentos se evaluaron los productos en células Caco-2 en condiciones de estimulación con citocinas durante 24 horas. No se detectaron valores de toxicidad significativos en ningún caso (ver tabla 1).

Previamente a los estudios en condrocitos OA, se realizó una prueba de toxicidad a los productos, la IL-1 $\beta$  y los silenciadores. Se evaluaron las diferentes concentraciones de los productos, solos o en combinación con el estímulo o los ARN de interferencia e incubados durante 24 horas.

**Tabla 2.** Ensayo de viabilidad por MTT en condrocitos OA.

Tratamiento	% de viabilidad $\pm \epsilon$
B	100,0%
IL-1 $\beta$	105,6% $\pm$ 3,1
CoPP 10 $\mu$ M	93,2% $\pm$ 2,4
CoPP 10 $\mu$ M + IL-1 $\beta$	95,6% $\pm$ 1,9
siRNA (HO-1) + CoPP 10 $\mu$ M + IL-1 $\beta$	95,3% $\pm$ 2,2
siRNA (inesp.) + CoPP 10 $\mu$ M + IL-1 $\beta$	93,1% $\pm$ 3,0
CORM-2 50 $\mu$ M	95,8% $\pm$ 0,9
CORM-2 100 $\mu$ M	93,1% $\pm$ 2,2
CORM-2 150 $\mu$ M	92,1% $\pm$ 2,4
CORM-2 50 $\mu$ M + IL-1 $\beta$	96,0% $\pm$ 1,7
CORM-2 100 $\mu$ M + IL-1 $\beta$	95,2% $\pm$ 2,0
CORM-2 150 $\mu$ M + IL-1 $\beta$	92,9% $\pm$ 3,2
RuCl <sub>3</sub> 150 $\mu$ M	97,5% $\pm$ 1,0
RuCl <sub>3</sub> 150 $\mu$ M + IL-1 $\beta$	97,3% $\pm$ 4,1

Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) durante 24 horas en presencia o ausencia de los productos. Los siRNA se utilizaron a 100 nM. La viabilidad se expresó como porcentaje respecto a la viabilidad de las células no estimuladas, que se consideró del 100%. Resultados expresados como media  $\pm \epsilon$  de cultivos independientes de células procedentes de 5 donantes diferentes. IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , CoPP: cobalto protoporfirina IX, CORM-2: dímero tricarbonildiclororrutenio (II), siRNA (HO-1): ARN de interferencia para HO-1, siRNA (inesp.): ARN de interferencia inespecífico, B: células no estimuladas.



En la tabla 2 se observa como ninguno de los tratamientos resultó tóxico para las células en cultivo primario, ya que no mostraron una disminución de la viabilidad significativa respecto a las células no tratadas, de hecho, ninguno de los tratamientos superó el 10% de toxicidad.

#### **4.3.2. Ensayo de apoptosis y necrosis por citometría láser**

Un fosfolípido de membrana llamado fosfatidilserina se localiza, en condiciones normales, en la superficie citoplasmática de la membrana celular. Sin embargo, en células apoptóticas, la fosfatidilserina se desplaza del interior al exterior de la membrana plasmática, exponiéndose así al espacio extracelular. La anexina V (proteína con gran afinidad por la fosfatidilserina) conjugada con fluoresceína, es capaz de identificar a las células apoptóticas por unión a la fosfatidilserina expuesta al exterior, mostrando estas células fluorescencia verde. Por otro lado, un colorante vital denominado yoduro de propidio, que no es capaz de penetrar en las células vivas o apoptóticas, se une a los ácidos nucleicos de las células necróticas dando fluorescencia roja.

#### **PROTOCOLO**

La técnica empleada para determinar la proporción de células apoptóticas y necróticas fue la de anexina V (FITC) y yoduro de propidio por citometría láser. En los experimentos con la línea celular Caco-2, las células se sembraron en microcámaras de tipo *Chamber Slide*<sup>TM</sup> de 8 pocillos a  $8 \times 10^4$  células/mL, y se incubaron durante 72 horas. Transcurrido ese tiempo se sustituyó el medio con suero por medio sin suero con el fin de inducir la apoptosis, a la vez que se añadieron los productos y se transfectó el siRNA de HO-1. El cultivo se mantuvo en estas condiciones durante 168 horas, con cambios de medio y adición de productos en días alternos.

Para la medida de apoptosis en condrocitos primarios, las células se sembraron en microcámaras *Chamber Slide*<sup>TM</sup> de 8 pocillos a una concentración de  $4 \times 10^4$

células/mL y se dejaron crecer hasta casi llegar a la confluencia, con cambios de medio en días alternos. Al comenzar el experimento se sustituyó el medio *DMEM* completo y se añadieron los productos en estudio. Las células se estimularon 30 minutos después con 100 U/mL de IL-1 $\beta$  durante 24 horas.

Posteriormente, siguiendo el protocolo establecido en el sistema comercial *Vibrant Apoptosis Assay Kit* (Molecular Probes, Leiden, Países Bajos), se lavaron las células con tampón PBS a 4° C, se añadió una solución de yoduro de propidio y anexina V y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se eliminaron los sobrenadantes y se separó la pieza superior de la microcámara *Chamber Slide<sup>TM</sup>*, quedando el portaobjetos (pieza inferior) con las células adheridas. Al portaobjetos se le adicionó líquido de montaje para fluorescencia (Dako, Copenhagen, Dinamarca) y fue cubierto con un cubreobjetos. La fluorescencia de las células fue medida y analizada en un citómetro láser *Laser Scanning Cytometer (LSC) Bx50 Compucyte Olympus* (Cambridge, MA, EE.UU.), equipado con el programa *Win Cyte 2.1* (Compucyte).

El citómetro láser *LSC* está dotado de un láser de argón ionizado que emite luz a 488 nm, y de dos tubos fotomultiplicadores estándar que detectaron la señal en verde (banda de 530 nm de longitud de onda) y en rojo (banda de longitud de onda mayor que 570 nm). Las preparaciones fueron examinadas mediante un objetivo x100. El área a examinar fue ajustada a la superficie completa del cubreobjetos y al menos 2000 células fueron analizadas en cada uno de los pocillos. El porcentaje de células viables, apoptóticas y necróticas vino dado por la emisión fluorescente de las mismas: verde para las células apoptóticas, roja para las necróticas y basal para las viables.

#### **4.3.3. Medida de la apoptosis por la técnica TUNEL**

La valoración de la apoptosis por el método TUNEL (“TdT-mediated dUTP nick end labelling”), que podríamos traducir como “marcaje del extremo libre con dUTP y mediado por TdT”, se basa en la detección de la fragmentación del ADN del nucleosoma celular. En la apoptosis, el ADN se fragmenta dejando extremos 3'-OH libres. La enzima TdT (desoxinucleotidil transferasa terminal) transfiere entonces un

## *Material y métodos*

---

dUTP marcado a esos extremos libres. Las células viables se diferencian fácilmente de las apoptóticas porque las primeras apenas presentan tinción, frente a las células apoptóticas visiblemente teñidas. Esto se debe a que cada cadena de cromatina íntegra tiene sólo un extremo libre, mientras que las cadenas fragmentadas presentan múltiples sitios de unión.

### *PROTOCOLO*

Para la medida de la apoptosis por el método TUNEL se utilizó un sistema comercial (Roche Applied Science, Barcelona, España). Los condrocitos primarios se sembraron en placas de Petri de 5 cm de diámetro a  $10^6$  células/placa y se dejaron crecer hasta alcanzar aproximadamente el 80% de confluencia. Después, las células se incubaron en presencia de CoPP y se estimularon con IL-1 $\beta$  durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de estimulación, se aplicó el método TUNEL seguido de una inmunotinción con peroxidasa según las instrucciones del fabricante. Las células se fijaron y se permeabilizaron y luego se incubaron con una mezcla que contenía la enzima TdT y dUTP marcado. La unión del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa al dUTP marcado confirió a las células apoptóticas la tinción marrón que las diferenció de las células no apoptóticas. Finalmente, se realizó una contratinción con hematoxilina. Las placas se observaron y se fotografiaron en un microscopio óptico *Eclipse TE2000-S* (Nikon Instruments Europe, Amstelveen, Países Bajos). Las células apoptóticas fueron contadas y se presentaron los resultados como media  $\pm \epsilon$  del porcentaje de células apoptóticas de cada variable.

#### **4.3.4. Ensayo de ciclo celular**

El yoduro de propidio es una tinción vital que se une al ADN dando lugar a fluorescencia roja, de modo que las diferentes concentraciones de cromatina correspondientes a las diferentes fases del ciclo celular generarán diferentes intensidades de fluorescencia roja cuantificables por citometría láser. De este modo, las células se reparten en tres categorías: aquéllas que tienen todo su ADN sin replicar

(una unidad arbitraria) y, por lo tanto, están en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, las que tienen todo su ADN replicado por completo (dos unidades arbitrarias), en fase G<sub>2</sub>/M, y las que tienen una cantidad intermedia de ADN, por lo que están en fase S.

### *PROTOCOLO*

Las células Caco-2 fueron sembradas a una concentración de  $8 \times 10^4$  células/mL en microcámaras tipo *Chamber Slide*<sup>TM</sup> en medio de cultivo *MEM* completo. Tras 72 horas de incubación con medio completo se procedió a sustituirlo por medio *MEM* sin SBF, a la vez que se adicionaron los productos: indometacina, CoPP y CORM-2. Se mantuvieron estas condiciones durante 168 horas, reemplazando el medio y los productos en días alternos. Se lavaron las microcámaras con tampón PBS, se fijaron con etanol al 70% y se incubaron a temperatura ambiente con solución de Vindelov (0,1 mg/mL de ribonucleasa A (RNasa A), 50 µg/mL de yoduro de propidio y 0,01% de Tritón X-100 en tampón PBS), durante 30 minutos y en oscuridad. Transcurrido ese tiempo se eliminaron los sobrenadantes, se separó la parte superior de la *Chamber Slide*<sup>TM</sup> y se adicionó medio de montaje de la marca Dako (Copenhague, Dinamarca) al portaobjetos. La fluorescencia celular se analizó por *LSC*.

Las preparaciones se examinaron con el objetivo de x200 y el área a examinar fue ajustada a la superficie del cubreobjetos. Al menos 5000 células se analizaron en cada pocillo. La determinación de los parámetros del ciclo celular se realizó por recuento de células y basándose en el área del contorno (reflejando el tamaño del núcleo) y el "PI maximal píxel" (máxima intensidad de fluorescencia dentro del contorno, representando la condensación de cromatina). El análisis del pico de fluorescencia (que representa el máximo valor de fluorescencia de todos los píxeles de la célula medida) y el área de fluorescencia (que representa el número de píxeles por encima del umbral) de las células teñidas con fluorocromos de ADN son una medida sensible de la cantidad de cromatina, pudiéndose diferenciar las células según el grado de condensación de la cromatina en el núcleo.

#### **4.3.5. Ensayo de degradación de glicosaminoglicanos en explantes**

El ensayo de degradación de glicosaminoglicanos se realizó en explantes de cartílago OA. Glicosaminoglicanos como el sulfato de condroitina o el sulfato de queratano son componentes mayoritarios de la matriz extracelular, y su presencia es de suma importancia en el mantenimiento de la estructura de la misma. Por ello, la liberación de productos con restos sulfato del cartílago puede considerarse directamente proporcional al grado de degradación del tejido. Así, se incorporó sulfato sódico marcado con azufre radiactivo a los explantes de cartílago y posteriormente se midió la radiactividad liberada por los explantes incubados con IL-1 $\beta$ , correspondiente al azufre marcado procedente de la degradación de los glicosaminoglicanos.

#### *PROTOCOLO*

Los explantes, procedentes del mismo donante, fueron incubados con medio *DMEM* completo, en placas de Petri de 10 cm de diámetro y en presencia de sulfato sódico marcado con  $^{35}\text{S}$  a 4  $\mu\text{Ci/mL}$  durante 3 días. Transcurrido ese tiempo se renovó el medio con sulfato radiactivo y se repitió la incubación durante otros 3 días. Durante estas incubaciones se produjo la incorporación del sulfato radiactivo al cartílago, quedando el tejido marcado. Transcurridos esos 6 días, la radiactividad no incorporada se eliminó con 6 lavados realizados durante 2 días con *DMEM* completo. Posteriormente, los explantes se distribuyeron en placas de 24 pocillos (10 explantes/pocillo) y se incubaron en *DMEM* completo con IL-1 $\beta$  a 100 U/mL o con IL-1 $\beta$  y el producto en estudio durante 6 días, con un cambio de medio y adición del tratamiento el día tercero. En el cambio de medio y el último día, se recogieron los sobrenadantes para la posterior medida de la radiactividad liberada. Finalmente se recogieron los explantes y se digirieron en una solución con 2 mg/mL de papaína, EDTA 1 mM, ditioneitol a 0,25 mg/mL y fosfato sódico 20 mM a pH 6,8 y a 56° C durante 16 horas. Para eliminar el sulfato de  $^{35}\text{S}$  no incorporado, tanto en el medio de cultivo como en el tejido digerido, se utilizó un sistema de cromatografía con columnas de *Sephadex G25* (GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, España). La

mencionada columna contiene dextrano con un alto grado de entrecruzamiento y tamaño de poro pequeño y se utiliza para retener sales como el sulfato de  $^{35}\text{S}$  libre, en este caso. La radiactividad liberada al medio de cultivo y la de los digestos se midió en un contador de centelleo líquido para emisiones  $\beta$  tipo *Microbeta* (Wallac, Turku, Finlandia). La degradación se expresó como porcentaje de radiactividad liberada al medio (de los sobrenadantes) respecto a la radiactividad total (de los sobrenadantes sumada a la de los explantes) (Moulharat y cols., 2004).

#### **4.3.6. Ensayo de síntesis de proteoglicanos**

La síntesis de proteoglicanos de la matriz extracelular por parte de los condrocitos del cartílago OA, requiere de azufre como componente para la formación de moléculas estructurales. De este modo, la incorporación de azufre por parte del condrocito puede considerarse una medida de la capacidad de síntesis de proteoglicanos del mismo. La medida de la síntesis de proteoglicanos en condrocitos primarios OA se cuantificó por monitorización de la incorporación, por parte de éstos, de sulfato de  $^{35}\text{S}$  añadido al medio de cultivo (Moulharat y cols., 2004).

#### *PROTOCOLO*

Los condrocitos primarios OA se sembraron a  $3 \times 10^5$  células/pocillo y se dejaron crecer hasta alcanzar un número cercano a la confluencia. Después de la estimulación con IL-1 $\beta$  a 100 U/mL o con IL-1 $\beta$  y los productos durante 24 horas se procedió al marcaje. En esta fase las células fueron marcadas por incubación con sulfato de  $^{35}\text{S}$  a 2  $\mu\text{Ci/mL}$  durante 24 horas. Después, se recogieron los sobrenadantes y se congelaron a  $-20^\circ\text{C}$ . Las células se lavaron con tampón PBS estéril y luego fueron extraídas con un tampón de digestión compuesto por guanidina HCl 4 M, EDTA 5 mM y acetato de sodio 5 mM a pH 7,2 y a  $4^\circ\text{C}$  durante 48 horas. Los proteoglicanos procedentes de los sobrenadantes y de la digestión celular fueron adsorbidos en filtros de fibra de vidrio individuales de 25 mm de diámetro *Glass microfibre filters GFF* (Whatman,

### *Material y métodos*

---

Maidstone, Reino Unido). Para ello, para la misma muestra se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de sobrenadante y 50  $\mu\text{L}$  de digesto en sendos filtros y se dejaron secar a temperatura ambiente. Los filtros, una vez secos, se introdujeron en una solución de NaCl 0,3 M con cloruro de cetilpiridinio monohidratado (CPC) al 1%, que eliminó el sulfato marcado no incorporado por las células, quedando precipitado en el papel únicamente el proteoglicano unido al sulfato radiactivo. La radiactividad presente en los respectivos filtros se midió en un contador de centelleo líquido para emisiones  $\beta$  modelo *Microbeta* (Wallac, Turku, Finlandia). Se sumó la radiactividad del medio y la de los extractos celulares de cada muestra y el valor obtenido fue normalizado con la cantidad de proteína de los extractos celulares.

#### **4.3.7. Inmunocitoquímica**

Las técnicas de inmunocitoquímica o inmunohistoquímica están basadas en la detección de antígenos por medio de la unión antígeno-anticuerpo con anticuerpos específicos. Estas técnicas nos permiten observar al microscopio el antígeno buscado gracias al marcaje de los anticuerpos con fluorocromos (inmunofluorescencia) o a la conjugación con enzimas (reacción inmunoenzimática).

#### *PROTOCOLO*

Para la técnica de inmunocitoquímica de colágeno II, los condrocitos fueron sembrados en cultivo primario en microcámaras tipo *Chamber Slide™* a  $4 \times 10^4$  células/pocillo y se dejaron crecer hasta casi la confluencia. Luego fueron incubados con CoPP o con CORM-2 en presencia o en ausencia de IL-1 $\beta$  a 100 U/mL durante 15 días, con cambio de medio y adición de tratamiento cada 4 días. Transcurrido ese tiempo las células se fijaron con formaldehído al 4 % en tampón PBS durante 30 minutos a 4° C. El colágeno II se detectó utilizando el sistema *type II collagen staining kit* (MD Biosciences, Zürich, Suiza), siguiendo las instrucciones del fabricante. Así, tras la fijación de las células se procedió a lavar con tampón PBS, para posteriormente tratar las células con hialuronidasa al 2 % en tampón PBS a pH 7,4 y a 25° C durante

30 minutos. Esta enzima facilita la permeabilización celular. Después se adicionó una disolución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1,7 % en metanol al 70% durante 15 minutos para inactivar la peroxidasa endógena. Posteriormente, se procedió a incubar con la solución de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente, previniendo uniones inespecíficas a los anticuerpos, tras lo cual se añadió el anticuerpo primario monoclonal durante 1 hora de incubación. Tras 3 lavados con tampón PBS, se añadió el anticuerpo secundario conjugado con estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano) y se incubó durante 1 hora. Las células se lavaron 3 veces. Se reveló con el cromógeno insoluble diaminobencidina (DAB). El reactivo DAB es un revelador de la actividad peroxidasa que desarrolla una coloración marrón en pocos minutos, la cual se debe controlar por observación al microscopio y detener con adición de agua. En cada caso, se realizaron los controles negativos correspondientes. Posteriormente al revelado, se observaron y capturaron las imágenes de las células con la ayuda de un microscopio *Eclipse E800* (Nikon Instruments Europe, Amstelveen, Países Bajos) conectado a una cámara fotográfica digital y a un ordenador con el programa *ACT-1* (Nikon Instruments Europe, Amstelveen, Países Bajos) para la adquisición y tratamiento de imágenes.

En otra serie de experimentos, se midió la expresión de HO-1 y mPGES-1 por análisis inmunocitoquímicos en un cultivo tridimensional de condrocitos primarios (ver sección 4.1.3). Las células se sembraron a  $4 \times 10^5$  células/pocillo en alginato y el cultivo fue infectado con vectores lentivirales de HO-1 (LV-HO-1) y vacíos (LV-), como se especifica en la sección 4.2.2. Posteriormente, las células fueron estimuladas con IL-1 $\beta$  durante 24 horas. Tras la estimulación, los lechos de alginato fueron fijados con formaldehído al 4% en tampón PBS durante 10 minutos e incubados con dos anticuerpos a la vez: un anticuerpo monoclonal anti-Flag a 1/400 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y un anticuerpo policlonal anti-mPGES-1 a 1/50 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EE.UU.) durante 1 hora y 30 minutos, seguido de una incubación con los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 488 de cabra frente a IgG de ratón y R-ficoeritrina de cabra frente a IgG de conejo (ambos de Invitrogen, Barcelona, España) durante 45 minutos a 37° C. Los núcleos celulares fueron contrateñidos con una solución DAPI (4', 6'-diamidino-2-fenilindol) a 1/1000 en



tampón PBS. Los lechos de alginato, cortados en láminas se colocaron sobre portaobjetos y se examinaron en un microscopio de fluorescencia *Eclipse E800* (Nikon Instruments Europe, Amstelveen, Países Bajos). La fluorescencia roja correspondió a la expresión de mPGES-1, la verde a la HO-1 y los núcleos quedaron teñidos de color azul con DAPI.

#### **4.3.8. Medida del estrés oxidativo**

Para medir el estrés oxidativo de los condrocitos en cultivo se empleó dihidrorrodamina 123 (DHR). La DHR se oxida dando lugar a la molécula fluorescente rodamina (longitud de onda de excitación a 485 nm y de emisión a 534 nm) en presencia de agentes oxidantes, en este caso en presencia de radicales libres de oxígeno, pudiéndose considerar la fluorescencia emitida directamente proporcional al estrés oxidativo.

#### *PROTOCOLO*

Los condrocitos fueron sembrados en microcámaras *Lab-tek chambers* (Nalge Nunc Internacional, Naperville, IL, EE.UU.) de 8 pocillos a  $7,5 \times 10^4$  células/pocillo en medio *DMEM* completo. Una vez alcanzada una monocapa celular próxima a la confluencia, se sustituyó el medio por medio *DMEM* completo sin rojo fenol y con dihidrorrodamina 5  $\mu$ M durante 15 minutos a 37° C. Tras dos lavados con *DMEM* completo sin rojo fenol, las células se incubaron en este medio de cultivo con los productos durante 4 horas y después con IL-1 $\beta$  en presencia o ausencia de los productos durante otros 30 minutos. Finalmente, las células se lavaron dos veces con el mismo medio de cultivo y la determinación de la fluorescencia se hizo por citometría láser con el citómetro *Laser Scanning Cytometer (LSC) Bx50 Compucyte Olympus*, (Compucyte, Cambridge, MA, EE.UU.) conectado a un ordenador equipado con el programa *Win Cyte 2.1* (Compucyte, Cambridge, MA, EE.UU.) para el análisis de los resultados. En cada pocillo se analizaron 2000 células.

#### 4.3.9. Determinación de la actividad metaloproteinasas

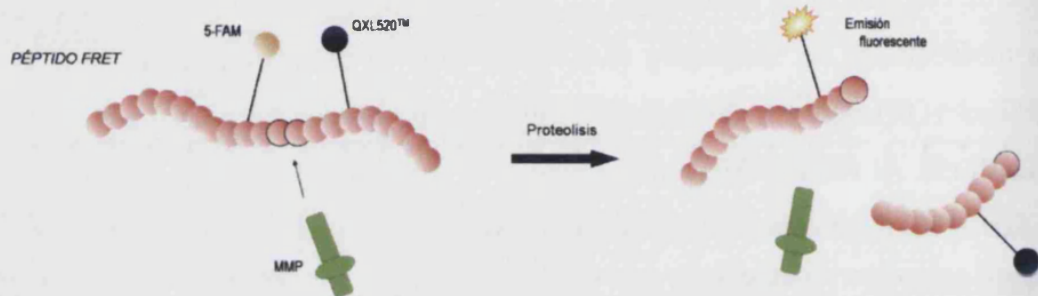
Para medir la actividad de las enzimas metaloproteinasas presentes en los sobrenadantes celulares de cultivos de condrocitos, se utilizó una técnica fluorimétrica. La actividad enzimática se determinó por la rotura, por parte de las metaloproteinasas, de un sustrato consistente en un péptido FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia). Este sustrato se denomina así por la presencia en la molécula de un fluoróforo (5-FAM) y de una estructura capaz de inhibir al fluoróforo (QXL520<sup>TM</sup>), de manera que el péptido completo no emite ninguna fluorescencia. Al romper las metaloproteinasas al péptido, se separa el fragmento con QXL520<sup>TM</sup> del fragmento con el fluoróforo 5-FAM, de modo que este último recupera su fluorescencia. La medida de la emisión de fluorescencia es directamente proporcional a la actividad de las metaloproteinasas.

#### PROTOCOLO

Los condrocitos se sembraron en cultivo primario a  $3 \times 10^5$  células/pocillo en placas de 6 pocillos. Cuando se alcanzó una confluencia superior al 80% se procedió a incubar las células con o sin CoPP y a estimularlas con IL-1 $\beta$  durante 24 horas. Pasadas las 24 horas, se recogieron los sobrenadantes celulares y se conservaron los extractos celulares para otras determinaciones. A 100  $\mu$ L de cada sobrenadante se le añadió 1  $\mu$ L de una solución 100 mM de acetato p-aminofenil mercúrico (APMA), capaz de activar a las metaloproteinasas. Estas alícuotas de sobrenadantes se incubaron a 37° C durante 5 horas en un calibrador de temperatura *Techne DB-3D Dri-Block* y luego se transfirieron a una placa de 96 pocillos blanca opaca para medir fluorescencia. Finalmente, se añadió a cada pocillo 1  $\mu$ L de una dilución (1  $\mu$ g/ $\mu$ L en DMSO) del sustrato fluorescente 5-FAM-Arg-Pro-Lys-Pro-Tyr-Ala-Nva-Trp-Met-Lys (QXL520<sup>TM</sup>)-NH<sub>2</sub>, de AnaSpec Inc. (San José, CA, EE.UU.) y, tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente, se midió la fluorescencia a 490 nm de excitación y 520 nm de emisión en un espectrofotómetro *VICTOR 3<sup>TM</sup> V 1420 multilabel counter*

(Perkin-Elmer España, Madrid, España). Este sustrato es hidrolizado por las enzimas MMP-1, -2, -7, -8, -12 y -13. El método descrito se diseñó como una variante de la técnica fluorimétrica comercial del sistema *EnzoLyte™ MMP Profiling Kit* de AnaSpec Inc. (San José, CA, EE.UU.).

**Figura 21.** Rotura proteolítica de los péptidos FRET.



#### 4.3.10. Determinación de la producción de nitrito

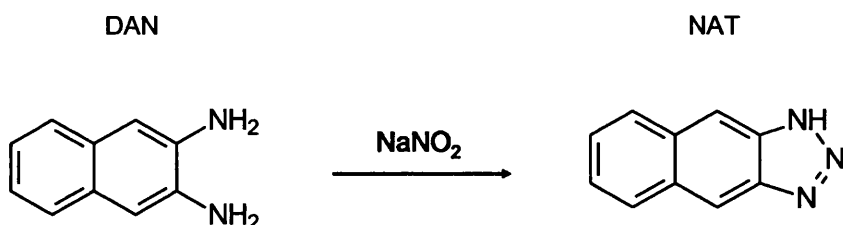
La producción celular de NO se midió por determinación de una de sus formas estables, el nitrito, en el medio de cultivo. Se empleó la técnica fluorimétrica de liberación de nitrito desarrollada por Misko y sus colaboradores (Misko y cols., 1993). Esta técnica se basa en la reacción del ión nitrito con el 2, 3-diaminonaftaleno (DAN) para formar el producto fluorescente 1-(H)-naftotriazol (NAT). La adición de una base incrementa la intensidad de fluorescencia y contribuye a la estabilidad del NAT. La intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de nitrito producido.

#### PROTOCOLO

Los condrocitos en cultivo primario fueron sembrados en placas de 24 pocillos ( $8 \times 10^4$  células/pocillo) o en placas de 6 pocillos ( $3 \times 10^5$  células/pocillo) y fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) o con IL-1 $\beta$  más el producto durante 24 horas. Después, los sobrenadantes fueron recogidos, centrifugados y congelados a  $-80^\circ\text{C}$  hasta el posterior análisis. Los extractos celulares se conservaron para realizar otras

determinaciones. La determinación de nitrito se realizó en placas de 96 pocillos opacas blancas. En los pocillos se pipetearon los sobrenadantes diluidos en suero fisiológico y las diferentes diluciones de una recta patrón de nitrito sódico hasta completar 100  $\mu\text{L}$  de volumen final en cada pocillo. Tras la adición de muestras y patrones se añadió a cada pocillo 10  $\mu\text{L}$  de una solución de DAN a 50  $\mu\text{g/mL}$ . Se incubó la placa durante 7 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de NaOH 1,4 M por pocillo y se incubó la placa 3 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. La fluorescencia fue cuantificada mediante un espectrofotómetro *VICTOR 3<sup>TM</sup> V 1420 multilabel counter* a 365 nm de longitud de onda de excitación y 450 nm de emisión. Los valores se interpolaron en una recta estándar de nitrito sódico.

Figura 22. Reacción del DAN con nitrito para formar el producto fluorescente NAT.



#### 4.3.11. Determinación de la producción de PGE<sub>2</sub>

Para determinar la liberación de PGE<sub>2</sub> en los sobrenadantes celulares se empleó la técnica del radioinmunoensayo (RIA) (Moroney y cols., 1988). Esta técnica radioinmunométrica se basa en la competencia entre dos antígenos, la PGE<sub>2</sub> presente en nuestras muestras problema y una cantidad conocida de PGE<sub>2</sub> marcada con tritio (<sup>3</sup>H, frente a una cantidad conocida de anticuerpo anti-PGE<sub>2</sub>. De este modo, la medida de emisión radiactiva  $\beta$  de los complejos antígeno-anticuerpo será mayor cuanto menos PGE<sub>2</sub> tengamos en nuestra muestra problema (más unión del anticuerpo con PGE<sub>2</sub> radiactiva) y menor cuanto más PGE<sub>2</sub> haya presente en la muestra problema (más unión con PGE<sub>2</sub> del sobrenadante y menos con PGE<sub>2</sub> radiactiva).

### PROTOCOLO

Los condrocitos en cultivo primario, sembrados en placas de 24 o 6 pocillos (a  $0,8$  y  $3 \times 10^5$  células/pocillo, respectivamente) se estimularon con IL- $1\beta$  (100 U/mL) o con IL- $1\beta$  en presencia de los productos durante 24 horas. Los sobrenadantes se recogieron y fueron centrifugados y congelados a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su posterior análisis y el material celular se conservó para otras determinaciones. Las muestras experimentales y los patrones de una curva estándar de PGE $_2$  se pipetearon en tubos de ensayo de vidrio y se diluyeron con los tampones específicos para RIA de PGE $_2$ :

- A1: NaH $_2$ PO $_4$  x 2H $_2$ O 1,19 g/L, Na $_2$ HPO $_4$  4,6 g/L, albúmina sérica bovina (BSA) 0,1% y azida sódica 0,1%
- B1: tampón A1 con 9 g/L de NaCl

A continuación se añadió el anticuerpo anti-PGE $_2$  (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y la PGE $_2$  tritiada (GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, España), se agitaron los tubos y se incubaron a  $4^\circ\text{C}$  durante 18 horas. Transcurrido ese tiempo, se añadió una mezcla de carbón activado y dextrano, se agitaron los tubos, se incubaron a  $4^\circ\text{C}$  durante 30 minutos y se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 minutos, con el fin de precipitar el material radiactivo no unido al anticuerpo. Los sobrenadantes resultantes se mezclaron con 3 mL de líquido de centelleo *Optiphase "Supermix"* (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE.UU.) y la radiactividad presente en dichos sobrenadantes, procedente de la unión del antígeno tritiado con el anticuerpo, se midió en un contador de centelleo *Microbeta* (Wallac, Turku, Finlandia). Los valores obtenidos se interpolaron en la curva estándar de PGE $_2$ .

#### 4.3.12. Cuantificación de proteínas por ELISA

La técnica de cuantificación de proteínas denominada ELISA es un tipo de ensayo inmunoenzimático, es decir basado en el empleo de anticuerpos marcados con una enzima. Su nombre es un acrónimo anglosajón: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*. Los niveles de determinadas proteínas se cuantificaron mediante ELISA, siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante en cada caso. La mayor

parte de las muestras a ensayar fueron sobrenadantes celulares recogidos de placas previamente tratadas, que fueron centrifugados y congelados a  $-80^{\circ}$  C antes del análisis. Se emplearon sobrenadantes en la cuantificación de la mayoría de citocinas, así como para las metaloproteinasas. En el caso de proteínas como Akt o p38 se emplearon métodos de ELISA que requerían lisados celulares como muestras. La unión al ADN del NF- $\kappa$ B y el HIF-1 $\alpha$  se cuantificó en extractos nucleares de proteína con el *Trans AM<sup>TM</sup> kit* para p65 y HIF-1 $\alpha$  de Active Motif Europe. La razón I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilado/I $\kappa$ B $\alpha$  total se midió con el sistema *I $\kappa$ B $\alpha$  Ser<sup>32</sup>/Ser<sup>36</sup>-phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  CASE<sup>TM</sup> Cellular Activation of Signalling ELISA* de SuperArray Bioscience Corp., en células en cultivo sembradas en placa de 96 pocillos.

Para medir la actividad agrecanasa en sobrenadantes de condrocitos primarios se utilizó el sistema *Sensitive Aggrecanase Activity ELISA*. Para ello, las muestras se incubaron en presencia de una solución tamponada del sustrato agrecano durante 15 minutos, tras lo cual se generaron péptidos denominados ARGSVIL en cantidades diferentes según la actividad enzimática de cada muestra. Finalmente los péptidos ARGSVIL se cuantificaron por ELISA. En la tabla 3 se presenta toda la información relacionada con los sistemas comerciales de ELISA utilizados en la presente tesis.

**Tabla 3.** Sistemas de ELISA utilizados.

<i>Proteínas</i>	<i>Muestra</i>	<i>Sensibilidad</i>	<i>Fabricante</i>
agrecanasa, actividad (cuantificación de ADAMTS-1,4 y 5)	Sobrenadantes	2 pM	MD Bioscience (Zürich, Suiza)
agrecano	Sobrenadantes y lisados celulares	<90 pg/mL	BioSource Europe (Bélgica)
IGF-1	Sobrenadantes	45 pg/mL	Raybiotech Inc. (Norcross, GA, EE.UU.)
IL-1Ra	Sobrenadantes	4 pg/mL	Biosource, Invitrogen (Barcelona, España)
IL-6	Sobrenadantes	4 pg/mL	eBioscience (San Diego, CA, EE.UU.)

*Material y métodos*

IL-8	Sobrenadantes	3,5 pg/mL	R&D Biosystems (Abingdon, Reino Unido)
HIF-1 $\alpha$ , unión a	Extractos nucleares de proteína	----	Active Motif Europe (Rixensart, Bélgica)
MMP-3 total	Sobrenadantes	9 pg/mL	R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, EE.UU.)
MMP-10 total	Sobrenadantes	4 pg/mL	R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, EE.UU.)
NF- $\kappa$ B, unión a	Extractos nucleares de proteína	----	Active Motif Europe (Rixensart, Bélgica)
p21 (Cip/WAF1)	Lisado celular	0,1 U/mL	Calbiochem, EMD Bioscience (Darmstadt, Alemania)
P-p38	Lisado celular	<0,8 U/mL	Calbiochem, EMD Bioscience (Darmstadt, Alemania)
P-Akt	Lisado celular	<0,8 U/mL	Calbiochem, EMD Bioscience (Darmstadt, Alemania)
P-I $\kappa$ B/I $\kappa$ B total	Células en cultivo	-----	SuperArray Bioscience Corp. (Frederik, MD, EE.UU.)
Pro-MMP-1	Sobrenadantes	21 pg/mL	R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, EE.UU.)
Pro-MMP-7	Sobrenadantes	97 pg/mL	GE Healthcare (Barcelona, España)
Pro-MMP-13	Sobrenadantes	7,7 pg/mL	R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, EE.UU.)
TNF- $\alpha$	Sobrenadantes	4 pg/mL	eBioscience (San Diego, CA, EE.UU.)

## **PROTOCOLO**

El procedimiento de los diferentes tipos de ELISA es variable y siempre se lleva a cabo siguiendo de manera estricta las instrucciones del fabricante. En la mayoría de los casos se procedió como se describe en este protocolo. Primero, las muestras y los estándares se pipetearon en los pocillos de una placa que contenía un anticuerpo frente al antígeno o anticuerpo de captura, específico de la proteína a analizar en cada caso. El periodo de incubación para la unión de la proteína a analizar al anticuerpo de captura varió en cada caso. Transcurrido ese tiempo, se procedió a lavar con tampón de lavado y se adicionó el anticuerpo de detección biotinilado, incubado a temperatura ambiente durante el tiempo establecido. Después de una serie de lavados con el tampón, se añadió la solución del conjugado estreptavidina-peroxidasa, con su respectivo periodo de incubación. Tras sucesivos lavados con el tampón se añadió la solución de tetrametilbencidina (TMB) y se incubó durante aproximadamente 30 minutos en oscuridad. Este sustrato cromogénico es oxidado por la enzima, dando lugar a la aparición de coloración azul. La adición de una solución de parada (ácido sulfúrico 2,5 N) hizo que el color de la solución cambiara a amarillo. La absorbancia fue cuantificada mediante un espectrofotómetro *VICTOR 3<sup>TM</sup> V 1420 multilabel counter* a 450 nm de longitud de onda. La cuantificación de las cantidades de proteína se llevó a cabo por comparación de las absorbancias de las muestras con las absorbancias de los puntos de una curva estándar de concentraciones conocidas.

### **4.3.13. Análisis por Western blot**

El término anglosajón “blotting”, que en castellano podríamos traducir de manera imprecisa como “generación de manchas”, se refiere a la transferencia de muestras biológicas de un gel a una membrana y su siguiente detección sobre la superficie de dicha membrana. La técnica del Western blot, también conocida como “immunoblotting” (debido a que un anticuerpo es utilizado específicamente para detectar un antígeno) fue introducida por Towbin y sus colaboradores en 1979



## *Material y métodos*

---

(Towbin y cols., 1979) y en la actualidad es una técnica rutinaria para los análisis de proteína.

El primer paso del procedimiento del Western blot es separar las proteínas por electroforesis en gel de acrilamida y bisacrilamida. Después, las macromoléculas separadas se transfieren a una segunda matriz, generalmente una membrana de nitrocelulosa o de polivinilideno difluoruro (PVDF). En el sistema de detección indirecto, un anticuerpo primario es añadido primero para unirse al antígeno. A esto le sigue un anticuerpo secundario marcado con una enzima y que se une específicamente al primario. Se añade después un sustrato apropiado a la enzima y juntos producen un producto detectable. Los métodos de detección más sensibles utilizan un sustrato quimioluminiscente que, combinado con la enzima, produce luz. La producción de luz puede ser capturada utilizando una película fotográfica o una cámara fotográfica adaptada para la detección quimioluminiscente. Independientemente del sustrato utilizado, la intensidad de la señal es indicativa de la abundancia del antígeno unido a la membrana

### *PROTOCOLO*

Las células Caco-2 se sembraron en placas de 6 pocillos a  $10^6$  células/pocillo y tras tres días de incubación con medio completo se procedió a la estimulación y a la extracción de la proteína. Los condrocitos primarios se sembraron a  $3 \times 10^5$  células/pocillo y, tras alcanzar un número de células cercano a la confluencia, se estimularon y se extrajo la proteína.

Previamente a la extracción de proteínas, se utilizó un tampón PBS estéril para lavar tres veces las células adheridas a los pocillos. Para la extracción de la proteína total, se añadieron a cada pocillo 100  $\mu$ L de un tampón de lisis (1% Tritón X-100, 1% ácido deoxicólico, NaCl 20 mM y Tris 25 mM, pH 7,4) y se incubaron las placas a 37° C durante aproximadamente diez minutos. Con ayuda de un rascador de células se recogieron los lisados celulares y se transfirieron a tubos que fueron centrifugados a una velocidad de 10000 x g, durante 5 minutos y a 4° C. Los sobrenadantes

resultantes, que contenían el extracto total de proteína fueron recogidos en tubos, cuantificados y conservados a -20° C.

Con el fin de determinar la expresión proteica del IκBα en células Caco-2, se extrajo la fracción proteica citoplásmica. Para ello, las células se lavaron 2 veces con tampón PBS estéril a 4° C y luego se trataron con 0,2 mL de tampón A durante 15 minutos. El tampón A tenía la siguiente composición: Tris-HCl 20 mM a pH 7,8, KCl 10 mM, EGTA 1 mM, ditioneitol (DTT) 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, NaF 5 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 10 mM, aprotinina 4 μg/mL y leupeptina 10 μM. Posteriormente se adicionó un detergente no iónico y no desnaturizante, el Nonidet P-40 diluido al 0,5% p/v en agua. Los lisados se agitaron en vórtice durante 15 segundos y los extractos nucleares se precipitaron por centrifugación a 8000 x g durante 30 segundos. Las alícuotas de los sobrenadantes constituyeron el extracto proteico citoplásmico.

Para determinar la expresión proteica de mPGES-1, fue necesario extraer la fracción proteica microsomal, siguiendo el siguiente protocolo: Tras la estimulación, las placas de cultivo se lavaron con un tampón PBS estéril y se añadieron 200 μL de tampón A por pocillo (ver composición del tampón A en el párrafo anterior). Las células se extrajeron con la ayuda de un rascador de células y las muestras se transfirieron a tubos de polipropileno. Para lograr la lisis celular, las muestras en tampón A se sonicaron con un sonicador *Vibra Cell* (Sonics and Materials Inc., Newtown, CT, EE.UU.). Los lisados se centrifugaron a 10000 x g durante 10 minutos y los sobrenadantes con la proteína se separaron y se volvieron a centrifugar, esta vez en una ultracentrífuga *Optima<sup>TM</sup> MAX Ultracentrifuge* (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EE.UU.) a 40000 x g durante 1 hora y 40 minutos. El precipitado resultante, que contenía la fracción microsomal, fue resuspendido en tampón A, cuantificado y congelado a -80° C hasta su posterior uso.

La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976), con el reactivo *DC Bio-Rad protein reagent* (Bio-Rad Laboratorios, Richmond, CA, EE.UU.) y utilizando BSA como patrón. El lisado celular se mezcló a partes iguales con tampón de carga desnaturizante de Laemmli (Laemmli, 1970), con una relación de volúmenes 1:1, conteniendo cada muestra la misma cantidad de proteína,

### *Material y métodos*

---

que estuvo entre 20 a 30  $\mu\text{g}$  dependiendo de la proteína a analizar. El tampón de Laemmli 2x tenía la siguiente composición: Tris-HCl 125 mM a pH 6,8, sodio dodecilsulfato (SDS) al 4%, glicerol al 20%, DTT al 10% y azul bromofenol al 0,004%. Las muestras se calentaron a 90° C durante 5 minutos para facilitar la desnaturalización de las proteínas hasta su estructura secundaria, perdiendo así su forma tridimensional.

Las proteínas contenidas en las muestras se separaron por electroforesis en geles de acrilamida/bisacrilamida-SDS, utilizando un equipo de electroforesis (Bio-Rad Laboratories, Madrid, España) y un tampón de electroforesis que contenía glicina a 14,4 g/L, trizma base a 3 g/L y SDS al 0,1% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Este tipo de electroforesis se conoce como desnaturalizante ya que tanto el tampón de Laemmli como el detergente SDS desnaturalizan las proteínas. El SDS además recubre la proteína y bloquea la carga propia de la molécula, confiriendo al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa. De este modo las proteínas migran hacia el ánodo debido a su carga negativa, y se separan únicamente en función de su peso molecular. El porcentaje de acrilamida/bisacrilamida determina el tamaño de poro del gel por el cual han de pasar las proteínas, de manera que las proteínas más ligeras atravesarán el gel a más velocidad que las más pesadas, consiguiéndose la separación por peso molecular. El porcentaje de acrilamida/bisacrilamida más empleado fue del 12,5%, ya que permitió la adecuada separación de un amplio rango de proteínas de diferente peso molecular. En los análisis de proteínas de alto peso molecular (>100 kDa) y de bajo peso (<25 kDa) se utilizaron geles del 10% y del 15% respectivamente, lográndose una mejor resolución.

Finalizada la electroforesis, el gel con las proteínas separadas en función de su peso molecular se transfirió durante 90 minutos a 125 mA constantes a una membrana de PVDF (GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, España). La membrana de PVDF, que fue tratada previamente con metanol, tiene una gran capacidad de unión a proteínas y gran resistencia mecánica, siendo además muy hidrofóbica. El sistema de transferencia utilizado fue el semiseco, en el que los geles son sometidos a una intensidad de corriente entre dos electrodos planos, entre los cuales se colocó el gel y la membrana cubiertos por papel de filtro empapado en tampón de transferencia (3 g/L

de glicina, 0,6 g/L de trizma base y SDS al 0,01%) a ambos lados. De este modo las proteínas migran del gel y quedan adheridas a la superficie de la membrana.

A continuación se procedió al bloqueo, en el que las membranas se incubaron con leche desnatada al 3% (p/v) en tampón PBS-Tween (PBS suplementado con Tween 20 al 0,1%) durante 1 hora a temperatura ambiente. El bloqueo previno la unión no específica del sistema de detección a la membrana, evitando falsos positivos e inespecificidad. Las membranas se incubaron con anticuerpos primarios específicos (ver tabla 4), a unas diluciones que oscilaron ente 1/600 y 1/5000 (v/v) en tampón PBS-Tween al 2% con leche desnatada o con BSA, en función del anticuerpo. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con anticuerpos secundarios o IgG conjugados con peroxidasa de rábano (1/10000), durante 45 minutos a temperatura ambiente. Las bandas se visualizaron por el sistema ECL (sistema de quimioluminiscencia intensificado) (GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, España). La reacción quimioluminiscente se produjo tras el tratamiento de la membrana con dos soluciones que contenían luminol y peróxido de hidrógeno respectivamente. Así, la peroxidasa conjugada con el anticuerpo secundario catalizó la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno. En este proceso, el luminol pasa a su estado basal reducido emitiendo luz, y dicha luz puede ser detectada por un sistema computerizado de revelado *Autochemi™ System* (UPV Inc., Upland, CA, EE.UU.). Este aparato está dotado de un habitáculo oscuro donde se deposita la membrana tratada con luminol, y de una cámara fotográfica capaz de capturar imágenes secuencialmente, además del programa *LabWorks™ 4.6* para la adquisición y análisis de imágenes.

Las membranas que fueron incubadas con anticuerpos fosforilados (P-Akt, P-MAPK) fueron reveladas y posteriormente tratadas con una solución de “stripping” *Restore Western Blot Stripping Buffer* (Pierce, Rockford. IL, EE.UU.), capaz de separar los anticuerpos unidos a una membrana sin afectar a la integridad de la misma ni de las proteínas fijadas a ella. La finalidad de este proceso es poder detectar las dos formas de la misma proteína en la misma membrana, algo muy ventajoso a la hora de normalizar la proteína fosforilada frente a la total. Posteriormente, las membranas se

reincubaron con los anticuerpos correspondientes a las proteínas totales y se revelaron normalmente.

La intensidad de las bandas obtenidas en el revelado de las membranas se densitómetró y cuantificó utilizando el programa *LabWorks™* 4.6. La cuantificación de cada proteína se normalizó con la de la proteína control  $\beta$ -actina, revelada en la misma membrana. En el caso de las proteínas fosforiladas, como las MAPK, la normalización se hizo respecto a la proteína total.

**Tabla 4.** Anticuerpos utilizados en los ensayos de Western blot.

ANTICUERPOS PRIMARIOS		
<i>Anticuerpo</i>	<i>Dilución</i>	<i>Fabricante</i>
Akt total (policlonal)	1/1000	Cell Signalling Technology Inc. (Beverly, MA, EE.UU.)
Bax (policlonal)	1/1000	Cell Signalling Technology Inc. (Beverly, MA, EE.UU.)
Bcl-2 (policlonal)	1/1000	Cell Signalling Technology Inc. (Beverly, MA, EE.UU.)
$\beta$ -actina (policlonal)	1/5000	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.)
COX-2 (policlonal)	1/1000	Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EE.UU.)
ERK 1/2 total (policlonal)	1/750	Cell Signalling Technology Inc. (Beverly, MA, EE.UU.)
HO-1 (policlonal)	1/1000	Stressgen (Victoria, Canadá)
$\kappa$ B $\alpha$ (policlonal)	1/750	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, EE.UU.)
IGFBP-3 (policlonal)	1/750	R&D Systems (Minneapolis, MN, EE.UU.)
JNK total (policlonal)	1/750	Cell Signalling Technology Inc. (Beverly, MA, EE.UU.)
mPGES-1 (policlonal)	1/700	Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EE.UU.)

NOS-2 (policlonal)	1/1000	Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EE.UU.)
p38 total (policlonal)	1/600	Cell Signalling Technology Inc. (Beverly, MA, EE.UU.)
p53 (policlonal)	1/1000	AnaSpec (San José, CA, EE.UU.)
P-AKT (policlonal)	1/1000	Cell Signalling Technology Inc. (Beverly, MA, EE.UU.)
P-ERK 1/2 (policlonal)	1/1000	Cell Signalling Technology Inc. (Beverly, MA, EE.UU.)
P-JNK (policlonal)	1/1000	Cell Signalling Technology Inc. (Beverly, MA, EE.UU.)
P-p38 (policlonal)	1/800	Promega Corp. (Madison, WI, EE.UU.)

#### ANTICUERPOS SECUNDARIOS

<i>Anticuerpo</i>	<i>Dilución</i>	<i>Fabricante</i>
IgG conjugada con peroxidasa (policlonal)	1/10000	Dako, Copenhagen, Dinamarca (Copenhagen, Dinamarca)

#### 4.3.14. Transfección transitoria de plásmidos para ensayos de actividad luciferasa

En las transfecciones transitorias, el objetivo es el estudio de un determinado gen en un periodo de tiempo corto, en el que no se requiere de la división celular ni de la integración del ADN en el genoma de la célula hospedadora. La transfección transitoria de plásmidos marcados se utiliza frecuentemente para estudiar la expresión génica de células eucarióticas. Los plásmidos transfectados corresponden a factores de transcripción y están conjugados con una enzima, la luciferasa, la cual emite luminiscencia en presencia de su sustrato. De esta manera, la medida de la luminiscencia emitida por la luciferasa es directamente proporcional a la expresión del gen en estudio.



## PROTOCOLO

En el caso de las células Caco-2, fueron sembradas en placas de 6 pocillos a  $10^6$  células/pocillo. Tras 24 horas de incubación fueron transfectadas con los plásmidos del factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)-Luc, de la proteína activadora-1 (AP-1)-Luc o de la proteína ligadora del intensificador CCAAT (C/EBP)-Luc (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.) utilizando como agente de transfección *Fugene 6* (Roche Applied Indianápolis, IN, EE.UU.). La transfección se llevó a cabo durante toda la noche, con las células incubadas en medio *MEM* sin SBF, sin antibióticos ni fungizona y a las concentraciones de plásmido sugeridas por el fabricante. Posteriormente, las células fueron tratadas con citomix durante 8 horas en presencia o ausencia de CORM-2 a diferentes concentraciones. Desde este punto hasta la reacción final se utilizó el sistema de Promega Corp. (Madison, WI, EE.UU.). Después de la estimulación, se eliminaron los sobrenadantes y se procedió a la lisis celular y posterior centrifugación. En la medida de la actividad luciferasa se utilizaron alícuotas de 20  $\mu$ L de los sobrenadantes del lisado celular, a los que se añadieron 100  $\mu$ L de sustrato de luciferasa que desencadenó la reacción quimioluminiscente. La luminiscencia fue medida en un contador *Microbeta* (Wallac, Turku, Finlandia) y normalizada frente a la cantidad de proteína.

En condrocitos, por el hecho de ser éstos cultivos primarios, el método de transfección descrito mostró un rendimiento muy bajo. Por ello se utilizó un método de transfección magnético, el sistema *Magnetofection* (OZ Bioscience, Marsella, Francia). Los plásmidos (NF- $\kappa$ B)-Luc, (AP-1)-Luc y (EGR-1)-Luc (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.) se cotransfectaron con el plásmido de control interno pRL-TK (Promega Corporation, Madison, WI, EE.UU.). Para la cotransfección se preparó una mezcla de 2  $\mu$ g del correspondiente factor de transcripción con 1  $\mu$ g del plásmido pRL-TK en medio de cultivo *DMEM* sin suplementación. A esa mezcla se añadieron 3  $\mu$ L del agente de transfección *PolyMag* (OZ Bioscience, Marsella, Francia), un preparado a base de partículas magnéticas con alta eficiencia en el transporte de ácidos nucleicos. El complejo se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se adicionó a los condrocitos. Después, las células en cultivo se mantuvieron en el

incubador celular (5% CO<sub>2</sub>/95% humedad /37° C) durante 30 minutos sobre una placa magnética suministrada por el fabricante, que hizo posible la transfección. Transcurrido ese tiempo, se retiró el imán y se llevó a cabo un cambio de medio con *DMEM* completo. Las células se estimularon con IL-1 $\beta$  en presencia o ausencia de los productos durante un mínimo de 8 horas. Tras la estimulación se procedió al lisado y medida de la luminiscencia con el sistema de Promega Corp. (Madison, WI, EE.UU.). Los plásmidos de los factores de transcripción estaban conjugados con una enzima luciferasa procedente de luciérnaga (*Photinus pyralis*), mientras que el control interno estaba conjugado con luciferasa de un coral marino denominado pensamiento de mar (*Renilla reniformis*). Las medidas de luminiscencia de las dos enzimas se tomaron de manera secuencial para cada muestra, gracias a los reactivos comerciales *LAR II* que generó la luminiscencia de luciérnaga inhibiendo la del control interno y *Stop & Glo* que generó posteriormente la emisión del control interno. Los resultados se normalizaron mediante el cálculo de la razón de ambas emisiones: factor de transcripción/control interno.

#### **4.3.15. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética**

Los ensayos de retardo de la movilidad electroforética o EMSA se emplean para estudiar la unión de proteínas (como los factores de transcripción) al ADN (Revzin, 1989). Para ello, un oligonucleótido específico marcado previamente con radiactividad se incuba con el extracto nuclear a analizar, produciéndose la unión ADN-proteína. Posteriormente, la mezcla se separa electroforéticamente observándose dos frentes: uno de migración rápida consistente en el ADN radiactivo libre y otro de migración retardada que es el complejo ADN radiactivo-proteína.

#### *PROTOCOLO*

Las células Caco-2, sembradas a 10<sup>6</sup> células/pocillo fueron preincubadas con CORM-2 durante 30 minutos y posteriormente estimuladas con citomix durante 15 ó 30 minutos. Los extractos nucleares se prepararon de la manera descrita por López-



### *Material y métodos*

---

Collazo y sus colaboradores y detallada en la sección 4.3.13. (López-Collazo y cols., 1998). De este modo, las células se trataron con 0,2 mL de tampón A durante 15 minutos, tras lo cual se añadió Nonidet P-40 diluido al 0,5% p/v en agua. Los lisados se agitaron y precipitaron por centrifugación a 8000 x g durante 30 segundos. Los precipitados nucleares se resuspendieron en 50 mL de tampón A suplementado con KCl 0,4 M. Después de centrifugar a 13000 x g 15 minutos, las alícuotas de este último sobrenadante (extracto nuclear) se guardaron a -80° C. La proteína se cuantificó con el reactivo *DC Bio-Rad protein reagent* (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EE.UU.). Paralelamente, se preparó la unión del fragmento de ADN específico a la sonda radiactiva y se incubó con los extractos nucleares. Así, el oligonucleótido de doble hebra que contenía la secuencia consenso de NF-κB, de Promega Corp. (Madison, WI, EE.UU.) fue marcado en su extremo con ATP [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] procedente de NEN Life Sciences Products Inc. (Boston, MA, EE.UU.) utilizando una polinucleótido cinasa de T4 comprada a GE Healthcare Life Sciences, (Barcelona, España). Las incubaciones posteriores se llevaron a cabo en hielo con 6 µg de extracto nuclear, 100000 cpm de sonda marcada, 2 µg de poli (dI-dC); que es un polímero sintético que previene la unión inespecífica de proteínas al ADN radiactivo, glicerol al 5% en agua, EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 1 mM, NaCl 100 mM y tampón Tris-HCl 10 mM a pH 8,0 durante 15 minutos. Los complejos fueron analizados con un gel no desnaturizante de poliacrilamida al 6% en un tampón Tris-borato 0,5x. Al ser un gel no desnaturizante, las muestras migraron en función de su carga y su peso molecular. Terminada la electroforesis, se extrajo el gel de la cubeta y se secó en un secador de geles *RCT 60* (Jouan Inc., Winchester, VA, EE.UU.), se introdujo en una pantalla de intensificación radiográfica de europio durante 18 horas y se analizó por autorradiografía en un aparato *Typhoon 9410 system* (GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, España). La intensidad de las bandas radiografiadas fue directamente proporcional a la unión sonda-NF-κB y por tanto a la cantidad de NF-κB presente en cada muestra.

#### **4.3.16. Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real**

La transcripción inversa (RT) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o RT-PCR son dos técnicas que nos permiten estudiar el ARN mensajero (ARNm) y por lo tanto la expresión génica correspondiente a nuestras células. La transcripción inversa consiste en la síntesis de una cadena de ADN complementario (ADNc) a partir del ARNm extraído de la célula por medio de una enzima denominada transcriptasa reversa que utiliza ARN como molde para sintetizar una hebra de ADN. En la RT es necesaria la presencia de: un cebador aleatorio, o fragmento corto de ADN que se une al ARN celular en un punto determinado y a partir del cual se iniciará la elongación del ADNc; desoxirribonucleótidos o dNTP (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), que constituyen la materia prima a partir de la cual la enzima construirá la cadena complementaria; un inhibidor de RNasas que prevenga la degradación del ARN y un tampón específico para la RT que incluya la cantidad adecuada de  $MgCl_2$  necesaria para el rendimiento óptimo de la polimerasa.

La cadena de ADNc se amplifica por PCR, una reacción cíclica que nos permite obtener cantidades apropiadas de ADNc para llevar a cabo diversos procesos. La reacción de la PCR contiene: una ADN-polimerasa termoestable capaz de elongar el molde produciendo su amplificación, los dos cebadores (sentido y antisentido) con secuencias específicas complementarias al segmento inicial y final de ADN que queremos amplificar, desoxirribonucleótidos, el tampón para PCR con los iones necesarios para que funcione la polimerasa y la muestra problema de ADNc obtenida de la RT. La reacción en cadena de la polimerasa comenzará al someter la mezcla descrita a una serie de cambios drásticos de temperatura de forma cíclica. Para ello utilizaremos un aparato termociclador. Cada uno de estos ciclos se compone de tres fases: En primer lugar se eleva la temperatura de la reacción para separar las hebras de ADN (fase de desnaturalización) y a continuación la temperatura baja, lo que permite que los cebadores se unan a las regiones adecuadas de la hebra de ADN, ensamblándose y actuando como límites de la región de la molécula que va a ser duplicada (fase de unión). Posteriormente, se eleva la temperatura nuevamente y la

## *Material y métodos*

---

polimerasa comienza a copiar formándose una hebra nueva complementaria (fase de extensión). Después de varios ciclos el número de copias crece exponencialmente obteniéndose los productos de la PCR.

La RT-PCR a tiempo real es una variante de la RT-PCR convencional que ofrece la posibilidad de cuantificar el número de copias realizadas a partir del ADN original, obteniéndose como resultado la expresión relativa del gen estudiado. Se basa en la detección de un fluorocromo, que se intercala en las dobles hebras de ADN a medida que se van sintetizando y cuya señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de la PCR en la reacción. Se emplea un ciclador térmico que tiene acoplado un sistema de detección capaz de captar y cuantificar la señal emitida por el informador al final de cada ciclo. Se pueden utilizar diferentes reactivos fluorescentes como agentes intercalantes (en nuestro caso *SYBR Green*) que se unen a la doble cadena de ADN dando un incremento de la fluorescencia a medida que aumenta la cantidad del producto de la PCR.

## *PROTOCOLO*

Las células Caco-2 y los condrocitos en cultivo primario se sembraron en placas de Petri de 10 cm de diámetro y, al alcanzar un número de células cercano a la confluencia, fueron estimulados con citocinas en presencia o ausencia de los productos durante 12 horas. Las placas se lavaron con tampón PBS estéril y el ARN total fue extraído utilizando 1 mL del reactivo *TRIzol* (Life Technologies Inc. Barcelona, España) por placa. Los extractos se transfirieron a tubos de polipropileno y se añadieron 0,2 mL de cloroformo por muestra, consiguiéndose la precipitación de ADN y proteínas. Los tubos se agitaron y centrifugaron a 12000 x g, separándose la mezcla en una fase inferior rojiza (de fenol y cloroformo), una interfase y una fase superior acuosa e incolora que contenía el ARN. El sobrenadante acuoso se separó cuidadosamente, se transfirió a tubos nuevos y se precipitó el ARN presente con alcohol isopropílico. Los tubos se centrifugaron a 12000 x g, apareciendo un precipitado de ARN que se lavó con etanol al 75%. El precipitado de ARN se resuspendió en agua libre de ARNasas. La cuantificación del ARN se llevó a cabo

utilizando capilares de cuarzo con un aparato de medida *GeneQuant* (GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, España) y midiendo a una densidad óptica de 260 nm. Las muestras se purificaron utilizando el sistema comercial *TURBO DNA-free* (Ambion, Austin, TX, EE.UU.). Gracias a este proceso se descartó la presencia de ADN genómico contaminante en las muestras mediante la utilización de una enzima ADNasa. Las muestras se incubaron a 37° C durante 1 hora en presencia de la enzima *Turbo DNase-free* (Ambion, Austin, TX, EE.UU) y la reacción se detuvo con el reactivo inactivador *DNase inactivation Reagent* (Ambion, Austin, TX, EE.UU.), obteniéndose la muestra purificada.

La transcripción reversa se realizó en tubos de propileno tipo *ependorf* de 0,2 mL. En ellos se preparó la reacción con los siguientes componentes del sistema *TaqMan RT* (Applied Biosystems, Madrid, España): tampón *TaqMan RT 10x*,  $MgCl_2$  (5,5 mM), dNTP (2 mM), cebador hexamérico aleatorio (2,5  $\mu$ M), inhibidor de ARNasas (2000 U/mL), enzima transcriptasa reversa (5000 U/mL), agua libre de ARNasas hasta un volumen final de reacción de 20  $\mu$ L y finalmente 1  $\mu$ g de ARN procedente de nuestra muestra. Se introdujeron los tubos en el termociclador *iCycler Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad Laboratories, Madrid, España) y se procedió a la transcripción reversa. El ciclo termal constó de las siguientes fases:

- Incubación a 25° C durante 10 minutos; el cebador aleatorio se une a la cadena de ARN.
- Incubación a 48° C durante 30 minutos; se activa la transcriptasa reversa y se sintetiza el ADNc.
- Elevación de la temperatura a 95° C durante 5 minutos; se inactiva la enzima.

El ADNc se almacenó a -20° C hasta su posterior análisis.

En una placa de 96 pocillos específica para PCR se añadieron 24  $\mu$ L por pocillo de *2x SYBR Green Supermix* (Bio-Rad Laboratories, Madrid, España) que contenía: KCl 100 mM, Tris-HCl 40 mM a pH 8,4, una mezcla de dNTP 0,4 mM, enzima ADN polimerasa a 50 U/mL,  $MgCl_2$  6 mM, el fluorocromo intercalante *SYBR Green I* a 20 nM, fluoresceína y estabilizadores, al que se añadió agua libre de ADNasas y los cebadores sentido y antisentido correspondientes. Por último, se pipeteó 1  $\mu$ L de la muestra de ADNc en cada pocillo. La concentración del ADNc de la muestra estuvo

comprendida entre 10 y 20 ng/ $\mu$ L. Los ensayos de la PCR se realizaron por duplicado en un aparato termociclador *iCycler Real-Time PCR Detection System* (Bio Rad Laboratories, Madrid, España).

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

Fase	Temperatura	Tiempo
Activación de la polimerasa	95° C	10 minutos
PCR (40 ciclos): Desnaturalización	95° C	15 segundos
Unión	56° C	45 segundos
Extensión	72° C	45 segundos
Adquisición de datos	77° C	15 segundos

Los cebadores utilizados en los ensayos de RT-PCR de la presente tesis están descritos en la bibliografía, se obtuvieron de Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemania) y son los siguientes: ADAMTS-4 y ADAMTS-5 (Pelletier y cols., 2005), agrecano (Dreier y cols., 2001),  $\beta$ -actina (Thilakawardhana y cols., 2005), colágeno II (Dreier y cols., 2001), COX-2 (Daouti y cols., 2005), HO-1 (Kasai y cols., 2000), IL-6 ([www.realttime-primers.org](http://www.realttime-primers.org)), IL-8 (Muhlbauer y cols., 2004), MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-10, (Mietz y cols., 2003), MMP-13 (Boileau y cols., 2005), mPGES-1 (Li y cols., 2005) y NOS-2 (Thilakawardhana y cols., 2005).

Para el análisis cuantitativo del producto se analizó la curva de amplificación, que consta de tres zonas o fases: fase de latencia, con un fondo inespecífico más o menos estable; fase exponencial, donde la fluorescencia empieza a crecer por encima del fondo; fase de saturación, en la que tras varios ciclos la fluorescencia deja de crecer y se estabiliza.

El número de copias del correspondiente producto de la PCR o “amplicón” se cuantificó conociendo su ciclo umbral y utilizando el método delta-delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) (Livak y Schmittgen, 2001). El ciclo umbral ( $C_T$ ) de una muestra es el ciclo en el que su intensidad de fluorescencia sobrepasa un umbral preestablecido. De manera que

cuanto antes alcance este umbral menor será su valor de  $C_T$ , mayor su intensidad de fluorescencia y mayor la expresión relativa de la muestra analizada. En las condiciones experimentales usadas, la eficiencia de la reacción fue mayor del 90%. La eficiencia de la reacción ( $E=10^{-1/\text{pendiente}}$ ), es calculada automáticamente por el instrumento a partir de la pendiente de la recta que se obtiene haciendo diluciones del ADNc y representando la recta de regresión de  $C_t$  frente al logaritmo de la concentración inicial de ADNc. Si es aproximadamente del 100% indica que se dobla la cantidad de amplicón en cada ciclo.  $\Delta C_T$  representa la diferencia entre el  $C_T$  del gen estudiado y el  $C_T$  de un gen control ( $\beta$ -actina) para la misma muestra.  $\Delta\Delta C_T$  es la resta del  $\Delta C_T$  de las diferentes variables menos el  $\Delta C_T$  de las células no estimuladas. Finalmente, el parámetro  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  representa la “diferencia en número de veces” y cuantifica la expresión relativa de un gen respecto a las células no estimuladas, es decir, nos dice cuantas veces es mayor un valor respecto de los blancos.

Para concluir, se analizaron las curvas de fusión. La curva de fusión del producto consiste en la monitorización de la fluorescencia de las muestras mientras se aumenta progresivamente la temperatura (de 55 a 95° C). Cuando se alcanza la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de algún fragmento presente en la muestra, se observa un repentino descenso de la fluorescencia de ésta. La derivada de la gráfica resultante, muestra tantos picos como fragmentos haya en la muestra, lo que permite detectar si ha habido amplificaciones secundarias no específicas o dímeros de cebadores. Los dímeros de cebadores suelen tener una  $T_m$  más baja, entre los 70 y 80° C. Para cada gen utilizado, se confirmó la especificidad de la reacción mediante el análisis de la curva de fusión.

#### **4.3.17. Análisis estadístico y expresión de resultados**

Los resultados se han expresado como media aritmética de los valores  $\pm$  error estándar de la media ( $\epsilon$ ). Los resultados obtenidos se sometieron al tratamiento estadístico empleando el método ANOVA simple de una vía y la  $t$  de Dunnett para comparaciones múltiples. El método de Dunnett (Dunnett, 1964) permite comparar los valores medios de los grupos problema respecto de un grupo control, teniendo en

## Material y métodos

---

cuenta el error asociado a las comparaciones múltiples. Se considera que la diferencia entre los grupos tratados y el control es significativa ( $p < 0,05$ ) cuando el valor de  $t$  obtenido es mayor que el tabulado para un margen de confianza del 95%, y muy significativa ( $p < 0,01$ ) cuando es mayor del 99%. Se utilizó el símbolo (\*) para representar la significatividad estadística respecto del control correspondiente en cada caso (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ). La ausencia de símbolo indica que no hubo diferencias significativas frente al grupo control.

Para las comparaciones entre dos medias muestrales se empleó la distribución  $t$  de Student para muestras independientes. Se utilizó el símbolo (\*) para representar la significatividad estadística respecto del control (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ). El símbolo (†) se utilizó para representar la significatividad estadística de las células incubadas con un producto y sin estímulo (es decir, los blancos de producto) frente a las células no estimuladas o blancos († $p < 0,05$ , †† $p < 0,01$ ). El símbolo (#) representó la significatividad estadística de las células transfectadas con siRNA frente a sus respectivos controles (# $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ ).

***5. RESULTADOS EN LA  
LÍNEA CELULAR Caco-2***





## **5.1. EFECTOS DE LA CoPP Y DEL CORM-2 SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN LA LÍNEA CELULAR Caco-2**

La inducción de HO-1 ha demostrado tener efectos citoprotectores en distintos tipos celulares (Yao y cols., 2009; González-Reyes y cols., 2009). Para estudiar estos posibles efectos en la línea celular de enterocitos Caco-2 utilizamos un modelo experimental *in vitro* de inflamación intestinal, en el cual las células se estimularon con una mezcla de citocinas llamada citomix con: IFN- $\gamma$  (1000 U/mL), IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) y TNF- $\alpha$  (10 ng/mL). El citomix reproduce los estímulos proinflamatorios a que se pueden ver expuestos los enterocitos humanos en las enfermedades crónicas inflamatorias (ver sección de Material y métodos para más información).

### **5.1.1. Estudio comparativo de los efectos de la CoPP y el CORM-2 sobre la producción de mediadores inflamatorios en células Caco-2 estimuladas con citocinas**

Una vez demostrada la ausencia de toxicidad de los productos en este modelo (ver sección 4.3.1 de Material y métodos), se procedió a realizar una serie de medidas preliminares en las que las células se estimularon con citomix durante 24 horas en presencia o ausencia de los dos productos, CoPP y CORM-2, a dos concentraciones diferentes cada uno. Transcurrido ese tiempo se recogieron los sobrenadantes y se midió en ellos la producción de tres mediadores implicados en la inflamación y el estrés celular en este sistema experimental: el NO (medido como nitrito), la IL-8 y la proteína pro-MMP-7. Los resultados de estas medidas quedan reflejados en la tabla 5.

Como podemos observar, el tratamiento con CORM-2 redujo significativamente dichos mediadores a las dos concentraciones testadas de 50 y 100  $\mu$ M. Sin embargo, el inductor de HO-1 CoPP apenas produjo disminuciones significativas de alguno de estos mediadores, a pesar de utilizar concentraciones del producto que

han mostrado gran eficacia en otras condiciones de experimentación (ver sección 5.2. de Resultados).

Debido a la escasa relevancia de los efectos de la CoPP frente a los observados en el CORM-2 en nuestras condiciones de experimentación, se decidió centrar el estudio en el dador de monóxido de carbono, trabajando a tres concentraciones del producto: 50, 100 y 150  $\mu\text{M}$ . Estas concentraciones están en el rango de las previamente publicadas en otras líneas celulares (Motterlini y cols., 2002).

**Tabla 5.** Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP y del CORM-2 sobre los niveles de nitrito, IL-8 y pro-MMP-7 en sobrenadantes.

Tratamiento	Nitrito (ng/mL)	IL-8 (pg/mL)	pro-MMP-7 (pg/mL)
B	165,2 $\pm$ 18,4**	24,5 $\pm$ 7,4**	129,0 $\pm$ 4,4**
CIT	324,5 $\pm$ 29,5	78,3 $\pm$ 4,6	285,2 $\pm$ 16,6
CIT + CoPP 1 $\mu\text{M}$	301,2 $\pm$ 42,4	72,8 $\pm$ 8,9	273,5 $\pm$ 26,6
CIT + CoPP 5 $\mu\text{M}$	189,9 $\pm$ 20,5*	60,0 $\pm$ 4,3*	233,0 $\pm$ 35,7
CIT + CORM-2 50 $\mu\text{M}$	213,5 $\pm$ 29,7*	59,3 $\pm$ 7,6*	230,5 $\pm$ 21,7*
CIT + CORM-2 100 $\mu\text{M}$	148,1 $\pm$ 19,9**	53,7 $\pm$ 6,9**	200,4 $\pm$ 19,8**

Las células Caco-2 fueron estimuladas con citomix durante 18 horas. Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de 3 experimentos independientes, cada uno con 4 muestras. El nitrito se midió por una técnica fluorimétrica y la IL-8 y pro-MMP-7 por ELISA; *t* de Dunnett, \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ , respecto a las células control estimuladas con citomix. CIT: citomix, CoPP: cobalto protoporfirina IX, CORM-2: dímero tricarbonildiclororrutenio (II), (B): células no estimuladas.

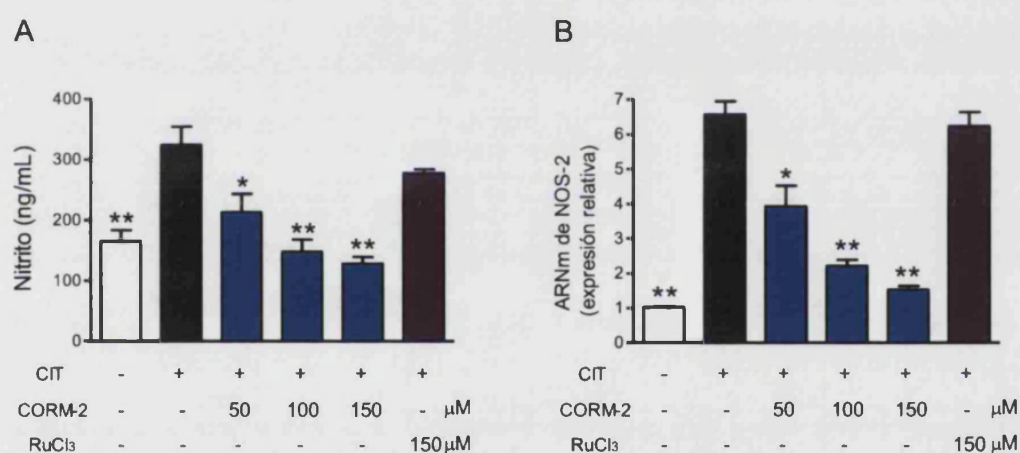
### 5.1.2. Efecto del CORM-2 sobre la producción de óxido nítrico

Así, para la medida de la producción de NO por las células Caco-2, éstas fueron incubadas con CORM-2 a tres concentraciones diferentes y estimuladas con citomix durante 18 horas, transcurridas las cuales se recogieron los sobrenadantes celulares y se midieron en ellos los niveles de nitrito por la técnica fluorimétrica de Misko y colaboradores (Misko y cols., 1993).

El tratamiento con CORM-2 a tres concentraciones, 50, 100 y 150  $\mu\text{M}$ , redujo significativamente la generación de NO medida como nitrito tras las 18 horas de estimulación, de manera concentración-dependiente (figura 23A). Por el contrario,

el control negativo sin grupos CO, el cloruro de rutenio, fue inefectivo a la concentración de 150  $\mu\text{M}$ , comparable con la concentración más alta de CORM-2 empleada. La inhibición de la producción de nitrito por el CORM-2 se corresponde con la expresión del ARNm de NOS-2 (figura 23B) medida por RT-PCR a tiempo real.

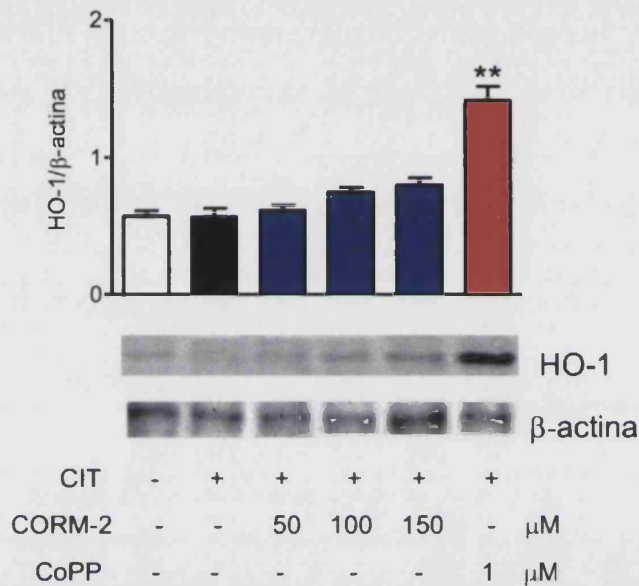
**Figura 23.** Efecto del CORM-2 sobre los niveles de nitrito en sobrenadantes (A) y en la expresión de ARNm de NOS-2 (B) en células Caco-2.



Las células Caco-2 fueron estimuladas con citomix durante 18 horas (A) o 12 horas (B). Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de 3 experimentos independientes, cada uno con 4 muestras; *t* de Dunnett, \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ , respecto a las células control estimuladas con citomix. CIT: citomix, CORM-2: dímero tricarbonildiclororrutenio (II), (-): células no estimuladas.

Se sabía que tanto el CO como el CORM-2 podían inducir HO-1 en otras líneas celulares (Sawle y cols., 2005) y esta actividad podría inhibir la producción de NO (Turcanu y cols., 1998). Por ello, evaluamos el efecto del CORM-2 sobre la expresión de HO-1 por Western blot. El inductor de HO-1 utilizado anteriormente, la cobalto protoporfirina IX (CoPP), fue incluido en este caso como control positivo. Como se muestra en la figura 24, el tratamiento con CORM-2 durante 24 horas no indujo un incremento significativo en la expresión de HO-1, mientras que la CoPP indujo dicha enzima muy significativamente.

**Figura 24.** Efecto del CORM-2 sobre la expresión proteica de HO-1 en células Caco-2.

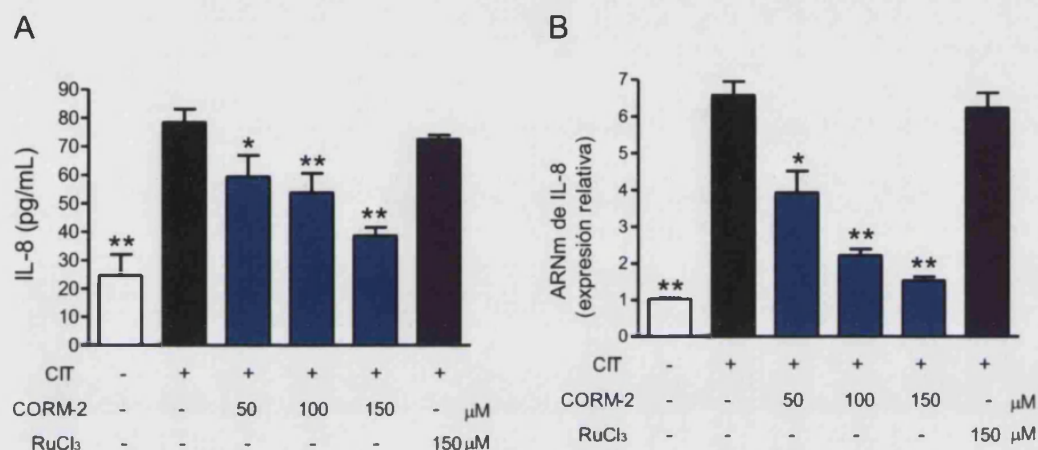


Las células Caco-2 fueron incubadas con los compuestos a evaluar durante 24 horas en presencia o ausencia de citomix. Las imágenes de Western blot son representativas de tres experimentos diferentes. Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$ ;  $t$  de Dunnett, \*\*  $p < 0,01$ , respecto a las células control estimuladas con citomix. CIT: citomix, CORM-2: dímero tricarbonildiclororrutenio (II), CoPP: cobalto protoporfirina IX, (-): células no estimuladas.

### 5.1.3. Efecto del CORM-2 sobre la producción de IL-8

Debido a que la quimiocina IL-8 tiene un papel importante en los procesos quimiotácticos de la inflamación intestinal (Mazzucchelli y cols., 1994), decidimos estudiar el efecto del CORM-2 sobre la producción de IL-8. El tratamiento de las células Caco-2 con citomix aumentó la expresión del ARNm de IL-8 de manera significativa, así como la liberación de la proteína IL-8. Como se muestra en la figuras 25A y 25B, el CORM-2 inhibió de manera concentración-dependiente tanto los niveles de proteína IL-8 en sobrenadantes como la expresión de ARNm en células Caco-2 estimuladas con citomix.

**Figura 25.** Efecto del CORM-2 sobre los niveles de proteína de IL-8 en sobrenadantes (A) y en la expresión de ARNm (B) en células Caco-2.



Las células Caco-2 fueron estimuladas con citomix durante 18 horas (A) o 12 horas (B). Los niveles de proteína de IL-8 se midieron en los sobrenadantes por ELISA (A). La expresión de ARNm fue determinada por PCR a tiempo real (B). Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de 3 experimentos independientes, cada uno con 4 muestras; *t* de Dunnett, \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ , respecto a las células control estimuladas con citomix. CIT: citomix, CORM-2: dímero tricarbonildiclororrutenio (II), (-): células no estimuladas.

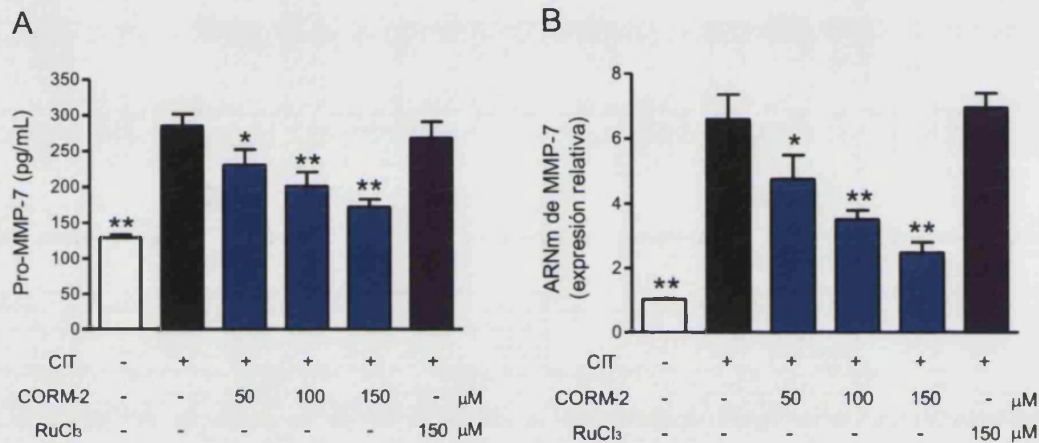
#### 5.1.4. Efecto del CORM-2 sobre la inducción de MMP-7

La matrilisina-1 (MMP-7) es considerada como una enzima de gran importancia como mediador en patologías inflamatorias intestinales y cáncer colorrectal (Wielockx y cols., 2004; Witty y cols., 1994) y su inhibición podría ser potencialmente beneficiosa en el tratamiento de dichas patologías. Siendo conocido el papel de las citocinas en la inducción de la MMP-7 en células epiteliales, se procedió a la estimulación de células Caco-2 con la mezcla de citocinas citomix.

Dicha estimulación incrementó significativamente la expresión de MMP-7. Como se muestra en la figura 26A, el CORM-2 inhibió los niveles de proteína de pro-MMP-7 de manera concentración-dependiente, mientras que el control negativo RuCl<sub>3</sub> no mostró ningún efecto. Para averiguar si el CORM-2 reducía la expresión génica de MMP-7, las células Caco-2 fueron estimuladas con citomix en presencia o ausencia de CORM-2 y las cantidades relativas de ARNm se midieron

por RT-PCR a tiempo real. La figura 26B muestra como el tratamiento con CORM-2 redujo significativamente la inducción de ARNm de MMP-7 por citomix.

**Figura 26.** Efecto del CORM-2 sobre los niveles de proteína de pro-MMP-7 en sobrenadantes (A) y en la expresión de ARNm (B) en células Caco-2.

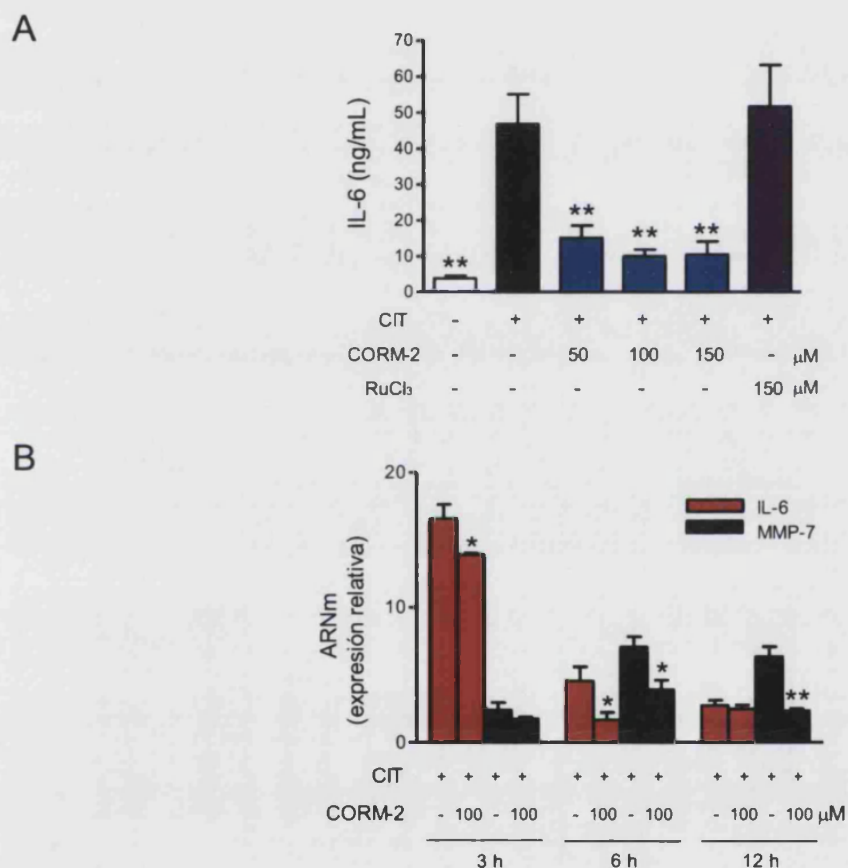


Las células Caco-2 fueron estimuladas con citomix durante 18 horas (A) o 12 horas (B). Los niveles de proteína de MMP-7 se midieron en los sobrenadantes por ELISA (A). La expresión de ARNm fue determinada por PCR a tiempo real (B). Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de 3 experimentos independientes, cada uno con 3 muestras;  $t$  de Dunnett, \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ , respecto a las células control estimuladas con citomix. CIT: citomix, CORM-2: dímero tricarbonildiclororrutenio (II), (-): células no estimuladas.

### 5.1.5. Efecto del CORM-2 sobre la IL-6

Otro mediador inflamatorio implicado en patologías inflamatorias intestinales y cáncer es la IL-6. En concreto, se sabe que la IL-6 se produce por la mucosa intestinal y puede ser inducida por IL-1 $\beta$  en células Caco-2 (Parikh y cols., 1997). De este modo, la estimulación por citomix llevó a un rápido incremento de la producción de IL-6. Como se muestra en la figura 27A, el tratamiento con CORM-2 redujo marcadamente los niveles de IL-6 en sobrenadantes de células estimuladas con citomix durante 6 horas, de manera concentración-dependiente, hasta aproximadamente el mismo nivel que el observado en células no estimuladas, mientras el RuCl<sub>3</sub> fue totalmente inactivo en estas condiciones.

**Figura 27.** Efecto del CORM-2 en los niveles de IL-6 medidos en sobrenadantes de células estimuladas con citomix durante 6 horas (A) y estudio cinético de la expresión de ARNm de IL-6 y MMP-7 y del efecto del CORM-2 a 100  $\mu\text{M}$  (B).



Las células Caco-2 fueron estimuladas con citomix durante 6 horas (A) o 3, 6 y 12 horas (B). Los niveles de proteína de IL-6 se midieron en los sobrenadantes por ELISA (A). La expresión de ARNm fue determinada por PCR a tiempo real (B). Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de 3 experimentos independientes, cada uno con 4 muestras; *t* de Dunnett, \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ , respecto a las células control estimuladas con citomix. CIT: citomix, CORM-2: dímero tricarbonildiclororrutenio (II), (-): células no estimuladas.

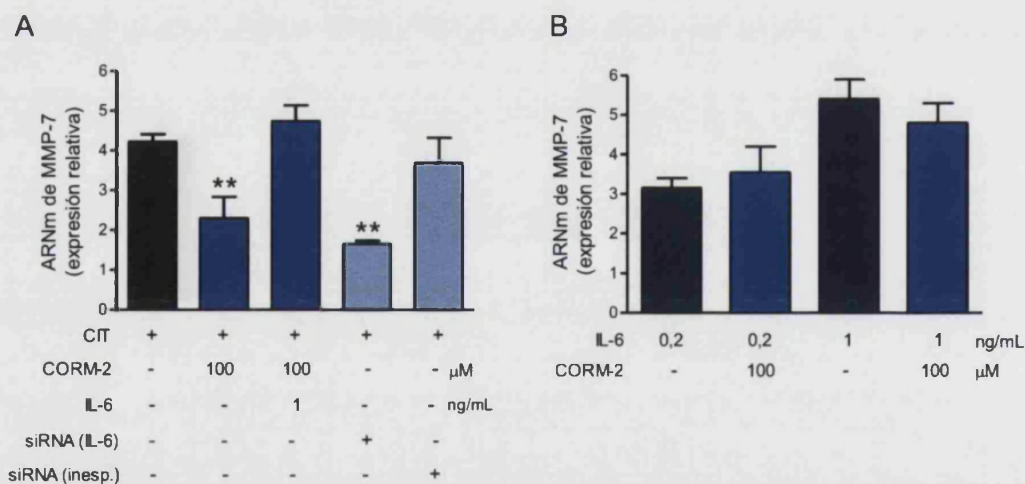
Ya que la IL-6 puede mediar la inducción de MMP-7 por IL-1 $\beta$  (Maliner-Stratton y cols., 2001), dirigimos los experimentos a determinar si la inhibición de la producción de IL-6 juega un papel en los efectos del CORM-2 sobre la MMP-7. Para establecer la relación entre la IL-6 y la MMP-7, llevamos a cabo una serie de experimentos de PCR a tiempo real donde observamos los cambios en la expresión relativa del mensajero. El ARNm de la IL-6 fue apenas detectable en células no estimuladas, mientras que el tratamiento con citomix rápidamente aumentó la expresión de este transcrito.



La figura 27B muestra la cinética de la inducción por citomix de ARNm de IL-6 y MMP-7 en células Caco-2. La expresión de IL-6 estimulada por citomix tuvo un pico a las 3 horas. Esto es diferente de lo observado en la expresión de MMP-7 provocada por citomix, que alcanza una meseta tras 6 horas de estimulación.

El tratamiento con CORM-2 redujo la expresión de ambos genes, con mayor intensidad para IL-6 y MMP-7 a las 6 y 12 horas posteriores a la estimulación con citomix, respectivamente. Estos experimentos muestran que la inhibición de la expresión del ARNm de IL-6 por CORM-2 precedió a la de MMP-7.

**Figura 28.** Influencia de la modulación de IL-6 en el efecto inhibitorio del CORM-2 sobre la expresión de ARNm de MMP-7 en células Caco-2 estimuladas durante 12 horas (A) y efecto de la estimulación con IL-6 sobre la expresión de ARNm de MMP-7 durante 12 horas (B).



Las células Caco-2 fueron estimuladas con citomix durante 12 horas (A) y con IL-6 durante 12 horas (B). La expresión de ARNm fue determinada por PCR a tiempo real. La concentración del siRNA de IL-6 y el siRNA inespecífico fue de 100 nM. Resultados expresados como media ± ε de 2 experimentos independientes, cada uno con 3 muestras; t de Dunnett, \*\*  $p < 0,01$ , respecto a las células control estimuladas con citomix. CIT: citomix, IL-6: interleucina-6, CORM-2: dímero tricarbonildiclororrutenio (II), siRNA (IL-6): ARN de interferencia para IL-6, siRNA (inesp.): ARN de interferencia inespecífico.

En la figura 28A observamos cómo los efectos inhibitorios del CORM-2 sobre el ARNm de la MMP-7 quedaron abolidos cuando se añadió IL-6 al medio de cultivo a la vez que el citomix. También observamos que el pretratamiento de las células Caco-2 con un siRNA específico para IL-6 disminuyó significativamente la

expresión del mensajero de MMP-7 en células estimuladas con citomix, mientras el pretratamiento con un siRNA inespecífico no tuvo efecto. Estos resultados constatan la relación directa entre la presencia de IL-6 y el aumento de la expresión de MMP-7, así como la posibilidad de que la disminución de IL-6 producida por el CORM-2 medie, al menos en parte, en los efectos del CORM-2 sobre la MMP-7.

En otra serie de experimentos realizados sin estimulación con citomix, se observó que la adición de IL-6 a las células no estimuladas inducía la expresión de mensajero de MMP-7. El tratamiento con CORM-2 no inhibió dicha expresión (figura 28B).

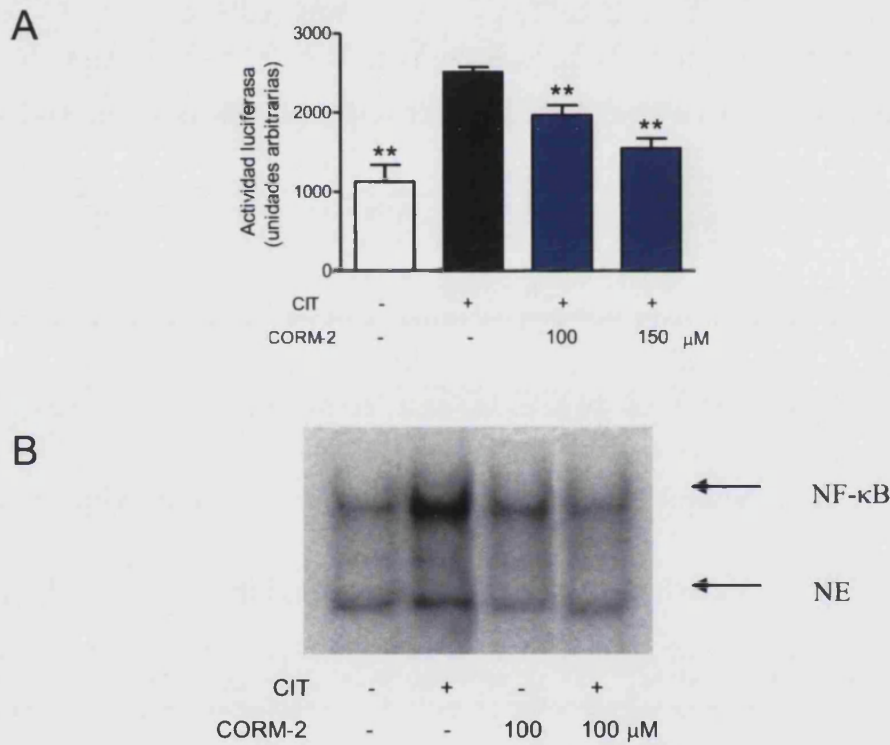
#### **5.1.6. Efecto del CORM-2 sobre la activación de NF- $\kappa$ B, AP-1 y C/EBP**

Ya que la activación de NF- $\kappa$ B es esencial para la inflamación mediada por citocinas y la transcripción de NOS-2 e IL-8 en células epiteliales intestinales humanas (Jobin y cols., 1998) y la producción de IL-6 en células Caco-2 tras la estimulación con IL-1 $\beta$  ha sido relacionada con la activación de NF- $\kappa$ B, AP-1 y C/EBP (Parikh y cols., 1997; Hungness y cols., 2000; Hungness y cols., 2002), evaluamos la hipótesis de que el CORM-2 podía mediar sus efectos a través de la supresión de la actividad de estos factores de transcripción.

De este modo, pudimos comprobar cómo el tratamiento con citocinas de las células Caco-2 tuvo como consecuencia una rápida fosforilación del I $\kappa$ B $\alpha$ , el desplazamiento hacia el núcleo del NF- $\kappa$ B, la unión al ADN y la activación de la transcripción, como veremos a continuación.

Para determinar el efecto del CORM-2 en la actividad de NF- $\kappa$ B inducida por citocinas, transfectamos las células de manera transitoria con un plásmido de NF- $\kappa$ B conjugado con luciferasa, seguido de la incubación con CORM-2 y estimulación con citomix.

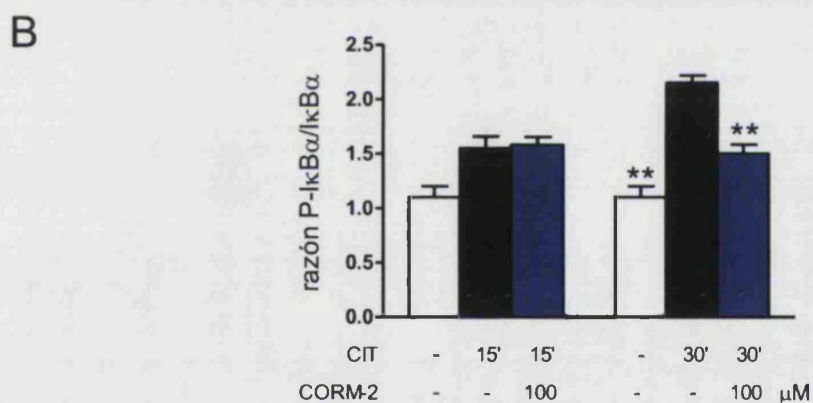
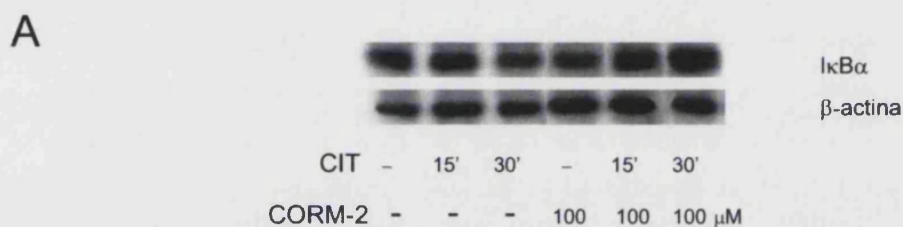
**Figura 29.** Efecto del CORM-2 sobre la activación del promotor de NF- $\kappa$ B en células Caco-2 estimuladas con citomix durante 8 horas (A) y sobre la unión del NF- $\kappa$ B al ADN con estimulación de 30 minutos (B).



Las células Caco-2 fueron estimuladas con citomix durante 8 horas (A) o 30 minutos (B). Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de 3 experimentos independientes, cada uno con 3 muestras; *t* de Dunnett, \*\*  $p < 0,01$ , respecto a las células control estimuladas con citomix. CIT: citomix, CORM-2: dímero tricarbonildiclororrutenio (II), (-): células no estimuladas, NE: banda no específica.

La exposición de las células a citomix durante 8 horas, incrementó la actividad luciferasa en las células transfectadas con el plásmido NF- $\kappa$ B-luciferasa, mientras el tratamiento con CORM-2 redujo significativamente la activación de NF- $\kappa$ B (figura 29A). Además, los experimentos de EMSA (figura 29B) revelaron que el CORM-2 también inhibió la unión entre el NF- $\kappa$ B y el ADN inducida por el citomix tras 30 minutos de estimulación.

**Figura 30.** Efecto del CORM-2 sobre la expresión de I $\kappa$ B $\alpha$  medida en extractos celulares citoplásmicos (A) y sobre la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  medida en células en cultivo (B) previa estimulación con citomix durante 15 o 30 minutos.



Las células Caco-2 fueron estimuladas con citomix durante 15 y 30 minutos. En (A), la figura es representativa de 3 experimentos independientes. En (B), los resultados están expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de 3 experimentos independientes, cada uno con 3 muestras; *t* de Dunnett, \*\*  $p < 0,01$ , respecto a las células control estimuladas con citomix a 30 minutos. CIT: citomix, CORM-2: dímero tricarbonildiclororrutenio (II), (-): células no estimuladas.

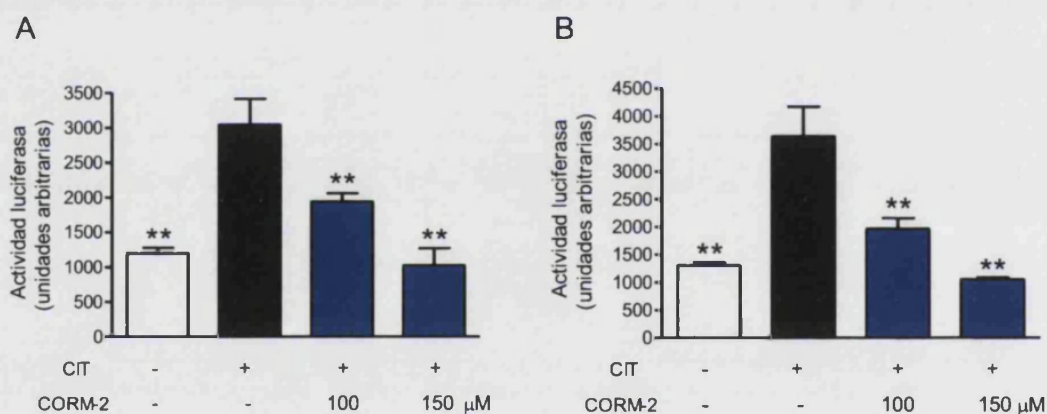
Como se muestra en la figura 30A, el análisis por Western blot reveló que la expresión de la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  disminuía tras la estimulación con citomix durante 30 minutos. Esta disminución en la expresión de I $\kappa$ B $\alpha$  fue prevenida con el tratamiento conjunto de citomix más CORM-2 a ese mismo tiempo. Sin embargo, no se apreciaron cambios notables en la expresión de I $\kappa$ B $\alpha$  a los 15 minutos de estimulación con citomix.

En la figura 30B se muestra la razón entre la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilada y la total medidas por ELISA. En este caso, el citomix elevó significativamente la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  a los 30 minutos de ser adicionado al medio y el CORM-2

fue capaz de revertir este proceso, previniendo la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  y evitando el movimiento de NF- $\kappa$ B al núcleo.

Para examinar los efectos del CORM-2 en la actividad transcripcional de AP-1 y C/EBP, las células Caco-2 fueron transfectadas temporalmente con plásmidos acoplados a luciferasa que contenían los promotores correspondientes.

**Figura 31.** Efecto del CORM-2 sobre la activación del promotor de AP-1 (A) y C/EBP (B) en células Caco-2 estimuladas con citomix durante 8 horas.



Las células Caco-2 fueron estimuladas con citomix durante 8 horas. Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de 2 experimentos independientes, cada uno con 3 muestras; *t* de Dunnett, \*\*  $p < 0,01$ , respecto a las células control estimuladas con citomix. CIT: citomix, CORM-2: dímero tricarbonildiclororrutenio (II), (-): células no estimuladas.

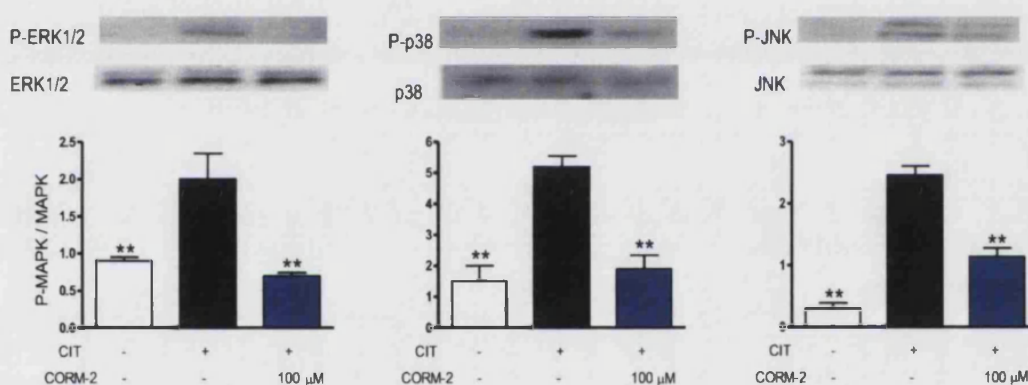
El tratamiento con citomix resultó en un incremento de la actividad luciferasa de aproximadamente tres veces respecto de los controles en ambos casos (figuras 31A y 31B). Los resultados observados indican que el CORM-2 disminuyó significativamente y de manera concentración-dependiente la activación de estos factores de transcripción mediada por citocinas.

### 5.1.7. Efecto del CORM-2 sobre la activación de las enzimas MAPK

Ya que la activación de las enzimas MAPK es un paso importante en la activación del enterocito humano por citocinas proinflamatorias, examinamos la

potencial implicación de esta vía en los efectos inhibitorios del CORM-2. Tratamos las células con citomix y sometimos los lisados celulares al análisis por Western blot para detectar las formas activadas de p38, ERK1/2 y JNK1/2, usando anticuerpos específicos.

**Figura 32.** Efecto del CORM-2 sobre la expresión de las formas fosforiladas de JNK1/2, p38 y ERK1/2 en células Caco-2 estimuladas con citomix durante 15 minutos.



Las células Caco-2 fueron estimuladas con citomix durante 15 minutos. La expresión de las formas fosforilada y total de ERK1/2, p38 y JNK en la fracción celular fue analizada por Western blot. La expresión relativa de las bandas de proteína fosforilada y total fue calculada tras análisis densitométricos, se calculó la razón entre la proteína fosforilada y la total y los resultados se expresaron como media  $\pm$   $\epsilon$ . Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes; *t* de Dunnett, \*\*  $p < 0,01$ , respecto a las células control estimuladas. CIT: citomix, CORM-2: dímero tricarbonyldiclororrutenio (II), (-): células no estimuladas.

Como se muestra en la figura 32, la estimulación con citomix rápidamente incrementó los niveles de las formas fosforiladas de estas proteínas. En células tratadas con CORM-2 y estimuladas con citomix, la expresión de las formas activadas del p38, ERK1/2 y JNK1/2 fue reducida notablemente.

## **5.2. EFECTOS CITOPROTECTORES DE LA CoPP Y EL CORM-2 EN LA LÍNEA CELULAR Caco-2**

En este estudio sobre los efectos citoprotectores de la CoPP y del CORM-2 en células Caco-2, mantuvimos dichas células en un cultivo sometido al estrés de la privación de suero bovino fetal durante tiempos prolongados. La falta de nutrientes es una característica de diversas patologías del tejido colónico que intentamos imitar en nuestras condiciones de experimentación mediante la privación de suero (Stierum y cols., 2003). En estas condiciones, para estudiar el papel de la enzima HO-1, empleamos el inductor CoPP y la molécula liberadora de monóxido de carbono, el dímero tricarbonildiclororrutenio (II) o CORM-2.

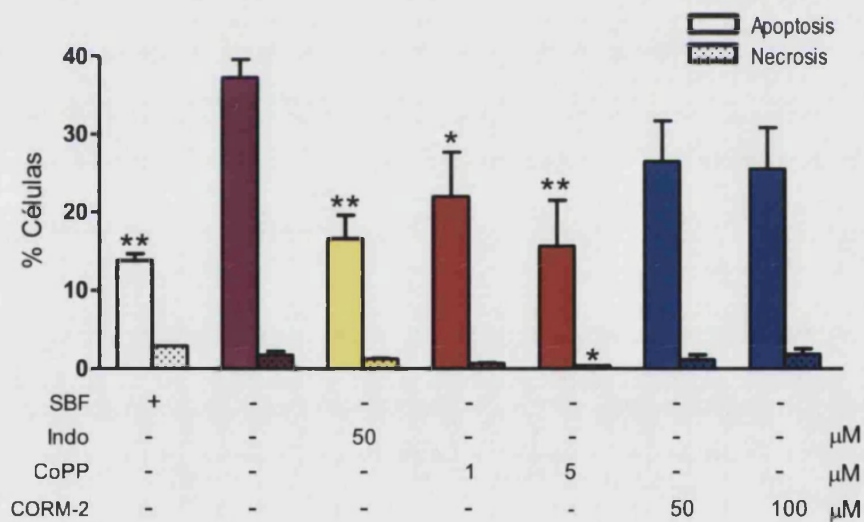
### **5.2.1. Efectos de la inducción de HO-1 por CoPP y del CORM-2 sobre la apoptosis inducida por la privación de suero**

El estímulo apoptótico que se empleó en células Caco-2 fue la ausencia de suero bovino fetal en el medio de cultivo durante 7 días (ver Material y métodos). Como se observa en la figura 33, la carencia de suero durante 168 horas indujo apoptosis significativamente, con un 37,3% de células apoptóticas en el grupo control, comparado con el porcentaje de apoptosis producida espontáneamente en células Caco-2 incubadas durante el mismo tiempo en medio completo (13,8%). Debido a que algunos fármacos antiinflamatorios no esteroídicos tienen la capacidad de prevenir la apoptosis (Ricchi y cols., 2003), utilizamos como referencia la indometacina, que redujo significativamente el número de células apoptóticas en estas condiciones experimentales. Con el objetivo de determinar las consecuencias de la expresión de HO-1, las células Caco-2 fueron tratadas con el potente inductor de HO-1 CoPP. Con fines comparativos, en otros grupos de tratamiento, las células fueron incubadas con una molécula liberadora de CO, el CORM-2. Dado que la enzima HO-1 produce CO, el CORM-2 podría reproducir parte de los efectos de la inducción de HO-1.

En la figura 33 podemos comprobar cómo la molécula CoPP redujo significativamente la apoptosis en células privadas de suero durante 7 días, con un descenso del 57% de células apoptóticas a la concentración de 5  $\mu$ M respecto al

control. La indometacina también redujo de forma muy significativa el porcentaje de células apoptóticas en estas condiciones. Por el contrario, el dador de CO (CORM-2) mostró una tendencia a reducir el número de células apoptóticas, si bien esta reducción no fue significativa. En cuanto a la necrosis, la CoPP disminuyó de manera significativa el número de células necróticas en estas condiciones mientras el CORM-2 no tuvo ningún efecto notable.

**Figura 33.** Efectos de la CoPP y el CORM-2 sobre la apoptosis y la necrosis inducidas por la privación de suero.



El estudio de la apoptosis y la necrosis se realizó por citometría láser (LSC). El análisis estadístico se realizó de manera independiente para la apoptosis y para la necrosis. Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  ( $n=3$ ),  $t$  de Dunnett, \*\*  $p<0,01$ ; \*  $p<0,05$ , respecto a las células control privadas de suero (grupo de barras violeta). Las células SBF+ fueron incubadas con medio completo (10% SBF) durante todo el experimento. Indo: indometacina, CoPP: cobalto protoporfirina IX, CORM-2: dímero tricarbonildiclororrutenio (II).

### 5.2.2. Efectos de la inducción de HO-1 por CoPP y del CORM-2 sobre las alteraciones del ciclo celular inducidas por la privación de suero

La privación de suero indujo la acumulación de células en la fase  $G_2/M$  del ciclo celular. Las células que habían crecido en presencia de medio completo se encontraron principalmente en las fases  $G_0/G_1$  (63,0%) y S (24,8%), con sólo un 12,2% en la fase  $G_2/M$  (figura 34). Tras la privación de suero durante 7 días, el



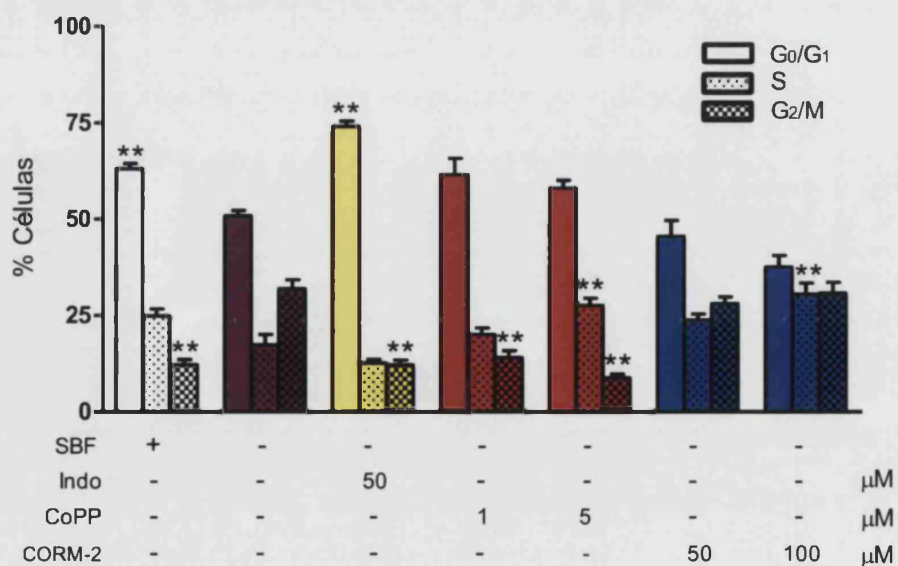
porcentaje de células en fase G<sub>2</sub>/M se incrementó a 31,9%. Esta acumulación en la fase G<sub>2</sub>/M fue acompañada por una disminución en las fases S (17,3%) y G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (50,8%) del ciclo celular.

El tratamiento con indometacina disminuyó el número de células en fase G<sub>2</sub>/M y al mismo tiempo produjo una acumulación celular en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> con una transición disminuida a la fase S.

En las células privadas de suero tratadas con CoPP (a 1 y 5 μM) se redujo el número de células en G<sub>2</sub>/M y el perfil de la distribución del ciclo celular revirtió hacia el perfil que se observa para las células que crecieron en medio completo.

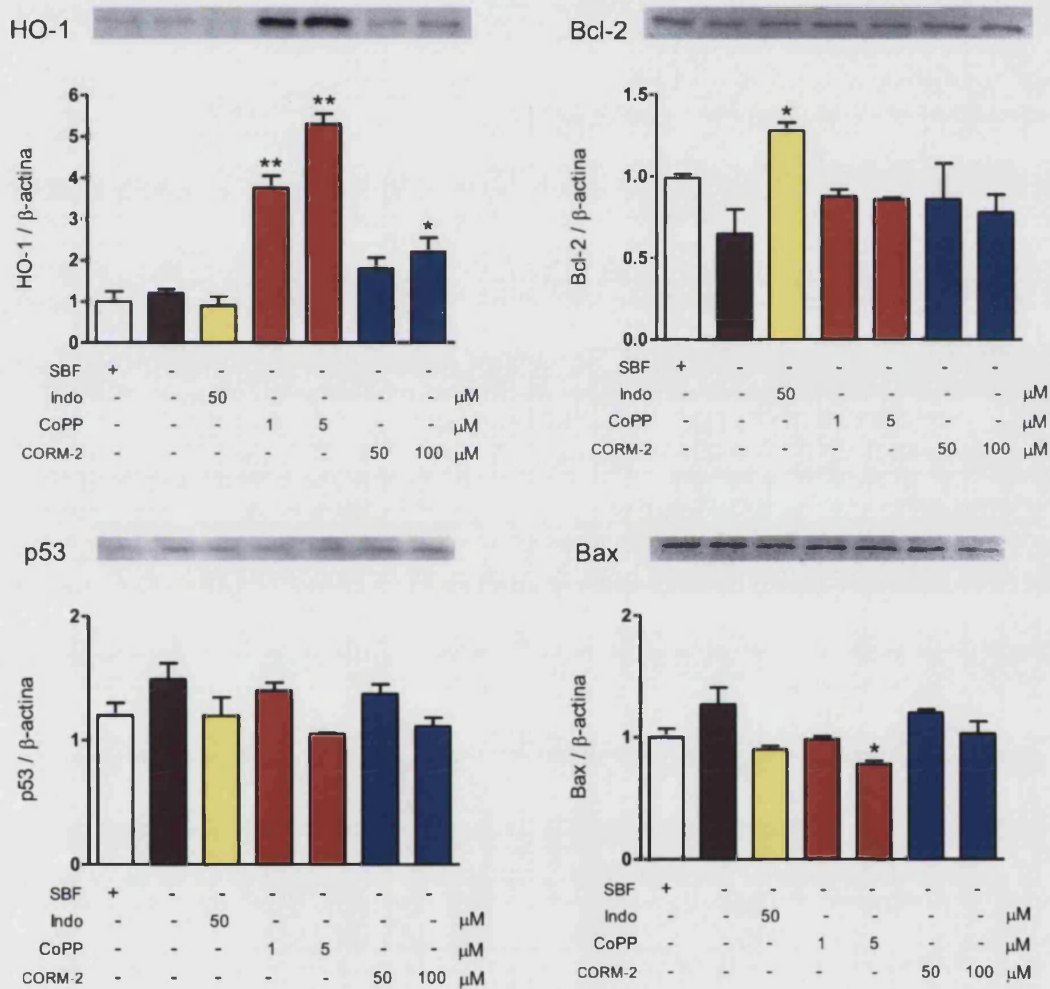
Por otro lado, el tratamiento con CORM-2 no modificó significativamente el porcentaje de células en fase G<sub>2</sub>/M aunque a la concentración más alta (100 μM), se observó un descenso en el porcentaje de células en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> acompañado de una acumulación en la fase S.

**Figura 34.** Efectos de la CoPP y el CORM-2 en la distribución del ciclo celular tras la privación de suero.



El estudio del ciclo celular se realizó por citometría láser (LSC). El análisis estadístico se realizó de manera independiente para cada fase del ciclo celular. Resultados expresados como media ± ε (n=3), t de Dunnett, \*\* p<0,01, respecto a las células control privadas de suero (grupo de barras violeta). Las células SBF+ fueron incubadas con medio completo (10% SBF) durante todo el experimento. Indo: indometacina, CoPP: cobalto protoporfirina IX, CORM-2: dímero tricarbonildiclororrutenio (II).

Figura 35. Efectos en la expresión de proteínas en células Caco-2 tras 7 días de privación de suero.



Las imágenes de Western blot son representativas de tres experimentos diferentes. Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de las razones de la DO de la expresión de las proteínas respecto a la  $\beta$ -actina, *t* de Dunnett, \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ , respecto a las células control privadas de suero (barra violeta). Las células SBF+ fueron incubadas con medio completo (10% SBF) durante todo el experimento. Indo: indometacina, CoPP: cobalto protoporfirina IX, CORM-2: dímero tricarbonildiclororrutenio (II).

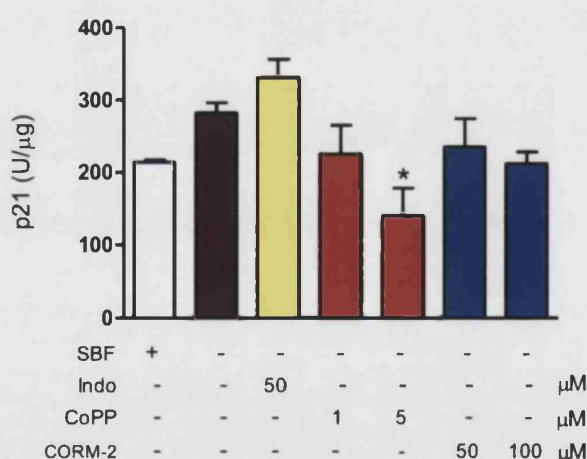
### 5.2.3. Efectos de la inducción de HO-1 por CoPP y del CORM-2 sobre la expresión de proteínas reguladoras de la apoptosis

En nuestras condiciones experimentales, la CoPP indujo un fuerte aumento de los niveles de la proteína HO-1 a las concentraciones empleadas (figura 35). El CORM-2 produjo una inducción de HO-1 menor, significativa a la concentración

de 100  $\mu\text{M}$ . Para evaluar los mecanismos relacionados con los efectos anteriormente observados de los fármacos sobre la apoptosis, determinamos la expresión de varias proteínas relevantes de la apoptosis por Western blot y por ELISA (figuras 35 y 36).

La falta de suero tuvo como consecuencia el incremento en la expresión de las proteínas: Bax, p53, y p21<sup>Cip/WAF1</sup> (promoviendo la apoptosis y la parada del ciclo celular) y la disminución en la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (figuras 35 y 36). El tratamiento con CoPP y el tratamiento con indometacina modificaron parcialmente la razón Bcl-2/Bax (antiapoptótica/proapoptótica) a favor de la supervivencia. Además, este antiinflamatorio no esteroideo tendió a aumentar el p21<sup>Cip/WAF1</sup>, mientras que la CoPP a 5  $\mu\text{M}$  descendió los niveles de esta proteína.

Figura 36. Efecto en los niveles de proteína p21<sup>Cip/WAF1</sup>.

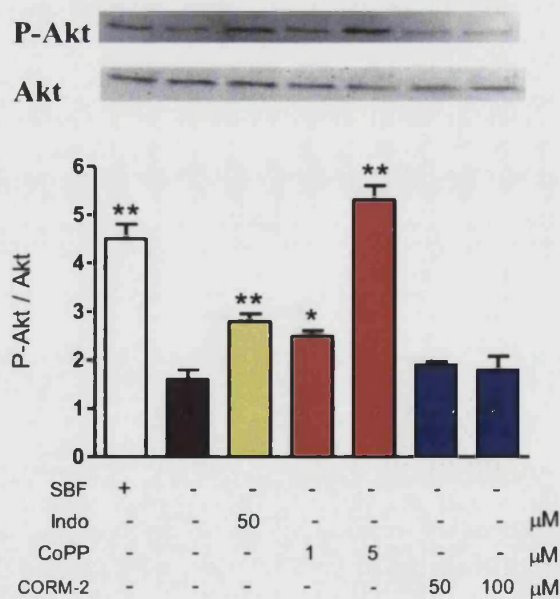


Los niveles de proteína fueron determinados por ELISA en lisado celular y expresados en unidades/ $\mu\text{g}$  de proteína. Resultados expresados como media  $\pm \epsilon$  de 3 experimentos independientes, *t* de Dunnett, \*  $p < 0,05$ , respecto a las células control privadas de suero (barra violeta). Las células SBF+ fueron incubadas con medio completo (10% SBF) durante todo el experimento. Indo: indometacina, CoPP: cobalto protoporfirina IX, CORM-2: dímero tricarbonildiclororrutenio (II).

Dado que la proteína Akt está relacionada con señales antiapoptóticas y proliferativas en las células Caco-2 (Gauthier y cols., 2001), determinamos la posible participación de esta enzima en el efecto antiapoptótico de la CoPP. Los análisis por Western blot se llevaron a cabo con extractos de proteína procedentes de células a las que se privó de suero durante 7 días, en presencia o ausencia de los tratamientos farmacológicos. Las membranas fueron primero tratadas con

anticuerpos específicos frente la proteína Akt fosforilada en la Ser<sup>473</sup> (P-Akt). Posteriormente se separaron los anticuerpos de dichas membranas mediante una solución de “stripping” y se incubaron por segunda vez con un anticuerpo frente a la proteína Akt total. La intensidad de las bandas para Akt fosforilada fue normalizada con la intensidad de las bandas correspondientes a Akt total. Esta razón entre P-Akt y Akt representa la activación de la proteína. Como se muestra en la figura 37, la privación de suero redujo la fosforilación de Akt, en comparación con las células incubadas en medio completo. El tratamiento con CoPP incrementó el estado activado de Akt, con un elevado efecto a 5  $\mu$ M. La indometacina también produjo un aumento significativo de la fosforilación de Akt. No se observó ningún cambio significativo en las células tratadas con CORM-2.

Figura 37. Efecto sobre la fosforilación de Akt.



Las imágenes de Western blot son representativas de tres experimentos diferentes. Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de las razones de la DO de Akt fosforilada respecto a Akt total, *t* de Dunnett, \*\* *p*<0,01; \* *p*<0,05, respecto a las células control privadas de suero (barra violeta). Las células SBF+ fueron incubadas con medio completo (10% SBF) durante todo el experimento. Indo: indometacina, CoPP: cobalto protoporfirina IX, CORM-2: dímero tricarbonildiclororrutenio (II).

Debido a que p38 puede estar relacionada con la fosforilación de Akt en células epiteliales (Shiue y cols., 2005), se determinó la posible participación de esta vía en

los efectos antiapoptóticos de la HO-1. La cuantificación de la forma fosforilada de p38 por ELISA indicó una reducción significativa en los niveles de esta proteína tras la restricción total de suero durante 7 días (de  $1,62 \pm 0,09$  unidades/mg de proteína en el grupo control de células incubadas con suero, a  $1,00 \pm 0,08$  unidades/mg de proteína en el grupo sin suero, media  $\pm \epsilon$ ,  $n=14$ ,  $p<0,01$ ). El tratamiento con CoPP no modificó la fosforilación de p38 en células sin suero ( $0,85 \pm 0,04$  y  $0,91 \pm 0,10$  unidades/mg de proteína a las concentraciones de CoPP de 1 y 5  $\mu\text{M}$ , respectivamente, media  $\pm \epsilon$ ,  $n=6$ ).

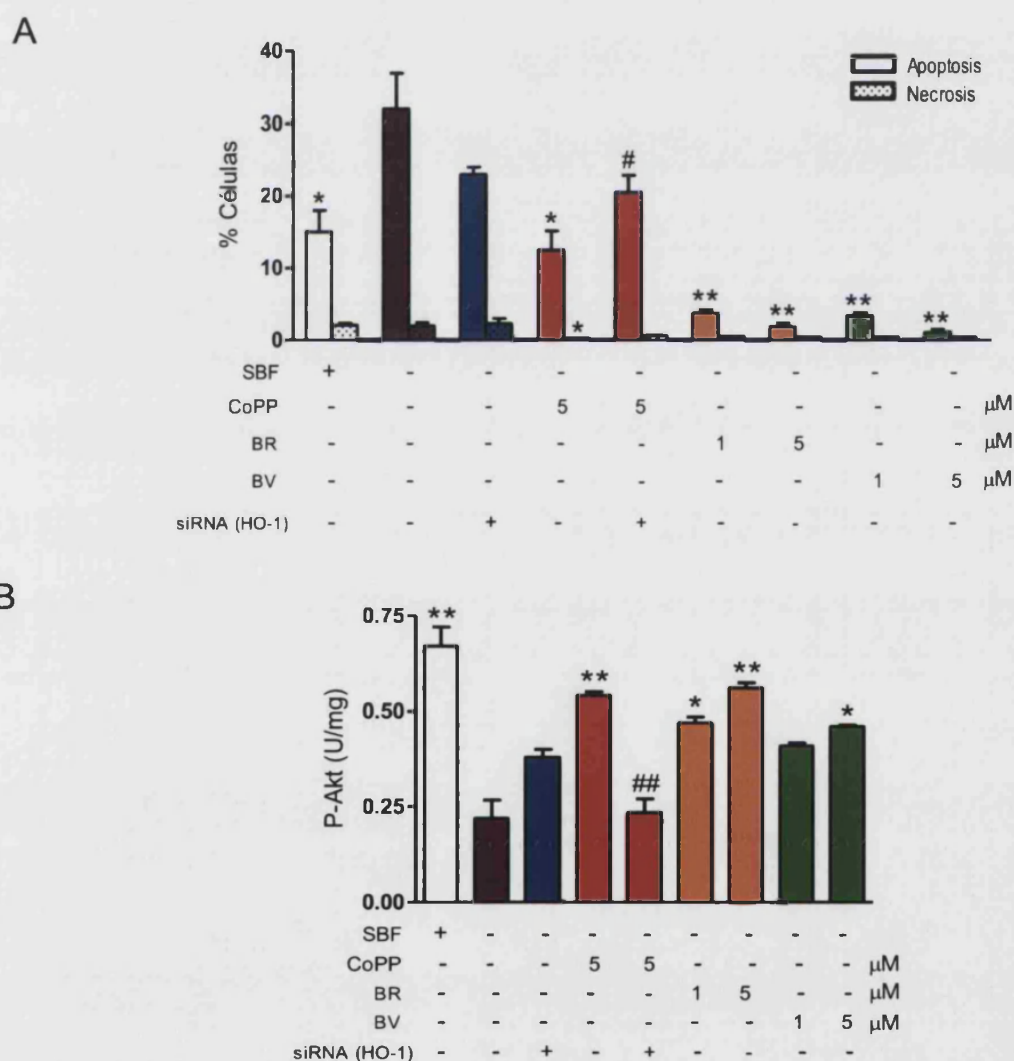
#### **5.2.4. Efecto del siRNA para HO-1, la bilirrubina y la biliverdina sobre la apoptosis y la activación de Akt**

Con el fin de caracterizar mejor el efecto antiapoptótico de la inducción de HO-1, se llevaron a cabo experimentos adicionales en los que se incluyó un siRNA específico para HO-1, así como dos de los metabolitos de dicha enzima: la bilirrubina y la biliverdina. Como se muestra en la figura 38A, la presencia de siRNA evitó el efecto antiapoptótico de CoPP, indicando por tanto que dicho efecto depende únicamente de la inducción de HO-1. Si la inhibición de la apoptosis se debe a la actividad HO-1, uno o varios de los productos derivados de dicha actividad podrían mediar dicho efecto. Por ello, estudiamos la influencia de la bilirrubina y la biliverdina sobre la apoptosis inducida por privación de suero. En la figura 38A se observa que ambos compuestos, a las concentraciones de 1 y 5  $\mu\text{M}$ , inhibieron significativamente la apoptosis en las células privadas de suero.

Profundizando en el efecto antiapoptótico de la inducción de HO-1 sobre la activación de la proteína Akt, se cuantificaron por ELISA los niveles de su forma fosforilada en lisados celulares, obtenidos en las mismas condiciones experimentales anteriormente establecidas y con la inclusión del siRNA específico para HO-1. La figura 38B muestra que este siRNA previno el incremento de la proteína Akt fosforilada causado por CoPP. También se estudiaron los efectos de la bilirrubina y la biliverdina, que aumentaron los niveles de Akt fosforilada respecto al control, de forma que ambos metabolitos imitaron los efectos de CoPP sobre la

activación de Akt. Estos resultados sugieren la participación de los metabolitos de HO-1 bilirrubina y biliverdina en el efecto antiapoptótico de la enzima.

**Figura 38.** Efectos de los metabolitos bilirrubina y biliverdina y del ARN de interferencia (siRNA) para HO-1 en la apoptosis y necrosis (A), y en la fosforilación de Akt (B) inducidas por privación de suero.



A: El estudio de la apoptosis y la necrosis se realizó por citometría láser (LSC). El análisis estadístico se realizó de manera independiente para la apoptosis y para la necrosis. B: Los niveles de Akt fosforilado fueron determinados por ELISA en lisado celular y expresados en unidades/mg de proteína. Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de 3 experimentos independientes, *t* de Dunnett, \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ , respecto a las células control privadas de suero (barra violeta) y ##  $p < 0,01$ ; #  $p < 0,05$ , respecto a CoPP 5  $\mu$ M. Las células SBF+ fueron incubadas con medio completo (10% SBF) durante todo el experimento. El siRNA fue utilizado a 80 nM. CoPP: cobalto protoporfirina IX, BR: bilirrubina, BV: biliverdina, siRNA (HO-1): ARN de interferencia para HO-1.



**6. RESULTADOS EN CONDROCITOS  
OSTEOARTRÍTICOS**





## 6.1. EFECTOS DE LA INDUCCIÓN DE HO-1 POR CoPP EN EL METABOLISMO DEL CONDROCITO OSTEOARTRÍTICO

Tras el estudio de los efectos de la inducción de HO-1 y del dador de monóxido de carbono CORM-2 en la línea celular Caco-2, estudiamos los efectos de la inducción de dicha enzima y del CO en un modelo *in vitro* de OA. En esta serie de ensayos trabajamos con condrocitos, únicas células presentes en el tejido cartilaginoso hialino articular. Los condrocitos fueron aislados de cartílago humano y se trabajó con ellos en cultivo primario. Utilizamos una citocina proinflamatoria, la IL-1 $\beta$ , como estímulo, ya que su participación es de gran importancia en los procesos catabólicos e inflamatorios propios de la osteoartritis (OA). En estas condiciones se empleó el inductor de HO-1 CoPP para examinar los posibles efectos protectores de esta enzima en la OA.

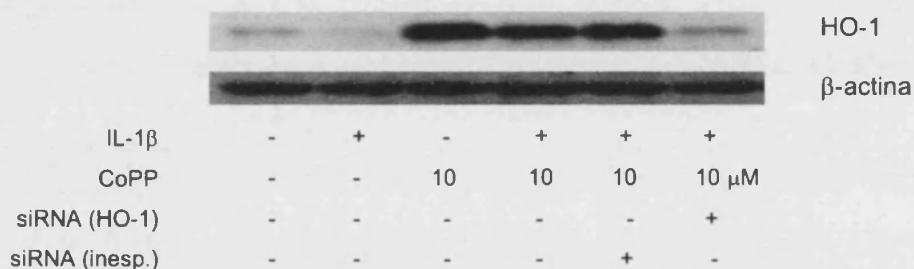
### 6.1.1. Inducción de HO-1 por CoPP en condrocitos primarios

Basándonos en trabajos previos realizados en nuestro grupo de investigación (Fernández y cols., 2004; Fernández y cols., 2003), comenzamos a trabajar con cultivos primarios de condrocitos osteoartríticos humanos y con explantes de cartílago humano (ver sección de Material y métodos).

La primera medida que se realizó fue la de la expresión de la HO-1 en las células del cartílago. De este modo, los condrocitos OA en cultivo primario fueron tratados con CoPP a la concentración de 10  $\mu$ M para inducir HO-1. A esta concentración la CoPP indujo de forma potente la expresión de HO-1 (figura 39). Tal y como se ha descrito previamente (Fernández y cols., 2003), la estimulación de condrocitos OA con IL-1 $\beta$  disminuyó la expresión de la proteína HO-1. El tratamiento con un siRNA específico para HO-1 hizo desaparecer casi en su totalidad los efectos de la CoPP sobre la expresión proteica de HO-1, mientras un siRNA inespecífico no modificó la expresión de la HO-1. Con el uso de un siRNA

específico para HO-1 pudimos asegurar que los efectos de la CoPP eran debidos a la inducción de HO-1 y no a otros efectos propios de la porfirina.

**Figura 39.** Inducción de HO-1 por CoPP en condrocitos osteoartríticos humanos.



Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1β (100 U/mL) durante 24 horas. La concentración de los siRNA fue de 100 nM. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes con células procedentes de tres pacientes. IL-1β: interleucina-1β, CoPP: cobalto protoporfirina IX, siRNA (HO-1): ARN de interferencia para HO-1, siRNA (inesp.): ARN de interferencia inespecífico, (-): células no estimuladas.

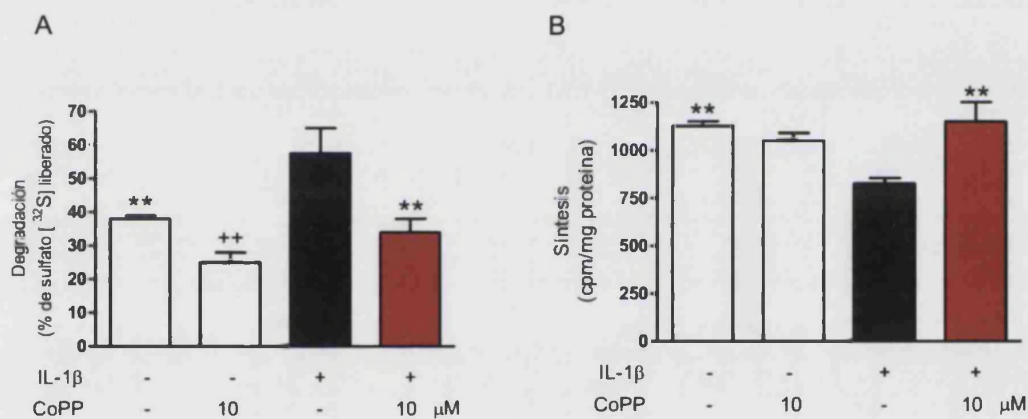
### 6.1.2. Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre la degradación y síntesis de la matriz extracelular

La liberación de glicosaminoglicanos es un evento temprano en el proceso de degradación del cartílago (Sandy, 2006). Para medir la liberación de glicosaminoglicanos, se utilizó un cultivo de explantes de cartílago OA, que fueron incubados con medio de cultivo en presencia de sulfato marcado con <sup>35</sup>S durante 6 días, de modo que el proteoglicano que se formó en los explantes OA quedó marcado con <sup>35</sup>S. Luego, el cultivo se incubó con medio fresco y se trató con IL-1β en presencia o ausencia de CoPP (10 μM). Tras 6 días, se midieron los niveles de glicosaminoglicano radiactivo liberados al medio. Como se muestra en la figura 40A, el inductor de HO-1 redujo significativamente la degradación de matriz inducida por IL-1β y también la degradación basal.

En otra serie de experimentos se procedió a medir el proteoglicano sintetizado por las células del cartílago. Para ello los condrocitos, sembrados en monocapa, fueron estimulados con IL-1β en presencia o ausencia de CoPP y luego tratados con sulfato de <sup>35</sup>S durante 24 horas. En estos experimentos la IL-1β redujo

significativamente la síntesis de glicosaminoglicanos y este efecto se previno con el tratamiento con CoPP, que a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  aumentó la síntesis hasta alcanzar los niveles basales (figura 40B).

**Figura 40.** Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre la degradación de glicosaminoglicanos en explantes OA (A) o de la síntesis de glicosaminoglicanos en condrocitos OA en cultivo primario (B).



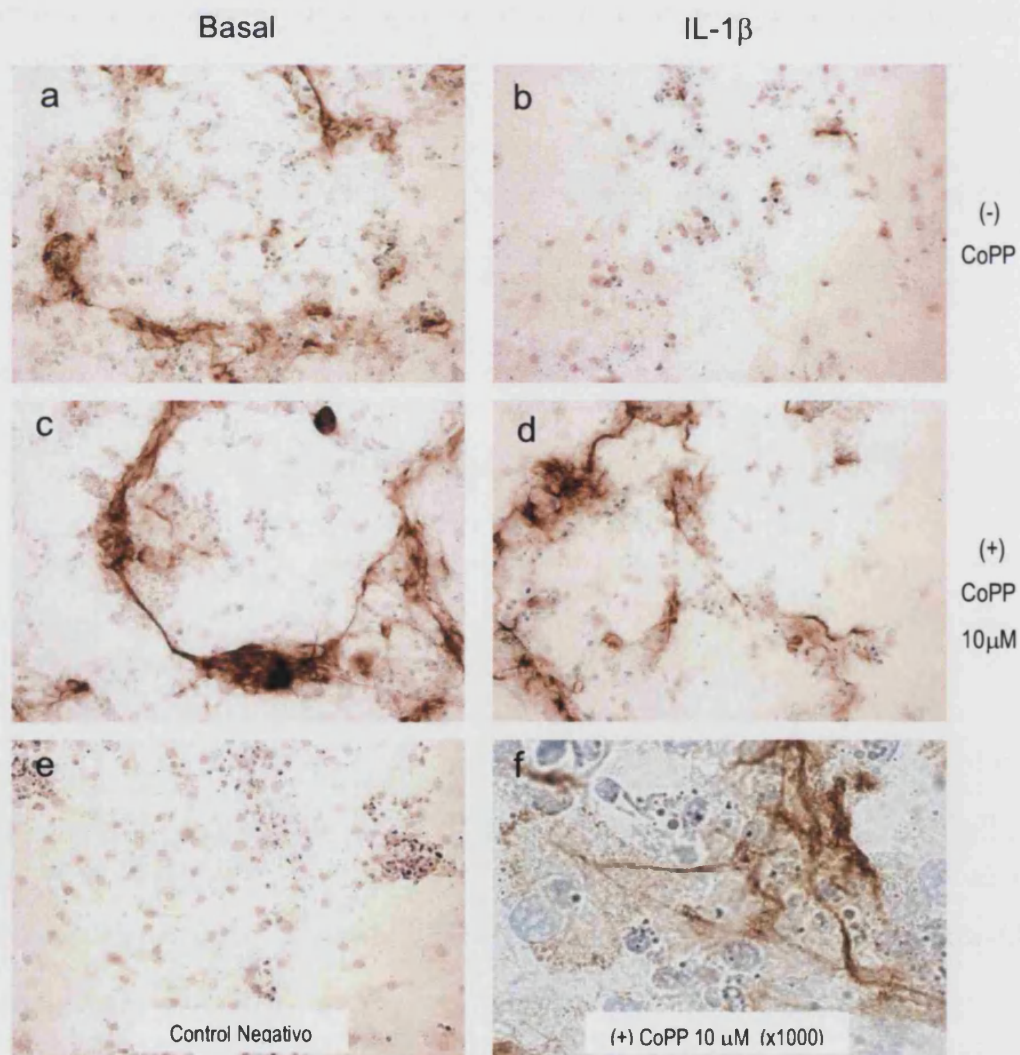
Los explantes o los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) y la degradación o síntesis se midió por procedimientos radiométricos, como se indica en la sección de Material y métodos. Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de cultivos independientes de explantes o células procedentes de 11 donantes diferentes;  $t$  de Dunnett, \*\*  $p < 0,01$ , respecto a las células control estimuladas con IL-1 $\beta$  y \*\*  $p < 0,01$ , respecto a las células no estimuladas (-). IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , CoPP: cobalto protoporfirina IX, (-): células no estimuladas.

En los análisis inmunocitoquímicos realizados para la determinación del efecto de la inducción de HO-1 sobre la expresión de colágeno II (figura 41), se pueden apreciar las fibras de colágeno, de color anaranjado, producidas específicamente por los condrocitos, que constituyen parte de la matriz extracelular del cartílago.

Es conocido que la IL-1 $\beta$  disminuye la producción de colágeno II e incrementa su degradación en el cartílago, lo cual pudimos comprobar en nuestro estudio, ya que la estimulación con IL-1 $\beta$  indujo la pérdida de colágeno II en condrocitos primarios respecto de los condrocitos en condiciones basales, tal y como se aprecia en la figura 41.

Este análisis mostró además que el tratamiento con CoPP incrementaba la expresión de colágeno II en condrocitos no estimulados con IL-1 $\beta$  en comparación con las células en condiciones basales. Finalmente, también se apreció un incremento de colágeno en las células que fueron incubadas con CoPP e IL-1 $\beta$  frente a las células que fueron únicamente estimuladas con la citocina.

**Figura 41.** Análisis inmunocitoquímico de la expresión de colágeno II en condrocitos OA.



Las células fueron incubadas con CoPP (10  $\mu$ M) para inducir HO-1 en presencia o ausencia de IL-1 $\beta$  (100 U/mL) durante 15 días. Los condrocitos se fijaron y trataron con un anticuerpo monoclonal frente al colágeno II humano, como se indica en Material y métodos. IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , CoPP: cobalto protoporfirina IX, (-): células no estimuladas. Aumentos: (a)-(e) x200; (f) x1000.

La capacidad de sintetizar componentes de la matriz extracelular es un rasgo del metabolismo de los condrocitos. Los efectos de la CoPP sobre la expresión de agregano se midieron por ELISA. Nuestros resultados indican que el tratamiento con CoPP fue también capaz de contrarrestar la pérdida de agregano inducida por IL-1 $\beta$ . El tratamiento con esta citocina durante 24 horas redujo el contenido de agregano en los condrocitos, mientras que el tratamiento conjunto de los condrocitos con IL-1 $\beta$  y CoPP equiparó los niveles de agregano a los niveles basales (tabla 6). Así, nuestras investigaciones sugieren que el aumento de la expresión de HO-1 confiere a los condrocitos OA un incremento de resistencia a los efectos deletéreos de la IL-1 $\beta$ .

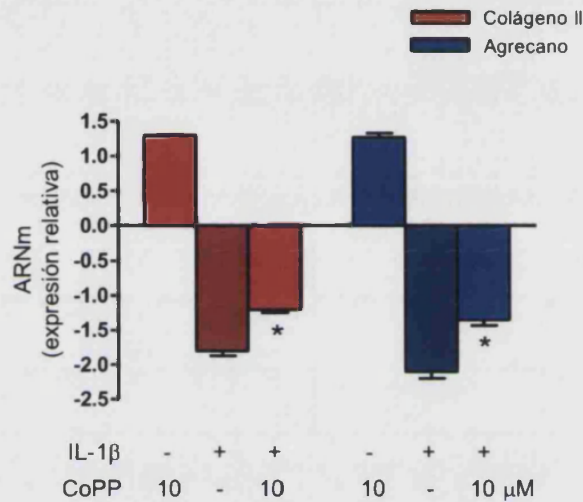
**Tabla 6.** Medida del contenido de agregano en condrocitos OA estimulados por IL-1 $\beta$ .

Tratamiento	Contenido de agregano (ng proteoglicano/mg de proteína)
B	11618 $\pm$ 1664*
IL-1 $\beta$	7699 $\pm$ 567
IL-1 $\beta$ + CoPP 10 $\mu$ M	12063 $\pm$ 522*

Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) durante 24 horas. La cantidad de agregano se midió por ELISA. Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de cultivos independientes de células procedentes de 6 donantes diferentes; *t* de Dunnett, \* *p*<0,05, respecto a las células control estimuladas con IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , CoPP: cobalto protoporfirina IX, B: células no estimuladas.

La influencia de la inducción de HO-1 por CoPP sobre el colágeno II y el agregano también fue estudiada a nivel de ARNm por PCR a tiempo real. La figura 42 muestra como en los condrocitos estimulados con IL-1 $\beta$  se produjo una disminución de la expresión del mensajero de colágeno II y agregano. El tratamiento con CoPP previno en parte el efecto observado en las células estimuladas con la citocina.

**Figura 42.** Efecto de la inducción de HO-1 sobre la expresión de ARNm de colágeno II y agregano en condrocitos OA humanos.

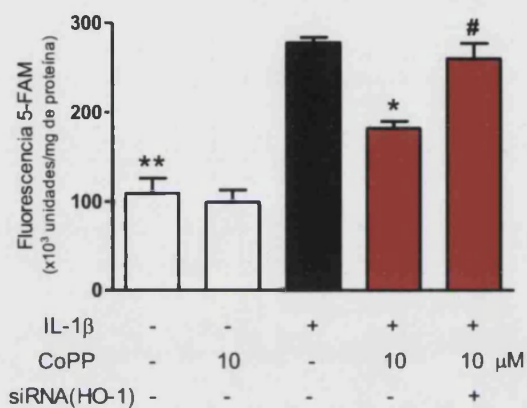


Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1β (100 U/mL) durante 12 horas. La expresión de ARNm fue determinada por PCR a tiempo real. Resultados expresados como media ± ε de cultivos independientes de células procedentes de 6 pacientes; *t* de Dunnett, \* *p*<0,05, respecto a las células control estimuladas con IL-1β. IL-1β: interleucina-1β, CoPP: cobalto protoporfirina IX, (-): células no estimuladas.

### 6.1.3. Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre las enzimas degradativas del cartílago

La IL-1β induce enzimas degradativas en condrocitos. Partiendo de esta premisa, decidimos determinar la influencia del tratamiento con CoPP sobre la actividad MMP evaluada en el medio de cultivo utilizando un péptido fluorescente como sustrato. Como se indica en la figura 43, la IL-1β aumentó la actividad total metaloproteinasas muy significativamente frente a la actividad basal, mientras que la inducción de HO-1 resultó en una disminución considerable de la actividad MMP que fue revertida en presencia del siRNA de HO-1.

Figura 43. Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre la actividad MMP.



Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) durante 24 horas. La actividad MMP se midió en los sobrenadantes utilizando un sustrato fluorescente. La concentración del siRNA de HO-1 fue de 100 nM. Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de cultivos independientes de células procedentes de 5 donantes diferentes; *t* de Dunnett, \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ , respecto a las células control estimuladas con IL-1 $\beta$  y #  $p < 0,05$ , respecto a IL-1 $\beta$  + CoPP. IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , CoPP: cobalto protoporfirina IX, siRNA (HO-1): ARN de interferencia para HO-1, (-): células no estimuladas.

A continuación, procedimos a estudiar por ELISA la expresión específica de algunas metaloproteinasas implicadas en el catabolismo de la matriz extracelular. La estimulación con IL-1 $\beta$  elevó significativamente los niveles de las metaloproteinasas: pro-MMP-1, MMP-3 total, MMP-10 total y pro-MMP-13 (figura 44).

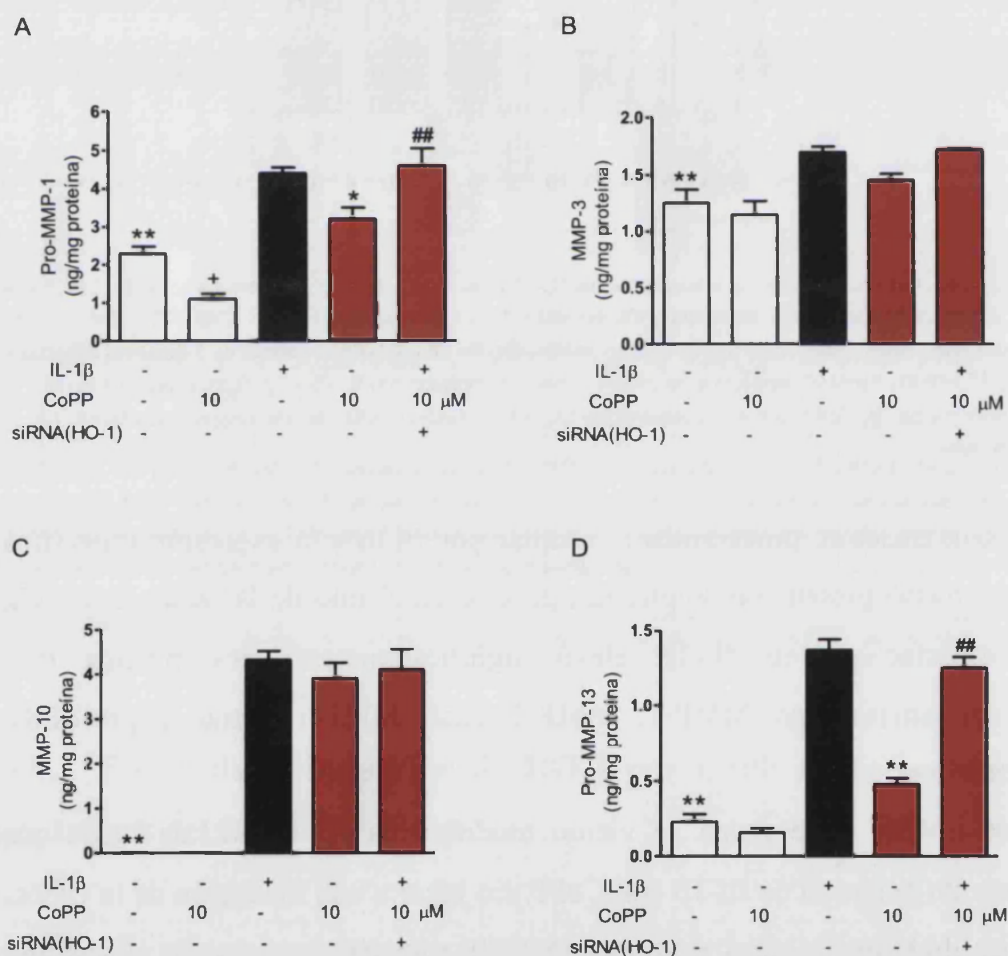
Los niveles de proteína se vieron modificados por CoPP, de modo que el tratamiento conjunto de IL-1 $\beta$  con CoPP dio lugar a una reducción de la expresión proteica de la pro-MMP-1 y la pro-MMP-13, mientras los cambios en los niveles de MMP-3 y de MMP-10 totales no fueron significativos. Se observó que el tratamiento con siRNA de HO-1 previno los efectos de la CoPP.

En nuestras condiciones de experimentación, se midió la actividad agrecanasa por ELISA en sobrenadantes (ver sección 4.3.12. de Material y métodos). En esta ocasión, la CoPP no logró reducir los niveles de actividad agrecanasa ni en condiciones basales ni tras la estimulación con IL-1 $\beta$ . Los condrocitos fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) durante 24 horas en ausencia o presencia de CoPP y los resultados, medidos como concentraciones de péptidos-ARGSVIL y



expresados como media de 3 experimentos independientes  $\pm \epsilon$ , fueron:  $82,1 \pm 9,3$  nM (células no estimuladas),  $85,0 \pm 9,5$  nM (CoPP 10  $\mu$ M),  $134,2 \pm 8,2$  nM (IL-1 $\beta$ ) y  $140,1 \pm 12,9$  nM (IL-1 $\beta$  + CoPP 10  $\mu$ M).

**Figura 44.** Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre los niveles de proteína de MMP en condrocitos OA humanos.

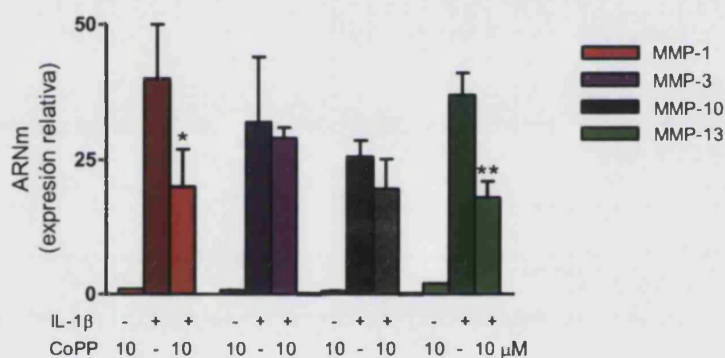


Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) durante 24 horas. La concentración del siRNA de HO-1 fue de 100 nM. Los niveles de proteína de pro-MMP-1, MMP-3 total, MMP-10 total y pro-MMP-13 se midieron por ELISA. Resultados expresados como media  $\pm \epsilon$  de cultivos independientes de células procedentes de 9 donantes diferentes;  $t$  de Dunnett, \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ , respecto a las células control estimuladas con IL-1 $\beta$ , +  $p < 0,05$ , respecto a las células no estimuladas (-) y ##  $p < 0,01$ , respecto a IL-1 $\beta$  + CoPP. IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , CoPP: cobalto protoporfirina IX, siRNA (HO-1): ARN de interferencia para HO-1, (-): células no estimuladas.

Estos efectos se correlacionan con la modificación de los niveles de mensajero. La expresión de ARNm de MMP-1, MMP-3, MMP-10 y MMP-13 se midió por

PCR cuantitativa a tiempo real. En este ensayo la CoPP sólo redujo significativamente los niveles relativos de ARNm de MMP-1 y MMP-13 inducidos por IL-1 $\beta$  en condrocitos OA (figura 45).

Figura 45. Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre la expresión de ARNm.

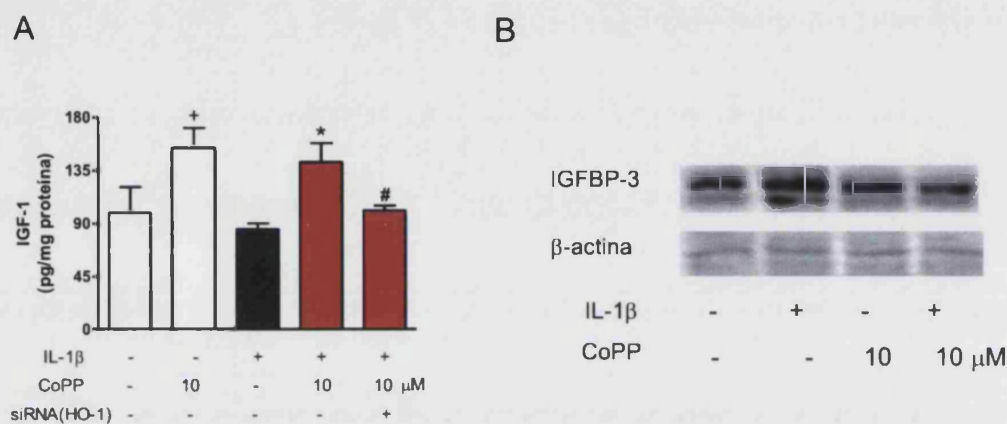


Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) durante 12 horas. La expresión de ARNm fue determinada por PCR a tiempo real. Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de cultivos independientes de células procedentes de 5 donantes diferentes; *t* de Dunnett, \*\* *p* < 0,01; \* *p* < 0,05, respecto a las células control estimuladas con IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , CoPP: cobalto protoporfirina IX.

#### 6.1.4. Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre la producción de IGF-1

Para determinar si la inducción de HO-1 puede también modificar factores anabólicos que disminuyen por la acción de la IL-1 $\beta$  en condrocitos OA, examinamos la producción de IGF-1. El tratamiento con IL-1 $\beta$  de los condrocitos OA disminuyó los niveles del IGF-1 liberado al medio y medido por ELISA (figura 46A), mientras que el tratamiento con CoPP aumentó significativamente la liberación de IGF-1, tanto la CoPP sola frente a los basales, como la mezcla de CoPP con IL-1 $\beta$  frente a la IL-1 $\beta$ . Es interesante destacar que en las células tratadas con el siRNA de HO-1, la CoPP no modificó significativamente los niveles de IGF-1.

**Figura 46.** Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre los niveles de proteína de IGF-1 (A) y sobre la expresión proteica de IGFBP-3 (B) en condrocitos OA humanos.



Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) durante 24 horas. La concentración del siRNA de HO-1 fue de 100 nM. El IGF-1 se midió en los sobrenadantes por ELISA (A) y la expresión de IGFBP-3 en la fracción celular fue analizada por Western blot (B). Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de cultivos independientes de células procedentes de 9 donantes diferentes; *t* de Dunnett, \*  $p < 0,05$ , respecto a las células control estimuladas con IL-1 $\beta$ ,  $^{\wedge}$   $p < 0,05$ , respecto a las células no estimuladas (-) y #  $p < 0,05$ , respecto a IL-1 $\beta$  + CoPP (A). Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes con células procedentes de tres pacientes (B). IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , CoPP: cobalto protoporfirina IX, siRNA (HO-1): ARN de interferencia para HO-1, (-): células no estimuladas.

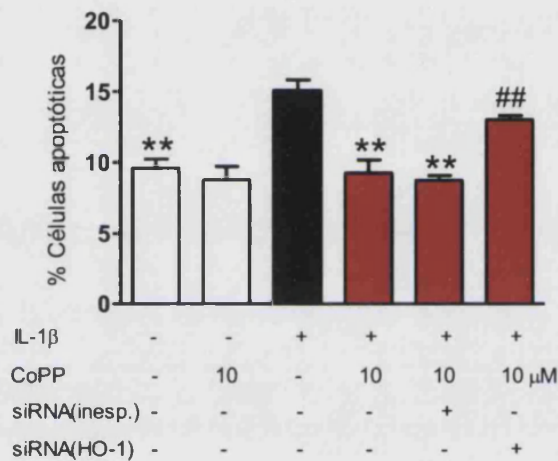
Además estudiamos la expresión proteica de IGFBP-3, un regulador principal de la actividad IGF-1 en condrocitos humanos (Im y cols., 2003; Olney y cols., 1996). Los análisis por Western blot indicaron que el tratamiento con CoPP fue capaz de reducir la expresión del IGFBP-3 en condrocitos OA estimulados con IL-1 $\beta$  (figura 46B).

### 6.1.5. Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre la apoptosis

Determinamos si la inducción de HO-1 por CoPP era capaz de controlar la apoptosis, un factor importante en la evolución de la OA (Heraud y cols., 2000). La figura 47 muestra como la IL-1 $\beta$  indujo apoptosis débilmente, medida por LSC (anexina V-FITC) y el tratamiento con CoPP redujo significativamente la apoptosis hasta niveles basales. Nuestros resultados sugieren que los efectos de la CoPP sobre

la apoptosis son específicos, ya que en células tratadas con el siRNA de HO-1, el CoPP fracasó al intentar modificar este proceso.

**Figura 47.** Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre la apoptosis medida por citometría láser en condrocitos OA humanos.



Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1β (100 U/mL) durante 24 horas. La concentración de los siRNA fue de 100 nM. La apoptosis se midió por LSC. Resultados expresados como media ± ε de cultivos independientes de células procedentes de 6 donantes diferentes; *t* de Dunnett, \*\*  $p < 0,01$ , respecto a las células control estimuladas con IL-1β y  $^{###} p < 0,01$ , respecto a IL-1β + CoPP. IL-1β: interleucina-1β, CoPP: cobalto protoporfirina IX, siRNA (HO-1): ARN de interferencia para HO-1, siRNA (inesp.): ARN de interferencia inespecífico, (-): células no estimuladas.

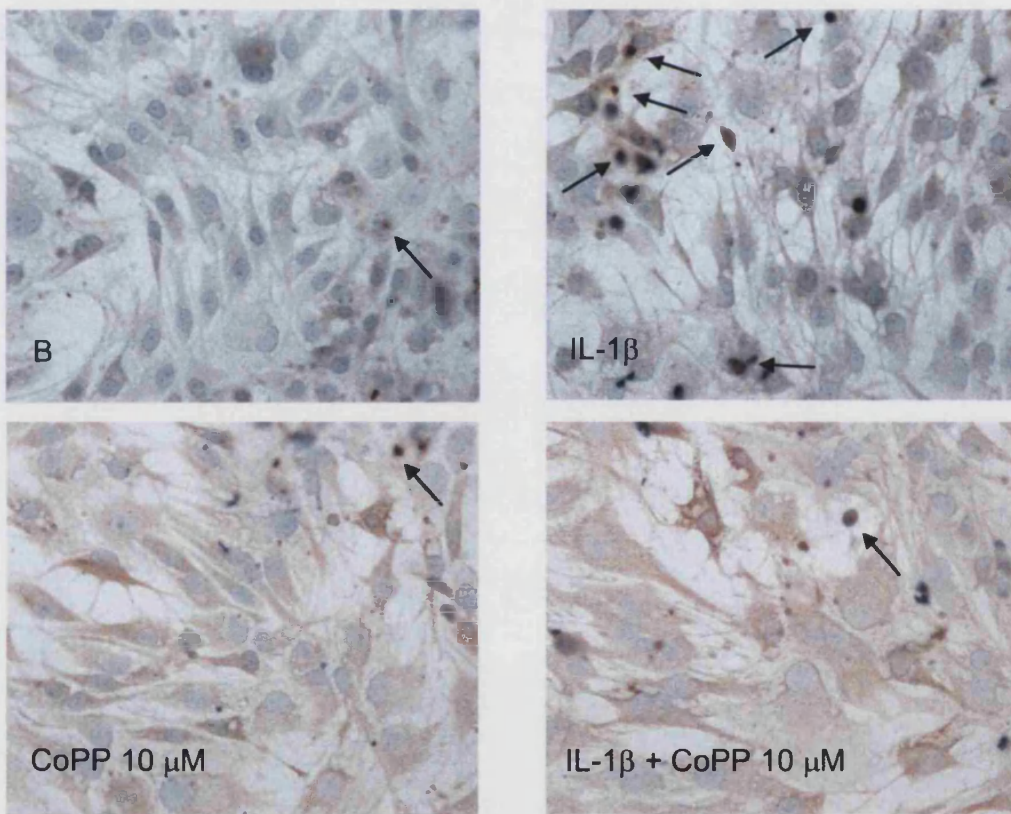
Experimentos adicionales usando el método TUNEL (figura 48) confirmaron los efectos beneficiosos del tratamiento con CoPP sobre la apoptosis de los condrocitos en presencia de IL-1β, aunque el nivel de apoptosis inducida por esta citocina fue un poco más alto en este ensayo y la CoPP disminuyó el porcentaje de células apoptóticas en células estimuladas con IL-1β (ver tabla insertada en la figura 48).

#### 6.1.6. Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre el estrés oxidativo

Dado que muchos de los efectos de la IL-1β sobre el metabolismo de los condrocitos son mediados por la generación de especies reactivas de oxígeno

(ROS), quisimos determinar si la producción de estrés oxidativo podría modificarse por la inducción de HO-1. La estimulación de los condrocitos por esta citocina resultó en un nivel significativo de generación de ROS como se aprecia en la figura 49. Debido al efecto antioxidante de la inducción de HO-1, el estrés oxidativo disminuyó significativamente en células tratadas con CoPP.

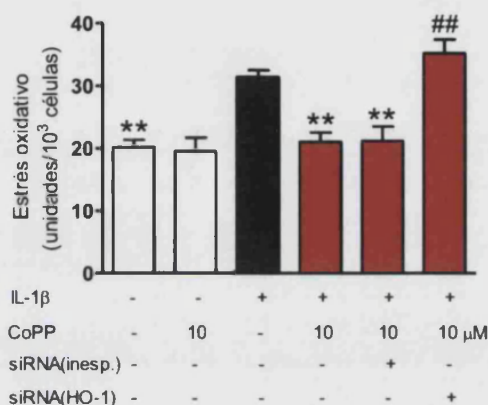
**Figura 48.** Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre la apoptosis medida por ensayo TUNEL en condrocitos OA humanos.



Tratamiento	Células apoptóticas (%)
B	11,4 ± 2,3*
IL-1β	21,2 ± 5,3
CoPP 10 μM	6,2 ± 2,2
IL-1β + CoPP 10 μM	12,0 ± 2,9*

Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1β (100 U/mL) durante 24 horas. La apoptosis se midió por el método TUNEL. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes con células procedentes de tres pacientes. Los resultados de la tabla están expresados como media ±  $\epsilon$ ; *t* de Dunnett, \*  $p < 0,05$ , respecto a las células control estimuladas con IL-1β. IL-1β: interleucina-1β, CoPP: cobalto protoporfirina IX, B: células no estimuladas. Aumento: x400.

**Figura 49.** Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre el estrés oxidativo en condrocitos OA humanos.



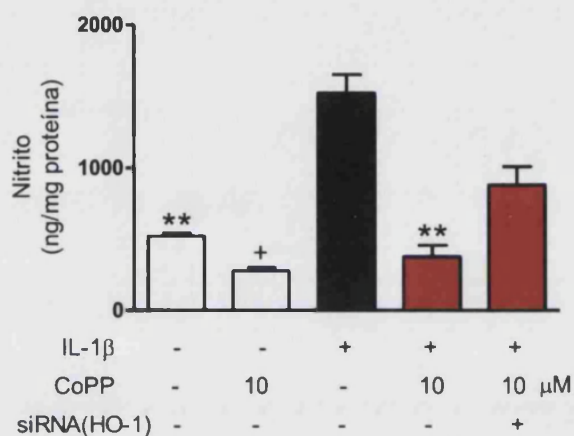
Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) durante 24 horas. La concentración de los siRNA fue de 100 nM. El estrés oxidativo se midió por LSC usando dihidrorrodamina 123. Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de cultivos independientes de células procedentes de 8 donantes diferentes; *t* de Dunnett, \*\* *p* < 0,01, respecto a las células control estimuladas con IL-1 $\beta$  y ## *p* < 0,01, respecto a IL-1 $\beta$  + CoPP. IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , CoPP: cobalto protoporfirina IX, siRNA (HO-1): ARN de interferencia para HO-1, siRNA (inesp.): ARN de interferencia inespecífico, (-): células no estimuladas.

El efecto de la inducción de HO-1 se confirmó en experimentos en los que se utilizó un siRNA específico para HO-1, ya que este agente previno la regulación a la baja de la producción de ROS provocada por el tratamiento con CoPP. El siRNA inespecífico, utilizado como control negativo del siRNA específico de HO-1, no revirtió el efecto de la CoPP + IL-1 $\beta$ , tal y como cabía esperar.

### 6.1.7. Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre la producción de NO y PGE<sub>2</sub>

La estimulación de los condrocitos OA durante 24 horas con la citocina IL-1 $\beta$  disparó la producción de dos mediadores inflamatorios como el NO y la PGE<sub>2</sub>, tal y como se muestra en las figuras 50 y 51. La CoPP redujo significativamente los niveles de NO medido como nitrito en células estimuladas con citocina.

**Figura 50.** Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre los niveles de NO en condrocitos OA humanos.



Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1β (100 U/mL) durante 24 horas. El NO fue medido como nitrito por una técnica fluorimétrica. Resultados expresados como media ± ε de cultivos independientes de células procedentes de 5 donantes diferentes; *t* de Dunnett, \*\*  $p < 0,01$ , respecto a las células control estimuladas con IL-1β y  $p < 0,05$ , respecto a las células no estimuladas (-). IL-1β: interleucina-1β, CoPP: cobalto protoporfirina IX, siRNA (HO-1): ARN de interferencia para HO-1, (-): células no estimuladas.

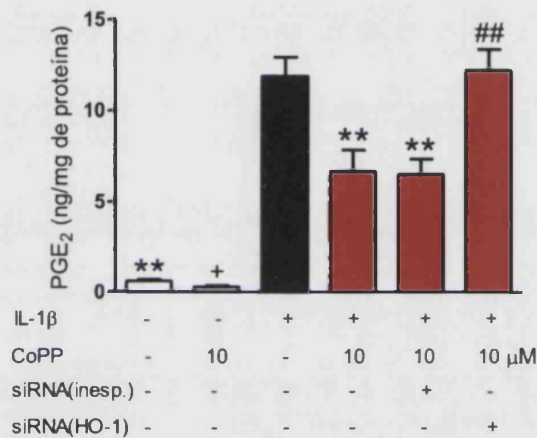
Sin embargo el ARN de interferencia específico para HO-1 no logró revertir estos efectos inhibitorios de la CoPP, lo cual podría indicar que esta reducción del nitrito podría no deberse a la inducción de HO-1 sino a alguna acción inespecífica de la porfirina (figura 50). Por lo tanto, no podemos atribuir la disminución en la producción de nitrito a la acción de la enzima HO-1.

Como resultado de la inducción conjunta de COX-2 y de mPGES-1, la IL-1β incrementó considerablemente los niveles de PGE<sub>2</sub> tras la estimulación de los condrocitos con esta citocina durante 24 horas. Esta sobreproducción de PGE<sub>2</sub> se vio reducida muy significativamente en células en las que se indujo la expresión de HO-1 con CoPP a 10 μM a la vez que eran estimuladas con IL-1β, como vemos en la figura 51.

Para confirmar que los efectos de la CoPP eran debidos a la inducción de HO-1 y no a otros posibles efectos inespecíficos de la mencionada porfirina, se utilizó un siRNA específico para HO-1 humana. Como consecuencia de esta capacidad de silenciar la expresión de HO-1, el tratamiento con el primer siRNA revirtió los efectos inhibitorios de la CoPP sobre la PGE<sub>2</sub>, de forma que los niveles de este

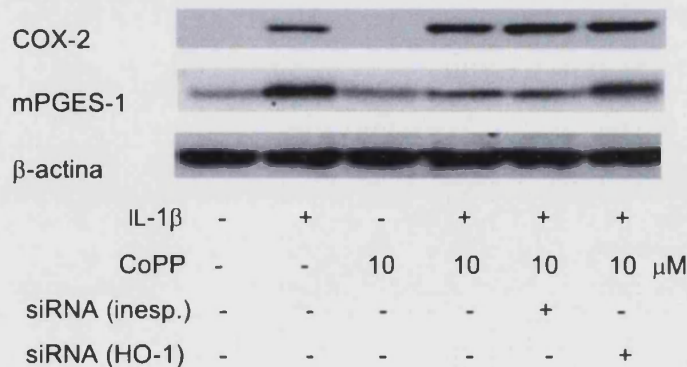
prostanoides fueron semejantes a los alcanzados por las células estimuladas con IL-1 $\beta$  (figura 51).

**Figura 51.** Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre los niveles de PGE<sub>2</sub> en condrocitos OA humanos.



Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) durante 24 horas. La concentración de los siRNA fue de 100 nM. La PGE<sub>2</sub> fue medida por RIA. Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de cultivos independientes de células procedentes de 15 donantes diferentes; *t* de Dunnett, \*\* *p*<0,01, respecto a las células control estimuladas con IL-1 $\beta$ , + *p*<0,05, respecto a las células no estimuladas (-) y ## *p*<0,01, respecto a IL-1 $\beta$  + CoPP. IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , CoPP: cobalto protoporfirina IX, siRNA (HO-1): ARN de interferencia para HO-1, siRNA (inesp.): ARN de interferencia inespecífico, (-): células no estimuladas.

**Figura 52.** Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre la expresión proteica de COX-2 y mPGES-1 en condrocitos OA humanos.



Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) durante 24 horas. La concentración de los siRNA fue de 100 nM. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes con células procedentes de tres pacientes. IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , CoPP: cobalto protoporfirina IX, siRNA (HO-1): ARN de interferencia para HO-1, siRNA (inesp.): ARN de interferencia inespecífico, (-): células no estimuladas.



A continuación, se procedió a examinar si los efectos de la inducción de HO-1 sobre la PGE<sub>2</sub> eran consecuencia de una reducción en la expresión de COX-2 o mPGES-1. Como se muestra en la figura 52, tras 24 horas de estimulación la IL-1β indujo la expresión de COX-2 y mPGES-1 en condrocitos OA. El tratamiento de CoPP más IL-1β redujo la expresión de la proteína mPGES-1, en comparación con las células control estimuladas con IL-1β. El siRNA de HO-1 tendió a revertir ese efecto. Por el contrario, la expresión de COX-2 no fue modificada significativamente por CoPP. La capacidad de la CoPP de reducir la expresión de la mPGES-1 fue también observada a nivel de ARNm medido por PCR a tiempo real.

Como se aprecia en la tabla 8, el tratamiento de los condrocitos primarios con IL-1β y CoPP 10 μM no redujo en absoluto los niveles de mensajero de la enzima COX-2 frente las células estimuladas únicamente con la citocina inflamatoria. Sin embargo, la CoPP sí fue capaz de reducir significativamente la expresión relativa del ARNm de la mPGES-1, siendo coincidente este efecto con el observado en la expresión proteica.

Estos resultados, tomados en conjunto, parecen indicar que la inhibición de la producción de PGE<sub>2</sub> por parte de la CoPP podría deberse casi en su totalidad a su efecto sobre la expresión de la enzima mPGES-1.

**Tabla 8.** Expresión génica relativa en condrocitos OA estimulados con IL-1β.

Tratamiento	HO-1	COX-2	mPGES-1
IL-1β	-1,1 ± 1,5	20,9 ± 2,7	21,8 ± 0,6
IL-1β + CoPP 10 μM	4,9 ± 0,3*	21,7 ± 1,7	15,7 ± 0,7*

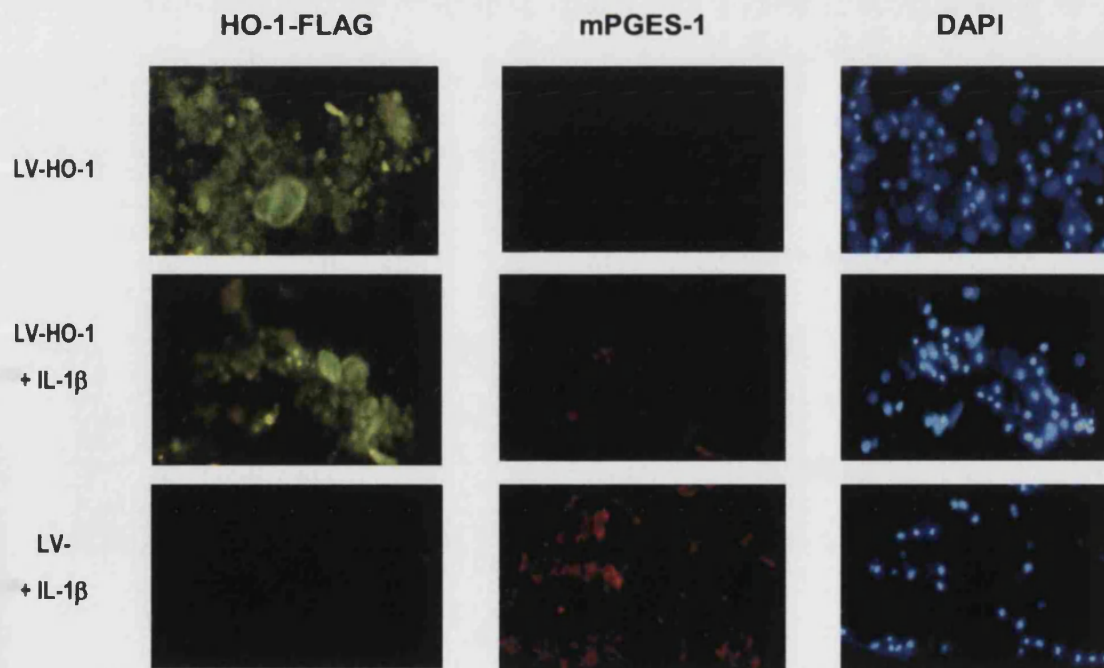
Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1β (100 U/mL) durante 12 horas. La expresión de ARNm fue determinada por PCR a tiempo real. Resultados expresados como media de la expresión relativa (número de veces de cambio) ± ε de cultivos independientes de células procedentes de 5 donantes diferentes; t de Dunnett, \* p<0,05, respecto a las células control estimuladas con IL-1β. IL-1β: interleucina-1β, CoPP: cobalto protoporfirina IX.

Para confirmar que el incremento en la expresión de HO-1 tiene como resultado una reducción de la expresión de mPGES-1, se llevó a cabo un cultivo de condrocitos primarios OA en tres dimensiones. Para conseguir un cultivo de tales características, las células se sembraron en lecho de alginato, un polímero de

consistencia sólida en el cual las células se mantuvieron embebidas durante todo el experimento. Las células, en estas condiciones, conservaron una forma aproximadamente esférica y la totalidad de la superficie celular expuesta. El cultivo en tres dimensiones fue transducido con un vector lentiviral de HO-1 (LV-HO-1) y un vector sin plásmido o vector vacío (LV-), y se procedió a estimular con IL-1 $\beta$  (ver sección de Material y métodos).

Los análisis inmunocitoquímicos posteriores se llevaron a cabo utilizando dos anticuerpos fluorescentes específicos: anti-FLAG con fluorescencia verde, que detecta HO-1 procedente del vector LV-HO-1 y anti-mPGES-1 con fluorescencia roja. Los núcleos quedaron teñidos de azul por DAPI.

**Figura 53.** Efecto de la HO-1, por transducción de LV-HO-1, sobre la proteína mPGES-1 en condrocitos OA humanos.



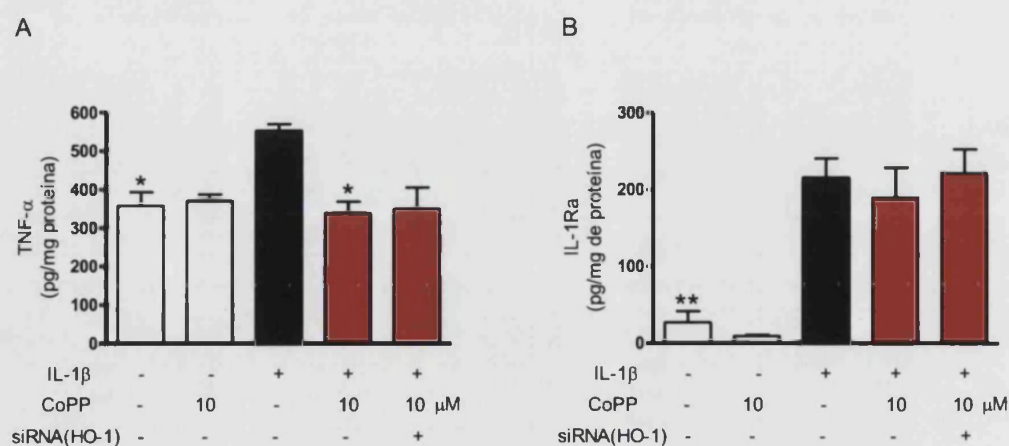
Los cultivos tridimensionales de condrocitos OA primarios en alginato fueron transducidos con un vector lentiviral de HO-1 LV-HO-1 o con el vector vacío LV-. La expresión de mPGES-1 se indujo por estimulación con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) durante 24 horas y la expresión de HO-1 y mPGES-1 fue determinada por inmunofluorescencia. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. Las micrografías fluorescentes son representativas de tres experimentos independientes. IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , LV-HO-1: lentivirus de HO-1, LV-: lentivirus vacío. Aumento: x200.

La figura 53 muestra cómo la mPGES-1 fue fuertemente inducida por IL-1 $\beta$  en células transducidas con el vector vacío LV-. Por el contrario, en células transducidas con el vector LV-HO-1, la mPGES-1 fue apenas detectable tras la estimulación con IL-1 $\beta$ .

### 6.1.8. Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre la producción de TNF- $\alpha$ e IL-1Ra

La estimulación de los condrocitos primarios OA con IL-1 $\beta$  durante 24 horas tuvo como consecuencia la generación de niveles elevados un mediador inflamatorio como el TNF- $\alpha$  y de IL-1Ra (figura 54). La inhibición de la producción de TNF- $\alpha$  por CoPP fue débil y el siRNA de HO-1 no revirtió este efecto. Por tanto, no debemos considerar este resultado, al no poder asegurar que los efectos de la CoPP sobre este mediador se deban a la inducción de HO-1.

**Figura 54.** Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre la producción de TNF- $\alpha$  (A) y de IL-1Ra (B) en condrocitos osteoartríticos humanos.



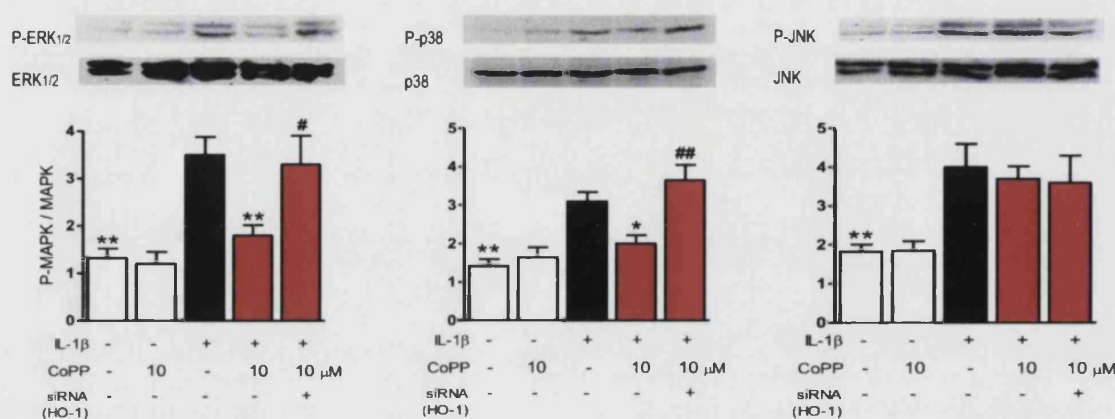
Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) durante 24 horas. Los niveles de proteína de TNF- $\alpha$  e IL-1Ra se midieron en los sobrenadantes por ELISA. Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de cultivos independientes de células procedentes de 10 donantes diferentes; *t* de Dunnett, \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ , respecto a las células control estimuladas con IL-1 $\beta$ , +  $p < 0,05$ , respecto a las células no estimuladas (-). IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , CoPP: cobalto protoporfirina IX, siRNA (HO-1): ARN de interferencia para HO-1, (-): células no estimuladas

Los condrocitos estimulados con citocina experimentaron un incremento en la producción de IL-1Ra muy significativo, si los comparamos con los niveles basales de las células no estimuladas. No obstante, la CoPP no modificó significativamente los niveles de IL-1Ra (figura 54B).

### 6.1.9. Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre la activación de las enzimas MAPK

Las citocinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$  activan la señalización de las MAPK, con un papel para p38 y ERK1/2 en las actividades anabólicas y catabólicas en condrocitos articulares humanos (Fan y cols., 2007; Fan y cols., 2006). La posible modificación de esta vía por la inducción de HO-1 fue analizada por Western blot. Como se muestra en la figura 55, la inducción de HO-1 por CoPP inhibió la fosforilación de ERK1/2 en condrocitos primarios estimulados con IL-1 $\beta$ . Este efecto se revirtió con la incubación de los condrocitos con un siRNA específico de HO-1 humana.

**Figura 55.** Efecto de la inducción de HO-1 sobre la fosforilación de MAPK en condrocitos osteoartríticos humanos.



Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) durante 15 minutos. La expresión de las formas fosforilada y total de ERK1/2, p38 y JNK en la fracción celular fue analizada por Western blot. La expresión relativa de las bandas de proteína fosforilada y total fue calculada tras análisis densitométricos, se calculó la razón entre la proteína fosforilada y la total y los resultados se expresaron como media  $\pm$   $\epsilon$ . Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes con células procedentes de tres pacientes; *t* de Dunnett, \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ , respecto a las células control estimuladas y <sup>###</sup>  $p < 0,01$ ; #  $p < 0,05$ , respecto a IL-1 $\beta$  + CoPP. IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , CoPP: cobalto protoporfirina IX, siRNA (HO-1): ARN de interferencia para HO-1, (-): células no estimuladas.

Además se observó un débil descenso de la fosforilación de p38 para la combinación CoPP más IL-1 $\beta$  frente a la IL-1 $\beta$  sola, también prevenido por la incubación previa de las células con el ARN de interferencia de HO-1. El inductor de HO-1 no tuvo efectos significativos en la fosforilación de JNK.

#### **6.1.10. Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre la activación de factores de transcripción**

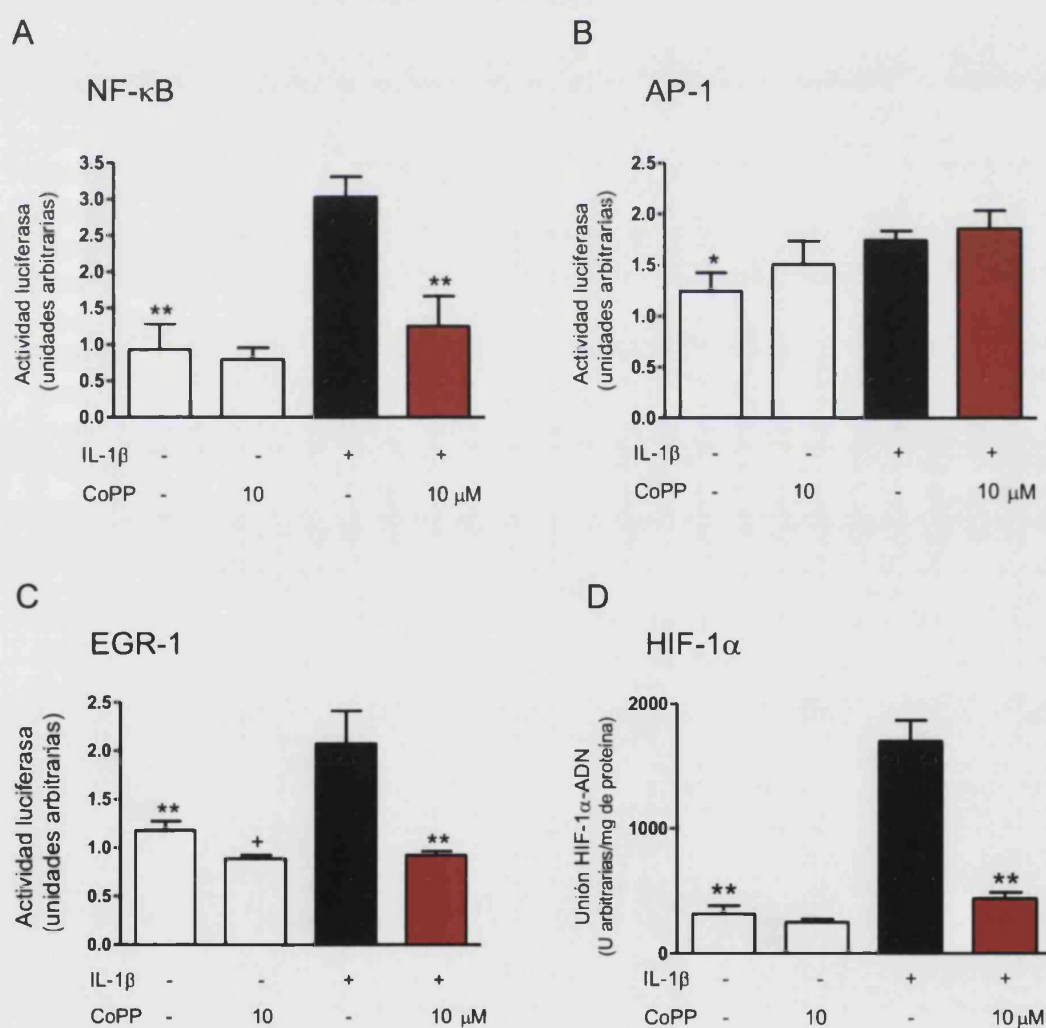
Debido a que el NF- $\kappa$ B es el principal regulador de los genes proinflamatorios, analizamos la contribución de este factor de transcripción a los efectos de la CoPP. Para analizar los efectos de la CoPP sobre la actividad de factores como el NF- $\kappa$ B, se transfectó de manera transitoria el plásmido del factor de transcripción conjugado con enzima luciferasa en los condrocitos OA (ver sección de Material y métodos). También se realizaron experimentos similares utilizando plásmidos de AP-1 luciferasa y EGR-1 luciferasa.

Como se muestra en la figura 56A, la IL-1 $\beta$  activó el NF- $\kappa$ B en condrocitos OA. Aunque el tratamiento de las células con CoPP no modificó los niveles basales de actividad luciferasa, sí redujo significativamente la activación de este factor de transcripción en presencia de IL-1 $\beta$ . Sin embargo, la activación de AP-1, otro factor de transcripción implicado en la expresión de genes proinflamatorios (Liacini y cols., 2002), no se vio influenciada por la CoPP (figura 56B).

Ya que el EGR-1 es un factor de transcripción implicado en regular la expresión de la enzima mPGES-1 (Cheng y cols., 2004), investigamos los efectos del tratamiento con CoPP sobre la activación del EGR-1. Cuando la IL-1 $\beta$  fue incubada con los condrocitos, la actividad EGR-1 se vio significativamente incrementada. Es interesante destacar que el tratamiento de los condrocitos con CoPP condujo a una reducción significativa de la activación del promotor EGR-1-luc en células estimuladas con IL-1 $\beta$  y también en células no estimuladas (figura 56C).

Finalmente, se midió la activación del factor HIF-1 $\alpha$  por la unión a su secuencia consenso por ELISA. La activación de HIF-1 $\alpha$  está relacionada con la expresión aumentada de mPGES-1 en condrocitos OA, pudiendo ser este factor de gran importancia en el metabolismo del cartílago en esta patología (Grimmer y cols., 2007).

**Figura 56.** Efecto de la inducción de HO-1 por CoPP sobre la activación de NF- $\kappa$ B (A), AP-1 (B), EGR-1 (C) y HIF-1 $\alpha$  (D) en condrocitos OA humanos.



Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) durante 24 horas (A-C) y 1 hora (D). La actividad de NF- $\kappa$ B, AP-1 y EGR-1 (A-C) se midió por transfección de los respectivos constructos testigo como se indica en la sección de Material y métodos. La actividad luciferasa se normalizó con la actividad luciferasa Renilla. La unión del HIF-1 $\alpha$  al oligonucleótido consenso fue medida en extractos nucleares por ELISA (D). Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de cultivos independientes de células procedentes de 6 donantes diferentes;  $t$  de Dunnett, \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ , respecto a las células control estimuladas con IL-1 $\beta$  y +  $p < 0,05$ , respecto a las células no estimuladas (-). IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , CoPP: cobalto protoporfirina IX, (-): células no estimuladas.

*Resultados en condrocitos osteoartríticos*

---

En la figura 56D se aprecia cómo la estimulación con IL-1 $\beta$  durante 24 horas produjo un gran aumento de la activación de HIF-1 $\alpha$ . El tratamiento con CoPP a 10  $\mu$ M disminuyó muy significativamente esta activación hasta alcanzar prácticamente los niveles de unión de las células no estimuladas.

## **6.2. EFECTOS DE LA MOLÉCULA LIBERADORA DE CO CORM-2 SOBRE EL METABOLISMO DEL CONDROCITO OSTEOARTRÍTICO**

El monóxido de carbono (CO) es uno de los metabolitos de la actividad HO-1 junto con la biliverdina y el hierro. Por este motivo, las moléculas liberadoras de monóxido de carbono o CORM mimetizan parte de los efectos del metabolismo de la enzima HO-1.

En la siguiente serie de experimentos, se trabajó con cultivo primario de condrocitos humanos y explantes OA, utilizando IL-1 $\beta$  como estímulo y la molécula dadora de CO CORM-2. De esta forma, se estudiaron los efectos de dicha molécula en el metabolismo del condrocito y en los procesos inflamatorios de la OA.

### **6.2.1. Efecto del CORM-2 sobre la degradación y síntesis de la matriz extracelular**

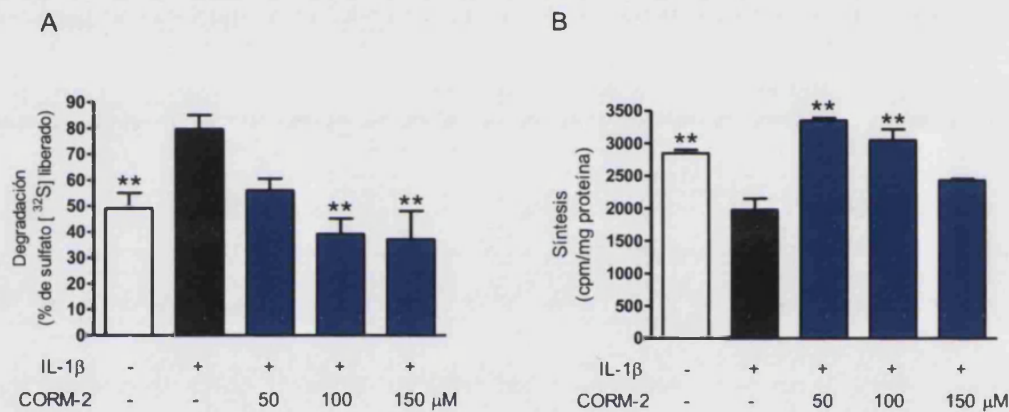
Inicialmente, examinamos si la liberación de CO debida a la actividad del CORM-2 se traducía en efectos protectores sobre el cartílago. Para valorar la magnitud de los procesos enzimáticos de degradación en el cartílago, realizamos experimentos de degradación en explantes de cartílago OA (para ver el protocolo acudir a la sección de Material y métodos). El tratamiento con IL-1 $\beta$  en explantes de cartílago indujo la degradación de la matriz, que fue medida como liberación de glicosaminoglicanos. La figura 57A muestra cómo el tratamiento con CORM-2 a las concentraciones de 100 ó 150  $\mu$ M redujo los efectos de la IL-1 $\beta$  sobre la liberación de glicosaminoglicanos.

Posteriormente quisimos determinar si el tratamiento con CORM-2 resultaba en una interacción con los procesos anabólicos en condrocitos, mediante un ensayo de síntesis. La síntesis de agregano basal fue investigada estudiando la incorporación de Na<sub>2</sub><sup>35</sup>SO<sub>4</sub> en condrocitos. La síntesis basal de agregano en condrocitos OA se



redujo significativamente por IL-1 $\beta$  (figura 57B). El CORM-2 a las concentraciones de 50 y 100  $\mu$ M contrarrestó significativamente el descenso de la síntesis de glicosaminoglicanos producido por esta citocina.

**Figura 57.** Efecto del CORM-2 sobre la degradación de glicosaminoglicanos en explantes OA (A) o de la síntesis de glicosaminoglicanos en condrocitos OA en cultivo primario (B).

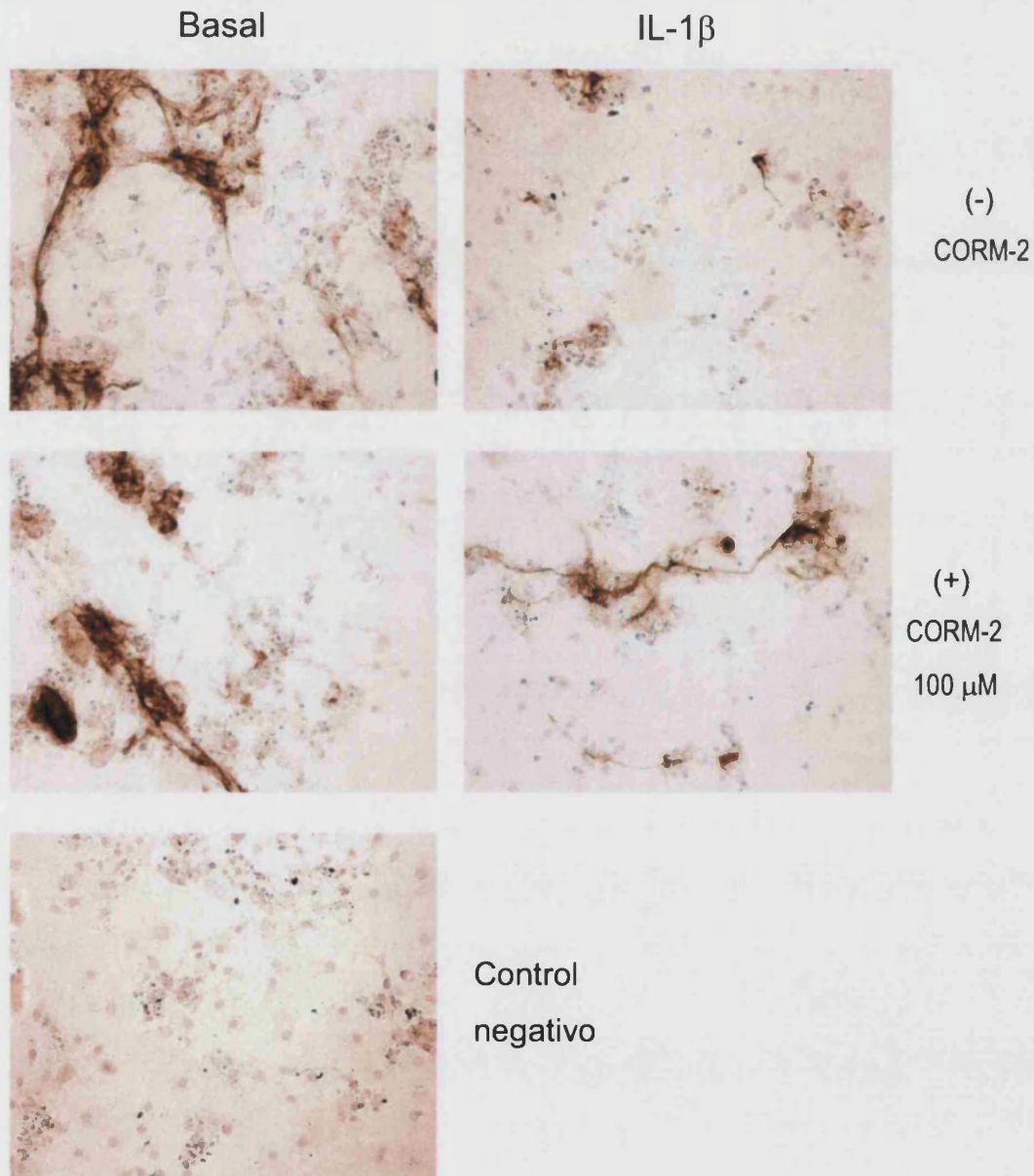


Los explantes o los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) y la degradación o síntesis se midió por procedimientos radiométricos, como se indica en la sección de Material y métodos. Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de cultivos independientes de explantes o células procedentes de 3 donantes diferentes;  $t$  de Dunnett, \*\*  $p < 0,01$ , respecto a las células control estimuladas. IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , CORM-2: dímero tricarbonildiclororrutenio (II), (-): células no estimuladas.

Para evaluar la influencia del CORM-2 en el colágeno II, llevamos a cabo análisis inmunocitoquímicos. La figura 58 muestra que los condrocitos OA en cultivo exhiben un alto nivel de expresión de colágeno II, con la presencia de múltiples fibras de esta estructura que aparecen teñidas de color anaranjado e interconectan a las células.

En contraste, la estimulación con IL-1 $\beta$  tiene como resultado una reducción importante de esta proteína respecto de las incubaciones basales. Es interesante resaltar que el tratamiento con CORM-2 a 100  $\mu$ M mantuvo la expresión de este componente de la matriz extracelular en condiciones basales y restauró la expresión de colágeno II en condrocitos estimulados con IL-1 $\beta$ .

**Figura 58.** Análisis inmunocitoquímico de los efectos del CORM-2 sobre la expresión de colágeno II en condrocitos OA.



Las células fueron incubadas con CORM-2 en presencia o ausencia de IL-1 $\beta$  (100 U/mL) durante 15 días. Los condrocitos se fijaron y trataron con un anticuerpo monoclonal frente al colágeno II humano, como se indica en Material y métodos. IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , CORM-2: dimero tricarbonildiclororrutenio (II), (-): células no estimuladas. Aumento: x200.

Además, el CORM-2 aumentó el contenido de agregano en células estimuladas con citocina, como se muestra en la tabla 9. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que el CORM-2 bloquea los efectos de la IL-1 $\beta$  en condrocitos primarios mediante la regulación de diversas enzimas de degradación de matriz, previniendo así el daño en el cartílago.

Tabla 9. Medida del contenido de agregano en condrocitos OA estimulados por IL-1 $\beta$ .

Tratamiento	Contenido de agregano (ng proteoglicano/mg de proteína)
B	9975 $\pm$ 830*
IL-1 $\beta$	6889 $\pm$ 463
IL-1 $\beta$ + CORM-2 100 $\mu$ M	8466 $\pm$ 775*

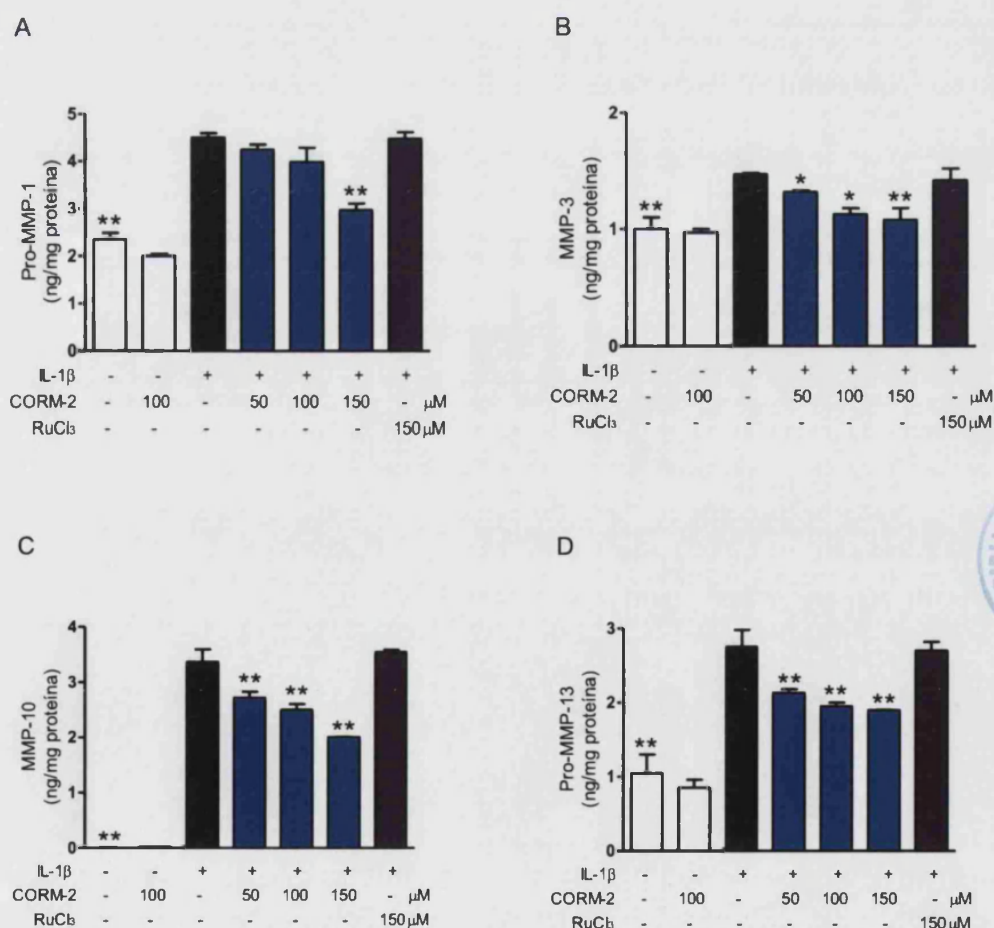
Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) durante 24 horas. La cantidad de agregano se midió por ELISA. Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de cultivos independientes de células procedentes de 6 donantes diferentes; *t* de Dunnett, \* *p*<0,05, respecto a las células control estimuladas con IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , CORM-2: dímero tricarbonildiclororrutenio (II), B: células no estimuladas.

### 6.2.2. Efecto del CORM-2 sobre las enzimas degradativas del cartílago

Determinamos los efectos del dador de monóxido de carbono CORM-2 en la inducción mediada por IL-1 $\beta$  de diversas enzimas relevantes en la degradación de cartílago. Tras la estimulación de los condrocitos OA con IL-1 $\beta$  durante 24 horas, se detectaron niveles elevados de MMP-1, MMP-3, MMP-10 y MMP-13 en el medio de cultivo por ELISA (figura 59). El CORM-2 logró reducir los niveles de proteína de estas enzimas en células estimuladas con IL-1 $\beta$ , mientras que el cloruro de rutenio, un análogo de CORM-2 sin grupos CO utilizado como control negativo, no fue efectivo. El tratamiento con CORM-2 resultó en una disminución concentración-dependiente de los niveles de MMP-3, MMP-10 y MMP-13, mientras que la MMP-1 fue inhibida solamente a la concentración más alta (150  $\mu$ M).

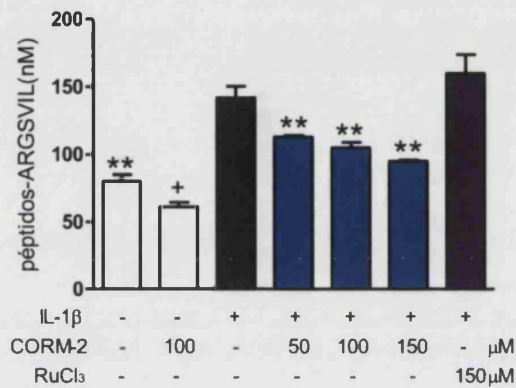
Además, la actividad agrecanasa se midió en sobrenadantes de condrocitos como liberación de neoepítosos específicos de agrecano y detectada por ELISA (figura 60). Tras 24 horas de estimulación con IL-1 $\beta$ , los péptidos del agrecano aumentaron muy significativamente respecto a los valores basales. El CORM-2 a 100  $\mu$ M redujo los niveles de actividad agrecanasa basales. Las mezclas de IL-1 $\beta$  y CORM-2 a diferentes concentraciones redujeron significativamente la actividad agrecanasa de modo concentración-dependiente. El RuCl $_3$  fue inactivo ya que, con IL-1 $\beta$ , su nivel de actividad agrecanasa fue semejante al de las células estimuladas.

Figura 59. Efecto del CORM-2 sobre los niveles de proteína de MMP liberados por condrocitos OA humanos.



Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) durante 24 horas. Los niveles de proteína de pro-MMP-1, MMP-3 total, MMP-10 total y pro-MMP-13 se midieron en los sobrenadantes por ELISA. Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de cultivos independientes de células procedentes de 7 donantes diferentes; *t* de Dunnett, \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ , respecto a las células control estimuladas con IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , CORM-2: dimero tricarbonildiclororutenio (II), (-): células no estimuladas.

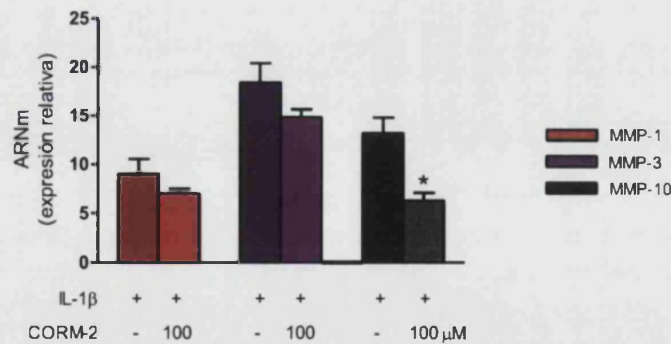
Figura 60. Efecto del CORM-2 en la actividad agrecanasa de condrocitos OA humanos.



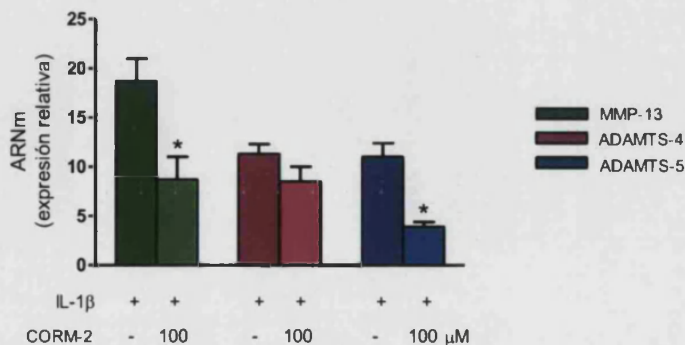
Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1β (100 U/mL) durante 24 horas. La actividad agrecanasa se midió en los sobrenadantes por ELISA. Resultados expresados como media ± ε de cultivos independientes de células procedentes de 7 donantes diferentes; *t* de Dunnett, \*\*  $p < 0,01$ , respecto a las células control estimuladas con IL-1β y +  $p < 0,05$ , respecto a las células no estimuladas (-). IL-1β: interleucina-1β, CORM-2: dímero tricarbonildiclororrutenio (II), (-): células no estimuladas.

Figura 61. Efecto del CORM-2 en la expresión de ARNm de MMP y agrecanasas en condrocitos OA humanos.

A



B



Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1β (100 U/mL) durante 12 horas. La expresión de ARNm fue determinada por PCR a tiempo real. Resultados expresados como media ± ε de cultivos independientes de células procedentes de 3 donantes diferentes; *t* de Dunnett, \*  $p < 0,05$ , respecto a las células control estimuladas con IL-1β. IL-1β: interleucina-1β, CORM-2: dímero tricarbonildiclororrutenio (II).

Posteriormente analizamos los efectos del CORM-2 en la expresión de ARNm de estas enzimas (figura 61). Para ello comparamos los niveles de mensajero de condrocitos primarios estimulados durante 12 horas con IL-1 $\beta$  frente a otros estimulados con IL-1 $\beta$  en presencia del dador de CO a 100  $\mu$ M. El análisis de los niveles de ARNm por PCR a tiempo real mostró que el tratamiento con CORM-2 redujo la expresión del ARNm de MMP-10, MMP-13 y ADAMTS-5, mientras que las reducciones de MMP-1, MMP-3 y ADAMTS-4 no fueron significativas.

### 6.2.3. Efecto del CORM-2 sobre la producción de IGF-1

En la sección 6.1.5 se estudió el papel de la inducción de HO-1 sobre el factor de crecimiento IGF-1. La inducción de CoPP aumentó significativamente la liberación de IGF-1, tanto a nivel basal como en células estimuladas con IL-1 $\beta$  durante 24 horas. Basándonos en estos resultados estudiamos el papel de la liberación de uno de los metabolitos de la HO-1, el CO, sobre los niveles del citado factor anabólico. Incubamos los condrocitos primarios en presencia o ausencia de CORM-2 y estimulamos las células con IL-1 $\beta$  durante 24 horas. El dador de monóxido de carbono resultó inefectivo en estas condiciones, ya que no aumentó la liberación de IGF-1, tal y como se muestra en la tabla 10. Estos resultados parecen indicar un papel anabólico de la HO-1 independiente del CO.

**Tabla 10.** Efecto del CORM-2 sobre los niveles de proteína de IGF-1 en condrocitos OA humanos.

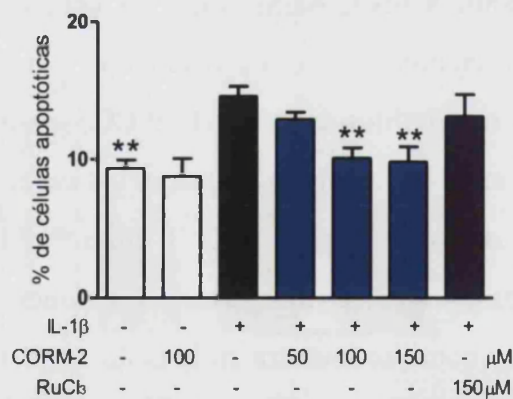
Tratamiento	IGF-1 (pg/mg de proteína)
B	131,4 $\pm$ 22,4**
CORM-2 100 $\mu$ M	135,2 $\pm$ 8,8
IL-1 $\beta$	85,2 $\pm$ 13,7
IL-1 $\beta$ + CORM-2 100 $\mu$ M	64,0 $\pm$ 23,9

Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) durante 24 horas. El IGF-1 se midió en los sobrenadantes por ELISA. Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de cultivos independientes de células procedentes de 5 donantes diferentes; *t* de Dunnett, \*\*  $p < 0,01$ , respecto a las células control estimuladas con IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , CORM-2: dímero tricarbonildiclororrutenio (II), B: células no estimuladas.

### 6.2.4. Efecto del CORM-2 sobre la apoptosis

Dada la importancia de la muerte celular por apoptosis en los procesos degradativos propios de la artrosis, decidimos medir el porcentaje de células apoptóticas en nuestras condiciones de experimentación. La técnica empleada para la medida de la apoptosis fue la de anexina V-FITC por citometría láser LSC, tal y como se describe en la sección de Material y métodos. La estimulación con IL-1 $\beta$  durante 24 horas aumentó de forma leve el número de células apoptóticas de un 9%, correspondiente a las células no estimuladas, a un 15% (figura 62). El dador de monóxido de carbono CORM-2 revirtió esta cifra hasta alcanzar prácticamente los niveles basales de apoptosis a las concentraciones de 100 y 150  $\mu$ M.

Figura 62. Efecto del CORM-2 sobre la apoptosis en condrocitos osteoarthríticos humanos.



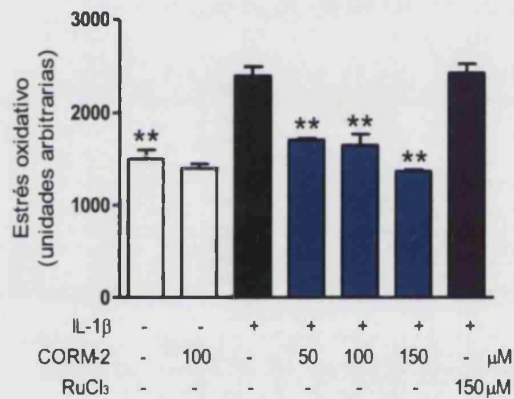
Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) durante 24 horas. La apoptosis se midió por LSC. Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de cultivos independientes de células procedentes de 4 donantes diferentes; *t* de Dunnett, \*\* *p*<0,01, respecto a las células control estimuladas con IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , CORM-2: dimero tricarbonyldiclororrutenio (II), (-): células no estimuladas.

### 6.2.5. Efecto del CORM-2 sobre el estrés oxidativo

Otra medida de gran interés por su importancia en los procesos de degradación del cartilago OA, fue la del estrés oxidativo. Dicho estrés se evaluó por la medida de las especies reactivas de oxígeno por citometría láser. Sobre la activación con IL-1 $\beta$  durante 24 horas, los condrocitos produjeron altos niveles de ROS. La figura

63 muestra cómo el CORM-2 disminuyó significativamente la producción de ROS producida por estimulación con IL-1 $\beta$ , en concreto, se obtuvieron niveles basales de ROS en presencia de la concentración más alta de CORM-2 (150  $\mu$ M). El control negativo RuCl<sub>3</sub> fue inefectivo a la concentración de 150  $\mu$ M, comparable a la concentración más alta de CORM-2.

**Figura 63.** Efecto del CORM-2 sobre el estrés oxidativo en condrocitos osteoartríticos humanos.



Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) durante 24 horas. El estrés oxidativo se midió por LSC. Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de cultivos independientes de células procedentes de 4 donantes diferentes; *t* de Dunnett, \*\* *p* < 0,01, respecto a las células control estimuladas con IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , CORM-2: dimero tricarbonyldiclororrutenio (II), (-): células no estimuladas.

### 6.2.6. Efecto del CORM-2 sobre la producción de NO y PGE<sub>2</sub>

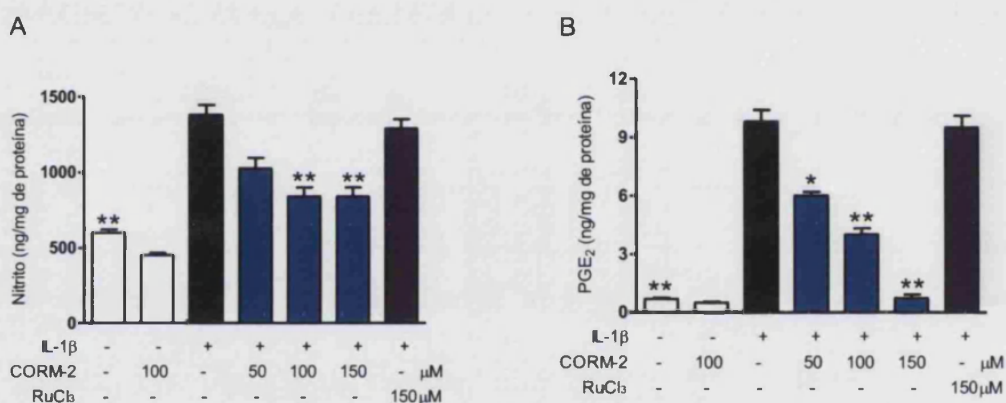
El aumento de la expresión de NOS-2 resultó en la producción de NO, medido como niveles de nitrito en el medio de cultivo por una técnica fluorimétrica (ver Material y métodos). Como se muestra en la figura 64A, el CORM-2 redujo los niveles de nitrito en células no estimuladas y en células estimuladas con IL-1 $\beta$ , siendo esta reducción significativa para las combinaciones de IL-1 $\beta$  más CORM-2 a 100 y 150  $\mu$ M. El cloruro de rutenio no mostró efecto alguno.

Además, los condrocitos estimulados con IL-1 $\beta$  liberaron PGE<sub>2</sub> al medio en cantidades diez veces mayores a las cantidades liberadas por las células en condiciones basales (figura 64B). La adición de CORM-2 disminuyó la producción



de este eicosanoide de manera concentración-dependiente y a la más alta concentración (150  $\mu$ M) el CORM-2 bloqueó la producción de PGE<sub>2</sub> en las células estimuladas con IL-1 $\beta$  reduciéndola hasta niveles basales. El RuCl<sub>3</sub> no tuvo ningún efecto significativo.

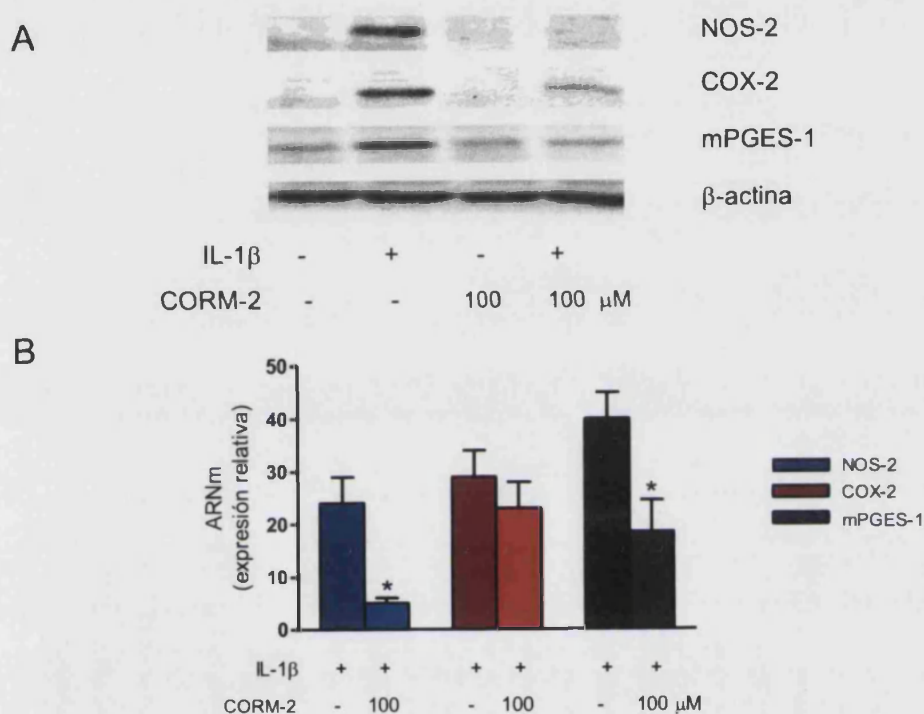
**Figura 64.** Efecto del CORM-2 sobre la producción de NO (A) y PGE<sub>2</sub> (B) en condrocitos osteoartríticos humanos.



Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) durante 24 horas. El NO fue medido como nitrito por una técnica fluorimétrica (A) y la PGE<sub>2</sub> fue medida por RIA (B). Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de cultivos independientes de células procedentes de 7 donantes diferentes; *t* de Dunnett, \*\* *p*<0,01; \* *p*<0,05, respecto a las células control estimuladas con IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , CORM-2: dímero tricarbonildiclororrutenio (II), (-): células no estimuladas.

A continuación se analizó por Western blot la expresión proteica de las enzimas productoras de NO y PGE<sub>2</sub>. Los condrocitos estimulados 24 horas con IL-1 $\beta$  demostraron aumentos significativos de la expresión de las proteínas NOS-2, COX-2 y mPGES-1 (figura 65A). El tratamiento con CORM-2 en células estimuladas con IL-1 $\beta$  disminuyó la expresión proteica de NOS-2 y mPGES-1, mientras que la expresión de COX-2 se redujo, aunque en menor medida. La inhibición de la producción de NO por el CORM-2 analizada anteriormente (figura 64A) podría ser consecuencia de la disminución en la expresión de NOS-2 (figura 65A), mientras la inhibición de los niveles de PGE<sub>2</sub> (figura 64B) podría ser dependiente de la disminución de la expresión proteica de las enzimas COX-2 y mPGES-1 por parte del CORM-2 (figura 65A).

**Figura 65.** Efecto del CORM-2 sobre la expresión de proteína (A) y de ARNm (B) de NOS-2, COX-2 y mPGES-1 en condrocitos osteoartríticos humanos.



Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) durante 24 (A) y 12 (B) horas. La expresión proteica fue analizada por Western blot. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes con células procedentes de tres pacientes. La expresión de ARNm fue determinada por PCR a tiempo real. Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de cultivos independientes de células procedentes de 4 donantes diferentes; *t* de Dunnett, \*  $p < 0,05$ , respecto a las células control estimuladas. IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , CORM-2: dímero tricarbonildiclororutenio (II). (-): células no estimuladas.

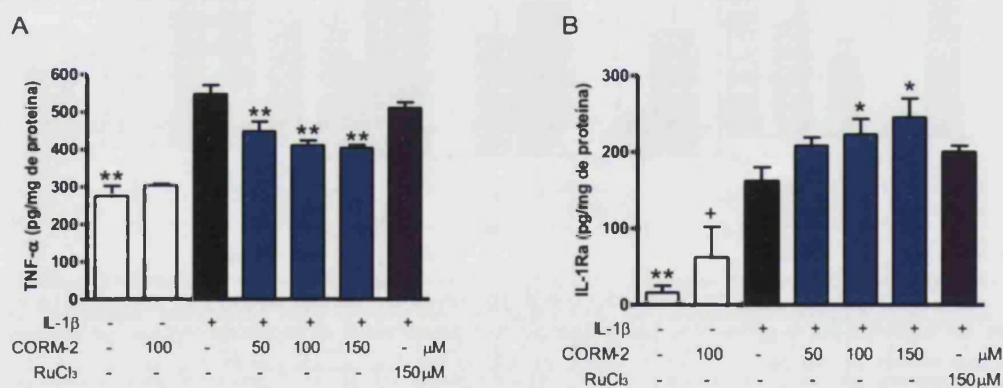
En condrocitos estimulados con IL-1 $\beta$  durante 12 horas, medimos la expresión génica relativa de NOS-2, COX-2 y mPGES-1 por PCR a tiempo real. La figura 65B muestra que el tratamiento con CORM-2 disminuye significativamente los transcritos de NOS-2 y mPGES-1 incrementados por IL-1 $\beta$ , mientras la modulación del ARNm de COX-2 no fue significativa.

### 6.2.7. Efecto del CORM-2 sobre la producción de TNF- $\alpha$ e IL-1Ra

Los condrocitos estimulados con IL-1 $\beta$  generaron niveles incrementados de TNF- $\alpha$  e IL-1Ra (figura 66). En cuanto al TNF- $\alpha$ , el CORM-2 inhibió la producción de TNF- $\alpha$  inducida por IL-1 $\beta$  de manera concentración-dependiente

(figura 66A). Por lo que a la producción de IL-1Ra se refiere, a pesar de que el CORM-2 por sí solo no tuvo un efecto significativo, este compuesto estimuló la producción de IL-1Ra en presencia de IL-1 $\beta$  (figura 66B). Nuestros resultados muestran que la combinación de IL-1 $\beta$  y CORM-2 produjo más IL-1Ra que la interleucina sola y que la producción de esta molécula aumentó mientras aumentaba la concentración del dador de CO, siendo este aumento significativo a las concentraciones más altas de CORM-2.

**Figura 66.** Efecto del CORM-2 sobre la producción de TNF- $\alpha$  (A) y de IL-1Ra (B) en condrocitos osteoartríticos humanos.



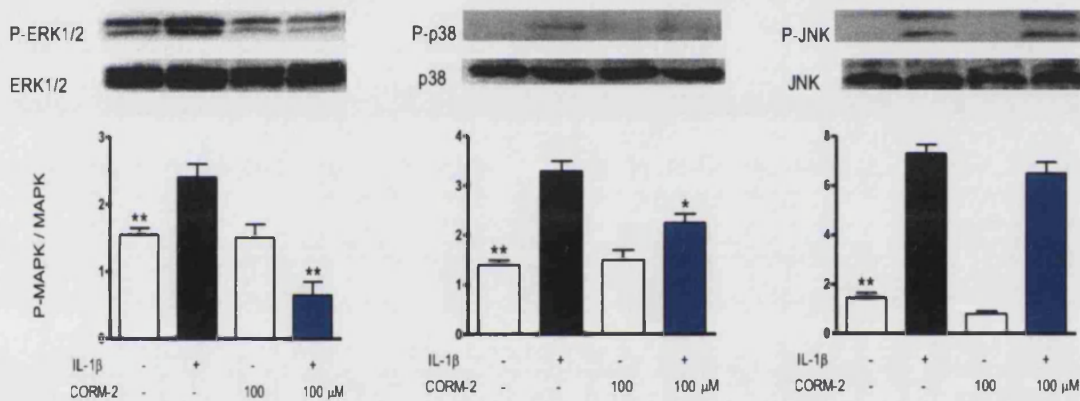
Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) durante 24 horas. Los niveles de proteína de TNF- $\alpha$  e IL-1Ra se midieron en los sobrenadantes por ELISA. Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de cultivos independientes de células procedentes de 10 donantes diferentes; *t* de Dunnett, \*\* *p*<0,01; \* *p*<0,05, respecto a las células control estimuladas con IL-1 $\beta$ , + *p*<0,05, respecto a las células no estimuladas (-). IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , CORM-2: dímero tricarbonildiclororrutenio (II), (-): células no estimuladas.

### 6.2.8. Efecto del CORM-2 sobre la activación de las enzimas MAPK

En condrocitos articulares humanos, la activación de la señalización de las MAPK por IL-1 $\beta$  juega un papel importante en procesos anabólicos y catabólicos (Fan y cols., 2007). Los niveles de expresión de la proteína total y de la proteína fosforilada de estas enzimas se analizaron por Western blot (figura 67). La razón entre la proteína fosforilada y la proteína total representa la activación de la enzima MAPK. Así, la estimulación de condrocitos OA con IL-1 $\beta$  condujo a una rápida

inducción de la fosforilación de las MAPK ERK1/2, p38 y JNK. Como se muestra en la figura 67, el CORM-2 a 100  $\mu\text{M}$  inhibió la ERK1/2 y la fosforilación de p38 en condrocitos primarios estimulados con IL-1 $\beta$ . Por el contrario, la activación de JNK no se vio afectada por este compuesto.

**Figura 67.** Efecto del CORM-2 sobre la fosforilación de MAPK en condrocitos osteoartríticos humanos.



Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) durante 15 minutos. La expresión de las formas fosforilada y total de ERK1/2, p38 y JNK en la fracción celular fue analizada por Western blot. La expresión relativa de las bandas de proteína fosforilada y total fue calculada tras análisis densitométricos, se calculó la razón entre la proteína fosforilada y la total y los resultados se expresaron como media  $\pm$   $\epsilon$ . Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes con células procedentes de tres pacientes; *t* de Dunnett, \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ , respecto a las células control estimuladas. IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , CORM-2: dímero tricarbonildiclororrutenio (II), (-): células no estimuladas.

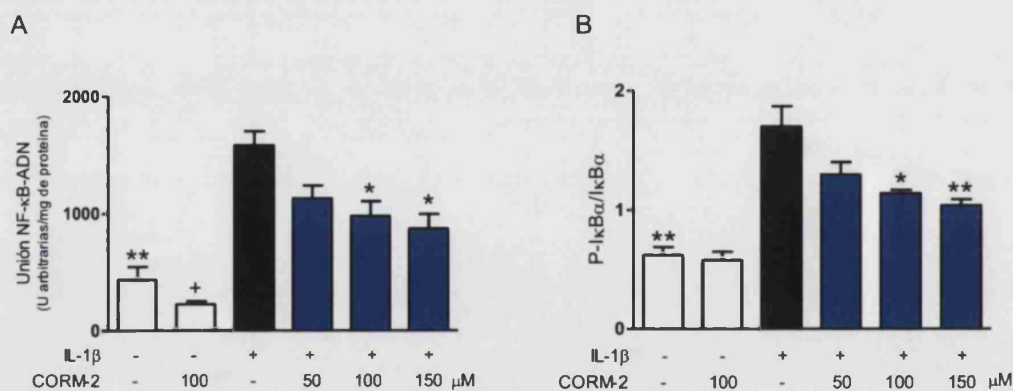
### 6.2.9. Efecto del CORM-2 sobre la activación de factores de transcripción

La inducción de mediadores inflamatorios mediada por IL-1 $\beta$  se asocia con la activación del NF- $\kappa$ B (Barnes y Karin, 1997). Por ello, medimos por ELISA la unión al ADN del NF- $\kappa$ B y la fosforilación del I $\kappa$ B $\alpha$ , estudiando el papel del CORM-2 en ambos procesos. La estimulación de condrocitos primarios con IL-1 $\beta$  resultó en una unión incrementada del NF- $\kappa$ B a su secuencia consenso (figura 68A). Relacionado con la reducción de mediadores inflamatorios, evidenciada anteriormente, observamos cómo el CORM-2 mostró una inhibición de la actividad

de unión de la proteína p65 concentración-dependiente, significativa a las concentraciones de 100 y 150  $\mu\text{M}$ .

El proceso de activación del NF- $\kappa\text{B}$  depende de la fosforilación de su proteína inhibidora, el I $\kappa\text{B}\alpha$ . El I $\kappa\text{B}\alpha$  juega un papel clave en el mantenimiento de la localización citoplasmática de los complejos inactivos para, llegado el momento, conseguir una activación de NF- $\kappa\text{B}$  eficiente a través de señales extracelulares y regular el desplazamiento hacia el núcleo (Huang y cols., 2000). Investigamos si la inhibición de la unión NF- $\kappa\text{B}$ -DNA era a través de la inhibición de la fosforilación de I $\kappa\text{B}\alpha$ . Como se muestra en la figura 68B, el CORM-2 redujo la razón entre el I $\kappa\text{B}\alpha$  fosforilado y la proteína total de I $\kappa\text{B}\alpha$ . Es decir, el CORM-2 redujo la fosforilación de I $\kappa\text{B}\alpha$  previniendo el movimiento del NF- $\kappa\text{B}$  al núcleo y en consecuencia reduciendo su unión con el ADN.

**Figura 68.** Efecto del CORM-2 sobre la activación de NF- $\kappa\text{B}$  en condrocitos osteoartríticos humanos.

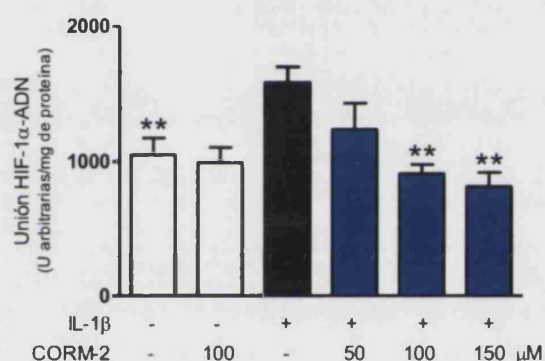


Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) durante 1 hora (A) y 30 minutos (B). La unión del NF- $\kappa\text{B}$  al oligonucleótido consenso fue medida en extractos nucleares por ELISA (A). La razón entre el I $\kappa\text{B}\alpha$  fosforilado y el I $\kappa\text{B}\alpha$  total fue medida por ELISA en extractos celulares (B). Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de cultivos independientes de células procedentes de 4 donantes diferentes;  $t$  de Dunnett, \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ , respecto a las células control estimuladas con IL-1 $\beta$  y +  $p < 0,05$ , respecto a las células no estimuladas (-). IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , CORM-2: dímero tricarbonildiclororrutenio (II), (-): células no estimuladas.

Se ha descrito que el factor de transcripción HIF-1 $\alpha$  está relacionado con la expresión de mPGES-1 en condrocitos OA (Grimmer y cols., 2007). Para estudiar este mecanismo potencial, analizamos el efecto del CORM-2 en la activación del

factor de transcripción por ELISA. La figura 69 muestra cómo la IL-1 $\beta$  estimuló fuertemente la unión de HIF-1 $\alpha$  a su secuencia consenso. En los condrocitos tratados con CORM-2, se observó una inhibición de la unión significativa y concentración-dependiente.

**Figura 69.** Efecto del CORM-2 sobre la activación de HIF-1 $\alpha$  en condrocitos osteoartríticos humanos.



Los condrocitos OA primarios fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (100 U/mL) durante 1 hora. La unión del HIF-1 $\alpha$  al oligonucleótido consenso fue medida en extractos nucleares por ELISA. Resultados expresados como media  $\pm$   $\epsilon$  de cultivos independientes de células procedentes de 4 donantes diferentes; *t* de Dunnett, \*\* *p* < 0,01, respecto a las células control estimuladas con IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$ , CORM-2: dímero tricarbonyldiclororrutenio (II), (-): células no estimuladas.



## ***7. DISCUSIÓN***





---

### 7.1. EFECTOS DE LA CoPP Y EL CORM-2 EN LA LÍNEA CELULAR Caco-2

En este modelo *in vitro* de inflamación intestinal, estudiamos las células Caco-2 en presencia de una mezcla de citocinas proinflamatorias, que reprodujeron el entorno de la inflamación intestinal, y las tratamos con los productos CoPP y CORM-2. En estas condiciones, la CoPP mostró efectos muy limitados sobre la respuesta inflamatoria. Sin embargo, el CORM-2 fue efectivo en este modelo experimental, por lo que decidimos centrar el estudio en el papel protector y antiinflamatorio de la liberación de CO en las citadas condiciones.

En la inflamación crónica intestinal, la estimulación continua con citocinas proinflamatorias lleva a la regulación al alza de la NOS-2 y al aumento de la producción de NO. La presencia de niveles altos de NO en los tejidos es un posible factor de riesgo en el cáncer colorrectal (Seidelin y Nielsen, 2005), ya que puede dañar el ADN o inhibir su reparación (Jaiswal y cols., 2000), aumentar la angiogénesis y favorecer la progresión del tumor (Ambs y cols., 1998; Hellmuth y cols., 2004). En nuestros ensayos, hemos mostrado que el CORM-2 moduló la expresión génica de la NOS-2 y la producción de NO en células Caco-2 estimuladas con citocinas proinflamatorias. Algunos estudios de actividad biológica del CO han descrito que la influencia de este mediador en la expresión de NOS-2 puede ser célula-dependiente y estímulo-dependiente. En un modelo de endotoxemia de rata, el CO se mostró capaz de prevenir el aumento en la expresión de la NOS-2 en el pulmón, si bien incrementó la expresión de NOS-2 en el hígado (Sarady y cols., 2004). Además, nuestros datos en células Caco-2 son coincidentes con estudios previos que describieron que las acciones antiinflamatorias del CO podrían estar relacionadas con la regulación a la baja de la NOS-2 en células de la línea de carcinoma de colon DLD-1 y en modelos animales de inflamación intestinal (Dijkstra y cols., 2004).

La expresión de IL-8 se correlaciona con la inflamación de la mucosa tanto en la colitis ulcerosa como en la enfermedad de Crohn (Daig y cols., 1996). La producción aumentada de IL-8 en presencia de bacterias o en la inflamación

## *Discusión*

---

intestinal ha sido relacionada con transformaciones malignas, crecimiento celular, metástasis y angiogénesis en células de cáncer de colon (Mizukami y cols., 2005). Diversos estudios han revelado la expresión de esta quimiocina proinflamatoria en tejidos de cáncer colorrectal donde podría actuar como un factor de crecimiento autocrino o paracrino (Brew y cols., 2000). En cambio, la inhibición de la producción de IL-8 podría inhibir la proliferación de las células de cáncer de colon (Li y cols., 2001). Según nuestros resultados, el dador de CO CORM-2 inhibe la producción de IL-8, lo cual, dada la persistente expresión de esta quimiocina en trastornos intestinales inflamatorios y en cáncer de colon, podría contribuir a la protección de las células epiteliales intestinales.

Se ha descrito que la expresión de MMP-7 se induce en el epitelio del colon humano inflamado, aunque los mecanismos celulares responsables de esta respuesta no están bien establecidos (Newell y cols., 2002). Además de su participación en respuestas inflamatorias, la MMP-7 es una diana transcripcional de la vía oncogénica src en células de cáncer de colon, lo que podría contribuir a la tumorigenicidad, invasión celular y potencial metastático de las células de cáncer (Witty y cols., 1994; Yamamoto y cols., 1995; Rivat y cols., 2003). Aparte de la degradación de la matriz extracelular y la inducción de factores angiogénicos, la MMP-7 podría activar citocinas o factores de crecimiento para modificar el crecimiento celular. No en vano, se ha descrito que la ausencia de MMP-7 podría inhibir la neoplasia intestinal en ratones (Wilson y cols., 1997) y podría reducir el riesgo de progresión de la colitis ulcerosa y de la displasia de grado bajo hacia el cáncer (Newell y cols., 2002). Nuestros datos demuestran que el CORM-2 disminuye la expresión de MMP-7 durante la respuesta inflamatoria provocada por citocinas en enterocitos humanos. Estos estudios sustentarían un papel para el CO en la regulación de las MMP, lo que es coincidente con algunas evidencias mostradas en otros modelos celulares, como en una línea celular epitelial de pulmón humana en la que se describe la inhibición de la expresión de MMP-1 y MMP-2 por CORM-2 (Desmard y cols., 2005).

Hemos mostrado en nuestros experimentos, que el CORM-2 inhibe potentemente la producción de IL-6, una citocina implicada en la patogénesis de

condiciones inflamatorias crónicas como la EII (Gross y cols., 1992). Dado que la IL-6 induce la expresión de MMP-7, los datos presentados sugieren que la disminución observada de la IL-6 podría mediar, al menos, parte de los efectos del CORM-2 en la expresión de MMP-7. La producción de IL-6 tras la estimulación de las células Caco-2 con citocinas proinflamatorias se ha relacionado con la actividad de NF- $\kappa$ B (Parikh y cols., 1997), AP-1 (Hungness y cols., 2000) y C/EBP (Hungness y cols., 2002). Según los resultados obtenidos, el CORM-2 inhibe la activación de estos factores de transcripción, lo que podría contribuir a reducir la expresión de IL-6.

Otro aspecto que hemos estudiado en la línea celular Caco-2, es el posible efecto citoprotector de la HO-1 y el CORM-2. Para ello, se indujo la apoptosis al someter a las células a condiciones de estrés, por privación de suero durante 168 horas. Nuestros resultados demuestran que la inducción de HO-1 por CoPP disminuye la apoptosis y la fase G<sub>2</sub>/M del ciclo celular. En estas condiciones experimentales, la indometacina también inhibe la apoptosis inducida por restricción de suero pero, a diferencia de la CoPP, produce la detención del ciclo celular y acumulación de células en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Varios de los productos derivados de la actividad HO-1 podrían ser responsables del efecto antiapoptótico de la inducción de la enzima. Los resultados obtenidos indican que la bilirrubina y la biliverdina pueden mediar el efecto protector de la HO-1 frente a la restricción de suero. Aunque el CO tiene un efecto antiapoptótico en diversos modelos experimentales (Tsui y cols., 2005; Zhang y cols., 2005), los resultados obtenidos con CORM-2 no apoyan que este mediador pueda tener un papel importante en nuestro sistema, si bien se debe indicar que el CO no produce efectos antiapoptóticos en algunos tipos celulares (Choi y cols., 2004; Mayerhofer y cols., 2004) o incluso puede ser proapoptótico en células Jurkat (Song y cols., 2004).

De acuerdo con los resultados de este estudio, los efectos antiapoptóticos de la HO-1 en Caco-2 están mediados por la vía de Akt. La serina/treonina cinasa Akt (o proteína cinasa B) es un efector de la vía de la PI3-K. La activación de esta vía permite a las células sobrevivir debido a la inhibición de señales apoptóticas e inducción de señales a favor de la supervivencia (revisado en Marte y Downward,

## *Discusión*

---

1997). En concreto, la participación de Akt en la supervivencia de las células enterocíticas parece ser relevante en las células no diferenciadas (Gauthier y cols., 2001). La fosforilación de Akt ha sido descrita en carcinomas de colon humano y se ha correlacionado con el bloqueo de la apoptosis, sugiriéndose así la participación de esta proteína en la progresión del cáncer de colon (Itoh y cols., 2002). Existe por tanto la posibilidad de que el efecto antiapoptótico de la HO-1 pudiera favorecer la supervivencia de células cancerosas. A este respecto, algunas observaciones sugieren que los niveles elevados de esta proteína están asociados con el crecimiento neoplásico (Nishie y cols., 1999; Mayerhofer y cols., 2004).

La cronificación de la inflamación en el tejido intestinal es un factor que contribuye al desarrollo de cáncer colorrectal (Westbrook y cols., 2009; Rose-John y cols., 2009). El posible papel de la HO-1 en esta enfermedad no está determinado. Aunque la expresión de la HO-1 podría proteger a las células frente a la apoptosis en algunos casos, la inhibición de esta enzima incrementa el estrés oxidativo y la apoptosis en la línea celular de cáncer de colon SW480 (Fang y cols., 2004). En nuestras condiciones experimentales, la biliverdina y la bilirrubina serían los metabolitos derivados de la actividad HO responsables de la inhibición de la apoptosis. Sin embargo, en otras condiciones, la influencia de la bilirrubina podría ser diferente. Así, en células de adenocarcinoma de colon, el tratamiento con bilirrubina puede inducir la despolarización mitocondrial y la apoptosis (Keshavan y cols., 2004). Por otro lado, el control de la respuesta inflamatoria por la actividad HO-1 podría disminuir la producción de mediadores y evitar la cronificación de la inflamación. Es interesante destacar que la expresión de la HO-1 en el cáncer colorrectal y en el adenoma de colon se asocia con una menor invasión linfática, menor tasa de metástasis y una mayor supervivencia de los pacientes a largo plazo (Becker y cols., 2007).

En este estudio también hemos demostrado que los niveles de la proteína p21<sup>Cip/WAF1</sup> aumentan en las células Caco-2 sometidas a restricción de suero y que la indometacina inhibe la apoptosis dependiendo de la activación de la vía Akt/p21<sup>Cip/WAF1</sup>. En relación con la vía de la HO-1, se ha descrito que los productos derivados de ella, como son el hierro o el CO inducen p21<sup>Cip/WAF1</sup> en células del

túbulo proximal de ratas tratadas con hemina (González-Michaca y cols., 2004). Esta proteína puede mediar la resistencia que produce la HO-1 frente a la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$  y cicloheximida, en células de cáncer gástrico o de carcinoma de tiroides (Liu y cols., 2004; Chen y cols., 2004). Sin embargo, nuestros datos sugieren que otras dianas posteriores en la cascada del Akt estarían implicadas en el efecto antiapoptótico de la HO-1 en células Caco-2 que han sido privadas de suero.

En algunos modelos experimentales, la MAPK p38 podría participar en los efectos antiapoptóticos de la HO-1. A diferencia de la respuesta descrita en hepatocitos estimulados con TNF- $\alpha$  (Tsui y cols., 2005), nuestros resultados sugieren que la activación de p38 no es relevante en los efectos antiapoptóticos de la HO-1 en nuestro modelo de trabajo.

## **7.2. EFECTOS DE LA CoPP Y DEL CORM-2 EN EL METABOLISMO DEL CONDROCITO OSTEOARTRÍTICO**

Los siguientes experimentos se realizaron en cultivos primarios de condrocitos OA, estimulados con la citocina proinflamatoria IL-1 $\beta$  y en presencia de los productos CoPP y CORM-2. En este modelo de OA *in vitro* y en nuestras condiciones de experimentación, se ha descrito por primera vez un papel protector, tanto de la HO-1 como de una molécula tipo CORM en el metabolismo de los condrocitos OA, ya que ambas han sido capaces de reducir los efectos catabólicos de la IL-1 $\beta$  sobre los componentes de la matriz extracelular. Nuestros resultados también indican que el CO liberado por el CORM-2 puede reproducir los efectos protectores de la inducción de la enzima HO-1 en condrocitos OA. No obstante, no se sabe si el CO liberado por tal fuente externa es equiparable al CO producido por la actividad HO-1 de manera endógena. Estas limitaciones se han discutido en un estudio reciente utilizando CORM-3 (Urquhart y cols., 2007).

Las citocinas proinflamatorias, como la IL-1 $\beta$ , pueden tener un papel importante en la progresión de la lesión articular en la OA. Aunque los niveles de expresión de la IL-1 $\beta$  son bajos en el cartílago OA, la parte superficial del mismo

## *Discusión*

---

está en contacto con niveles elevados de ésta y de otras citocinas presentes en el fluido sinovial. De esta forma, puede producirse la estimulación auto/paracrina de su expresión, que tendría como consecuencia la activación de las vías de señalización principales, como las de las MAPK y la del NF- $\kappa$ B (Fan y cols., 2007), desencadenándose procesos de tipo degradativo e inflamatorio, entre otros.

El agrecano y el colágeno tipo II son los componentes mayoritarios del cartílago articular y su síntesis y mantenimiento son rasgos del condrocito diferenciado (Reginato y cols., 1994). En la OA, la IL-1 $\beta$  no sólo suprime estos procesos anabólicos, sino que promueve la destrucción del cartílago (Goldring y cols., 1988; Frazer y cols., 1994). Este proceso, en el que la pérdida de agrecano precede a la degradación del colágeno, implica a un gran número de proteinasas y tiene como resultado la alteración de la funcionalidad de la articulación (Nagase y Kashiwagi, 2003). El daño a la red fibrilar de colágeno puede ser mediado por la acción conjunta de las citocinas IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , las cuales disminuyen la expresión del agrecano y del colágeno II (Fan y cols., 2006) e inducen la expresión de distintas enzimas catabólicas, incluyendo colagenasas y agrecanasas (Goldring y Goldring, 2004). En los experimentos realizados pudimos constatar que la inducción de HO-1 por CoPP y la liberación de CO por parte del CORM-2, no sólo inhibió la degradación de la matriz extracelular sino que también aumentó la síntesis de proteoglicano y colágeno II por los condrocitos OA.

La activación de las MMP colagenolíticas, depende de la proteólisis de sus respectivas proformas por las proteinasas de la serina y otras MMP, lo que podría ser un paso limitante en la colagenolisis del cartílago (Milner y cols., 2001). A este respecto, es interesante destacar el papel de la MMP-3 (stromelisin-1) y la MMP-10 (stromelisin-2) en la activación de las proformas de las colagenasas (Murphy y Lee, 2005; Knauper y cols., 1996a), conduciendo a un incremento significativo de la colagenolisis del cartílago (Barksby y cols., 2006b). Nuestros estudios han mostrado los efectos inhibitorios del CORM-2 en ambas enzimas, indicando que este agente podría actuar a diferentes niveles en la cascada de reacciones que llevan a la degradación del colágeno.

Se ha descrito que las colagenasas MMP-1 y MMP-13 son mediadores clave en la degradación del colágeno II de la matriz extracelular (Poole y cols., 2003; Billinghamurst y cols., 1997; Wu y cols., 2002), siendo la MMP-13 la principal colagenasa en el cartílago OA, capaz de degradar tanto el colágeno como el agrecano (Bau y cols., 2002; Burrage y cols., 2006; Wu y cols., 2002). En condrocitos humanos OA estimulados con IL-1 $\beta$ , hemos mostrado cómo la inducción de HO-1 disminuye la actividad MMP y disminuye la expresión de MMP-1 y MMP-13, lo cual puede tener un papel importante en los efectos protectores de la inducción de la HO-1 frente a la degradación del cartílago. Algo similar se observó con el tratamiento con CORM-2, que inhibió la producción de MMP-1 y MMP-13, con un mayor efecto sobre la MMP-13.

La rotura del agrecano podría ser dependiente mayoritariamente de la actividad de agrecanasas como ADAMTS-4 y ADAMTS-5 (Malfait y cols., 2002; Bau y cols., 2002), aunque algunas MMP como la MMP-13 son también capaces de degradar agrecano (Burrage y cols., 2006). La degradación de agrecano es una característica temprana de la OA, que puede tener una gran influencia en la alteración del cartílago, ya que la macromolécula del agrecano protege la estructura fibrilar del colágeno del ataque proteolítico por colagenasas (Malfait y cols., 2002). Nuestros datos indican que el tratamiento con CORM-2 redujo la actividad agrecanasa y la expresión génica de ADAMTS-5 en condrocitos OA humanos.

Hasta la fecha, las nuevas estrategias terapéuticas en protección del cartílago centradas en los inhibidores de MMP no han dado lugar a beneficios clínicos (Murphy y Lee, 2005). Por lo tanto, la inhibición de ADAMTS-4/ADAMTS-5 se ha propuesto como nueva diana farmacológica para desarrollar agentes protectores de cartílago (Malfait y cols., 2002). De este modo, es posible que compuestos tales como los CORM, capaces de controlar vías degradativas y de síntesis, puedan proveer una mayor protección. Estas observaciones apoyan el interés de realizar estudios adicionales sobre esta clase de agentes.

La activación de las vías de señalización de las MAPK parece mediar la regulación de los componentes de la matriz extracelular dependiente de IL-1 $\beta$  y la expresión de MMP en condrocitos articulares humanos (Fan y cols., 2007). En



## Discusión

---

particular, ERK1/2 es un regulador negativo de la condrogénesis y de la diferenciación de condrocitos (Yoon y cols., 2002b). La inhibición de la activación de ERK por HO-1 podría contribuir al mantenimiento del fenotipo condrocítico y a la expresión de componentes de la matriz extracelular. Nuestros resultados muestran que la inducción de HO-1 y el CORM-2 inhiben la fosforilación de ERK1/2 y de p38, lo que podría contrarrestar los efectos destructivos de las citocinas proinflamatorias en la síntesis y degradación de la matriz extracelular en la OA.

La capacidad del CO de unirse a centros metálicos en metaloproteínas es conocida (Roberts y cols., 2004), lo que podría resultar en la regulación directa de los procesos de fosforilación-defosforilación de las MAPK a través de posibles interacciones con la proteína fosfatasa 2C (Boczkowski y cols., 2006). Además, el CO puede inhibir a la NADPH oxidasa (Boczkowski y cols., 2006) y disminuir así la producción de ROS en la mitocondria (Piantadosi, 2002), conduciendo a la modulación indirecta de la señalización por MAPK. Serían necesarios estudios adicionales para determinar los mecanismos responsables de la inhibición de las MAPK por el CORM-2 en condrocitos. La capacidad del CO de reaccionar con metales de transición podría también resultar en la inhibición de las MMP relevantes en la degradación del cartílago (Desmard y cols., 2005).

Asimismo, hemos descrito que la HO-1 incrementa la producción de IGF-1, un importante factor anabólico para el cartílago. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el IGF-1 estimula la síntesis de proteoglicano y enlentece el catabolismo del proteoglicano en el cartílago (revisado en Schmidt y cols., 2006). Este factor de crecimiento, también invalida las acciones de la IL-1 $\beta$  sobre la matriz extracelular (Wang y cols., 2003). No obstante, la respuesta de los condrocitos al IGF decrece con la edad y con el progreso de la OA, lo que podría deberse a tres motivos: defectos en la unión al receptor de IGF, defectos en la señalización o aumento de la expresión de proteínas de unión tipo IGFBP (Martin y cols., 1997; Dore y cols., 1994). En la OA, la pobre eficacia anabólica del IGF-1 en el cartílago, parece ser debida parcialmente a su secuestro por los niveles anormalmente elevados de proteínas IGFBP extracelulares, principalmente IGFBP-

3, que podrían regular los niveles locales de IGF (De Ceuninck y cols., 2004). Nuestros resultados indican que la inducción de HO-1 disminuye los altos niveles de IGFBP-3 presentes en condrocitos OA (Olney y cols., 1996; Iwanaga y cols., 2005; Tardif y cols., 1996). Además, la inducción de HO-1 aumenta la razón IGF-1/IGFBP-3, lo que facilitaría la interacción del IGF-1 con sus receptores para ejercer efectos anabólicos (Dore y cols., 1994). Este mecanismo indirecto, podría también contribuir a los efectos protectores de la inducción de HO-1 en el cartílago OA. Por el contrario, el CORM-2 no mostró efectos significativos sobre la expresión de este factor de crecimiento.

Las citocinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$  incrementan el estrés oxidativo, al inducir la formación de oxidantes intracelulares que podrían funcionar como segundos mensajeros, implicando un aumento de la expresión génica de enzimas degradativas (Lo y cols., 1998). Además, las ROS han sido relacionadas con la degeneración del cartílago en la OA a través de la iniciación de la apoptosis del condrocito (Del, Jr. y Loeser, 2002), el descenso del potencial replicativo, cambios catabólicos en la matriz del cartílago, inestabilidad de los telómeros y senescencia (Yudoh y cols., 2005b). Se sabe que la inducción de HO-1 puede disminuir los niveles de la molécula oxidante hemo e incrementar la generación de moléculas antioxidantes (biliverdina y bilirrubina) y del agente antiapoptótico y antiinflamatorio CO (revisado en Alcaraz y cols., 2003). En la presente tesis, se ha demostrado un papel protector de la inducción de HO-1 y de la liberación de CO frente al estrés oxidativo en condrocitos humanos OA. Nuestros resultados también sugieren que la inhibición de la generación de ROS podría contribuir a los efectos beneficiosos de la CoPP y del CORM-2 sobre la viabilidad, apoptosis y metabolismo de la matriz extracelular en condrocitos primarios OA. Además, hay evidencias contundentes de efectos reguladores del CO en la señalización redox. Se ha descrito que el CO exógeno procedente de los CORM o de la actividad HO-1 inhibe a la NADPH oxidasa y a la citocromo oxidasa en algunos tipos celulares (Boczkowski y cols., 2006).

Estudios previos han demostrado una excesiva producción de NO y ROS en enfermedades inflamatorias y degenerativas de las articulaciones (Abramson y

## Discusión

---

cols., 2001). Grandes cantidades de NO se asocian a la degradación de la matriz, lo que podría depender de la supresión de la síntesis de glicosaminoglicanos y colágeno, de la expresión aumentada de MMP y de la activación de proenzimas (Lotz, 1999). Hemos mostrado que el CORM-2 reduce la producción de NO e inhibe la expresión de ARNm y la expresión proteica de la NOS-2 en condrocitos OA estimulados con IL-1 $\beta$ , lo que podría jugar un papel en los efectos protectores del CORM-2 frente a la degradación del cartílago. La inhibición de la activación del NF- $\kappa$ B por CORM-2 podría proveernos de una base para explicar la reducción en la expresión de NOS-2 y la disminución de la producción de NO.

Además, el NO puede modificar los efectos de las citocinas. Por ejemplo, el NO puede reducir la producción de IL-1Ra lo que conlleva una mayor degradación de la matriz del cartílago por IL-1 (Pelletier y cols., 1996). Hemos observado que el CORM-2 es capaz de aumentar la producción de IL-1Ra en condrocitos primarios OA estimulados con IL-1 $\beta$ . Aunque los niveles producidos son bajos, es probable que *in vivo* el bloqueo de pequeñas cantidades de IL-1 sea suficiente para evitar la potenciación con otras citocinas en la inducción de efectos catabólicos (Chabaud y cols., 2001).

Una de estas citocinas es el TNF- $\alpha$ , que induce la producción de mediadores inflamatorios y enzimas catabólicas en tejidos OA (Fernandes y cols., 2002). Por tanto, la reducción de la producción de TNF- $\alpha$  por el CORM-2 en condrocitos OA primarios, podría contribuir a los efectos antiinflamatorios de este agente y es de gran interés en el contexto de la OA, en vista de los efectos catabólicos de esta citocina.

Estudios previos han demostrado un incremento de la expresión de COX-2 y mPGES-1 en cartílago OA (Li y cols., 2005) y en condrocitos (Grimmer y cols., 2007). La evidencia experimental indica que la IL-1 $\beta$  induce en los condrocitos grandes incrementos en la expresión de COX-2 y mPGES-1, lo que tiene como consecuencia la producción de niveles elevados de PGE<sub>2</sub>. Además de sus efectos proinflamatorios, este mediador puede participar en el desequilibrio del balance anabolismo-catabolismo en la OA, mediante la inhibición del inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP-1) o aumentando la producción de MMP (Yamada y

cols., 1996; Shapiro y cols., 1993; Hardy y cols., 2002). Por el contrario, bajas concentraciones de PGE<sub>2</sub> podrían regular a la baja las colagenasas, las citocinas proinflamatorias y la rotura del colágeno 2A1 (Tchetina y cols., 2007). Por otro lado, la PGE<sub>2</sub> podría aumentar la mortalidad de los condrocitos (Notoya y cols., 2000) e inducir apoptosis en condrocitos articulares de bovino a través de la vía del AMPc (Miwa y cols., 2000).

En nuestros experimentos, estudiamos los efectos de la inducción de HO-1 y de la liberación CO por el CORM-2 sobre la producción de PGE<sub>2</sub> inducida por IL-1 $\beta$  en condrocitos primarios OA. En ambos casos, se produjo una disminución de dicha producción de PGE<sub>2</sub>. En el caso de la inducción de HO-1, comprobamos que tales efectos no eran dependientes de la inhibición de la actividad enzimática COX-2, sino de la regulación a la baja de la expresión génica de mPGES-1, mientras que el CORM-2 inhibió la expresión de mPGES-1 y, en menor medida, la de COX-2. Por lo tanto, nuestros datos sugieren que el CO producto de la actividad HO-1 podría ser responsable de la disminución de la producción de PGE<sub>2</sub> tras la inducción de HO-1. La incapacidad de la HO-1 de inhibir la actividad COX-2 podría tener como consecuencia el control de la excesiva producción de PGE<sub>2</sub> durante las respuestas inflamatorias, sin inhibición de otros metabolitos derivados de la actividad COX-2, con posibles efectos protectores (Gilroy y cols., 1999).

Con estos resultados, mostramos por primera vez un papel regulador de la HO-1 y del CORM-2 sobre la producción de PGE<sub>2</sub> a través, mayoritariamente, de la modulación de la mPGES-1, en condrocitos primarios OA estimulados con IL-1 $\beta$ . De hecho, la mPGES-1 se ha propuesto como diana en patologías inflamatorias como la artritis reumatoide (Stichtenoth y cols., 2001) y la OA (Masuko-Hongo y cols., 2004; Kojima y cols., 2004).

Los efectos inhibitorios de la inducción de la HO-1 y del CORM-2 sobre la fosforilación de ERK1/2 y p38 descritos anteriormente, podrían también participar en la regulación a la baja de la mPGES-1 por inducción de HO-1, ya que la actividad de las MAPK podría ser crítica para la expresión de la mPGES-1 (Masuko-Hongo y cols., 2004).

## *Discusión*

---

El NF- $\kappa$ B y el AP-1 están implicados en la transcripción de numerosos genes proinflamatorios (Liacini y cols., 2002). Aunque el promotor de COX-2 contiene múltiples sitios de regulación, incluyendo aquéllos capaces de interactuar con ambos factores de transcripción, se ha descrito que la inducción de COX-2 por IL-1 $\beta$  en condrocitos humanos podría ser dependiente de otros factores de transcripción (Thomas y cols., 2000), lo cual podría explicar la leve reducción en la COX-2 conseguida por el CORM-2 y la falta de efecto de la CoPP.

Se sabe que la activación de receptores activados por proliferadores de peroxisomas- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) ejerce efectos inhibitorios sobre la transcripción de la mPGES-1 (Li y cols., 2005) y estudios recientes sugieren la contribución del HIF-1 $\alpha$  a la regulación de la mPGES-1 y en menor medida de la expresión de COX-2 en condrocitos primarios (Grimmer y cols., 2007). Nuestros datos sugieren que la inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B y HIF-1 $\alpha$  por CoPP y CORM-2 podría contribuir a la inhibición de la expresión de la mPGES-1 por estos agentes.

Estudios recientes han sugerido que el EGR-1 podría ser un regulador clave en la transcripción de la mPGES-1 en respuesta a la estimulación por citocinas (Naraba y cols., 2002). Por este motivo, intentamos establecer si la inducción de HO-1 podría regular a este factor de transcripción. Nuestros datos mostraron que la inducción de HO-1 produce una reducción significativa de la activación de EGR-1 en condrocitos primarios OA estimulados con IL-1 $\beta$  y por tanto este mecanismo podría contribuir a la inhibición de la expresión de la mPGES-1.

## **8. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS**



1.- En células Caco-2, el dador de CO CORM-2 tiene efectos antiinflamatorios, con inhibición de la expresión de NOS-2, IL-6, IL-8 y MMP-7. El mecanismo de acción del CORM-2 dependería de la inhibición de la activación de las MAPK (ERK, p38 y JNK) y de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B, AP-1 y C/EBP. Además, la inducción de HO-1 por CoPP ha demostrado un efecto antiapoptótico mediado por biliverdina y bilirrubina y dependiente de la activación de Akt. La vía HO-1/CO puede tener efectos antiinflamatorios y protectores en enterocitos.

2.- En condrocitos osteoarthríticos, tanto la inducción de HO-1 por CoPP como el CORM-2, protegen frente a los efectos catabólicos y antianabólicos de la IL-1 $\beta$ , con aumento de la viabilidad celular y de la síntesis de la matriz extracelular e inhibición de su degradación. La inhibición de la expresión de MMP y, en el caso de CORM-2, también de agreganasa-2 protege frente a la degradación del cartílago. El aumento de la razón IGF-1/IGFBP3 participa en el efecto anabólico de la inducción de HO-1.

3.- En este sistema celular, la inducción de HO-1 y la molécula CORM-2 tienen efectos antiinflamatorios y reducen la expresión de mPGES-1 y los niveles de PGE<sub>2</sub>, así como la producción de estrés oxidativo. La inhibición de la activación de las MAPK ERK y p38, y de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B, HIF-1 $\alpha$  y EGR-1 media la protección producida por la inducción de HO-1 y por el CORM-2 frente a los efectos nocivos de la IL-1 $\beta$  en condrocitos osteoarthríticos.



1.- In Caco-2 cells, the CO-releasing molecule CORM-2 showed anti-inflammatory effects, with inhibition of NOS-2, IL-6, IL-8 and MMP-7 expression. The mechanism of action of CORM-2 may depend on the inhibition of the activation of both MAPK (ERK, p38 and JNK) and transcription factors NF- $\kappa$ B, AP-1 and C/EBP. Moreover, HO-1 induction by CoPP has demonstrated an anti-apoptotic effect mediated by biliverdin and bilirubin and dependent on Akt activation. HO-1/CO pathway might have anti-inflammatory and protective effects on enterocytes.

2.- In osteoarthritic chondrocytes, HO-1 induction by CoPP and CO release by CORM-2 protect against the catabolic and anti-anabolic effects of IL-1 $\beta$ , with increase of cell viability and extracellular matrix synthesis and inhibition of its degradation. Downregulation of MMPs and, in the case of CORM-2, also of ADAMTS-5 protects against cartilage degradation. The increased IGF-1/IGFBP3 ratio participates in the anabolic effect of HO-1 induction.

3.- In this cellular system, HO-1 induction and CORM-2 exert anti-inflammatory effects and reduce mPGES-1 expression and PGE<sub>2</sub> levels, as well as oxidative stress production. Inhibition of MAPK ERK and p38 activation and inhibition of the transcription factors NF- $\kappa$ B, HIF-1 $\alpha$  and EGR-1, mediate the protection produced by HO-1 and CORM-2 against the deleterious effects of IL-1 $\beta$  in osteoarthritic chondrocytes.

## ***9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS***



- Abraham E (2000) NF-kappaB activation. *Crit Care Med* **28**:N100-N104.
- Abramson SB, Amin AR, Clancy RM y Attur M (2001) The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **15**:831-845.
- Acevedo CH y Ahmed A (1998) Hemeoxygenase-1 inhibits human myometrial contractility via carbon monoxide and is upregulated by progesterone during pregnancy. *J Clin Invest* **101**:949-955.
- Adams JM y Cory S (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**:1322-1326.
- Aigner A (2006) Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: strategies based on the direct application of siRNAs. *J Biotechnol* **124**:12-25.
- Aigner T, Zien A, Hanisch D y Zimmer R (2003) Gene expression in chondrocytes assessed with use of microarrays. *J Bone Joint Surg Am* **85-A Suppl 2**:117-123.
- Akira S y Kishimoto T (1997) NF-IL6 and NF-kappa B in cytokine gene regulation. *Adv Immunol* **65**:1-46.
- Alam J (1994) Multiple elements within the 5' distal enhancer of the mouse heme oxygenase-1 gene mediate induction by heavy metals. *J Biol Chem* **269**:25049-25056.
- Alam J, Killeen E, Gong P, Naquin R, Hu B, Stewart D, Ingelfinger JR y Nath KA (2003) Heme activates the heme oxygenase-1 gene in renal epithelial cells by stabilizing Nrf2. *Am J Physiol Renal Physiol* **284**:F743-F752.
- Alam J, Shibahara S y Smith A (1989) Transcriptional activation of the heme oxygenase gene by heme and cadmium in mouse hepatoma cells. *J Biol Chem* **264**:6371-6375.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K y Walter P (1996) *Biología molecular de la célula*. Vol. 17, El ciclo de la división celular.

### Referencias bibliográficas

---

Alcaraz MJ, Fernández P y Guillén MI (2003) Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. *Curr Pharm Des* 9:2541-2551.

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW y Yuan J (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87:171.

Amba S, Merriam WG, Ogunfusika MO, Bennett WP, Ishibe N, Hussain SP, Tzeng EE, Geller DA, Billiar TR y Harris CC (1998) p53 and vascular endothelial growth factor regulate tumor growth of NOS2-expressing human carcinoma cells. *Nat Med* 4:1371-1376.

Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ y Gabay C (1998) Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol* 16:27-55.

Arend WP, Welgus HG, Thompson RC y Eisenberg SP (1990) Biological properties of recombinant human monocyte-derived interleukin 1 receptor antagonist. *J Clin Invest* 85:1694-1697.

Arikawa-Hirasawa E, Watanabe H, Takami H, Hassell JR y Yamada Y (1999) Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat Genet* 23:354-358.

Atreya R, Mudter J, Finotto S, Mullberg J, Jostock T, Wirtz S, Schutz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schurmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S y Neurath MF (2000) Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 6:583-588.

Attur M, Al Mussawir HE, Patel J, Kitay A, Dave M, Palmer G, Pillinger MH y Abramson SB (2008) Prostaglandin E<sub>2</sub> exerts catabolic effects in osteoarthritis cartilage: evidence for signaling via the EP4 receptor. *J Immunol* 181:5082-5088.

Attur MG, Dave M, Akamatsu M, Katoh M y Amin AR (2002) Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine. *Osteoarthritis Cartilage* 10:1-4.

#### Referencias bibliográficas

---

Attur MG, Patel IR, Patel RN, Abramson SB y Amin AR (1998) Autocrine production of IL-1 beta by human osteoarthritis-affected cartilage and differential regulation of endogenous nitric oxide, IL-6, prostaglandin E<sub>2</sub>, and IL-8. *Proc Assoc Am Physicians* **110**:65-72.

Aukrust P, Halvorsen B, Yndestad A, Ueland T, Oie E, Otterdal K, Gullestad L y Damas JK (2008) Chemokines and cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**:1909-1919.

Autschbach F, Braunstein J, Helmke B, Zuna I, Schurmann G, Niemir ZI, Wallich R, Otto HF y Meuer SC (1998) In situ expression of interleukin-10 in noninflamed human gut and in inflammatory bowel disease. *Am J Pathol* **153**:121-130.

Autschbach F, Giese T, Gassler N, Sido B, Heuschen G, Heuschen U, Zuna I, Schulz P, Weckauf H, Berger I, Otto HF y Meuer SC (2002) Cytokine/chemokine messenger-RNA expression profiles in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Virchows Arch* **441**:500-513.

Baldwin AS, Jr. (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* **14**:649-683.

Bani-Hani MG, Greenstein D, Mann BE, Green CJ y Motterlini R (2006) Modulation of thrombin-induced neuroinflammation in BV-2 microglia by carbon monoxide-releasing molecule 3. *J Pharmacol Exp Ther* **318**:1315-1322.

Barksby HE, Hui W, Wappler I, Peters HH, Milner JM, Richards CD, Cawston TE y Rowan AD (2006a) Interleukin-1 in combination with oncostatin M up-regulates multiple genes in chondrocytes: implications for cartilage destruction and repair. *Arthritis Rheum* **54**:540-550.

Barksby HE, Milner JM, Patterson AM, Peake NJ, Hui W, Robson T, Lakey R, Middleton J, Cawston TE, Richards CD y Rowan AD (2006b) Matrix metalloproteinase 10 promotion of collagenolysis via procollagenase activation: implications for cartilage degradation in arthritis. *Arthritis Rheum* **54**:3244-3253.

### Referencias bibliográficas

---

Barnes PJ y Karin M (1997) Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* **336**:1066-1071.

Barton SG, Rampton DS, Winrow VR, Domizio P y Feakins RM (2003) Expression of heat shock protein 32 (hemoxygenase-1) in the normal and inflamed human stomach and colon: an immunohistochemical study. *Cell Stress Chaperones* **8**:329-334.

Bau B, Gebhard PM, Haag J, Knorr T, Bartnik E y Aigner T (2002) Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis Rheum* **46**:2648-2657.

Baugh MD, Perry MJ, Hollander AP, Davies DR, Cross SS, Lobo AJ, Taylor CJ y Evans GS (1999) Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **117**:814-822.

Baumann H y Gauldie J (1990) Regulation of hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation. *Mol Biol Med* **7**:147-159.

Becker JC, Fukui H, Imai Y, Sekikawa A, Kimura T, Yamagishi H, Yoshitake N, Pohle T, Domschke W y Fujimori T (2007) Colonic expression of heme oxygenase-1 is associated with a better long-term survival in patients with colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol* **42**:852-858.

Becker JC, Grosser N, Boknik P, Schroder H, Domschke W y Pohle T (2003) Gastroprotection by vitamin C--a heme oxygenase-1-dependent mechanism? *Biochem Biophys Res Commun* **312**:507-512.

Becker JC, Grosser N, Waltke C, Schulz S, Erdmann K, Domschke W, Schroder H y Pohle T (2006) Beyond gastric acid reduction: proton pump inhibitors induce heme oxygenase-1 in gastric and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **345**:1014-1021.

#### Referencias bibliográficas

---

Beg AA, Finco TS, Nantermet PV y Baldwin AS, Jr. (1993) Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation. *Mol Cell Biol* **13**:3301-3310.

Beg AA, Ruben SM, Scheinman RI, Haskill S, Rosen CA y Baldwin AS, Jr. (1992) I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes Dev* **6**:1899-1913.

Bender S, Haubeck HD, van de LE, Dufhues G, Schiel X, Lauwerijns J, Greiling H y Heinrich PC (1990) Interleukin-1 beta induces synthesis and secretion of interleukin-6 in human chondrocytes. *FEBS Lett* **263**:321-324.

Benninghoff A (1925) Form und Bau der gelenkknorpel in ihrem Beziehungen zur Funktion. Zwerter Teil: Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische. *Anatomie* **2**:783-867.

Berberat PO, Rahim YI, Yamashita K, Warny MM, Csizmadia E, Robson SC y Bach FH (2005) Heme oxygenase-1-generated biliverdin ameliorates experimental murine colitis. *Inflamm Bowel Dis* **11**:350-359.

Billiau A y Matthys P (2009) Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev* **20**:97-113.

Billinghurst RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, Mitchell P, Hambor J, Diekmann O, Tschesche H, Chen J, Van Wart H y Poole AR (1997) Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest* **99**:1534-1545.

Birbach A, Gold P, Binder BR, Hofer E, de Martin R y Schmid JA (2002) Signaling molecules of the NF-kappa B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem* **277**:10842-10851.

Bister V, Salmela MT, Heikkila P, Anttila A, Rintala R, Isaka K, Andersson S y Saarialho-Kere U (2005) Matrilysins-1 and -2 (MMP-7 and -26) and



### Referencias bibliográficas

---

metalloelastase (MMP-12), unlike MMP-19, are up-regulated in necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **40**:60-66.

Blumberg RS y Strober W (2001) Prospects for research in inflammatory bowel disease. *JAMA* **285**:643-647.

Boczkowski J, Poderoso JJ y Motterlini R (2006) CO-metal interaction: Vital signaling from a lethal gas. *Trends Biochem Sci* **31**:614-621.

Boehm U, Klamp T, Groot M y Howard JC (1997) Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* **15**:749-795.

Boileau C, Pelletier JP, Tardif G, Fahmi H, Laufer S, Lavigne M y Martel-Pelletier J (2005) The regulation of human MMP-13 by licofelone, an inhibitor of cyclooxygenases and 5-lipoxygenase, in human osteoarthritic chondrocytes is mediated by the inhibition of the p38 MAP kinase signalling pathway. *Ann Rheum Dis* **64**:891-898.

Boirivant M, Marini M, Di Felice G, Pronio AM, Montesani C, Tersigni R y Strober W (1999) Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis. *Gastroenterology* **116**:557-565.

Borkakoti N (1998) Matrix metalloproteases: variations on a theme. *Prog Biophys Mol Biol* **70**:73-94.

Boughton-Smith NK, Evans SM, Hawkey CJ, Cole AT, Balsitis M, Whittle BJ y Moncada S (1993) Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Lancet* **342**:338-340.

Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH y Yancopoulos GD (1991) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**:663-675.

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.

Breese EJ, Michie CA, Nicholls SW, Murch SH, Williams CB, Domizio P, Walker-Smith JA y Macdonald TT (1994) Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **106**:1455-1466.

Brew R, Erikson JS, West DC, Kinsella AR, Slavin J y Christmas SE (2000) Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro. *Cytokine* **12**:78-85.

Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AM y Soares MP (2000) Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* **192**:1015-1026.

Brown KD, Claudio E y Siebenlist U (2008) The roles of the classical and alternative nuclear factor-kappaB pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* **10**:212.

Brown RA y Jones KL (1990) The synthesis and accumulation of fibronectin by human articular cartilage. *J Rheumatol* **17**:65-72.

Brustugun OT, Fladmark KE, Doskeland SO, Orrenius S y Zhivotovsky B (1998) Apoptosis induced by microinjection of cytochrome c is caspase-dependent and is inhibited by Bcl-2. *Cell Death Differ* **5**:660-668.

Bulmer AC, Ried K, Blanchfield JT y Wagner KH (2008) The anti-mutagenic properties of bile pigments. *Mutat Res* **658**:28-41.

Burkhardt H, Schwingel M, Menninger H, Macartney HW y Tschesche H (1986) Oxygen radicals as effectors of cartilage destruction. Direct degradative effect on matrix components and indirect action via activation of latent collagenase from polymorphonuclear leukocytes. *Arthritis Rheum* **29**:379-387.

### Referencias bibliográficas

---

Burrage PS, Mix KS y Brinckerhoff CE (2006) Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci* **11**:529-543.

Byers PH (2001) Folding defects in fibrillar collagens. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**:151-157.

Caron JP, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Tardif G, Mineau F, Geng C y Pelletier JP (1996) Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis. Suppression of collagenase-1 expression. *Arthritis Rheum* **39**:1535-1544.

Castillo D y Casán P (2006) [Carbon monoxide: two sides to the same coin]. *Arch Bronconeumol* **42**:489-491.

Chabaud M, Page G y Miossec P (2001) Enhancing effect of IL-1, IL-17, and TNF- $\alpha$  on macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$  production in rheumatoid arthritis: regulation by soluble receptors and Th2 cytokines. *J Immunol* **167**:6015-6020.

Chang L y Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**:37-40.

Chen GG, Liu ZM, Vlantis AC, Tse GM, Leung BC y van Hasselt CA (2004) Heme oxygenase-1 protects against apoptosis induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  and cycloheximide in papillary thyroid carcinoma cells. *J Cell Biochem* **92**:1246-1256.

Chen LX, Lin L, Wang HJ, Wei XL, Fu X, Zhang JY y Yu CL (2008) Suppression of early experimental osteoarthritis by in vivo delivery of the adenoviral vector-mediated NF- $\kappa$ Bp65-specific siRNA. *Osteoarthritis Cartilage* **16**:174-184.

Chen Z, Hagler J, Palombella VJ, Melandri F, Scherer D, Ballard D y Maniatis T (1995) Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* **9**:1586-1597.

Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T y Korsmeyer SJ (2001) BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* **8**:705-711.

Cheng S, Afif H, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Li X, Farrajota K, Lavigne M y Fahmi H (2004) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits interleukin-1beta-induced membrane-associated prostaglandin E<sub>2</sub> synthase-1 expression in human synovial fibroblasts by interfering with Egr-1. *J Biol Chem* **279**:22057-22065.

Chevalier X (1997) Upregulation of enzymatic activity by interleukin-1 in osteoarthritis. *Biomed Pharmacother* **51**:58-62.

Chevalier X, Giraudeau B, Conrozier T, Marliere J, Kiefer P y Goupille P (2005) Safety study of intraarticular injection of interleukin 1 receptor antagonist in patients with painful knee osteoarthritis: a multicenter study. *J Rheumatol* **32**:1317-1323.

Choi BM, Pae HO, Jeong YR, Oh GS, Jun CD, Kim BR, Kim YM y Chung HT (2004) Overexpression of heme oxygenase (HO)-1 renders Jurkat T cells resistant to fas-mediated apoptosis: involvement of iron released by HO-1. *Free Radic Biol Med* **36**:858-871.

Clark JE, Naughton P, Shurey S, Green CJ, Johnson TR, Mann BE, Foresti R y Motterlini R (2003) Cardioprotective actions by a water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. *Circ Res* **93**:e2-e8.

Clemmons DR (1998) Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Mol Cell Endocrinol* **140**:19-24.

Colman MS, Afshari CA y Barrett JC (2000) Regulation of p53 stability and activity in response to genotoxic stress. *Mutat Res* **462**:179-188.

### Referencias bibliográficas

---

Colpaert EE, Timmermans JP y Lefebvre RA (2002) Immunohistochemical localization of the antioxidant enzymes biliverdin reductase and heme oxygenase-2 in human and pig gastric fundus. *Free Radic Biol Med* **32**:630-637.

Cs-Szabo G, Roughley PJ, Plaas AH y Glant TT (1995) Large and small proteoglycans of osteoarthritic and rheumatoid articular cartilage. *Arthritis Rheum* **38**:660-668.

da Cunha A, Jefferson JA, Jackson RW y Vitkovic L (1993) Glial cell-specific mechanisms of TGF-beta 1 induction by IL-1 in cerebral cortex. *J Neuroimmunol* **42**:71-85.

Dai SM, Shan ZZ, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K y Yudoh K (2006) Catabolic stress induces features of chondrocyte senescence through overexpression of caveolin 1: possible involvement of caveolin 1-induced down-regulation of articular chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **54**:818-831.

Daig R, Andus T, Aschenbrenner E, Falk W, Scholmerich J y Gross V (1996) Increased interleukin 8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **38**:216-222.

Daouti S, Latario B, Nagulapalli S, Buxton F, Uziel-Fusi S, Chirn GW, Bodian D, Song C, Labow M, Lotz M, Quintavalla J y Kumar C (2005) Development of comprehensive functional genomic screens to identify novel mediators of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **13**:508-518.

De Backer O, Elinck E, Blanckaert B, Leybaert L, Motterlini R y Lefebvre RA (2009) Water-soluble CO-releasing molecules reduce the development of postoperative ileus via modulation of MAPK/HO-1 signalling and reduction of oxidative stress. *Gut* **58**:347-356.

De Ceuninck F, Caliez A, Dassencourt L, Anract P y Renard P (2004) Pharmacological disruption of insulin-like growth factor 1 binding to IGF-binding

proteins restores anabolic responses in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 6:R393-R403.

De Giorgi F, Lartigue L, Bauer MK, Schubert A, Grimm S, Hanson GT, Remington SJ, Youle RJ y Ichas F (2002) The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *FASEB J* 16:607-609.

Del CM, Jr. y Loeser RF (2002) Nitric oxide-mediated chondrocyte cell death requires the generation of additional reactive oxygen species. *Arthritis Rheum* 46:394-403.

Delhanty PJ (1998) Interleukin-1 beta suppresses growth hormone-induced acid-labile subunit mRNA levels y secretion in primary hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 243:269-272.

Desmard M, Amara N, Lanone S, Motterlini R y Boczkowski J (2005) Carbon monoxide reduces the expression and activity of matrix metalloproteinases 1 and 2 in alveolar epithelial cells. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 51:403-408.

Devesa I, Ferrándiz ML, Busserolles J y Alcaraz MJ (2005) Effects of heme oxygenase-1 inducers on established rat adjuvant arthritis. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 51:479-485.

Dijkstra G, Blokzijl H, Bok L, Homan M, van Goor H, Faber KN, Jansen PL y Moshage H (2004) Opposite effect of oxidative stress on inducible nitric oxide synthase and haem oxygenase-1 expression in intestinal inflammation: anti-inflammatory effect of carbon monoxide. *J Pathol* 204:296-303.

Dinarello CA (2005) Interleukin-1beta. *Crit Care Med* 33:S460-S462.

Dingle JT (1993) Prostaglandins in human cartilage metabolism. *J Lipid Mediat* 6:303-312.

### Referencias bibliográficas

---

Dodge GR y Poole AR (1989) Immunohistochemical detection and immunochemical analysis of type II collagen degradation in human normal, rheumatoid, and osteoarthritic articular cartilages and in explants of bovine articular cartilage cultured with interleukin 1. *J Clin Invest* **83**:647-661.

Domagala F, Martín G, Bogdanowicz P, Ficheux H y Pujol JP (2006) Inhibition of interleukin-1beta-induced activation of MEK/ERK pathway and DNA binding of NF-kappaB and AP-1: potential mechanism for Diacerein effects in osteoarthritis. *Biorheology* **43**:577-587.

Dong J, Fujii S, Imagawa S, Matsumoto S, Matsushita M, Todo S, Tsutsui H y Sobel BE (2007) IL-1 and IL-6 induce hepatocyte plasminogen activator inhibitor-1 expression through independent signaling pathways converging on C/EBPdelta. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**:C209-C215.

Dore S, Pelletier JP, DiBattista JA, Tardif G, Brazeau P y Martel-Pelletier J (1994) Human osteoarthritic chondrocytes possess an increased number of insulin-like growth factor 1 binding sites but are unresponsive to its stimulation. Possible role of IGF-1-binding proteins. *Arthritis Rheum* **37**:253-263.

Dreier R, Wallace S, Fuchs S, Bruckner P y Grassel S (2001) Paracrine interactions of chondrocytes and macrophages in cartilage degradation: articular chondrocytes provide factors that activate macrophage-derived pro-gelatinase B (pro-MMP-9). *J Cell Sci* **114**:3813-3822.

Dunnett CW (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* **20**:482-491.

Eder J (1997) Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 signalling: do MAPKK kinases connect it all? *Trends Pharmacol Sci* **18**:319-322.

Eisenstein RS, García-Mayol D, Pettingell W y 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.

el Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW y Vogelstein B (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**:817-825.

Elson CJ, Mortuza FY, Perry MJ, Warnock MG, Webb GR y Westacott CI (1998) Cytokines and focal loss of cartilage in osteoarthritis. *Br J Rheumatol* **37**:106-107.

Eyre DR, Wu JJ y Apone S (1987) A growing family of collagens in articular cartilage: identification of 5 genetically distinct types. *J Rheumatol* **14 Spec No**:25-27.

Fan Z, Bau B, Yang H y Aigner T (2004) IL-1beta induction of IL-6 and LIF in normal articular human chondrocytes involves the ERK, p38 and NFkappaB signaling pathways. *Cytokine* **28**:17-24.

Fan Z, Soder S, Oehler S, Fundel K y Aigner T (2007) Activation of interleukin-1 signaling cascades in normal and osteoarthritic articular cartilage. *Am J Pathol* **171**:938-946.

Fan Z, Yang H, Bau B, Soder S y Aigner T (2006) Role of mitogen-activated protein kinases and NFkappaB on IL-1beta-induced effects on collagen type II, MMP-1 and 13 mRNA expression in normal articular human chondrocytes. *Rheumatol Int* **26**:900-903.

Fang J, Sawa T, Akaike T, Greish K y Maeda H (2004) Enhancement of chemotherapeutic response of tumor cells by a heme oxygenase inhibitor, pegylated zinc protoporphyrin. *Int J Cancer* **109**:1-8.

Fernandes J, Tardif G, Martel-Pelletier J, Lascau-Coman V, Dupuis M, Moldovan F, Sheppard M, Krishnan BR y Pelletier JP (1999) In vivo transfer of interleukin-1 receptor antagonist gene in osteoarthritic rabbit knee joints: prevention of osteoarthritis progression. *Am J Pathol* **154**:1159-1169.

Fernandes JC, Martel-Pelletier J y Pelletier JP (2002) The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* **39**:237-246.



### Referencias bibliográficas

---

Fernández P, Guillén MI, Gomar F y Alcaraz MJ (2003) Expression of heme oxygenase-1 and regulation by cytokines in human osteoarthritic chondrocytes. *Biochem Pharmacol* **66**:2049-2052.

Fernández P, Guillén MI, Gomar F, Aller E, Molina P y Alcaraz MJ (2004) A novel cyclo-oxygenase-2 inhibitor modulates catabolic and antiinflammatory mediators in osteoarthritis. *Biochem Pharmacol* **68**:417-421.

Ferrándiz ML, Maicas N, García-Arnandis I, Terencio MC, Motterlini R, Devesa I, Joosten LA, van den Berg WB y 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.

Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW y O'Garra A (1991) IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* **146**:3444-3451.

Foresti R, Hammad J, Clark JE, Johnson TR, Mann BE, Friebe A, Green CJ y Motterlini R (2004) Vasoactive properties of CORM-3, a novel water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. *Br J Pharmacol* **142**:453-460.

Foresti R, Shurey C, Ansari T, Sibbons P, Mann BE, Johnson TR, Green CJ y Motterlini R (2005) Reviewing the use of carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs) in biology: implications in endotoxin-mediated vascular dysfunction. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* **51**:409-423.

Frazer A, Bunning RA, Thavarajah M, Seid JM y Russell RG (1994) Studies on type II collagen and aggrecan production in human articular chondrocytes in vitro and effects of transforming growth factor-beta and interleukin-1beta. *Osteoarthritis Cartilage* **2**:235-245.

Gauthier R, Harnois C, Drolet JF, Reed JC, Vezina A y Vachon PH (2001) Human intestinal epithelial cell survival: differentiation state-specific control mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**:C1540-C1554.

Ge B, Gram H, Di Padova F, Huang B, New L, Ulevitch RJ, Luo Y y Han J (2002) MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science* **295**:1291-1294.

Geng Y, McQuillan D y Roughley PJ (2006) SLRP interaction can protect collagen fibrils from cleavage by collagenases. *Matrix Biol* **25**:484-491.

Gibson PR (2004) Increased gut permeability in Crohn's disease: is TNF the link? *Gut* **53**:1724-1725.

Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ y Willoughby DA (1999) Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* **5**:698-701.

Giris M, Erbil Y, Oztezcan S, Olgac V, Barbaros U, Deveci U, Kirgiz B, Uysal M y Toker GA (2006) The effect of heme oxygenase-1 induction by glutamine on radiation-induced intestinal damage: the effect of heme oxygenase-1 on radiation enteritis. *Am J Surg* **191**:503-509.

Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, Flannery CR, Peluso D, Kanki K, Yang Z, Majumdar MK y Morris EA (2005) Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* **434**:644-648.

Gloire G, Legrand-Poels S y Piette J (2006) NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol* **72**:1493-1505.

Goldring MB (2000a) Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Curr Rheumatol Rep* **2**:459-465.

Goldring MB (2000b) The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **43**:1916-1926.

### Referencias bibliográficas

---

Goldring MB, Birkhead J, Sandell LJ, Kimura T y Krane SM (1988) Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes. *J Clin Invest* **82**:2026-2037.

Goldring MB y Goldring SR (2007) Osteoarthritis. *J Cell Physiol* **213**:626-634.

Goldring SR y Goldring MB (2004) The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res* **S27-S36**.

González-Michaca L, Farrugia G, Croatt AJ, Alam J y Nath KA (2004) Heme: a determinant of life and death in renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **286**:F370-F377.

González-Reyes S, Orozco-Ibarra M, Guzmán-Beltrán S, Molina-Jijón E, Massieu L y Pedraza-Chaverri J (2009) Neuroprotective role of heme-oxygenase 1 against iodoacetate-induced toxicity in rat cerebellar granule neurons: Role of bilirubin. *Free Radic Res* **43**:214-223.

Gorlach A, Diebold I, Schini-Kerth VB, Berchner-Pfannschmidt U, Roth U, Brandes RP, Kietzmann T y Busse R (2001) Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circ Res* **89**:47-54.

Gosset M, Berenbaum F, Levy A, Pigenet A, Thirion S, Saffar JL y Jacques C (2006) Prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis in cartilage explants under compression: mPGES-1 is a mechanosensitive gene. *Arthritis Res Ther* **8**:R135.

Gouze JN, Bordji K, Gulberti S, Terlain B, Netter P, Magdalou J, Fournel-Gigleux S y Ouzzine M (2001) Interleukin-1beta down-regulates the expression of glucuronosyltransferase I, a key enzyme priming glycosaminoglycan biosynthesis: influence of glucosamine on interleukin-1beta-mediated effects in rat chondrocytes. *Arthritis Rheum* **44**:351-360.

*Referencias bibliográficas*

---

Grabowski PS, Wright PK, 't Hof RJ, Helfrich MH, Ohshima H y Ralston SH (1997) Immunolocalization of inducible nitric oxide synthase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Br J Rheumatol* **36**:651-655.

Green DR y Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**:1309-1312.

Grimmer C, Pfander D, Swoboda B, Aigner T, Mueller L, Hennig FF y Gelse K (2007) Hypoxia-inducible factor 1alpha is involved in the prostaglandin metabolism of osteoarthritic cartilage through up-regulation of microsomal prostaglandin E synthase 1 in articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* **56**:4084-4094.

Gross SS y Levi R (1992) Tetrahydrobiopterin synthesis. An absolute requirement for cytokine-induced nitric oxide generation by vascular smooth muscle. *J Biol Chem* **267**:25722-25729.

Gross V, Andus T, Caesar I, Roth M y Scholmerich J (1992) Evidence for continuous stimulation of interleukin-6 production in Crohn's disease. *Gastroenterology* **102**:514-519.

Grozdanovic Z y Gossrau R (1996) Expression of heme oxygenase-2 (HO-2)-like immunoreactivity in rat tissues. *Acta Histochem* **98**:203-214.

Guan Z, Buckman SY, Springer LD y Morrison AR (1999a) Both p38alpha(MAPK) and JNK/SAPK pathways are important for induction of nitric-oxide synthase by interleukin-1beta in rat glomerular mesangial cells. *J Biol Chem* **274**:36200-36206.

Guan Z, Buckman SY, Springer LD y Morrison AR (1999b) Regulation of cyclooxygenase-2 by the activated p38 MAPK signaling pathway. *Adv Exp Med Biol* **469**:9-15.

Guha M, O'Connell MA, Pawlinski R, Hollis A, McGovern P, Yan SF, Stern D y Mackman N (2001) Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha

*Referencias bibliográficas*

---

expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood* **98**:1429-1439.

Guilak F, Jones WR, Ting-Beall HP y Lee GM (1999) The deformation behavior and mechanical properties of chondrocytes in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **7**:59-70.

Guy-Grand D, DiSanto JP, Henchoz P, Malassis-Seris M y Vassalli P (1998) Small bowel enteropathy: role of intraepithelial lymphocytes and of cytokines (IL-12, IFN-gamma, TNF) in the induction of epithelial cell death and renewal. *Eur J Immunol* **28**:730-744.

Hale KK, Trollinger D, Rihanek M y Manthey CL (1999) Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages. *J Immunol* **162**:4246-4252.

Han J, Lee JD, Jiang Y, Li Z, Feng L y Ulevitch RJ (1996) Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6). *J Biol Chem* **271**:2886-2891.

Hanada T y Yoshimura A (2002) Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* **13**:413-421.

Hansen MK, Taishi P, Chen Z y Krueger JM (1998) Vagotomy blocks the induction of interleukin-1beta (IL-1beta) mRNA in the brain of rats in response to systemic IL-1beta. *J Neurosci* **18**:2247-2253.

Hardy MM, Seibert K, Manning PT, Currie MG, Woerner BM, Edwards D, Koki A y Tripp CS (2002) Cyclooxygenase 2-dependent prostaglandin E<sub>2</sub> modulates cartilage proteoglycan degradation in human osteoarthritis explants. *Arthritis Rheum* **46**:1789-1803.

Harmann D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**:298-300.

*Referencias bibliográficas*

---

Hayashi S, Omata Y, Sakamoto H, Higashimoto Y, Hara T, Sagara Y y Noguchi M (2004) Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene* **336**:241-250.

Hegazi RA, Rao KN, Mayle A, Sepúlveda AR, Otterbein LE y Plevy SE (2005) Carbon monoxide ameliorates chronic murine colitis through a heme oxygenase 1-dependent pathway. *J Exp Med* **202**:1703-1713.

Hellmuth M, Paulukat J, Ninic R, Pfeilschifter J y Muhl H (2004) Nitric oxide differentially regulates pro- and anti-angiogenic markers in DLD-1 colon carcinoma cells. *FEBS Lett* **563**:98-102.

Henningsson R, Alm P, Ekstrom P y Lundquist I (1999) Heme oxygenase and carbon monoxide: regulatory roles in islet hormone release: a biochemical, immunohistochemical, and confocal microscopic study. *Diabetes* **48**:66-76.

Henrotin YE, Bruckner P y Pujol JP (2003) The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **11**:747-755.

Heraud F, Heraud A y Harmand MF (2000) Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Ann Rheum Dis* **59**:959-965.

Hermanowicz A, Gibson PR y Jewell DP (1985) The role of phagocytes in inflammatory bowel disease. *Clin Sci (Lond)* **69**:241-249.

Hirano T, Taga T, Nakano N, Yasukawa K, Kashiwamura S, Shimizu K, Nakajima K, Pyun KH y Kishimoto T (1985) Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**:5490-5494.

Hogervorst T y Brand RA (1998) Mechanoreceptors in joint function. *J Bone Joint Surg Am* **80**:1365-1378.

### Referencias bibliográficas

---

Homandberg GA, Meyers R y Williams JM (1993) Intraarticular injection of fibronectin fragments causes severe depletion of cartilage proteoglycans in vivo. *J Rheumatol* **20**:1378-1382.

Huang TT, Kudo N, Yoshida M y Miyamoto S (2000) A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of IkappaBalpha controls cytoplasmic localization of inactive NF-kappaB/IkappaBalpha complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:1014-1019.

Hui W, Barksby HE, Young DA, Cawston TE, McKie N y Rowan AD (2005) Oncostatin M in combination with tumour necrosis factor {alpha} induces a chondrocyte membrane associated aggrecanase that is distinct from ADAMTS aggrecanase-1 or -2. *Ann Rheum Dis* **64**:1624-1632.

Hungness ES, Luo GJ, Pritts TA, Sun X, Robb BW, Hershko D y Hasselgren PO (2002) Transcription factors C/EBP-beta and -delta regulate IL-6 production in IL-1beta-stimulated human enterocytes. *J Cell Physiol* **192**:64-70.

Hungness ES, Pritts TA, Luo GJ, Sun X, Penner CG y Hasselgren PO (2000) The transcription factor activator protein-1 is activated and interleukin-6 production is increased in interleukin-1beta-stimulated human enterocytes. *Shock* **14**:386-391.

Hunziker EB, Kapfinger E, Martin J, Buckwalter J y Morales TI (2008) Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 (IGFBP-3) is closely associated with the chondrocyte nucleus in human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **16**:185-194.

Im HJ, Pacione C, Chubinskaya S, Van Wijnen AJ, Sun Y y Loeser RF (2003) Inhibitory effects of insulin-like growth factor-1 and osteogenic protein-1 on fibronectin fragment- and interleukin-1beta-stimulated matrix metalloproteinase-13 expression in human chondrocytes. *J Biol Chem* **278**:25386-25394.

Inoue H, Takamori M, Shimoyama Y, Ishibashi H, Yamamoto S y Koshihara Y (2002) Regulation by PGE2 of the production of interleukin-6, macrophage colony

stimulating factor, and vascular endothelial growth factor in human synovial fibroblasts. *Br J Pharmacol* **136**:287-295.

Inoue K, Takahashi T, Uehara K, Shimuzu H, Ido K, Morimatsu H, Omori E, Katayama H, Akagi R y Morita K (2008) Protective role of heme oxygenase 1 in the intestinal tissue injury in hemorrhagic shock in rats. *Shock* **29**:252-261.

Ishikawa K Heme oxygenase-1 against vascular insufficiency: roles of atherosclerotic disorders. *Curr Pharm Des* 2003 ;9 (30 ):2489 -97.

Itoh N, Semba S, Ito M, Takeda H, Kawata S y Yamakawa M (2002) Phosphorylation of Akt/PKB is required for suppression of cancer cell apoptosis and tumor progression in human colorectal carcinoma. *Cancer* **94**:3127-3134.

Iwanaga H, Matsumoto T, Enomoto H, Okano K, Hishikawa Y, Shindo H y Koji T (2005) Enhanced expression of insulin-like growth factor-binding proteins in human osteoarthritic cartilage detected by immunohistochemistry and in situ hybridization. *Osteoarthritis Cartilage* **13**:439-448.

Jaiswal M, LaRusso NF, Burgart LJ y Gores GJ (2000) Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res* **60**:184-190.

Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R y Samuelsson B (1999) Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:7220-7225.

Jiang X y Wang X (2004) Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* **73**:87-106.

Jiao H, Shen W, Ohe Y, Miura K, Tamura T y Saijo N (1992) A new 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay for testing macrophage cytotoxicity to L1210 and its drug-resistant cell lines in vitro. *Cancer Immunol Immunother* **35**:412-416.



### Referencias bibliográficas

---

Jobin C, Panja A, Hellerbrand C, Iimuro Y, Didonato J, Brenner DA y Sartor RB (1998) Inhibition of proinflammatory molecule production by adenovirus-mediated expression of a nuclear factor kappaB super-repressor in human intestinal epithelial cells. *J Immunol* **160**:410-418.

Jobin C y Sartor RB (2000) The I kappa B/NF-kappa B system: a key determinant of mucosalinflammation and protection. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**:C451-C462.

Kaiser GC y Polk DB (1997) Tumor necrosis factor alpha regulates proliferation in a mouse intestinal cell line. *Gastroenterology* **112**:1231-1240.

Kakazu T, Hara J, Matsumoto T, Nakamura S, Oshitani N, Arakawa T, Kitano A, Nakatani K, Kinjo F y Kuroki T (1999) Type 1 T-helper cell predominance in granulomas of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* **94**:2149-2155.

Kallen KJ (2002) The role of transsignalling via the agonistic soluble IL-6 receptor in human diseases. *Biochim Biophys Acta* **1592**:323-343.

Kallunki T, Su B, Tsigelny I, Sluss HK, Derijard B, Moore G, Davis R y Karin M (1994) JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Dev* **8**:2996-3007.

Kalvakolanu DV (2003) Alternate interferon signaling pathways. *Pharmacol Ther* **100**:1-29.

Kamio N, Hashizume H, Nakao S, Matsushima K y Sugiya H (2007) IL-1beta stimulates urokinase-type plasminogen activator expression and secretion in human dental pulp cells. *Biomed Res* **28**:315-322.

Kanety H, Shimon I, Ehrenfeld M, Israeli A, Pariente C y Karasik A (1996) Insulin-like growth factor I and its binding proteins 3 and 4 are increased in Human inflammatory synovial fluid. *J Rheumatol* **23**:815-818.

Karin M y Delhase M (2000) The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin Immunol* **12**:85-98.

Kasai K, Banba N, Hishinuma A, Matsumura M, Kakishita H, Matsumura M, Motohashi S, Sato N y Hattori Y (2000) 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) facilitates thyroglobulin production by cultured human thyrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**:C1859-C1869.

Keshavan P, Schwemberger SJ, Smith DL, Babcock GF y Zucker SD (2004) Unconjugated bilirubin induces apoptosis in colon cancer cells by triggering mitochondrial depolarization. *Int J Cancer* **112**:433-445.

Khachigian LM (2006) Early growth response-1 in cardiovascular pathobiology. *Circ Res* **98**:186-191.

Kim HA, Lee KB y Bae SC (2005) The mechanism of low-concentration sodium nitroprusside-mediated protection of chondrocyte death. *Arthritis Res Ther* **7**:R526-R535.

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR y Newmeyer DD (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**:1132-1136.

Knauper V, Murphy G y Tschesche H (1996a) Activation of human neutrophil procollagenase by stromelysin 2. *Eur J Biochem* **235**:187-191.

Knauper V, Will H, López-Otín C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H, Hembry RM y Murphy G (1996b) Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* **271**:17124-17131.

Knowles RG y Moncada S (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* **298** ( Pt 2):249-258.

### Referencias bibliográficas

---

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

Kojima F, Naraba H, Miyamoto S, Beppu M, Aoki H y Kawai S (2004) Membrane-associated prostaglandin E synthase-1 is upregulated by proinflammatory cytokines in chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* **6**:R355-R365.

Kruidenier L, Kuiper I, Lamers CB y Verspaget HW (2003) Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *J Pathol* **201**:28-36.

Kulik G y Weber MJ (1998) Akt-dependent and -independent survival signaling pathways utilized by insulin-like growth factor I. *Mol Cell Biol* **18**:6711-6718.

Kupper TS y Groves RW (1995) The interleukin-1 axis and cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol* **105**:62S-66S.

Kusano K, Miyaura C, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, Kamoi K y 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.

Kushida T, Quan S, Yang L, Ikehara S, Kappas A y Abraham NG (2002) A significant role for the heme oxygenase-1 gene in endothelial cell cycle progression. *Biochem Biophys Res Commun* **291**:68-75.

Kutty RK y Maines MD (1989) Selective induction of heme oxygenase-1 isozyme in rat testis by human chorionic gonadotropin. *Arch Biochem Biophys* **268**:100-107.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.

Lang D, Reuter S, Buzescu T, August C y Heidenreich S (2005) Heme-induced heme oxygenase-1 (HO-1) in human monocytes inhibits apoptosis despite caspase-3 up-regulation. *Int Immunol* 17:155-165.

Largo R, Álvarez-Soria MA, Díez-Ortego I, Calvo E, Sánchez-Pernaute O, Egido J y Herrero-Beaumont G (2003) Glucosamine inhibits IL-1beta-induced NFkappaB activation in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 11:290-298.

Lee C, Miura K, Liu X y Zweier JL (2000) Biphasic regulation of leukocyte superoxide generation by nitric oxide and peroxynitrite. *J Biol Chem* 275:38965-38972.

Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH y Kim KW (2004) Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 36:1-12.

León AJ, Garrote JA y Arranz E (2005) [Cytokines in the pathogeny of celiac disease]. *Med Clin (Barc)* 125:508-516.

Li A, Varney ML y Singh RK (2001) Expression of interleukin 8 and its receptors in human colon carcinoma cells with different metastatic potentials. *Clin Cancer Res* 7:3298-3304.

Li H, Gade P, Xiao W y Kalvakolanu DV (2007) The interferon signaling network and transcription factor C/EBP-beta. *Cell Mol Immunol* 4:407-418.

Li L, Xing FQ y Chen SL (2006) [Role of interleukin-1beta in regulating human cultured endometrial cell MMP-9 and TIMP-3 expressions in the mid-secretory phase]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 26:1143-1145.

Li X, Afif H, Cheng S, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Ranger P y Fahmi H (2005) Expression and regulation of microsomal prostaglandin E synthase-1 in human osteoarthritic cartilage and chondrocytes. *J Rheumatol* 32:887-895.

### Referencias bibliográficas

---

Li X, Schwacha MG, Chaudry IH y Choudhry MA (2008) Heme oxygenase-1 protects against neutrophil-mediated intestinal damage by down-regulation of neutrophil p47phox and p67phox activity and O<sub>2</sub>- production in a two-hit model of alcohol intoxication and burn injury. *J Immunol* **180**:6933-6940.

Liacini A, Sylvester J, Li WQ y Zafarullah M (2002) Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. *Matrix Biol* **21**:251-262.

Liaudet L, Soriano FG y Szabo C (2000) Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med* **28**:N37-N52.

Liu ZM, Chen GG, Ng EK, Leung WK, Sung JJ y Chung SC (2004) Upregulation of heme oxygenase-1 and p21 confers resistance to apoptosis in human gastric cancer cells. *Oncogene* **23**:503-513.

Livak KJ y Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* **25**:402-408.

Lo YY, Conquer JA, Grinstein S y Cruz TF (1998) Interleukin-1 beta induction of c-fos and collagenase expression in articular chondrocytes: involvement of reactive oxygen species. *J Cell Biochem* **69**:19-29.

Loeser RF, Carlson CS, Del Carlo M y Cole A (2002) Detection of nitrotyrosine in aging and osteoarthritic cartilage: Correlation of oxidative damage with the presence of interleukin-1beta and with chondrocyte resistance to insulin-like growth factor 1. *Arthritis Rheum* **46**:2349-2357.

Longo WE, Damore LJ, Mazuski JE, Smith GS, Panesar N y Kaminski DL (1998) The role of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide and interleukin-1 stimulated enterocyte prostanoid formation. *Mediators Inflamm* **7**:85-91.

López-Armada MJ, Vaamonde-García C, Caramés B, Lires-Deán M, Cillero-Pastor B y Blanco FJ (2007) Evidence of inflammatory mechanisms in osteoarthritis. *Reumatol Clin* 3:23-27.

López-Collazo E, Hortelano S, Rojas A y Boscá L (1998) Triggering of peritoneal macrophages with IFN-alpha/beta attenuates the expression of inducible nitric oxide synthase through a decrease in NF-kappaB activation. *J Immunol* 160:2889-2895.

Lotz M (1999) The role of nitric oxide in articular cartilage damage. *Rheum Dis Clin North Am* 25:269-282.

Lubberts E, Joosten LA, Oppers B, van den BL, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK, Schwarzenberger P, van de Loo FA y van den Berg WB (2001) IL-1-independent role of IL-17 in synovial inflammation and joint destruction during collagen-induced arthritis. *J Immunol* 167:1004-1013.

Luyten FP, Hascall VC, Nissley SP, Morales TI y Reddi AH (1988) Insulin-like growth factors maintain steady-state metabolism of proteoglycans in bovine articular cartilage explants. *Arch Biochem Biophys* 267:416-425.

Macdonald TT (1999) Effector and regulatory lymphoid cells and cytokines in mucosal sites. *Curr Top Microbiol Immunol* 236:113-135.

Macdonald TT y Monteleone G (2001) IL-12 and Th1 immune responses in human Peyer's patches. *Trends Immunol* 22:244-247.

Madry H, Zurakowski D y Trippel SB (2001) Overexpression of human insulin-like growth factor-I promotes new tissue formation in an ex vivo model of articular chondrocyte transplantation. *Gene Ther* 8:1443-1449.

Maines MD y Kappas A (1974) Cobalt induction of hepatic heme oxygenase; with evidence that cytochrome P-450 is not essential for this enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:4293-4297.

## Referencias bibliográficas

---

Maines MD, Trakshel GM y Kutty RK (1986) Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem* **261**:411-419.

Malemud CJ (2004) Protein kinases in chondrocyte signaling and osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res* **S145-S151**.

Malemud CJ (2006) Small molecular weight inhibitors of stress-activated and mitogen-activated protein kinases. *Mini Rev Med Chem* **6**:689-698.

Malemud CJ (2007) MAP Kinases, en *Osteoarthritis, inflammation and degradation: a continuum* (Buckwalter J, Lotz M y Stoltz J-F eds) páginas 99-117.

Malfait AM, Liu RQ, Ijiri K, Komiya S y Tortorella MD (2002) Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem* **277**:22201-22208.

Maliner-Stratton MS, Klein RD, Udayakumar TS, Nagle RB y Bowden GT (2001) Interleukin-1beta-induced promatrilysin expression is mediated by NFkappaB-regulated synthesis of interleukin-6 in the prostate carcinoma cell line, LNCaP. *Neoplasia* **3**:509-520.

Mandelker L (2008) Introduction to oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **38**:1-30, v.

Mankin HJ y Thrasher AZ (1975) Water content and binding in normal and osteoarthritic human cartilage. *J Bone Joint Surg Am* **57**:76-80.

Marchetti P (2005) [Apoptosis: basic knowledge and applications]. *Gynecol Obstet Fertil* **33**:632-641.

Marte BM y Downward J (1997) PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci* **22**:355-358.

Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP y Roughley PJ (2008) Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **22**:351-384.

*Referencias bibliográficas*

---

Martel-Pelletier J y Pelletier JP (2007) Inflammatory factors involved in osteoarthritis, en *Osteoarthritis, inflammation and degradation: a continuum* (Buckwalter J, Lotz M y Stoltz J-F eds) páginas 3-13.

Martel-Pelletier J, Welsch DJ y Pelletier JP (2001) Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **15**:805-829.

Martel-Pelletier J (1999) Proinflammatory mediators and osteoarthritis. *Osteoarthritis. Cartilage*. **7**:315-316.

Martin JA, Ellerbroek SM y Buckwalter JA (1997) Age-related decline in chondrocyte response to insulin-like growth factor-I: the role of growth factor binding proteins. *J Orthop Res* **15**:491-498.

Martindale JL y Holbrook NJ (2002) Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* **192**:1-15.

Massagué J (2004) G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* **432**:298-306.

Masuko-Hongo K, Berenbaum F, Humbert L, Salvat C, Goldring MB y Thirion S (2004) Up-regulation of microsomal prostaglandin E synthase 1 in osteoarthritic human cartilage: critical roles of the ERK-1/2 and p38 signaling pathways. *Arthritis Rheum* **50**:2829-2838.

Matsuno K, Adachi Y, Yamamoto H, Goto A, Arimura Y, Endo T, Itoh F e Imai K (2003) The expression of matrix metalloproteinase matrilysin indicates the degree of inflammation in ulcerative colitis. *J Gastroenterol* **38**:348-354.

Mayerhofer M, Florian S, Krauth MT, Aichberger KJ, Bilban M, Marculescu R, Printz D, Fritsch G, Wagner O, Selzer E, Sperr WR, Valent P y Sillaber C (2004) Identification of heme oxygenase-1 as a novel BCR/ABL-dependent survival factor in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res* **64**:3148-3154.

Mayne R y Ala-Kokko L (2005) Collagen structure and function, in *Arthritis and allied conditions* pp 189-209.



### Referencias bibliográficas

---

Mazzucchelli L, Hauser C, Zraggen K, Wagner H, Hess M, Laissue JA y Mueller C (1994) Expression of interleukin-8 gene in inflammatory bowel disease is related to the histological grade of active inflammation. *Am J Pathol* **144**:997-1007.

McCoubrey WK, Jr., Ewing JF y Maines MD (1992) Human heme oxygenase-2: characterization and expression of a full-length cDNA and evidence suggesting that the two HO-2 transcripts may differ by choice of polyadenylation signal. *Arch Biochem Biophys* **295**:13-20.

McCoubrey WK, Jr., Huang TJ y Maines MD (1997) Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* **247**:725-732.

McQuillan DJ, Handley CJ, Campbell MA, Bolis S, Milway VE y Herington AC (1986) Stimulation of proteoglycan biosynthesis by serum and insulin-like growth factor-I in cultured bovine articular cartilage. *Biochem J* **240**:423-430.

Medina C, Santana A, Quintero E, Radomski MW y Guarner F (2004) [Matrix metalloproteinases in diseases of the gastrointestinal tract]. *Gastroenterol Hepatol* **27**:491-497.

Medina C, Videla S, Radomski A, Radomski MW, Antolín M, Guarner F, Vilaseca J, Salas A y Malagelada JR (2003) Increased activity and expression of matrix metalloproteinase-9 in a rat model of distal colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**:G116-G122.

Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A y Brinckerhoff CE (2000) Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum* **43**:801-811.

*Referencias bibliográficas*

---

Mi Z, Ghivizzani SC, Lechman ER, Jaffurs D, Glorioso JC, Evans CH y Robbins PD (2000) Adenovirus-mediated gene transfer of insulin-like growth factor 1 stimulates proteoglycan synthesis in rabbit joints. *Arthritis Rheum* **43**:2563-2570.

Middleton JF y Tyler JA (1992) Upregulation of insulin-like growth factor I gene expression in the lesions of osteoarthritic human articular cartilage. *Ann Rheum Dis* **51**:440-447.

Middleton SJ, Shorthouse M y Hunter JO (1993) Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. *Lancet* **341**:465-466.

Mietz H, Esser JM, Welsandt G, Kociok N, Hueber A, Jousen A, Esser P y Krieglstein GK (2003) Latanoprost stimulates secretion of matrix metalloproteinases in tenon fibroblasts both in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**:5182-5188.

Milner JM, Elliott SF y Cawston TE (2001) Activation of procollagenases is a key control point in cartilage collagen degradation: interaction of serine and metalloproteinase pathways. *Arthritis Rheum* **44**:2084-2096.

Minisini MP, Kantengwa S y Polla BS (1994) DNA damage and stress protein synthesis induced by oxidative stress proceed independently in the human premonocytic line U937. *Mutat Res* **315**:169-179.

Misko TP, Schilling RJ, Salvemini D, Moore WM y Currie MG (1993) A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal Biochem* **214**:11-16.

Mitani K, Fujita H, Fukuda Y, Kappas A y Sassa S (1993) The role of inorganic metals and metalloporphyrins in the induction of haem oxygenase and heat-shock protein 70 in human hepatoma cells. *Biochem J* **290** ( Pt 3):819-825.

Miwa M, Saura R, Hirata S, Hayashi Y, Mizuno K e Itoh H (2000) Induction of apoptosis in bovine articular chondrocyte by prostaglandin E(2) through cAMP-dependent pathway. *Osteoarthritis Cartilage* **8**:17-24.

### Referencias bibliográficas

---

Mizukami Y, Jo WS, Duerr EM, Gala M, Li J, Zhang X, Zimmer MA, Iliopoulos O, Zukerberg LR, Kohgo Y, Lynch MP, Rueda BR y Chung DC (2005) Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1alpha-deficient colon cancer cells. *Nat Med* **11**:992-997.

Moldovan F, Pelletier JP, Hambor J, Cloutier JM y Martel-Pelletier J (1997) Collagenase-3 (matrix metalloprotease 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ: in vitro mimicking effect by transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum* **40**:1653-1661.

Morales TI (2002) The insulin-like growth factor binding proteins in uncultured human cartilage: increases in insulin-like growth factor binding protein 3 during osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **46**:2358-2367.

Morales TI (2008) The quantitative and functional relation between insulin-like growth factor-I (IGF) and IGF-binding proteins during human osteoarthritis. *J Orthop Res* **26**:465-474.

Moroney MA, Alcaraz MJ, Forder RA, Carey F y Hoult JR (1988) Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *J Pharm Pharmacol* **40**:787-792.

Motterlini R, Clark JE, Foresti R, Sarathchandra P, Mann BE y Green CJ (2002) Carbon monoxide-releasing molecules: characterization of biochemical and vascular activities. *Circ Res* **90**:E17-E24.

Motterlini R, Gonzales A, Foresti R, Clark JE, Green CJ y Winslow RM (1998) Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide contributes to the suppression of acute hypertensive responses in vivo. *Circ Res* **83**:568-577.

Moulharat N, Lesur C, Thomas M, Rolland-Valognes G, Pastoureau P, Anract P, De Ceuninck F y Sabatini M (2004) Effects of transforming growth factor-beta on

aggrecanase production and proteoglycan degradation by human chondrocytes in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* **12**:296-305.

Mudter J y Neurath MF (2007) IL-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance. *Inflamm Bowel Dis* **13**:1016-1023.

Muhlbauer M, Allard B, Bosserhoff AK, Kiessling S, Herfarth H, Rogler G, Scholmerich J, Jobin C y Hellerbrand C (2004) Differential effects of deoxycholic acid and taurodeoxycholic acid on NF-kappa B signal transduction and IL-8 gene expression in colonic epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**:G1000-G1008.

Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, Kojima F, Ikeda T, Fueki M, Ueno A, Oh S y Kudo I (2000) Regulation of prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E<sub>2</sub> synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* **275**:32783-32792.

Murphy G y Lee MH (2005) What are the roles of metalloproteinases in cartilage and bone damage? *Ann Rheum Dis* **64 Suppl 4**:iv44-iv47.

Murray AW (2004) Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* **116**:221-234.

Nagase H, Barrett AJ y Woessner JF, Jr. (1992) Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. *Matrix Suppl* **1**:421-424.

Nagase H y Kashiwagi M (2003) Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res Ther* **5**:94-103.

Nagase H y Woessner JF, Jr. (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* **274**:21491-21494.

Naito S, Shiomi T, Okada A, Kimura T, Chijiwa M, Fujita Y, Yatabe T, Komiya K, Enomoto H, Fujikawa K y Okada Y (2007) Expression of ADAMTS4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic cartilage. *Pathol Int* **57**:703-711.

### Referencias bibliográficas

---

Naito Y, Takagi T y Yoshikawa T (2004) Heme oxygenase-1: a new therapeutic target for inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* **20 Suppl 1**:177-184.

Naraba H, Yokoyama C, Tago N, Murakami M, Kudo I, Fueki M, Oh-Ishi S y Tanabe T (2002) Transcriptional regulation of the membrane-associated prostaglandin E<sub>2</sub> synthase gene. Essential role of the transcription factor Egr-1. *J Biol Chem* **277**:28601-28608.

Neurath MF, Finotto S, Fuss I, Boirivant M, Galle PR y Strober W (2001) Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: to die or not to die, that is the mucosal question. *Trends Immunol* **22**:21-26.

Newell KJ, Matrisian LM y Driman DK (2002) Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) expression in ulcerative colitis-related tumorigenesis. *Mol Carcinog* **34**:59-63.

Nietfeld JJ, Wilbrink B, Helle M, van Roy JL, den Otter W, Swaak AJ y Huber-Bruning O (1990) Interleukin-1-induced interleukin-6 is required for the inhibition of proteoglycan synthesis by interleukin-1 in human articular cartilage. *Arthritis Rheum* **33**:1695-1701.

Nishie A, Ono M, Shono T, Fukushi J, Otsubo M, Onoue H, Ito Y, Inamura T, Ikezaki K, Fukui M, Iwaki T y Kuwano M (1999) Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. *Clin Cancer Res* **5**:1107-1113.

Nosho K, Yoshida M, Yamamoto H, Taniguchi H, Adachi Y, Mikami M, Hinoda Y e Imai K (2005) Association of Ets-related transcriptional factor E1AF expression with overexpression of matrix metalloproteinases, COX-2 and iNOS in the early stage of colorectal carcinogenesis. *Carcinogenesis* **26**:892-899.

Notoya K, Jovanovic DV, Reboul P, Martel-Pelletier J, Mineau F y Pelletier JP (2000) The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric

oxide is related to the production of prostaglandin E<sub>2</sub> via the induction of cyclooxygenase-2. *J Immunol* **165**:3402-3410.

O'Neill GP y Ford-Hutchinson AW (1993) Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett* **330**:156-160.

Okada Y, Konomi H, Yada T, Kimata K y Nagase H (1989) Degradation of type IX collagen by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) from human rheumatoid synovial cells. *FEBS Lett* **244**:473-476.

Olney RC, Tsuchiya K, Wilson DM, Mohtai M, Maloney WJ, Schurman DJ y Smith RL (1996) Chondrocytes from osteoarthritic cartilage have increased expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 (IGFBP-3) and -5, but not IGF-II or IGFBP-4. *J Clin Endocrinol Metab* **81**:1096-1103.

Oltvai ZN, Milliman CL y Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**:609-619.

Ono K y Han J (2000) The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* **12**:1-13.

Overhaus M, Moore BA, Barbato JE, Behrendt FF, Doering JG y Bauer AJ (2006) Biliverdin protects against polymicrobial sepsis by modulating inflammatory mediators. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**:G695-G703.

Pae HO, Choi BM, Oh GS, Lee MS, Ryu DG, Rhew HY, Kim YM y Chung HT (2004) Roles of heme oxygenase-1 in the antiproliferative and antiapoptotic effects of nitric oxide on Jurkat T cells. *Mol Pharmacol* **66**:122-128.

Palmer G, Guerne PA, Mezin F, Maret M, Guicheux J, Goldring MB, y Gabay C (2002) Production of interleukin-1 receptor antagonist by human articular chondrocytes. *Arthritis Res.* **4**:226-231.

### Referencias bibliográficas

---

Palmer LA, Gaston B y Johns RA (2000) Normoxic stabilization of hypoxia-inducible factor-1 expression and activity: redox-dependent effect of nitrogen oxides. *Mol Pharmacol* **58**:1197-1203.

Parikh AA, Salzman AL, Kane CD, Fischer JE y Hasselgren PO (1997) IL-6 production in human intestinal epithelial cells following stimulation with IL-1 beta is associated with activation of the transcription factor NF-kappa B. *J Surg Res* **69**:139-144.

Paul G, Bataille F, Obermeier F, Bock J, Klebl F, Strauch U, Lochbaum D, Rummele P, Farkas S, Scholmerich J, Fleck M, Rogler G y Herfarth H (2005) Analysis of intestinal haem-oxygenase-1 (HO-1) in clinical and experimental colitis. *Clin Exp Immunol* **140**:547-555.

Payá M, García PP, Coloma J y Alcaraz MJ (1997) Nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase pathways in the inflammatory response induced by zymosan in the rat air pouch. *Br J Pharmacol* **120**:1445-1452.

Pelletier JP, Boileau C, Boily M, Brunet J, Mineau F, Geng C, Reboul P, Laufer S, Lajeunesse D y Martel-Pelletier J (2005) The protective effect of licofelone on experimental osteoarthritis is correlated with the downregulation of gene expression and protein synthesis of several major cartilage catabolic factors: MMP-13, cathepsin K and aggrecanases. *Arthritis Res Ther* **7**:R1091-R1102.

Pelletier JP y Martel-Pelletier J (1989) Evidence for the involvement of interleukin 1 in human osteoarthritic cartilage degradation: protective effect of NSAID. *J Rheumatol Suppl* **18**:19-27.

Pelletier JP, Mineau F, Ranger P, Tardif G y Martel-Pelletier J (1996) The increased synthesis of inducible nitric oxide inhibits IL-1ra synthesis by human articular chondrocytes: possible role in osteoarthritic cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* **4**:77-84.

Pender SL, Tickle SP, Docherty AJ, Howie D, Wathen NC y Macdonald TT (1997) A major role for matrix metalloproteinases in T cell injury in the gut. *J Immunol* **158**:1582-1590.

Perrella MA y Yet SF (2003) Role of heme oxygenase-1 in cardiovascular function. *Curr Pharm Des* **9**:2479-2487.

Petrache I, Otterbein LE, Alam J, Wiegand GW y Choi AM (2000) Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **278**:L312-L319.

Piantadosi CA (2002) Biological chemistry of carbon monoxide. *Antioxid Redox Signal* **4**:259-270.

Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, Masakowski VR, Griffin GL, Senior RM y Deuel TF (1989) Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J Cell Biol* **109**:429-440.

Plaas A, Osborn B, Yoshihara Y, Bai Y, Bloom T, Nelson F, Mikecz K y Sandy JD (2007) Aggrecanolytic in human osteoarthritis: confocal localization and biochemical characterization of ADAMTS5-hyaluronan complexes in articular cartilages. *Osteoarthritis Cartilage* **15**:719-734.

Podolsky DK (2002) Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* **347**:417-429.

Poole AR, Nelson F, Dahlberg L, Tchetina E, Kobayashi M, Yasuda T, Lavery S, Squires G, Kojima T, Wu W y Billingham RC (2003) Proteolysis of the collagen fibril in osteoarthritis. *Biochem Soc Symp* **115**:115-123.

Porter S, Clark IM, Kevorkian L y Edwards DR (2005) The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J* **386**:15-27.

Pouyssegur J, Volmat V y Lenormand P (2002) Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol* **64**:755-763.



### Referencias bibliográficas

---

Radi R, Beckman JS, Bush KM y Freeman BA (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* **266**:4244-4250.

Reginato AM, Iozzo RV y Jiménez SA (1994) Formation of nodular structures resembling mature articular cartilage in long-term primary cultures of human fetal epiphyseal chondrocytes on a hydrogel substrate. *Arthritis Rheum* **37**:1338-1349.

Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Kenney JS, Baumann R, Poindron P y Duclos B (1996) Increased production of tumour necrosis factor-alpha interleukin-1 beta, and interleukin-6 by morphologically normal intestinal biopsies from patients with Crohn's disease. *Gut* **39**:684-689.

Revzin A (1989) Gel electrophoresis assays for DNA-protein interactions. *Biotechniques* **7**:346-355.

Ricchi P, Palma AD, Matola TD, Apicella A, Fortunato R, Zarrilli R y Acquaviva AM (2003) Aspirin protects Caco-2 cells from apoptosis after serum deprivation through the activation of a phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/p21Cip/WAF1 pathway. *Mol Pharmacol* **64**:407-414.

Rivat C, Le Floch N, Sabbah M, Teyrol I, Redeuilh G, Bruyneel E, Mareel M, Matrisian LM, Crawford HC, Gespach C y Attoub S (2003) Synergistic cooperation between the AP-1 and LEF-1 transcription factors in activation of the matrilysin promoter by the src oncogene: implications in cellular invasion. *FASEB J* **17**:1721-1723.

Roberts GP, Youn H y Kerby RL (2004) CO-sensing mechanisms. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**:453-473.

Roebuck KA (1999) Regulation of interleukin-8 gene expression. *J Interferon Cytokine Res* **19**:429-438.

Rogachefsky RA, Dean DD, Howell DS y Altman RD (1994) Treatment of canine osteoarthritis with sodium pentosan polysulfate and insulin-like growth factor-1. *Ann N Y Acad Sci* **732**:392-394.

Rojo AI, Sagarra MR y Cuadrado A (2008) GSK-3beta down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. *J Neurochem* **105**:192-202.

Rose-John S, Mitsuyama K, Matsumoto S, Thaiss WM y Scheller J (2009) Interleukin-6 trans-signaling and colonic cancer associated with inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des* **15**:2095-2103.

Rosse T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, Jansen B y Borner C (1998) Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* **391**:496-499.

Rot A y von Andrian UH (2004) Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* **22**:891-928.

Roy SK, Wachira SJ, Weihua X, Hu J y Kalvakolanu DV (2000) CCAAT/enhancer-binding protein-beta regulates interferon-induced transcription through a novel element. *J Biol Chem* **275**:12626-12632.

Rueda B, Oliver J, Robledo G, López-Nevot MA, Balsa A, Pascual-Salcedo D, González-Gay MA, González-Escribano MF y Martín J (2007) HO-1 promoter polymorphism associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **56**:3933-3958.

Rugtveit J, Nilsen EM, Bakka A, Carlsen H, Brandtzaeg P y Scott H (1997) Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of mucosal macrophages from inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **112**:1493-1505.

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

### Referencias bibliográficas

---

Ryter SW y Otterbein LE (2004) Carbon monoxide in biology and medicine. *Bioessays* **26**:270-280.

Saha N, Moldovan F, Tardif G, Pelletier JP, Cloutier JM y Martel-Pelletier J (1999) Interleukin-1beta-converting enzyme/caspase-1 in human osteoarthritic tissues: localization and role in the maturation of interleukin-1beta and interleukin-18. *Arthritis Rheum* **42**:1577-1587.

Salmela MT, Pender SL, Karjalainen-Lindsberg ML, Puolakkainen P, Macdonald TT y Saarialho-Kere U (2004) Collagenase-1 (MMP-1), matrilysin-1 (MMP-7), and stromelysin-2 (MMP-10) are expressed by migrating enterocytes during intestinal wound healing. *Scand J Gastroenterol* **39**:1095-1104.

Salo DC, Pacifici RE, Lin SW, Giulivi C y Davies KJ (1990) Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation. *J Biol Chem* **265**:11919-11927.

Sandy JD (2006) A contentious issue finds some clarity: on the independent and complementary roles of aggrecanase activity and MMP activity in human joint aggrecanolytic. *Osteoarthritis Cartilage* **14**:95-100.

Sandy JD, Flannery CR, Neame PJ y Lohmander LS (1992) The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence for the involvement in osteoarthritis of a novel proteinase which cleaves the Glu 373-Ala 374 bond of the interglobular domain. *J Clin Invest* **89**:1512-1516.

Sarady JK, Zuckerbraun BS, Bilban M, Wagner O, Usheva A, Liu F, Ifedigbo E, Zamora R, Choi AM y Otterbein LE (2004) Carbon monoxide protection against endotoxic shock involves reciprocal effects on iNOS in the lung and liver. *FASEB J* **18**:854-856.

Sastre J, Pallardó FV y Viña J (2000) Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life* **49**:427-435.

Sawle P, Foresti R, Mann BE, Johnson TR, Green CJ y Motterlini R (2005) Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs) attenuate the inflammatory response elicited by lipopolysaccharide in RAW264.7 murine macrophages. *Br J Pharmacol* **145**:800-810.

Schmidt MB, Chen EH y Lynch SE (2006) A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis Cartilage* **14**:403-412.

Schreiber S, Rosenstiel P, Hampe J, Nikolaus S, Groessner B, Schottelius A, Kuhbacher T, Hamling J, Folsch UR y Seegert D (2002) Activation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 in human chronic inflammatory bowel disease. *Gut* **51**:379-385.

Scott JR, Cukiernik MA, Ott MC, Bihari A, Badhwar A, Gray DK, Harris KA, Parry NG y Potter RF (2009) Low-dose inhaled carbon monoxide attenuates the remote intestinal inflammatory response elicited by hindlimb ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**:G9-G14.

Seidelin JB y Nielsen OH (2005) Continuous cytokine exposure of colonic epithelial cells induces DNA damage. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **17**:363-369.

Semenza GL (2000) HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* **88**:1474-1480.

Shanahan F (2002) Crohn's disease. *Lancet* **359**:62-69.

Shapiro SD, Kobayashi DK, Pentland AP y Welgus HG (1993) Induction of macrophage metalloproteinases by extracellular matrix. Evidence for enzyme- and substrate-specific responses involving prostaglandin-dependent mechanisms. *J Biol Chem* **268**:8170-8175.

Shaulian E y Karin M (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* **4**:E131-E136.

### Referencias bibliográficas

---

Shinmei M, Masuda K, Kikuchi T, Shimomura Y y Okada Y (1991) Production of cytokines by chondrocytes and its role in proteoglycan degradation. *J Rheumatol Suppl* **27**:89-91.

Shiue H, Musch MW, Wang Y, Chang EB y Turner JR (2005) Akt2 phosphorylates ezrin to trigger NHE3 translocation and activation. *J Biol Chem* **280**:1688-1695.

Singer II, Kawka DW, Scott S, Weidner JR, Mumford RA, Riehl TE y Stenson WF (1996) Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **111**:871-885.

Skundric DS, Bealmear B y Lisak RP (1997) Induced upregulation of IL-1, IL-1RA and IL-1R type I gene expression by Schwann cells. *J Neuroimmunol* **74**:9-18.

Snyder SH, Jaffrey SR y Zakhary R (1998) Nitric oxide and carbon monoxide: parallel roles as neural messengers. *Brain Res Brain Res Rev* **26**:167-175.

Soares MP, Usheva A, Brouard S, Berberat PO, Gunther L, Tobiasch E y Bach FH (2002) Modulation of endothelial cell apoptosis by heme oxygenase-1-derived carbon monoxide. *Antioxid Redox Signal* **4**:321-329.

Song R, Zhou Z, Kim PK, Shapiro RA, Liu F, Ferran C, Choi AM y Otterbein LE (2004) Carbon monoxide promotes Fas/CD95-induced apoptosis in Jurkat cells. *J Biol Chem* **279**:44327-44334.

Song RH, Tortorella MD, Malfait AM, Alston JT, Yang Z, Arner EC y Griggs DW (2007) Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Arthritis Rheum* **56**:575-585.

Stanton H, Rogerson FM, East CJ, Golub SB, Lawlor KE, Meeker CT, Little CB, Last K, Farmer PJ, Campbell IK, Fourie AM y Fosang AJ (2005) ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature* **434**:648-652.

Stichtenoth DO, Thoren S, Bian H, Peters-Golden M, Jakobsson PJ y Crofford LJ (2001) Microsomal prostaglandin E synthase is regulated by proinflammatory

cytokines and glucocorticoids in primary rheumatoid synovial cells. *J Immunol* **167**:469-474.

Stiehl DP, Jelkmann W, Wenger RH y Hellwig-Burgel T (2002) Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1alpha by insulin and interleukin-1beta involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett* **512**:157-162.

Stierum R, Gaspari M, Dommels Y, Ouatas T, Pluk H, Jespersen S, Vogels J, Verhoeckx K, Groten J y van Ommen B (2003) Proteome analysis reveals novel proteins associated with proliferation and differentiation of the colorectal cancer cell line Caco-2. *Biochim Biophys Acta* **1650**:73-91.

Stiles B, Gilman V, Khanzenon N, Lesche R, Li A, Qiao R, Liu X y Wu H (2002) Essential role of AKT-1/protein kinase B alpha in PTEN-controlled tumorigenesis. *Mol Cell Biol* **22**:3842-3851.

Stocker R (1990) Induction of haem oxygenase as a defence against oxidative stress. *Free Radic Res Commun* **9**:101-112.

Stocker R y 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 y Ames BN (1987) Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* **235**:1043-1046.

Strater J, Wellisch I, Riedl S, Walczak H, Koretz K, Tandara A, Krammer PH y Moller P (1997) CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis in colon epithelial cells: a possible role in ulcerative colitis. *Gastroenterology* **113**:160-167.

Strober W, Kelsall B, Fuss I, Marth T, Ludviksson B, Ehrhardt R y Neurath M (1997) Reciprocal IFN-gamma and TGF-beta responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunol Today* **18**:61-64.

## Referencias bibliográficas

---

Struglics A, Larsson S, Pratta MA, Kumar S, Lark MW y Lohmander LS (2006) Human osteoarthritis synovial fluid and joint cartilage contain both aggrecanase- and matrix metalloproteinase-generated aggrecan fragments. *Osteoarthritis Cartilage* **14**:101-113.

Sturm A, de Souza HS y Fiocchi C (2008) Mucosal T cell proliferation and apoptosis in inflammatory bowel disease. *Curr Drug Targets* **9**:381-387.

Sztrolovics R, Grover J, Cs-Szabo G, Shi SL, Zhang Y, Mort JS y Roughley PJ (2002) The characterization of versican and its message in human articular cartilage and intervertebral disc. *J Orthop Res* **20**:257-266.

Tak PP y Firestein GS (2001) NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* **107**:7-11.

Tamion F, Richard V, Renet S y Thuillez C (2007) Intestinal preconditioning prevents inflammatory response by modulating heme oxygenase-1 expression in endotoxic shock model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**:G1308-G1314.

Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakami M y Kudo I (2000) Molecular identification of cytosolic prostaglandin E<sub>2</sub> synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis. *J Biol Chem* **275**:32775-32782.

Tardif G, Pelletier JP, Dupuis M, Geng C, Cloutier JM y Martel-Pelletier J (1999) Collagenase 3 production by human osteoarthritic chondrocytes in response to growth factors and cytokines is a function of the physiologic state of the cells. *Arthritis Rheum* **42**:1147-1158.

Tardif G, Reboul P, Pelletier JP, Geng C, Cloutier JM y Martel-Pelletier J (1996) Normal expression of type 1 insulin-like growth factor receptor by human osteoarthritic chondrocytes with increased expression and synthesis of insulin-like growth factor binding proteins. *Arthritis Rheum* **39**:968-978.

Tardif G, Reboul P, Pelletier JP y Martel-Pelletier J (2004) Ten years in the life of an enzyme: the story of the human MMP-13 (collagenase-3). *Mod Rheumatol* 14:197-204.

Tarlton JF, Whiting CV, Tunmore D, Bregenholt S, Reimann J, Claesson MH y Bland PW (2000) The role of up-regulated serine proteases and matrix metalloproteinases in the pathogenesis of a murine model of colitis. *Am J Pathol* 157:1927-1935.

Tavera C, Abribat T, Reboul P, Dore S, Brazeau P, Pelletier JP y Martel-Pelletier J (1996) IGF and IGF-binding protein system in the synovial fluid of osteoarthritic and rheumatoid arthritic patients. *Osteoarthritis Cartilage* 4:263-274.

Tchetina EV, Di Battista JA, Zukor DJ, Antoniou J y Poole AR (2007) Prostaglandin PGE<sub>2</sub> at very low concentrations suppresses collagen cleavage in cultured human osteoarthritic articular cartilage: this involves a decrease in expression of proinflammatory genes, collagenases and COL10A1, a gene linked to chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Res Ther* 9:R75.

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

Tetlow LC, Adlam DJ y Woolley DE (2001) Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum* 44:585-594.

Thilakawardhana S, Everett DM, Murdock PR, Dingwall C y Owen JS (2005) Quantification of apolipoprotein E receptors in human brain-derived cell lines by real-time polymerase chain reaction. *Neurobiol Aging* 26:813-823.

Thomas B, Berenbaum F, Humbert L, Bian H, Bereziat G, Crofford L y Olivier JL (2000) Critical role of C/EBPdelta and C/EBPbeta factors in the stimulation of the cyclooxygenase-2 gene transcription by interleukin-1beta in articular chondrocytes. *Eur J Biochem* 267:6798-6809.



### Referencias bibliográficas

---

Thoreson R y Cullen JJ (2007) Pathophysiology of inflammatory bowel disease: an overview. *Surg Clin North Am* **87**:575-585.

Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J y cols. (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* **356**:768-774.

Thornberry NA y Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* **281**:1312-1316.

Towbin H, Staehelin T y Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:4350-4354.

Tracz MJ, Alam J y Nath KA (2007) Physiology and pathophysiology of heme: implications for kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **18**:414-420.

Trebino CE, Stock JL, Gibbons CP, Naiman BM, Wachtmann TS, Umland JP, Pandher K, Lapointe JM, Saha S, Roach ML, Carter D, Thomas NA, Durtschi BA, McNeish JD, Hambor JE, Jakobsson PJ, Carty TJ, Pérez JR y Audoly LP (2003) Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:9044-9049.

Tsui TY, Siu YT, Schlitt HJ y Fan ST (2005) Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide stimulates adenosine triphosphate generation in human hepatocyte. *Biochem Biophys Res Commun* **336**:898-902.

Turcanu V, Dhoub M y Poindron P (1998) Nitric oxide synthase inhibition by haem oxygenase decreases macrophage nitric-oxide-dependent cytotoxicity: a negative feedback mechanism for the regulation of nitric oxide production. *Res Immunol* **149**:741-744.

Tyler JA (1989) Insulin-like growth factor 1 can decrease degradation and promote synthesis of proteoglycan in cartilage exposed to cytokines. *Biochem J* **260**:543-548.

Uc A y Britigan BE (2003) Does heme oxygenase-1 have a role in Caco-2 cell cycle progression? *Exp Biol Med (Maywood)* **228**:590-595.

Urquhart P, Rosignoli G, Cooper D, Motterlini R y Perretti M (2007) Carbon monoxide-releasing molecules modulate leukocyte-endothelial interactions under flow. *J Pharmacol Exp Ther* **321**:656-662.

van de Loosdrecht AA, Nennie E, Ossenkoppele GJ, Beelen RH y Langenhuijsen MM (1991) Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. *J Immunol Methods* **141**:15-22.

van den Berg WB (2001) Uncoupling of inflammatory and destructive mechanisms in arthritis. *Semin Arthritis Rheum* **30**:7-16.

van der Korst JK, Skoloff L y Miller EJ (1968) Senescent pigmentation of cartilage and degenerative joint disease. *Arch Pathol* **86**:40-47.

van der Kraan PM y van den Berg WB (2000) Anabolic and destructive mediators in osteoarthritis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **3**:205-211.

Verstege MI, te Velde AA y Hommes DW (2006) Apoptosis as a therapeutic paradigm in inflammatory bowel diseases. *Acta Gastroenterol Belg* **69**:406-412.

Viatour P, Merville MP, Bours V y Chariot A (2005) Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci* **30**:43-52.

von Lampe B, Barthel B, Coupland SE, Riecken EO y Rosewicz S (2000) Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **47**:63-73.

## Referencias bibliográficas

---

Wagner CT, Durante W, Christodoulides N, Hellums JD y Schafer AI (1997) Hemodynamic forces induce the expression of heme oxygenase in cultured vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* **100**:589-596.

Wagner EF y Eferl R (2005) Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunol Rev* **208**:126-140.

Wang GL y Semenza GL (1993) General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:4304-4308.

Wang J, Elewaut D, Veys EM y Verbruggen G (2003) Insulin-like growth factor 1-induced interleukin-1 receptor II overrides the activity of interleukin-1 and controls the homeostasis of the extracellular matrix of cartilage. *Arthritis Rheum* **48**:1281-1291.

Wang WP, Guo X, Koo MW, Wong BC, Lam SK, Ye YN y Cho CH (2001) Protective role of heme oxygenase-1 on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**:G586-G594.

Watkins CC, Boehning D, Kaplin AI, Rao M, Ferris CD y Snyder SH (2004) Carbon monoxide mediates vasoactive intestinal polypeptide-associated nonadrenergic/noncholinergic neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:2631-2635.

Weaver LK, Hopkins RO y Elliott G (1999) Carbon monoxide poisoning. *N Engl J Med* **340**:1290.

Westbrook AM, Wei B, Braun J y Schiestl RH (2009) Intestinal mucosal inflammation leads to systemic genotoxicity in mice. *Cancer Res* **69**:4827-4834.

Wewers MD, Dare HA, Winnard AV, Parker JM y Miller DK (1997) IL-1 beta-converting enzyme (ICE) is present and functional in human alveolar macrophages: macrophage IL-1 beta release limitation is ICE independent. *J Immunol* **159**:5964-5972.

Wielockx B, Libert C y Wilson C (2004) Matrilysin (matrix metalloproteinase-7): a new promising drug target in cancer and inflammation? *Cytokine Growth Factor Rev* **15**:111-115.

Williams SC, Baer M, Dillner AJ y Johnson PF (1995) CRP2 (C/EBP beta) contains a bipartite regulatory domain that controls transcriptional activation, DNA binding and cell specificity. *EMBO J* **14**:3170-3183.

Wilson CL, Heppner KJ, Labosky PA, Hogan BL y Matrisian LM (1997) Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:1402-1407.

Witsch-Prehm P, Miehke R y Kresse H (1992) Presence of small proteoglycan fragments in normal and arthritic human cartilage. *Arthritis Rheum* **35**:1042-1052.

Witty JP, McDonnell S, Newell KJ, Cannon P, Navre M, Tressler RJ y Matrisian LM (1994) Modulation of matrilysin levels in colon carcinoma cell lines affects tumorigenicity in vivo. *Cancer Res* **54**:4805-4812.

Wooley PH, Grimm MJ y Radin EL (2005) The structure and function of joints, en *Arthritis and allied conditions* páginas 149-173.

Wu W, Billingham RC, Pidoux I, Antoniou J, Zukor D, Tanzer M y Poole AR (2002) Sites of collagenase cleavage and denaturation of type II collagen in aging and osteoarthritic articular cartilage and their relationship to the distribution of matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 13. *Arthritis Rheum* **46**:2087-2094.

Xie D, Hui F y Homandberg GA (1993) Fibronectin fragments alter matrix protein synthesis in cartilage tissue cultured in vitro. *Arch Biochem Biophys* **307**:110-118.

Yamada H, Kikuchi T, Nemoto O, Obata K, Sato H, Seiki M y Shinmei M (1996) Effects of indomethacin on the production of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 by human articular chondrocytes. *J Rheumatol* **23**:1739-1743.

## Referencias bibliográficas

---

Yamakawa K, Kamekura S, Kawamura N, Saegusa M, Kamei D, Murakami M, Kudo I, Uematsu S, Akira S, Chung UI, Nakamura K y Kawaguchi H (2008) Association of microsomal prostaglandin E synthase 1 deficiency with impaired fracture healing, but not with bone loss or osteoarthritis, in mouse models of skeletal disorders. *Arthritis Rheum* **58**:172-183.

Yamamoto H, Itoh F, Hinoda Y e Imai K (1995) Suppression of matrilysin inhibits colon cancer cell invasion in vitro. *Int J Cancer* **61**:218-222.

Yan SF, Lu J, Zou YS, Soh-Won J, Cohen DM, Buttrick PM, Cooper DR, Steinberg SF, Mackman N, Pinsky DJ y Stern DM (1999) Hypoxia-associated induction of early growth response-1 gene expression. *J Biol Chem* **274**:15030-15040.

Yao P, Hao L, Nussler N, Lehmann A, Song F, Zhao J, Neuhaus P, Liu L y Nussler AK (2009) The protective role of HO-1 and its generated products (CO, Bilirubin and Fe) in ethanol-induced human hepatocyte damage. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.

Yoon SO, Park SJ, Yoon SY, Yun CH y Chung AS (2002a) Sustained production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activates pro-matrix metalloproteinase-2 through receptor tyrosine kinases/phosphatidylinositol 3-kinase/NF-kappa B pathway. *J Biol Chem* **277**:30271-30282.

Yoon YM, Kim SJ, Oh CD, Ju JW, Song WK, Yoo YJ, Huh TL y Chun JS (2002b) Maintenance of differentiated phenotype of articular chondrocytes by protein kinase C and extracellular signal-regulated protein kinase. *J Biol Chem* **277**:8412-8420.

Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, Okamura H, Akira S y Nakanishi K (1998) IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol* **161**:3400-3407.

Yudoh K, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T y Nishioka K (2005a) Catabolic stress induces expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 alpha in articular chondrocytes: involvement of HIF-1 alpha in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 7:R904-R914.

Yudoh K, Nguyen T, Nakamura H, Hongo-Masuko K, Kato T y Nishioka K (2005b) Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Res Ther* 7:R380-R391.

Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, Redlich K, Smolen J, Schonhaler HB, Kenner L, Tschachler E y Wagner EF (2008) Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Res Ther* 10:201.

Zenz R y Wagner EF (2006) Jun signalling in the epidermis: From developmental defects to psoriasis and skin tumors. *Int J Biochem Cell Biol* 38:1043-1049.

Zhang W, Geiman DE, Shields JM, Dang DT, Mahatan CS, Kaestner KH, Biggs JR, Kraft AS y Yang VW (2000) The gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21WAF1/Cip1 promoter. *J Biol Chem* 275:18391-18398.

Zhang X, Shan P, Alam J, Fu XY y Lee PJ (2005) Carbon monoxide differentially modulates STAT1 and STAT3 and inhibits apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and p38 kinase-dependent STAT3 pathway during anoxia-reoxygenation injury. *J Biol Chem* 280:8714-8721.

Zwerina J, Tzima S, Hayer S, Redlich K, Hoffmann O, Hanslik-Schnabel B, Smolen JS, Kollias G y Schett G (2005) Heme oxygenase 1 (HO-1) regulates osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB J* 19:2011-2013.



## ***10. ANEXOS***





---

## 10.1. ARTÍCULOS PUBLICADOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

1.- Heme oxygenase-1 inhibits apoptosis in Caco-2 cells via activation of Akt pathway

Autores: Jérôme Busserolles, Javier Megías, María Carmen Terencio, María José Alcaraz.

Revista: International Journal of Biochemistry & Cell Biology, abril de 2006, 38(9):1510-7

Índice de Impacto: 4,804 (2006)

2.- The carbon monoxide-releasing molecule CORM-2 inhibits the inflammatory response induced by cytokines in Caco-2 cells

Autores: Javier Megías, Jérôme Busserolles, María José Alcaraz.

Revista: British Journal of Pharmacology, abril de 2007, 150(8): 977-86.

Índice de Impacto: 3,767 (2007)

3.- Haem oxygenase-1 regulates catabolic and anabolic processes in osteoarthritic chondrocytes.

Autores: María Isabel Guillén, Javier Megías, Francisco Gomar, María José Alcaraz.

Revista: Journal of Pathology, marzo de 2008, 214(4): 515-22.

Índice de Impacto: 5,121 (2008)

4.- The CO-releasing molecule CORM-2 protects human osteoarthritic chondrocytes and cartilage from the catabolic actions of interleukin-1 $\beta$

Autores: Javier Megías, María Isabel Guillén, Antonio Bru, Francisco Gomar, María José Alcaraz.

Revista: Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, abril de 2008, 325(1):56-61.

Índice de Impacto: 4,309 (2008)

5.- Carbon monoxide-releasing molecules: a pharmacological expedient to counteract inflammation.

Autores: María José Alcaraz, María Isabel Guillén, María Luisa Ferrándiz, Javier Megías, Roberto Motterlini.

Revista: Current Pharmaceutical Design, 2008, 14(5): 465-72.

Índice de Impacto: 4,399 (2008)

6.- The CO-releasing molecule CORM-2 is a novel regulator of the inflammatory process in osteoarthritic chondrocytes.

Autores: María Isabel Guillén, Javier Megías, Victoria Clérigues, Francisco Gomar, María José Alcaraz.

Revista: Rheumatology (Oxford), septiembre de 2008, 47(9): 1323-8.

Índice de Impacto: 4,136 (2008)

7.- Heme oxygenase-1 induction modulates microsomal prostaglandin E synthase-1 expression and prostaglandin E(2) production in osteoarthritic chondrocytes.

Autores: Javier Megías, María Isabel Guillén, Victoria Clérigues, Ana I. Rojo, Antonio Cuadrado, Miguel Ángel Castejón, Francisco Gomar, María José Alcaraz.

Revista: Biochemical Pharmacology, junio de 2009, 77(12): 1806-13.

Índice de Impacto: 4,838 (2008)

## 10.2. INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

GENERALITAT VALENCIANA



### INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA DEL HOSPITAL CLINIC UNIVERSITARI DE VALENCIA

D. Manuel Labiós Gómez, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínic Universitari de Valencia

#### CERTIFICA

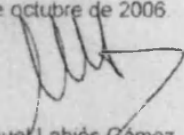
Que en este Comité, en reunión ordinaria de fecha 25 de octubre de 2006, y según consta en el acta de la misma, se han analizado los aspectos éticos y científicos relacionados con el proyecto de investigación que lleva por título:

#### ***Mecanismos moleculares de la activación de células inflamatorias en la lesión articular***

Que será llevado a cabo en la Facultad de Medicina en el Servicio de Dept. Farmacología y cuyo investigador principal es la Dra. Alcaraz Tormo, acordando que reúne las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación médica y biomédica establecidos en la ***Declaración de Helsinki*** (Junio 1964, Helsinki, Finlandia) de la Asamblea Médica Mundial, y sus revisiones (Octubre 1975, Tokio, Japón), (Octubre 1983, Venecia, Italia), (Septiembre 1989, Hong Kong), (Octubre 1996, Somerset West, Sudáfrica) y (Octubre 2000, Edimburgo) en la ***Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos del Hombre de la UNESCO*** y los acuerdos del ***Protocolo Adicional del Consejo de Europa para la protección de los Derechos del Hombre y de la dignidad del ser humano frente a la aplicaciones de la biología y de la medicina*** (París 12-1-1998, ratificado el 23-7-1999).

Lo que certifico a efectos oportunos.

Valencia, a 25 de octubre de 2006.

  
Fdo. Dr. D. Manuel Labiós Gómez  
Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica



