

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA  
DEPARTAMENT DE CIRURGIA



**Tesis Doctoral**

**PAPEL DE NF- $\kappa$ B Y miRNA-34a EN  
LA PATOGÉNESIS DE LA  
OSTEOARTRITIS Y COMO POSIBLE  
DIANA DE LAS NUEVAS TERAPIAS  
BIOLÓGICAS**

Presentada por:  
**Francisco Argüelles Linares**

**Dirigida:**

**Prof. Antonio Silvestre Muñoz  
Prof. José Miguel Cerdá Nicolás**

**Valencia, Octubre 2015**



**TESIS DOCTORAL**

**PROGRAMA DE DOCTORADO  
CIRUGIA Y SUS ESPECIALIDADES (040F)**

**PAPEL DE NF- $\kappa$ B Y miRNA-34a EN  
LA PATOGÉNESIS DE LA  
OSTEOARTRITIS Y COMO POSIBLE  
DIANA DE LAS NUEVAS TERAPIAS  
BIOLÓGICAS**

***Francisco Argüelles Linares***  
***OCTUBRE 2015***



**JOSÉ MIGUEL CERDÁ NICOLÁS, Catedrático de Patología del Departamento de patología de la Facultad de Medicina i Odontología de la Universidad de Valencia**

**ANTONIO SILVESTRE MUÑOZ, Profesor asociado del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina i Odontología de la Universitat de Valencia**

**CERTIFICAN:**

**Que el trabajo presentado por D. Francisco Argüelles Linares, titulado “Papel de NF- $\kappa$ B Y miRNA-34a en la patogénesis de la osteoartritis y como posible diana de las nuevas terapias biológicas” ha sido realizado bajo nuestra dirección**

**Y para que así conste, firmo el presente certificado en Valencia, a 1 de Octubre de dos mil quince.**

**Fdo.: Prof. José Miguel Cerdá Nicolás**

**Fdo.: Prof. Antonio Silvestre Muñoz**



*A mis padres y a mi mujer*



# AGRADECIMIENTOS

Para la realización de este trabajo de investigación he contado con la colaboración de excelentes personas, sin las cuales no hubiera podido completarlo, y a las cuales quiero agradecer su apoyo y ayuda.

En primer lugar quiero mostrar mi más sincero agradecimiento al personal de quirófano que me ayudó en la recogida de muestras, especialmente a Marisa, Loles, Natalia, Ana, Quique y Enrique.

A mis maestros, el Dr. Laguía, el Dr. Jolín, Dr. Fernández y el Dr. Segura, por la confianza que depositaron siempre en mí, por los valiosos conocimientos que me transmitieron y por el apoyo que siempre me han ofrecido. Al Dr. Argüelles Sanginés, mi padre, la persona de la que más he aprendido y al que un día le prometí que acabaría la tesis doctoral. Hoy es ese día.

Al profesor Francisco Gomar, por darme la posibilidad de volver al Hospital Clínico y así, poder llevar a cabo este trabajo.

Al equipo de Ortopedia del Hospital Clínico, por su ayuda en la recogida de muestras y toma de fotografías. Gracias Fernando, Silvia y Raúl por vuestro apoyo y compañerismo.

A Lisandra, por su enorme valía, dedicación y predisposición en todo momento. Gracias por el excelente trabajo en la elaboración y procesamiento de las muestras, así como la gran ayuda en la elaboración de los resultados y del material y métodos. Sin tu ayuda no hubiera podido completar este trabajo.

A mis directores de Tesis, Dr. Miguel Cerdá y Dr. Antonio Silvestre

Al Dr. Cerdá por su ayuda en los procedimientos de elaboración y procesamiento de las muestras, por sus conocimientos en la materia, por el gran trabajo histológico e inmunohistoquímico realizado, así como la ayuda en la obtención de las excelentes fotografías de las muestras. Gracias por tu ayuda, y sobretodo por tu paciencia conmigo.

Al Dr. Silvestre, porque siempre mostró un enorme interés e ilusión en que realizará la tesis, mostrando una total confianza en este proyecto. Por sus correcciones, rápidas y precisas. Por su apoyo y comprensión en los buenos y malos momentos, por los conocimientos que me ha enseñado, especialmente en el ámbito de la investigación y divulgación científica. Gracias por aguantarme y escucharme.

Agradecer al personal administrativo del Departamento de Cirugía, especialmente a Merche, su disponibilidad, apoyo e interés para que este trabajo de investigación pudiera completarse.

Todo esto nunca hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de mi familia. A mis padres, porque se lo debo todo a ellos, a mi madre, por su ejemplo de coraje y bondad, a mi hermano por estar siempre a mi lado, a mis hijas Marta y Blanca, porque sois lo mejor que me ha pasado en la vida y a mi mujer Marta por su comprensión, apoyo, serenidad y amor.  
Gracias.

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>9</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>15</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>17</b>
DEFINICIÓN.....	19
PREVALENCIA .....	20
ETIOPATOGENIA.....	23
<i>FACTORES DE RIESGO</i> .....	26
CLASIFICACIÓN .....	35
<i>Clasificación etiológica</i> .....	35
<i>Clasificación topográfica</i> .....	37
<i>Clasificación de Kellgren y Lawrence</i> .....	38
FORMAS DE PRESENTACIÓN .....	39
ANATOMIA PATOLÓGICA .....	42
<i>MACROSCÓPICA</i> .....	42
<i>MICROSCÓPICA</i> .....	43
CLÍNICA.....	45
DIAGNÓSTICO.....	46
ESTRATEGIA TERAPÉUTICA ACTUAL.....	49
<i>TRATAMIENTO MEDICO</i> .....	49
<i>TRATAMIENTO QUIRÚRGICO</i> .....	50
CONCEPTO Y PAPEL NF- $\kappa$ B.....	53
<i>CONCEPTO</i> .....	53
<i>SEÑALIZACIÓN</i> .....	53
<i>IMPORTANCIA CLÍNICA Y TERAPÉUTICA</i> .....	55
PAPEL DE LOS micro-RNA EN LA ARTROSIS.....	57
<i>CONCEPTO DE microRNA</i> .....	57
<i>FUNCIÓN</i> .....	59
<i>BIOGÉNESIS Y PROCESAMIENTO</i> .....	59
<i>MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS micro-RNA</i> .....	62
<i>FUNCIÓN BIOLÓGICA</i> .....	64
<i>miRNA34a Y ARTROSIS</i> .....	66
CONCEPTO DE MCP-1.....	67
HIPÓTESIS Y OBJETIVO DEL TRABAJO .....	69

<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>71</b>
OBTENCIÓN DE DATOS CLÍNICOS.....	73
OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN INICIAL DE LAS MUESTRAS PARA ESTUDIO .....	75
PREPARACIÓN Y DESCALCIFICACIÓN DE BLOQUES ÓSEOS .....	80
ANÁLISIS HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO .....	83
ESTABLECIMIENTO DE UN CULTIVO PRIMARIO DE CONDROCITOS Y ELABORACIÓN DE UN MODELO IN VITRO DE INFLAMACIÓN .....	84
METODOLOGÍA PARA WESTERN BLOT Y ELISA .....	88
TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR .....	90
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>91</b>
ESTUDIO CLÍNICO .....	93
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DATOS CLÍNICOS .....	95
<i>El banco de datos.....</i>	<i>95</i>
<i>Análisis exploratorio de las variables cuantitativas.....</i>	<i>96</i>
<i>Análisis exploratorio de las variables cualitativas .....</i>	<i>99</i>
ANÁLISIS HISTOLOGICO POR ÁREAS.....	104
CULTIVO DE CONDROCITOS .....	116
1. <i>Establecimiento y caracterización de un cultivo primario de condrocitos humanos.....</i>	<i>116</i>
2. <i>Descripción del cultivo de condrocitos control.....</i>	<i>117</i>
3. <i>Comportamiento de NF-<math>\kappa</math>B en el cultivo de condrocitos.....</i>	<i>118</i>
4. <i>Estudio de la expresión del RNAm de NF-<math>\kappa</math>B y expresión del miR-34a en el cultivo de condrocitos.....</i>	<i>121</i>
5. <i>Estudio de la expresión de MCP-1 mediante ELISA.....</i>	<i>124</i>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>125</b>
INTRODUCCIÓN-ETIOPATOGENIA.....	127
MATERIAL Y MÉTODOS .....	131
ESTUDIO DE FACTORES CLÍNICOS .....	137
ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO .....	145
CULTIVO DE CONDROCITOS .....	150
<i>PAPEL DE NF-KB EN LA ARTROSIS .....</i>	<i>150</i>
<i>mRNA-NF-<math>\kappa</math>B EN LA ARTROSIS.....</i>	<i>157</i>
<i>miR-34a EN LA ARTROSIS.....</i>	<i>158</i>
<i>MCP-1 EN LA ARTROSIS.....</i>	<i>163</i>
REPRODUCTIBILIDAD Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO .....	165

<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>169</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>175</b>



# ABREVIATURAS

1. BSA: Albúmina sérica bovina
2. C: *Caenorhabditis*.
3. *DMEM*: Dulbecco's modified eagles medium.
4. DNA: Ácido desoxiribonucleico
5. FGF: Factor de crecimiento de los fibroblastos.
6. GAG: glucosaminoglicanos
7. GTP: Guanosin-trifosfato
8. ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular-1
9. IL-1 $\beta$ : Interleuquina 1 $\beta$
10. Kb: Kilo bytes
11. KDa: KiloDalton
12. microM: Micromolar
13. miR\*: Premir
14. miRNA: MicroRNA
15. mRNA: RNA mensajero
16. Mpm: Metaloproteinasas de la matriz
17. Nm: Nanómetros.
18. NF- $\kappa$ B : Factor nuclear  $\kappa$ B
19. NO: Óxido Nítrico
20. Nts: Nucleótidos
21. PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
22. PG<sub>s</sub>: Prostaglandinas
23. pM: Picomol.
24. PTL: Parthenolide
25. PART25: Parthenolide a concentración 25 microM
26. RNA: Ácido ribonucleico
27. SBF: Suero bovino fetal
28. SIP<sub>1</sub>: Receptor 1 de la esfingosina 1 fosfato
29. TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformador beta
30. TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$
31. VCAM-1: Molécula de adhesión vascular-1



# **INTRODUCCIÓN**



### **DEFINICIÓN**

La artrosis fue definida por la OMS en 1995 como un proceso degenerativo articular que se produce como consecuencia de alteraciones mecánicas y bioquímicas que desestabilizan el equilibrio entre la síntesis y la degradación del cartílago articular, estimulando la formación de hueso subcondral y con presencia de una sinovitis crónica inespecífica de intensidad leve o moderada.

Según el American College of Rheumatology, la artrosis puede definirse como un grupo heterogéneo de condiciones que conducen a síntomas y signos articulares que se asocian con defectos en la integridad del cartílago articular, además de cambios relacionados con el hueso subcondral y con los márgenes articulares<sup>1</sup>.

La artrosis afecta a todos los tejidos de una articulación diartrodial, incluyendo el hueso subcondral, los meniscos, los ligamentos, la cápsula articular, la membrana sinovial y el músculo periarticular<sup>2</sup>, sin que presente efectos sistémicos, y se caracteriza desde el punto de vista clínico por dolor y limitación de la función articular con signos clínicos como la crepitación y los derrames de repetición.

Actualmente algunos autores consideran la artrosis como un grupo heterogéneo de procesos, con aspectos comunes y diferenciales en cuanto a su localización, su historia natural, su pronóstico y sus posibilidades de tratamiento<sup>3</sup>.

Lo que parece claro es que la artrosis es un ejemplo de enfermedad de etiología compleja que resulta de la interacción de factores adquiridos con una predisposición hereditaria a la que contribuyen múltiples factores genéticos.

A pesar de que en los últimos años se han llevado a cabo innumerables ensayos clínicos y experimentales de ligamento y asociación de posibles y probables factores relacionados con la enfermedad, hasta el momento no se han establecido claramente cuales son los genes que realmente son responsables de esa predisposición hereditaria.

No obstante, parece existir cierta evidencia de que están implicados algunos genes relacionados con la **vía Wnt** y con la **síntesis de las prostaglandinas**<sup>4</sup>.

## **PREVALENCIA**

Las enfermedades osteoarticulares son muy prevalentes en todo el mundo, representando más del 10% de las consultas de atención primaria<sup>5</sup>. Diferentes estudios señalan que entre el 10 y el 40% de la población general padece algún trastorno osteoarticular, que requiere de atención médica.

La prevalencia es asimismo elevada en España, sobre todo en lo que hace referencia a patologías como la espondilosis lumbar, la osteoartritis y la fibromialgia<sup>6</sup>.

Su prevalencia oscila entre el 6 y el 20% de la población adulta. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente el 28% de la población mayor de 60 años presenta una osteoartrosis sintomática, y hasta el 80% de ésta tiene limitaciones funcionales. Desde el punto de vista topográfico las localizaciones más frecuentes de esta enfermedad son los últimos segmentos del raquis cervical y lumbar y las articulaciones interfalángicas distales de los dedos de las manos.

La artrosis de rodilla, que es la que vamos a analizar en este trabajo, tiene una prevalencia del 10.2% en España y es un hecho llamativo que presenta una importante disociación clínico-radiológica, especialmente en la población joven. Por su parte la osteoartrosis de las manos, que la OMS indica como una de las más frecuentes e incapacitantes, muestra una prevalencia del 14%<sup>6</sup>, aunque la afectación sintomática suele rondar aproximadamente el 6.2% con distintas formas de presentación como la afectación interfalángica distal (nódulos de Bouchard), proximal (nódulos de Heberden) y la enfermedad de la trapecio-metacarpiana (rizartrrosis). Otras localizaciones como la cadera se afecta en el 3.5-6% de los pacientes mayores de 50 años y presenta diferentes patrones radiológicos en función de la existencia o no de patología previa de la cabeza femoral.

Debemos resaltar que la enfermedad osteoarticular supone un impacto importante sobre el estado de salud de la población en general y un substancial consumo de recursos sanitarios con la consiguiente repercusión en la economía de la nación. Se estima que entre el 10-40% de las personas que consultan al médico de atención primaria lo hacen a consecuencia de problemas derivados de alguna enfermedad osteoarticular.

Hoy en día esta patología es la primera causa de incapacidad permanente y una de las principales fuentes de baja laboral. En España hay cerca de 4 millones de personas afectas de enfermedad osteoarticular, por lo que teniendo en cuenta los últimos datos del INE (instituto nacional de estadística) de Junio del 2015 en los que se afirma que la población española es de 46.439.864, representa alrededor de 8.61% de la población. El deterioro funcional progresivo producido por este tipo de patología dificulta la realización de tareas cotidianas, domésticas o laborales, lo que acaba desencadenando un menoscabo en la calidad de vida de los pacientes.

El estudio **ARTROCAD** realizado hace unos años y publicado en la revista Reumatología Clínica [2006; 2(5): 224-34] revelaba que prácticamente la mitad de los encuestados necesitaba algún tipo de ayuda para realizar las actividades cotidianas más básicas y que hasta un tercio de esta población se pasaba más de 8 horas al día sentada.

Debemos conocer la trascendencia económica que supone esta enfermedad no solo en cuanto a uso de recursos sanitarios y gasto farmacéutico, sino también en cuanto a consumo de tiempo laboral, haciendo una profunda reflexión sobre la repercusión que tiene en nuestro Sistema de Salud. Según el estudio **ARTROCAD** antes mencionado, cada paciente realizó al menos una visita al mes al médico de atención primaria. Hasta el 70% recibía analgésicos o antiinflamatorios y el 43% tomaba al mismo tiempo analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos. Un 5% de las osteoartrosis de rodilla había recibido alguna infiltración ácido hialurónico, y algo más del 60% de los pacientes recibía algún fármaco gastroprotector<sup>6</sup>.

El estudio **EPISER 2000** señala que las patologías osteoarticulares que se asocian a una peor calidad de vida en lo que se refiere a limitación física son la artritis reumatoide, la gonartrosis y osteoartritis lumbar.

## **ETIOPATOGENIA**

En la actualidad se considera a la articulación diartrodial como una unidad funcional integrada por diferentes tejidos, principalmente el cartílago, la membrana sinovial y el hueso subcondral, todos ellos implicados en la etiopatogenia de la artrosis, que presenta tres manifestaciones fundamentales: sinovitis inespecífica, destrucción del cartílago articular y alteraciones en el hueso subcondral (remodelado óseo con esclerosis subcondral, osteofitos y osteonecrosis focal).

Los condrocitos son las únicas células presentes en el cartílago articular y son las responsables de la síntesis y recambio de la matriz extracelular del mismo, lo que resulta fundamental para el buen funcionamiento articular. Así, podemos afirmar que estas células participan tanto en la síntesis como en el catabolismo de la matriz extracelular.

Por su parte la matriz extracelular que producen estos condrocitos y que esta formada principalmente por colágena de tipo II, es la que mantiene la estructura del cartílago a la vez que mantiene la homeostasia del entorno extracelular.

En la osteoartrosis, la degeneración e insuficiente síntesis de matriz extracelular por parte de los condrocitos es la responsable de la degradación y de la inadecuada función del cartílago.

Así, algunas citoquinas inflamatorias como la IL-1 $\beta$  tienen un papel crucial en la degradación del cartílago, ya que estimulan la síntesis de enzimas que degradan la matriz extracelular de los condrocitos en concreto las *colagenasas*. Por otro lado, la IL-1 $\beta$  inhibe la expresión de ciertos genes específicos y causan la insuficiente síntesis de matriz extracelular por parte del condrocito.

Aunque se conoce poco acerca de la patogénesis de la osteoartritis, parece ser que el desbalance entre los factores catabólicos y anabólicos que mantienen la homeostasia del cartílago influyen en el proceso de degradación y destrucción del mismo.

Por lo tanto, mientras se mantiene el delicado balance anabolismo-catabolismo del cartílago, la matriz se renueva hacia un cartílago normal, mientras que cuando predomina el catabolismo, se inicia el proceso de degradación del mismo.

A continuación pasaremos a analizar el papel de cada una de estas estructuras en el desarrollo de la osteoartritis<sup>7</sup>.

### ***Cartílago articular***

En la artrosis se produce una disminución en el número de condrocitos, único elemento celular del tejido cartilaginoso, principalmente por apoptosis (muerte celular programada), en la que estarían implicados diferentes mediadores celulares presentes en exceso en la articulación afectada, como el óxido nítrico (NO), la interleuquina 1-beta (IL-1 $\beta$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). El NO es un radical libre gaseoso producido por el condrocito como respuesta al estímulo de diferentes factores catabólicos que inhibe la apoptosis celular y aumenta la capacidad lesiva de otros oxidantes. Por otra parte, los tres mediadores anteriormente reseñados pueden activar una serie de pro-enzimas proteolíticas del grupo de las proteasas, principalmente la cisteína-proteasas y metaloproteasas como la colagenasa, que contribuyen a la degradación de la matriz extracelular del cartílago articular produciendo su fisuración y progresiva destrucción.

### ***Membrana sinovial***

La sinovial muestra un componente de inflamación de la membrana (hiperplasia e infiltración de células mononucleares) que se manifiesta en forma de tumefacción, calor y rubor local y que se ha relacionado con su cronificación y progresión. Se han propuesto como factores desencadenantes de esta respuesta inflamatoria la sobrecarga mecánica articular (cargas mecánicas de alta frecuencia e intensidad), la presencia de microcristales y diferentes productos procedentes de la degradación del cartílago citados anteriormente.

Durante el proceso inflamatorio, la síntesis de mediadores bioquímicos por parte de la membrana sinovial tiene un efecto catabólico sobre el cartílago y a su vez, estimula la producción de otros mediadores por parte del condrocito, que son moléculas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , la PGE-2, etc..., con marcado efecto destructor del cartílago.

No podemos olvidar además, que el NO (óxido nítrico) se encuentra en concentraciones elevadas en el líquido sinovial y en los sinoviocitos de la articulación, lo que puede favorecer el cuadro destructivo articular.

### ***Hueso subcondral***

El hueso subcondral por su parte presenta alteraciones de mineralización, crecimiento del tejido óseo subcondral y aparición de osteofitos. Estos cambios pueden incluso preceder a los que se producen en el cartílago y la sinovial, y están promovidos por diferentes mediadores producidos por el osteoblasto y por una alteración del eje RANK/RANK-ligando-osteoprotegerina a favor del RANK ligando, responsable de una mayor reabsorción ósea.

### *FACTORES DE RIESGO*

Se han descrito diferentes factores de riesgo que pueden estar implicados o relacionados en la aparición y progresión de la osteoartrosis, que se dividen en generales, modificables o no, y locales<sup>8, 9</sup> (Figura1).

#### ***Factores de riesgo generales no modificables***

##### *Edad*

Es el factor de riesgo que más frecuentemente se relaciona con la aparición de esta enfermedad<sup>10</sup>, especialmente en el sexo femenino, en el que se constata un claro aumento de la incidencia de la enfermedad de manera independiente de las articulaciones afectas. Podemos concluir que aunque es muy infrecuente en personas menores de 35 años (prevalencia inferior al 0.1%), prácticamente más del 70% de los sujetos mayores de 50 años, tiene signos radiológicos de osteoartrosis en alguna articulación y casi el 100% de los sujetos muestran la enfermedad a nivel radiológico a partir de los 75 años. Por otra parte podemos concluir que hay una evidencia moderada de que la edad es un factor de riesgo para la progresión de la enfermedad.

##### *Sexo*

El hecho de que la artrosis sea más prevalente en los varones por debajo de los 45 años y en las mujeres por encima de los 55 hace que se considere la influencia de factores genéticos y especialmente hormonales como una de las causas más importantes.

En general, la artrosis es más prevalente en el sexo femenino, con un riesgo relativo de 2,6. Además, en la mujer son más frecuentes las formas más severas así como la artrosis de manos, sus formas erosivas y

nodulares, y la artrosis de rodilla, especialmente la que afecta al compartimento femoropatelar. En el varón la artrosis afecta más a la articulación de la cadera, especialmente antes de los 50 años y en la rodilla se presenta sobre todo en el compartimento femorotibial medial. No obstante, no hay evidencia de que el sexo femenino sea un factor de riesgo para la progresión de la artrosis de rodilla y la evidencia es contradictoria para la progresión de la artrosis de cadera.

### *Genética*

La contribución genética en la fisiopatología de la osteoartritis se estima que puede llegar al 50-65%<sup>11</sup> y cada vez se le atribuye mayor importancia<sup>12</sup>.

Sin embargo hay que tener en cuenta que hay grandes diferencias entre los resultados de diferentes estudios, hecho que dificulta hacer predicciones precisas sobre la importancia de este componente, que difiere en función de la localización de la osteoartritis y el sexo del paciente. Por otra parte, las evidencias de que la herencia genética intervenga de forma directa en la progresión de la artrosis no son concluyentes.

A pesar de que en los últimos años se han efectuado numerosos estudios de asociación, hasta el momento no se han establecido claramente cuales son los genes que realmente causan esa predisposición hereditaria.

Dado el importante beneficio que aporta la cirugía a los pacientes con artrosis avanzada, cabría plantearse si estos estudios genéticos tienen realmente alguna utilidad. La respuesta es claramente afirmativa. Por un lado, el conocimiento de los factores genéticos implicados en la aparición y el desarrollo de la artrosis puede permitir identificar y controlar subgrupos de individuos de mayor riesgo en fases precoces. Por otro lado, la identificación de los genes involucrados puede llevar a identificar

nuevas dianas terapéuticas que permitan frenar de manera eficaz el desarrollo del proceso, algo que no podemos ofrecer a nuestros pacientes en la actualidad.

### ***ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN FAMILIAR Y DE GEMELOS EN ARTROSIS***

Es bien conocido que algunos pacientes desarrollan artrosis secundariamente a alteraciones del esqueleto de causa genética (ostecondro-displasias, ocronosis, enfermedad de Wilson, etc...) o adquirida (infecciones, traumatismos, alteraciones metabólicas, etc...). En cuanto a los casos de artrosis primaria, a menudo el proceso se desarrolla por la acción de una serie de factores (microtraumatismos repetidos, obesidad, etc...) que actúan en un individuo con una cierta predisposición genética. La contribución de esa predisposición genética se pone de manifiesto en los estudios que revelan una agregación familiar y en la actividad clínica cotidiana: los pacientes con artrosis a menudo refieren que sus familiares también presentan la enfermedad. Así, por ejemplo, se ha estimado que los individuos con familiares con artrosis grave de rodilla o cadera que supuso la colocación de una prótesis articular precisan, a su vez, una prótesis de dichas articulaciones con una frecuencia 2-5 veces mayor que la de la población general<sup>13</sup>. La influencia de la herencia varía según la topografía de la enfermedad. A partir de los estudios de gemelos, se ha estimado que el grado de heredabilidad está en torno al 75% en el caso de la espondiloartrosis, el 60% en la coxartrosis, el 40% en la gonartrosis y el 65% en la artrosis de la mano<sup>5</sup>.

En varios estudios se ha observado que el componente hereditario es más importante en las mujeres que en los varones. No obstante, no está claro si ello refleja realmente una interacción de los propios factores genéticos y de éstos con otras características como el sexo (concentraciones hormonales, etc.) o si depende de

una amplia variabilidad de factores exógenos como ocurre en los varones, por ejemplo, en relación con las diversas actividades laborales. Por otro lado, hay que tener en cuenta que la predisposición hereditaria no depende sólo de que se hereden determinados polimorfismos relacionados con el tejido óseo, sino que engloba elementos tanto relacionados con la biología articular como con otras características orgánicas asociadas a su vez con el riesgo de artrosis, como la obesidad.

### ***ESTUDIOS DE LIGAMIENTO EN ARTROSIS***

En diferentes estudios de ligamiento se han encontrado algunas regiones del genoma relacionadas con la osteoartritis. Así, se ha comprobado que la artrosis de la mano se asocia a polimorfismos situados en el brazo largo del cromosoma 2 (regiones 2q, 12-35), mientras que la artrosis de cadera se ha asociado a polimorfismos en ese mismo cromosoma y en otras regiones de los cromosomas 4, 6 y 16. Sin embargo, esos resultados han sido poco reproducibles y en diferentes estudios se ha hallado ligamiento a diferentes regiones cromosómicas.

### ***ESTUDIOS DE GENES RELACIONADOS CON LA ARTROSIS***

Han sido numerosos los genes presuntamente involucrados en la biología del sistema esquelético cuyos polimorfismos se han relacionado con la osteoartritis.

Entre estos genes nos encontramos con:

- Genes relacionados con constituyentes de la matriz cartilaginosa.
- Genes relacionados con el metabolismo fosfocálcico relacionado con el hueso y el cartilago articular.
- Genes relacionados con la inflamación y la degradación del cartilago. Los polimorfismos del gen PTGS2, que codifica la COX-2, una enzima

implicada en la síntesis de prostaglandinas, se han relacionado con artrosis de rodilla<sup>14</sup>.

### ***ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN GENÓMICA EN ARTROSIS***

Hasta el momento únicamente se han publicado 3 estudios de asociación genómica en relación con la osteoartritis. En uno de ellos, se encontró una asociación entre el gen CALM1, un gen que codifica la calmodulina, que ha resultado ser la proteína reguladora de los movimientos intracelulares del calcio, y la artrosis de cadera<sup>15</sup>.

Posteriormente, Spector et al. establecieron una asociación entre el gen LRCH1 y la osteoartritis de rodilla.

En el último estudio, se identificó un vínculo entre la artrosis de rodilla y los polimorfismos de la región q33 del cromosoma 2, en la que se encuentran los genes de dos enzimas implicadas en la síntesis de prostaglandinas, como la COX-2 y la fosfolipasa<sup>16</sup>.

### *Raza*

La artrosis, en general, es más frecuente en la población de raza caucásica, pero las diferencias son poco significativas. Por el contrario, sí que se han podido establecer algunas diferencias en cuanto a la distribución de las diferentes formas de osteoartritis en función de la raza. Así, las mujeres afroamericanas y las chinas presentan mayor incidencia de artrosis de rodilla, diferencia que podría ser atribuida por una parte a un componente genético pero también a factores ambientales, como los relacionados con la sobrecarga articular asociada a una actividad laboral más exigente desde el punto de vista físico, habitual en estos grupos.

### ***Factores de riesgo generales modificables***

#### *Obesidad*

Numerosos estudios han correlacionado desde hace tiempo el sobrepeso y la obesidad con la artrosis radiológica y sintomática de rodilla, mientras que la pérdida de peso es considerado un factor preventivo de esta forma de osteoartrosis<sup>17, 18, 19, 20, 21</sup>. Se estima que aproximadamente el 61% de las mujeres obesas tienen artrosis en las rodillas, frente únicamente el 26% de las no obesas.

Además, es un hecho evidente que el sobrepeso contribuye al deterioro de la calidad de vida y supone una discapacidad para el paciente artrósico, e incluso se ha relacionado en algunos estudios con peores resultados en la cirugía de reconstrucción articular<sup>22</sup>.

Se ha sugerido que el mecanismo por el que la obesidad se relaciona con la artrosis es de tipo mecánico, activando los condrocitos y acelerando la degeneración del cartílago con una especial susceptibilidad por parte de la articulación de la rodilla.

No obstante, la obesidad también se ha relacionado con la artrosis de la mano, probablemente por un efecto sistémico mediado por adipocinas secretadas por el tejido adiposo con efecto proinflamatorio y degenerativo, por lo que se ha sugerido que la artrosis inducida por el sobrepeso se podría considerar que forma parte del síndrome metabólico.

Por otra parte, la posible relación de la obesidad con la artrosis de cadera es algo menos consistente.

Podemos concluir que aunque el exceso de peso es un factor de riesgo significativo para la aparición de artrosis,

la evidencia de que el peso intervenga en su progresión es contradictoria<sup>1</sup>.

### *Factores hormonales*

Es evidente que el déficit estrogénico en la mujer está relacionado con el desarrollo de la artrosis, hecho que explicaría el aumento de su incidencia y prevalencia a partir de la menopausia. Sin embargo, la certidumbre de que los estrógenos sean protectores frente a la progresión de la artrosis no es concluyente<sup>1</sup>.

### *Debilidad muscular*

Algunos autores sugieren que la debilidad muscular es un estado previo a la artrosis y no una manifestación de esta, y que puede considerarse como un indicador o factor de riesgo para el desarrollo de una osteoartritis de rodilla. Sin embargo, aunque se recomienda potenciar la fuerza muscular del cuádriceps y de los isquiotibiales para un mejor control articular y un alivio de los síntomas, no hay evidencia de que se correlacione con la progresión de la artrosis excepto quizás para el compartimiento lateral de la articulación femoropatelar<sup>1</sup>.

### *Factores nutricionales*

Algunos estudios epidemiológicos, como el de Framingham, atribuyen un papel protector a las vitaminas C y D frente a la osteoartritis y su progresión, sin embargo los resultados hasta la fecha no son concluyentes<sup>1</sup>.

### *Densidad mineral ósea*

Aunque algunos estudios epidemiológicos lo han verificado<sup>1</sup>, no está claro que exista una relación inversa entre la aparición y el desarrollo de la artrosis y la densidad mineral ósea<sup>1</sup>.

### ***Factores de riesgo locales***

Se trata de circunstancias puntuales que alteran la normal congruencia geométrica de los extremos óseos que componen la articulación o la integridad de las demás estructuras que participan en su función.

#### *Anomalías articulares previas*

Incluyen anomalías congénitas (sinostosis, agenesias, hipoplasias, aplasias, displasias), defectos de alineación articular, traumatismos previos, laxitud articular excesiva. Es un hecho evidente que la displasia de cadera favorece la aparición de una artrosis de cadera, mientras que las lesiones meniscales y de los ligamentos, las meniscectomías y los defectos de alineación en la extremidad inferior (genu varo o valgo) favorecen la aparición de la artrosis de rodilla, y estos últimos factores influyen también en su progresión. Por su parte los traumatismos repetidos y las fracturas que interesan a la superficie articular son causa de aparición de artrosis secundarias en localizaciones atípicas<sup>1</sup>.

#### *Sobrecarga articular (actividad física o laboral)*

El ejercicio físico de elevada intensidad y el deporte de alta competición pueden favorecer el desarrollo de la artrosis a causa del sobreuso y los traumatismos de repetición sobre la articulación. Pero hasta la fecha no se ha encontrado relación entre la artrosis y el ejercicio físico de baja o moderada intensidad, como caminar o correr, siempre y cuando éste no se asocie a impactos de alta intensidad.

Diversas actividades laborales se relacionan con artrosis de diferente localización, por uso inadecuado y repetido, especialmente en manos, codos, rodillas y cadera.

Cabe destacar que de entre los factores de riesgo señalados, los claramente asociados a una mayor progresión de la artrosis son los defectos de alineación de la extremidad inferior y la presencia de artrosis generalizada.

### **Figura 1. Factores de riesgo de la artrosis.**

#### **Factores generales**

1. No modificables
  - a. Sexo
  - b. Edad
  - c. Raza
  - d. Factores genéticos
2. Modificables
  - a. Obesidad
  - b. Enfermedades sistémicas (endocrinopatías, metabólicas etc...)
  - c. Factores hormonales
  - d. Debilidad muscular
  - e. Factores nutricionales
  - f. Densidad mineral ósea

#### **Factores locales**

1. Anomalías articulares previas
  - a. Traumatismos y fracturas
  - b. Malformación o displasia
  - c. Defectos de alineación
  - d. Inestabilidad y laxitud articular
  - e. Meniscopatías
  - f. Artropatías neuropáticas
2. Sobrecarga articular (actividad física y laboral)

## **CLASIFICACIÓN**

Hay diferentes formas de clasificar la artrosis. La más utilizada, por su claridad conceptual, es la etiológica, aunque también es frecuente la utilización de otras formas de clasificación como la topográfica y la de Kellgren-Lawrence.

### **Clasificación etiológica (*Figura 2*)**

Clasifica las osteoartrosis en función de su causa en formas primarias o idiopáticas y secundarias. En las formas primarias, más frecuentes, se cumplen los criterios diagnósticos de la artrosis sin la presencia de otra enfermedad subyacente causal. Pueden afectar a la columna vertebral, caderas, rodillas, articulaciones, así como a las articulaciones de los dedos de las manos y de los pies.

Puede presentarse de manera localizada (aquellos casos con afección de menos de 3 articulaciones), formas oligoarticulares (diferentes combinaciones con afectación de manos, columna y rodillas) y poliarticulares.

Hay algunos autores distinguen 3 tipos etiológicos que integrarían la artrosis primaria: la artrosis tipo I, de causa genética (predisposición familiar), la tipo II, dependiente de las hormonas o posmenopáusica (déficit estrogénico), y la tipo III o senil, relacionada con la edad (envejecimiento).

La artrosis secundaria puede afectar a cualquier articulación y aparecen como consecuencia de patologías articulares previas, como las fracturas articulares, y en menor medida por procesos inflamatorios crónicos como la artritis reumatoide o la artropatía por depósito de cristales de pirofosfato.

## **Figura 2. Clasificación etiológica de la artrosis.**

### ***Artrosis primaria o idiopática***

- Localizada o generalizada (oligoarticular o poliarticular)
- Formas con características diferenciales
  - Artrosis erosiva de articulaciones interfalángicas distales
  - Artrosis de rodilla y manos en mujeres obesas
  - Artrosis de cadera en varones

### ***Artrosis secundaria***

- Postraumática
- Enfermedades congénitas, displasias y trastornos del desarrollo
- Enfermedades metabólicas
  - Enfermedad de Wilson
  - Enfermedad de Gaucher
  - Hemocromatosis
  - Ocronosis
- Enfermedades endocrinas
  - Acromegalia
  - Diabetes
  - Hipotiroidismo
  - Hiperparatiroidismo
- Enfermedades por depósito de cristales
  - Artropatía por depósito de hidroxapatita
  - Artropatía por depósito de pirofosfato cálcico (condrocalcinosis)
  - Gota
- Enfermedades óseas
  - Enfermedad de Paget
  - Osteonecrosis
- Enfermedades articulares inflamatorias
  - Artritis reumatoidea, espondilitis anquilopoyética
  - Espondiloartropatías (psoriasis)
- Artritis séptica
- Artropatía neuropática
- Artropatía hemofílica

### Clasificación topográfica (*Figura 3*)

En función de la localización o topografía de la enfermedad, ésta puede presentarse como una entidad con manifestaciones propias y características de la osteoartrosis primarias que se catalogan como "formas típicas", mientras que aquellas que se manifiestan como osteoartrosis secundaria son las que se especifican como "formas atípicas".

#### **Figura 3. Clasificación topográfica de la artrosis.**

##### *Localizaciones típicas*

- Manos (inter-falángica, trapecio-metacarpiana)
- Rodillas
- Caderas
- Columna
- Articulación acromio-clavicular
- Articulación esterno-clavicular
- Primera articulación metatarso-falángica

##### *Localizaciones atípicas*

- Articulación metacarpofalángica
- Carpo
- Codos
- Articulación escapulo-humeral
- Tobillos
- Tarso
- Temporo-mandibular

*Clasificación de Kellgren y Lawrence ( tabla 1)*

Según su repercusión radiológica, la artrosis puede clasificarse en 5 grados en la escala de Kellgren-Lawrence, que contempla evidencias radiográficas como el estrechamiento de la interlínea articular, la presencia o no de osteofitos, la esclerosis del hueso subcondral y la deformidad de los extremos óseos.

Esta forma de clasificación tiene algunas limitaciones relativas, como la variabilidad inter-observador en la interpretación de las imágenes radiológicas, las posibles interferencias de la posición del paciente en la evaluación del grado de pinzamiento articular en la artrosis de rodilla, o la mayor importancia atribuida a los osteofitos sobre el pinzamiento de la interlínea, cuando este último puede ser un criterio más sensible de la artrosis en fases iniciales y en concreto en determinadas localizaciones.

**Tabla 1. Clasificación de la artrosis según la escala de Kellgren y Lawrence (Ann Rheum Dis, 1957)**

<b>GRADO</b>	<b>HALLAZGOS RADIOLÓGICOS</b>
<b>0 (normal)</b>	Radiografía normal
<b>1 (dudoso)</b>	Dudoso estrechamiento de la interlínea Posible osteofitosis
<b>2 (leve)</b>	Posible estrechamiento de la interlínea Osteofitosis
<b>3 (moderado)</b>	Estrechamiento de la interlínea Moderada osteofitosis Esclerosis leve Posible deformidad de los extremos óseos
<b>4 (severo)</b>	Marcado estrechamiento de la interlínea Abundante osteofitosis Esclerosis severa Deformidad de los extremos óseos

## ***FORMAS DE PRESENTACIÓN***

### **Artrosis de manos**

La artrosis sintomática de las manos tiene una prevalencia estimada del 5% en la población general adulta.

En las manos, la artrosis afecta de forma característica a los dedos, principalmente a las articulaciones interfalángicas distales (nódulos dolorosos de Heberden), siendo esta la localización más frecuente de la artrosis primaria de las manos (hasta el 70%), y también a las interfalángicas proximales (nódulos de Bouchard), que afectan con más frecuencia a los dedos índice, medio y meñique.

Otra forma de presentación de la artrosis de la mano es la que afecta a la articulación trapecio-metacarpiana (rizartrosis). Esta es la segunda afectación más frecuente de la mano

### **Artrosis de cadera**

Es una localización frecuente de artrosis y probablemente la forma de manifestación clínica más incapacitante. En España, la prevalencia de la artrosis sintomática en esta localización se estima en el 4,4%.

### **Artrosis de rodilla**

Se estima que la incidencia de la artrosis radiológica de rodilla en mayores de 40 años es de alrededor del 20%, pero se ha descrito una elevada discordancia entre los signos radiológicos y la sintomatología. Así Carmona Ortells afirma que únicamente el 50% de la personas con dolor de rodilla tienen signos radiológicos de osteoartrosis

y menos del 25% de las personas que tienen signos radiológicos presenta dolor<sup>23</sup>.

En España, según el estudio **EPISER**, la prevalencia de la artrosis sintomática de rodilla es del 10,2% en la población adulta (el 14% en mujeres y el 5,7% en varones), y se estima que la artrosis radiológica en esta localización podría ser del 34%.

La artrosis sintomática de rodilla tiene un predominio en mujeres con una relación mujer/varón de 3:1 en mayores de 60 años. Suele ser bilateral y debe descartarse una etiología previa (proceso secundario) sobre todo cuando el cuadro es de carácter unilateral. Por otra parte se ha descrito un patrón de afectación radiológica dependiente del sexo, con mayor frecuencia de afectación aislada de la femoro-patelar en mujeres y de la tibio-femoral en varones.

En personas jóvenes suele asociarse a alteraciones biomecánicas de la rodilla, lesiones previas o meniscopatías.

### **Artrosis de columna**

Existen pocos estudios epidemiológicos sobre la artrosis de columna, donde también destaca una importante disociación clínico-radiológica. Los estudios radiológicos muestran cambios degenerativos en esta localización en el 80% de los varones y el 72% de las mujeres de más de 55 años, con mayor gravedad en el sexo masculino.

*Artrosis cervical.* Presenta una elevada prevalencia, con signos radiológicos presentes en el 22% de los mayores de 25 años y en el 80% de los mayores de 55 años.

*Artrosis lumbar.* También tiene una elevada prevalencia radiológica, aunque algo inferior a la de la espondiloartrosis cervical. Se estima que solo en el 10%

de los casos la degeneración discal y la artrosis interapofisaria son los responsables del dolor lumbar.

*Artrosis dorsal.* Menos frecuente y menos sintomática que las anteriores. En este nivel, la disociación clínico-radiológica es todavía más acentuada que en las anteriores.

### Otras localizaciones

-*Glenohumeral:* Generalmente aparece de forma secundaria a fracturas o a otras patologías como la rotura del manguito rotador o la osteonecrosis

-*Acromioclavicular:* Habitualmente poco sintomática

-*Esternoclavicular:* frecuente pero asintomática.

-*Codo:* localización infrecuente.

-*Tobillo:* es poco frecuente y habitualmente secuela de una fractura articular previa.

- *Pie:* la localización más habitual es la primera articulación metatarso-falángica, que provoca el denominado *hallux rigidus*. También en el antepié pueden verse formas de artrosis secundaria a fracturas.

## **ANATOMIA PATOLOGICA**

### **MACROSCÓPICA**

Los cambios que se aprecian son<sup>24</sup>:

1. *Cartílago articular*: esta estructura pierde su textura y su aspecto brillante tornándose la superficie casi amarillenta, irregular, mate y menos consistente (blanda).

- La fibrilación de sus capas más superficiales le confiere aspecto aterciopelado, afelpado, veloso.

- También se observan fisuraciones verticales que se prolongan hasta alcanzar la placa subcondral.

- El cartílago puede desprenderse y desaparecer en determinadas zonas quedando expuesto el hueso subcondral en el fondo de las ulceraciones. Este fenómeno de la ulceración del tejido cartilaginoso suele detectarse principalmente en las zonas de carga.

- Esta pérdida de tejido cartilaginoso se traduce en un estrechamiento de la interlínea articular (pinzamiento) en la imagen radiológica.

2. *Cápsula articular y membrana sinovial*: secundariamente al deterioro condral, la cápsula articular se engruesa y fibrosa, adhiriéndose a zonas las zonas de hueso subyacente lo que limita la movilidad articular.

Por su parte la membrana sinovial se engruesa en ocasiones de forma leve, aunque habitualmente suele llegar a formar gruesos repliegues con hiperemia y formaciones vasculares que se acompañan de signos inflamatorios.

3. *Hueso subcondral*: el hueso subyacente a una ulceración condral sufre una intensa esclerosis con formación de islotes de tejido fibroso o fibrocartilaginoso. En el margen osteo-cartilaginoso aparecen formaciones de hueso esponjoso recubiertas en ocasiones de cartilago hialino que reciben el nombre de osteofitos y cuya finalidad es incrementar la estabilidad articular alterada por la deformidad que desencadena la enfermedad y por la incompetencia de la cápsula y los ligamentos.

Asimismo es frecuente observar a este nivel cavidades subcondrales o quistes óseos de paredes esclerosas y rellenas de un líquido gelatinoso acelular (líquido sinovial articular).

### *MICROSCÓPICA*

Los cambios detectados inicialmente se deben a fallos en la malla tridimensional de la colágena y a la degradación de los agregados de la matriz fundamental<sup>24</sup>.

Las sollicitaciones mecánicas debilitan los puentes cruzados entre las fibras colágenas lo que precede a la rotura y fragmentación de las mismas. Ello permite la penetración de más agua en el entramado dando mayor turgencia y menor resistencia al tejido.

El condrocito sometido a una sobrecarga o estrés mecánico estimula la síntesis de enzimas proteolíticas: metaloproteasas de la matriz (MMPs) como la colagenasa y la gelatinasa, que generan detritus los cuales sirven de estímulo a los fibroblastos sinoviales para que produzcan citoquinas mediadoras de la inflamación como son la interleuquina 1 (IL-1), el Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) y las PGE<sub>2</sub>, lo que aumenta la acción catabólica a nivel del tejido cartilaginoso<sup>24</sup>.

Por otra parte existen otros factores que pueden desempeñar un papel protector del tejido cartilaginoso por diferentes mecanismos como son: el factor de crecimiento transformador beta (TGF- $\beta$ ), glucosaminoglicanos (GAG) y ácido polisulfúrico.

La secuencia lesional se produce por tanto del siguiente modo<sup>24</sup>:

- Ante las sollicitaciones mecánicas se desencadena una proliferación de condrocitos en clones o racimos en un intento de aumentar la respuesta reparadora, generando por lo tanto una síntesis acelerada de macromoléculas estructurales aunque de inferior calidad: los proteoglicanos presentan cadenas más cortas y una disminución en la proporción condroitín/queratán sulfato, el colágeno es de menor tamaño y se altera la distribución de sus fibras que se hacen menos resistentes a las tensiones a que son sometidas.

- La degradación mediada por enzimas lisosómicas y colagenasas supera en última instancia a la reparación del tejido cartilaginoso, lo que altera el equilibrio del sistema cartílagos-hueso subcondral y contribuye a desencadenar una reacción sinovial inflamatoria secundaria a la absorción de partículas cartilaginosas (detritus) lo que acelera y potencia el proceso destructivo.

## **CLÍNICA**

El síntoma más importante, frecuente y la principal causa de consulta es el **dolor** de características mecánicas, también conocido como “*dolor de ritmo artrósico*”. Se trata de un dolor al inicio de la actividad que mejora al menos parcialmente con la misma. Se produce debido a la distensión cápsulo-ligamentosa tras los derrames de repetición, a la reacción inflamatoria de la membrana sinovial y a la denudación de las superficies óseas. El cartílago como estructura avascular y aneural que es, no duele.

Como hemos indicado suele ser de comienzo insidioso, apareciendo con el uso de la articulación y desapareciendo o atenuándose con el reposo o con la actividad moderada; si bien hay que tener en cuenta que en fases más avanzadas de la enfermedad el dolor se hace más persistente y puede aparecer incluso en reposo.

Igualmente no podemos olvidar que este dolor puede agudizarse de forma episódica o esporádica durante las crisis sinovíticas o inflamatorias, lo que condiciona la vida cotidiana del paciente afecto.

Otros motivos de consulta al médico de atención primaria o al especialista son la **pérdida de movilidad articular**, que aparece de forma secundaria a la fibrosis y a las adherencias capsulo-sinoviales, pero también se produce por el choque de los extremos óseos deformados. Es frecuente esta restricción funcional con el cambio postural tras un periodo más o menos largo periodo de inactividad.

El paciente consulta asimismo por **crepitaciones y crujidos** y por episodios intercurrentes de inflamación con derrames sinoviales de repetición. Estos episodios se desencadenan generalmente por depósito de cristales cálcicos liberados durante la remodelación del hueso subcondral. El líquido sinovial de un derrame osteo-

artrítico obtenido mediante punción articular en condiciones estériles tiene menos de 2000 células por  $\text{mm}^3$ , es transparente, de color amarillo y posee una viscosidad media (filante).

Todo esto acaba desencadenando la **deformidad progresiva** de la articulación afecta<sup>24</sup>. Estas deformidades son secundarias a la destrucción ósea por la ulceración del tejido cartilaginoso y subcondral y a las formaciones osteofitarias. Todo esto unido a las retracciones del tejido capsular y ligamentoso desencadenan deformidades articulares inicialmente reductibles, que con el tiempo se hacen irreductibles.

Estas deformidades pueden alterar los ejes mecánicos y anatómicos de las extremidades originando anomalías de eje como el “genu varo o genu valgo” o incluso llegando a provocar subluxaciones/luxaciones articulares.

## **DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico de la artrosis es fundamentalmente clínico, atendiendo a los síntomas y signos antes señalados, y a los hallazgos radiológico considerando las anomalías de imagen características de la enfermedad.

Es importante llevar a cabo una meticulosa anamnesis de los síntomas y signos del paciente prestando especialmente atención a las características del dolor y a las limitaciones funcionales que refiere. La inspección y la exploración es fundamental ya que nos muestra una articulación tumefacta, con derrame/s articular/es en ocasiones, dolorosa a la palpación y a la movilización pasiva, pudiendo aparecer crujidos y crepitaciones durante el movimiento activo y pasivo de la misma.

### ANALÍTICA

Tiene más valor para el establecer el diagnóstico diferencial con otras patologías que cursan con anomalías analíticas sistémicas que para establecer el diagnóstico de este proceso. El líquido sinovial en la artrosis presenta una viscosidad normal o discretamente aumentada (se describe como un líquido filante) con menos de 200 glóbulos blancos/mm<sup>3</sup>. El 25% de estos leucocitos son polimorfonucleares. Por otra parte la glucosa y las proteínas se presentan con la misma concentración que en el plasma sanguíneo.

### RADIOLOGÍA SIMPLE

Se trata de la prueba complementaria más importante, si bien como hemos señalado al principio, no siempre existe correlación entre las imágenes radiográficas y las manifestaciones clínicas del paciente.

Las características fundamentales que se aprecian a nivel radiográfico son:

- Pinzamiento articular o estrechamiento de la interlínea articular.
- Esclerosis subcondral como un segmento de mayor densidad (hueso ebúrneo) en zonas de mayor presión, generalmente sometidas a cargas.
- Formaciones osteofitarias en las zonas marginales de la articulación.
- Quistes óseos subcondrales.
- Presencia de cuerpos libres articulares (ratón articular).
- Incongruencia articular o subluxación de los extremos óseos en estadios avanzados.

Para la gradación o clasificación de la osteoartrosis se han descrito diversas escalas. Una de la más utilizadas es la escala de Ahlbäck, que permite unificar el estadio de enfermedad y homogeneizar las bases del tratamiento recomendable en función del grado de afectación articular. Esta clasificación establece cinco grupo o estadios radiológicos:

- I. Disminución de la interlínea articular en un 50%
- II. Desaparición de la interlínea articular
- III. Erosión ósea leve menor de 0.5 mm
- IV. Erosión ósea moderada de 0.5 a 1 cm
- V. Erosión ósea grave mayor de 1 cm o la presencia de subluxación



**Figura 4. Genu varo artrósico rodilla izquierda con prótesis de rodilla contralateral. En la imagen se aprecia la desaparición de la interlínea articular, esclerosis subcondral, osteofitos mediales y laterales y deformidad del eje mecánico de la rodilla izquierda**

## ***ESTRATEGIA TERAPÉUTICA ACTUAL***

Actualmente el tratamiento de la artrosis puede dividirse en médico (conservador/ortopédico) o quirúrgico<sup>24</sup>.

Existe consenso en que el tratamiento inicial de la artrosis debe ser siempre médico y únicamente recurrir al tratamiento quirúrgico en caso de que el paciente no responda al mismo.

### ***TRATAMIENTO MEDICO***

Va encaminado por un lado a mejorar las condiciones mecánicas de la articulación, y por otra tiene como objetivo aliviar el dolor y mejorar la función del paciente.

Podemos mejorar las condiciones mecánicas de la articulación afecta mediante la aplicación de las siguientes medidas:

- Control ponderal e incremento del ejercicio físico para mejorar tanto la flexibilidad como el tono muscular.
- Reposo durante las fases de reagudización del proceso.
- Modificaciones en actividades cotidianas y actividad educacional con el paciente para mejorar el reparto de cargas.
- Ejercicios programados de fisioterapia para disminuir las contracturas musculares y potenciar la musculatura con ejercicios isométricos-isocinéticos que fortalezcan las partes blandas periarticulares.

Para mejorar el dolor e incrementar el nivel funcional del sujeto, podemos emplear:

- *Técnicas de fisioterapia.*
- *Ingesta de fármacos analgésicos/antiinflamatorios* para disminuir o al menos reducir el componente inflamatorio del tejido sinovial y aliviar el dolor.
- *Utilización de fármacos sistémicos de acción lenta y administración oral para la osteo-artrosis (SYSADOA, “Symptomatic Slow Action Drugs for Osteoarthritis”), como son el condroitin sulfato y el sulfato de glucosamina.*
- *Viscosuplementación:* Se trata de la aplicación de infiltraciones locales de ácido hialurónico de forma periódica con la finalidad de mejorar el nivel funcional articular y aumentar el rango de movilidad.

## TRATAMIENTO QUIRÚRGICO

Como ya se ha mencionado se recurre a él, en función de la evolución y progresión de la enfermedad y los síntomas que presente el paciente.

Hoy en día el tratamiento quirúrgico responde a distintos objetivos <sup>24</sup>:

1. Alivio sintomático:
  - a. Lavado articular o desbridamiento artroscópico.
2. Mejora fisiológica/funcional:
  - a. Osteotomías
  - b. Perforaciones subcondrales
  - c. Injertos de cartílago
3. Control/curación de la enfermedad:
  - a. Artroplastias
  - b. Artrodesis

### 1. Lavado y desbridamiento artroscópico:

Alivia el dolor al retirar de la articulación mediadores de la inflamación y detritus de tejido cartilaginoso. La mejoría clínica puede ser limitada en tiempo y en alcance, con lo que la recidiva sintomática es frecuente.

### 2. Osteotomías

Presentan un efecto beneficioso porque permiten equilibrar y redistribuir las cargas, reducen la fricción en las zonas denudadas de cartílago, y por el posible efecto de regeneración vascular de la zona del corte óseo (osteotomía).

### 3. Perforaciones subcondrales de Pridie o esponjialización de Ficat

Su objetivo es estimular la formación de tejido fibroso o fibrocartilaginoso que recubra el hueso subcondral expuesto, pero presenta como principales problemas que tienen un efecto poco duradero en el tiempo, y que el tejido fibrocartilaginoso que se produce tiene peores propiedades mecánicas que el cartílago hialino.

### 4. Injertos de cartílago

Se trata de trasplantar tejido osteocondral autólogo o sintético o bien realizar el implante autólogo de condrocitos.

### 5. Artroplastias

Se trata de una cirugía mayor en la cual los extremos óseos articulares son reemplazados por una prótesis total.

De forma esquemática las principales indicaciones para la implantación de una prótesis articular son: el mal control analgésico, la edad avanzada en general superior a los 60-65 años (ya que por debajo de esta edad se debería considerar otras opciones como las osteotomías) y la pérdida funcional.

En la rodilla podemos identificar diferentes tipos de artroplastia<sup>24</sup> total de sustitución:

- **Constreñidas:** Para rodillas muy deformadas o revisiones donde existe una gran pérdida ósea.
- **Semi-constreñidas:** presentan una congruencia que limita el varo-valgo y la luxación posterior (postero-estabilizadas, estabilizadas anteriormente...).
- **No constreñidas:** permiten un mayor grado de movilidad.

### 6. Artrodesis

Consiste en la fijación de la articulación en una posición adecuada desde el punto de vista funcional, permitiendo eliminar el dolor. Son funcionalmente aceptables en el tobillo y articulaciones distales a las cinturas pélvica y escapular, menos en la cadera o el hombro.

En rodilla son altamente limitantes, por lo que su indicación se limita al tratamiento de las complicaciones sépticas de la artroplastia de rodilla.

## **CONCEPTO Y PAPEL NF- $\kappa$ B**

### **CONCEPTO**

El **NF- $\kappa$ B** (*factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas*) es un complejo proteico que controla la transcripción del ADN. NF- $\kappa$ B se encuentra en la mayoría de tipos de células animales y está implicado en la respuesta celular frente a estímulos como el estrés, las citoquinas, radiación ultravioleta, LDL oxidadas y antígenos bacterianos o virales. La regulación defectuosa del NF- $\kappa$ B está relacionada con el cáncer, enfermedades inflamatorias y autoinmunes, shock séptico, infecciones virales o un desarrollo inmune inadecuado. También está implicado en procesos de plasticidad sináptica y de memoria.<sup>25</sup>

### **SEÑALIZACIÓN**

#### Activación

El NF- $\kappa$ B es relevante en la regulación de la respuesta celular ya que pertenece a la categoría de los factores de transcripción primarios de “acción rápida”, como son los factores de transcripción que están presentes en las células en un estado de inactivación y que no requieren una nueva síntesis de proteínas para ser activados. Esto permite al NF- $\kappa$ B ser la primera respuesta a estímulos celulares nocivos. Los inductores de la actividad del NF- $\kappa$ B son altamente variables, y pueden ser desde especies reactivas de oxígeno (ROS), factores de necrosis tumoral alfa (TNF  $\alpha$ ), interleuquina 1-beta (IL-1 $\beta$ ), lipopolisacáridos bacteriales (LPS), isoproterenol, cocaína e incluso radiaciones iónicas.

Muchos productos bacterianos así como la estimulación de una gran variedad de receptores de la superficie celular inducen la activación de NF- $\kappa$ B así como también

cambios rápidos en la expresión génica.

### Inhibición

En células no estimuladas, los dímeros de NF- $\kappa$ B son secuestrados en el citoplasma por una familia de inhibidores, llamados I $\kappa$ Bs (Inhibidores de  $\kappa$ B), los cuales son proteínas que contienen múltiples copias de una secuencia llamada “repeticiones de anquirina”. En virtud de estos dominios, las proteínas I $\kappa$ B enmascaran la secuencia de localización nuclear (NLS) de las proteínas NF- $\kappa$ B y las mantienen secuestradas en un estado de inactivación en el citoplasma<sup>26</sup>.

Las **I $\kappa$ Bs** forman una familia de proteínas relacionadas, que tienen un dominio N-terminal regulador, seguido por seis o más repeticiones de anquirina y un dominio PEST cerca de su C-terminal. Aunque la familia de las I $\kappa$ B consiste en I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , y Bcl-3, la principal y más estudiada I $\kappa$ B es la I $\kappa$ B $\alpha$ .

La activación de NF- $\kappa$ B se inicia a través de la degradación inducida por señal de proteínas I $\kappa$ B. Esto ocurre principalmente mediante la activación de una quinasa llamada I $\kappa$ B quinasa (IKK). La IKK está formada por un heterodímero de las subunidades catalíticas de IKK alfa e IKK beta y por una proteína reguladora “maestra” llamada NEMO (modulador esencial NF- $\kappa$ B) o IKK gamma. Cuando es activada por señales, normalmente procedentes de fuera de la célula, la I $\kappa$ B quinasa fosforila dos residuos de serina localizados en un dominio I $\kappa$ B regulador. Una vez fosforiladas estas serinas (por ejemplo, las serinas 32 y 36 en la I $\kappa$ B $\alpha$  humana), las moléculas del inhibidor I $\kappa$ B son modificadas por un proceso llamado ubiquitinación, que después las lleva a ser degradadas por una estructura celular llamada proteosoma.

Con la degradación de I $\kappa$ B, el complejo NF- $\kappa$ B es libre

para entrar al núcleo dónde puede activar la expresión de los genes específicos que tienen cerca sitios de unión de ADN para NF- $\kappa$ B.

La activación de estos genes por NF- $\kappa$ B entonces induce una respuesta fisiológica, como por ejemplo, una respuesta inflamatoria o inmune, una respuesta de supervivencia celular, o una proliferación celular. NF- $\kappa$ B activa la expresión de su propio represor, I $\kappa$ B $\alpha$ . El nuevamente sintetizado I $\kappa$ B $\alpha$  re-inhíbe NF- $\kappa$ B y, por tanto, forma un bucle de auto feedback, que provoca niveles oscilatorios de la actividad de NF- $\kappa$ B<sup>27</sup>. YopP es un factor secretado por la *Yersinia pestis*, el agente causante de la peste, que previene la ubiquitinación de I $\kappa$ B. Esto provoca que este agente patógeno inhiba eficazmente la vía NF- $\kappa$ B y así bloquea la respuesta inmune de una persona infectada con *Yersinia*.

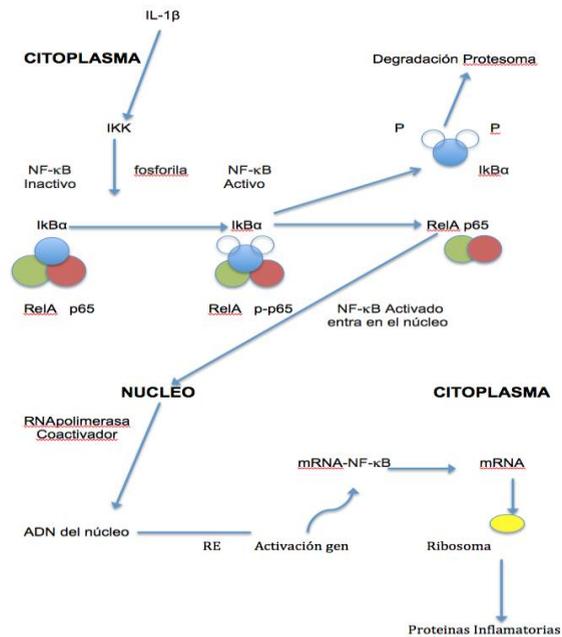
### *IMPORTANCIA CLÍNICA Y TERAPÉUTICA*

El NF- $\kappa$ B es ampliamente utilizado por las células eucariotas como regulador de los genes que controlan la proliferación celular y la supervivencia celular. Debido a ello, muchos tipos diferentes de tumores humanos tienen dis-regulado el sistema NF- $\kappa$ B (es decir, activado).

Los defectos en NF- $\kappa$ B producen una mayor susceptibilidad a la apoptosis que conduce que haya un aumento en la muerte celular. Esto se debe a que NF- $\kappa$ B regula genes anti-apoptóticos (sobre todo la TRAF1 TRAF2) y por tanto, controla la actividad enzimática de las caspasas, que son fundamentales para la mayoría de los procesos apoptóticos.

NF- $\kappa$ B controla varios genes involucrados en la inflamación y se encuentra activado crónicamente en enfermedades inflamatorias, tales como la enfermedad inflamatoria intestinal, la artritis, sepsis, gastritis, asma y arterosclerosis entre otros<sup>28</sup>.

Muchos productos naturales, incluidos los anti-oxidantes que tienen actividad anti-cancerígena y anti-inflamatoria, se ha demostrado que también son capaces de inhibir NF- $\kappa$ B.

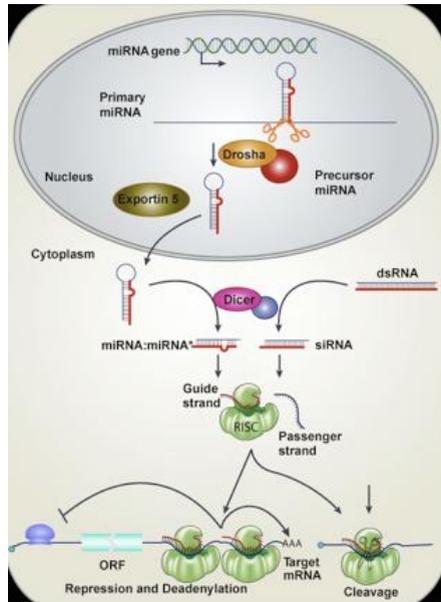


**Figura 5. Mecanismo de acción del heterodímero NF- $\kappa$ B formado por el Rel y las proteínas p65 tras la estimulación por IL-1 $\beta$ .** En su estado inactivo, el NF- $\kappa$ B se encuentra en el citosol formando un complejo con la proteína inhibitoria I $\kappa$ B $\alpha$ . A través de receptores integrales de membrana, una variedad de señales extracelulares activan la enzima quinasa ikB (IKK). La IKK, a su vez, fosforila la proteína I $\kappa$ B $\alpha$ , que da lugar a la ubiquitinación, disociación del complejo I $\kappa$ B $\alpha$  -NF- $\kappa$ B, y la degradación eventual de I $\kappa$ B $\alpha$  por el proteosoma. Posteriormente la NF- $\kappa$ B activada entra en el núcleo donde se une a secuencias específicas llamadas elementos de respuesta (RE). El complejo ADN/NF- $\kappa$ B da lugar a otras proteínas como los coactivadores ARN polimerasa, que transcribe ADN en ARN mensajero, que a su vez se transforma en proteínas que provocan un cambio en la función de la célula

## **PAPEL DE LOS *micro-RNA* EN LA ARTROSIS**

### **CONCEPTO DE *microRNA***

Un **micro ARN** (**miARN** o **miRNA** por sus siglas en inglés) es un ARN monocatenario, de una longitud de entre 21 y 25 nucleótidos, y que tiene la capacidad de regular la expresión de otros genes mediante diversos procesos, utilizando para ello la ruta de ribointerferencia<sup>29</sup>.



**Figura 6. Biogénesis miRNA.**

Fueron descritos inicialmente en 1993 por Lee y colaboradores en el laboratorio de Víctor Ambros<sup>30</sup>, sin embargo el término "microARN" sólo se acuñó en 2001 en un conjunto de tres artículos publicados en Science (26 Octubre 2001)<sup>31</sup>.

A principios de 2008, análisis computacionales realizados por IBM sugerían la presencia de alrededor de 50.000 miRNA diferentes en el genoma humano, cada uno tal vez con alrededor de miles de ARNm dianas potenciales<sup>32</sup>.

Los miRNA son moléculas de ARN transcritas a partir de genes de ADN, pero no son traducidos a proteínas. Se expresan en una amplia variedad de organismos, desde plantas hasta gusanos y humanos. Muchos miRNA están bien conservados entre especies, y muchos componentes de la maquinaria de los miRNA se han encontrado incluso en Archaea y eubacterias, lo que revela que su origen es muy antiguo. Algunos recuentos de miRNA en humanos identificaban hasta 800, lo que implicaría que los miRNA podrían representar como mínimo el 3% de todos los genes humanos<sup>33</sup>.

La secuencia de ADN que codifica el miRNA tiene una longitud que supera al tamaño final del propio miRNA e incluye la región miRNA y una región que es complementaria a la anterior, lo que permite su apareamiento. Esto conlleva que, durante la transcripción de esta secuencia de ADN, se forman regiones que tienen la capacidad de formar una horquilla y generar un ARN bicatenario primario largo conocido como *pri-miRNA*. Posteriormente, una enzima nuclear llamada drosha corta las bases de la horquilla, formando lo que se denomina *pre-miRNA*. Este pre-miRNA es transportado desde el núcleo al citoplasma por la exportina 5. Una vez que el pre-miRNA está en el citoplasma es fragmentado por la enzima dicer, que lo corta hasta la longitud final de 20-25 nucleótidos<sup>34</sup>.

### *FUNCIÓN*

La función de los miRNA está relacionada con la regulación de la expresión génica. De esta forma un miRNA es complementario de una parte de uno o más ARN mensajeros (ARNm). Los miRNA de animales generalmente inhiben la traducción del ARNm.

Dado que el número de dianas potenciales de los miRNA aumenta al número de miles (alrededor del 30% de los genes humanos), los miRNA podrían constituir otra capa del circuito regulatorio que existe en las células<sup>35</sup>. Según esto, cualquier disrregulación de los miRNA podría conllevar grandes problemas de regulación en la célula, induciendo quizá fenotipos cancerosos. De hecho, se ha mostrado que los perfiles de expresión de los miRNA están modificados en un gran número de tipos de cáncer<sup>36</sup> y que la sobreexpresión forzada de los miRNA podría conducir al desarrollo de tumores.

### *BIOGÉNESIS Y PROCESAMIENTO*

Los genes que codifican los miRNAs están localizados principalmente dentro de los intrones de genes que pueden codificar proteínas, así como también en regiones intergénicas o exónicas. En el primer caso, la expresión de los miRNAs puede ir correlacionada con la regulación transcripcional de su gen huésped y de esta manera explicaría una especificidad tisular debida a la expresión de diferentes grupos de genes. En el segundo caso, la expresión de los miRNAs viene regulada de forma independiente a través de sus propios elementos reguladores. También se ha observado que los miRNAs pueden estar derivados de secuencias repetitivas de DNA.

Los microRNAs maduros son moléculas de unos 20-25 nucleótidos de longitud, con un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo en el extremo 3'.

Éstos derivan de un procesamiento que se inicia en el núcleo de la célula y termina en el citoplasma donde realizan su función. Son transcritos por la RNA polimerasa II que produce una larga molécula de RNA que puede exceder 1 kb, conocida con el nombre de miRNA primario (pri-miRNAs). Éste es cortado en el núcleo por la endonucleasa RNasa III conocida con el nombre de Drosha, que está asociada con la proteína DGCR8 (en mamíferos) o Pasha (en *Drosophila* y *C. elegans*). Drosha corta de forma asimétrica ambas cadenas en los sitios cercanos a la base de la estructura primaria en forma de stem-loop, de forma que el producto resultante es una molécula de unos 60-70 nucleótidos denominada pre-miRNA. Este pre-miRNA es exportado al citoplasma de forma activa a través del complejo dependiente de RAN-GTP, Exportina-5.

En el citoplasma, la molécula de GTP es hidrolizada a GDP y el pre-miRNA es liberado del complejo exportador. Una vez en el citoplasma, esta molécula de unos 70nt será cortada por la endonucleasa RNasa III conocida como Dicer, asociada a las proteínas TRBP y PACT en mamíferos, dando lugar a una molécula de doble cadena conocida como miRNA duplex. De este miRNA duplex, se separan las dos cadenas y una de ellas da lugar al miRNA maduro de unos 20-25nt que se incorpora al complejo ribonucleoproteico conocido como *RNA-induced silencing complex* (RISC), el cual es la maquinaria catalítica responsable de la degradación del mRNA diana y/o de la inhibición de la traducción, mientras que la otra cadena, conocida como miRNA\*, es degradada. El complejo RISC cuando actúa con miRNAs se le conoce como miRISC.

Los componentes conocidos del complejo miRISC humano incluyen a Dicer, a las proteínas Argonauta, a TRBP (*HIV-1 transactivation responsive element [TAR] RNA-binding protein*) y a PACT (una proteína de unión a RNA de doble cadena).

Dicer es una enzima muy conservada en casi todos los eucariotas.

En algunas especies, homólogos de Dicer, como Dicer-1 y Dicer-2, tienen funciones específicas en el silenciamiento génico. En *Drosophila melanogaster*, Dicer-1 y Dicer-2 están involucradas en el procesamiento del pre-microRNA y en la generación de RNAs silentes (siRNA), respectivamente.

En el complejo miRISC humano formado por TRBP, Dicer, AGO2 y PACT, el enzima catalítico que corta el mRNA diana es AGO2. Los dos pasos cruciales en el ensamblaje de miRISC son: la selección de la cadena de miRNA *sense* o *antisense*, seguido de la potencial destrucción de la otra cadena. Los pasos de estos dos mecanismos no se conocen con exactitud y no está claro si la cadena *sense* es destruida en todas las especies, pero una vez el miRISC se ha ensamblado con la cadena que le hace de guía, este se unirá al mRNA diana en la región UTR 3' para bloquear su traducción<sup>37</sup>.

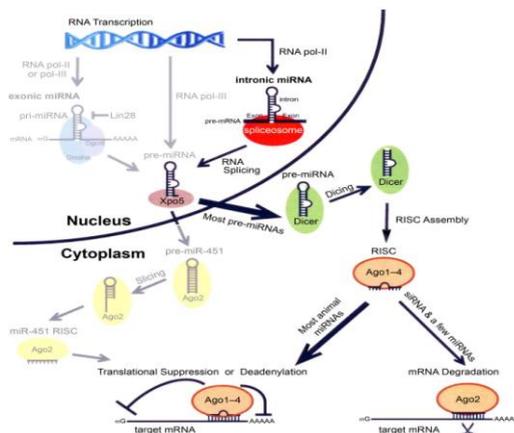


Figura 7. Biogénesis miRNA.

## MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS *micro-RNA*

A pesar del importante progreso realizado en la comprensión de la biogénesis y la función de los miRNA, los mecanismos utilizados por los miRNA para regular la expresión génica permanecen bajo un intenso debate<sup>38</sup>.

En efecto, existen trabajos publicados que indican que los miRNA en células animales **reprimen la expresión génica** de cuatro formas diferentes:

- Degradación de la proteína durante la traducción
- Inhibición de la elongación de la traducción
- Finalización prematura de la traducción (disgregación de los ribosomas)
- Inhibición de la iniciación de la traducción

Además, los miRNA en animales pueden inducir una degradación significativa de los ARNm diana (como los miRNA de plantas), a pesar del apareamiento imperfecto ARNm-miRNA. Sin embargo, el mecanismo de degradación suele ser diferente: los miRNA inducen la degradación de los ARNm diana mediante la eliminación de la caperuza (en el extremo 5') y de la cola de poliadeninas (poly-A, en el extremo 3')<sup>39</sup>. Finalmente, los microARN podrían también silenciar sus ARNm dianas secuestrándolos en *foci* (sitios) citoplásmicos discretos, los cuerpos de procesamiento de ARNm o *P bodies*, que carecen de maquinaria de traducción.

Sin embargo, a pesar de las discrepancias existentes entre los diferentes mecanismos propuestos, los apoyos experimentales para cada mecanismo son variados, y son el objeto actual de intensos estudios, para tratar de elucidarlos.

Se ha sugerido que las diferencias observadas se deben a deficiencias en los experimentos realizados, en algunos casos originadas por la utilización de modelos erróneos en los estudios de regulación de la traducción.

Por último, en estudios recientes se ha detectado que en determinadas condiciones, los miRNA pueden también activar la síntesis proteica<sup>40</sup>.

Características generales de los miRNA:

- \* Se asocian a la región 3' UTR de los ARNm diana.
  
- \* Hacen falta muchos sitios de unión para activar la respuesta de los miRNA (la unión de uno solo no produce efectos significativos).
  
- \* Un ARNm puede estar regulado por diferentes miRNA.
  
- \* Un único miRNA puede controlar la actividad de cientos de ARNm diferentes. Los primeros estudios a gran escala publicados en Nature en 2008, que utilizan una variante de la técnica de espectrometría de masas denominada SILAC (marcado estable de aminoácidos con isótopos pesados en cultivo celular, *Stable Isotope Labelling with Amino Acids in Cell Culture*) para detectar las proteínas afectadas al reducir o aumentar los niveles de un miRNA concreto, muestran que en efecto, un único miRNA puede reducir los niveles de cientos de proteínas mediante el bloqueo de su traducción, no sólo degradando sus ARNm<sup>41</sup>. El descubrimiento más llamativo de estos estudios es que los efectos de los miRNA sobre las proteínas son habitualmente bastante modestos. Sin embargo, a pesar de que los efectos de los miRNA pueden ser sutiles, también pueden ser potentes: los miRNA parecen intervenir en la regulación de la expresión génica realizando un ajuste fino, de forma compleja e interconectada.
  
- \* La especificidad y la función de los miRNA están determinados por los nucleótidos 2 a 7 de la parte 5' de los miRNA maduros (la llamada región "semilla" del miRNA): dichos nucleótidos deben ser obligatoriamente complementarios al ARNm diana.

\* Un miRNA puede ser funcional aunque no haya sido sintetizado en el núcleo: un miRNA introducido en la célula por transfección puede inhibir eficazmente la síntesis de proteínas.

### *FUNCIÓN BIOLÓGICA*

#### **Función en la infección viral y la respuesta inmune**

- Función anti-viral: el miRNA miR-32 tiene como diana una secuencia presente en la UTR del extremo 3' de todos los ARNm retrovirales.
- Función pro-viral: el miRNA miR-122, que se expresa específicamente en el hígado, es necesario para que el virus de la hepatitis C se exprese de manera eficiente.
- Muchos miRNA que están regulados diferencialmente en líneas celulares hematopoyéticas tienen funciones importantes en la regulación del desarrollo y la función de las células del sistema inmune, y en las interacciones huésped-patógeno

#### **Función en cáncer**

Los miRNA pueden funcionar como supresores de tumores o como oncogenes; queda por demostrar su influencia concreta en cada tipo de cáncer.

La expresión de ciertos miRNA está correlacionada con varios tipos de cáncer, por lo que funcionarían como **oncogenes**. Por ejemplo, un informe de Sonoki y colaboradores<sup>42</sup> relacionó el gen *mir-125b-1* con leucemia, y describió un paciente con leucemia linfoblástica aguda de precursores de células B que portaba una inserción del pre-miRNA en el locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina. Aunque los investigadores no pudieron determinar cómo se modulaba la expresión de *mir-125b-1* en las células tumorales, este estudio apoya el papel de este gen como un *oncomir*.

La primera indicación de que los miRNA podrían funcionar como **supresores de tumores** proceden de un informe de Calin y colaboradores<sup>43</sup> que mostraba que pacientes diagnosticados con una forma frecuente de leucemia en adultos (leucemia linfocítica crónica de las células B o *LLC*), presentan a menudo deleciones o sub-regulación (*downregulation*) de dos genes de miRNA presentes en *mir-15a* y *mir-16-1*.

Por otro lado, se ha observado además que los microRNA contribuyen a la progresión maligna del cáncer, mediando la invasión tumoral y la formación de metástasis<sup>44</sup>.

### **Función durante el desarrollo**

Por ejemplo, en *C. elegans*, los miRNA permiten un paso rápido a través de las diferentes fases del desarrollo<sup>45</sup>: los miRNA *lin-4* y *let-7* controlan el momento en los que se define el destino de las células neuronales e hipodérmicas durante el desarrollo larvario.

### **Nuevas funciones maternas**

Dos estudios independientes en 2007 en ratones<sup>46</sup> indican que los miRNA maternos podrían tener un papel importante en las etapas tempranas del desarrollo embrionario (*efecto materno*).

### *miRNA34a Y ARTROSIS*

Muchos son los miRNAs relacionados con la artrosis como miR-146a, miR-155, miR-125b, miR-101. Sin embargo este estudio se ha centrado en uno particular, el miR-34a.

Como se ha mencionado en los apartados anteriores, los microRNAs han emergido como importantes reguladores de diversos procesos biológicos.

Durante su biogénesis, los miRNA son transcritos a miRNAs primarios, que a su vez son procesados por Drosha y Dicer, para de esta forma generar duplas de miRNA, formados por una parte en una hebra madura y otra hebra pasajera llamada pre-miRNA o miR\*.

Así pues, algunos miRNA han sido involucrados como importantes reguladores de la esperanza de vida celular. Uno de ellos, el miRNA-34a, ha sido identificado como un importante modulador de la apoptosis<sup>47</sup>. No obstante, existe gran controversia al respecto.

Por un lado, miRNA-34a ha demostrado ser inductor de la muerte celular programada en las células del cáncer de colon, mientras que por otra parte protege a algunas células como linfocitos B humanos frente a la apoptosis.

Los estudios de Fabienne Niederer et al. demostraron que los pre-miR-34a tiene un papel importante en el proceso pro-apoptótico, a través de la modulación de una proteína inhibidora de la apoptosis denominada XIAP. Así, demostraron que cuando disminuye la modulación de los pre-miR-34a en los fibroblastos sinoviales de los/as pacientes con artritis reumatoide, se evita el bloqueo de expresión de XIAP, lo que contribuye de forma importante a la resistencia de las células a la apoptosis<sup>46</sup>.

Por otra parte, Mohamed M. Abouheif et al. investigaron la expresión de miR-34a en el cartílago articular y confirmaron que la expresión de los mismos tiende a incrementarse al mismo tiempo que aumenta la degradación del cartílago. Sus estudios demostraron que la expresión de los miRNA-34a está inducido por IL-1 $\beta$  en los condrocitos y que silenciar dicho miR-34a puede prevenir la apoptosis en los condrocitos<sup>48</sup>.

Otros autores como Dongkyum et al<sup>49</sup>. demostraron que el miRNA-34a es una llave moduladora en la dinámica del citoesqueleto a través de su interacción entre Roa/Rac1 durante la condrogénesis, modulando negativamente la reorganización del citoesqueleto de actina, que es uno de los procesos esenciales en la maduración del condrocito<sup>29</sup>.

### **CONCEPTO DE MCP-1**

La MCP-1 es una quimiocina o citoquina quimiotáctica.

Son una familia de pequeñas proteínas (60-100 aminoácidos) de bajo peso molecular (8-14 KDa), relacionadas estructuralmente con las citoquinas, que juegan un papel esencial en la migración celular y en la comunicación intercelular<sup>50</sup>.

Aunque las quimioquinas se definieron inicialmente como citoquinas inducibles que facilitaban el reclutamiento de diferentes subtipos de leucocitos al sitio de inflamación, hoy en día se sabe que también están implicadas en procesos inmunológicos mediante el control de la circulación de células inmunes, entre la sangre, los tejidos y los órganos linfoides. Junto con esto, las quimioquinas regulan además numerosos procesos celulares como son la adhesión, la apoptosis, la proliferación, la fagocitosis o la secreción de otras citoquinas, y están implicadas en

procesos como la homeostasis, desarrollo celular, angiogénesis, crecimiento de tumores o metástasis (Ambrosini and Aloisi, 2004; Deshmane et al. 2009).

Las quimioquinas se clasifican estructuralmente en cuatro subfamilias según el número de aminoácidos entre cisteínas que presenta en su extremo N-terminal y se nombran como CXC, CC, CX<sub>3</sub>C y XC.

La proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1/CCL2) es una quimioquina perteneciente a la familia tipo CC cuya principal función conocida es la de regular la migración de monocitos, linfocitos T de memoria y células Natural Killer (NK), hacia la zona lesionada, participando por tanto en la inflamación.

MCP-1 pertenece a una familia compuesta por, al menos, cinco miembros (MCP-1/CCL2, MCP-2/CCL8, MCP-3/CCL7, MCP-4/CCL13 y MCP-5/CCL12) y todos ellos comparten una alta homología en su secuencia. Fue la primera quimioquina humana de este tipo descubierta, su gen se localiza en el cromosoma 17 y la proteína está formada por 76 aminoácidos, con un peso molecular de 13 KDa.

Además, se han purificado diferentes isoformas de MCP-1, con variaciones en la masa molecular según el grado de O-glicosilación, lo cual puede interferir en su acción quimioatrayente (Deshmane et al. 2009).

## ***HIPÓTESIS Y OBJETIVO DEL TRABAJO***

### **HIPOTESIS DE TRABAJO**

La osteoartritis está asociada a múltiples factores etiológicos, algunos de ellos conocidos y modificables, pero existen otros muchos que hasta la fecha se encuentran en fase de investigación. El papel de los micro-RNA como moléculas del RNA transcritas a partir de genes de DNA y cuya función está relacionada con la regulación de la expresión genética, el control del ciclo celular, el envejecimiento celular, la apoptosis celular etc... ha sido ampliamente estudiado desde su descubrimiento en 1993 por Lee & cols. No obstante su relación con la génesis y evolución del envejecimiento articular no está claramente definido.

*HIPÓTESIS:* El micro RNA “miR-34a” que se encuentra presente en el cartílago de los pacientes que padecen una enfermedad degenerativa articular, actúa como uno de los principales responsables del desbalance anabolismo-catabolismo del cartílago articular lo que conduce a la artrosis de la siguiente forma:

- El estímulo de los condrocitos con IL-1 $\beta$ , produce un aumento en la producción y activación de NF- $\kappa$ B en el citoplasma. Este aumento de NF- $\kappa$ B facilita la traslocación del ADN del núcleo lo que desencadena la producción de citoquinas inflamatorias en el ribosoma que son las responsables de la destrucción del cartílago articular, todo ello regulado por el aumento del miRNA34a que se produce tras la estimulación del condrocito con IL-1 $\beta$ .
- De igual forma, si inhibimos el condrocito, se produce una disminución de NF- $\kappa$ B en el citoplasma celular, así como una disminución del miRNA 34a en el condrocito. Esta disminución supone una menor producción de las

citoquinas inflamatorias responsables del daño del cartílago articular.

### **OBJETIVOS:**

1. Analizar los datos clínicos obtenidos de los pacientes con artrosis de rodilla, para contrastarlos con los existentes en la literatura, así como para observar el grado de correlación clínico-radiológica.
2. Analizar los cambios histopatológicos e inmunohistoquímicos que se producen en el cartílago articular en relación a la enfermedad degenerativa del mismo.
3. Establecer un modelo experimental de condrocitos humanos que permitan determinar el miRNA-34a mediante "PCR real time", al estimular el condrocito con IL-1 $\beta$  e inhibirlo con Parthenolide.
4. Determinar y cuantificar la expresión de las proteínas *NF- $\kappa$ B-p65* y *NF- $\kappa$ B-p-p65* en cultivos de condrocitos humanos mediante Western-Blot analizando las variaciones en su expresión al estimular el condrocito con IL-1 $\beta$  y al inhibirlo con Parthenolide.
5. Determinar y cuantificar la expresión de mRNA-*NF- $\kappa$ B* mediante PCR real time tras la estimulación del condrocito con IL-1 $\beta$  e inhibición con Parthenolide mediante "PCR real time".
6. Determinar y cuantificar la expresión de la citoquina inflamatoria MCP-1 mediante ELISA tras la estimulación con IL-1 $\beta$  e inhibición del condrocito con Parthenolide, responsable del daño articular en los pacientes con artrosis.
7. Analizar los resultados obtenidos tras la estimulación e inhibición del condrocito y valorar su posible aplicación terapéutica en la práctica médica diaria.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**



El estudio se realizó sobre un total de 27 pacientes en lista de espera quirúrgica en el Departamento 5 (Clínico-Malvarrosa) de la Agencia Valenciana de Salud, sometidos a una artroplastia total de rodilla.

Todos los pacientes fueron intervenidos por presentar una deformidad en varo de rodilla (“genu varo” artrósico de rodilla) con criterios clínicos que aconsejaban la indicación quirúrgica (mal control del dolor con tratamiento médico habitual, déficit funcional significativo, pérdida de movilidad; necesidad de ayudas para caminar) y radiográficos que mostraban un deterioro articular evidente (grado III-IV de Ahlbäck).

La intervención quirúrgica se llevó a cabo por miembros de la Unidad de Ortopedia del Servicio de Traumatología y Cirugía Ortopédica del Hospital Clínico Universitario de Valencia a lo largo del año 2014. De los pacientes se obtuvieron 27 muestras, de las cuales, 24 fueron utilizadas para realizar el estudio macro y microscópico, mientras que 3 muestras se utilizaron para realizar la técnica de cultivo de condrocitos.

### ***OBTENCIÓN DE DATOS CLÍNICOS***

Los datos clínicos y demográficos (edad, sexo, rodilla más afecta, tratamientos previos aplicados, antecedentes médicos de interés, cirugías previas en la rodilla intervenida, grado de afectación contralateral, estado de la enfermedad en otras localizaciones distintas a la rodilla) de los pacientes se obtuvieron a partir de la Historia Clínica electrónica del Centro.

Mediante el estudio radiográfico de imagen (telemetría en ortostatismo de ambas extremidades inferiores) se clasificó el grado de osteoartritis de las rodillas en función de los criterios radiológicos de Ahlbäck.

Previamente a la intervención se aplicó a todos los pacientes seleccionados el “Knee-Society-Score (KSS)” que es un cuestionario que permite obtener una valoración clínica y funcional del paciente, analizando aspectos puntuales de la articulación afecta.

Dicho cuestionario consta de 12 preguntas en forma de test con 5 posibles respuestas enumeradas con un puntuación del 0 al 4, siendo 4 la puntuación más favorable y 0 la más desfavorable.

Dicho test consta de las siguientes preguntas:

1. **Durante las últimas 4 semanas** .....¿Cómo describiría el dolor que normalmente tiene en la rodilla?
2. **Durante las últimas 4 semanas** .....¿Ha tenido algún problema con el aseo personal por causa del dolor de su rodilla?
3. **Durante las últimas 4 semanas** .....¿Ha tenido algún problema para entrar y salir de un coche o usar el transporte público aún con bastón por el dolor de la rodilla? □
4. **Durante las últimas 4 semanas** .....¿Durante cuánto tiempo ha sido capaz de caminar antes de que el dolor de la rodilla se convierte en grave? (*Con o sin un palo*)
5. **Durante las últimas 4 semanas** .....¿Después de un tiempo sentado ¿cuanto dolor ha tenido al levantarse?
6. **Durante las últimas 4 semanas** .....¿Ha estado cojeando al caminar, a causa del dolor de la rodilla?
7. **Durante las últimas 4 semanas** .....¿Podría arrodillarse y levantarse de nuevo después de un rato de descanso?
8. **Durante las últimas 4 semanas** .....¿Has tenido dolor en la rodilla en la cama por la noche?
9. **Durante las últimas 4 semanas** .....¿el dolor de su rodilla ha interferido en su actividad cotidiana (*incluidas las tareas domésticas*)?
10. **Durante las últimas 4 semanas** .....¿Ha sentido que su rodilla podría de repente ceder o fallarle y hacerle caer al suelo?
11. **Durante las últimas 4 semanas** ..... ¿Podría usted ir de compras por si solo?
12. **Durante las últimas 4 semanas** ..... ¿Podría usted subir o bajar escaleras?

De esta forma la puntuación global puede interpretarse de la siguiente forma:

- **0-19 puntos:** Severa alteración de la función articular.
- **20-29 puntos:** Moderada severa alteración de la función articular.
- **30- 39 puntos:** Leve-moderada alteración de la función articular.
- **39-48 puntos:** Satisfactoria función articular

### ***OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN INICIAL DE LAS MUESTRAS PARA ESTUDIO***

Las muestras estudiadas macroscópicamente y microscópicamente fueron obtenidas a partir de la osteotomía proximal de tibia que se lleva a cabo en las artroplastias totales de rodillas postero-estabilizadas (modelo de implante que se utiliza en nuestro servicio). Con la pieza que se obtuvo y que incluye el compartimento medial y lateral de la tibia proximal se procedió a medir la pieza en los planos lateral y coronal (figuras 8 y 9). Posteriormente se procedió a medir el grosor del compartimento lateral y medial que en este tipo de deformidades es el más afectado por la degeneración artrosica (efecto de la sobrecarga mecánica), con la utilización de un pie de rey del instrumental de la prótesis total de rodilla Vanguard (Figura 10).



**Figura 8. Medición lateral de la meseta tibial.**



**Figura 9. Medición antero-posterior de la tibia proximal en quirófano**

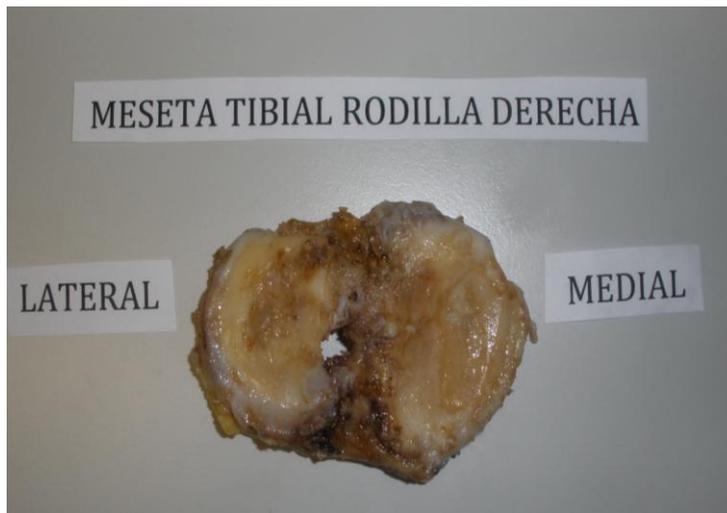


**Figura 10. Determinación del grosor del compartimento medial en quirófano.**

## MATERIAL Y MÉTODOS

Finalmente, la muestra se introdujo en un recipiente con formol, para fijar la estructura de la misma. A la semana de la inclusión de la pieza en formol, en el laboratorio se realizaron cortes de 1 cm de ancho y 1 cm de largo aproximadamente de los compartimentos medial y lateral de la meseta tibia.

Una vez la pieza fijada en formol y antes de proceder a obtener la muestra se obtuvieron imágenes de la muestra primero, y luego de las dos muestras cortadas y preparadas de ambos compartimentos (Figuras 11,12 y 13).



**Figura 11. Muestra de la pieza (extremidad proximal de la tibia obtenida tras permanecer en formol una semana).**



**Figura 12. Muestra de la pieza (1x1 cm) cortada de la meseta medial.**



**Figura 13. Muestra de la pieza (1x1) cortada a partir de la meseta tibial lateral.**

Los cortes se realizaron con una sierra fina de 1 mm para no deteriorar la estructura del tejido óseo (Figura 14) y se volvieron a introducir en formol una semana más (Figura 15).



**Figura 14. Sierra de corte de 1 mm empleada para obtener las muestras.**



**Figura 15. Tras el corte de las muestras, éstas se vuelven a introducir en formol.**

## ***PREPARACIÓN Y DESCALCIFICACIÓN DE BLOQUES ÓSEOS***

Una vez se había realizado el corte del bloque óseo y tras la introducción de cada uno de ellos perfectamente identificado en cartuchos independientes, se inició el proceso de preparación de las mismas para el análisis histológico.

Para ello se siguieron los siguientes pasos:

- 1- En primer lugar, se lavaron los cartuchos que contenían las muestras en agua corriente.
- 2- Posteriormente se colocaron las muestras contenidas en los cartuchos y se introdujeron en un frasco al que posteriormente se añadió el reactivo “Ostesoft” (MERCK\_MILLIPORE®)

El Osteosoft es una solución descalcificadora de tejido óseo usada para material con sensible contenido en calcio. Las piezas cortadas y contenidas en los cartuchos se mantuvieron en esta solución durante 4 semanas, momento en el que el tejido descalcificado puede cortarse con bisturí fácilmente. (Figuras 16 y 17).



**Figura 16. Muestra del cartucho con la pieza introducida en el reactivo durante 4 semanas.**



**Figura 17. Muestras incluidas en "osteosoft" en fase de descalcificación.**

3- Posteriormente se lavaron las piezas de nuevo con agua corriente, y fueron procesadas en el servicio de Anatomía Patológica para llevar a cabo el análisis histológico. Inicialmente y para completar la fijación de la estructura de las piezas ya descalcificadas, éstas fueron introducidas de nuevo en formol.

4- Tras el baño en formol, los cartuchos se colocaron en un procesador de tejidos LEICA ASP 300 S.

El equipo posee varios programas en función del tipo de tejido y en concreto para el procesamiento de las muestras obtenidas se siguió el siguiente esquema:

En primer lugar, las muestras se deshidrataron con alcoholes de graduaciones diferentes. Posteriormente se realizó el aclaramiento del exceso de alcohol con Xileno, Tolueno y Cloroformo durante unas 12 horas. Finalmente tras el aclaramiento se procedió al montaje del bloque en parafina.

**Tabla 2. Procesos de elaboración de las muestras para estudio histológico.**

Fijación	Deshidratación	Aclaramiento	Parafinar
1. Formalina (tamponada o no tamponada)	1. Alcohol etílico 2. Alcohol isopropílico 3. Alcohol metílico	1. Xileno 2. Tolueno* 3. Cloroformo*	1. Parafina
2. Sustituto de formalina	4. Alcohol butílico 5. Alcoholes industriales desnaturalizados		

5- La elaboración del bloque en parafina del tejido procesado, se realizó con el módulo caliente del centro de inclusión de parafina Leica EG1150 H.

Se colocó el tejido procesado en la posición correcta dentro del cartucho y con el molde metálico, se abrió el dispensador de parafina líquida hasta que se llenaba el cartucho. Posteriormente éste se dejaba enfriar en la placa fría hasta que solidificaba.

6- Finalmente se procedió al corte de los bloques con el micrótopo:

De acuerdo a los pasos anteriormente indicados, se realizaron las diferentes preparaciones sobre las que se probaron distintos anticuerpos y en las que se practicaba la tinción de hematoxilina-eosina para estudiar la morfología del tejido. Los cortes realizados tenían un grosor de 4 a 5 micras. De estos, 2 se utilizaban para la aplicación de la tinción hematoxilina-eosina, y 6 para llevar a cabo el estudio inmuno-histoquímico.

## **ANÁLISIS HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO**

El análisis histológico se realizó sobre muestras de tejido articular procesado que se montaron en portaobjetos con Poly-L-lisina. Para el estudio morfológico de las piezas se emplearon técnicas convencionales de tinción con hematoxilina-eosina.

Reactivos:

- Eosina 0,7% en agua destilada
- Hematoxilina de Harris

Protocolo de tinción:

Las muestras ya montadas en el porta, se introdujeron inicialmente en hematoxilina de Harris durante 5 minutos. Posteriormente, se realizó un lavado con agua destilada durante otros 5 minutos y un lavado rápido posterior con agua corriente. En ese momento se realizó una inmersión de las muestras en eosina de 1 minuto, y se deshidrataron posteriormente con lavados cortos en alcohol de 96° y absoluto. Finalmente se lavaron con Xilol durante 10 minutos y se montaron para su análisis.

Por otro lado, en las secciones incluidas en parafina destinadas al estudio inmunohistoquímico se utilizó la técnica de la avidina-biotina-peroxidasa (ABP), con algunas modificaciones.

Los anticuerpos utilizados en el estudio han sido:

ANTICUERPO	DILUCIÓN	MONO/POLICLONAL	CASA
NF- $\kappa$ B	1:500	monoclonal	DAKO

**Tabla 3. Anticuerpo utilizado en el estudio inmunohistoquímico.**

## ***ESTABLECIMIENTO DE UN CULTIVO PRIMARIO DE CONDROCITOS Y ELABORACIÓN DE UN MODELO IN VITRO DE INFLAMACIÓN***

Del total de muestras obtenidas, se eligieron tres al azar para realizar un modelo experimental de cultivo de condrocitos, que nos permitiera elaborar un modelo de inflamación sobre el que pudiéramos actuar.

Para el cultivo de condrocitos se ha utilizado la superficie articular de la meseta tibial lateral, menos afectada por el efecto de la sobrecarga mecánica.

En este caso, tras realizar la osteotomía de la porción proximal de la tibia según el protocolo de intervención en una prótesis total de rodilla y en condiciones de esterilidad absoluta, se envió la muestra desde quirófano al laboratorio de Anatomía Patológica en suero fisiológico.

Para reproducir in vitro unas condiciones semejantes al entorno de inflamación crónica que experimentan los condrocitos de las rodillas con osteoartrosis, los cultivos primarios de condrocitos fueron estimulados con IL-1 $\beta$ . Dicha citoquina pro-inflamatoria está presente tanto en el líquido sinovial, como en los condrocitos de los pacientes con osteoartrosis, y como ya se ha mencionado en la introducción participa activamente en los procesos relacionados con el catabolismo del cartílago y en los procesos inflamatorios de la artrosis.

El NF- $\kappa$ B es una proteína dimérica que es activada por la IL-1 $\beta$ , cuando ésta actúa sobre el condrocito, de manera que se separa y se dirige al núcleo para unirse al ADN de diversos genes (translocación), lo que origina que se active la producción de citoquinas inflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$  en el ribosoma con la regularización del miR-34a.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El diseño del presente estudio fue aprobado por el comité Ético del Hospital Clínico de Valencia, ya que cumplía los criterios éticos y biomédicos establecidos en la Declaración de Helsinki (Junio 1964, Helsinki, Finlandia).

Con la ayuda de un bisturí y en condiciones de esterilidad se diseccionó el cartílago procedente del platillo tibial de los especímenes obtenidos y se conformaron piezas de pequeños tamaño. Posteriormente se aislaron los condrocitos del cartílago mediante digestión enzimática.

El cartílago aislado, se troceó de forma mecánica y se sometió a digestión con una dilución enzimática. De esta forma, los fragmentos de cartílago obtenidos fueron expuestos a una dilución de colagenasa tipo II a dosis de 1mg/mL (Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri [MO], EE.UU.) en un medio *DMEM/Ham's F-12* con penicilina (100 U/mL) y estreptomycinina (100 mg/mL) durante 16 horas.

Transcurrido ese tiempo, el cartílago digerido se filtró a través de un filtro estéril de 70 mm de tamaño de poro. Se realizaron dos lavados con *DMEM* suplementado con SBF al 10%, penicilina 100 U/mL y estreptomycinina 100 mg/mL (*DMEM* completo) y se cuantificaron las células viables con ayuda de un contador celular automático *TC20™ Automated Cell Counter* (Bio-Rad, Madrid, España), sembrándose en frascos de cultivo en medio de expansión *DMEM* suplementado con SBF y penicilina /estreptomycinina. Finalmente se cultivaron a 37° en una estufa humidificada con 95% de humedad y con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

En las siembras sólo fueron utilizadas aquellas suspensiones con una viabilidad superior al 80%. Los condrocitos aislados se sembraron en placas multipocillo

y fueron cultivados hasta alcanzar la confluencia, con cambios de medio a días alternos.

### *Elaboración del modelo in vitro de inflamación*

Para reproducir *in vitro* unas condiciones semejantes al entorno de inflamación crónica que experimentan los condrocitos en la artrosis, los cultivos primarios de condrocitos fueron estimulados con IL-1 $\beta$  (Peprotech EC Ltd., Londres, Reino Unido). Dicha citoquina proinflamatoria está presente tanto en el fluido sinovial como en los condrocitos de pacientes con artrosis y participa en procesos relacionados con el catabolismo del cartilago<sup>51</sup> y en los procesos inflamatorios vinculados a la artrosis<sup>52</sup>.

En nuestro estudio comparamos cultivos estimulados con IL-1 $\beta$  a 10 ng/mL en ausencia y en presencia de un inhibidor de NF- $\kappa$ B denominado **Parthenolide** (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, EE.UU., Ref: P0667), a una concentración de 25 microM, durante 24 horas.

El Parthenolide (PTL) es un compuesto natural que se obtiene de la planta perenne *Tanacetum parthenium*. PTL puede inhibir la degradación y la fosforilación del NF $\kappa$ B inhibitor I $\kappa$ B (IKK) y directamente inactivar NF- $\kappa$ B. En la actualidad siguen siendo desconocidos los mecanismos moleculares exactos por los que el PLT participa en la actividad anti-inflamatoria. El estudio realizado por Benjamin H.B. Kwok demostró que se une a la subunidad quinasa I $\kappa$ B kinase L (IKKL). Esta subunidad quinasa se conoce que juega un rol importante en la vía de señalización mediada por citoquinas. Mediante espectrometría de masas pudo demostrar que una sola sustitución de aminoácidos en la activación de IKKL en concreto C179A suprime la actividad inhibitoria de IKKL por PLT, por tanto este residuo de cisteína es un

candidato probable para el sitio de unión covalente modificado por PLT<sup>53</sup>.

Tras la estimulación con IL-1 $\beta$ , se extrajo el ARN total de las células con el equipo *mirVana TM miRNA Isolation Kit* (Ambion, Austin, TX, EE.UU.) en las condiciones anteriormente descritas y se estudió la expresión del micro ARN miR-34a.

Se ha descrito en un modelo in vitro, en donde la expresión de miR-34a es inducida en condrocitos de rata por IL-1 $\beta$ <sup>47</sup>.

Nosotros utilizamos condrocitos humanos de la siguiente forma:

1. En los condrocitos de la rodilla artrósica sin la estimulación de la IL-1 $\beta$ , se determina con Western-Blot la presencia de NF- $\kappa$ B (que se supone debe estar disminuida), se determina también la expresión del miR-34a para luego determinar las citoquinas inflamatorias segregadas por el condrocito.
2. En los condrocitos de la rodilla artrósica se estimulan con IL-1 $\beta$ , y se determina posteriormente el NF- $\kappa$ B (que se supone estará aumentado) así como la expresión del miR-34a y la posterior medida de las citoquinas inflamatorias.
3. A los condrocitos de la rodilla artrósica se les añade un inhibidor de NF- $\kappa$ B y se estimulan con IL-1 $\beta$ , para determinar posteriormente los niveles de NF- $\kappa$ B y la posterior medida de citoquinas inflamatorias. Se estudia el miR-34a cuya expresión se debe inducir significativamente con la IL-1 $\beta$ .

## **METODOLOGIA PARA WESTERN BLOT Y ELISA**

### WESTERN BLOT

Para el estudio de la expresión de proteínas se extrajo proteína total de tejido óseo mediante digestión mecánica y utilizando un buffer de extracción de proteínas.

La cuantificación de proteínas se ha realizado mediante el método de Lowry, utilizando como recta patrón estándar albúmina sérica bovina (BSA). Una vez cuantificadas, se cargaron 30-50µg de proteínas en un gel SDS-poliacrilamida para su separación mediante electroforesis. Se empleó un marcador de peso molecular (Biorad).

Una vez separadas las proteínas, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, para posteriormente incubar las membranas con los anticuerpos primarios EGFR, E-Cadherin, N-cadherin, ZEB 1 (Sigma Aldrich) el tiempo indicado por el fabricante. Finalmente se llevó a cabo el revelado en una cámara de revelado automática.

### ELISA

Para la detección de citoquinas inflamatorias y pequeñas concentraciones de proteínas (MCP-1) se utilizó la técnica de ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) que es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable como cambio de color o algún otro tipo; en ocasiones, con el fin de reducir los costes del ensayo, nos encontramos con que existe un anticuerpo primario que reconoce al antígeno y que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva enlazado la enzima anteriormente mencionada.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La aparición de colorantes permitió efectuar la medición de forma indirecta, mediante espectrofotometría del antígeno en la muestra.

El proceso realizado fue el siguiente:

El primer día se incubó en anticuerpo primario con una dilución de 1:20000 a 4° grados durante toda una noche.

El segundo día se procedió a bloquearlo con PBS-BSA al 4% y luego se incubó durante 2 horas a 37° grados. Tras esto, se realizó el lavado del anticuerpo primario 5 veces con PBS-TWEEN y se añadió la proteína MCP-1 (1:100) disuelta en PBS-TWEEN 1X al 0.2% de BSA. Se realizó una nueva incubación de la proteína durante 2 horas a 37° para posteriormente realizar un nuevo lavado. Finalmente, se procedió a la incubación del anticuerpo anti-MCP-1 a una concentración de 1:10000 con PBS-TWEEN y se incubó toda una noche a 4°C.

El tercer día se lavó la placa en primer lugar, para posteriormente incubar el anticuerpo secundario (para que se una solo al anticuerpo 1°) marcado con Peroxidasa a una concentración 1:20000 con PBS-TWEEN 1X al 0.2% de BSA durante 2 horas a 37°C.

A continuación se lavó y se realizó el revelado, incubándolo durante tres minutos a oscuras con una solución de revelado (momento en el que se une la solución de revelado a el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa). Luego se detuvo la reacción añadiendo  $H_2SO_4$  a 2M, y finalmente se procedió a leer la placa a 490 nm de longitud de onda en el lector de placas VICTOR®.

## ***TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR***

### **Estudio de la expresión de miARN-34a y mRNA NF- $\kappa$ B**

La extracción de RNA total se realizó mediante el uso de mirVana miARN Isolation Kit (Ambion, Austin, TX, USA), siguiendo las instrucciones establecidas por el fabricante.

#### **RT PCR y Real Time PCR cuantitativa:**

Se sintetizó cDNA a partir del RNA total usando primers específicos a 5x mediante TaqMan Assay Protocol de Applied Biosystems. Este sistema permitió amplificar miRNAs maduros en dos pasos: primero la síntesis de cDNA específico y luego la cuantificación por PCR en tiempo real gracias al alargamiento de la cadena producido por el desplegamiento del primer, lo que facilitó la unión del primer a una sonda necesarios para la cuantificación.

En la reacción de RT- PCR se utilizaron 300 ng de cDNA, 5ul de Taqman gene Expression Master Mix, 5uL de H<sub>2</sub>O y 0,5  $\mu$ L volumen de sondas NF- $\kappa$ B y ACTINA como control. La reacción de RT-PCR para analizar la expresión de microRNA se realizó mediante el kit Taqman Universal Master Mix II (Life Technologies) y utilizando 10ng de cDNA. La PCR en tiempo real se llevó a cabo en un equipo ABI Prism 7900.

# RESULTADOS



## ***ESTUDIO CLÍNICO***

El estudio se realizó sobre un total de **27 pacientes** sometidos a una artroplastia total de rodilla. Todos los pacientes fueron intervenidos con la indicación de artrosis severa de rodilla (grado III-IV de Alhåck). En todos los casos la indicación quirúrgica se estableció siguiendo los criterios de la Institución y que se fundamentan en el dolor incapacitante que no se controla con tratamiento medico habitual y la limitación funcional del enfermo/a.

La intervención quirúrgica se realizó por la unidad de Ortopedia del Servicio de Traumatología y Cirugía Ortopédica del Hospital Clínico Universitario de Valencia a lo largo del año 2014. De los pacientes se obtienen 27 muestras, de las cuales, 24 son utilizadas para estudio macro y microscópico, mientras que 3 muestras son utilizadas para realizar una técnica de cultivo de condrocitos.

### **EDAD**

La edad media de los pacientes intervenidos fue de 70.03 años, con una edad mínima de 59 y una edad máxima de 79 años.

### **SEXO**

En relación al sexo, 18 pacientes eran mujeres, mientras que 9 eran hombres.

### **LATERALIDAD**

El lado afectado con más frecuencia en el 66% de los casos fue el lado izquierdo, lo que se corresponde con 18 pacientes, mientras que el lado derecho estaba afectado en 9 pacientes.

### **CLÍNICA**

En relación a la clínica, el 51.9% de los pacientes (14 pacientes) presentaban como clínica fundamental dolor invalidante asociado a derrames de repetición con gran incapacidad funcional, mientras que un 48.1% presentaban dolor, derrames, una deformidad clínica evidente y ciertas limitaciones para la vida cotidiana.

### **KNEE-SCORE**

El análisis del Knee-society-score (KSS) entregado a los pacientes muestra una puntuación media obtenida de 19.85 puntos.

### **ANÁLISIS RADIOGRÁFICO**

La clasificación radiográfica de Albhäck realizada en todos los pacientes de forma previa a la cirugía, puso de manifiesto que la mayoría de los pacientes se encontraban en un grado III de Albhäck (70,4%), mientras que solo un 18,5% de los pacientes presentaba un grado radiológico IV.

Un 70,04% de los pacientes, lo que equivale a 19 pacientes no presentaban correlación clínico-radiográfica, mientras que solo en 8 pacientes (29,96%) era evidente una relación directa entre la clínica y las alteraciones estructurales radiográficas.

### **ANTECEDENTES**

En relación a la comorbilidad asociada, la hipertensión arterial fue el antecedente médico más frecuente, que presentaban hasta el 48,14% de los casos (13 pacientes), seguido de las alteraciones en el metabolismo lipídico en un 25,92% de los pacientes.

En relación a los antecedentes quirúrgicos de la rodilla intervenida, 7 pacientes del total (25,9%) presentaban algún tipo de cirugía previa en dicha articulación, siendo la intervención previa más frecuente la menisectomía

parcial artroscópica, antecedente que presentaban 5 pacientes.

Por lo que hace referencia la medicación previa de estos pacientes, 26 pacientes (96,3%) habían recibido algún tipo de tratamiento médico para mejorar la clínica de forma previa a la intervención, ya fuera con fármacos antiinflamatorios o analgésicos, siendo el más frecuentemente utilizado el Ibuprofeno en un 66,7% de los casos.

### ***ANALISIS ESTADÍSTICO DATOS CLÍNICOS***

#### *El banco de datos*

Una vez depurados los datos y obtenidas todas las variables necesarias para el estudio, la tabla de datos definitiva contiene 20 variables observadas en 27 pacientes. No existe ningún dato faltante, a todos los pacientes se les han observado todas las variables.

La depuración del banco de datos, y el análisis estadístico utilizado, se ha llevado a cabo con la aplicación informática R (R Core Team, 2014. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>).

### *Análisis exploratorio de las variables cuantitativas*

En el banco de datos hay seis variables numéricas: una de ellas discreta, la clasificación Albhäck; las otras cinco son continuas, o pueden considerarse como continuas.

Las cinco variables continuas son: edad, resultado del Knee-Society-Score, y el grosor y longitud antero-posterior y lateral de la meseta tibial de los pacientes, una vez realizada la osteotomía de la meseta tibial durante la intervención. En relación a la edad, se aprecia como la media de edad es de 70.03 con una mediana de 70.0 (tabla 4). Igualmente, la media del resultado del Knee – Society-Score completado por los pacientes de forma previa a la cirugía es de 19.85 con una mediana de 18 (tabla 4).

En relación a las medidas de las piezas tibiales obtenidas tras la osteotomía de la tibia proximal durante la intervención quirúrgica, se aprecia como los pacientes incluidos en el estudio presentaban unos valores similares. Se observó poca diferencia en relación a las medidas de longitud determinadas en las piezas obtenidas, siendo éstas de 7.41 cm de media por lo que respecta a la longitud medio-lateral y 5.14 cm en relación de longitud antero-posterior. Por lo que hace referencia al grosor del compartimento determinado la media es de 4.11 mm, como se aprecia en la tabla 4.

	Mean	Sd Error	Minima	Mediana	Máxima
<b>Edad</b>	70.63	0.98	59	70.0	79
<b>Knee score</b>	19.85	1.30	5	18.0	35
<b>Longitud lateral (cms)</b>	7.41	0.12	6	7.4	9
<b>Longitud AP (cm)</b>	5.14	0.13	4	5.0	7
<b>Grosor (mm)</b>	4.11	0.30	2	4.0	8

**Tabla 4. Descripción numérica de las variables continuas. Se muestra la media, el error estándar, el valor mínimo observado, la mediana y el valor máximo.**

Todas las correlaciones (coeficientes de correlación lineal de Pearson) observadas entre estas variables son muy pequeñas. Ninguno de los contrastes de hipótesis sobre cada uno de los coeficientes de correlación proporciona resultados estadísticamente significativos y todos los valores de p son más grandes de 0.05, por lo que todas las variables podrían estar correlacionadas. La matriz de correlaciones aparece descrita en la tabla 5.

	Edad	Knee score	Lon_lat (cms)	Lon_ap (cms)	Grosor (mm)
Edad	1.00	-0.05	0.18	0.06	-0.28
Knee score	-0.05	1.00	0.29	0.13	0.07
Lon_lat (cm)	0.18	0.29	1.00	0.37	-0.04
Lon_ap (cm)	0.06	0.13	0.37	1.00	-0.04
Grosor (mm)	-0.28	0.07	-0.04	-0.04	1.00

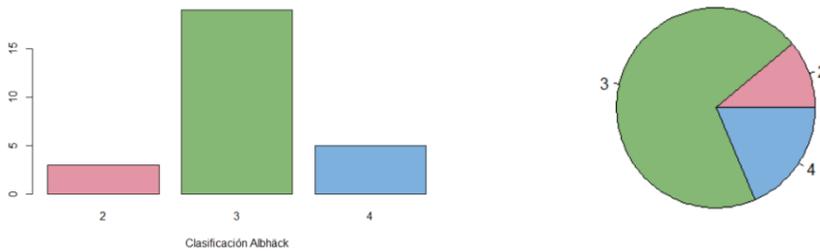
**Tabla 5. Coeficientes de correlación lineal de Pearson entre las distintas variables continuas.**

No se muestra aquí ninguna descripción gráfica de esas variables pues ni los histogramas ni los diagramas de cajas resultan informativos debido al tamaño muestral: 27 pacientes.

Por lo que hace referencia a la clasificación de Albhäck, se puede apreciar como la mayor parte de los pacientes intervenidos presentan una clasificación radiográfica de Albhäck de III (70.4%), mientras que el grado IV se aprecia en el 18,5% y el grado II en el 11.1% de los casos (tabla 6 y figura 18). No ha sido intervenido ningún paciente con grado I en este estudio, dado que la escasa afectación articular de este grado apenas se traduce en clínica, y que por lo tanto no son pacientes candidatos a una artroplastia total de rodilla según los criterios de la Institución.

	II	III	IV	Total
<b>Frecuencia</b>	3.0	19.0	5.0	27
<b>Porcentaje</b>	11.1	70.04	18.5	100

**Tabla 6. Tabla de frecuencias absolutas y relativas de la clasificación De Albhäck**



**Figura 18. Descripción gráfica de la clasificación de Albhäck: Diagrama de barras (izquierda) y diagrama de sectores (derecha).**

*Análisis exploratorio de las variables cualitativas*

En relación al sexo de los pacientes, el 66.7% eran mujeres, mientras que en un 66.7% la rodilla afectada con más frecuencia era la izquierda (tabla 7).

En general, la rodilla izquierda aparece con mayor frecuencia que la derecha (tabla 8), pero el porcentaje de afectación en la rodilla izquierda es el mismo en hombres que en mujeres.

No se desprende ninguna relación entre las variables sexo y rodilla afectada, al tratar de establecer la posible relación entre esas dos variables (tabla 9).

	Mujer	Varón	Total
<b>Frecuencia</b>	18.0	9.0	27
<b>Porcentaje</b>	66.7	33.3	100

**Tabla 7. Tabla de frecuencias absolutas y relativas de la variable sexo.**

	Derecha	Izquierda	Total
<b>Frecuencia</b>	9.0	18.0	27
<b>Porcentaje</b>	33.3	66.7	100

**Tabla 8. Tabla de frecuencias absolutas y relativas de la variable lateralidad.**

	Derecha	Izquierda
<b>Mujer</b>	6	12
<b>Varón</b>	3	6

**Tabla 9. Tabla de contingencia de las variables sexo y rodilla**

La mayor parte de los pacientes presentaban como clínica, la asociación de dolor y derrames de repetición (51,9%), siendo muy importante también, con un porcentaje del 44%, la asociación de dolor, derrames y deformidad clínica evidente. Solo en un 3,7% (1 paciente) se observó la presencia de dolor como único síntoma (tabla 10 y en la figura 19).

	Dolor	Dolor y derrames	Dolor, derrames y deformidad	total
<b>Frecuencia</b>	1.0	14.0	12.0	27
<b>Porcentaje</b>	3.7	51.9	44.4	100

Tabla 10. Tabla de frecuencias absolutas y relativas de los resultados de la exploración.

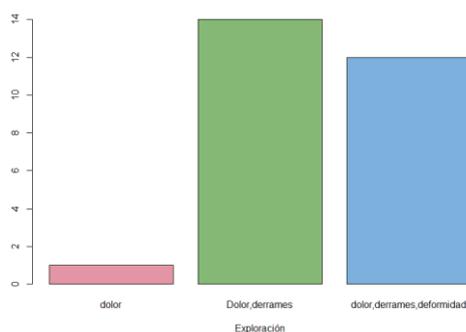


Figura 19. Diagrama de barras de la variable exploración.

En relación a los antecedentes médicos de los pacientes, hay que mencionar que dada la edad de los mismos (media de 70.63), la lista de antecedentes médicos es extensa.

El antecedente médico más frecuente es la hipertensión arterial, que la presentan el 48.14% de los pacientes (13 casos), seguido de la dislipemia en un 25.92% de los casos (7 pacientes).

Igualmente hay que mencionar que el 33.3% de los pacientes (9 casos) ya habían sido intervenidos de un artroplastia total de rodilla contralateral con anterioridad, al igual que el 25.92% de los pacientes (7 casos) presentaban una meniscectomía previa en la rodilla intervenida.

	Frecuencias		Porcentajes	
	si	no	si	no
<b>Antecedentes rodilla</b>	7	20	25.9	74.1
<b>Correlación Clínico-RX</b>	8	19	29.6	70.04
<b>Correlación Rx-Histologica</b>	18	9	66.7	33.3
<b>Tratamiento</b>	26	1	96.3	3.7

**Tabla 11. Tabla de contingencia de las variables antecedentes y tratamiento.**

Si llama la atención que cinco de los siete pacientes con antecedentes quirúrgicos en dicha rodilla presentaban como antecedente una meniscectomía previa, mientras que los dos restantes habían sido sometidos a una artrolysis de rodilla, con el antecedente de una fractura de meseta tibial (tabla11).

En relación a la correlación clínico-radiológica, se observa como en el 70.04 de los pacientes no existe correlación clínico-radiológica, mientras que por el contrario si existe correlación histológico-radiológica en un 66.7% de los casos (tabla11).

Por lo que respecta a la variable tratamiento se observa que todos los pacientes, excepto uno, habían sido sometidos al menos a un tratamiento médico (Tabla 11). Las medicaciones más utilizadas por los pacientes de forma previa a la cirugía eran, el Paracetamol y el

## RESULTADOS

Ibuprofeno, mientras que los corticoides y los Cox-2 solo habían sido utilizados por tres pacientes (tabla 12 y en la figura 20).

	Frecuencias		Porcentajes	
	Si	No	Si	no
<b>Ibuprofeno</b>	18	9	66.7	33.3
<b>Paracetamol</b>	15	12	55.6	44.4
<b>Metamizol</b>	4	23	14.8	85.2
<b>Arcoxia</b>	2	25	7.4	92.6
<b>Corticoides</b>	1	26	3.7	96.3

Tabla 12. Tabla de contingencia de los tratamientos utilizados, ordenados de más a menos frecuentes.

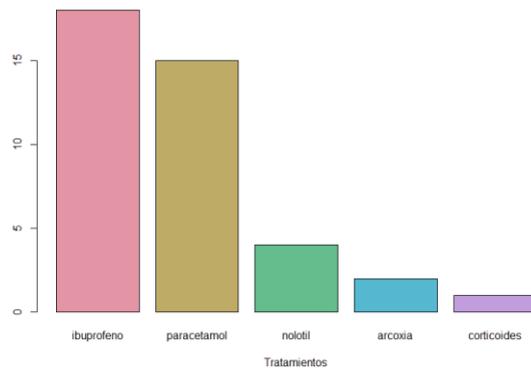


Figura 20. Diagrama de barras de los distintos tratamientos.

## ***ANÁLISIS HISTOLOGICO POR ÁREAS***

El estudio histopatológico se realizó sobre un total de 27 piezas quirúrgicas de tibia proximal obtenidas tras la realización de una osteotomía tibial en los pacientes sometidos a una artroplastia total de rodilla.

Se realizó un análisis de las diferentes áreas de la superficie articular de cada una de las 27 muestras quirúrgicas, es decir, analizando la meseta tibial medial y la meseta tibial lateral de cada una de las muestras.

El análisis histopatológico se centra fundamentalmente en la superficie articular de la mesetas tibiales, si bien la medial está más afectada en todos los pacientes debido a la deformidad en varo que presentan.

### **Análisis macroscópico**

Del total de las muestras estudiadas, los datos macroscópicos obtenidos fueron los siguientes:

La longitud medio-lateral media fue de 7.42 cm, con valor máximo de 9 cm y mínimo de 6 cm. La longitud antero-posterior media fue de 5.14 cm, con un valor máximo de 7 cm y un valor mínimo de 4 cm.

Por lo que hace referencia al grosor del compartimento medial, más afectado en todos los casos incluidos en el estudio, el grosor medio fue de 4.19 mm, con un valor máximo de 8 mm y un valor mínimo de 2 mm.

Desde un punto de vista macroscópico, apreciamos como el cartílago articular se vuelve opaco, de color amarillento, rugoso, blando y menos elástico.

### **Alteraciones en la estructura articular**

En general, el cartílago articular es una estructura organizada y adaptada al soporte de cargas y al desplazamiento mecánico durante los movimientos articulares. Éste sufre como consecuencia de la edad, de diferentes procesos inflamatorios y de la propia sobrecarga física un deterioro estructural, lo que induce cambios morfológicos progresivos que afectan a los condrocitos, a la matriz cartilaginosa y al hueso subyacente.

Estos cambios, configuran un complejo de lesiones, en un principio reactivas y reparativas y en una segunda fase degenerativas, que pueden describirse como alteraciones estructurales, de la matriz articular, de los condrocitos, del mesénquima y de la formación de osteocitos.

Las alteraciones de la estructura del cartílago que apreciamos son: fibrilación, microfractura y ulceración o erosión del cartílago articular.

#### *Fibrilación:*

Las muestras del cartílago nos muestran una pérdida de la superficie lisa del cartílago articular.

Los condrocitos pierden su orientación paralela a la superficie y adoptan patrones globulares y poligonales. La superficie articular adopta un perfil quebrado con incisiones irregulares de una profundidad variable (figura 21).

Estas lesiones las observamos o bien de forma focalizada, afectando a zonas concretas del cartílago o bien, afectando de forma difusa a la mayor parte de la superficie articular.

Se aprecian grietas superficiales verticales a la superficie. Su profundidad es variable, afectando al tercio superior de la superficie articular (figura 22 A-B-C-D).

### Microfractura:

Una lesión asociada a la fibrilación es el “desflecamiento”, que observamos en la superficie articular, con fracturas elongadas en la superficie del cartílago y fragmentación en láminas o esquirlas irregulares de la misma.

Las fracturas mas importantes aparecen como grietas de diámetro amplio, verticales, profundas, alcanzan el tercio profundo del cartílago y en ocasiones al tejido óseo. Presentan un componente horizontal (figura 23A).

Estas fracturas presentan cambios en la matriz y en la organización de los condrocitos de su alrededor (figura 23 B-C).

Se asocian a espacios quísticos intracartilaginosos o intraóseos de contenido agua (líquido sinovial), como se aprecia en la figura 24.

### Erosión:

La erosión la apreciamos como consecuencia de la pérdida del cartílago articular y la presencia de tejido óseo en la superficie articular.

Apreciamos como el tejido óseo emergente sufre una transformación eburnea. El tejido óseo adopta un patrón compacto, laminar y denso. Desaparece el patrón óseo trabecular normal. Aumenta la actividad osteoblástica, lo que es un indicador del fracaso de la respuesta del cartílago articular (figura 25 A-B-C).

### **Cambios en la matriz articular:**

La característica mas llamativa es un aumento en la basofilia alrededor de las lagunas de los condrocitos con una pérdida de la metacromasia (figura 27 A-B). Las alteraciones por fibrilación se asocian a un aumento en las fibrillas de colágeno, que se muestran paralelas a la superficie articular.

De la misma forma, en la figura 28 se aprecian fibrillas de colágeno desorganizadas y densas, dando imágenes cicatriciales.

### **Cambios en los Condrocitos:**

Apreciamos como los condrocitos superficiales mueren, son reabsorbidos y las lagunas aparecen vacías. Esta alteración se produce principalmente en la superficie celular y en la periferia de las grietas.

Por otro lado, los condrocitos viables, aumentan de tamaño, las lagunas son amplias y poligonales. Hay cambios basófilos en las áreas territoriales y cambios en la estructura de la matriz conformando una estructura de "fibrocartílago".

Como se aprecia en la figura 30 A-B, los condrocitos presentan un núcleo amplio, vesiculado con un nucléolo prominente. El citoplasma es amplio y ocupa el espacio lacunar. Los condrocitos aumentan su capacidad proliferativa y tienden a agruparse en grupos isogénicos, en los que se aprecia un número importante de condrocitos. Estos grupos (clones) aparecen aisladamente, en forma aleatoria y en las áreas lesionadas con fracturas.

El estudio inmunohistoquímico efectuado nos muestra una fuerte expresión de NF- $\kappa$ B a nivel del citoplasma de los condrocitos (figura 31 A-B). Esta expresión la observamos de manera más intensa en las áreas más alteradas del cartílago articular (figura 31 B-C).

### **Reacción Mesenquimal:**

Asociado a los cambios en el cartílago articular, apreciamos como desde el tejido óseo se produce una reacción mesenquimal caracterizada por un proceso de angiogénesis (figura 29).

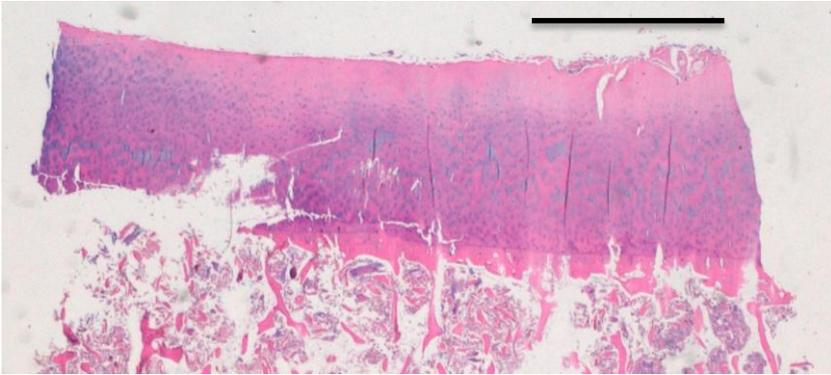
Se observa un crecimiento de células mesenquimales, fibroblastos y vasos sanguíneos de tipo capilar. El crecimiento es vertical, surge del tejido óseo, alcanzando el cartílago, al cual “perfora” y vasculariza. Se acompaña de un discreto componente inflamatorio y predominan células osteoblásticas que forman áreas de osteogénesis.

### **Osteofitos:**

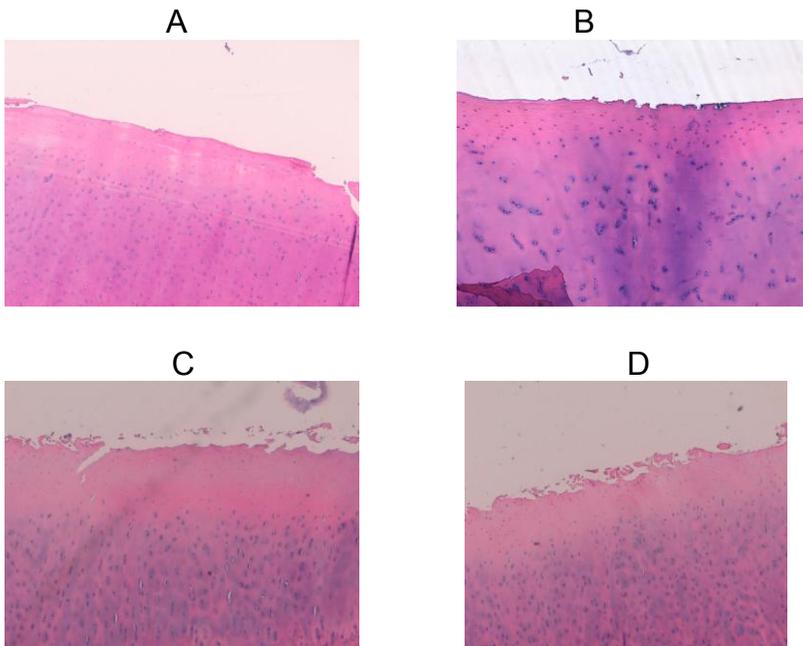
Aparecen en las áreas laterales de la superficie articular y se relacionan con las áreas donde hay una importante reacción mesenquimal y de angiogénesis.

Apreciamos acúmulos de condrocitos formando grupos isogénicos en un número mayor de lo habitual. De la misma forma, se asocian a un crecimiento del mesénquima y de la angiogénesis, con áreas de diferenciación osteoblástica y con un aumento del número de células de patrón cuboideo, formando unas estructuras con matriz cartilaginosa, de predominio fibroso que se asocian con tejido óseo neoformado.

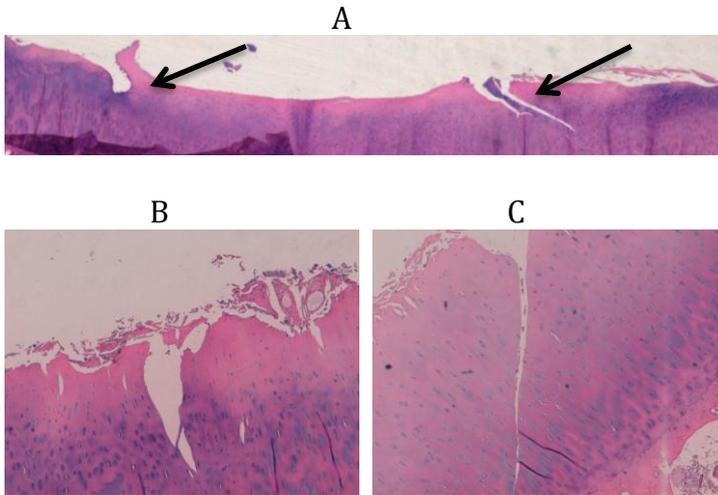
Los osteofitos aparecen asociados a la superficie del cartílago. Están unidas a él por un pedículo o bien libres en la cavidad articular (figura 26 A-B).



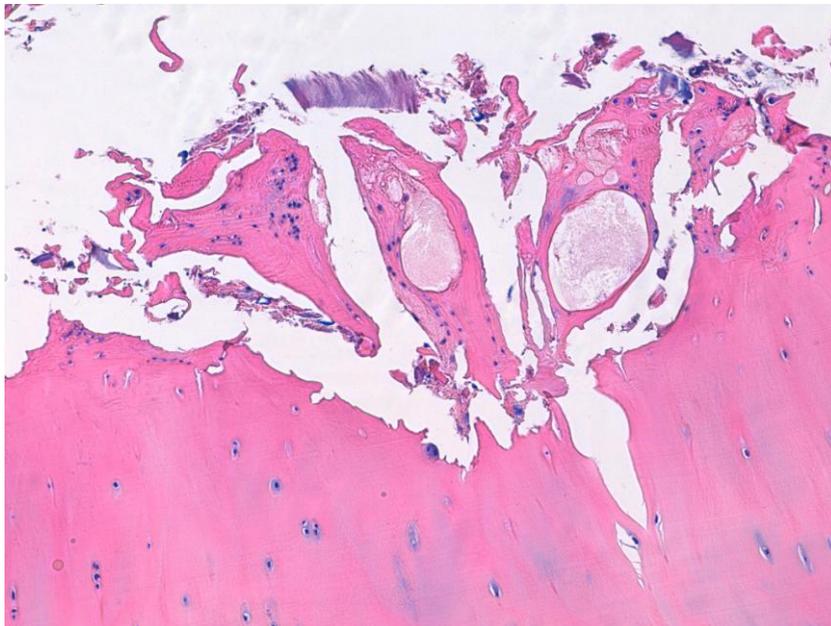
**Figura 21. Cartilago articular en proceso degenerativo. Fibrilación. Fracturación (línea)**



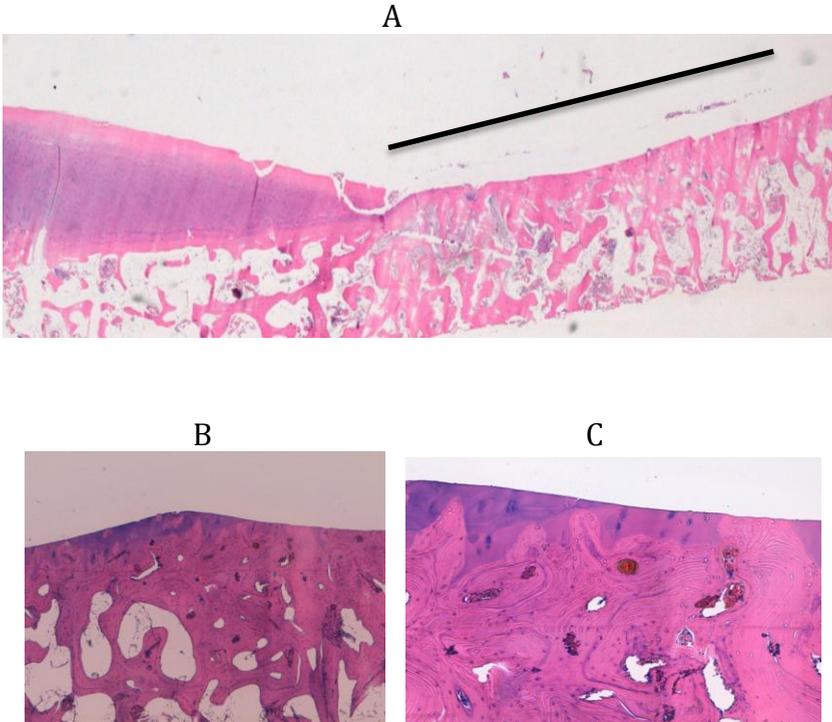
**Figura 22. Fibrilación. Cambios en superficie del cartilago. Patrón 1 de fibrilación. Se aprecia superficie aristada, quebrada (no como originalmente es el cartilago, fina). Las fracturas son poco profundas y dan imagen desflecada. El cartilago subyacente está bien definido. (A-B-C-D).**



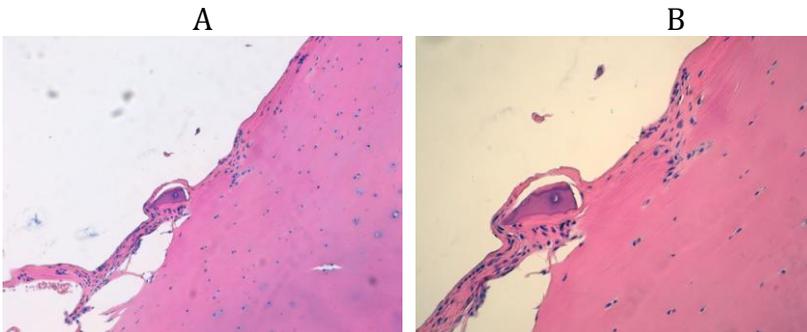
**Figura 23. Fracturas: Grietas en la superficie que alcanzan áreas profundas del cartilago (flechas) (A). Presentan un componente vertical y/o horizontal. El líquido sinovial circula a través de ellas en profundidad (B-C).**



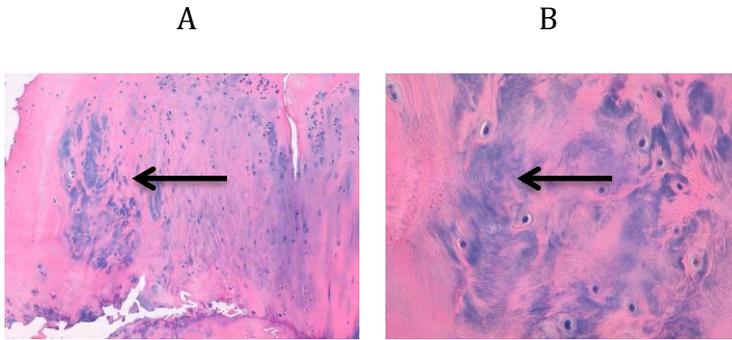
**Figura 24. Quistes intracartilagosos. Fracturación de la superficie articular.**



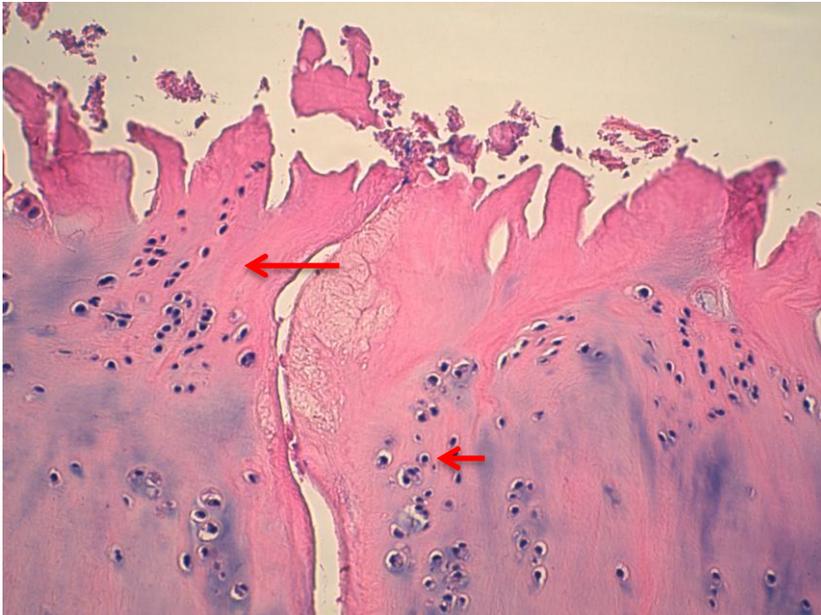
**Figura 25. Erosión del cartilago articular (línea) (A). Se aprecia un hueso ebúrneo: hueso laminar compacto en la superficie articular erosionada (B-C).**



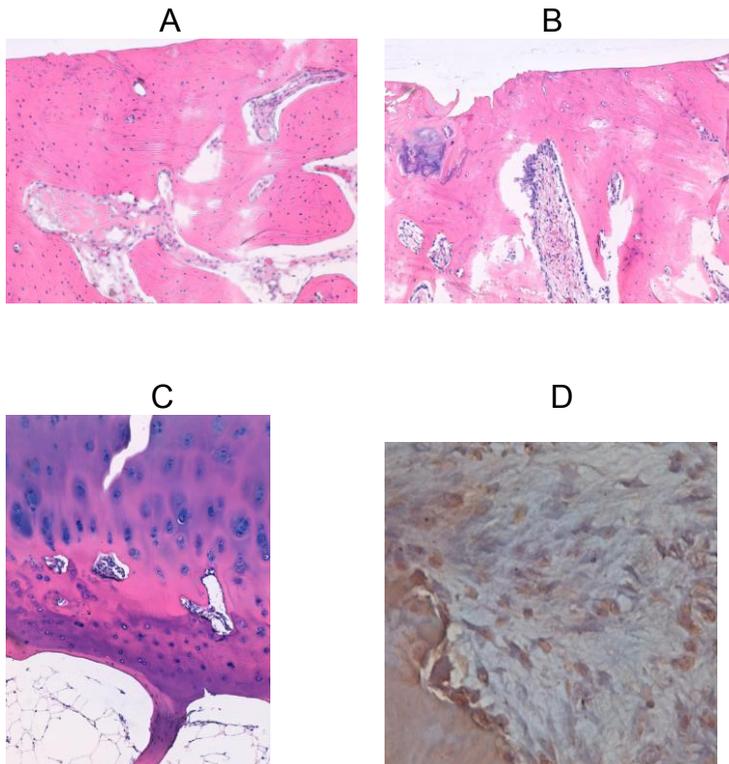
**Figura 26. Osteofitos (A-B).**



**Figura 27. (A-B) Cambios en la matriz. Basofilia (Azul).**

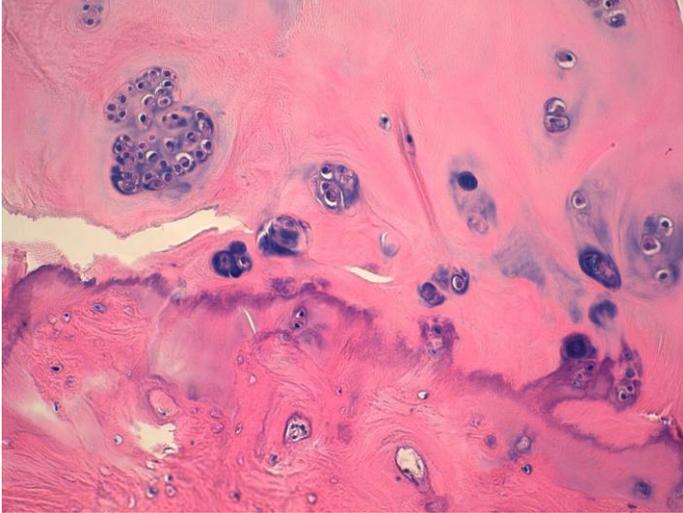


**Figura 28. Patrón fibrilar, colágeno. Podemos apreciar la transformación en fibrocartilago, con aumento del número de condrocitos en grupos isogénicos en la periferia (flecha roja).**



**Figura 29. Reacción mesenquimal. Angiogénesis intracartilaginosa (A-B-C). *NF-κB* en células mesenquimales (D).**

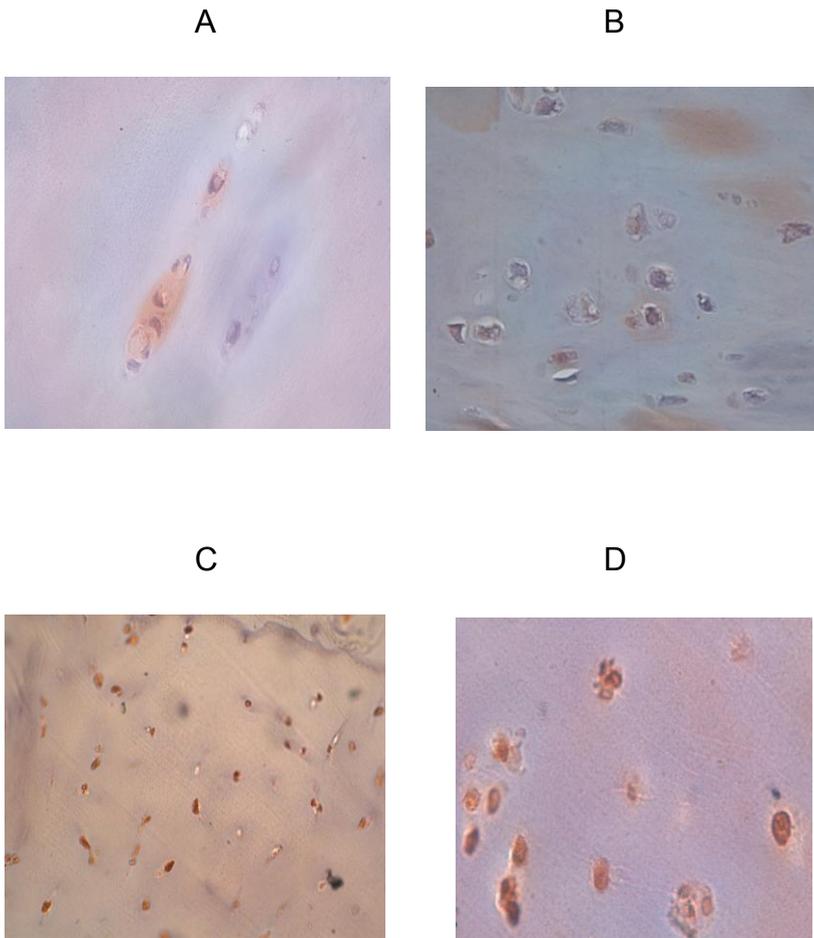
A



B



**Figura 30. A-B. Clonación. Aumento del número de condrocitos en los grupos isogénicos, con basofilia en áreas territoriales y aumento de las lagunas.**



**Figura 31. Aumento de la expresión de NF- $\kappa$ B en el citoplasma del condrocito (A-B-C-D).**

## ***CULTIVO DE CONDROCITOS***

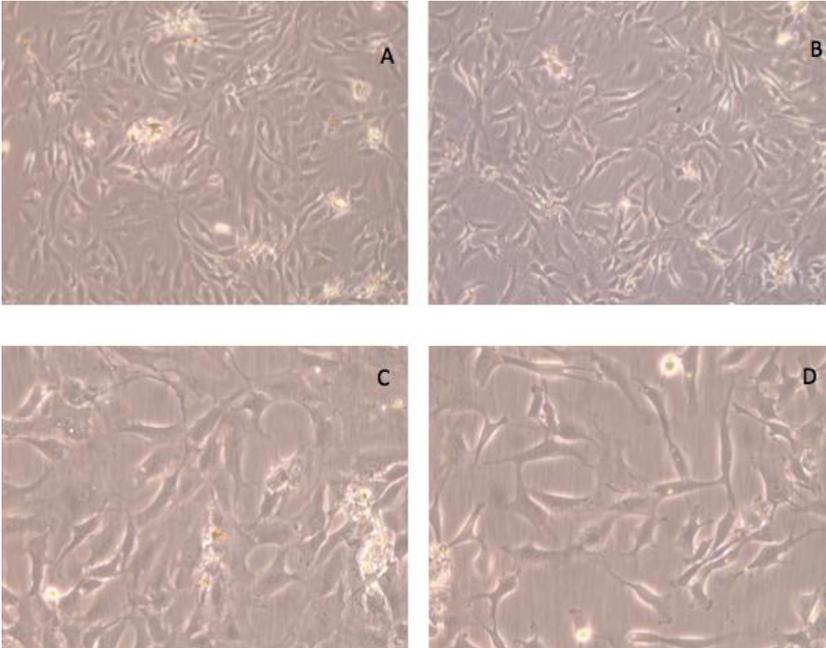
### ***1. Establecimiento y caracterización de un cultivo primario de condrocitos humanos***

A partir de una muestra de cartílago procedente de la meseta tibial externa de un paciente con diagnóstico de artrosis severa grado III-IV del Albhäck, se aislaron los condrocitos del cartílago, procediendo al establecimiento del cultivo celular.

El cultivo de células de condrocitos humanos han sido modelos extraordinariamente útiles para el estudio de los mecanismos fisiopatológicos de la artrosis. Tras el preparado del cartílago obtenido y someterlo a la digestión enzimática, lavados, contaje y siembra en el medio descrito en el apartado de material y métodos con una incubadora a 37° y a una presión de CO<sub>2</sub> al 5%, se procede al estudio del cultivo obtenido, una vez que se ha obtenido la confluencia de los condrocitos entre 24 y 48 horas.

El cultivo adoptó patrones mesenquimales con una baja actividad divisional. Las células son de morfología poligonal y de núcleo redondeado, grande y un citoplasma amplio con prolongaciones gruesas y escasas prolongaciones.

En el establecimiento del cultivo hemos podido observar que el cultivo de condrocitos presentó una forma redondeada y ligeramente poligonal, además de una escasa actividad mitótica y una capacidad de síntesis relativamente baja, pero a la vez suficiente para permanecer en confluencia durante el tiempo del estudio en cultivos como se muestra en la figura 32.



**Figura 32. Cultivo de condrocitos. A y B con visión 10x. C y D con visión 20x**

## *2. Descripción del cultivo de condrocitos control*

El cultivo de condrocitos control se realizó a partir de una muestra de meseta tibial de longitud antero-posterior de 5 cm, longitud lateral de 7 cm y un grosor de 2 mm.

El estudio con Western-Blot en *NF-κB*, muestra que en el cultivo de condrocitos utilizado como control, se aprecia como la expresión de la proteína *NF-κB*-p65 es de aproximadamente  $0,50 \cdot 2^{-\Delta\Delta ct}$ , mientras que la expresión de la proteína *NF-κB*-p-p65 es aproximadamente la mitad, con valores alrededor de  $0,20 \cdot 2^{-\Delta\Delta ct}$  y observables en la membrana de nitrocelulosa con una densidad baja (Figura 33).

### *3. Comportamiento de NF- $\kappa$ B en el cultivo de condrocitos.*

#### **A.-NF- $\kappa$ B tras la estimulación con IL-1 $\beta$ .**

El análisis con Western-Blot del cultivo de condrocitos tras la estimulación con IL-1 $\beta$ , muestra un claro aumento de la expresión de NF- $\kappa$ B (figura 34) tanto en la forma NF- $\kappa$ B-p65, como en la forma fosforilada NF- $\kappa$ B-p-p65.

Se procedió a la cuantificación de la proteína NF- $\kappa$ B-p65, así como de la forma fosforilada NF- $\kappa$ B-p-p65.

#### A.1.-Cuantificación de la expresión de la proteína NF- $\kappa$ B-p65.

En este estudio se observó el aumento significativo en la expresión de NF- $\kappa$ B-p65 cuando el cultivo fue estimulado con IL-1 $\beta$  comparado con la expresión del cultivo de condrocitos control que no fue estimulado, alcanzando valores de 1,15 pixeles, en comparación con los valores del cultivo control que son de 0.50 pixeles y observables en la membrana de nitrocelulosa de Western-Blot.

#### A.2.- Cuantificación de la expresión de la proteína NF- $\kappa$ B-p-p65.

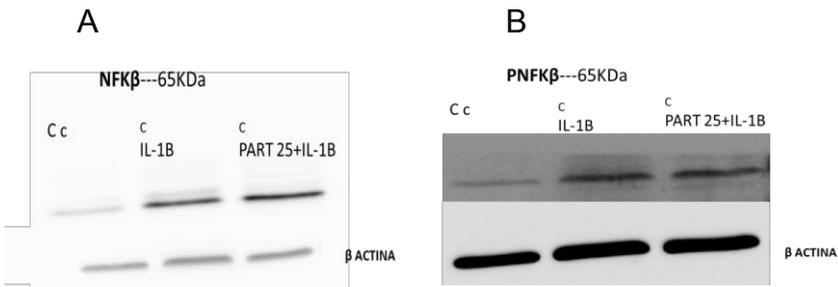
En cuanto a la expresión de la proteína fosforilada p-p65 medida con Western-Blot no se mostraron diferencias significativas con respecto al cultivo control al ser los condrocitos estimulados con IL-1 $\beta$ , siendo los valores cuantificados de 0.27 pixeles, discretamente superiores en relación a los valores control que son de 0.22 pixeles (figura 34). Al realizar el ratio entre ambas expresiones (proteína NF- $\kappa$ B-p65 y la NF- $\kappa$ B-p-p65) no se observó el aumento de la

proteína fosforilada y por tanto no hay activación de la misma en estas células (figura 34).

***B.-Actividad de NF- $\kappa$ B tras la estimulación con IL-1 $\beta$  y la inhibición de la Parthenolide.***

En nuestro estudio comparamos cultivos estimulados con IL-1 $\beta$  a 10 ng/mL en ausencia y en presencia de un inhibidor de NF- $\kappa$ B denominado Parthenolide (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU., Ref: P0667), a una concentración de 25 microM, durante 24 horas.

Tras la extracción de proteínas y análisis mediante Western Blot (figura 33), podemos apreciar que la expresión de proteínas procedentes del cultivo de condrocitos control (Cc), proteínas procedentes de un cultivo de condrocitos estimulados con IL-1 $\beta$  y proteínas procedentes de un cultivo de condrocitos estimulados con IL-1 $\beta$  y a la vez inhibidas con Parthenolide, PART25+IL-1 $\beta$  sobre la membrana de nitrocelulosa de Western-Blot.



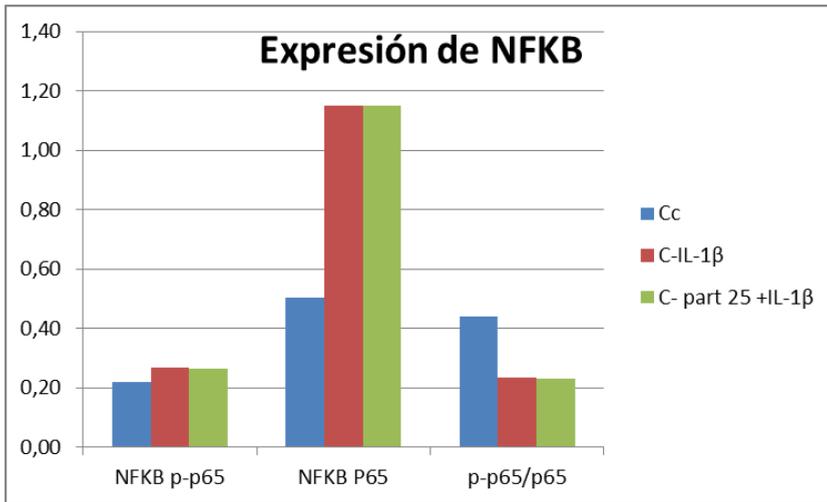
**Figura 33. Expresión de la proteína NFKB-p65 y (B) NFKB-p-p65 en condrocitos en la matriz de nitrocelulosa de Western-Blot**

### *B.1.- Cuantificación de la expresión de la proteína $NF-\kappa B$ -p65*

En el cultivo estimulado con IL-1 $\beta$  e inhibido a la vez con el Parthenolide, sustancia utilizada como inhibidor de  $NF-\kappa B$ , no se observó el efecto esperado en cuanto a la inhibición en la expresión de la proteína  $NF-\kappa B$ -p65, siendo esta similar a la expresión del cultivo que fue solamente estimulado con IL-1 $\beta$ , siendo la cuantificación de  $NF-\kappa B$ -p65 de 1.15 pixeles.

### *B.2.-Cuantificación de la expresión de la proteína $NF-\kappa B$ -p-p65.*

En el cultivo estimulado con IL-1 $\beta$  e inhibido a la vez con el Parthenolide, inhibidor de  $NF-\kappa B$ , tampoco se observó el efecto esperado en cuanto a la inhibición en la expresión de la proteína fosforilada  $NF-\kappa B$ -p-p65, siendo su expresión similar a la del cultivo que fue solamente estimulado con IL-1 $\beta$  (con un valor de 0.27 pixeles), produciendo igualmente una sobre-expresión significativa de  $NF-\kappa B$ , con una cuantificación de  $NF-\kappa B$ -p-p65 de 0.26 pixeles.

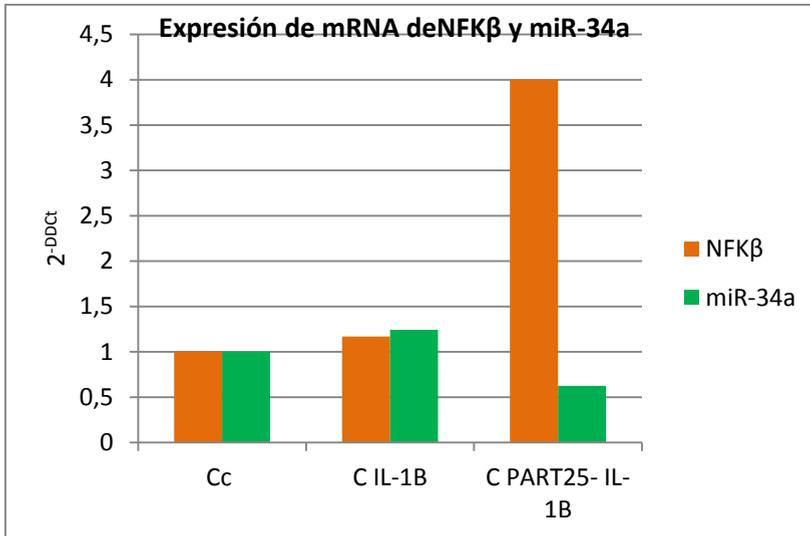


**Figura 34.** Cuantificación de la expresión de la proteína NFKB-p65 y la NFKB-P65 en condrocitos medido en PIXELES.

#### *4. Estudio de la expresión del RNAm de NF-κB y expresión del miR-34a en el cultivo de condrocitos.*

Se realizó la extracción de RNA de cada cultivo de condrocitos con las diferentes variantes tratadas: la estimulada con IL-1β, la estimulada con IL-1β y a la vez inhibida con Parthenolide y el control sin ningún tratamiento y se realizó un estudio mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR-RT), para analizar la expresión de mRNA de NF-κB y la expresión del miR-34a.

En la figura 35 se aprecia la expresión del mRNA de NF-κB y la expresión del miR-34a en los diferentes cultivos de condrocitos procedentes de un cultivo de condrocito control (Cc), cultivo de condrocitos estimulado NF-κB (c IL-1β) y proteínas de un cultivo de condrocitos estimulados con IL-1β y a la vez inhibidas con Parthenolide, PART25 + IL-1β.



**Figura 35. Expresión del RNAm de NFKB y de miR-34a en diferentes cultivos de condrocitos**

Los resultados obtenidos muestran, como se aprecia en la figura 35, que la expresión del mRNA en el cultivo de condrocitos estimulados con IL-1 $\beta$  y a la vez inhibidos con Parthenolide presentaban un aumento en la expresión de NF- $\kappa$ B muy significativo ( $4.0 \cdot 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) con respecto a las células control en las que el valor era de  $1.0 \cdot 2^{-\Delta\Delta Ct}$  y aquellas que solo fueron estimuladas con IL-1 $\beta$ , en donde el valor es de  $1.16 \cdot 2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

En cuanto a la expresión del miR-34a se pudo constatar un aumento en la expresión de este miRNA con respecto al control cuando las células están inducidas por IL-1 $\beta$ , alcanzando valores de  $1.24 \cdot 2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## RESULTADOS

Por su parte se observa una menor expresión del miRNA-34a en las células estimuladas con IL-1 $\beta$  y a la vez inhibidas con Parthenolide en relación a las células control y aquellas que solo fueron estimuladas con IL-1 $\beta$ , con unos valores de  $0.6 \cdot 2^{-\Delta\Delta Ct}$  (figura 35).

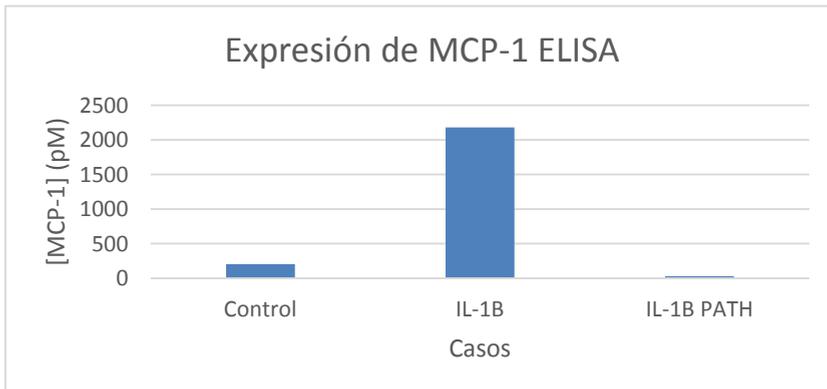
				media	SD	ct RNJ 4B	ct RNJ 4B	media	SD	ΔCt	-ΔΔCt	2 <sup>-ΔΔCt</sup>
miR-34a	C 1 NORMAL	24.95	24.65	24.80	0.21	21.50	21.19	21.95	0.22	3.46		
miR-34a	C 1 NORMAL	25.85	25.96	25.91	0.08	21.50	21.59	21.55	0.06	4.36		
miR-34a	C2 NORMAL	25.71	25.72	25.72	0.01	22.28	22.21	22.25	0.06	3.47	0.00	1.00
miR-34a	C2 IL-1B	25.23	25.21	25.22	0.01	21.82	21.76	21.79	0.04	3.43	0.04	1.03
miR-34a	C2 PART10- IL-1B	25.85	26.13	25.99	0.01	22.50	22.59	22.55	0.06	3.45	0.02	1.02
miR-34a	C2 PART25- IL-1B	26.14	26.30	26.22	0.20	22.06	22.04	22.05	0.01	4.17	0.70	0.62
miR-34a	C3 NORMAL	24.73	24.74	24.74	0.01	21.25	21.32	21.29	0.05	3.45	0.00	1.00
miR-34a	C3 IL-1B	23.65	23.38	23.52	0.19	20.42	20.34	20.38	0.06	3.14	0.32	1.24
miR-34a	C3 PART25- IL-1B	24.42	24.47	24.45	0.04	20.24	20.40	20.32	0.11	4.13	0.68	0.63

**Figura 36. Determinaciones de miRNA-34a**

### 5. Estudio de la expresión de MCP-1 mediante ELISA

De la misma forma, se realizó la determinación y cuantificación de MCP-1 mediante la técnica de ELISA de cada cultivo de condrocitos con las diferentes variantes tratadas: la estimulada con IL-1 $\beta$ , la estimulada con IL-1 $\beta$  y a la vez inhibida con Parthenolide y el control sin ningún tratamiento.

Como se aprecia en la figura 37, la determinación de MCP-1 en el cultivo control es de 204.61 pM. En el cultivo estimulado con IL-1 $\beta$ , se observa un incremento muy importante de MCP-1, alcanzando valores de 2181.19 pM. Por el contrario, en el cultivo estimulado con IL-1 $\beta$  y a la vez inhibido con Parthenolide, se aprecia como los valores de MCP-1 descienden a 29.49 pM, siendo estos valores inferiores a los obtenidos en el grupo control.



**Figura 37. Determinación de MCP-1 mediante ELISA.**

# DISCUSIÓN



## **INTRODUCCIÓN-ETIOPATOGENIA**

La artrosis es una enfermedad que ha sido ampliamente estudiada desde diversos puntos de vista a lo largo de los años. Los diferentes estudios se han centrado fundamentalmente en el origen del dolor, la radiología y su utilidad en la determinación del grado de enfermedad, su etiopatogenia y la respuesta frente a los diversos tipos de tratamiento existentes en la actualidad.

Los últimos estudios publicados y dada la situación económica general, hacen hincapié en el elevado coste socio-económico que supone esta enfermedad para la sociedad actual al tratarse de una enfermedad frecuente, especialmente en la población de edad más avanzada y cuya solución médica o quirúrgica supone un gasto elevado. No podemos olvidar que se trata de una enfermedad con una elevada prevalencia y con importantes costes económicos, tanto en lo que se refiere a la medicación utilizada para paliar la sintomatología que origina, sino también por el elevado precio de las artroplastias de rodilla.

A pesar de ello, los estudios en relación a la patogénesis de la osteoartritis siguen teniendo vigencia. Por un lado, lo que parece claro es la importancia de los factores mecánicos (deformidades axiales, sobrepeso, traumatismos repetidos...), tanto en el establecimiento del proceso como en la progresión de la enfermedad.

De esta forma, aunque en situación de reposo las superficies articulares vecinas de la rodilla no suelen ser congruentes, al producirse el apoyo de la extremidad, se desencadena una deformación que favorece una mayoritaria e íntima relación entre las superficies articulares y una notable disminución de la presión por unidad de medida, que suele evaluarse por  $\text{cm}^2$ . Esta modulación de la forma del cartílago para contactar al

máximo con su vecino, facilita una lubricación rezumante hidrostática auto presurizada, que es precisa para hacer posible el movimiento. Si se aumenta la carga es preciso añadir a la deformación del cartílago la deformación del hueso subyacente, con objeto de minimizar el deterioro cartilaginoso a consecuencia de la presión concentrada en un menor número de puntos.

El hueso subcondral, 10 veces más duro que el cartílago, tiene una mayor flexibilidad que el hueso cortical y es el que absorbe los impactos que actúan sobre el cartílago. Cuando la carga sobrepasa ciertos límites, se produce la ruptura de las trabéculas y la aparición de microfracturas, cuya reparación produce un remodelado de mayor dureza que el hueso previo, lo que influye negativamente en el funcionamiento homogéneo de la articulación (peor congruencia articular), al no poder deformarse este tejido y al concentrarse la sobrecarga sobre un menor número de puntos del cartílago articular<sup>70</sup>.

No obstante, el avance de la medicina y especialmente en lo que respecta al campo de la genética ha provocado que el enfoque del estudio de esta enfermedad se dirija no hacia el análisis de aspectos mecánicos relacionados con al enfermedad, sino hacia el posible origen genético de la misma, así como al estudio y control de los diferentes reguladores de la expresión de los genes.

Por el contrario, otros autores consideran que debido a que el único tratamiento definitivo de la osteoartritis de rodilla es por el momento la artroplastia total de rodilla, el estudio del posible origen genético de dicha enfermedad carece de sentido. Además esta aseveración está basada en que en la actualidad todavía no se han identificado los genes que están implicados en la predisposición genética de esta enfermedad.

Sin embargo, como bien menciona J.R Prieto-Montañana en su estudio de la osteoartrosis como enfermedad genética, lo más comúnmente aceptado, es que la osteoartritis es una enfermedad de etiopatogenia compleja que resulta de la interacción de factores ambientales y genéticos.

Es bien conocido que el factor de transcripción NF- $\kappa$ B tiene un papel muy importante en el desarrollo y mantenimiento de numerosas enfermedades, especialmente en aquellas con importante componente inflamatorio como la osteoartrosis, por lo que su papel en dicha enfermedad también debería ser estudiado en profundidad como hemos hecho en el presente estudio.

En los últimos años, ha cobrado importancia el papel de los microRNAs en el desarrollo de numerosas enfermedades como moduladores del proceso de expresión de las proteínas, al actuar sobre el mRNA, bien activando o inhibiendo dicho mRNA y, consecuentemente la síntesis de proteínas sobretodo en el cáncer, o en enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide.

Son numerosos los microRNAs que se han ido descubriendo recientemente. Pero es necesario centrar los estudios en identificar cuales de ellos tiene realmente relevancia en cada una de las posibles patologías, para de esta forma poder iniciar estudios con fines terapéuticos que nos permitan actuar directamente sobre ellos.

Es por ello que el presente estudio trata de analizar el papel y comportamiento del microRNA 34a en la artrosis de rodilla, dada la elevada prevalencia que presenta esta enfermedad y las evidencias que relacionan la osteoartritis con este microRNA.

De esta forma se ha planteado un estudio controlado en pacientes afectados de una osteoartrosis de rodilla que fueron intervenidos quirúrgicamente en nuestro centro. A partir de las piezas quirúrgicas de la extremidad proximal de la tibia obtenidas durante la intervención quirúrgica se obtuvo un modelo experimental con cultivos de condrocitos y se observó el comportamiento de los mismos en un medio inflamatorio con activación a partir de la IL-1 $\beta$ , situación similar al que existe en la rodilla de los pacientes artrósicos, determinando las variaciones del NF- $\kappa$ B y del miRNA 34a, con la finalidad de determinar si realmente dicho miRNA es relevante en la patogénesis de la osteoartritis y analizando el papel que juega como modulador NF- $\kappa$ B.

Este es un aspecto puntual de un proceso como la osteoartritis, que debe ser considerada como una enfermedad de etiopatogenia compleja en la que interactúan diferentes factores ambientales, mecánicos y genéticos, lo que obliga a realizar un estudio de la enfermedad desde diversos puntos de vista: a) desde el punto de vista clínico, analizando edad, comorbilidad, factores de riesgo, respuesta a tratamientos previos a la intervención quirúrgica etc...; b) desde el punto de vista histológico, para valorar las alteraciones estructurales macro y microscópicas y c) desde un punto de vista molecular analizando el comportamiento y función de los diferentes reguladores de la expresión de los genes como el NF- $\kappa$ B, así como la función e importancia de los microRNAs (en este caso en concreto el miRNA 34a en el desarrollo de la enfermedad, en los diferentes cultivos de condrocitos realizados).

De esta forma, el presente estudio nos permite tener una visión más amplia de lo que realmente ocurre en las articulaciones afectas de una osteoartrosis, y nos facilitará estudiar posibles terapias alternativas a las ya existentes actualmente, antes de plantearnos una cirugía de

reconstrucción articular mediante prótesis dado el riesgo que ésta supone especialmente en pacientes de edad avanzada.

### PARTICULARIDAD DEL TRABAJO:

Se trata de un trabajo con un enfoque y un planteamiento diferente a la inmensa mayoría de trabajos en cirugía ortopédica, ya que aborda la enfermedad no desde el punto de vista diagnóstico o terapéutico, sino que trata de justificar y analizar los cambios que acontecen a nivel molecular en los condrocitos de los pacientes afectados de una osteoartritis de rodilla con la finalidad de poder identificar metabolitos detectables y objetivables en líquido sinovial y sangre periférica que permitan definir y establecer criterios de “evolución de la enfermedad”, que puedan ser utilizables en el futuro en la prevención y tratamiento de la artrosis.

## ***MATERIAL Y MÉTODOS***

Para poder realizar el estudio se seleccionaron los pacientes tras un detallado análisis de la historia clínica y de las exploraciones complementarias, centrando nuestra elección en los paciente afectados de una deformidad en varo, excluyendo a los pacientes con genu valgo con la finalidad de eliminar sesgos o posibles factores de confusión, que pudieran interferir en los resultados. De la misma forma, se excluyeron del estudio a los pacientes con patología infecciosa previa en la articulación afecta o con patología tumoral activa.

Todos los pacientes incluidos en el estudio fueron de raza caucásica y nacidos en España. La población no presenta por tanto diferencias étnicas, lo que disminuye la heterogenicidad genética, si bien es cierto que los estudios epidemiológicos de la osteoartrosis realizados en España son extrapolables a los realizados en otros países

desarrollados, que presentan una esperanza de vida aumentada.

La recogida de datos clínicos se realizó durante la consulta previa a la intervención quirúrgica, momento en el que además de poner al paciente en lista de espera quirúrgica se le entrega el Knee-Society-Score. De la misma forma que Castellet Feliu E. a los pacientes se les administra este test debido a que es un test corto, simple y fácil de aplicar, lo que facilita la comprensión del mismo.

El análisis de los antecedentes personales recogidos en el presente trabajo, nos hace reflexionar sobre un gesto quirúrgico que se practica en ocasiones con excesiva asiduidad e indiferencia en cuanto a sus consecuencias como es la meniscectomía parcial artroscópica. En efecto, la meniscectomía parcial es una técnica sencilla, barata y agradecida, sobretodo en los casos en los que la rotura meniscal origine un bloqueo mecánico. Por este motivo, se practica en numerosos centros sanitarios con quizá excesiva frecuencia. Cabría preguntarse si las indicaciones siempre son las adecuadas, ya que como se demuestra en este estudio, un porcentaje elevado de estos pacientes acaba necesitando una artroplastia total de rodilla por la degeneración del cartílago articular y como afirman Petty C.A. y Lubowitz J.H.<sup>54</sup>, entre los 8-16 años de una meniscectomía parcial se aprecian signos radiográficos de artrosis, aunque en muchas ocasiones los síntomas clínicos no eran significativos.

La meniscectomía, tanto total como parcial, es un factor de riesgo conocido para el desarrollo de osteoartrosis, dadas las alteraciones biomecánicas que el procedimiento conlleva, aumentando hasta 14 veces la posibilidad de desarrollo de osteoartritis. Es evidente que entre el 30 y el 70% de pacientes que han sufrido una meniscectomía desarrollan fenómenos radiológicos degenerativos, hecho particularmente frecuente en el paciente joven que presenta concomitantemente una inestabilidad

ligamentaria, lesiones condrales postraumáticas y alteraciones del eje<sup>55</sup>.

Es evidente que la meniscectomía parcial o total es una técnica quirúrgica que favorece la aparición de osteoartrosis de rodilla a medio-largo plazo, por lo que parece recomendable revisar las indicaciones e impulsar nuevas estrategias para el tratamiento de las lesiones meniscales como la sutura, el trasplante y la utilización de terapias biológicas<sup>56</sup>, de tal manera que solo aquellos pacientes con roturas complejas que originen bloqueos mecánicos o no sean susceptibles de reparación mediante estas técnicas, fueran sometidos a una meniscectomía. De la misma forma, es conveniente revisar el riesgo-beneficio que reporta esta técnica a los pacientes con edad por encima de los 50 años; cabría reflexionar si es mejor tener un menisco roto escasamente sintomático, o presentar signos radiográficos de artrosis de rodilla a partir de los 8-16 años con o sin síntomas derivados de la osteoartrosis de rodilla, como demuestra el estudio citado anteriormente.

Para la evaluación radiográfica hemos utilizado la clasificación de Albhäck, que nos parece sencilla y fácil de aplicar por cualquier facultativo independientemente de su especialidad, a pesar de que hay autores como Pineda B.<sup>57</sup> et al que prefieren la escala de Kellgren-Lawrence. Esta última clasificación, también contempla evidencias radiográficas como el estrechamiento de la interlínea articular, la presencia o no de osteofitos, la esclerosis del hueso subcondral y la deformidad de los extremos óseos. Sin embargo, creemos que esta forma de clasificación tiene algunas limitaciones relativas, como la variabilidad inter-observador en la interpretación de las imágenes radiológicas, las posibles interferencias de la posición del paciente en la evaluación del grado de pinzamiento articular en la artrosis de rodilla, o la mayor importancia atribuida a los osteofitos sobre el pinzamiento de la interlínea, cuando este último puede ser un criterio más

sensible de la artrosis en fases iniciales y en concreto en determinadas localizaciones<sup>23, 58</sup>.

La mayor parte de los pacientes incluidos en este estudio presentan una clasificación radiográfica de Albhäck de 3, lo que equivale a un 70.4%, mientras que solo el 18% de los pacientes presentan un grado IV. Así, podríamos preguntarnos porque la mayoría de los pacientes presentan un grado III de Albhäck y no un grado IV en donde la articulación está más afectada

Para muestras histológicas, es evidente que los mejores resultados se obtienen en muestras fijadas en formol incluidas en parafina y cortadas entre 3 y 6 micras, que es el procedimiento empleado en este estudio. Para el análisis histológico se utilizaron las mesetas tibiales obtenidas de los pacientes.

El análisis histológico lo realizamos con la tinción hematoxilina-eosina, ya que es una tinción que permite interpretar bien el tejido óseo, pues la hematoxilina al ser catiónica o básica, tiñe las estructuras ácidas en tonos azulados y púrpura permitiendo el estudio de los núcleos celulares; por su parte la eosina tiñe los componentes básicos en tonos de color rosa, gracias a su naturaleza aniónica o ácida facilitando el estudio del citoplasma.

Para el estudio inmunohistoquímico de las secciones incluidas en parafina empleamos la técnica de la avidina-biotina-peroxidasa (ABP), otra técnica habitual y eficiente en los estudios inmunohistoquímicos, utilizando para ello el anticuerpo monoclonal NF- $\kappa$ B a una dilución de 1:500.

El cultivo de condrocitos se realizó a partir de las mesetas tibiales laterales, menos afectadas que las mediales al tratarse de pacientes con genu varo, eliminando de esta forma el efecto de la sobrecarga mecánica sobre el cartílago articular y sobre los determinaciones realizadas

en el cultivo.

La elaboración de un cultivo de condrocitos es un procedimiento perfectamente descrito en la literatura con pequeñas modificaciones entre los diferentes autores<sup>46 47</sup>. Para elaboración del cultivo se utiliza el procedimiento conocido como digestión enzimática.

Este método, instaurado por Blanco et al<sup>59</sup> en 1995 ha sido seguido e imitado por muchos autores como en concreto Vela Anero, A<sup>60</sup>, en su estudio sobre el sulfuro de hidrógeno como diana terapéutica de la osteoartritis.

De esta forma, mientras autores como Vela A<sup>60</sup>, utilizan para la digestión enzimática soluciones de colagenasa tipo IV, en este estudio hemos utilizado la colagenasa tipo II.

Al igual que los cultivos realizados en este trabajo, Vela et al<sup>60</sup> utilizan de forma conjunta con las diluciones enzimáticas drogas como la penicilina y la estreptomycin, para disminuir el riesgo de infección y contaminación del cultivo durante el procedimiento y manipulación de las muestras.

En el presente estudio y de forma similar al modelo utilizado por Blanco et al<sup>59</sup> los condrocitos se cultivan a 37°C en una estufa humidificada y con 5% de CO<sub>2</sub>.

En relación a las técnicas de determinación y cuantificación de proteínas, citoquinas inflamatorias y miRNA 34a empleadas en este trabajo se han utilizado los métodos usados de forma convencional y bien descritos en la bibliografía.

Para la extracción y determinación de proteínas se ha utilizado la técnica de Western-Blot, que nos permite detectar y cuantificar el NF- $\kappa$ B con técnicas de inmunohistoquímica, al igual que han realizado otros autores antes como Buhrmann C, et al<sup>61</sup> en el trabajo en el que demuestra que el NF- $\kappa$ B aumenta la diferenciación de los condrocitos.

En la determinación y cuantificación del miRNA, elegimos la técnica qRT-PCR, ya que son numerosos los artículos publicados que utilizan con éxito esta técnica para el estudio de los miRNAs. Así, Kelnar K y Bader G describen que la qRT-PCR es un método excelente para la determinación de los perfiles de biodistribución de los miRNA, y en concreto del miRNA34a.

Asimismo el método ha demostrado ser eficiente en la determinación del miRNA 125B y en la regulación de la expresión ADAMTS-4 y su relación con la osteoartritis como demostró Matsukawa et al<sup>62</sup>. En el presente trabajo hemos utilizado este método de detección y cuantificación por su precisión.

Algunos autores se han centrado como hemos hecho en el presente trabajo en las determinaciones de miRNA 34a y su posible relación con la osteoartrosis. En concreto Abouheif MM et al<sup>48</sup> demostraron que la inhibición de miRNA 34a inhibe la apoptosis de los condrocitos en un modelo experimental “in vitro” con ratas. De forma similar a nuestro estudio, realiza el cultivo de condrocitos con el método de digestión enzimática.

## ***ESTUDIO DE FACTORES CLÍNICOS***

El análisis de la tabla 5 nos muestra los datos clínicos más relevantes recogidos en los pacientes incluidos en el estudio. Aunque el tamaño muestral no sea excesivamente grande, estadísticamente es posible realizar un análisis aproximativo. Con estos datos se conforma que se trata de una enfermedad degenerativa propia de pacientes de edad avanzada, como lo demuestra que la media de los pacientes era de 70.03 años. Por lo tanto, al igual que refleja Belo JN<sup>10</sup> en su trabajo podemos afirmar que la edad es el factor de riesgo más importante para la aparición de esta enfermedad. No obstante, llama la atención que los pacientes de menor edad intervenidos en esta serie presentaban algún antecedente quirúrgico en esa rodilla, fundamentalmente meniscectomías previas, gesto quirúrgico en ocasiones excesivamente practicado lo que pone de manifiesto una vez más que en el desarrollo de la osteoartritis intervienen no solo factores genéticos sino factores mecánicos, al suprimir el efecto de amortiguación que los meniscos proporcionan a la articulación evitando el contacto de las superficies articulares.

En el presente estudio, al igual que en la inmensa mayoría de trabajos publicados, las mujeres presentan esta enfermedad con más frecuencia que los hombres, especialmente por encima de los 55 años. Dado que la edad media de los pacientes de nuestra serie se encuentra alrededor de los 70 años (70.03), es lógico pensar que el sexo femenino sea el más afectado y el predominante en nuestro trabajo.

Algunos autores defienden la influencia de factores hormonales como una de las causas fundamentales por lo que la osteoartrosis es más frecuente en mujeres. Así, autores como Messier SP<sup>21</sup> o Carmena-Ortells L<sup>23</sup> afirman que el déficit estrogénico justificaría el aumento de la

incidencia de esta enfermedad en las mujeres sobre todo después de la menopausia. Sin embargo, esta afirmación no se ha podido verificar en relación con la osteoartritis, como si se ha demostrado con otras patologías como la osteoporosis. Por lo tanto la afirmación de que los estrógenos son protectores frente a la progresión de la enfermedad no es concluyente y queda en entredicho.

Por lo que hace referencia a la lateralidad prácticamente en 2/3 de los casos analizados estaba afecta la rodilla izquierda sin que existan hasta la fecha evidencias que orienten sobre la mayor o menor afectación de la articulación de la rodilla en función de la lateralidad.

El dolor articular se presenta como síntoma fundamental en todos los pacientes y es el principal síntoma de consulta en la actividad diaria del especialista si bien es cierto que solo uno de los pacientes de nuestra serie fue intervenido exclusivamente por dicho motivo, siendo la asociación de este síntoma con la limitación funcional los criterios de indicación quirúrgica principales.

Como bien esta descrito en la literatura, los derrames de repetición en las fases sinovíticas de la enfermedad es un hecho frecuente en estos pacientes. En nuestro estudio prácticamente más de la mitad de los pacientes (51.9%) presentaban dolor asociado a derrames de repetición.

Es importante destacar, que la irregular transferencia de cargas en una rodilla con una importante reacción inflamatoria conduce a una deformidad progresiva, debido al pinzamiento del compartimento afecto. No obstante y a pesar de que todos los pacientes seleccionados para el estudio presentaban un genu varo artrósico con mayor afectación del compartimento medial, solo en el 44% existe una deformidad clínica evidente. Es más, conviene hacer especial hincapié que atendiendo al KSS que completaban los pacientes previamente a la cirugía,

aquellos que mostraban una mayor deformidad clínica o radiográfica no eran los que referían más dolor. Todo esto confirma la teoría de que en muchas ocasiones existe una disociación clínico-radiológica en la osteoartritis de rodilla.

Las comorbilidades de esta enfermedad son un dato a tener en cuenta, ya que aunque el riesgo de muerte es bajo (0.3-0.7% a los 3 meses), se trata de una intervención de riesgo que el paciente debe asumir. Es un hecho verificado y publicado que aquellos centros que intervienen más de 50 prótesis al año presentan una tasa de complicaciones menor. Ninguno de los pacientes incluidos en esta serie presentaron complicaciones graves en el post-operatorio inmediato, lo que esta en consonancia con la afirmación anterior, ya que en nuestra Institución el número de artroplastias totales primarias de rodilla es superior a 150 al año.

En nuestra serie, el antecedente médico más frecuente fue la hipertensión arterial, que la presentaban el 48.14% de los pacientes, seguida de la dislipemia en un 25.92% de los casos. Según los estudios de Banegas JR<sup>63</sup> la prevalencia en España de la hipertensión arterial es del 35% de los adultos y hasta del 68% en pacientes mayores de 68 años; no obstante a pesar de esas prevalencias elevadas de ambas patologías frecuentemente presentes en pacientes afectos de osteoartritis, no se ha podido establecer una clara relación entre hipertensión, dislipemia y osteoartrosis.

Hay que señalar que un tercio de los pacientes (33.3%) ya habían sido intervenidos previamente de un artroplastia total de rodilla contralateral. Este dato muestra un porcentaje elevado de pacientes sometidos a una artroplastia bilateral de rodillas, lo que puede hacer pensar que la intervención mejora de forma sustancial el precario estado funcional de estos pacientes y que el grado de satisfacción proporcionado por esta cirugía es alto.



**Figura 38. Paciente con artrosis de rodilla derecha intervenida en este estudio que es portador de una artroplastia total de rodilla izquierda.**

La mayor parte de los pacientes incluidos en este estudio precisó de analgésicos de uso cotidiano de forma previa a la intervención. Son numerosos los fármacos usados para el alivio sintomático de la artrosis, siendo el paracetamol® y el ibuprofeno® los más utilizados y de prescripción habitual en atención primaria. Los otros tipos de fármacos como los corticoides y los COX-2 fueron utilizados en menor medida, bien debido a las contraindicaciones que presentan, especialmente en los casos de hipertensión arterial (comorbilidad más frecuente en nuestra serie), o bien debido a otras causas como la falta de manejo de estos fármacos desde atención primaria, elevado coste económico de los COX 2, etc...

La radiografía simple es la prueba complementaria más importante y más usada para el diagnóstico de la osteoartrosis. Es accesible, barata y validada. Se utiliza para realizar el diagnóstico y diagnóstico diferencial, y evaluar tanto el grado de daño estructural como la

progresión y la respuesta a las nuevas terapias modificadoras de la enfermedad<sup>64</sup>. No obstante, en los últimos años, se ha comenzado a utilizar la resonancia magnética para valorar la progresión de la lesión artrósica. Recientemente, Raynaud et<sup>65</sup>al han publicado un artículo en el que estudian 32 pacientes con artrosis sintomática de rodilla y con seguimiento de 2 años con evaluaciones a los 6, 12, 18 y 24 meses. Los autores demuestran que la técnica era precisa con una variabilidad inter-observador del 2.2, 1.6 y 2.6% para el volumen del cartílago global, medial y lateral, respectivamente. El estudio mostraba una pérdida del volumen global del cartílago del 6.1% a los 2 años ( $p < 0,0001$ ), cambios que eran ya demostrables a los 6 meses. Al final del tiempo de observación se demostró mediante resonancia una pérdida del cartílago medial en 27 de los 31 pacientes, mientras que esto sólo se constataba en aproximadamente el 50% de los seguidos con radiología simple. Así pues, el uso de la resonancia magnética puede permitir cuantificar de una forma sensible y reproducible la pérdida de cartílago en la osteoartritis y reducir de forma considerable el tiempo y el número de pacientes necesarios en los ensayos clínicos para evaluar los fármacos modificadores de la enfermedad.

En este trabajo se ha utilizado únicamente la radiografía como prueba complementaria de imagen, pues si bien es cierto que la resonancia magnética es muy útil, la radiografía en carga aporta suficiente información para el diagnóstico de la enfermedad y el seguimiento de la respuesta al tratamiento, tanto farmacológico como quirúrgico de los pacientes con osteoartrosis de rodilla. No debemos olvidar el coste económico que implica la realización de una resonancia magnética en todos los procesos degenerativos de rodilla, actualmente difícilmente asumible para nuestro sistema sanitario.

No podemos olvidar, como menciona De Miguel Mendieta<sup>64</sup> que la radiología es una técnica accesible y validada, además de barata, con lo que se minimiza el coste sanitario. El estudio radiográfico realizado en las rodillas de esta serie fue una telemetría en carga que permite valorar el pinzamiento articular de los compartimentos si lo hubiere, medir los ejes de la extremidad y planificar de manera más adecuada una eventual intervención quirúrgica.



**Figura 39. Genu varo artrósico grado IV de Albhäck**

Los criterios de indicación quirúrgica de los pacientes del estudio son los vigentes en la Unidad de nuestra institución y coinciden con los de Lotke<sup>66</sup>, para el que la principal indicación para la implantación de una prótesis de rodilla se basa en la incapacidad producida por la deformidad, el dolor y la impotencia funcional debida a procesos como la artritis reumatoide, la osteoartrosis y otras patologías artríticas de la rodilla.

Además este autor considera la cirugía como tratamiento cuando ya se ha utilizado algún tratamiento conservador, como la rehabilitación, AINEs y cambios en las actividades diarias, sin resultado. Es importante señalar que cuando nos planteamos el tratamiento de un paciente con osteoartritis, éste debe ir encaminado a mejorar su sintomatología y no mejorar su imagen radiográfica, motivo por el que no aconsejamos intervenir pacientes asintomáticos, aunque presenten una imagen radiográfica con signos degenerativos avanzados.

No debemos perder de vista el trabajo de De Miguel Mendieta<sup>64</sup> que señala que los estudios longitudinales muestran una clara variabilidad de la calidad dolorosa a lo largo del tiempo para un paciente concreto. Afirma además que su relación con un hallazgo objetivo, como el grado de afectación radiológica, muestra también una gran variabilidad. Las diferentes publicaciones muestran que aproximadamente la mitad de las personas con dolor de rodilla tienen signos radiológicos de osteoartrosis, aunque menos de un 25% de los que presentan la enfermedad radiológica manifiestan algún grado de dolor. Por este motivo en el presente estudio hemos seleccionados solo pacientes que son intervenidos por presentar osteoartritis sintomática y radiológica.

El concepto de disociación clínico-radiológica en la osteoartritis ha sido estudiado por muchos autores<sup>67, 68</sup>. Se han descrito 3 razones que pueden explicar esta discordancia clínico-radiológica<sup>67</sup>:

1. Técnicas: número insuficiente de proyecciones en el estudio de la articulación o el empleo de diferentes técnicas para tomar la imagen.
2. Clínicas: amplia variación usada en la definición del dolor, además el origen del dolor no siempre tiene traducción radiológica.

3. Epidemiológicas: la naturaleza de la población estudiada, con especial atención a factores demográficos como la edad o la raza.

En este trabajo, la disociación clínico-radiológica es evidente, ya que el 70.04% de los pacientes presentan una sintomatología que no se corresponde con la enfermedad articular. Llama la atención el hecho de que solo el 40% de los pacientes con un grado IV de Albhäck presenten una sintomatología dolorosa severa con marcada repercusión funcional, mientras que en el grupo de pacientes con grado III de Albhäck solo la presentan el 15,78%.

Por el contrario, la correlación entre la radiografía y los hallazgos histológicos obtenidos si demuestran como el 66.7% de los pacientes presentan correlación entre la radiografía obtenida de forma previa a la intervención y la histología de las muestras de tibia proximal tras la misma.

## ***ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO***

Desde un punto de vista histológico, la artrosis es clásicamente definida como una alteración lenta y progresiva del cartílago articular que se caracteriza por la destrucción patológica del mismo

El análisis histopatológico se realizó en las superficies articulares de las mesetas tibiales, lo que permite analizar los fenómenos acaecidos en el compartimento lateral no deteriorado por el efecto mecánico y el medial sometido a sobrecarga mecánica por la deformidad en varo de la articulación.

El cartílago presenta en esta enfermedad cambios morfológicos progresivos que interesan a los condrocitos, a la matriz cartilaginosa y al hueso subyacente. Estos cambios, configuran un complejo de lesiones, en un principio reactivas y reparativas y en una segunda fase degenerativas que pueden describirse como alteraciones estructurales, de la matriz articular, de los condrocitos, del mesénquima y de la formación de osteocitos. Cuando el proceso ya está avanzado, el cartílago presenta alteraciones como fisuración, fractura y ulceración con pérdida completa del espesor.

El proceso de pérdida de matriz cartilaginosa evidente en esta enfermedad es responsabilidad de las enzimas lisosómicas y de la metaloproteinasas de la matriz (MPM). En sentido contrario actúa el factor de crecimiento básico de los fibroblastos (FGF), que favorece la reparación o estabiliza el proceso de deterioro cartilaginoso<sup>69</sup>.

Como menciona Paz Jiménez<sup>70</sup>, cuando se inicia el proceso degenerativo, los condrocitos sufren divisiones activas y aumentan la producción de ADN, RNA, colágeno, prostaglandinas (PGs), y proteínas no colágenas. Esta hiperactividad aumenta la concentración

de PGs, lo que conlleva un engrosamiento del cartílago, lo que puede estabilizar la evolución durante años, pero con un cartílago menos resistente que el normal. Finalmente disminuiría la producción de PGs y el cartílago perdería grosor, por lo que se establecería un osteoartrosis avanzada.

Durante la carga en una articulación normal, se produce una deformidad plástica del cartílago y del hueso subcondral, lo que facilita el reparto de presiones y aumenta la superficie de contacto de las superficies articulares. La pérdida de elasticidad del cartílago por la progresión de la enfermedad genera una concentración de presiones en un menor número de puntos, lo que provoca una rotura de las fibras de colágena y la aparición de hendiduras o fisuras, para posteriormente evolucionar a fracturas y finalmente en ulceraciones<sup>70</sup>.

El análisis microscópico de las muestras estudiadas, en las zonas menos comprometidas muestra áreas de fibrilación con diferentes patrones de alteración. Estas alteraciones vienen caracterizadas por la pérdida de la superficie lisa del cartílago que afecta a la organización de los condrocitos, los cuales pierden su orientación elongada y paralela a la superficie y adoptan patrones globulares y poligonales. La superficie adopta un perfil quebrado con incisiones irregulares de una profundidad variable. Estas lesiones se pueden presentar en forma focalizada, afectando a zonas concretas del cartílago o bien afectan en forma difusa a la mayor parte de la superficie articular.

Las grietas superficiales son verticales a la superficie, presentan una profundidad variable, afectando fundamentalmente al tercio superior de la superficie articular. Cuando la zona de afectación es mayor, se puede observar la fractura del cartílago articular, que se presenta bajo diferentes aspectos histopatológicos. Lo más frecuente es la aparición de una lesión asociada a la

fibrilación como es el “desflecamiento” de la superficie con fracturas elongadas en la superficie del cartílago y fragmentación en láminas o esquirlas irregulares de la misma<sup>70</sup>.

Sin embargo, hemos comprobado que las fracturas más importantes aparecen como grietas de diámetro amplio, verticales y profundas, que alcanzan el tercio profundo del cartílago y en ocasiones al tejido óseo y que además suelen presentar un componente horizontal. Estas fracturas presentan cambios en la matriz y en la organización de los condrocitos a su alrededor. En ocasiones se suelen asociar a espacios quísticos intra-cartilaginosos o intra-óseos de contenido agua (liquido sinovial).

Por su parte, en las zonas con mayor afectación, se aprecia como el tejido óseo subcondral presentaba ulceraciones o erosiones profundas que hacen desaparecer el cartílago, descubriendo el hueso subcondral. De esta forma, el tejido óseo emergente sufre una transformación ebúrnea y adopta un patrón compacto, laminar y denso. Los osteocitos adoptan un patrón regular, y en la superficie del tejido óseo, desaparece el patrón óseo trabecular normal. A este nivel se observa un aumento de la actividad osteoblástica, lo que es un indicador del fracaso de la respuesta del cartílago articular<sup>71</sup>.

Podemos apreciar cambios a distintos niveles:

### *Matriz articular*

El cambio fundamental se inicia como consecuencia de la alteración del metabolismo en la síntesis de proteoglicanos y colágeno de los condrocitos, es decir, con el descenso en la matriz de los mucopolisacáridos, lo que conlleva a una disminución de la elasticidad y consistencia del cartílago. Como consecuencia de ello, se inician los procesos de fisuración, esclerosis subcondral y los cambios de la mecánica articular. Una de las características más llamativas, es el aumento en la basofilia alrededor de las lagunas de los condrocitos con una pérdida de la metacromasia.

De la misma forma, las alteraciones por fibrilación se asocian a un aumento en las fibrillas de colágeno, paralelas a la superficie articular. Éstas se evidencian en la matriz y focalmente producen un cambio en la estructura articular hacia la formación de un cartílago fibroso o fibrocartílago.

Se observan de forma generalizada cambios en los que predomina el colágeno, con fibrillas desorganizadas y densas, dando imágenes cicatriciales.

Finalmente, como consecuencia de la fisuración y fractura se produce la ulceración, que puede dar lugar a la aparición de cuerpos libres, responsables si se desprenden de la limitación de la movilidad articular<sup>71</sup>.

### *Reacción Mesenquimal*

Asociado a los cambios en el cartílago articular, desde el tejido óseo se produce una reacción mesenquimal caracterizada por un proceso de angiogénesis. El descenso de la elasticidad y consistencia y la erosión subsiguiente del cartílago articular hace que el hueso subyacente sufra una hiperpresión que va a dar lugar a una esclerosis subcondral como mecanismo de defensa y

autocuración, o en caso contrario a la aparición de quistes subcondrales por debilidad, isquemia, necrosis y rotura de la pared subcondral. La esclerosis subcondral puede contribuir a la instauración de una hipertensión venosa intraósea, considerada como una de las posibles causas del dolor.

Así, podemos observar en las muestras analizadas un crecimiento de células mesenquimales, fibroblastos y vasos sanguíneos de tipo capilar que surgen del tejido óseo, alcanzando el cartílago, al cual “perfora” y vasculariza.

Todo esto se acompaña de un discreto componente inflamatorio donde predominan las células osteoblásticas, formando áreas de osteogénesis.

### *Condrocitos*

Los condrocitos sufren diferentes cambios, asociados a la lesión y a la reacción celular frente a la agresión. Por un lado, los condrocitos superficiales mueren y son reabsorbidos por lo que las lagunas aparecen vacías. Esta alteración se produce principalmente en la superficie celular y en la periferia de las grietas.

Por otro lado, los condrocitos viables, aumentan de tamaño, las lagunas son amplias y poligonales. Hay cambios basófilos en las áreas territoriales y cambios en la estructura de la matriz conformando una estructura de “fibrocartílago” como se ha mencionado anteriormente debido al aumento en la síntesis de colágeno y prostaglandinas.

Estos condrocitos presentan un núcleo amplio, vesiculado con un nucléolo prominente. El citoplasma es amplio y ocupa el espacio lacunar. Los condrocitos aumentan su capacidad proliferativa y tienden a agruparse en grupos isogénicos donde se concentran en un número importante<sup>71</sup>.

Además, el estudio inmunohistoquímico pone de manifiesto una fuerte expresión en NF- $\kappa$ B a nivel del citoplasma de los condrocitos. Esta expresión es mas intensa en las áreas mas alteradas del cartílago articular.

### ***CULTIVO DE CONDROCITOS***

#### ***PAPEL DE NF-KB EN LA ARTROSIS***

La familia del factor nuclear KB (NF- $\kappa$ B) es una de las más estudiadas.

NF- $\kappa$ B fue identificado inicialmente como un regulador de la expresión del gen de la cadena liviana kappa de las inmunoglobulinas en linfocitos B murinos, encontrándose posteriormente en el resto de los distintos tipos celulares. Desde su descubrimiento, en la década de los 80, se ha demostrado su participación en muchos procesos diferentes, incluyendo inflamación, sobrevida celular, proliferación y diferenciación. La importancia de NF- $\kappa$ B en la fisiología humana es enfatizada por una serie de patologías donde su actividad se encuentra dis-regulada. La activación constitutiva de NF- $\kappa$ B ha sido asociada con enfermedades inflamatorias crónicas, como la artritis reumatoide (AR), esclerosis múltiple, el asma y la enfermedad inflamatoria intestinal.

Esta familia de factores de transcripción está formada por cinco miembros: p105 (la que es procesada constitutivamente a p50), p100 (procesada a p52 en condiciones finamente reguladas), p65 (también conocido como RelA), RelB y c-Rel. Estas subunidades forman homo y heterodímeros para configurar el factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Se unen a secuencias de consenso NF- $\kappa$ B (5'-GG- GRNYYYCC-3') presentes en las regiones promotoras de una gran cantidad de genes.

Como menciona Claudia Metz Baer<sup>72</sup>, el factor de transcripción NF- $\kappa$ B juega un papel fundamental en la patogenia de desórdenes inflamatorios y autoinmunes. NF- $\kappa$ B tiene un papel central en los mecanismos inflamatorios y destructivos que conducen la progresión de enfermedades como artritis reumatoide (AR).

Esto incluye la regulación de: (1) el reclutamiento de células a través de la expresión de moléculas de adhesión regulada por NF- $\kappa$ B, por ejemplo, la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1), y de quimioattractantes como la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) e interleuquina-8 (IL-8); (2) la producción dependiente de NF- $\kappa$ B de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17 e IL-23 y la activación de NF- $\kappa$ B en las células que reciben la señal de estas citoquinas; (3) la producción de IL-2, que promueve la proliferación de linfocitos T; (4) la regulación de la secreción de inmunoglobulinas, de la expresión de citoquinas y el cambio de isotipo en linfocitos B; (5) la producción del ligando del receptor activado por NF- $\kappa$ B (RANK-L), el que junto a otras citoquinas promueven la diferenciación y activación de osteoclastos<sup>73</sup>; (6) la expresión de metaloproteinasas de matriz (MMP) que degradan cartílago y hueso; y (7) inhibición de apoptosis de células inflamatorias.

Igualmente, Metz señala que por el papel central que tiene NF- $\kappa$ B en estos mecanismos, sería muy efectivo analizar la acción de un inhibidor de la activación de NF- $\kappa$ B para el tratamiento de desórdenes inflamatorios y autoinmunes como la artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, lupus y esclerosis múltiple. En concordancia con esto, la actividad de los glucocorticoides, uno de los agentes antiinflamatorios más efectivos disponibles, es mediada principalmente por la inhibición de la transcripción mediada por NF- $\kappa$ B<sup>74 75 76</sup>.

Esta ruta es también blanco de otras drogas antiinflamatorias e inmunosupresoras utilizadas actualmente en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, por ejemplo, metotrexato<sup>77</sup>, sulfasalazina y salicilato con un fuerte impacto en el metabolismo general.

Un mejor entendimiento de la ruta de activación de NF- $\kappa$ B otorga una excelente plataforma para el desarrollo de nuevas terapias para las enfermedades inflamatorias.

Por otra parte, se ha observado que la inhibición de NF- $\kappa$ B en modelos animales de AR, a través de distintos métodos, mejora o detiene el desarrollo de la enfermedad, incluida la destrucción ósea<sup>78</sup>.

Como señala Whiteside ST et al<sup>79</sup>, muchos estímulos activan NF- $\kappa$ B, incluyendo citoquinas, activadores de proteína quinasa C, virus y estrés oxidativo. Cuando las células son estimuladas se gatillan cascadas de señalización que convergen en la activación de quinasas específicas (I $\kappa$ B o IKK).

NF- $\kappa$ B se encuentra en el citoplasma unido a sus inhibidores en las células que no han sido estimuladas, previniendo su entrada al núcleo. De esta forma, diferentes estímulos provocan la activación de estas cascadas de señalización que convergen en la activación de las quinasas específicas (IKK) y permite la entrada de las proteínas NF- $\kappa$ B al núcleo y su unión a secuencias específicas del DNA, regulando la transcripción de un gran número de genes.

Estudios recientes como los de Strand J. Et al<sup>80</sup>, que utilizaron la inhibición de IKK, han mostrado que a pesar que el uso potencial de inhibidores de IKK se puede extender a patologías en humanos tan diversas como diabetes, cáncer e infarto, la utilización principal sería en

enfermedades inflamatorias y autoinmunes, por el papel central que tiene NF- $\kappa$ B en la regulación de la respuesta inflamatoria.

En este sentido se han centrado estudios recientes, como los realizados por J.A, Roman-Blas et al<sup>61</sup>, que consideran que NF- $\kappa$ B juega un papel fundamental en los diferentes procesos inflamatorios característicos de la artrosis o la artritis reumatoide.

También señala que IKK, enzima clave en la activación de NF- $\kappa$ B juega un papel fundamental en la vía canónica de activación de NF- $\kappa$ B. Añade que la activación de NF- $\kappa$ B es producida por una serie de citoquinas proinflamatorias, como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , así como fragmentos de fibronectina o factores mecánicos.

De la misma forma señalan que los niveles de NF- $\kappa$ B aumentan con el envejecimiento y en condiciones de hipoxia en los condrocitos estimulados con IL-1 $\beta$ .

Aunque merece una atención particular la IL-1 $\beta$ , como factor estimulador de NF- $\kappa$ B. Numerosos artículos relacionan esta citoquina inflamatoria con la activación de NF- $\kappa$ B. Por su relevancia, mencionamos los artículos de Buhrmann Constanze y los de Martin H. Stradner.

Buhrmann Constanze et al<sup>61</sup>, menciona en su trabajo que los niveles elevados de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$  en la articulación impiden la diferenciación condrogénica. Así, la IL-1 $\beta$  a través de la activación de NF- $\kappa$ B, pone en marcha el proceso de activación de proteínas que originan la degradación del cartílago articular.

El mismo autor menciona que el tratamiento con Curcumina debería estabilizar el micro-ambiente en donde actúan las citoquinas pro-inflamatorias facilitando la

condrogénesis. Afirma que esta estrategia terapéutica debería regenerar el cartílago articular.

Por su parte, Stradner<sup>82</sup> afirma que la Esfingosina 1 fosfato contrarresta los efectos de la IL-1 $\beta$  en los condrocitos humanos. Para ello, realiza un estudio histológico, inmunohistoquímico y un cultivo de condrocitos en pacientes que van ser intervenidos de prótesis total de rodilla.

Tras realizar el cultivo, estimulan los condrocitos con IL-1 $\beta$  y SIP<sub>1</sub>. Posteriormente determinaron la fosforilación de las MAPquinasas y de NF- $\kappa$ B en presencia de IL-1 $\beta$ . Demostraron que en los condrocitos humanos, la esfingosina 1 fosfato reduce la inducción de los genes catabólicos en presencia de IL-1 $\beta$ . Por su parte, la activación del receptor S1P<sub>2</sub> contrarresta el detrimento de fosforilación de p38 MAPK por la IL-1 $\beta$ .

De los estudios mencionados se desprende la importancia y el atractivo objetivo que supone NF- $\kappa$ B para el tratamiento de determinadas enfermedades inflamatorias como la osteoartritis o la artritis reumatoide. Así, diversas terapias como el tratamiento con glucocorticoides han demostrado disminuir los niveles de NF- $\kappa$ B. Pero las dudas en relación a los efectos sistémicos y al bloqueo indiscriminado de sus numerosos efectos beneficiosos, así como las dificultades técnicas para poder enviarlo como agente potencial a través de la terapia génica, hacen que todavía se tenga que esperar para poder usarlo con fines terapéuticos.

Constatamos el aumento de la expresión de NF- $\kappa$ B, inmunohistoquímicamente en el cartílago articular, hecho ya observado por otros autores anteriormente. Se inició un modelo experimental mediante cultivo de condrocitos de la superficie articular proximal de las tibias procedentes de pacientes con artrosis de rodilla que son

sometidos a una artroplastia total de rodilla, con el objetivo de determinar y cuantificar los niveles de NF- $\kappa$ B en los condrocitos cultivados.

La determinación y cuantificación de los niveles de NF- $\kappa$ B en el condrocito normal, obtenido del cartílago de pacientes con osteoartrosis de rodilla mediante la extracción de proteínas y análisis mediante Western-Blot nos muestra un valor de 1,00 medido en  $2^{-\Delta\Delta ct}$ .

Se realizó en este modelo experimental, una activación del condrocito con IL-1 $\beta$  obteniendo una determinación de 1,17  $2^{-\Delta\Delta ct}$ . Pero lo verdaderamente llamativo ocurre cuando posteriormente a la estimulación con IL-1 $\beta$ , al inhibir el condrocito con Parthenolide PARTS25-IL-1 $\beta$ , los niveles de NF- $\kappa$ B aumentan considerablemente hasta valores de 115,66  $2^{-\Delta\Delta ct}$ .

Quizás este inexplicable aumento a pesar de inhibir el condrocito, tenga relación con el desconocimiento que se tiene a día de hoy sobre los mecanismos moleculares exactos por los que el Parthenolide participa en la actividad antiinflamatoria. Si bien es cierto que se cree que actúa uniéndose a IKK $\alpha$ , sustituyendo al aminoácido C179A y suprimiendo por tanto la actividad inhibitoria de IKK $\alpha$ , este mecanismo todavía no ha podido ser demostrado.

Por su parte, la determinación y cuantificación de las proteínas NF- $\kappa$ B-p65 y la NF- $\kappa$ B-p-p65, ponen de manifiesto que tras la estimulación con IL-1 $\beta$  aumenta de forma considerable la expresión de NF- $\kappa$ B-p65, sin embargo el aumento de la forma fosforilada NF- $\kappa$ B-p-p65 es muy discreto, por lo que al realizar el ratio entre ambas expresiones (proteína NF- $\kappa$ B-p65 y la NF- $\kappa$ B-p-p65) no se observó el aumento de la proteína fosforilada y por tanto podemos afirmar que no hay activación de la misma en estas células.

De la misma manera, tras la aplicación de Parthenolide, no se obtiene la respuesta esperada, ya que los niveles de NF- $\kappa$ B-p65 y de NF- $\kappa$ B-p-p65 son similares a los obtenidos tras la estimulación con IL-1 $\beta$ , y no menores como cabría esperar.

Así, podemos concluir que los datos obtenidos apoyan la idea de que el aumento de NF- $\kappa$ B podría estar relacionado con un aumento del NF- $\kappa$ B acumulado a nivel citoplásmico. El Parthenolide, por su parte actuaría como un inhibidor de IKK, activador de la fosforilación y disociación de NF- $\kappa$ B. Ello condicionaría el acúmulo a nivel citoplásmico (aumento de NF- $\kappa$ B-p65 similar a la estimulación con IL-1 $\beta$ ), pero también su no activación (valores de NF- $\kappa$ B-p-p65 similares a la estimulación con IL-1 $\beta$ ).

Así, se produce un aumento considerable de NF- $\kappa$ B, éste se encuentra en estado inactivo en el citoplasma y no actúa sobre el ADN del núcleo.

### *mRNA-NF- $\kappa$ B EN LA ARTROSIS*

El ARN mensajero (ARNm o *mRNA*, este último de su nombre en inglés) es el ácido ribonucleico que contiene la información genética procedente del ADN del núcleo celular y la transmite a un ribosoma en el citoplasma, lo que determina el orden en que se unirán los aminoácidos de una proteína y actúa como plantilla o patrón para la síntesis de dicha proteína. Se trata de un ácido nucleico monocatenario, al contrario del ADN.

La determinación de mRNA-NF- $\kappa$ B en el condrocito control de nuestra ser muestra unos valores de  $12^{-\Delta\Delta ct}$ . En cuanto a la expresión del mRNA-NF- $\kappa$ B en los condrocitos estimulados con IL-1 $\beta$  se pudo constatar un aumento en la expresión de este mRNA-NF- $\kappa$ B con respecto al control cuando las células están inducidas por IL-1 $\beta$ , obteniendo unos valores de  $1,16 \cdot 2^{-\Delta\Delta ct}$ .

Por su parte, se aprecia una mayor expresión del mRNA-NF- $\kappa$ B en las células con estimulación con IL-1 $\beta$  y a la vez inhibidas con Parthenolide en relación a las células control y aquellas que solo fueron estimuladas con IL-1 $\beta$ , obteniendo unos valores de  $4 \cdot 2^{-\Delta\Delta ct}$ .

### *miR-34a EN LA ARTROSIS*

La expresión génica es regulada por diferentes mecanismos que permiten o impiden su transcripción y, en última instancia, su función a través de la proteína que codifican. Uno de los mecanismos de regulación más recientemente estudiado es el ejercido por los miARN.

Un micro RNA es un ARN monocatenario, de una longitud de entre 21 y 25 nucleótidos de longitud, y que tiene la capacidad de regular la expresión de otros genes mediante diversos procesos.

Los miRNA son moléculas de ARN transcritas a partir de genes de ADN, pero estas moléculas no son traducidas a proteínas. La función de los miRNA, por tanto está relacionada con la regulación de la expresión génica, por lo que cualquier disrregulación de los miRNA podría conllevar grandes problemas de regulación en la función celular, dado que los miARN actúan a modo de silenciadores génicos reprimiendo la traducción del ARN mensajero o induciendo su degradación, o bien son activadoras de la función celular, siendo capaces de modular la actividad señalizadora de una vía de transducción de señales celulares.

El papel de los microRNA en el desarrollo de numerosas patologías ha centrado la atención de la comunidad médica en los últimos años. Recientemente, han aumentado las publicaciones en las que se estudia el posible papel etiopatogénico de los miRNA en numerosas enfermedades.

Desde el descubrimiento del primero, se han ido identificando numerosos miRNA, de tal forma que actualmente se encuentran registrados cerca de 500 miRNA maduros. De la misma forma, han ido aumentando

los estudios en los que se estudia la implicación de los miRNA en diversas patologías.

Son numerosas las patologías en las que se estudia la implicación de diversos miRNAs, como por ejemplo enfermedades neoplásicas como el cáncer de colon, cáncer de páncreas, el glioblastoma o el linfoma de Hodking. De igual modo también se relacionan con patologías neurológicas como la enfermedad de Hutchington.

Pero una de las asociaciones más firmemente establecidas sin lugar a dudas, es la implicación de los miRNAs en patologías inflamatorias, como la artritis reumatoide o la osteoartritis.

En este trabajo nos centramos en el análisis de este último tipo de patologías, especialmente de la osteoartritis. Como menciona Tornero-Esteban et al<sup>83</sup>, recientemente, y debido al interés creciente en el estudio de los miARN en relación con la regulación de la diferenciación tisular, se han identificado varios miARN cuya expresión se encuentra aumentada durante la diferenciación de MSC a distintos fenotipos mesenquimales. Así, miR-26b y miR-337 regularían la diferenciación adipocítica y la condrogénesis, respectivamente. También se han identificado varios miARN que actuarían regulando la diferenciación osteogénica, entre ellos, miR-125b y miR-196a.

Por su parte, Silvia Díaz Prado et al<sup>84</sup> al identifican 7 miRNAs que se expresan de forma distinta en pacientes con y sin osteoartritis, tras realizar un estudio de caracterización de los perfiles de expresión de microRNA en los condrocitos de los pacientes con osteoartritis.

Por otra parte, Tracey E. et al<sup>85</sup> al estudian la expresión y función del miRNA-455 en el proceso de condrogénesis de los pacientes con osteoartritis.

No obstante, uno de los miRNAs más estudiados ha sido el miRNA 146, especialmente en relación con la artritis reumatoide. Autores como Takuya Niimoto et al<sup>86</sup>, Tomoyuki Nakasa<sup>88</sup> o Jing Li<sup>87</sup> realizan estudios de expresión de miRNA-146 en pacientes con artritis reumatoide.

Así, Tomoyuki et al<sup>88</sup>, demuestran que el miR-146 está expresado en el tejido tisular de los pacientes con artritis reumatoide, y que esta expresión esta inducida por la estimulación con IL-1 $\beta$  y el factor TNF- $\alpha$ .

De igual modo, Jing li et al<sup>87</sup>, demuestra que el miR-146a induce la formación de factores de crecimiento endotelial y la apoptosis de los condrocitos, todo ello tras la activación del condrocito con IL-1 $\beta$ .

Otro de los miRNA relacionados con patologías articulares es el miRNA 34a, sobre el que se centra nuestro trabajo, especialmente en su implicación con la osteoartritis.

Los estudios realizados sobre el miRNA 34a, se han realizado con modelos experimentales utilizando condrocitos de ratas, sin embargo, en este trabajo el modelo experimental se ha realizado utilizando condrocitos humanos procedentes de pacientes con artrosis de rodilla.

Como ya se menciona en la introducción, los estudios de Fabienne Niederer et al.<sup>47</sup> demostraron que los pre-miR-34a tiene un papel importante en el proceso pro-apoptótico, a través de la modulación de una proteína inhibidora de la apoptosis denominada XIAP. Así, demostraron que cuando disminuye la modulación de los pre-miR-34a en los fibroblastos sinoviales de los/as pacientes con artritis reumatoide, se evita el bloqueo de expresión de XIAP, lo que contribuye de forma importante a la resistencia de las células a la apoptosis.

Por otra parte, Mohamed M. Abouheif investigó la expresión de miR-34a en el cartílago articular y confirmaron que la expresión de los mismos tiende a incrementarse al mismo tiempo que aumenta la degradación del cartílago. Sus estudios demostraron que la expresión de los miRNA-34a está inducida por IL-1 $\beta$  en los condrocitos y que silenciar dicho miR-34a puede prevenir la apoptosis en los condrocitos<sup>48</sup>.

Otros autores como Dongkyum et al.<sup>49</sup> demostraron que el miRNA-34a es una llave moduladora en la dinámica del citoesqueleto a través de su interacción entre Roa/Rac1 durante la condrogénesis, modulando negativamente la reorganización del citoesqueleto de actina, que es uno de los procesos esenciales en la maduración del condrocito.

En el presente estudio, se realiza la determinación y cuantificación de miRNA 34a de los condrocitos obtenidos del cartílago de pacientes con artrosis de rodilla en situación basal, tras ser estimulados con IL-1 $\beta$  y posteriormente inhibidos con Parthenolide PARTS25-IL-1 $\beta$ , observando su relación con NF- $\kappa$ B como medidor del proceso inflamatorio.

Tras realizar el cultivo de condrocitos, en primer lugar se determina y cuantifica la expresión de los niveles de miRNA34a en el condrocito normal, mediante PCR. Obtenemos un valor de 1,00 medido en  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

En cuanto a la expresión del microRNA miR-34a en los condrocitos estimulados con IL-1 $\beta$  se pudo constatar un aumento en la expresión de este miRNA con respecto al control cuando las células están inducidas por IL-1 $\beta$ , obteniendo unos valores de 1,24  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Por su parte, se aprecia una menor expresión del miRNA en las células con estimulación con IL-1 $\beta$  y a la vez inhibidas con Parthenolide en relación a las células control y aquellas que solo fueron estimuladas con IL-1 $\beta$ , obteniendo unos valores de 0,63  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

	Control	IL-1 $\beta$	PARTS25-IL-1 $\beta$
NF- $\kappa$ B	1	1,17	115,6
mRNA- NF- $\kappa$ B	1	1,16	4
miR-34a	1	1,24	0,63

**Tabla 13. Determinaciones de NF- $\kappa$ B, mRNA- NF- $\kappa$ B y miR-34a medido en  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .**

Dado que los microARN actúan regulando la expresión génica es lógico pensar que una reducción en los niveles de expresión de miR-34a constituye posiblemente un factor beneficioso para evitar la degeneración de los tejidos articulares. Ello hace suponer que microRNA-34a actúa como un modulador positivo del gen NF- $\kappa$ B, expresándose para activar NF- $\kappa$ B y silenciándose con el aumento citoplásmico de NF- $\kappa$ B-p65.

Es difícil explicar la relación entre miR-34a con IL-1 $\beta$  o con los mecanismos de inhibición producidos por el Parthenolide. Por tanto, se hace necesario llevar a cabo más investigaciones que permitan entender y definir mejor el papel de miR-34a sobre el control de los mecanismos implicados en el desarrollo de la osteoartritis. Este conocimiento puede también contribuir al desarrollo de futuros enfoques terapéuticos.

### *MCP-1 EN LA ARTROSIS*

La proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1/CCL2) es una quimioquina cuya principal función conocida es la de regular la migración de monocitos, linfocitos T de memoria y células Natural killer (NK), hacia la zona lesionada, participando por lo tanto en los procesos de inflamación.

Su gen se localiza en el cromosoma 17 y la proteína está formada por 76 aminoácidos, con un peso molecular de 13 KDa<sup>49</sup>.

Son numerosas las enfermedades y patologías en las que se ha documentado la participación de MCP-1, como la esclerosis múltiple (Tanuma 2006), asma alérgica (Ip 2006), nefropatía (Granata 2006), artritis reumatoide (Rantapaa-Dahlqvist 2007) o tumores neurovasculares (Wang 2006). Así, autores como Sara Cuesta et al<sup>89</sup> mencionan a IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B y a MCP-1 en el mismo trabajo, afirmando que sus niveles de expresión disminuyen tras el tratamiento con melatonina en el hígado de ratones.

Del mismo modo, Wendy L. Thompson et al<sup>90</sup> demostraron que la vía de señalización de NF- $\kappa$ B es muy importante para estimular la producción de las citoquinas.

En este sentido podemos afirmar que nuestro trabajo ayuda a corroborar esta afirmación pues la estimulación de condrocitos humanos con IL-1 $\beta$  origina un importante aumento de MCP-1, cuando NF- $\kappa$ B aparece activado en forma de NF- $\kappa$ B-p-p65, mientras que la inhibición del condrocito con Parthenolide origina un marcado descenso del mismo, aunque los valores de NF- $\kappa$ B-p65 sean elevados. Esto apoya la idea de que es necesaria la activación de NF- $\kappa$ B para inducir la expresión de MCP-1.

Por otra parte, apoya la idea de que el Parthenolide actúa a nivel de la activación de NF- $\kappa$ B, impidiendo su fosforilación.

Igualmente apoya la idea de que miRNA-34a, reduce su expresión ante estímulos citoplásmicos de NF- $\kappa$ B-p65 no activado, no interviniendo en su vía de activación.

Satish L. et al<sup>91</sup> mencionan que cualquier intento de reducir la producción de CCL2 o reducir su expresión para lograr beneficios en cualquiera de las patologías mencionadas anteriormente debe estudiarse con cautela dado el rol que presenta en el mantenimiento de la salud. No podemos olvidar por ejemplo, que el reclutamiento de monocitos y macrófagos en cualquier órgano en respuesta a la inflamación es una respuesta vital para eliminar los patógenos mediante la fagocitosis.

Así, descubrir algún fármaco que bloqueara algunos de los receptores dis-regulados de quimioquinas, podría demostrarse como muy efectivo siempre que permitieran la expresión normal de CCL2. Algunas citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 podrían tener un rol muy importante en el inicio de este proceso.

## **REPRODUCTIBILIDAD Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

El presente trabajo trata de estudiar y analizar de manera sencilla el comportamiento del condrocito en las rodillas de los pacientes afectados de una osteoartrosis.

La obtención de las muestras no representa gran dificultad para un servicio de Traumatología donde la implantación de artroplastias primarias de rodilla se realiza de manera habitual. Tras el procesado de las mismas se realizaron las diferentes técnicas indicadas muchas de ellas fácilmente reproducibles en cualquier servicio de Anatomía Patológica.

Probablemente la mayor dificultad del presente trabajo esté en la realización y posterior análisis del cultivo de condrocitos. Para la realización del cultivo, se realizó en primer lugar el aislamiento de los mismos por digestión enzimática.

Una vez realizado el cultivo, en este trabajo se ha tratado de reproducir las condiciones en las que se encuentran los condrocitos de las rodillas artrósicas, para lo cual se ha estimulado el condrocito con  $Il-1 \beta$ , lo que origina la estimulación del mismo y un aumento en la producción de  $NF-\kappa B$ . De la misma forma, tras la estimulación del condrocito se utilizó la Parthenolide para inhibir el  $NF-\kappa B$ . Posteriormente se procede a la extracción de proteínas y análisis mediante la técnica de Western-Blot.

Realizando los dos procesos de estimulación e inhibición de la producción de  $NF-\kappa B$  en el citoplasma del condrocito, procedimos posteriormente a determinar el comportamiento de miRNA 34a con técnicas de biología molecular (PCR) y la detección de citoquinas inflamatorias mediante la técnica ELISA.

Así pues, para el presente estudio hemos utilizado técnicas habituales que hacen que el método sea sencillo y fácilmente reproducible. Probablemente la mayor limitación de este procedimiento sea el coste económico y el tiempo que se emplea en la elaboración y preparación de la muestra. Igualmente es necesario la obtención de los diferentes Kits de trabajo, tinciones, anticuerpos etc... además de disponer de la posibilidad de realizar técnicas de ELISA, WESTERN-BLOT o PCR.

Otra limitación que nos encontramos, es determinar el tiempo adecuado para la elaboración del cultivo de condrocitos. En este trabajo hemos empleado 48 horas en la elaboración del mismo, pero cabe plantearse lo que ocurriría si aumentáramos el tiempo de elaboración a 72 horas y como afectaría este incremento del tiempo empleado en la preparación del cultivo a los resultados.

En el momento actual estamos muy alejados de poder utilizar este procedimiento de estudio en la práctica clínica. No podemos olvidar que trabajamos con muestras de pacientes a los que ya se les ha intervenido de prótesis de rodilla, es decir pacientes que a priori ya no se van a beneficiar de ningún tratamiento. Además, la mayor parte de los pacientes que presentan artrosis de rodilla son pacientes de edad avanzada, lo cual limita los resultados a la hora de extrapolarlos a la población más joven.

Pero probablemente, hoy en día la limitación más importante de este trabajo sea determinar a que nivel hay que actuar en la cadena de acontecimientos que se producen en el condrocito en el desarrollo de la artrosis.

Por un lado, de los estudios mencionados se desprende la importancia y el atractivo objetivo que supone actuar sobre el NF- $\kappa$ B para el tratamiento de determinadas enfermedades inflamatorias como la osteoartrosis o la

artritis reumatoide. Pero las dudas en relación a los efectos sistémicos y al bloqueo indiscriminado de sus numerosos efectos beneficiosos, así como las dificultades técnicas para poder usarlo a través de la terapia génica, hacen que todavía se tenga que esperar para poder usarlo con fines terapéuticos.

Por otro lado, dado que los microARN actúan regulando la expresión génica, es lógico pensar que una reducción en los niveles de expresión de miR-34a constituye posiblemente un factor beneficioso para evitar a degeneración de los tejidos articulares, si bien todavía no esta claro como disminuir estos niveles en pacientes vivos.

No obstante, el presente trabajo establece un modelo útil para conocer el comportamiento celular y los mecanismos moleculares y las vías de señalización involucrados en el desarrollo de la artrosis de rodilla, con la finalidad de conocer factores que permitan prevenir o mejorar el tratamiento de esta patología tan frecuente en la población general, reduciendo las indicaciones quirúrgicas.

Por otro lado, podemos afirmar que el conocimiento que se ha ido adquiriendo de las funciones de MCP-1 podría servir como base para encontrar nuevas estrategias para controlar los efectos no deseados de la inflamación crónica sin comprometer sus efectos beneficiosos.

Finalmente, esclarecer el mecanismo molecular y el lugar exacto de acción del Parthenolide, cuya acción antiinflamatoria es evidente, puede permitir disminuir la inflamación y abrir nuevas vías en el tratamiento de los procesos inflamatorios que afecten a la rodilla.



# CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

Del presente estudio se extraen las siguientes conclusiones:

1. La osteoartritis de rodilla es una enfermedad articular degenerativa con importante componente inflamatorio que afecta a pacientes de edad avanzada. Presenta una mayor prevalencia en mujeres y el antecedente de una cirugía previa aumenta el riesgo de padecerla. Un hecho importante en esta enfermedad es la existencia de una importante disociación clínico-radiológica, que en ocasiones plantea dudas terapéuticas.
2. En los cambios histológicos obtenidos, se observa una buena correlación de las lesiones observadas con la clínica, así como una alteración de la estructura definida por procesos de fibrilación, fractura y ulceración o erosión del cartilago articular. De la misma forma se observa una fuerte expresión de NF- $\kappa$ B en los condrocitos del cartilago articular lesionado.
3. El cultivo de condrocitos humanos es un método efectivo que permite generar modelos experimentales para el análisis molecular y genético de la función celular. Permite determinar y cuantificar NF- $\kappa$ B, la extracción de proteínas y su análisis mediante Western Blot. De la misma forma, es posible determinar y cuantificar mRNA-NF- $\kappa$ B y miR-34a mediante técnicas de biología molecular (PCR) y las citoquinas inflamatorias MCP-1 con la técnica ELISA.
4. La determinación y cuantificación de las proteínas NF- $\kappa$ B-p65 y NF- $\kappa$ B-p-p65, ponen de manifiesto que tras la estimulación con IL-1 $\beta$ , aumenta de forma considerable la expresión de ambas. Sin

embargo, la inhibición con Parthenolide produce un aumento de NF- $\kappa$ B-p65, pero una reducción de NF- $\kappa$ B-p-p65, lo que apoya la idea de que el Parthenolide actúa inhibiendo la vía de fosforilación y disociación de NF- $\kappa$ B, condicionando el acúmulo de éste a nivel citoplásmico, pero también su inactivación.

5. El análisis de la expresión del mRNA-NF- $\kappa$ B, constata un aumento en su expresión cuando las células están inducidas por IL-1 $\beta$ , pero sin embargo, se aprecia una mayor expresión del mRNA-NF- $\kappa$ B en las células que son estimuladas con IL-1 $\beta$  y a la vez inhibidas con Parthenolide en relación a las células control y aquellas que solo fueron estimuladas con IL-1 $\beta$ , apoyando la hipótesis de que el Parthenolide actúa a nivel de la vía de activación de NF- $\kappa$ B.
6. La determinación y cuantificación de MCP-1 mediante ELISA muestra un importante aumento de MCP-1 tras la estimulación con IL-1 $\beta$ , mientras que la inhibición con Parthenolide origina un marcado descenso del mismo, estableciéndose una relación directa entre los valores de activación de NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B-p-p65) y la expresión de MCP-1, apoyando la idea de una acción inhibitoria de Parthenolide sobre la fosforilación de NF- $\kappa$ B, y la implicación de ambos en la inflamación que ocurre en la artrosis.
7. Se observa un aumento en la expresión de miR-34a cuando las células están inducidas por IL-1 $\beta$ , mientras que se observa una menor expresión de este miR-34a en las células estimuladas con IL-1 $\beta$  y a la vez inhibidas con Parthenolide.

## CONCLUSIONES

8. Ello hace suponer que actúa como un modulador positivo de la expresión del gen NF- $\kappa$ B, expresándose para activar NF- $\kappa$ B tras el estímulo por IL-1 $\beta$  y silenciándose con el aumento citoplásmico de NF- $\kappa$ B-p65.
9. No se ha observado una acción directa de miRNA-34a sobre los procesos de activación/fosforilación de NF- $\kappa$ B, siendo éste un punto de interés para futuros estudios.
10. De esta forma, el miR-34a se convierte en una futura diana terapéutica a seguir analizando. Su determinación futura en líquido sinovial y sangre periférica, podrá relacionarse con una mayor o menor activación de la vía de señalización de NF- $\kappa$ B y con una activación del proceso inflamatorio/degenerativo de la artrosis.
11. Hoy en día son necesarios más estudios en relación a los efectos sistémicos y al bloqueo de los efectos beneficiosos de NF- $\kappa$ B, al igual que esclarecer el mecanismo molecular del Parthenolide como inhibidor del mismo, para abrir nuevas vías en el tratamiento de los procesos inflamatorios de la rodilla.



# BIBLIOGRAFIA

---

- <sup>1</sup> Xabier Mas Garriga. Definición, etiopatogenia, clasificación y formas de presentación. *Aten Primaria*.2014; 46 Supl 1:3-10.
- <sup>2</sup> Hunter DJ, Felson DT. Osteoarthritis. *BMJ*. 2006; 332:639-42.
- <sup>3</sup> Alonso Ruiz, A. Artrosis: definición y clasificación. En: Monfort J. Artrosis. Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. Madrid: Sociedad Española de Reumatología y Editorial Médica Panamericana; 2010. p. 65-71.
- <sup>4</sup> J.R. Prieto-Montañana, J.A. Riancho. La artrosis como enfermedad genética. *Rev. esp. cir. ortop. traumatol*. 2009; 53(4): 271–277.
- <sup>5</sup> Cueto Espinar A, Hernández Mejía R, Fernández López JA, Ballina García FJ. Enfermedades del sistema osteomuscular y tejido conjuntivo. En: Piédrola Gil G, Del Rey Calero J, Cortina Greus P, Gálvez Vargas R, Sierra López A, Sáenz González MC, et al. *Medicina preventiva y salud pública*. Barcelona: Masson; 2008. p. 885-96.
- <sup>6</sup> A. Poley Gonzalez, J.A: Ortega Blanco, M. Pedregal Gonzalez, M.Martin Azofra, C. Hermosilla Camacho, F.Mora Moreno. Prevalencia de enfermedades y consumo de recursos. Calidad de vida y dependencia en pacientes con artrosis. *Semergen* 2011; 37(9):466.467.
- <sup>7</sup> Monfort Faure J. Mecanismos de degeneración del cartílago articular. En: Monfort J. Artrosis. Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. Madrid: Sociedad Española de Reumatología y Editorial Médica Panamericana; 2010. p. 91-100.
- <sup>8</sup> Issa SN. Epidemiology of osteoarthritis: an update. *Curr Rheumatol Rep*. 2006; 8: 7-15.

- <sup>9</sup> Cheung PP, Gossec L. What are the best markers for disease progression in osteoarthritis? *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2010; 24: 81-92.
- <sup>10</sup> Belo JN, Berger MY, Reijman M, Koes W, Bierma-Zeinstra SMA. Prognostic factors of progression of osteoarthritis of the knee: a systematic review of observational studies. *Arthritis Rheum.* 2007; 57:13-26.
- <sup>11</sup> Monfort Faure J. Artrosis. Etiopatogenia, epidemiología y clasificación. Manual SER de las Enfermedades Reumáticas. 5ª ed. Madrid: Sociedad Española de Reumatología y Editorial Médica Panamericana; 2008. p. 317-23.
- <sup>12</sup> Valdés AM, Spector TD. The contribution of genes to osteoarthritis. *Med Clin North Am.* 2009; 93:45-66.
- <sup>13</sup> J.R. Prieto, J.A. Riancho. La artrosis como enfermedad genética. *Rev. Esp. Cir. Ortop. Traumatol.* 2009; 53(4):271-277.
- <sup>14</sup> Valdes AM, Hart DJ, Jones KA, Surdulescu G, Swarbrick P, Doyle DV, et al. Association study of candidate genes for the prevalence and progression of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2004; 50:2497–507.
- <sup>15</sup> Mototani H, Mabuchi A, Saito S, Fujioka M, Iida A, Takatori Y, et al. A functional single nucleotide polymorphism in the core promoter region of CALM1 is associated with hip osteoarthritis in Japanese. *Hum Mol Genet.* 2005; 14:1009–17.
- <sup>16</sup> Valdes AM, Loughlin J, Timms KM, Van Meurs JJ, Southam L, Wilson SG, et al. Genome-wide association scan identifies a prostaglandin-endoperoxide synthase 2 variant involved in risk of knee osteoarthritis. *Am J Hum Genet.* 2008; 82:1231–40.
- <sup>17</sup> Felson DT. The epidemiology of knee osteoarthritis: results from the Framingham osteoarthritis study. *Semin Arthritis Rheum.* 1990; 20 3 Suppl 1:42-50.

- 
- <sup>18</sup> Davis MA, Ettinger WH, Neuhaus JM. Obesity and osteoarthritis of the knee: evidence from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES I). *Semin Arthritis Rheum*. 1990; 20 3 Suppl 1:34-41.
- <sup>19</sup> Hart DJ, Spector TD. The relationship of obesity, fat distribution and osteoarthritis in women in general population. The Chingford study. *J Rheumatol*. 1993; 20:331-5.
- <sup>20</sup> Felson DT, Zhang Y, Anthony JM, Naimark A, Anderson JJ. Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in women: The Framingham Study. *Ann Intern Med*. 1992; 116:535-9.
- <sup>21</sup> Messier SP, Gutekunst DJ, Davis C, De Vita P. Weight loss reduces knee-joint loads in overweight and obese older adults with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2005; 52:2026-32.
- <sup>22</sup> González Martínez-Pedrayo A. Genética de la artrosis primaria. En: Monfort J, coordinador. *Artrosis. Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento*. Madrid: Sociedad Española de Reumatología y Editorial Médica Panamericana; 2010: 133-45.
- <sup>23</sup> Carmona Ortells L. Epidemiología de la artrosis. En: Monfort J, coordinador. *Artrosis. Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento*. Madrid: Sociedad Española de Reumatología y Editorial Médica Panamericana; 2010. p. 3-17.
- <sup>24</sup> Raya Moles J, Delgado Martínez A. Cirugía en el tratamiento de las artropatías crónicas degenerativas. La artrosis y sus posibilidades terapéuticas. *Cirugía OrtopédicaTraumatología*. Editorial Panamericana. Pág. 332-336.
- <sup>25</sup> Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, Fanselow MS, Baltimore D. NF- $\kappa$ B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat. Neurosci*. 2003; 6 (10): 1072–8.
- <sup>26</sup> Jacobs MD, Harrison SC (1998). Structure of an I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B complex. *Cell* 95 (6): 749–58.

- 
- <sup>27</sup> Nelson DE, Ihekweaba AE, Elliott M, Johnson JR, Gibney CA, Foreman BE, Nelson G, See V, Horton CA, Spiller DG, Edwards SW, McDowell HP, Unitt JF, Sullivan E, Grimley R, Benson N, Broomhead D, Kell DB, White MR .Oscillations in NF- $\kappa$ B signaling control the dynamics of gene expression. *Science* 2004; **306** (5696): 704–8.
- <sup>28</sup> Monaco C, Andreakos E, Kiriakidis S, Mauri C, Bicknell C, Foxwell B, Cheshire N, Paleolog E, Feldmann M. Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 13;101(15):5634-9.
- <sup>29</sup> Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA* 2005 Dec;11(12):1753-6.
- <sup>30</sup> Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75: 843–854.
- <sup>31</sup> Ruvkun, G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA World. *Science* Oct 26 de 2001; 294 (5543): 797–9.
- <sup>32</sup> Glasser V. Tapping miRNA-Regulated Pathways. *Genetic Eng Biotech News* Mar 1 2008 (Vol. 28, No. 5).
- <sup>33</sup> Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E, Sharon E, Spector Y, Bentwich Z. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet*. 2005 Jul; 37(7):766-70.
- <sup>34</sup> Saumet A, Lecellier CH . Anti-viral RNA silencing: do we look like plants? *Retrovirology* 2006; 3 (3): 3.
- <sup>35</sup> Bartel DP, Chen CZ. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNA. *Nat Rev Genet*. 2004 May;5(5):396-40.

- 
- <sup>36</sup> Lu C, Tej SS, Luo S, Haudenschild CD, Meyers BC, Green PJ. Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. *Science* 2005 Sep 2; 309 (5740):1567-9.
- <sup>37</sup> Alfons Navarro Ponz. Análisis comparativo de la expresión de miRNAs en el desarrollo embrionario del colon, el cáncer colorrectal y el linfoma de Hodkin. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona. Año 2004.
- <sup>38</sup> Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 2008 Jan 11;132(1):9-14.
- <sup>39</sup> Eulalio A, Rehwinkel J, Stricker M, Huntzinger E, Yang SF, Doerks T, Dorner S, Bork P, Boutros M, Izaurralde E. Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes Dev.* 2007 Oct 15;21(20):2558-70.
- <sup>40</sup> Kozak M. (2008). Faulty old ideas about translational regulation paved the way for current confusion about how microRNAs function. *Gene*. Jul 22 (Epub ahead of print).
- <sup>41</sup> Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*. Published online 30 July 2008.
- <sup>42</sup> Sonoki T, Iwanaga E, Mitsuya H, Asou N. Insertion of microRNA-125b-1, a human homologue of lin-4, into a rearranged immunoglobulin heavy chain gene locus in a patient with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2005 Nov;19(11):2009-10.
- <sup>43</sup> Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 26;99(24):15524-9.

- 
- <sup>44</sup> Ma L, Weinberg RA. (2008). "Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis". *Trends Genet.* Jul 30 (Epub ahead of print).
- <sup>45</sup> Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001 Oct 26;294(5543):858-62.
- <sup>46</sup> Murchison EP, Stein P, Xuan Z, Pan H, Zhang MQ, Schultz RM, Hannon GJ. Critical roles for Dicer in the female germline. *Genes Dev.* 2007 Mar 15;21(6):682-93.
- <sup>47</sup> Fabienne Niederer, Michelle Trenkmann, Caroline Ospelt, Emmanuel Karouzakis, Michel Neidhart, Joana Stanczyk, Christoph Kolling, Renate E. Gay, Michael Detmar, Steffen Gay, Astrid Jüngel, Diego Kyburz. Down-regulation of micro RNA-34a\* in rheumatoid Arthritis synovial fibroblasts promotes apoptosis resistance. *Arthritis and Rheumatism.* Vol.64, N°6, Junio 2012; 1771-1779.
- <sup>48</sup> Mohamed M. Abouheif, Tomoyuki Nakasa, Hayatoshi Shibuya, Takuya Niimoto, Wirat Kongcharoensombat, Mitsuo Ochi. Silencing microRNA-34a inhibits chondrocyte apoptosis in a rat osteoarthritis model in Vitro. *Rheumatology* 2010; 49:2054-2060.
- <sup>49</sup> Dongkyun Kim, Jinsoo Song, Sunhyo Kim, Hyang Mi Park, Churl-Hong Chun, Jongkyung Sonn. Micro RNA-34a modulates cytoskeletal dynamics through regulating RhoA/RAC 1 cross-talk in chondroblasts. *The Journal of biological Chemistry.* April 2012. Vol 287 (15): 12501-12509.
- <sup>50</sup> Ara Escudero Hinojosa. Estudio del papel de MCP-1 en los mecanismos neuroprotectores de la Noradrenalina. Tesis Doctoral Madrid 2014.
- <sup>51</sup> Van der Kraan PM y van den Berg WB. Anabolic and destructive mediators in osteoarthritis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000; 3:205-211.

- 
- <sup>52</sup> 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.
- <sup>53</sup> Benjamin H.B. Kwok , Brian Koh , MacKevin I. Ndubuisi , Mikael Elofsson , Craig M. Crews. The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb Feverfew directly binds to and inhibits IL- $\beta$  kinase. *Chemistry & Biology* 8 (2001) 759-766.
- <sup>54</sup> Catherine A. Petty , James H. Lubowitz. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, Vol 27, No 3 (March), 2011: 419-424.
- <sup>55</sup> Heijink A, Gomoll AH, Madry H, Drobnic M, Filardo G, Espregueira-Mendes J, et al. Biomechanical considerations in the pathogenesis of osteoarthritis of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012;20:423-35.
- <sup>56</sup> A. Moreno, A. Silvestre, P. Carpintero. Consenso SECOT artrosis femorotibial medial. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol.* 2013;57(6):417-428
- <sup>57</sup> M. Bernad-Pineda, J. de las Heras-Soto y M.V. Garcés-Puentes. Calidad de vida en pacientes con artrosis de rodilla y/o cadera. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol.* 2014; 58(5): 283-289.
- <sup>58</sup> Hirsch R, Fernandes RJ, Pillemer SR, Hochberg MC, Lane NE, Altman RD, et al. Hip osteoarthritis prevalence estimates by three radiographic scoring systems. *Arthritis Rheum.* 1998; 41: 361-8.
- <sup>59</sup> Blanco FJ, Lotz M. IL-1-induced Nitric oxide inhibits chondrocyte proliferation via PGE<sub>2</sub>. *Exp Cell Res* 1995; 218 (1):319-325.
- <sup>60</sup> Angela Vela Anero. El sulfuro de hidrógeno como diana terapéutica en la artrosis. Tesis doctoral. Universidad de A Coruña. Marzo 2015.

- <sup>61</sup> Constanze Buhrmann, Ali Mobasheri, Ulrike Matis and Mehdi Shakibaei. Research article Curcumin mediated suppression of nuclear factor- $\kappa$ B promotes chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a high-density co-culture microenvironment. *Arthritis Research & Therapy* 2010, 12:R127.
- <sup>62</sup> Tetsuya Matsukawa, Tadahiro Sakai, Tomo Yonezawa, Hideki Hiraiwa, Takashi Hamada, Motoshige Nakashima, Yohei Ono, Shinya Ishizuka, Hiroyuki Nakahara, Martin K Lotz, Hiroshi Asahara<sup>2,4</sup> and Naoki Ishiguro. MicroRNA-125b regulates the expression of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy* 2013, 15:R28.
- <sup>63</sup> Banegas JR. Epidemiología de la hipertensión arterial en España. Situación actual y perspectivas. *Hipertension*. 2005; 22:353-62.
- <sup>64</sup> E. De Miguel Mendieta. Relevancia de los hallazgos clínicos y radiológicos en la artrosis. *Rev Esp Reumatol*. 2005; 32(1):37-41.
- <sup>65</sup> Raynaud JP, Martel-Pelletier J, Berthiaume MJ, Labonté F, Beaudoin G, De Guise JA, et al. Quantitative magnetic resonance imaging evaluation of knee osteoarthritis progression over two years and correlation with clinical symptoms and radiologic changes. *Arthritis Rheum*. 2004 ;50:476-87.
- <sup>66</sup> P.A. Lotke. *Protesis total de rodilla*. En: *Artroplastia de la rodilla*. Madrid. Marban Libros, S.L. 1999; 65-92. ISBN: 84-7101-225-1.
- <sup>67</sup> Ana Isabel Castaño Carou. *Evaluación clínica del paciente con artrosis. Estudio multicentrico "EVALÚA"*. Tesis doctoral. Universidad de a Coruña. Año 2014.

- 
- <sup>68</sup> Bedson J, Croft PR. The discordance between clinical and radiographic knee osteoarthritis: a systematic search and summary of the literature. *BMC Musculoskelet Disord*. 2008; 9:116.
- <sup>69</sup> Cush JJ, Lipsky PE. Estudio de las enfermedades articulares y musculoesqueléticas. En: Harrison. Principios de medicina interna. 14ª edición. Madrid. MacGraw-Hill Interamericana de España, S.A.U. 1998; II:2191-8.
- <sup>70</sup> Paz Jiménez, J; González-Busto Múgica. I; Paz Aparicio, J. Artrosis: Patogenia y desarrollo. *Rev Ortop Traumatol* 2002;5:401-408.
- <sup>71</sup> Peter Bullough. The dysfunctional joint. *Orthopedic Pathology*. Editorial Mosby. 2004; Pag. 239-58.
- <sup>72</sup> Claudia Metz Baer. NFK $\beta$  y su importancia en artritis e inflamación. *Rev. chil. reumatol*. 2008; 24(4):197-199.
- <sup>73</sup> Ruocco MG, Maeda S, Park JM, et al. I $\kappa$ B kinase (IKK), but not IKK, is a critical mediator of osteoclast survival and is required for inflammation-induced bone loss. *J Exp Med* 2005; 201:1677-87.
- <sup>74</sup> Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmborg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- $\kappa$ B activity through induction of I $\kappa$ B synthesis. *Science* 1995; 270:286-90.
- <sup>75</sup> Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin AS, Jr. Role of transcriptional activation of I $\kappa$ B $\alpha$  in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 1995; 270:283-6.
- <sup>76</sup> Saklatvala J. Glucocorticoids: do we know how they work? *Arthritis Res* 2002; 4:146-50.

- 
- <sup>77</sup> Majumdar S, Aggarwal BB. Methotrexate suppresses NF-kappa B activation through inhibition of Ikappa B alpha phosphorylation and degradation. *J Immunol* 2001; 167: 2911-20.
- <sup>78</sup> McIntyre KW, Shuster DJ, Gillooly KM, et al. A highly selective inhibitor of N kappa B kinase, BMS-345541, blocks both joint inflammation and destruction in collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 2003; 48:2652-9.
- <sup>79</sup> Whiteside ST, Israel A. I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol* 1997; 8:75-82.
- <sup>80</sup> Strand J, Burke JR. Ikappa B kinase inhibitors for treating autoimmune and inflammatory disorders: potential and challenges. *Trends Pharmacol Sci* 2007; 28:142-8.
- <sup>81</sup> J.A. Roman-Blas and S.A. Jimenez. NF-kB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *OsteoArthritis and Cartilage* (2006) 14, 839-848.
- <sup>82</sup> Martin H. Stradner, Gerald Gruber, Hannes Angerer, Verena Huber, Daniela Setznagl, Marie-Luise Kremser, Florentine C. Moazed-Fürst, Reinhard Windhager, and Winfried B. Graninger. Sphingosine 1-Phosphate Counteracts the Effects of Interleukin-1 in Human Chondrocytes. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 65, No. 8, August 2013, pp 2113–2122.
- <sup>83</sup> Tornero-Esteban P, et al. Estudio del papel de los miARN en células madre mesenquimales aisladas de pacientes artrósicos. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol*. 2014. Vol 58 (3): 138-143.
- <sup>84</sup> Silvia Díaz-Prado, Claudia Cicione, Emma Muiños-López, Tamara Hermida-Gómez, Natividad Oreiro, Carlos Fernández-López and Francisco J Blanco. Characterization of microRNA expression profiles in normal and osteoarthritic human chondrocytes. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2012, 13:144.

- 
- <sup>85</sup> Tracey E. Swingler, Guy Wheeler, Virginia Carmont, Hannah R. Elliott, Matthew J. Barter, Muhammad Abu-Elmagd, Simon T. Donell, Raymond P. Boot-Handford, Mohammad K. Hajihosseini, Andrea Munsterberg, Tamas Dalmay, David A. Young, and Ian M. Clark. The Expression and Function of MicroRNAs in Chondrogenesis and Osteoarthritis. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 64, No. 6, June 2012, pp 1909–1919.
- <sup>86</sup> Takuya Niimoto, Tomoyuki Nakasa, Masakazu Ishikawa, Atsushi Okuhara, Bunichiro Izumi, Masataka Deie, Osami Suzuki, Nobuo Adachi, Mitsuo Ochi. MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2010, 11:209.
- <sup>87</sup> Li et al. miR-146a, an IL-1b responsive miRNA, induces vascular endothelial growth factor and chondrocyte apoptosis by targeting Smad4. *Arthritis Research & Therapy* 2012, 14:R75.
- <sup>88</sup> Tomoyuki Nakasa, Shigeru Miyaki, Atsuko Okubo, Megumi Hashimoto, Keiichiro Nishida, Mitsuo Ochi, and Hiroshi Asahara. Expression of MicroRNA-146 in Rheumatoid Arthritis Synovial Tissue. *Arthritis Rheum.* 2008 May ; 58(5): 1284–1292. doi:10.1002/art.23429.
- <sup>89</sup> Sara Cuesta , Roman Kireev , Katherine Forman , Cruz García , Germaine Escames , Carmen Ariznavarreta , Elena Vara , Jesús A.F. Tresguerres. Melatonin improves inflammation processes in liver of senescence-accelerated prone male mice (SAMP8). *Experimental Gerontology* 45 (2010) 950–956 .
- <sup>90</sup> Wendy L. Thompson, Linda J. Van Eldik. Inflammatory cytokines stimulate the chemokines CCL2/MCP-1 and CCL7/MCP-7 through NFkB and MAPK dependent pathways in rat astrocytes. *Brain Research*, Volume 1295, 12 October 2009, Page 230.

<sup>91</sup> Satish L. Deshmane, Sergey Kremlev, Shohreh Amini, and Bassel E. Sawaya. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. JOURNAL OF INTERFERON & CYTOKINE RESEARCH 2009; Volume 29, Number 6.

## FE DE ERRATAS

### 1. Página 104

El estudio histopatológico se realizó sobre un total de 24 piezas quirúrgicas de tibia proximal obtenidas tras la realización de una osteotomía tibial en los pacientes sometidos a una artroplastia total de rodilla.

Se realizó un análisis de las diferentes áreas de la superficie articular de cada una de las 24 muestras quirúrgicas, es decir, analizando la meseta tibial medial y la meseta tibial lateral de cada una de las muestras

### 2. Página 117

El estudio con Western-Blot en *NF-κB*, muestra que en el cultivo de condrocitos utilizado como control, se aprecia como la expresión de la proteína *NF-κB*-p65 es de aproximadamente 0,50 **pixeles**, mientras que la expresión de la proteína *NF-κB*-p-p65 es aproximadamente la mitad, con valores alrededor de 0,20 **pixeles** y observables en la membrana de nitrocelulosa con una densidad baja (Figura 33).

### 3. Página 137

Suprimida la primera frase.

### 4. Página 155

La determinación y cuantificación de los niveles de **mRNA de NF-κB** en el condrocito normal, obtenido del cartílago de pacientes con osteoartrosis de rodilla mediante **el análisis con PCR** nos muestra un valor de  $1,00 \cdot 2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Se realizó en este modelo experimental, una activación del condrocito con IL-1β obteniendo una determinación de **1,16**  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Pero lo verdaderamente llamativo ocurre cuando posteriormente a la estimulación con IL-1β, al inhibir el condrocito con Parthenolide PART25-IL-1β, los niveles **de mRNA de NF-κB** aumentan considerablemente hasta valores de **4**  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

5. Página 162

La tabla 13 queda de la siguiente manera:

	<b>Control</b>	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>PART25-IL-1<math>\beta</math></b>
<b>mRNA- NF-<math>\kappa</math>B</b>	<b>1</b>	<b>1,16</b>	<b>4</b>
<b>miR-34a</b>	<b>1</b>	<b>1,24</b>	<b>0,63</b>

Tabla 13. Determinaciones de NF- $\kappa$ B, mRNA- NF- $\kappa$ B y miR-34a medido en  $2^{-\Delta\text{ct}}$ .