

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL BIOLOGÍA VEGETAL Y ECOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE A CORUÑA

**EFFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO (*NO*) SOBRE LA ACTIVIDAD
MITOCONDRIAL DE LOS CONDROCITOS ARTICULARES HUMANOS: SU
IMPLICACIÓN EN LA ARTROSIS**

Memoria para aspirar al grado de
Doctor en Biología
presentada por

M^a del Carmen de Andrés González

2007



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA
ANIMAL BIOLOXIA VEXETAL E ECOLOXÍA

Campus da Zapateira s/n
15071 A Coruña. España
Teléfono: 981 16 70 00
Fax: 981 16 70 65

El presente trabajo, “Efecto del Óxido Nítrico (*NO*) sobre la actividad mitocondrial de los condrocitos articulares humanos: su implicación en la artrosis”, presentado por M^a del Carmen de Andrés González para aspirar al grado de Doctor en Biología, dirigido por la Dra. M^a Jesús Manso Revilla, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña, ha sido realizado bajo mi tutela.

Revisado el texto, estoy conforme con su presentación para ser juzgado.

Dr. M^a Jesús Manso Revilla
Profesor Titular de Biología Celular

En A Coruña, 6 de Marzo de 2007

El **Dr. Francisco Javier Blanco García**, Reumatólogo y Coordinador de la Unidad de Investigación del Complejo Hospitalario Universitario Juan Canalejo de A Coruña y la **Dra. Emilia Maneiro Pampín**, Investigadora en un Proyecto de Excelencia de la Comunidad de Madrid en el Departamento de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense.

CERTIFICAN:

Que **M^a del Carmen de Andrés González**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo: **“Efecto del Óxido Nítrico (NO) sobre la actividad mitocondrial de los condrocitos articulares humanos: su implicación en la artrosis”**

Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias de originalidad y rigor científico para ser defendido públicamente y optar al grado de Doctor en Biología.

Dr. Francisco Javier Blanco García
Coordinador de la Unidad de Investigación
C.H.U. Juan Canalejo

Dra. Emilia Maneiro Pampín
Investigadora Proyecto de Excelencia
Universidad Complutense

En A Coruña, 6 de Marzo de 2007

A mi padre
A mi tía Emilia

Agradecimientos:

Cuando acabas de escribir la tesis y llega el momento de los agradecimientos, éste se convierte en uno de los trámites más complicados; es difícil recapitular todas las vivencias y personas que han pasado por tu vida en estos largos años. No me gustaría olvidarme de nadie y quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que de alguna forma han contribuido y ayudado a la realización de este trabajo, especialmente a:

El Dr. Francisco Blanco por permitir mi incorporación al grupo de reumatología, por la dirección de este trabajo y por darme la oportunidad de continuar lo que fue su tesis y, de este modo, poder trabajar con el siempre interesante óxido nítrico.

A la Dra. Emilia Maneiro Pampín (Mili), por los años y las miles de horas que pasamos codo con codo en el laboratorio, por revisar este trabajo y, por haber intentado explicarme el verdadero sentido de la investigación y tratar de contagiarme su pasión por este trabajo. Por enseñarme que el verdadero material de laboratorio está en la cabeza.

A Ángeles, por todos los años que hemos sido “pareja” de laboratorio, y aunque no haya estado en la fase final, quiero que sepa que una parte de lo que está aquí también es suyo.

A las Dras. M^a Jesús Manso y M^a José González, con las que empecé la andadura en la investigación, por contar siempre con su apoyo, y al resto de compañeros del área de Biología Celular de la Facultad de Ciencias, con los que sigo compartiendo muy buenos momentos.

A todos mis compañeros del laboratorio de investigación, algunos ya no están, con los que he compartido grandes momentos durante todo este tiempo. Especialmente a Isa por su gran ayuda en el *sprint* final, por haber compartido conmigo este periodo y por estar ahí siempre para darme ese empujón que necesito a veces; a Tamara, no todo el mundo tiene la gran suerte de encontrar a su gema en el trabajo, por haberme ayudado tanto y, sobre todo, por hacer que el laboratorio sea un sitio mucho más alegre desde que llegó ella; a Mar, por haber estado conmigo desde el primer día que llegué y por ser la persona con mejor actitud ante la vida que conozco y a Isa S., siempre dispuesta a echarme una mano.

A Cristina, por todo lo que he podido aprender de ella acerca de las proteínas y por haberme ayudado con los “encantadores” GLUTs.

A Pury, por su gran ayuda en cuestiones de histología y microscopía.

A Sonia Pértega por su ayuda en el tratamiento estadístico de los datos.

A M^a Jesús por el increíble trabajo de microscopía electrónica, por sacar tiempo de donde no lo tenía para ayudarme y por mostrar siempre tanto interés en mi trabajo.

A Pilar, por hacer que realmente todo sea mucho más fácil para nosotros.

A los donantes de cartílago que con su generosidad han permitido que pueda hacer este trabajo.

Al grupo de Dr. Joaquín Arenas del Hospital 12 de octubre de Madrid por la medida de las actividades de la CRM.

Al Instituto de Salud Carlos III y la Fundación Juan Canalejo por la financiación durante este trabajo.

A todos mis amigos (ellos saben quienes son) por todos los años que llevamos juntos, por haber sufrido esta tesis conmigo y por los buenísimos momentos que hemos vivido y los que quedan. Especialmente a Elena (por algo eres la *number one*) y Chus, por todos los años que llevamos juntas y por el apoyo incondicional; y, Che y Jose, con los que compartí unos años de maravillosa convivencia.

A mi familia: mi padre, mi tía Emilia, M^a Jesús y mis hermanos, por su apoyo y ánimo constantes.

Gracias.

RESUMEN:

El cartílago articular hialino es un tejido formado principalmente por MEC y con un único componente celular que es el condrocito, el cual va a ser el responsable de el mantenimiento de la integridad y función de este tejido. El desgaste mecánico y la influencia de factores bioquímicos entre otros, hacen que acabe por degradarse dando como resultado la patología artrósica.

El cartílago articular en humanos y animales adultos sufre una serie de cambios asociados a la edad, incluido un descenso en el número de condrocitos (Adams *et al.*, 1998). Cuanto mayor es un individuo, menor número de condrocitos posee el cartílago y un mayor porcentaje de muerte por apoptosis. Actualmente se sabe que existen otros tipos de muerte programada diferentes a la apoptosis.

El metabolismo del cartílago es fundamentalmente glicolítico. Sin embargo, los condrocitos contienen mitocondrias (Yamamoto *et al.*, 1988) y poseen enzimas oxidativas mitocondriales activas (Sampson *et al.*, 1986). De esta forma el metabolismo aerobio también puede tener lugar (Spencer *et al.*, 1990).

En un trabajo previo realizado por nuestro grupo (Maneiro *et al.*, 2003) se analizaron las actividades de los complejos de la CRM en condrocitos OA, encontrándose una reducción significativa en las actividades de los complejos II y III respecto a las de los condrocitos procedentes de cartílago normal, lo que nos indicaba una implicación de la función mitocondrial en la patofisiología de la OA.

El *NO* puede regular la apoptosis a varios niveles, dependiendo del contexto celular. Es ampliamente conocido que el *NO* induce la muerte de los condrocitos por apoptosis. Parece que el *NO* puede desencadenar el proceso apoptótico en parte a través de una acción directa sobre las membranas mitocondriales. Se ha visto que una gran variedad de dadores de *NO* suprimen la respiración y la generación de ATP, sugiriendo una contribución a la pérdida de matriz y mineralización del cartílago. Por todo esto, el *NO* puede ser un importante mediador de la lesión articular crónica.

Por todo esto nos planteamos estudio del efecto del *NO*, mediante el empleo de diferentes dadores, sobre la viabilidad y la actividad mitocondrial de los condrocitos articulares humanos, y su posible implicación con la OA.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. EL CARTÍLAGO ARTICULAR HUMANO	3
1.1. Cartílago articular humano normal	3
1.1.1. Composición del cartílago articular (hialino)	4
1.1.1.1. Componente celular (condrocitos)	4
1.1.1.2. La matriz extracelular (MEC)	5
1.1.2. Estructura y función del cartílago articular humano normal	7
1.2. Cartílago articular humano patológico. La artrosis (OA)	11
1.2.1. Composición del cartílago artrósico (OA)	11
1.2.2. Estructura y función del cartílago articular humano patológico. La artrosis (OA)	13
1.2.2.1. Mecanismos de destrucción y reparación del cartílago	14
1.2.2.2. La artrosis (OA)	17
1.2.2.2.1. Definición y clasificación	17
1.2.2.2.2. Epidemiología. Influencia socioeconómica	20
1.2.2.2.3. Tratamiento de la artrosis (OA)	21
2. METABOLISMO DEL CARTÍLAGO ARTICULAR	21
2.1. Transporte de glucosa	24
2.2. La oxidación de la glucosa. Importancia de la glucólisis en el cartílago	26
2.3. La mitocondria como centro energético. La cadena respiratoria mitocondrial (CRM)	28
2.4. El metabolismo del cartílago articular artrósico (OA)	31
3. RECAMBIO CELULAR EN EL CARTÍLAGO ARTICULAR	32
3.1. Mecanismos de muerte en el cartílago articular	32
3.1.1. Muerte celular accidental (Necrosis)	32
3.1.2. Muerte celular programada (<i>Programmed Cell Death, PCD</i>)	34
3.1.2.1. Apoptosis (tipo I)	34
3.1.2.2. Autofagocitosis (tipo II). Condrotosis	39
3.1.2.3. Paraptosis (tipo III)	41
3.2. Viabilidad celular del cartílago patológico artrósico (OA)	41
4. EL ÓXIDO NÍTRICO (<i>NO</i>) EN EL CARTÍLAGO ARTICULAR	43
4.1. El óxido nítrico (<i>NO</i>)	44
4.2. Familia enzimática de la óxido nítrico sintasa (<i>NOS</i>)	45
4.3. Síntesis de óxido nítrico (<i>NO</i>). Mecanismo de acción	47
4.4. Metabolismo del óxido nítrico (<i>NO</i>). Estrés oxidativo	48
4.5. Óxido nítrico (<i>NO</i>), mitocondria y apoptosis	50
4.6. El papel del óxido nítrico (<i>NO</i>) en el proceso artrósico	52
II. OBJETIVOS	55
III. MATERIAL Y MÉTODOS	59
REACTIVOS	61
1. Dadores de óxido nítrico (<i>NO</i>)	61
1.1. Nitroprusiato sódico (<i>Sodium nitroprusside, SNP</i>)	62
1.2. NOC-5 (3-[2-hidroxi-1-(metiletil)-2-nitrosohidrazino]-1-propanamina)	62
1.3. NOC-12 (N-Etil-2-(1-etil-2-hidroxi-2-nitrosohidrazino) etanamina)	63

2. Inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM).....	63
2.1. Rotenona	63
2.2. Ácido 3-nitropropiónico (3-nitropropionic-acid, NPA)	63
2.3. Antimicina A	64
2.4. Azida sódica (NaN ₃)	64
2.5. Oligomicina	64
3. Reactivos empleados en el cultivo de condrocitos articulares humanos	65
3.1. Colagenasa tipo IV	65
3.2. Tripsina	65
3.3. Penicilina-estreptomicina	66
4. Aislamiento de los complejos mitocondriales	66
4.1. Digitonina	66
5. Tinción de mitocondrias, ADN, óxido nítrico (NO) y lipoproteínas	66
5.1. JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina iodada)	66
5.2. Ioduro de propidio (IP) y ARNasa.....	67
5.3. DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorhídrico)	68
5.4. DAF-FM diacetato (4-amino-5-metilamino- 2',7'-difluorofluoresceína diacetato).....	69
5.5. Oil-Red-O (1-[2,5-dimetil-4-(2,5-dimetilfenilazo)fenilazo]-2-naftol)	69
5.6. Sudán negro B.....	70
6. Valoración de la viabilidad celular	70
6.1. Azul tripán	70
MÉTODOS.....	71
1. Cultivos celulares	71
1.1. Cultivo primario de condrocitos	71
1.2. Cultivo primario de adipocitos	72
1.3. Tratamiento de los condrocitos con diferentes dadores de óxido nítrico (NO)	72
1.4. Tratamiento de los condrocitos con diferentes inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM)	73
2. Medida de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) en condrocitos permeabilizados con digitonina	74
3. Medida de los niveles de óxido nítrico (NO) mediante la reacción de Griess (cuantificación de nitritos).....	76
4. Determinación de los niveles de lactato mediante colorimetría	76
5. Medida de los niveles intracelulares de ATP mediante bioluminiscencia	76
6. Determinación del grado de viabilidad empleando el colorante azul tripán	77
7. Citometría de flujo.....	77
7.1. Determinación de los niveles de despolarización de la membrana mitocondrial (JC-1).....	77
7.2. Determinación del grado de apoptosis tardía (ARNasa e ioduro de propidio (IP))	78
8. Microscopía de fluorescencia	78
8.1. JC-1(5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina iodada)	79
8.2. DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorhídrico)	79
8.3. DAF-FM diacetato (4-amino-5-metilamino- 2',7'-difluorofluoresceína diacetato).....	79
9. Técnicas histológicas.....	80

9.1. Hematoxilina-eosina	80
9.2. Tinción de lípidos	80
9.2.1. Oil-red-O (1-[2,5-dimetil-4-(2,5-dimetilfenilazo)fenilazo]-2-naftol)	80
9.2.2. Sudán negro B.....	81
10. Microscopía electrónica de transmisión (MET)	81
11. Microscopía confocal	82
12. Medida de los niveles de incorporación de glucosa en condrocitos articulares humanos normales y artrósicos (OA)	82
13. Expresión de los receptores de glucosa (GLUTs) en condrocitos articulares humanos normales y artrósicos (OA)	83
13.1. Expresión del ARNm de los receptores de glucosa (GLUTs) por RT-PCR y PCR a tiempo real.....	83
13.2. Análisis proteico de los receptores de glucosa (GLUTs) por western blot	85
14. Análisis estadístico	87
IV. RESULTADOS.....	89
1. EFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO (<i>NO</i>) SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE LOS CONDROCITOS ARTICULARES HUMANOS	91
1.1. Diferencias en la liberación de óxido nítrico (<i>NO</i>) por diferentes dadores.....	91
1.2. Efecto del óxido nítrico (<i>NO</i>) sobre la viabilidad celular de los condrocitos articulares humanos	92
1.3. Estudio morfológico del efecto del óxido nítrico (<i>NO</i>) sobre la viabilidad de los condrocitos articulares humanos.....	96
1.3.1. Análisis celular mediante microscopía óptica de los condrocitos articulares humanos	96
1.3.2. Estudio del núcleo de condrocitos articulares humanos por inmunofluorescencia.....	97
1.3.3. Empleo de técnicas citoquímicas para la caracterización de las vacuolas.....	99
1.3.3.1. Hematoxilina-eosina	99
1.3.3.2. Identificación de lípidos.....	100
1.3.3.2.1. Oil-red-O (1-[2,5-dimetil-4-(2,5-dimetilfenilazo)fenilazo]-2-naftol).....	100
1.3.3.2.2. Sudán negro B	101
1.3.4. Técnicas de microscopía de fluorescencia y microscopía confocal para la caracterización de las vacuolas	102
1.3.4.1. Detección de óxido nítrico gas (<i>NO</i>) mediante DAF-FM diacetato (4-amino-5-metilamino- 2',7'-difluorofluoresceína diacetato).....	103
1.3.4.2. Estudio de la relación de las vacuolas con la mitocondria mediante el empleo de JC-1	106
1.3.5. Estudio de las vacuolas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)	108
2. EFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO (<i>NO</i>) SOBRE LA MITOCONDRIA	115
2.1. Efecto del óxido nítrico (<i>NO</i>) sobre la actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM).....	115

2.2. Medida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) en condrocitos articulares humanos normales y artrósicos (OA). Efecto del óxido nítrico (NO)	117
2.3. Medida de los niveles de ATP intracelular y lactato en condrocitos articulares humanos normales y artrósicos (OA). Efecto del óxido nítrico (NO)	121
2.3.1. Efecto del óxido nítrico (NO) sobre la producción de ATP intracelular y lactato en condrocitos articulares humanos normales	121
2.3.2. Diferencias en los niveles de ATP intracelular y lactato en condrocitos articulares humanos normales y artrósicos (OA).....	122
3. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LA GLUCOSA PARA MODIFICAR LOS EFECTOS DEL ÓXIDO NÍTRICO (NO) SOBRE LOS CONDROCITOS ARTICULARES HUMANOS	124
3.1. Diferencias en la liberación de óxido nítrico (NO) por diferentes dadores en condiciones de privación de glucosa	124
3.2. Incorporación de glucosa en condrocitos articulares humanos normales y artrósicos (OA). Efecto del óxido nítrico (NO)	125
3.2.1. Efecto del óxido nítrico (NO) sobre la incorporación de glucosa en condrocitos normales	125
3.2.2. Diferencias en los niveles de incorporación de glucosa en condrocitos articulares humanos normales y artrósicos (OA).....	126
3.3. Expresión de los receptores de glucosa (GLUTs) en condrocitos articulares humanos normales y artrósicos (OA). Efecto del óxido nítrico (NO).....	127
3.3.1. Efecto del óxido nítrico (NO) sobre la expresión de los GLUTs en condrocitos articulares humanos normales	127
3.3.1.1. Patrón de expresión del ARNm de los GLUTs en condrocitos articulares humanos normales	127
3.3.1.2. Patrón de expresión proteica de los GLUTs en condrocitos articulares humanos.....	130
3.3.2. Patrón de expresión de los GLUTs en condrocitos articulares humanos normales y artrósicos (OA)	131
3.3.2.1. Diferencias en el perfil de expresión del ARNm de los GLUTs en condrocitos articulares humanos normales y artrósicos (OA)	131
3.3.2.2. Diferencias en el perfil de expresión proteica de los GLUTs en condrocitos articulares humanos normales y artrósicos (OA)	132
3.4. Consecuencias de la privación de glucosa sobre el efecto del óxido nítrico (NO) en la viabilidad celular de los condrocitos articulares humanos normales	133
3.5. Influencia de la privación de glucosa sobre la mitocondria en condrocitos articulares humanos	137
3.5.1. Efecto de la glucosa sobre los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) en condrocitos articulares humanos	137
3.5.2. Medida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) en condrocitos normales y artrósicos (OA) en condiciones de privación de glucosa. Efecto del óxido nítrico (NO)	138
3.5.3. Medida de los niveles de producción de ATP intracelular y lactato en condrocitos articulares humanos normales y artrósicos (OA) en condiciones de privación de glucosa. Efecto del óxido nítrico (NO) ...	142

3.5.3.1. Efecto del óxido nítrico (<i>NO</i>) en condiciones de privación de glucosa sobre los niveles de producción de ATP intracelular y lactato en condrocitos articulares humanos normales.....	142
3.5.3.2. Influencia de la glucosa en las diferencias en los niveles de producción de ATP intracelular y lactato en condrocitos articulares humanos normales y artrósicos (OA).....	143
4. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL (CRM) SOBRE LA VIABILIDAD Y EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_m$) DE LOS CONDROCITOS ARTICULARES HUMANOS.....	145
4.1. Diferencias en la liberación de óxido nítrico (<i>NO</i>) por los diferentes inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM)	145
4.2. Efecto de los inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) sobre la viabilidad de los condrocitos articulares humanos.....	146
4.3. Efecto de los inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) sobre el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	150
V. DISCUSIÓN.....	155
1. EFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO (<i>NO</i>) SOBRE LA VIABILIDAD DEL CONDROCITO ARTICULAR HUMANO	157
1.1. Estudio morfológico del efecto del óxido nítrico (<i>NO</i>) sobre la viabilidad de los condrocitos articulares humanos.....	160
2. EFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO (<i>NO</i>) SOBRE LA MITOCONDRIA EN CONDROCITOS ARTICULARES HUMANOS.....	167
3. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LA GLUCOSA PARA MODIFICAR LOS EFECTOS DEL ÓXIDO NÍTRICO (<i>NO</i>) SOBRE LOS CONDROCITOS ARTICULARES HUMANOS	170
4. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL (CRM) SOBRE LOS CONDROCITOS ARTICULARES HUMANOS.....	176
RESUMEN FINAL	178
VI. CONCLUSIONES.....	181
VII. BIBLIOGRAFÍA	185
VIII. ABREVIATURAS.....	219

I. INTRODUCCIÓN

1. EL CARTÍLAGO ARTICULAR HUMANO.-

1.1. Cartílago articular humano normal.

Para que en una articulación los movimientos realizados se produzcan de forma normal y sin dolor, van a estar implicadas una serie de estructuras entre las que destacan, los meniscos, el hueso subcondral, los ligamentos, la cápsula articular y, sobre todo, el cartílago articular hialino. Este tejido forma las superficies de amortiguación de todas las articulaciones sinoviales (Buckwalter *et al.*, 1990) variando en grosor, densidad celular, composición de la matriz y propiedades mecánicas dentro de la misma articulación, y dentro de diferentes especies (Athanasίου *et al.*, 1991). Sin embargo, el cartílago está constituido por los mismos elementos, presenta la misma organización y realiza las mismas funciones (Buckwalter *et al.*, 2005).

El cartílago es un tejido conectivo especializado, avascular, aneural y alinfático, está constituido por dos elementos, un componente celular que son los condrocitos y otro extracelular que es la matriz. Aunque este tipo de tejido generalmente sólo va a tener unos milímetros de grosor es muy llamativa su capacidad para distribuir fuerzas, posee una gran resistencia frente a las fuerzas de compresión, disminuyendo, de esta forma, los picos de estrés sufridos por el hueso subcondral (Mow *et al.*, 1988; Mow *et al.*, 1995). Es un tejido con un nivel bajo de tasa metabólica comparado con otros como puede ser el músculo. Sin embargo, un estudio con detalle de su ultraestructura nos muestra que es un tejido que posee una estructura elaborada y altamente organizada, y que existen complejas interacciones entre los condrocitos y la matriz que hacen que se mantenga el tejido (Buckwalter *et al.*, 2005).

En el hombre encontramos tres tipos de cartílago (Young *et al.*, 2000):

- Fibroso (fibrocartílago). Se localiza en los discos intervertebrales, recubriendo el cóndilo mandibular (en la articulación temporomandibular), así como en los meniscos de la rodilla. Este tipo de cartílago contiene condrocitos que generalmente están encapsulados en la matriz extracelular (MEC) que es parecida a la del cartílago hialino pero con paquetes de fibras de colágeno (COL) tipo I orientados en diferentes direcciones.

- Elástico. Se encuentra en la epiglotis, la laringe, la trompa de Eustaquio o el pabellón auditivo. Su estructura es parecida a la del cartílago hialino ya que tiene una

capa de pericondrio asociada y los condrocitos están rodeados de MEC, pero en ésta hay fibras o láminas elásticas que se van a concentrar en la matriz interterritorial.

- Hialino (articular). Este tipo es el más abundante y se encuentra recubriendo las epífisis óseas en las articulaciones móviles (diartrodiales), de ahí que se le conozca como cartílago articular. Este tipo de cartílago es en el que nos vamos a centrar.

1.1.1. Composición del cartílago articular (hialino).

El cartílago articular hialino contiene únicamente un 2-3% de componente celular (condrocitos), mientras que el resto del volumen de este tejido es MEC (97-98%). A su vez, esta matriz está constituida por un 70-80% de agua y el 20-30% restante va a estar compuesto por COL tipo II (50%), proteoglicanos (PG) (30-35%) y por otras proteínas de matriz que representan el 15-20% restante (Buckwalter *et al.*, 2005) (Figura 1).

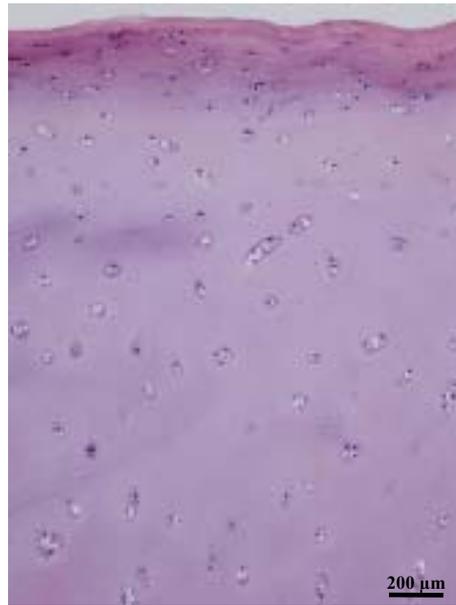


Figura 1.- Corte histológico donde se puede apreciar la composición del cartílago articular humano (Hematoxilina-eosina; de Andrés, 2006).

1.1.1.1. Componente celular (condrocitos).

Los condrocitos son el único tipo celular presente en el cartílago, es una población reducida que además disminuye con la edad. Son células altamente especializadas en la biosíntesis y mantenimiento de los componentes de la MEC (Buckwalter *et al.*, 1990). En el cartílago adulto, en condiciones normales, son capaces de mantener un equilibrio entre los procesos anabólicos y catabólicos (Muir, 1995).

La unidad funcional del cartílago es el condrón, que está formado por el condrocito, la laguna (lugar que ocupa dentro de la matriz cartilaginosa) y la matriz pericelular de glucoproteínas sintetizadas. Los condrocitos de las diferentes capas del cartílago

difieren en tamaño, forma, y probablemente en actividad metabólica (Aydelotte *et al.*, 1992; Aydelotte *et al.*, 1996).

La actividad metabólica de los condrocitos es elevada en fases de crecimiento. En el cartílago maduro la capacidad de síntesis de COL es limitada, sin embargo la de PG no se ve alterada. Su capacidad de división es limitada, en determinados cartílagos adultos se ve como respuesta a agresiones (Fuentes-Boquete *et al.*, 2001).

1.1.1.2. La matriz extracelular (MEC).

La MEC del cartílago articular la forman dos componentes: una fracción líquida y un almacén de macromoléculas estructurales que proporciona al tejido su forma y estabilidad. La interacción entre ambos componentes proporciona al cartílago sus propiedades biomecánicas de rigidez y elasticidad (Mow *et al.*, 1988; Buckwalter *et al.*, 1992).

También podemos diferenciar en la MEC del cartílago adulto tres regiones: una *pericelular* (rica en PG y proteínas no colágenas y colágenas no fibrilares), otra *territorial* (forma el entramado a modo de cápsula del condrón) y la *interterritorial* (es la de mayor volumen, formada por las fibras de COL de mayor diámetro, dispuestas en forma de arcos anclados en la profundidad y que van hacia la superficie) (Figura 2) (Mankin, 1978).

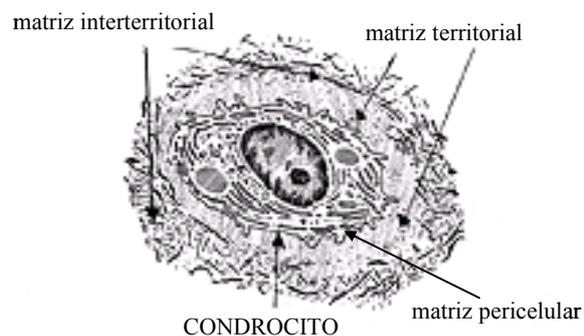


Figura 2.- Regiones de la MEC en función del elemento celular (<http://www.afh.bio.br>).

En cuanto a su composición podemos diferenciar:

- Fracción líquida. El agua representa alrededor del 80% y muestra una distribución desigual dentro del tejido, siendo su concentración más elevada en la superficie y disminuyendo gradualmente según avanzamos en profundidad. Dentro de la matriz del cartílago las moléculas de agua van a estar retenidas por las cargas negativas de los PG, manteniéndose así la elasticidad, flexibilidad y capacidad para reducir el rozamiento y distribución de las presiones, características propias de este tejido (Mankin, 1978).

- Macromoléculas estructurales. Representan el 20-30% del peso total del cartílago.

Forman parte de este grupo los siguientes componentes:

· *Componente fibrilar (COL)*. La red de fibrillas de COL va a constituir el armazón estructural del cartílago y proporciona la estructura de organización para los PG y los condrocitos. Representa el 50% de las macromoléculas estructurales y, a su vez, en el cartílago articular el 90-95% es del tipo II. Estructuralmente está formado por tres cadenas y recibe el nombre de tropocolágeno (Figura 3). De forma minoritaria encontramos COL de los tipos VI, IX, XI, XII y XIV (Goldring, 1997).

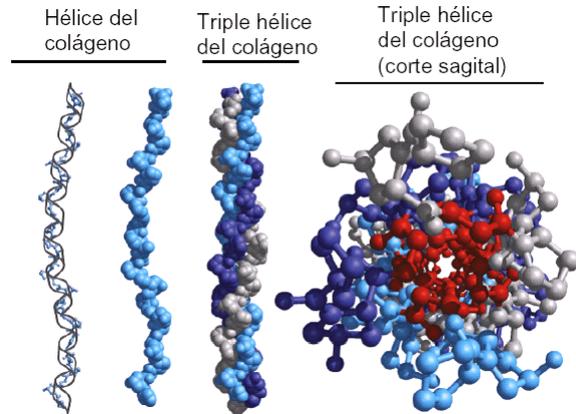


Figura 3.- Estructura del COL. Tres hélices se enrollan entre ellas de forma dextrógira. La molécula de tres cadenas resultante se conoce como tropocolágeno (Lehninger *et al.*, 1999).

· *Componente no fibrilar (PG)*. Son macromoléculas constituidas por un eje lineal proteico al que están unidas cadenas de glucosaminoglicanos (GAG) (largas cadenas de azúcares que se repiten, como el condroitín 4 y 6 sulfato, dermatán y queratán sulfatos), los cuales son altamente hidrófilos (Figura 4). Cada disacárido tiene al menos un grupo carboxilo o sulfato cargado negativamente, por lo que los GAG constituyen largas cadenas de cargas negativas que van a atraer cationes. El ácido hialurónico, que es otro GAG, une los PG a través de proteínas de unión formando agreganos. Los agregados de PG van a ocupar los espacios entre las fibras de COL. Aunque son más abundantes las cadenas largas de PG, existen otras de menor longitud como la decorina o la fibromodulina. La composición de los monómeros de PG cambia con el envejecimiento (Hardingham *et al.*, 1995), además, al menos una parte de estas moléculas se renueva cada 8 días, lo cual nos sugiere la existencia de un sistema de remodelación (Mankin, 1967); esta síntesis aumenta de forma llamativa en el cartílago lesionado, pero el nuevo material sintetizado es en su mayoría fibrocartílago, de modo que funcionalmente no es un sustituto adecuado del cartílago hialino (Coletti *et al.*, 1972).

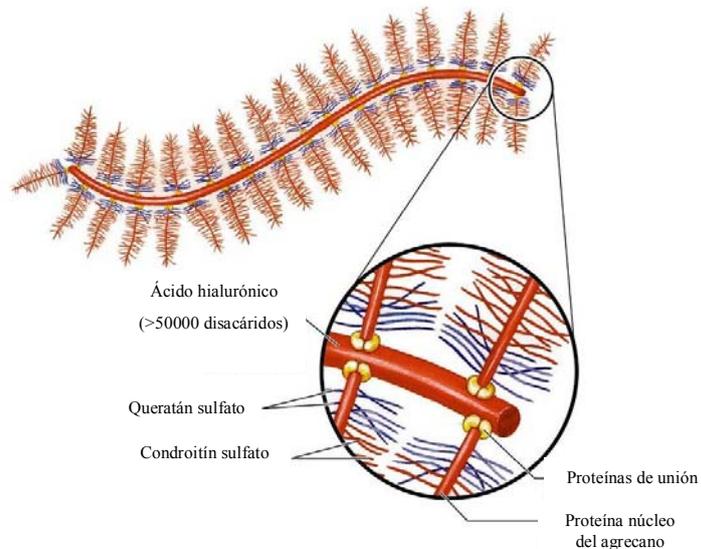


Figura 4.- Representación donde se muestra la estructura de un PG (<http://bifi.unizar.es>).

· *Otros Componentes.* El cartílago articular posee pequeñas cantidades de proteínas en la MEC que no son ni PG ni COL. Estas proteínas interactúan con otras de la matriz. Las mejor estudiadas son la ancorina (participa en las interacciones célula-matriz), la fibronectina (contribuye al mantenimiento de la estructura del cartílago) y la proteína oligomérica de matriz del cartílago (*COMP*, *cartilage oligomeric matrix protein*), proteína que participa en los mecanismos de reparación tisular y regulación del crecimiento celular). En el cartílago también encontramos al menos otras dos proteínas, condronectina y ancorina II, así como lípidos, aunque éstos están presentes en una proporción menor del 1% (Thonar *et al.*, 1999).

1.1.2. Estructura y función del cartílago articular humano normal.

En el cartílago articular podemos diferenciar cuatro zonas, desde la superficie hasta la profundidad, basándonos en cambios en cuanto a su composición, organización y propiedades mecánicas de la MEC, así como variaciones en la morfología, tamaño y actividad de los condrocitos (Thonar *et al.*, 1999). Aunque existen variaciones entre especies, así como entre articulaciones, claramente se pueden distinguir diferentes regiones (Figura 5):

- *Zona I* (superficial, tangencial o de deslizamiento). Los condrocitos son algo más pequeños que en el resto del cartílago y presentan forma aplanada, además se disponen de forma paralela a la superficie articular, estando ésta desprovista de células en su parte más superficial (lámina *splendens*). Las fibras de COL (presentes en alta concentración) son muy finas y también se disponen de forma paralela a la superficie. Esta

organización proporciona al cartílago mayor rigidez y fuerza que la existente en otras zonas del cartílago, de modo que le permite resistir las fuerzas generadas en el uso de la articulación (Roth *et al.*, 1980; Mow *et al.*, 1988; Woo *et al.*, 1988). Las alteraciones de esta zona pueden contribuir al desarrollo de la artrosis (OA) a través de cambios en el comportamiento mecánico del tejido (Guilak *et al.*, 1994).

- *Zona II* (media o transitoria). Esta región representa entre el 40-60% del grosor de este tejido; la morfología y la composición de la matriz es intermedia entre la zona superficial y la profunda, de ahí su nombre. Los condrocitos son algo más grandes y esféricos, aparecen de forma aleatoria tanto individuales como formando grupos. Por otra parte, las fibras de COL se disponen de forma oblicua a través de la MEC.

- *Zona III* (profunda o radial). Los condrocitos son elípticos y más grandes que los de la zona anterior, se disponen en grupos de 2 a 6 células y se encuentran orientados de forma perpendicular a la superficie articular. Las fibras de COL van a seguir la orientación de las columnas de condrocitos y son las de mayor diámetro que existen en todo el tejido, por otra parte es la zona donde son más numerosos los PG y existe menor proporción de agua (Buckwalter *et al.*, 2005).

- *Zona IV* (cartílago calcificado). En esta región los condrocitos son menos numerosos y aparecen esparcidos, y aunque hay algunos necróticos, de forma general son viables (Hunziker, 1992). Siempre se pensó que tenían una actividad metabólica muy baja, la tendencia actual es a creer que juegan un papel en el desarrollo y progresión de la OA (Oegema *et al.*, 1995). El límite entre esta zona y la anterior viene delimitado por el frente de calcificación o *tidemark*.

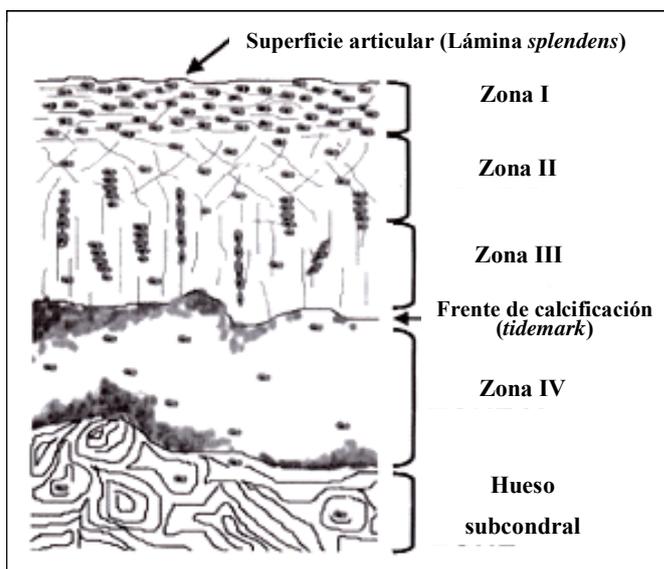


Figura 5.- Esquema donde se muestra la organización en capas que presenta el cartílago articular humano (<http://www.colvet.es>).

En cuanto a la **función** del cartílago, la interdependencia que existe entre los condrocitos y la MEC hace posible, en la mayoría de los casos, el mantenimiento del cartílago articular durante gran parte de la vida (Martin *et al.*, 2000).

El COL situado en las capas superficiales del cartílago adopta una orientación horizontal, las fibras están más compactas y su diámetro es menor. Esta orientación protege al cartílago de la abrasión y permite que se transmitan las fuerzas de compresión desde la superficie hacia los márgenes del cartílago. El contenido de COL disminuye progresivamente desde las capas superficiales a las profundas. En éstas las fibras están más separadas, su diámetro es mayor y se encuentran alineadas de forma vertical. Las fibras de COL se continúan con las fibras de cartílago calcificado, pero no con las del hueso subcondral. El tipo de moléculas que pueden atravesar la matriz y la proporción en la que lo hacen depende de la composición y organización de la MEC (Buckwalter *et al.*, 2005).

Las propiedades mecánicas del cartílago hialino, elasticidad y resistencia a la compresión, existen debido a que los agregados de PG poseen la capacidad de “secuestrar” agua. Las cargas electronegativas de los azúcares sulfatados hacen que las cadenas laterales del monómero se repelan unas a otras y atraigan agua. La asociación de moléculas de COL confiere a estos sistemas fuerza tensional, restringe el movimiento de los agregados de PG y limita la absorción máxima de agua. Debido a que el cartílago es avascular, la difusión de nutrientes e intercambio de productos de desecho se produce por medio del líquido hístico. El líquido extracelular del cartílago articular realiza estos intercambios con el agua y los solutos del líquido sinovial.

En el cartílago articular adulto, el recambio de los componentes de la MEC es bajo comparado con otros tejidos conectivos y su capacidad de reparación es limitada. El exceso de presiones aplicadas en una articulación, así como su inmovilización, reducen su metabolismo y por tanto la síntesis de PG por los condrocitos.

Por tanto, las propiedades funcionales del cartílago articular humano son el resultado de la interacción entre tres moléculas fundamentales: el COL tipo II, los PG y el agua.

Se ha visto que los condrocitos de las diferentes zonas van a responder de diferente forma ante las presiones mecánicas, sugiriendo que el desarrollo y el mantenimiento del cartílago articular normal depende, en parte, de la diferenciación de las diferentes poblaciones fenotípicas de los condrocitos (Buckwalter *et al.*, 2005).

A través de la vida, los condrocitos degradan y sintetizan macromoléculas de la MEC. Los mecanismos que controlan el balance entre las actividades prácticamente no se conoce, pero las citoquinas con efectos catabólicos y anabólicos parecen tener papeles importantes (Lotz *et al.*, 1995; Morales, 1995; Poole, 1995; Trippel, 1995; Martin *et al.*, 2000).

En el cartílago articular normal hay un balance equilibrado entre el anabolismo y el catabolismo (Aigner *et al.*, 2006). En el cartílago adulto siempre hay un desgaste de la MEC, debido tanto a las actividades enzimáticas como al estrés mecánico impuesto a las articulaciones. En circunstancias normales esto es compensado por el recambio de los componentes de la MEC, predominantemente los PG dañados.

El cartílago articular en humanos y animales adultos sufre una serie de cambios asociados a la edad, incluido un descenso en el número de condrocitos (Adams *et al.*, 1998). Además, la degeneración del cartílago articular asociada con la edad puede atribuirse a este descenso en el número de condrocitos, lo que da como resultado un fallo en la regeneración y reparación adecuadas del cartílago. En la línea de esta hipótesis, el descenso en la celularidad del cartílago en relación con la edad del mismo se asocia con un aumento en la fibrilación del cartílago (Stockwell, 1971).

En cuanto a la MEC, tiene lugar un descenso de la hidratación del COL, de la concentración de GAG (especialmente del condroitín sulfato) y, del tamaño y agregación de los PG para formar agreganos (Roughley *et al.*, 1980). Aunque la concentración total de GAG puede no variar mucho con el envejecimiento, la proporción de queratán sulfato y condroitín sulfato se incrementa. Con respecto a éste último, se ha visto que el componente 4-sulfatado decrece mientras que el componente 6-sulfatado aumenta (Maeda *et al.*, 2003). La alteración en la composición y tamaño de los PG aparece como resultando de divisiones proteolíticas que aparecen en todas las edades y no sólo durante el crecimiento y maduración. Las proteínas de enlace también se hallan sujetas a divisiones proteolíticas según la edad avanza, esto provoca la desestabilización del componente PG de la MEC. Entre los cambios del cartílago articular asociados con la edad que pueden llevar a la degeneración de este tejido se incluye el deshilachamiento y ablandamiento de la superficie articular. El resultado de estos cambios dará lugar a una matriz con capacidad reducida para soportar las fuerzas de tensión asociadas al funcionamiento normal de la articulación (Roughley *et al.*, 1980). Estos cambios probablemente son el resultado de un descenso, con la edad, en la capacidad de los condrocitos para mantener y reparar el tejido, manifestándose por un

descenso en la actividad mitótica y sintética, un descenso en la efectividad a la hora de responder a los factores de crecimiento anabólicos y síntesis de agregados más pequeños y menos uniformes, así como proteínas de unión menos funcionales. Algunos autores sugieren que el progresivo envejecimiento del condrocito viene marcado por la expresión de la enzima asociada al envejecimiento β -galactosidasa, por el acortamiento de la longitud de los telómeros del condrocito y la degeneración mitocondrial debida al daño oxidativo provocados por la falta de función del condrocito asociada al envejecimiento (Martin *et al.*, 2002).

1.2. Cartílago articular humano patológico. La artrosis (OA).

El cartílago articular, a pesar de sus pocos milímetros de grosor, es un tejido con una gran resistencia a las presiones y posee una excepcional capacidad para distribuir fuerzas dentro de la articulación, desafortunadamente esta habilidad del cartílago para mantenerse y repararse a sí mismo es limitada y declina con la edad. La degeneración del cartílago articular y cambios asociados en el hueso subcondral dan como resultado el dolor articular y la disfunción que caracterizan a la OA (Buckwalter *et al.*, 2000). Sin embargo, es importante diferenciar entre los cambios que se producen en el cartílago asociados a la edad y los que se producen como consecuencia del proceso artrósico.

Para poder tratar a pacientes afectados de patología articular es necesario comprender como se desarrolla y se produce la degeneración de la articulación, así como es importante familiarizarse con el conocimiento actual de la organización del cartílago articular, las interacciones entre los condrocitos y la MEC que mantienen el tejido, la biomecánica de la matriz y la degeneración tisular que lleva a la OA (Buckwalter *et al.*, 1998a,b).

1.2.1. Composición del cartílago artrósico (OA).

Existen diferencias histológicas importantes del cartílago articular OA respecto al no patológico:

Condrocitos. Los condrocitos, el único componente celular del cartílago articular adulto, son capaces de responder a cambios estructurales en la MEC que le rodea. En los estadios iniciales de la OA está implicado un aumento en la proliferación celular (tiene lugar una multiplicación y migración de los condrocitos formando clones) y la

síntesis de proteínas de matriz, proteinasas y citoquinas en el cartílago. En fases avanzadas, el número de condrocitos se reduce y aumenta el número de lagunas vacías (Blanco *et al.*, 1998c; Hashimoto *et al.*, 1998a; Horton *et al.*, 1998; Kim HA *et al.*, 2000).

Pero la capacidad del condrocito articular adulto para regenerar la arquitectura de la matriz del cartílago normal es limitada y el daño llega a ser irreversible, a menos que el proceso destructivo sea interrumpido (Goldring, 2006).

MEC. Si el catabolismo y el desgaste llegan a ser más fuertes que las actividades anabólicas y la capacidad de síntesis de los condrocitos, la matriz del cartílago degenera y el cartílago de la articulación acaba dañado. Esta degeneración es lo que se conoce como OA. Desde un punto de vista bioquímico, la enfermedad se caracteriza por un desequilibrio entre la síntesis y degradación de las macromoléculas que componen la MEC; por otra parte, sabemos que las propiedades de resistencia al peso que el tejido posee se deben, esencialmente, a la integridad y la estructura de la matriz. Se están utilizando algunos componentes de la MEC, como el condroitín sulfato y el sulfato de glucosamina, con cierto éxito para el tratamiento sintomático de la OA (McAlindon *et al.*, 2000).

Cuando comienza el proceso artrósico, la organización molecular de la MEC es interrumpida o alterada, así como aumenta el contenido de agua (Mankin *et al.*, 1978; Buckwalter *et al.*, 1995). No suelen producirse alteraciones en la red de COL (Blanco *et al.*, 1998c), los monómeros de los PG del cartílago degenerado son menores que aquellos del tejido normal dentro de la misma edad, y tienen una región rica en condroitín sulfato menor y algunas de las moléculas también parecen haber perdido la región de unión al ácido hialurónico. El aumento en la actividad proteolítica parece que está implicada en la degeneración del cartílago (Inerot *et al.*, 1978). El cartílago de pacientes con OA muestra un incremento significativo en la concentración de condroitín-4-sulfato y un descenso significativo en queratán sulfato, con sólo pequeños cambios en la cantidad total de GAG presentes. Gracias al aumento de condroitín sulfato se puede decir que el cartílago está “supersulfatado”, los cambios observados representan un patrón alterado de síntesis más que una degradación selectiva (Mankin *et al.*, 1971).

1.2.2. Estructura y función del cartílago articular humano patológico. La artrosis (OA).

En cuanto a las alteraciones histopatológicas que sufre el cartílago durante la OA, son de destacar las áreas de degeneración del cartílago articular con pérdida de volumen y fragmentación. Además, en el resto de la articulación se aprecia en grado variable esclerosis del hueso subcondral con quistes y aumento de la vascularización, proliferación osteofítica marginal, sinovitis leve con engrosamiento y fibrosis de cápsula articular (Figura 6).

La degeneración articular implica a todos los tejidos que forman parte de la articulación sinovial; sin embargo, los cambios más destacados consisten en la pérdida de cartílago articular, la remodelación del hueso subcondral y la formación de osteofitos (Buckwalter *et al.*, 1995; Schiller, 1995).

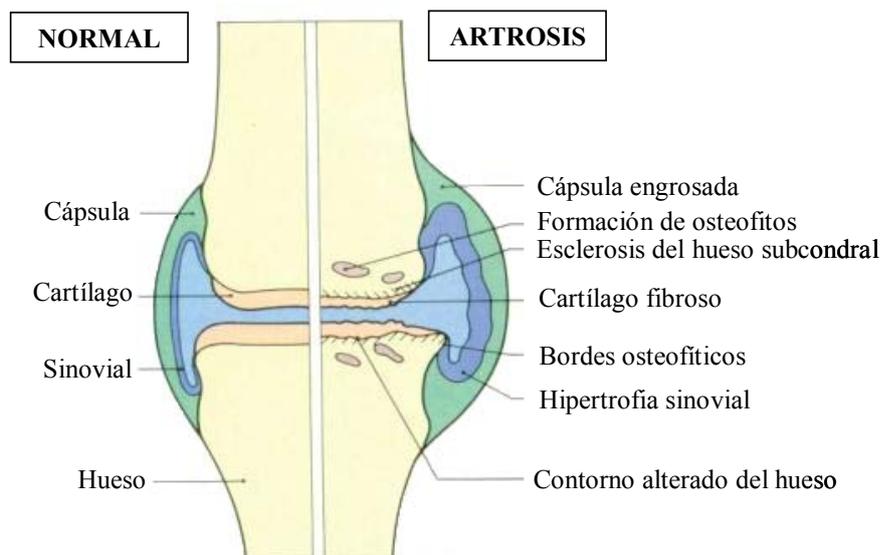


Figura 6.- Representación de una rodilla donde se muestran los componentes de una articulación normal (a la izquierda) y las alteraciones encontradas en los mismos en un proceso artrósico (a la derecha) (<http://www.arthritisylupus.com>).

Aún no se conocen muchos de los mecanismos responsables de la pérdida progresiva del cartílago articular en la enfermedad articular degenerativa, pero lo que se sabe es que el proceso puede “subdividirse” en tres etapas que se superponen: daño o alteración de la MEC, respuesta del condrocito al daño tisular y, por último, disminución de la respuesta sintética del condrocito y pérdida progresiva del tejido (Buckwalter *et al.*, 1995).

1.2.2.1. Mecanismos de destrucción y reparación del cartílago.

El mantenimiento de las superficies articulares en respuesta al uso de la mismas requiere un recambio continuo de los componentes de la MEC. A pesar de que a primera vista el cartílago parece un tejido estático, existe un continuo recambio y remodelación de sus componentes (Aigner *et al.*, 2006). El único componente celular del cartílago, los condrocitos, disponen de toda la maquinaria enzimática necesaria tanto para el metabolismo energético, como para la biosíntesis y degradación de las moléculas de la MEC. Para ello deben percibir los cambios producidos en la composición de la matriz, ya sea por la degradación de macromoléculas como cambios en la demanda por el uso articular.

En el cartílago adulto, debido a las actividades enzimáticas y el estrés mecánico impuesto a las articulaciones, siempre va a haber daño en las moléculas que forman la MEC. En circunstancias normales, esta alteración va a estar compensada por el recambio que existe en los componentes de la matriz, sobre todo en los PG dañados. Además, en el cartílago adulto normal existe un equilibrio entre los procesos anabólicos (síntesis de MEC) y catabólicos (degradación y pérdida de matriz). Si el catabolismo y el desgaste molecular superan las actividades anabólicas de los condrocitos, la MEC degenera y el cartílago articular resulta dañado. Esta degeneración es lo que se conoce como OA (Aigner *et al.*, 2006).

El desarrollo de la OA está fuertemente relacionado con el envejecimiento. Además de los cambios que tienen lugar en la MEC, como es una menor cantidad de agua y de largos agregados de PG y un aumento en la concentración de decorina, se produce una acumulación de productos que hacen que el tejido sea más frágil (Verzijl *et al.*, 2002). Los cambios en el condrocito relacionados con la edad dan como resultado una célula menos sensible a la estimulación con factores de crecimiento (Loeser *et al.*, 2003). Si no existe suficiente actividad de este tipo en un cartílago envejecido, entonces el tejido no generará las señales necesarias para neutralizar los factores catabólicos y poner en marcha la síntesis de MEC (Loeser, 2006).

Aunque la edad es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la OA, esta enfermedad no es simplemente el resultado del envejecimiento y el uso mecánico de la articulación, ya que los cambios observados en el cartílago artrósico difieren de los observados en el cartílago de los ancianos.

Mecanismos de destrucción del cartílago.

Dentro de este grupo tenemos: mecanismos de desgaste a través de factores mecánicos y mecanismos de degradación del cartílago articular a través de factores bioquímicos.

Factores mecánicos. La tensión repetitiva sobre la MEC podría causar la disrupción de las fibras de COL y la malla de PG. Aunque la fatiga mecánica puede producir el fallo por tracción de las fibras de COL, se ha observado que el daño acumulado en el tejido se debe a los cambios profundos que la edad y la enfermedad introducen en la población de PG (Urban *et al.*, 1989).

Factores bioquímicos. La degradación de la MEC del cartílago articular está producida fundamentalmente por cuatro familias de enzimas proteasas originadas en el propio condrocito: metaloproteasas y serín-proteasas (que actúan a pH neutro y son, por tanto, las responsables de la degradación de la MEC) y cisteín-proteasas y aspartato-proteasas (que actúan a pH ácido y son responsables de la actividad proteolítica intracelular) (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993; Mauch *et al.*, 1994; Birkedal-Hansen, 1995). Dentro de estos factores también encontramos al óxido nítrico (*Nitric oxide, NO*) y a las prostaglandinas, con efectos negativos sobre la supervivencia y proliferación de los condrocitos, y contribución en la degradación de la MEC.

Las citoquinas juegan un papel crucial dentro de los procesos de degradación del cartílago articular. Son proteínas de bajo peso molecular que actúan como mediadores solubles y cuya función es la comunicación intercelular. Las citoquinas que hasta el momento se ha demostrado que son sintetizadas por los condrocitos e inducen respuestas catabólicas en el cartílago son la interleuquina (IL)-1, el factor de necrosis tumoral α (*Tumor necrosis factor α , TNF- α*), la IL-6, la IL-8, la IL-15, la IL-17, el interferón γ (IFN- γ) y el factor inhibidor de la leucemia (*leucemia inhibitory factor, LIF*) (Pettipher *et al.*, 1986; Morales *et al.*, 1989; Goldring, 1993; Pelletier *et al.*, 1993).

Mecanismos de reparación del cartílago.

El programa anabólico del condrocito está constituido por factores de crecimiento, citoquinas antiinflamatorias e inhibidores de las proteasas, el cual va a estar encargado de favorecer la proliferación celular y la síntesis de MEC (Blanco, 1999b).

Como hemos visto en el metabolismo del cartílago lo importante es el equilibrio entre los factores anabólicos y los catabólicos. Un ejemplo muy claro lo encontramos con las citoquinas (Figura 7).

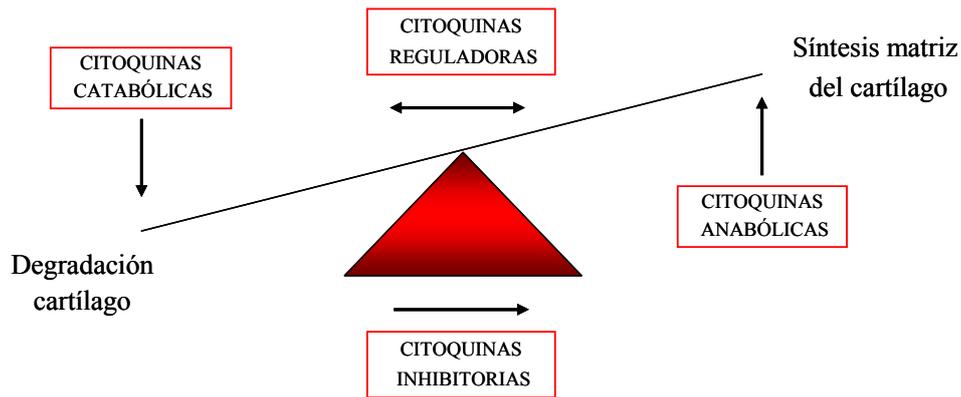


Figura 7.- Balance de las citoquinas en la OA. En una articulación artrósica están presentes tanto las citoquinas anabólicas como las catabólicas, pero es el balance entre estas citoquinas y factores anabólicos lo que va a determinar la severidad del daño artrósico (Goldring, 2000).

En el caso de la OA, el equilibrio va a estar a favor del programa catabólico, lo cual va a venir dado por un fallo en el sistema de reparación del cartílago. En los estadios iniciales del proceso artrósico se produce una etapa hipertrófica con un aumento de síntesis en la MEC, inicialmente se vio en modelos caninos tras seccionar el ligamento cruzado (Adams *et al.*, 1991; Van den Berg *et al.*, 1999) y posteriormente en modelos murinos. En esta fase se observa un aumento en los factores de crecimiento, pero aún es una incógnita si es un intento de reparación del cartílago lesionado o este proceso tiene algo que ver con la etiopatogenia del proceso artrósico.

Posteriormente encontramos un recambio acelerado de los componentes de la MEC y, finalmente, encontramos una reducción acusada de los PG, para terminar con la pérdida de la estructura de la red de COL. En esta fase ya se pueden observar los daños focales del cartílago de forma macroscópica (Van den Berg, 1995; Van den Berg *et al.*, 1999). Esta etapa se caracteriza por una activación del tejido sinovial, de modo que los fibroblastos y macrófagos presentes en este tejido van a sintetizar cantidades importantes de $IL-1\beta$ y en menor medida de $TNF-\alpha$. En estadios más avanzados del proceso artrósico se liberan pequeños fragmentos de cartílago y cristales, que a su vez hacen que tanto los fibroblastos como los macrófagos sinteticen citoquinas proinflamatorias que difunden al líquido sinovial, estimulando receptores de modo que se liberan más citoquinas inflamatorias y proteasas, que hacen que se continúe el proceso de degradación del cartílago articular (Benito *et al.*, 2000).

El proceso de reparación del cartílago consiste en una proliferación condrocitaria, que *in vivo* es limitada, excepto cuando se produce una disrupción en las estructuras

normales del cartílago, así como de los componentes de la MEC (Franchimont *et al.*, 1991). El proceso de reparación depende en último término de un conjunto de factores de crecimiento entre los que cabe destacar: el factor de crecimiento similar a la insulina (*Insulin growth factor, IGF*), el factor de crecimiento fibroblástico (*Basic fibroblast growth factor, bFGF*), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (*Platelet-derived growth factor, PDGF*), el factor transformador del crecimiento β (*Transforming growth factor-beta, TGF- β*), las proteínas morfogenéticas del hueso (*Bone morphogenetic proteins, BMPs*) y las proteínas morfogenéticas derivadas del cartílago (*Cartilage-derived morphogenetics proteins, CDMPs*) (Iannone *et al.*, 2003).

1.2.2.2. La artrosis (OA).

A diferencia de otras enfermedades, la OA tiene que ser descrita como un conjunto heterogéneo de patologías, las cuales presentan unas manifestaciones clínicas similares, así como cambios patológicos y radiológicos comunes (Blanco *et al.*, 1998c). También se ha definido como un desorden lentamente progresivo, mono o poliarticular, de causa desconocida y oscura etiopatogénesis (Mankin *et al.*, 1986).

1.2.2.2.1. Definición y clasificación.

A la hora de definir la OA hay que tener en cuenta diferentes puntos de vista (Arden *et al.*, 2006). La OA es una artropatía degenerativa que se produce por alteración de las propiedades del cartílago y secundariamente del hueso subcondral y el tejido sinovial, y a su vez es la expresión de un grupo heterogéneo de patologías de etiología multifactorial con manifestaciones biológicas, morfológicas y clínicas similares. Clínicamente se caracteriza por dolor articular, rigidez, limitación de la función, crepitación y derrame articular ocasional, con grados variables de inflamación local, sin repercusión sistémica. Desde un punto de vista histopatológico se caracteriza por la existencia de áreas irregulares de degeneración cartilaginosa, más evidentes en la zona de presión, con esclerosis del hueso adyacente, quistes óseos subcondrales, osteofitos marginales, aumento del flujo sanguíneo metafisario y grados variables de sinovitis. Y, desde un punto de vista bioquímico, la enfermedad se caracteriza por una disminución del número de condrocitos y un desequilibrio entre la síntesis y degradación de las macromoléculas que componen la MEC.

El hecho de que la OA sea considerada el resultado final de varias enfermedades ha conllevado varios intentos de clasificación. En primer lugar, encontramos una clasificación basada en un *criterio anatómico*, pudiendo así diferenciar la OA de cadera, la de rodilla, la de manos,... Por otro lado, si atendemos a un *criterio etiológico*, podemos diferenciar una OA primaria o idiopática, es decir, no se conocen factores determinantes que provoquen la enfermedad, y una OA secundaria, donde si encontramos factores definidos que influyen en su etiología, pudiendo ser estos factores traumáticos, congénitos, metabólicos, inflamatorios, neurológicos y vasculares (Buckwalter *et al.*, 2005). Por último, existe una tercera clasificación que va a combinar ambos criterios, y aunque es la más aceptada, tampoco va a tener en cuenta todas las posibilidades dentro de la manifestación de esta enfermedad (Tabla 1).

Tabla 1.- Clasificación actualmente más aceptada de la OA basada tanto en criterios anatómicos como etiológicos.

CLASIFICACIÓN DE LA ARTROSIS			
IDIOPÁTICA	LOCALIZADA	Manos	
		Pies	
		Rodillas	
		Caderas	
		Columna	
		Otras localizaciones	
	GENERALIZADA (más de 3 articulaciones)	Articulaciones pequeñas y columna	
		Articulaciones grandes y columna	
		Míxta	
SECUNDARIA	ENFERMEDADES CONGÉNITAS O DEL DESARROLLO	LOCALIZADA	Enfermedades de la cadera
			Factores mecánicos o locales
		GENERALIZADA	Displasias óseas
			Enfermedades metabólicas
	ENFERMEDADES POR DEPÓSITO DE CALCIO	Depósito de pirofosfato cálcico	
		Artropatía por hidroxapatita	
		Artropatía destructiva	
	POSTRAUMÁTICA		
	OTRAS ENFERMEDADES DEL HUESO Y ARTICULACIÓN		
	OTRAS ENFERMEDADES	Endocrinas	
		Artropatía neuropática	
		Miscelánea	

Debido a la gran heterogeneidad encontrada en las enfermedades clasificadas dentro de la OA, hasta ahora ha sido muy difícil su investigación, ya que es lógico predecir la gran disparidad encontrada en los resultados.

El Colegio Americano de Reumatología (*American Collage of Rheumatology, ACR*) se propuso establecer un sistema de clasificación para la OA (Altman, 1991), la evolución en el desarrollo de estos sistemas de clasificación ha sido lento ya que no existen manifestaciones específicas de esta enfermedad. Hasta ahora sólo se han establecido los criterios clínicos en el caso de la cadera, rodilla y manos.

Dentro del proceso artrósico también pueden diferenciarse diversas **etapas**:

- *Estadio I* (destrucción del cartílago): donde se produce la destrucción proteolítica de la matriz del cartílago.

- *Estadio II* (inflamación de la membrana sinovial): tiene lugar la fibrilación y erosión de la superficie del cartílago. Se liberan productos de degradación en el líquido sinovial.

- *Estadio III* (remodelación del hueso subcondral): las células sinoviales ingieren los productos de degradación. Se producen proteasas y citoquinas inflamatorias.

De forma más exacta en el proceso artrósico pueden distinguirse, mediante criterio histopatológico, diferentes grados de afectación de la enfermedad (Pritzker *et al.*, 2006):

- *Grado 0* (superficie y morfología del cartílago intactas): la MEC muestra una arquitectura normal, las células están intactas y con la orientación adecuada.

- *Grado 1* (superficie intacta): la zona superficial de la MEC permanece intacta, fibrilación superficial, condensación superficial de la MEC focal, existen células muertas, hay proliferación, hipertrofia.

- *Grado 2* (superficie discontinua): además de lo incluido en el grado anterior, existe más discontinuidad en la MEC a nivel superficial, desorientación de las columnas de condrocitos.

- *Grado 3* (fisuras verticales): además de lo incluido en el grado anterior, aparecen fisuras verticales ramificadas en la zona media del tejido, formación de nuevo COL, aparecen células muertas, también se dan procesos de regeneración, hipertrofia.

- *Grado 4* (erosión): pérdida de la MEC del cartílago, se produce descamación de la capa superficial, formación de quistes en la zona media y pérdida de la MEC en las zonas superficial y media.

- *Grado 5* (desnudez): en la superficie encontramos el hueso esclerótico o tejido de reparación en el que se incluye fibrocartilago dentro de la superficie desnuda. Existen microfracturas en la superficie del hueso con reparación limitada.

- *Grado 6* (deformación): se produce la remodelación del hueso, no únicamente formación de osteofitos. Se incluyen microfracturas con reparación fibrocartilaginosa y ósea extendidas sobre la superficie previa.

1.2.2.2.2. Epidemiología. Influencia socioeconómica.

La OA es la patología articular más común y está entre los problemas de salud más frecuentes de la gente de mediana y avanzada edad (Simon, 1999; Leigh *et al.*, 2001; Brooks, 2002; Reginster, 2002). La prevalencia de la OA aumenta con la edad y tiene gran impacto sobre la sociedad porque es la principal causa de incapacidad, de ahí que se le haya dado tanta importancia y se haya convertido en uno de los principales focos de estudio. Hay tres aspectos esenciales a tener en cuenta en cuanto al impacto de la OA en el sistema sanitario y en los propios pacientes: la prevalencia de la OA es muy alta actualmente y va en ascenso debido al envejecimiento de la población, conlleva una importante carga económica y reduce de manera considerable la calidad de vida de los pacientes que sufren la enfermedad de manera persistente (Reginster, 2002).

Existe una fuerte correlación entre la edad y el aumento en la incidencia de la OA, de modo que se la considera una patología relacionada con la edad. Pero, de igual modo que otras patologías de este grupo, la OA no es una consecuencia inevitable de la edad, sino que ésta es uno de los factores de riesgo para padecerla.

La OA es la artropatía más frecuente ya que más del 70% de los mayores de 50 años muestran signos radiológicos de OA en alguna localización, es además, la causa más común de incapacidad en personas de edad avanzada (Espallargues *et al.*, 1996).

Existen numerosos abordajes en cuanto al estudio epidemiológico de la OA. Es esencial que tanto investigadores como observadores tengan en cuenta toda la complejidad que conlleva esta patología a la hora de emitir juicios válidos, sobre todo a la hora de comparar los resultados con otros estudios publicados. El caso más llamativo es el de la propia definición de la OA, ya que aparecen problemas a la hora de seleccionar individuos, acotar la localización de la OA o incluso las edades de los pacientes (Spector *et al.*, 1994).

Existen numerosos factores que afectan al desarrollo de la OA: la edad, la predisposición genética, los desórdenes hormonales y metabólicos, la inflamación y las alteraciones inmunológicas (Buckwalter *et al.*, 2005).

1.2.2.2.3. Tratamiento de la artrosis (OA).

El tratamiento de la OA incluye la aplicación conjunta tanto de medidas terapéuticas no farmacológicas como farmacológicas. Dentro del primer grupo encontramos el ejercicio, la descarga de la articulación y el control del peso, todo lo cual lleva a un alivio sintomático de la enfermedad.

Existen dos claros objetivos terapéuticos en el tratamiento de la OA, uno focalizado en modificar la sintomatología de la OA, de modo que disminuya el dolor, que se reduzca la inflamación, así como intentar recuperar la movilidad de las articulaciones; y, por otro lado, está el objetivo centrado en modificar la estructura y la evolución de la OA, para lo cual hay que mantener el espacio articular.

Dentro del tratamiento farmacológico, los principales medicamentos empleados son: antiinflamatorios no esteroideos (AINE), analgésicos, *SYSADOA* (*symptomatic slow-acting drug for osteoarthritis*) e infiltraciones de esteroides y ácido hialurónico.

De forma más concreta, dentro de los fármacos selectivos para el tratamiento de la OA encontramos dos grupos:

- *SYSADOA*. Actúan sobre los síntomas de la enfermedad (dolor e impotencia) sin modificar los tejidos articulares.

- *DMOAD* (*disease modifying osteoarthritis drugs*). Interfieren en la progresión de los cambios articulares, pueden tener o no otros efectos sobre los síntomas y su registro requiere la demostración a largo plazo de este efecto (Altman *et al.*, 1998).

2. METABOLISMO DEL CARTÍLAGO ARTICULAR.-

El cartilago articular es diferente a otros tejidos en que sus células, los condrocitos, consumen mucho menos oxígeno molecular (O₂) que la mayoría de los demás tipos celulares (Oegema *et al.*, 1986; Stockwell, 1983). Los condrocitos consiguen la energía principalmente a través de la glucólisis, formalmente llamada vía de Embden-Meyerhof-Parnas, la cual no requiere O₂ (Stockwell, 1979; Otte, 1991; Lee *et al.*, 1997). La forma en que estas células utilizan el O₂ aún no está muy clara, pero los niveles en

los cuales está presente en el cartílago afectan el funcionamiento celular. Aunque los condrocitos pueden sobrevivir muchos días sin O₂ (Grimshaw *et al.*, 2000), a tensiones bajas de dicho gas (<5%) los niveles de síntesis de MEC y producción energética caen bruscamente dependiendo de la tensión de O₂ (Lee *et al.*, 1997; Grimshaw *et al.*, 2000).

Sin embargo, estas células contienen mitocondrias (Yamamoto *et al.*, 1988) y poseen enzimas oxidativas mitocondriales activas (Sampson *et al.*, 1986). De esta forma el metabolismo aerobio también puede tener lugar (Spencer *et al.*, 1990).

Los condrocitos están bien adaptados para mantener su función de síntesis con un mínimo aporte de nutrientes y un bajo consumo de O₂, dadas las condiciones del cartílago. La energía necesaria para su actividad de síntesis proviene de la metabolización de glucosa por glucólisis anaerobia. Cuando esta vía queda desbordada, los condrocitos utilizan la vía oxidativa (aerobia), utilizando la MEC adyacente para su combustión.

Se conoce poco acerca de las tensiones de O₂ dentro del cartílago articular. Este tejido es avascular, de modo que los nutrientes, incluido el O₂, son proporcionados a partir de las fuentes que le rodean, principalmente del líquido sinovial. La tensión de O₂ cae con la distancia a la superficie articular, y el gradiente depende del balance entre la tasa de transporte de este gas a través del cartílago y el índice de consumo por las células. Las únicas medidas consideradas hasta ahora son *in vitro* (Silver, 1975; Kellner *et al.*, 2002), donde se ha encontrado que los niveles de O₂ caen bruscamente con la distancia desde la superficie articular, siendo los niveles en el centro 1-2,5%. Basado en estas medidas, generalmente se considera que el cartílago es un tejido hipóxico y que la tensión de O₂ en la capa profunda es de ~1% (Grimshaw *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2004). Sin embargo, en vista del efecto inhibitorio que tienen las bajas tensiones de O₂ sobre el metabolismo de los condrocitos y en la síntesis de MEC (Lee *et al.*, 1997; Grimshaw *et al.*, 2000), es bastante sorprendente que estos niveles tan bajos de O₂ existan *in vivo*.

En el cartílago articular se dan efectos que van a tener una gran importancia en las rutas metabólicas, como son el **Efecto Crabtree** (fermentación bajo condiciones totalmente aerobias), el **Efecto Pasteur Clásico** (disminución de la fermentación en presencia de O₂, o lo que es lo mismo, inhibición de la fermentación por la respiración), siendo estos efectos contrapuestos (Otte, 1991); y por último, el **Efecto Pasteur negativo** (cuando hay un descenso en los niveles de O₂ se produce una disminución en la tasa de glucólisis) (Lee *et al.*, 1997).

En el cartílago articular tratado con un medio de cultivo que contiene simplemente sales, la glucólisis tiene lugar rápidamente bajo condiciones aerobias pero es fuertemente inhibida en condiciones de anoxia (Lee *et al.*, 1997). Krebs fue el primero en acuñar la expresión efecto Pasteur negativo para describir la situación en la que se suprime la rotura de carbohidratos bajo condiciones de anoxia (Krebs, 1972).

En esta respuesta a los ambientes bajos de O₂, el cartílago contrasta con lo que ocurre en el fibrocartílago de los discos intervertebrales, donde tanto el consumo de O₂ como la producción de lactato aumentan en condiciones de hipoxia (Holm *et al.*, 1981).

El lactato es el producto final principal del metabolismo externo de la glucosa del cartílago en condiciones de aerobiosis. Cuando el cartílago aerobio es suplementado con glucosa externa se metaboliza muy poco carbono de fuentes endógenas a través de la glucólisis. Incluso con O₂ disponible, una fracción insignificante de las sustancias reductoras generadas mediante la vía glucolítica se usan en cualquier otra reacción que no sea la reducción del piruvato (efecto Crabtree). Esto junto con el notable bajo consumo de O₂ por célula en cartílago recién aislado (Stockwell, 1983) limita el posible papel de la fosforilación oxidativa como una posible fuente de energía (Lee *et al.*, 1997). La existencia de un efecto Pasteur negativo *in vivo* puede hacer a los condrocitos especialmente vulnerables a cualquier reducción en el suministro de O₂, incluso cuando se produce de manera reducida o localizada como es el caso de una articulación estática (Lee *et al.*, 1997).

Los nutrientes y el O₂, esenciales para el mantenimiento del cartílago, van a provenir del líquido sinovial. El **tejido sinovial** está compuesto por una capa interna (*intima*) y una capa profunda (*subintima*). Dentro de la primera capa hay tres tipos de líneas celulares sinoviales que se superponen unas a otras en dos o tres capas: macrófagos, fibroblastos o precursores indiferenciados de la forma 2. La capa profunda está compuesta por grasa, fibras o tejido areolar (Ge *et al.*, 2006). La capa de células sinoviales que cubre la articulación típicamente es de dos células de grosor y carece de membrana basal. Esta capa tiene 5 funciones esenciales: prevenir la formación de adhesiones con la superficie articular mediante la formación de *villi*, producir el líquido sinovial esencial para la lubricación de las superficies articulares, proporcionar los nutrientes necesarios para el metabolismo de los condrocitos, ser parte del sistema inmunitario que responde ante moléculas extrañas y despejar partículas indeseables con un intrincado sistema de capilares y vasos linfáticos (Dewire *et al.*, 2001). El líquido sinovial, un líquido claro y viscoso, es un ultrafiltrado de plasma producido por los

fibroblastos en el tejido sinovial. En las articulaciones humanas normales hay entre 0,2 y 0,3 ml de líquido sinovial, incluyéndose tanto el líquido como los componentes celulares. El líquido sinovial contiene normalmente de 60 a 200 células mononucleares por milímetro. Excepto por el 95% que es agua, también contiene solutos del plasma, proteínas, GAG, proteasas y fosfatasa alcalina (Ge *et al.*, 2006). Bajo condiciones normales, existe un equilibrio entre el líquido sinovial y el suero, aunque la concentración de solutos en el líquido sinovial es diferente a la encontrada en el plasma. La presencia de ácido hialurónico y lubricina diferencia al líquido sinovial del plasma y contribuye a su viscosidad (Dewire *et al.*, 2001).

Respecto al aporte de O₂ y otros nutrientes al cartílago, no hay dudas de que éstos difunden desde el líquido sinovial, como ha sido demostrado hace bastante tiempo tanto *in vitro* como *in vivo* (Ingelmark, 1950; McKibbin *et al.*, 1966; Honner *et al.*, 1971). Pero una cuestión muy importante es si el O₂ también puede ser suministrado por el hueso subcondral, ya que hay muchas evidencias de que es una importante fuente de nutrientes para el cartílago inmaduro (Hodge *et al.*, 1969; Ogata *et al.*, 1981) pero existe mucha controversia de que sea así para el tejido maduro.

2.1. Transporte de glucosa.

La **D-Glucosa** es el principal combustible de la mayoría de los organismos y ocupa una posición central en el metabolismo (Figura 8). La glucosa no es sólo un combustible excelente sino un precursor muy versátil, capaz de suministrar una gran cantidad de intermediarios metabólicos, que son materiales de partida necesarios para reacciones biosintéticas.

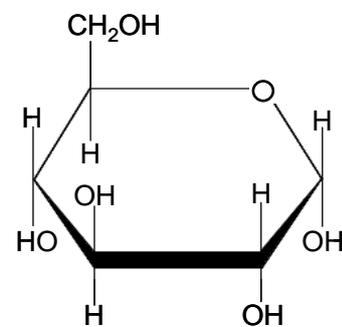


Figura 8.- Fórmula de perspectiva de Haworth de la hexosa D-glucosa (Lehninger *et al.*, 1999).

El transporte facilitado de glucosa a través de la membrana del condrocito representa la primera barrera en el metabolismo de la glucosa y es esencial para la integridad funcional de las articulaciones (Shikhman *et al.*, 2001b; Mobasher *et al.*, 2002b). Para su ingreso, requiere una proteína transportadora de la membrana celular. Se han descrito dos sistemas de transporte de glucosa y de otros monosacáridos: los transportadores de sodio y glucosa llamados SGLTs (*sodium-glucose transporters*) y los transportadores de glucosa llamados GLUTs (*glucosa transporters*).

La glucosa es la fuente principal de energía para los condrocitos durante la condrogénesis, en el crecimiento embrionario y el desarrollo fetal (Macheda *et al.*, 2002; Mobasher *et al.*, 2002b) y, es vital para los condrocitos articulares y los de la placa de crecimiento durante el desarrollo del esqueleto postnatal (Wang *et al.*, 1999; Ohara *et al.*, 2001). Asimismo, el transporte de glucosa a través del cartílago articular a los condrocitos es esencial para el crecimiento, desarrollo, mantenimiento e integridad estructural de la articulación (Wang *et al.*, 1999). Además, el suplemento regular y transporte de niveles fisiológicos de glucosa son críticos para la viabilidad del condrocito y en la síntesis de MEC como precursor de los GAG (Mobasher *et al.*, 2002b).

La familia de facilitadores de transporte GLUT/SLC2A cataliza la entrada de azúcares como la glucosa en las células de mamífero (Wood *et al.*, 2003). A esta familia pertenecen alrededor de una docena de miembros, que han sido identificados en base a la similitud en sus secuencias (Joost *et al.*, 2001). La mayoría de los miembros de los GLUTs transportan glucosa, con la excepción del GLUT-5, el cual transporta fructosa. Estas proteínas se expresan específicamente dependiendo de la célula y el tejido, y muestran diferentes cinética y propiedades reguladoras que reflejan sus papeles funcionales (Mobasher *et al.*, 2002a).

El GLUT-1 es ubicuo en cuanto a su expresión y facilita el transporte basal de glucosa en muchas células (Mueckler, 1994; Mueckler *et al.*, 1997). De hecho, el GLUT-1 es el GLUT expresado de forma dominante en eritrocitos (Zhang *et al.*, 1998) y células endoteliales (Cornford *et al.*, 1998). El GLUT-2 media la incorporación de glucosa en hepatocitos (Lachaal *et al.*, 2000) y células β -pancreáticas (Sweet *et al.*, 1997). El GLUT-3 se expresa predominantemente en neuronas (Maher *et al.*, 1996) y plaquetas (Sorbara *et al.*, 1997). Por otra parte, el GLUT-4 se expresa casi exclusivamente en tejidos sensibles a la insulina como es el músculo (Mora *et al.*, 2000) y el tejido adiposo (Kanzaki *et al.*, 2000). El GLUT-8 se expresa fundamentalmente en testículos (Doege *et al.*, 2000a) y el GLUT-9 fue detectado en bazo, leucocitos periféricos y cerebro (Doege *et al.*, 2000b). El GLUT-5, el cual inicialmente se pensaba que era un transportador de glucosa, finalmente se identificó como un transportador de fructosa (Darakhshan *et al.*, 1998).

La distribución de los transportadores de glucosa en los tejidos no es constante a través del desarrollo (Santalucía *et al.*, 1992). Grandes niveles de GLUT-1 y GLUT-3 están presentes en un amplio rango de tejidos fetales, estando la expresión bastante

disminuida después del nacimiento en muchos tipos celulares. También hay grandes cantidades de proteínas de estos transportadores en embriones de ratones en preimplantación, debido a que la glucosa es el principal sustrato consumido (Pantaleón *et al.*, 1998; Pantaleón *et al.*, 2001). Hay estudios que sugieren que tanto el GLUT-1 como el GLUT-9 están presentes en los condrocitos derivados de cartílago articular humano completamente desarrollado (Shikhman *et al.*, 2001b; Mobasher *et al.*, 2002a; Richardson *et al.*, 2003). La expresión de estas isoformas de GLUTs puede ser una adaptación bioenergética importante para los condrocitos en la matriz extracelular del cartílago en desarrollo (Mobasher *et al.*, 2005).

La glucosa también es muy importante en el cartílago maduro debido a su falta de vascularización y la naturaleza altamente glucolítica del tejido, una situación aún exacerbada por las bajas tensiones de O₂ y la glicólisis anaerobia realizada por los condrocitos (Otte, 1991; Mobasher *et al.*, 2002b; Rajpurohit *et al.*, 2002). Además, incluso pequeños cambios en la concentración de glucosa en el microambiente extracelular de los condrocitos pueden perjudicar las actividades anabólicas y catabólicas (Shikhman *et al.*, 2001b; Mobasher *et al.*, 2002b).

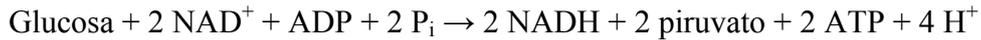
En condrocitos, los GLUTs se saturan con concentraciones de glucosa mayores de 1 mmol/L (Wilkins *et al.*, 2002).

2.2. La oxidación de la glucosa. Importancia de la glucólisis en el cartílago.

La **glucólisis**, también denominada glicólisis o ruta de Embden-Meyerhof, es la secuencia metabólica en la que se oxida la glucosa. Consiste en nueve reacciones enzimáticas que producen dos moléculas de piruvato y dos equivalentes reducidos de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), los que, al introducirse en la cadena respiratoria mitocondrial, producirán cuatro moléculas de adenosín trifosfato (ATP).

Cuando hay ausencia de O₂, la glucólisis es la única vía que produce ATP en las células animales. Los organismos primitivos se originaron en un mundo cuya atmósfera carecía de O₂ y, por esto, la glucólisis se considera como la vía metabólica más primitiva. Está presente en todas las formas de vida actuales. Es la primera parte del metabolismo energético y en las células eucariotas ocurre en el citoplasma.

En la glucólisis por cada molécula de glucosa se forman 2 ATP y 2 NADH, dando como resultado dos moléculas de piruvato. La reacción global de la glucólisis es:



Durante la secuencia de las diez reacciones de la glucólisis parte de la energía cedida por la glucosa se conserva en forma de ATP (Figura 9).

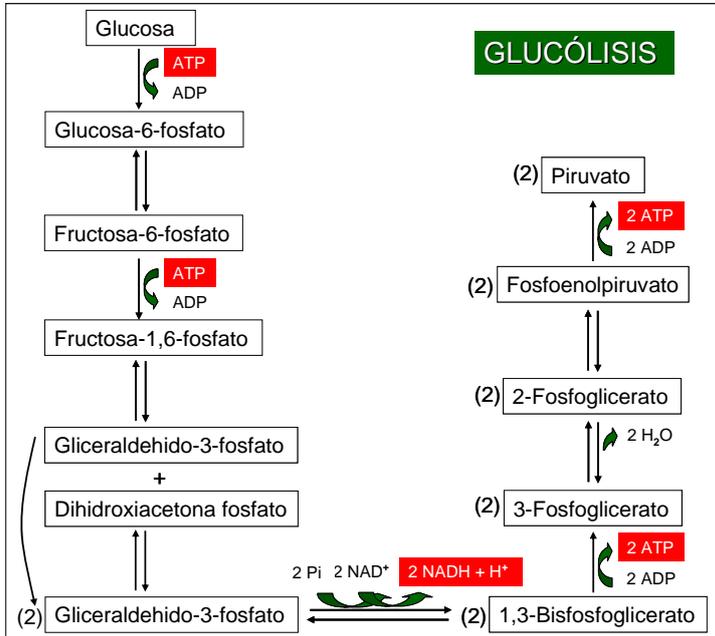


Figura 9.- Esquema donde se muestran las dos fases de la glucólisis. Por cada molécula de glucosa que entra en la fase preparatoria se forman dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato, ambas pasan por la fase de beneficios. El piruvato es el producto final de la segunda fase en condiciones aeróbicas, pero en condiciones anaeróbicas se reduce a lactato para regenerar NAD^+ (Lehninger *et al.*, 1999). NAD^+ : nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada). NADH : nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida). ATP: adenosin trifosfato. ADP: adenosin difosfato. Pi: fosfato inorgánico.

Esta ruta metabólica es muy importante ya que en condiciones de aerobiosis es el paso previo al ciclo de Krebs y en anaerobiosis va a ser vital en tejidos que tienen pocas o no tienen mitocondrias, como es el caso de la córnea, en el caso de que la demanda de ATP supere a capacidad aerobia del tejido, o cuando hay poco O_2 , como ocurre en el cartílago articular humano.

La glucólisis es la forma esencial de obtención de energía en condrocitos tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (Nahir, 1987; Mason *et al.*, 1989; Otte, 1991; Lee *et al.*, 1997). El cartílago normal es un tejido conectivo avascular, la disponibilidad de O_2 y de glucosa es significativamente inferior a las del líquido sinovial y al plasma. La glucosa es un importante combustible energético y un precursor estructural que juega un papel clave en la síntesis de macromoléculas de la MEC en el cartílago articular. La glucosa va a ser vital en el desarrollo, mantenimiento, reparación y remodelación del cartílago (Mobasheri *et al.*, 2002b).

Los niveles de glucólisis a bajas concentraciones de O_2 están influenciadas por las interacciones célula-matriz y por el ambiente osmótico extracelular (Bibby *et al.*, 2005).

Con un efecto Pasteur negativo, el descenso en la glucólisis a bajas concentraciones de O_2 dará como resultado la conservación del suministro de glucosa y disminución en

la tasa de acidificación de la matriz. Por otra parte, con un efecto Pasteur positivo, el aumento en la tasa de glucólisis puede aumentar la producción de ATP (Newsholme *et al.*, 1984); sin embargo, también puede aumentar el índice de disminución de glucosa y la acumulación de ácido láctico.

Dado que la glucólisis no necesita O₂, el hecho de que en el cartílago se de el efecto Pasteur negativo es bastante sorprendente, el O₂ funciona como un agente oxidante (aceptor de electrones), pero es importante mencionar que otros oxidantes también pueden estimular el metabolismo de forma significativa (Lee *et al.*, 2002).

La glucosa es la principal fuente de carbono para la vía glucolítica, tanto si la fuente oxidante es el O₂ como si son otros oxidantes. El hecho de que el piruvato o el oxalacetato aumenten la producción de lactato, incluso cuando el cartílago está en medio libre de glucosa, muestra que estos cetoácidos no actúan superando una restricción en la entrada de glucosa en la célula (Lee *et al.*, 2002). Se sabe que los condrocitos *in vivo* contienen glicógeno (Brighton *et al.*, 1984), el cual evidentemente puede hacer que continúe la formación de lactato, aunque en menor cantidad, en ausencia de glucosa externa.

2.3. La mitocondria como centro energético. La cadena respiratoria mitocondrial (CRM).

Las mitocondrias son orgánulos complejos que oxidan una gran cantidad de intermediarios metabólicos. Se ha visto que en células viables, estos orgánulos tienen una apariencia característica que depende del tipo de tejido y del estado oxidativo de la célula. Los complejos multienzimáticos localizados tanto en la membrana interna mitocondrial como en la matriz de la mitocondria oxidan intermediarios de los ácidos tricarbónicos derivados de los nutrientes primarios. El ATP es generado por la actividad de una bomba de protones que atraviesa la membrana interna mitocondrial. La energía para la síntesis de ATP se deriva de dos componentes: un gradiente de pH y el potencial eléctrico a través de la membrana mitocondrial (Lehninger *et al.*, 1999).

La fosforilación oxidativa realizada en la CRM se puede considerar como el final del catabolismo.

La CRM está formada por cuatro complejos enzimáticos: complejo I (NADH-deshidrogenasa), complejo II (succinato-deshidrogenasa), complejo III (ubiquinona-

citocromo c oxidorreductasa) y complejo IV (citocromo oxidasa); existe un quinto “complejo” que es donde se sintetiza el ATP (Figura 10).

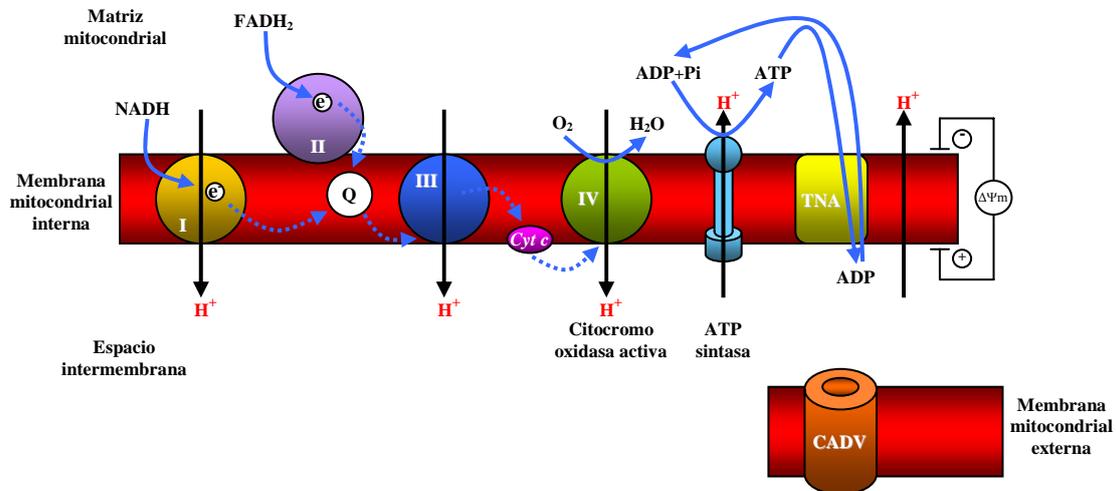
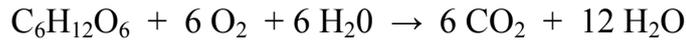


Figura 10.- Resumen del flujo de protones y electrones a través de los complejos de la CRM. Sistemas de transporte de la membrana mitocondrial interna transportan ADP + Pi al interior de la matriz permitiendo que salga el ATP recién sintetizado (Moncada *et al.*, 2002). Cyt c: citocromo c. FADH₂: dinucleótido de flavina y adenina (forma reducida). TNA: traslocador de nucleótidos de adenosina. CADV: canal de aniones dependiente de voltaje.

En la fosforilación oxidativa mitocondrial, el transporte de electrones está acoplado a los cuatro complejos enzimáticos en la membrana mitocondrial interna, con la síntesis de ATP a partir de ADP en el complejo V (ATP sintasa). El movimiento de los electrones entre los cuatro primeros complejos de la cadena produce un gradiente de protones, que es uno de los factores utilizados por el quinto “complejo” para generar ATP. El flujo electrónico está acompañado de transferencia de protones a través de la membrana mitocondrial produciendo un gradiente químico (ΔpH) y un potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) eléctrico. La membrana mitocondrial interna es impermeable a los protones; éstos sólo pueden volver a penetrar en la matriz mitocondrial a través de canales específicos de protones (como F₀, parte de la ATP sintasa). La fuerza protón-motriz que impulsa el retorno de los protones a la matriz proporciona la energía para la síntesis de ATP catalizada por el complejo F₁ asociado con F₀ (Lehninger *et al.*, 1999).

Durante la respiración, la energía que se libera es incorporada en la molécula de ATP, que puede ser inmediatamente reutilizado en el mantenimiento y desarrollo del organismo. Desde el punto de vista químico, la respiración se expresa como la oxidación de la glucosa, siendo la reacción global:



La energía es liberada en varios pasos:

- **GLUCÓLISIS:** ya descrita antes, ocurre en el citosol, donde cada molécula de glucosa se oxida parcialmente dando lugar a dos moléculas de piruvato. Se invierten dos moléculas de ATP pero se generan cuatro.

- **RESPIRACIÓN CELULAR:** cuando el ambiente es aerobio (contiene O₂) y el piruvato se oxida totalmente a CO₂, liberando la energía almacenada en los enlaces piruvato y atrapándola en el ATP. Se subdivide en lo que podríamos llamar dos etapas: el ciclo de los ácidos tricarbónicos (o del ácido cítrico) que ocurre en la matriz de la mitocondria y la cadena respiratoria que se lleva a cabo en las membranas mitocondriales.

- **FERMENTACIÓN:** cuando el O₂ está ausente (ambiente anaerobio), el piruvato no produce CO₂, sino otras moléculas como el ácido láctico o el etanol.

Aunque el metabolismo del cartilago es esencialmente glucolítico existe síntesis de ATP a nivel de la CRM, metabolismo mucho más rentable energéticamente hablando (Figura 11).

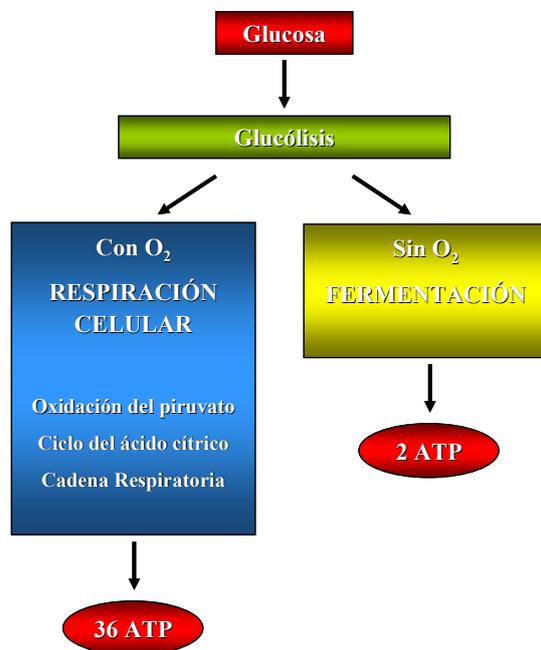


Figura 11.- Representación gráfica donde se muestran los posibles destinos catabólicos del piruvato formado en la fase de beneficios de la glucólisis. Son evidentes las diferencias en la rentabilidad energética en función de las condiciones de aerobiosis o anaerobiosis bajo las que se produzca (<http://fai.unne.edu.ar>).

El metabolismo oxidativo en los condrocitos articulares se ha observado, pero sólo tras varios días en cultivo en monocapa (Marcus, 1973; Johnson *et al.*, 2000), posiblemente debido a que la desdiferenciación aparece ligada a un aumento en este tipo de metabolismo (Mignotte *et al.*, 1991). Las condiciones de aerobiosis de los

condrocitos en cultivo se alejan bastante del ambiente básicamente anaerobio del cartílago. En condiciones de aerobiosis, en el cartílago articular la vía glucolítica es enzimáticamente capaz de simular un efecto Pasteur clásico, pero la hipoxia produce exactamente el efecto contrario, la glucólisis es suprimida (Lee *et al.*, 1997).

En el cartílago, la fosforilación oxidativa puede hacer una importante contribución a la generación de ATP. Las capas superficial y media de este tejido no son anóxicas (Oegema *et al.*, 1986), y en este contexto la fosforilación oxidativa es 18 veces más eficiente en la generación de ATP que la glucólisis (Brookes *et al.*, 1999; Murphy *et al.*, 1999). Además, la fosforilación oxidativa mitocondrial puede justificar más de un cuarto de la producción total de ATP dentro del cartílago articular, y posiblemente más bajo condiciones de estrés para el cartílago en las que se demande más energía (Lee *et al.*, 1997). El ATP generado a través de la respiración mitocondrial contribuye de forma significativa tanto en la síntesis de COL como en la PG (Johnson *et al.*, 2000).

2.4. El metabolismo del cartílago articular artrósico (OA).

En un trabajo previo realizado por nuestro grupo (Maneiro *et al.*, 2003) se analizaron las actividades de los complejos de la CRM en condrocitos OA, encontrándose una reducción significativa en las actividades de los complejos II y III respecto a las de los condrocitos procedentes de cartílago normal, lo que nos indicaba una implicación de la función mitocondrial en la patofisiología de la OA.

Hasta ese momento, los defectos en la fosforilación oxidativa se habían relacionado con multitud de enfermedades humanas (Kosel *et al.*, 1999; Leonard *et al.*, 2000), sin embargo, había muy poca información acerca de la mitocondria en el cartílago humano y en los propios condrocitos articulares. Únicamente, existían dos estudios en condrocitos que mostraban que el *NO* podía suprimir la respiración y la producción de ATP, sugiriendo una posible explicación para la pérdida de MEC y la mineralización del cartílago (Johnson *et al.*, 2000; Tomita *et al.*, 2001).

Por otra parte, la OA es la patología articular más relacionada con la edad; la relación potencial entre la edad y la actividad de los complejos de la CRM en células humanas siempre ha sido una cuestión bastante controvertida (Petit *et al.*, 1997). En condrocitos articulares normales no se encontró relación entre la edad de los pacientes y las actividades de los diferentes complejos de la CRM, lo que nos llevó a pensar que la

degradación del cartílago por la OA y la edad del propio tejido deben ser dos procesos diferentes (Maneiro *et al.*, 2003).

3. RECAMBIO CELULAR EN EL CARTÍLAGO ARTICULAR.-

La degeneración y remodelación del cartílago articular sólo depende de los condrocitos, ya que son el único tipo celular presente en el tejido y, además, de forma contraria a la “inerte” MEC, son el componente activo del cartílago. Además, tanto la estabilidad fenotípica como la supervivencia de los condrocitos son esenciales para el mantenimiento de la propia MEC (Kim *et al.*, 2007).

Al cartílago articular humano siempre se le ha considerado un tejido postmitótico, sin renovación virtual de células (Aigner *et al.*, 2001). El cartílago articular es avascular y no tiene una capa de células germinales, que compensaría la pérdida de células.

Históricamente, la muerte celular siempre se ha considerado un proceso patológico. Actualmente se acepta que es necesaria para que el desarrollo y funcionamiento de los organismos multicelulares sean los correctos. Encontramos ejemplos de muerte celular en todos los tejidos, ya que proporciona un mecanismo para renovar células dañadas o perjudiciales. Esto ha llevado a pensar que, por el contrario, todas las células están programadas para morir a menos que reciban señales de las células vecinas que eviten dicho suceso (Schwartz *et al.*, 1995).

La muerte celular fisiológica no sólo es esencial durante el desarrollo, sino también en el mantenimiento normal de los tejidos adultos, ya que si tiene lugar de forma insuficiente es un mecanismo que da lugar a enfermedades autoinmunes y neoplásicas. Por otra parte, en la línea del sentido clásico de la muerte celular como un proceso patológico y falta de regulación, la muerte celular excesiva es importante para el inicio y progreso de muchas enfermedades humanas, como son el Alzheimer, el Parkinson o la OA.

3.1. Mecanismos de muerte en el cartílago articular.

3.1.1. Muerte celular accidental (Necrosis).

La necrosis es la muerte patológica de un conjunto de células o de cualquier tejido del organismo, provocada por un agente nocivo que ha provocado una lesión tan grave

que una vez que se ha producido y desarrollado es irreversible, como por ejemplo el aporte insuficiente de sangre al tejido o isquemia, un traumatismo, la exposición a la radiación ionizante, por la acción de sustancias químicas o tóxicos, por una infección, o por el desarrollo de una enfermedad autoinmune o de otro tipo.

El concepto de necrosis se refiere esencialmente a células, la destrucción de la sustancia intercelular en la necrosis es un hecho secundario e inconstante y que se observa bajo ciertas condiciones. La necrosis conlleva la lisis de la membrana celular, de modo que se libera el contenido de la célula, dando como resultado un proceso inflamatorio (Schwartz *et al.*, 1993).

Varios componentes celulares interdependientes, como son las membranas celulares, las mitocondrias, el citoesqueleto o el ADN, son los objetivos primarios de los estímulos que van a causar la necrosis. Debido a su interdependencia, la lesión de un sistema provoca lesiones secundarias en otros y, por último, se produce la muerte celular cuando se sobrepasa cierto umbral de lesiones acumuladas (Stevens *et al.*, 2001).

Si la lesión de una célula es mínima, ésta puede recuperarse tras la desaparición del estímulo nocivo. Las proteínas y los orgánulos dañados son eliminados por una respuesta de estrés celular y por autofagia, y se sintetizan nuevos componentes estructurales; a esto se le denomina lesión celular subletal (Stevens *et al.*, 2001).

El momento en el que ocurre el daño celular irreversible es el llamado "punto sin retorno", a la muerte celular que se produce en ese momento se le conoce simplemente como "muerte celular" y, se denomina "necrosis" al proceso que sigue a la muerte celular, refiriéndose en particular a la necrofanerosis por ser el periodo de mayor duración (Figura 12). Los signos morfológicos que van a caracterizar a la necrofanerosis son: en el citoplasma, hipereosinofilia y pérdida de la estructura normal; en el núcleo, picnosis (retracción del núcleo), cariorexixis (fragmentación del núcleo en trozos de cromatina condensada) y cariólisis (disolución del núcleo). Las alteraciones del citoplasma y núcleo son coexistentes.

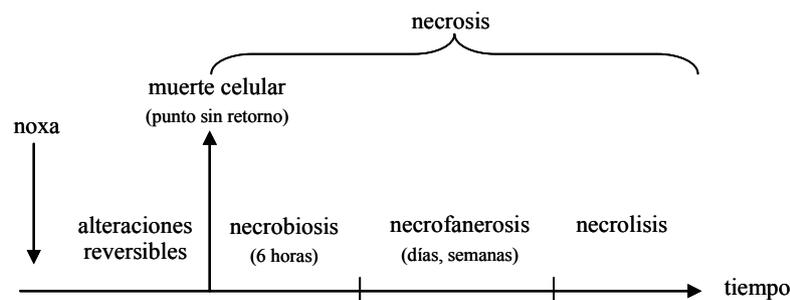


Figura 12.- Esquema de las fases de la necrosis (<http://escuela.med.puc.cl>).

Hasta ahora, la necrosis siempre ha sido definida como un tipo de muerte celular que carece de las características de la apoptosis y de la autofagocitosis, y generalmente se considera que se produce de manera descontrolada. Sin embargo, recientes investigaciones sugieren que este proceso debe estar sometido a una estrecha regulación. Después de producirse las lesiones o los mecanismos de señalización que inducen el daño, dentro de la necrosis se han encontrado signos de procesos controlados como es la disfunción mitocondrial, un incremento en la generación de especies reactivas del oxígeno (*Reactive Oxygen Species, ROS*), descenso del ATP, proteólisis por calpaínas o catepsinas y ruptura de la membrana plasmática en estadios tempranos del proceso. Además, la inhibición de proteínas específicas implicadas en la regulación de la apoptosis o de la autofagocitosis puede cambiar el tipo de muerte celular hacia la necrosis. Es importante caracterizar los aspectos bioquímicos y la definición molecular de este proceso, ya que pueden tener implicaciones clínicas importantes debido a que la necrosis es un proceso muy importante en la isquemia, en los traumatismos y posiblemente en algunas formas de procesos neurodegenerativos (Golstein *et al.*, 2007).

3.1.2. Muerte celular programada (*Programmed Cell Death, PCD*).

Hace alrededor de 30 años, Kerr y Wyllie identificaron un tipo de muerte celular distinto a la necrosis, esta vez programada, que pasó a conocerse con el nombre de apoptosis (Kerr, 1971; Wyllie *et al.*, 1973; Kerr, 2002). Aunque la apoptosis es el tipo mejor estudiado, actualmente se sabe que existen otros tipos de *PCD* como describiremos a continuación con mayor detalle.

3.1.2.1. Apoptosis (tipo I).

La definición original de apoptosis como una forma de muerte celular distinta a la necrosis simplemente estaba basada en criterios morfológicos (Kerr *et al.*, 1972).

En la Tabla 2 se reflejan las grandes diferencias existentes entre ambos tipos de muerte.

Tabla 2.- Diferencias entre los dos tipos de muerte celular más conocidos: apoptosis y necrosis.

	APOPTOSIS	NECROSIS
Estímulo	Fisiológico	Patológico
Presentación	Célula aislada	Grupos celulares
Tamaño celular	Encogimiento de la célula	Hinchamiento de la célula
Membrana plasmática	Efecto de burbujas en la membrana (<i>blebbing</i>), intacta hasta estadios tardíos	Pérdida de la integridad de la membrana
Adhesión entre células	Pérdida precoz	Pérdida tardía
Organización celular	Aparición de cuerpos apoptóticos, conservación de orgánulos	No hay formación de vesículas, desintegración de orgánulos
Núcleo	Pérdida de límites nucleares (cariorrhexis)	Desaparición (cariolisis)
Cromatina nuclear	Condensación en masas compactas	Grumos bien definidos
Fragmentación del ADN	Entre nucleosomas, salvo excepciones	Aleatorio
Aspecto del ADN en geles de agarosa	Patrón en escalera	Patrón extendido
Fagocitosis por otras células	Presente	Ausente
Inflamación	Ausente	Presente
Gasto energético	Requiere ATP	No requiere energía
Influencia de la temperatura	No ocurre a 4°C	Puede ocurrir a 4°C

La apoptosis es un mecanismo evolutivamente conservado en el cual está implicada una compleja maquinaria de señales para la eliminación de las células. Esto es importante, por ejemplo, durante el desarrollo embrionario, la homeostasis celular, y eliminación de los linfocitos autorreactivos y células neoplásicas, dañadas o infectadas. Las irregularidades en el control de la muerte celular pueden dar como resultado una variedad de enfermedades, entre las que se incluye el cáncer y las enfermedades degenerativas (Parone *et al.*, 2002).

En general, los **estímulos** que desencadenan la apoptosis se pueden dividir en dos grupos: estímulos fisiológicos y los que provocan estrés. Los estímulos fisiológicos incluyen receptores de superficie como el *TNF- α* o el CD95, por otra parte, ejemplos de estímulos que causan estrés son la luz ultravioleta (UV), la radiación, infecciones virales y bacterianas. Mientras muchos estímulos fisiológicos provocan la apoptosis a través de receptores de superficie, el inicio de la apoptosis mediado a través de estímulos que

inducen estrés está mucho menos definido, pero parece que está involucrada la mitocondria en un estadio muy temprano de la cascada de señalización intracelular.

Las **caspasas** son proteasas efectoras, el genoma humano codifica 12-13 caspasas (la 12 es un pseudogen). Muchas de ellas intervienen en el procesamiento de las citoquinas y en la inflamación, y al menos 7 (caspasas 2, 3, 6, 7, 8, 9 y 10) contribuyen a la muerte celular. Éstas últimas pueden subdividirse en caspasas iniciadoras (caspasas 2, 8, 9 y 10) y efectoras (caspasas 3, 6 y 7). Estas enzimas pueden autoactivarse (como la caspasa 3) o ser activadas por otras caspasas (por ejemplo, las caspasas 8 y 9 catalizan la activación proteolítica de la caspasa 3) (Kroemer *et al.*, 2005b).

Tradicionalmente, se ha visto la activación de las caspasas como un sinónimo de muerte celular por apoptosis, sin embargo, también pueden contribuir en procesos que no culminan con la desaparición de la célula. La inhibición de las caspasas puede tener efectos citoprotectores, pero en algunos modelos esta inhibición no mantiene la viabilidad celular y en lugar de eso cambia la morfología del proceso de muerte de apoptosis a otras vías no apoptóticas (Kroemer *et al.*, 2005b).

Existen tres **vías de señalización del proceso apoptótico** a través de las cuales se puede inducir la apoptosis a nivel celular, las dos mayoritarias son la inducida a través de receptores celulares y la que se produce a través de la mitocondria, y por otra parte, existe otra vía mediada por el retículo endoplasmático, que cada vez está cobrando más importancia.

Las vías apoptóticas mediadas por receptores y mitocondria tienen mecanismos de regulación y efectores que se superponen, aunque son diferentes en el inicio y la señalización (Kerr, 1971):

Receptores.- La oligomerización de los “receptores de muerte” (como Fas (CD95), *TNF- α*) por sus ligandos induce el reclutamiento de proteínas adaptadoras como son *FADD (Fas Associated Death Domain)* y *TRADD (TNFR1-associated death domain protein)*. Estas proteínas adaptadoras se unen al extremo citoplasmático a través de interacciones con dominios homólogos. La procaspasa-8 es reclutada en el complejo mediante interacciones con los dominios homólogos de los efectores, formándose un complejo de señalización de la muerte celular: *death-inducing signaling complex (DISC)*. Las caspasas iniciadoras activan a las ejecutoras, resultando en último término la rotura del ADN internucleosomal (Kim *et al.*, 2007). Esta vía en al menos algunos

tipos celulares es independiente de caspasas (Vercammen *et al.*, 1998; Foghsgaard *et al.*, 2001).

Mitocondria.- Varios investigadores han hipotetizado que los orígenes endosimbióticos de la mitocondria y la evolución del metabolismo aerobio en células eucariotas formaron las bases para la evolución de la muerte celular activa, la cual se manifiesta fundamentalmente como apoptosis en metazoos (Frade *et al.*, 1997; Kroemer, 1997a).

La mitocondria es importante en la regulación de la supervivencia de la célula (Petit *et al.*, 1995; Zamzami *et al.*, 1995; Kroemer *et al.*, 1997a; Green *et al.*, 1998; Loeffler *et al.*, 2000) y las señales clásicas de la muerte celular vienen precedidas por alteraciones mitocondriales (Vayssiere *et al.*, 1994; Petit *et al.*, 1997; Crompton, 1999), entre las que se incluyen la pérdida del $\Delta\Psi_m$ (Petit *et al.*, 1995; Zamzami *et al.*, 1995; Kroemer *et al.*, 1997b; Crompton, 1999), un descenso en la producción de energía (Petit *et al.*, 1997; Nicotera *et al.*, 1998), un aumento en la permeabilidad de la membrana (Kroemer *et al.*, 2000; Vander Heiden *et al.*, 2000; Green *et al.*, 2004) y la liberación del Cyt c (Cleeter *et al.*, 1994; Kluck *et al.*, 1997).

En esta vía, la apoptosis se induce tras producirse un daño celular (mediante estrés físico o químico), el cual causa cambios en la conformación y/o en la actividad de la familia de proteínas antiapoptóticas *Bcl-2* (*B-cell lymphoma 2*), como Bak y Bax en la membrana externa mitocondrial (Desagher *et al.*, 1999), así como perturbaciones del $\Delta\Psi_m$. Consecuentemente se libera Cyt c y otros polipéptidos del espacio intermembrana de la mitocondria y se unen a la proteína citoplasmática *Apaf-1* (*Apoptosis protease-activating factor-1*), lo que provoca un cambio conformacional dependiente de ATP que permite que se una a la procaspasa 9 (Li *et al.*, 1997), la unión de estos tres componentes da lugar a lo que se conoce como apoptosoma. Esta unión aumenta la capacidad proteolítica de la procaspasa-9, que resulta en la activación de las caspasas ejecutoras, como son las caspasas 3 y 7, desencadenando la muerte celular. Existen varios factores que aseguran que las subunidades que forman el complejo conocido como apoptosoma sólo se reúnen y son completamente funcionales cuando la célula está irrevocablemente destinada a morir (Cain *et al.*, 2002). La mitocondria actúa como centro integrador de las rutas apoptóticas (Figura 13).

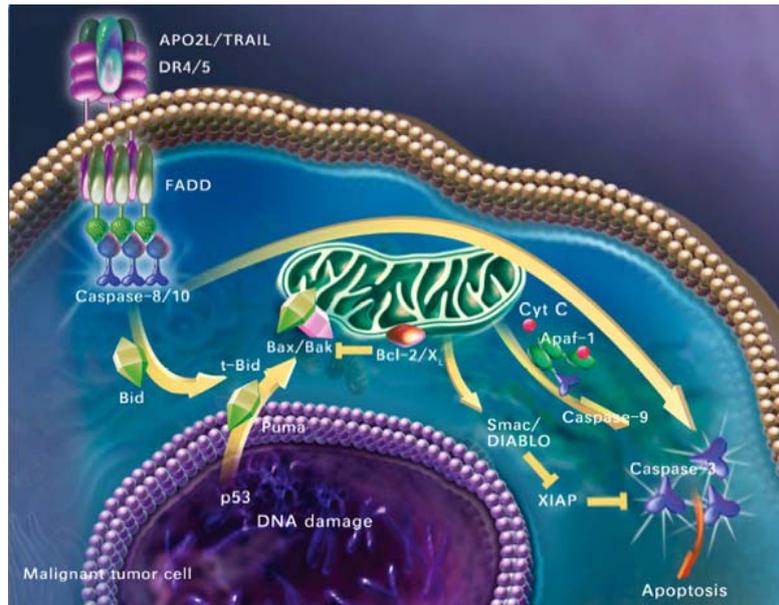


Figura 13.- La mitocondria como centro integrador de las rutas apoptóticas. Esquema de las diferentes vías de inducción de apoptosis (<http://www.bioncology.com>).

La mitocondria además de ser el orgánulo encargado de la producción de energía en la célula, y por ello vital para su supervivencia, es también crucial para la muerte de la misma, ya que la permeabilización de sus membranas juega un papel crucial en el desarrollo del proceso apoptótico (Green *et al.*, 1998; Kroemer, 2002; Breckenridge *et al.*, 2004; Green *et al.*, 2004). Es evidente que la barrera para la inducción de la apoptosis depende de la integridad de la membrana mitocondrial externa, la cual retiene una gran cantidad de proteínas apoptóticas que se encuentran en el espacio intermembrana de forma inactiva. La mitocondria contiene varias moléculas proapoptóticas que activan proteínas citosólicas que ejecutan la apoptosis, bloquean proteínas antiapoptóticas en el citosol y directamente rompen el ADN nuclear. La mitocondria atrapa estas proteínas proapoptóticas y las separa físicamente de sus dianas citoplasmáticas (Gulbins *et al.*, 2003).

Una gran cantidad de estímulos fisiológicos y patológicos pueden desencadenar la permeabilidad transitoria mitocondrial, lo cual constituye un paso clave y limitante para el desarrollo de la muerte celular. Esto conlleva la formación de poros, probablemente provocado por la oposición de proteínas de las membranas mitocondriales interna y externa, las cuales cooperan para formar el poro de permeabilidad transitoria (PPT) (Zamzami *et al.*, 1997).

Retículo endoplasmático.- Esta tercera vía ha sido definida recientemente y es mediada por estrés en el retículo endoplasmático (Breckenridge *et al.*, 2003). Éste activa a la caspasa-12 que se localiza dentro del retículo endoplasmático. El estrés puede venir dado por una interrupción en la homeostasis del ión calcio (Ca^{2+}) o una acumulación excesiva de proteínas en el retículo endoplasmático, pero no por señales mediadas por la mitocondria o vía receptor (Nakagawa *et al.*, 2000).

Cada vez hay una creencia más generalizada de que la apoptosis clásica y la necrosis no representan más que los extremos de un amplio rango de posibles muertes morfológicas y bioquímicas. Los dos tipos clásicos de muerte celular pueden ocurrir simultáneamente en tejidos o cultivos de células expuestos al mismo estímulo y, a menudo, la intensidad con que se produzca el estímulo decide la prevalencia de apoptosis o necrosis según sea el caso (Nicotera *et al.*, 1999; Zong *et al.*, 2006). En queratinocitos se ha visto que estos dos tipos de muerte celular están relacionados, los eventos necróticos siguen a los apoptóticos cuando ambos eventos están presentes (Paquet *et al.*, 2007).

3.1.2.2. Autofagocitosis (tipo II). Condoptosis.

Cada vez existen más evidencias de que el término *PCD* no es necesariamente sinónimo de apoptosis, las células usan gran variedad de mecanismos para morir, lo que se va a reflejar en diferentes morfologías (Roach *et al.*, 2004).

Los procesos de autofagia se caracterizan por la retención, tanto de citoplasma como de orgánulos, en vesículas de doble o multimembrana autofágicas y por la autodegradación de las células con su propio sistema lisosomal, además hay una expansión del retículo endoplasmático rugoso junto con un aumento en la cantidad de aparato de Golgi, así como extrusión del material celular al espacio extracelular y desintegración final de los restos celulares (Roach *et al.*, 2004).

La autofagocitosis sirve para eliminar proteínas de larga vida así como componentes de los orgánulos y tiene un importante papel en la remodelación celular debida a la diferenciación, estrés o daño inducido por citoquinas (Bröker *et al.*, 2005). Las células que sufren excesiva autofagia están condenadas a morir por un tipo de muerte diferente a la apoptosis y sin la activación de las caspasas (Gozuacik *et al.*, 2004). El papel

preciso de la muerte celular por autofagia en mamíferos aún no está completamente dilucidado (Okada *et al.*, 2004).

Se ha visto que la acumulación de vacuolas autofágicas puede preceder a la muerte celular por apoptosis, de modo que estos resultados irían en contra de una clara distinción entre el tipo I de muerte (apoptótica) y el II (autofágica) (González-Polo *et al.*, 2005).

Aunque se ha demostrado la existencia de condrocitos con las típicas características del proceso apoptótico en cultivo, encontrarlos *in vivo* es extremadamente raro. El grupo de Kourí ha propuesto el término **condroptosis** para definir el tipo de muerte celular observado en muchos, sino en la mayoría, de los condrocitos hipertróficos y articulares *in vivo*. En común con la apoptosis clásica, las células están “encogidas” y el núcleo contiene cromatina condensada, de forma contraria a la apoptosis, la cromatina no está marginada o fusionada en grandes masas sólidas, pero si hay pequeñas manchas de cromatina condensada esparcidas por todo el núcleo, el cual tiene una apariencia desigual y complicada (Roach *et al.*, 2004). Hasta ahora no se sabe si esto indica que la rotura internucleosomal típica de la apoptosis está ausente en la condroptosis (Nagata *et al.*, 2003), algún tipo de rotura debe producirse ya que son detectadas gracias a la tinción con el método *TUNEL* (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling method*) (Roach *et al.*, 2000).

Aunque el término muerte celular autofágica sugiere que la muerte de la célula está ocurriendo a través de la autofagia, el término simplemente describe que la muerte celular se está produciendo con autofagia (Kroemer *et al.*, 2005a). No existen evidencias *in vivo* que al eliminar los genes necesarios para la autofagia se reduzca la muerte celular, incluso hay evidencias de que células con características de muerte por autofagia pueden recuperarse después de retirar el estímulo inductor del mecanismo (Boya *et al.*, 2005).

Se ha visto que los condrocitos son capaces de incorporar partículas de látex, restos celulares y restos apoptóticos *in vitro*. De modo que es concebible que los condrocitos puedan estar implicados en la evacuación por fagocitosis de diferentes materiales dentro del cartílago. De hecho, no hay evidencias de la presencia de “fagocitos profesionales” (macrófagos y neutrófilos) en este tejido (Castillo *et al.*, 2004).

3.1.2.3. Paraptosis (tipo III).

La paraptosis es un tipo de *PCD*, ya que requiere la expresión génica, pero diferente a la apoptosis tanto por criterios morfológicos como bioquímicos. Morfológicamente, esta forma de *PCD* alternativa aparece durante el desarrollo y en algunos casos de neurodegeneración. Debido a la falta de respuesta a los inhibidores de caspasas y Bcl-x_L, se ha visto que este tipo de *PCD* está impulsada por una actividad alternativa de la caspasa-9 y que es independiente de Apaf-1 (Sperandio *et al.*, 2000).

La paraptosis está caracterizada por la vacuolización del citoplasma y la resistencia a los inhibidores de la apoptosis. Esta forma de muerte celular requiere la transcripción y síntesis *de novo* de proteínas (Sperandio *et al.*, 2000).

La vacuolización citoplasmática va seguida de un hinchamiento de las mitocondrias y del retículo endoplasmático. Típicamente no responde a los inhibidores de caspasas ni implica la activación de estas proteasas, la formación de cuerpos apoptóticos u otras características de la morfología apoptótica (Sperandio *et al.*, 2000).

Este tipo de muerte, implicado en el desarrollo, tiene características en común con la necrosis. No se detecta fagocitosis ni hay respuesta inflamatoria local. La actividad de las caspasas confiere una muerte celular con un morfotipo apoptótico, en ausencia de esta actividad existe un mecanismo subyacente, independiente de las caspasas conocidas, que también confiere muerte celular pero con morfotipo necrótico. Este tipo de muerte no es detectable utilizando metodología específica para la apoptosis y no puede ser bloqueada por agentes que actúan sobre las caspasas (Chautan *et al.*, 1999).

Actualmente hay poca información de este tipo de *PCD*, esencialmente la comparan con la apoptosis y no con otros tipos de muerte como la autofagia, de modo que queda por establecer que sean dos tipos diferentes de *PCD* (Bröker *et al.*, 2005), aunque hay autores que afirman que la condroptosis difiere con la paraptosis en la presencia de cromatina condensada de forma desigual, aumento en el aparato de Golgi y vacuolización del citoplasma (Roach *et al.*, 2004).

3.2. Viabilidad celular del cartílago patológico artrósico (OA).

Como hemos visto anteriormente, se considera que el cartílago normal es un tejido sin capacidad de división; sin embargo, en el desarrollo de la OA, algunos condrocitos pueden aumentar de tamaño así como formar grupos de 50 células o más que se

conocen como clones “condrocíticos”. Este fenómeno se considera una evidencia de que el cartílago es un tejido metabólicamente activo y que los condrocitos se dividen en la OA (Kim *et al.*, 2007). Sin embargo, el nivel de compensación parece no ser el adecuado, ya que el contenido de los GAG en la matriz en los sitios donde se ha producido la proliferación de los condrocitos sigue siendo inferior comparándolo con una MEC control de un tejido no OA (Kop’eva *et al.*, 1986). Si la OA sigue progresando, el cartílago llega a ser hipocelular a pesar de la compensación clónica (Vignon *et al.*, 1976). Además de esta hipocelularidad generalizada, las lagunas vacías son una característica del cartílago OA. Esto lleva al hecho ampliamente asumido de que la muerte celular es un proceso central en la degeneración del cartílago OA, cualquiera que sea el tipo de muerte celular que se produce en el cartílago articular, es importante prevenirla ya que va en detrimento del mantenimiento del cartílago (Aigner *et al.*, 2004). En muestras de cartílago articular animal, el descenso en la celularidad del cartílago se ha correlacionado con una reducción en el mantenimiento de la MEC por parte de los condrocitos, corroborando la creencia de que un descenso en el número de condrocitos es una condición previa para el desarrollo de la degeneración del cartílago (Roberts *et al.*, 1989).

El hecho de que los primeros casos de apoptosis en condrocitos se observasen en la placa de crecimiento epifisaria de huesos largos, tanto en aves como en mamíferos, (Hatori *et al.*, 1995; Bronckers *et al.*, 1996) parece indicar que los condrocitos entran en la última fase vital como células en pleno funcionamiento (Kim *et al.*, 2007). Estos resultados ponían de manifiesto que las células son eliminadas de la epífisis a través de la apoptosis. Posteriormente, en estudios con roedores, se observó que el número de condrocitos apoptóticos aumenta de manera significativa con la edad (Adams *et al.*, 1998). En el caso de la OA, el número de condrocitos apoptóticos es mayor en el caso de cartílago muy afectado que el encontrado en cartílago con menor grado de afectación (Blanco *et al.*, 1998a; Hashimoto *et al.*, 1998c; Kim HA *et al.*, 1999; Kim HA *et al.*, 2000). Todos estos resultados nos llevan a la conclusión de que la apoptosis está fuertemente relacionada con la progresión de la enfermedad, pero establecer la contribución relativa que puede tener la muerte celular por apoptosis en la progresión de la OA es muy difícil debido a la naturaleza crónica de esta enfermedad. Si la apoptosis del condrocito es el principal mecanismo de degradación del cartílago o simplemente es un subproducto de la degradación de este tejido está todavía por dilucidar (Kim *et al.*, 2007).

Sin embargo, con la mejora en las técnicas de detección de apoptosis, algunas opiniones van en la tendencia de que los condrocitos apoptóticos en el cartílago OA en realidad son raros, lo que nos sugiere que la muerte celular por apoptosis no es un fenómeno extendido con la edad o un resultado del deterioro del cartílago OA (Aigner *et al.*, 2001).

Debido al hecho de que en el cartílago los condrocitos están confinados en su laguna, esto les puede proporcionar una protección contra la fagocitosis y los cuerpos apoptóticos, de modo que se han sugerido diferentes mecanismos de muerte celular y eliminación. Es muy difícil demostrar los típicos condrocitos apoptóticos acompañados de cuerpos apoptóticos incluso en cartílago humano con un alto grado de OA, además, se han propuesto otros mecanismos de *PCD* no apoptótica (Kim *et al.*, 2007).

El tipo de muerte celular que actualmente se relaciona con los condrocitos se conoce con el nombre de condroptosis, reflejando el hecho de que los condrocitos sufren apoptosis pero no de la forma clásica, pero de una forma que parece típica y apropiada para la muerte celular de los condrocitos *in vivo* (Sperandio *et al.*, 2000).

Un estudio con gran detalle de la ultraestructura mostró que, de forma contraria a la apoptosis clásica, la muerte de los condrocitos implica un aumento inicial tanto del retículo endoplasmático como del aparato de Golgi, lo cual indica un aumento en la síntesis de proteínas (Hashimoto *et al.*, 1998c). El aumento de las membranas del retículo endoplasmático provoca una segmentación del citoplasma y facilita que se formen compartimentos donde van a digerirse tanto el citoplasma como los orgánulos celulares. El hecho de que aumente tanto la cantidad de retículo endoplasmático ha hecho que se especule en cuanto a que la vía apoptótica mediada a través de este orgánulo sea más importante en el condrocito que las mediadas a través de receptores y la mitocondria, así como que las proteasas lisosomales sean tan importantes como las caspasas en el cartílago OA (Roach *et al.*, 2004). En principio se podría identificar este tipo de muerte con paraptosis, pero la condroptosis difiere con ésta en la presencia de cromatina condensada de forma desigual, aumento en el aparato de Golgi y vacuolización del citoplasma (Roach *et al.*, 2004).

4. EL NO EN EL CARTÍLAGO ARTICULAR.-

El estudio del *NO* ha sido el campo de mayor expansión en el conocimiento biológico en la última década. Su importancia radica en que es la primera sustancia

química gaseosa que se ha demostrado que es producida por células vivas para enviar señales intercelulares. Salvador Moncada postuló que el *NO* actúa como un mediador biológico y él mismo demostró su presencia en endotelio, plaquetas, sistema nervioso central y periférico, médula suprarrenal y células del sistema inmunitario (Palmer *et al.*, 1987).

Actualmente el estudio del *NO* es el foco de atención de muchas investigaciones, ya que se ha involucrado como uno de los principales mediadores en la fisiología y fisiopatología de mecanismos inmunes, en las comunicaciones inter e intracelulares, en la adhesión de plaquetas y leucocitos y en el mantenimiento de la integridad vascular por citar algunos ejemplos (Radomski *et al.*, 1987; Kubes *et al.*, 1991; López-Farré *et al.*, 1995; Marks *et al.*, 1995).

4.1. El óxido nítrico (*NO*).

El *NO* es una pequeña molécula formada por dos átomos, uno de nitrógeno y el otro de O_2 , esto conlleva un número impar de electrones, lo que confiere al *NO* un carácter de radical libre (Radi, 1996). Aunque el *NO* es una molécula gaseosa con una vida media de unos pocos segundos, la presencia del electrón desapareado le permite interactuar rápidamente con otros átomos que son abundantes en los sistemas biológicos, como son el nitrógeno y el azufre, los cuales forman parte de las proteínas. La unión del *NO* a las proteínas, u otras moléculas, se llama nitrosación y este proceso es la base química que va a permitir al *NO* ejercer diferentes funciones en los organismos. El *NO* también interactúa con átomos metálicos, como el hierro, el cual forma parte de proteínas conocidas con el nombre de ferroproteínas o hemoproteínas, las cuales son fundamentales en la regulación de un gran número de funciones biológicas muy importantes, como son la producción de energía, el transporte y almacenamiento de oxígeno. Por otro lado, el *NO* reacciona rápidamente con el O_2 y con diferentes formas del O_2 que son altamente reactivas, como son el O_2^- y el radical hidroxilo (OH) los cuales son sumamente tóxicos. La interacción del *NO* con el O_2^- da lugar al peroxinitrito ($ONOO^-$) y otras formas reactivas del nitrógeno, todas ellas tóxicas, de modo que la combinación del *NO* con las formas reactivas del O_2 constituye el principal mecanismo mediante el cual el *NO* daña a las células. El *NO* es una molécula pequeña y neutra que difunde libremente a través de la membrana celular, de

este modo puede alcanzar rápidamente a las moléculas con las que interactúa en el interior de la célula.

El *NO* tiene numerosas funciones biológicas, las principales aparecen resumidas en la Tabla 3.

Tabla 3.- Principales acciones biológicas del *NO*.

FUNCIONES BIOLÓGICAS DEL <i>NO</i>	Estimulación de la guanilato ciclasa		
	Mensajero intracelular en la relajación vascular		
	Acciones locales (oxihemoglobina leucocitaria)		
	Regulación de la expresión génica (proteínas de adhesión en el endotelio vascular)		
	Sistema inmune (molécula efectora citotóxica)		
	Funciones fisiológicas	Vasodilatación	
		Inhibición de la agregación plaquetaria	
		Neurotransmisión	
		Regulación de la actividad cardíaca	
		Regulación de la respuesta inmune	

4.2. Familia enzimática de la óxido nítrico sintasa (*NOS*).

El *NO* es sintetizado por la familia de enzimas denominadas de manera colectiva como *NOS*, las cuales están ampliamente distribuidas en los tejidos de mamíferos (Moncada *et al.*, 1991). Aunque existen varias isoformas, que describiremos a continuación con mayor detalle, todas comparten una serie de características: aparecen en forma de dímero, cada monómero tiene un peso molecular de 130-150 KDa, poseen un sitio activo flavina y hemo, en su sitio activo poseen un sitio de unión para el complejo calcio-calmodulina y, por último, mayoritariamente requieren la presencia de tetrahidroiopterina como cofactor para ejercer su acción (Moncada *et al.*, 1991). Estrictamente, a las diferentes isoformas de *NOS* en su forma activa habría que considerarlas como un tetrámero ya que requieren calmodulina (dos monómeros están asociados con dos moléculas de calmodulina) (Alderton *et al.*, 2001).

Tradicionalmente se ha hablado de tres isoformas de la *NOS*, una forma neuronal, otra endotelial (ambas formas son constitutivas y reguladas por el calcio intracelular) y una tercera isoforma inducible e independiente del calcio. Son productos de diferentes genes, con diferente localización, regulación, propiedades catalíticas y sensibilidad

inhibitoria, y con una homología del 51-57% entre las isoformas humanas (Alderton *et al.*, 2001).

Actualmente, cada vez es más evidente que existe una cuarta forma presente en la mitocondria, que no es ninguna de las tres formas mencionadas anteriormente.

A continuación describiremos cada una de las isoformas con más detalle:

- **Variedad neuronal (*nNOS*, tipo I, *NOS-I* o *NOS-1*)**, fue la primera isoforma encontrada y predominantemente en el tejido neuronal.

- **Variedad endotelial (*eNOS*, tipo III, *NOS-III* o *NOS-3*)**, fue la primera isoforma encontrada en el endotelio de las células vasculares.

Estas formas constitutivas están siempre presentes y tienen una producción basal de *NO* en picomoles por cortos períodos de tiempo (segundos a minutos). Su función es producir *NO* que regule el tono vascular basal y la comunicación intercelular respectivamente. Estas formas también se han encontrado en plaquetas, leucocitos polimorfonucleares y células del músculo cardíaco (Shulz, 1995). Como se mencionó anteriormente, estas isoformas son dependientes del calcio (Ca^{2+}) intracelular para su activación, proceso en el cual está involucrada la calmodulina.

- **Variedad macrófagica o citoquina-inducible (*iNOS*, tipo II, *NOS-II* o *NOS-2*)**, es la isoforma inducible en un amplio abanico de células y tejidos. No se expresa normalmente en células y su producción es estimulada en macrófagos y fagocitos para desencadenar reacciones inmunológicas. Éstos liberan grandes cantidades de *NO* (nanogramos) de forma sostenida bajo estímulo fisiopatológico. Sin embargo, *iNOS* también puede producirse en otras células, como las del músculo liso vascular y miocitos cardíacos, conduciendo a una acción cronotrópica e inotrópica negativa (Lowenstein, 1994). La expresión de *iNOS* es inhibida por glucocorticoides (Shulz, 1995).

Su producción es activada por citoquinas y endotoxinas (Shulz, 1995), y en este caso, no es necesaria la presencia de Ca^{2+} para activar la acción de la calmodulina sobre *iNOS*.

En el caso de los condrocitos, los grupos de Salvador Moncada y Martin Lotz han clonado la *NOS* presente en estas células y presenta todas las características de una *iNOS* (Charles *et al.*, 1993; Maier *et al.*, 1994).

Al parecer existe un factor regulador, a manera de retroalimentación negativa del *NO* sobre la *NOS*, de forma que el *NO* controla su propia biosíntesis (Ignarro, 1996).

- **Variedad mitocondrial (*mtNOS*)**, nunca ha estado muy claro que exista, pero hay un artículo que claramente apoya su existencia (Lacza *et al.*, 2003).

La primera evidencia de producción de *NO* mitocondrial fue la descripción de la actividad de la NADPH diaforasa en los nervios perivasculares en la arteria basilar (Loesch *et al.*, 1994), siendo el marcaje localizado en la mitocondria. Posteriormente mediante técnicas de inmunocitoquímica se encontró *NOS* en las mitocondrias de varios tejidos (Bates *et al.*, 1996), esta observación básica abrió la posibilidad de que el *NO* fuese un regulador intrínseco de la respiración mitocondrial.

Se ha visto que la *mtNOS* es similar a las formas constitutivas ya que es sensible al Ca^{2+} y se expresa de forma constitutiva, pero no reacciona con los anticuerpos específicos de *eNOS* y *nNOS*. Por el contrario, se une fuertemente a la calmodulina y tiene una inmunoreactividad y peso molecular muy similar a la forma inducible, lo que nos indica que ambas formas están relacionadas. Existe bastante controversia, incluso algunos autores han llegado a decir que existe una variedad de *mtNOS* dependiendo del tipo de tejido (Boveris *et al.*, 2002; Escames *et al.*, 2003).

4.3. Síntesis de óxido nítrico (*NO*). Mecanismo de acción.

El *NO* es sintetizado por la familia de enzimas *NOS* que catalizan la reacción del O_2 con el aminoácido L-arginina para producir *NO* y citrulina (Figura 14). Estas enzimas son estructuralmente semejantes a la citocromo P450, son dímeros capaces de ligar FAD, flavín mononucleótido (FMN), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), tetrahidrobiopterina y protoporfirina IX para catalizar la reacción (White *et al.*, 1992; Ignarro, 1996).

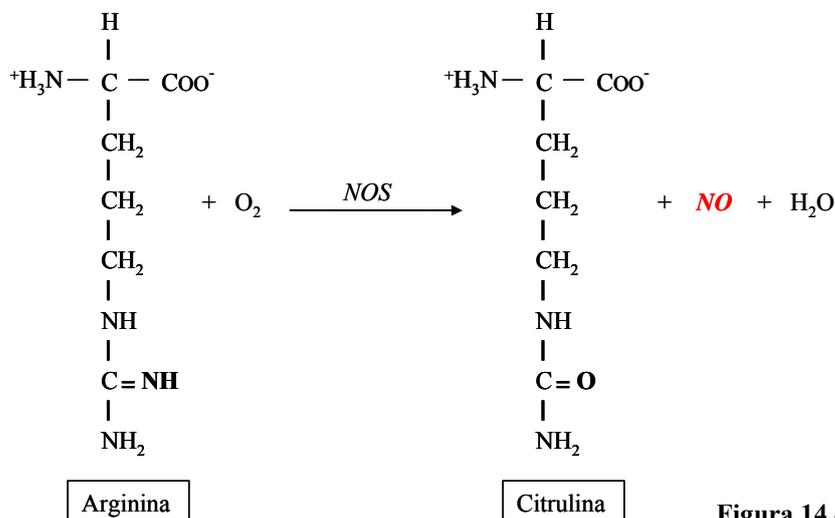


Figura 14.- Biosíntesis del *NO*.

Este compuesto una vez sintetizado, por ejemplo, por las células del endotelio, es liberado para luego difundir hacia las células de músculo liso vascular adyacente. Dentro de ellas, se une al hierro de la enzima guanilato ciclasa activándola para catalizar la producción de guanosina monofosfato cíclica (GMPc), a partir de la guanosina trifosfato (GTP). La GMPc al poseer la actividad de segundo mensajero activa diferentes procesos biológicos, en este caso dilatar arterias, ejerciendo su función a través de una cascada de proteínquinasas que reducen el Ca^{2+} intracelular regulando los canales de calcio de membrana celular y retículo sarcoplasmático (Gruetter *et al.*, 1979; Ignarro *et al.*, 1981; Palmer *et al.*, 1987).

4.4. Metabolismo del óxido nítrico (NO). Estrés oxidativo.

El NO va a reaccionar con multitud de moléculas, lo cual nos da una idea de la importancia de las acciones biológicas de este radical libre. Entre sus objetivos podemos señalar las reacciones con metaloproteínas (guanilato clicasa, citocromo oxidasa,...), sulfidrilo, O_2 , O_2^- y con radicales orgánicos.

El estrés oxidativo viene impuesto a las células como resultado de un aumento en la generación de oxidantes o un descenso en su producción, así como por un fallo en la reparación del daño oxidativo.

El daño celular es inducido por las ROS, siendo estos radicales libres, aniones reactivos que contienen átomos de O_2 , o moléculas que contienen átomos de O_2 que pueden producir radicales libres o son activados químicamente por ellos. Como ejemplos tenemos al OH, al O_2^- , al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ONOO $^-$.

La fuente principal de ROS *in vivo* es la respiración aerobia, aunque también son producidos por la β -oxidación de los ácidos grasos que tiene lugar en los peroxisomas, el metabolismo microsomial del citocromo P450 de compuestos xenobióticos, por la estimulación de la fagocitosis por patógenos o lipopolisacáridos, metabolismo de la arginina y enzimas específicos de cada tejido. Bajo condiciones normales, las ROS son eliminados por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD), la catalasa o la glutatión peroxidasa (GSH).

El principal daño inducido a las células es el resultado de la alteración de macromoléculas inducido por ROS, como es el caso de los ácidos grasos poliinsaturados en las membranas lipídicas, proteínas esenciales y ADN. Además, el estrés oxidativo y

las ROS han sido implicados en diversas patologías, como es la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, cáncer y envejecimiento.

El NO difunde fácilmente a través de las membranas celulares gracias a su carácter lipofílico y puede seguir dos caminos (Figura 15):

- En primer lugar, puede actuar sobre la enzima guanilato ciclasa (GC), responsable de la producción de GMPc (mensajero intracelular responsable de multitud de procesos en la célula), el ONOO⁻ o derivados del NO como el dióxido de dinitrógeno (N₂O₃), los cuales pueden causar directamente daño en el ADN o inhibir las enzimas de reparación del ADN, llevando a un aumento a la proteína supresora de tumores p53, la cual se ha visto que se acumula en macrófagos tratados con NO y puede ser el factor responsable de llevarlos a la apoptosis. La proteína p53 promueve la apoptosis a través de la activación de la regulación de proteínas apoptóticas como Bax, la quinasa dependiente de ciclina p21 y la disminución de la regulación de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Messmer *et al.*, 1996).

- Por otro lado, reacciona rápidamente con el O₂ para formar ONOO⁻, ya que su vida media *in vivo* es de sólo unos segundos. Esta molécula es altamente reactiva y puede actuar directamente sobre el núcleo de la célula provocando fragmentación y mutaciones en el ADN, así como sobre la membrana celular produciendo oxidación lipídica, llevando todo ello a la muerte celular. Además, este radical libre puede reaccionar con la CRM, sobre el Cyt c (directamente implicado en la producción energética de la célula en forma de ATP), así como sobre la superóxido dismutasa manganésica (SODMn), llevando todo esto a la producción de O₂⁻, que contribuye de manera muy significativa al estrés oxidativo de la célula. Otra fuente de producción de este radical es el propio O₂, evidentemente presente en la célula por el metabolismo aerobio de la misma. Los O₂⁻, a su vez, reaccionan sobre la SODMn liberándose H₂O₂, que a su vez es otro radical libre que se suma al estrés oxidativo de la célula.

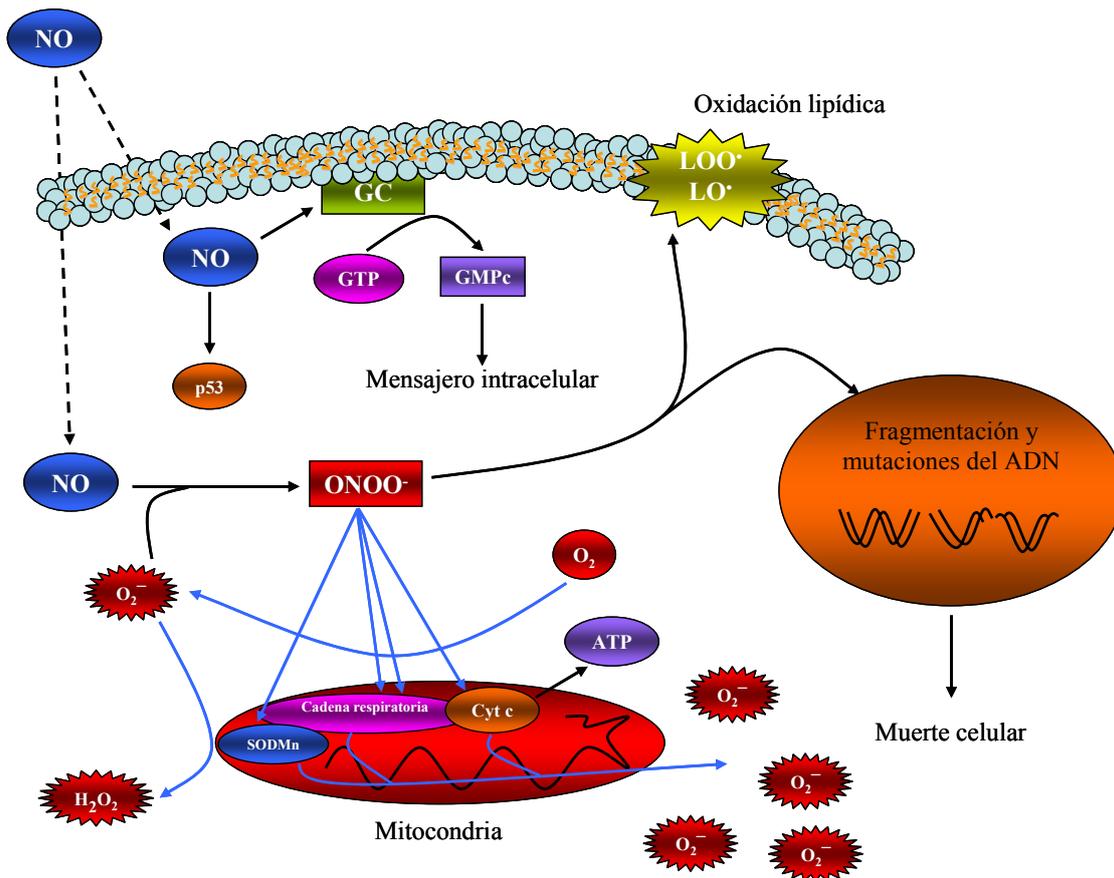


Figura 15.- Metabolismo del NO (<http://www.sigma-aldrich.com>).

4.5. Óxido nítrico (NO), mitocondria y apoptosis.

El NO puede regular la apoptosis a varios niveles, dependiendo del contexto celular. Puede bloquear la formación del apoptosoma (Zech *et al.*, 2003), inhibir las caspasas por S-nitrosación del centro catalítico (Melino *et al.*, 1997) y actuar sobre otras dianas celulares (Bernassola *et al.*, 2001), tanto inhibiendo como induciendo apoptosis. Se ha propuesto que el NO a bajas concentraciones, derivado de las formas constitutivas, generalmente tiene un efecto protector sobre las células, mientras que altas concentraciones de NO, derivado de la forma inducible, probablemente conduce a la muerte celular (Kim YM *et al.*, 1999).

En algunas circunstancias parece que el NO puede también actuar sobre la mitocondria para desencadenar la muerte celular.

Cuando se añaden NO y ONOO⁻ a mitocondrias aisladas se induce un rápido hinchazón de los orgánulos, probablemente debido a la activación del complejo del PPT porque la ciclosporina A (un ligando de la ciclofilina mitocondrial D, *CypD*) y el ácido

de *bongkrelic* (un ligando de la adenina nucleótido traslocasa, *ANT*), ambos inhibidores del fenómeno de permeabilidad mitocondrial transitoria, pueden inhibir esta respuesta del hinchamiento (Hortelano *et al.*, 1997).

El mecanismo de apertura del PPT inducido por el *NO* se ha visto que opera en la apoptosis patológica, por ejemplo en el caso de la muerte de neuronas dopaminérgicas tratadas con la neurotoxina N-metil-D-ácido aspártico (NMDA) (el cual obtiene *NO*) (Horn *et al.*, 2002). Sin embargo, los efectos del *NO* sobre la mitocondria probablemente se extienden y van más allá de la apertura del PPT (Brown *et al.*, 2002). La inhibición reversible de la respiración mitocondrial a nivel de la citocromo oxidasa en competición con el O_2 , así como la inhibición irreversible en múltiples sitios por especies reactivas del nitrógeno (*RNS*, *Reactive Nitrogen Species*), se ha visto que participan en la inducción de la apoptosis, como ha descrito de manera exhaustiva el grupo de Salvador Moncada (Beltrán *et al.*, 2000; Beltrán *et al.*, 2002). Es más, la inhibición de la CRM puede llevar a una reducción en el $\Psi\Delta m$ y/o mermar los inhibidores endógenos de la apertura del PPT, de ese modo facilitando la permeabilización de la membrana mitocondrial (Yuyama *et al.*, 2003). En términos teóricos, este último efecto puede ser secundario a la inhibición de la CRM mediada por el *NO* (Vieira *et al.*, 2003). Por otra parte, el *NO* es un potente vasodilatador (vía *GMPC*), aumentando el O_2 y, por tanto, el suministro de sustrato respiratorio a la mitocondria (Brown, 2007).

Parece que el *NO* puede desencadenar el proceso apoptótico en parte a través de una acción directa sobre las membranas mitocondriales. Además, forma parte de la categoría de los segundos mensajeros proapoptóticos que pueden actuar sobre la mitocondria. De modo que existe la controversia acerca de si el *NO* se produce localmente (a través de la acción de la *mtNOS*) dentro del citosol o llega a través de una fuente externa (Vieira *et al.*, 2003).

El *NO* puede inducir apoptosis, principalmente a través del estrés oxidativo, y también induce necrosis, principalmente a través del descenso en la energía. A su vez, se sabe que la activación del PPT por las *RNS* puede causar apoptosis o necrosis (Brown, 2007).

Aunque las *ROS* son un importante inductor de la apoptosis, la maquinaria apoptótica está sujeta a una regulación del sistema redox mucho más complicada. El *NO* previene la apoptosis por la supresión de las caspasas a través de un mecanismo dependiente de *GMPC* (Kim *et al.*, 1997; Thippeswamy *et al.*, 2001) y por inhibición

directa de las caspasas a través de s-nitrosación de proteínas (Dimmeler *et al.*, 1997; Mohr *et al.*, 1997; Ogura *et al.*, 1997; Ahern *et al.*, 2002).

4.6. El papel del óxido nítrico (NO) en el proceso artrósico.

En numerosas patologías el NO actúa como una molécula con efectos beneficiosos, como en la relajación del endotelio y la agregación plaquetaria; *a priori* sería la diana terapéutica ideal, pero el hecho de que en la OA aparezca en el cartílago patológico y de forma no significativa en el normal y que los condrocitos lo liberen sometidos a citoquinas proinflamatorias, hace que el objetivo principal siempre haya sido eliminarlo. Actualmente se sabe que el NO juega un doble papel en los sistemas biológicos (Choi *et al.*, 2002; Thippeswamy *et al.*, 2006).

El líquido sinovial procedente de las articulaciones humanas sanas contiene valores muy bajos de NO, sin embargo, el procedente de pacientes con OA o artritis reumatoide posee altas concentraciones de NO (Farrell *et al.*, 1992).

De todos los elementos celulares que pueden encontrarse en una articulación, los condrocitos son los que sintetizan y liberan los valores más altos de NO, así como también son los que expresan los valores más altos de ARNm y proteína de *iNOS* (Rediske *et al.*, 1994; Palmer *et al.*, 1992). Los cultivos primarios de condrocitos articulares humanos liberan valores bajos de NO, pero tras ser estimulados con la citoquina proinflamatoria IL-1 β presentan un incremento en la producción de NO dependiente de la dosis. Los condrocitos articulares activados procedentes de donantes artrósicos producen grandes cantidades de NO, incluso se podría decir que más que cualquier otra célula del cuerpo (Stadler *et al.*, 1991). Así mismo, se ha visto que los condrocitos situados en las capas más superficiales del cartílago van a producir más NO que los de capas profundas (Hayashi *et al.*, 1997).

El NO producido por la estimulación con citoquinas va a inducir determinados efectos catabólicos que llevan a la degradación progresiva del cartílago articular, entre los cuales podemos citar, inhibición de la síntesis de COL y PG (Cao *et al.*, 1997; Stefanovic-Racic *et al.*, 1996; Taskiran *et al.*, 1994), activación de metaloproteasas (Murrel *et al.*, 1995), incremento de la susceptibilidad al daño inducido por otros oxidantes (Blanco *et al.*, 1995a), descenso en la expresión del receptor antagonista de la IL-1 (IL-1ra) (Murrel *et al.*, 1995), inhibición de la proliferación celular (Blanco *et al.*, 1995b) e inducción de la apoptosis (Blanco *et al.*, 1995a), entre otros.

También es importante mencionar la relación entre el *NO* y las prostaglandinas en el cartílago articular humano; las prostaglandinas son unos mediadores inflamatorios sintetizados por la enzima ciclooxigenasa (COX). Dentro de la articulación, se ha visto que tanto el tejido sinovial como los condrocitos, si son estimulados adecuadamente, pueden sintetizar dichos mediadores. Concretamente, los condrocitos tras la estimulación con IL-1 β , *TNF- α* y *NO* son capaces de sintetizar prostaglandinas, principalmente prostaglandina E₂ (PGE₂). La función que desempeña en el cartílago aún no está muy clara, actualmente se han señalado tanto efectos anabólicos como catabólicos. Esta enzima presenta dos isoformas, una constitutiva (COX-1) y otra inducible (COX-2) (Dewitt *et al.*, 1988). Los condrocitos normales sin estimular presentan la COX-1 (Blanco *et al.*, 1999a; Geng *et al.*, 1995) y tras ser estimulados, también pueden expresar la COX-2, por otra parte, los condrocitos OA ya presentan esta isoforma sin ser estimulados.

Tanto la enzima que sintetiza el *NO* como la que sintetiza las prostaglandinas van a presentar una forma constitutiva y otra inducible, y se ha visto que ésta va a ser inducida por los mismos estímulos en ambos casos (Crofford *et al.*, 1994; Lotz *et al.*, 1995). En multitud de trabajos se muestra que entre ambos sistemas hay una relación muy estrecha, pero los resultados encontrados son bastante contradictorios ya que depende del tipo celular que se esté estudiando y la metodología empleada.

En condrocitos, el *NO* regula reacciones catabólicas y puede inducir apoptosis. Se ha visto que una gran variedad de dadores de *NO* suprimen la respiración y la generación de ATP, sugiriendo una contribución a la pérdida de matriz y mineralización del cartílago. Por todo esto, el *NO* puede ser un importante mediador de la lesión articular crónica. Además se ha visto que los condrocitos artrósicos expresan *iNOS* y producen *NO* de forma espontánea (Amin *et al.*, 1995a). Los estímulos que podemos encontrar en la MEC del cartílago artrósico persisten durante un tiempo y son, por tanto, capaces de inducir la síntesis de *NO*. Por otra parte, se ha visto que la cantidad de *NO* producido por el tejido artrósico está en relación directa con el grado de lesión que presente dicho tejido (Hashimoto *et al.*, 1998b). A través de la interferencia con las interacciones condrocito-matriz, el *NO* puede comprometer la supervivencia de la célula (Clancy *et al.*, 1997).

Aunque ha sido descrito que el *NO* causa la muerte del condrocito (Blanco *et al.*, 1995a; Notoya *et al.*, 2000), otras publicaciones más recientes han propuesto que el *NO* puede ser un regulador fisiológico de la respiración mitocondrial en condrocitos

(Johnson *et al.*, 2000; Tomita *et al.*, 2001). Además, la producción de grandes niveles de *NO* endógeno por activación de la expresión del gen de *iNOS* en condrocitos transfectados no causa la muerte de la célula (Studer *et al.*, 2000).

En cultivos de condrocitos, el *NO* por sí sólo no es citotóxico e incluso puede tener un papel citoprotector bajo ciertas condiciones de estrés oxidativo. La muerte celular del condrocito por *NO* ocurre bajo condiciones en las que se generan otras *ROS* (Del Carlo *et al.*, 2002).

Como se ha mencionado anteriormente, el *NO* es una molécula multifuncional que además juega un doble papel, ya que tanto puede ejercer un efecto positivo como negativo sobre los sistemas biológicos. Hemos visto el papel terapéutico del *NO* mediante el uso de diferentes dadores de *NO* en patologías cardiovasculares. En el caso del cartílago articular, *a priori*, el *NO* liberado por los condrocitos activados va a tener un efecto perjudicial y es un objetivo sumamente apetecible para el tratamiento farmacológico tanto en la OA como en la artritis reumatoide. Actualmente hay evidencias de que determinados agentes empleados en el tratamiento de las enfermedades reumatológicas afectan a la actividad del *NO*. Por ejemplo, se ha demostrado la inhibición de la producción del *NO* mediante el uso de AINE (Amin *et al.*, 1995b; Maneiro *et al.*, 2001b).

Existen ejemplos de compuestos utilizados en el tratamiento de la OA que ejercen efecto sobre la síntesis y actividad del *NO*. En trabajos previos realizados por nuestro grupo se vio que el condroitín sulfato inhibe *in vitro* la síntesis de *NO* por condrocitos OA humanos (Maneiro *et al.*, 2001a); por otra parte, el aceclofenaco aumenta la síntesis de IL-1ra y disminuye la producción de *NO* en condrocitos articulares OA humanos (Maneiro *et al.*, 2001b) y, por último, utilizando preparaciones de ácido hialurónico de diferentes pesos moleculares, se vio que no tenían efecto sobre la síntesis de *NO* en condrocitos OA, pero la preparación de menor peso molecular redujo la síntesis de *NO* producida tras la estimulación de las células con IL-1 β (Maneiro *et al.*, 2004).

II. OBJETIVOS

ANTECEDENTES:

1. Existen multitud de evidencias que implican al *NO* en la patología de la OA, entre las que se incluyen los altos niveles encontrados en el suero y líquido sinovial de pacientes con OA, así como el hecho de que los condrocitos OA produzcan *NO* de forma espontánea y expresen *NOS* a diferencia de los condrocitos normales.
2. Se ha relacionado el grado de OA con un mayor número de condrocitos apoptóticos.
3. El *NO* participa en el proceso de *PCD* apoptótica del condrocito.
4. Los condrocitos OA presentan alteraciones en la actividad mitocondrial respecto a los normales.

OBJETIVO GENERAL:

Examinar el efecto del *NO* sobre la viabilidad y actividad mitocondrial del condrocito articular humano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Este objetivo a su vez se ha subdividido en cuatro:

1. Estudiar el efecto de diferentes dadores de *NO* sobre la viabilidad celular de los condrocitos articulares humanos, analizando el grado de muerte inducido en los condrocitos por diferentes dadores de *NO* y caracterizando el tipo de muerte inducida en condrocitos articulares humanos por el *NO*.
2. Analizar el efecto de dadores de *NO* sobre la actividad mitocondrial en cuanto a su efecto en las actividades de los complejos de la CRM, influencia en el $\Delta\Psi_m$, en los niveles de ATP intracelular y la producción de lactato en los condrocitos articulares humanos.
3. Estudiar la capacidad de la glucosa para modificar los efectos del *NO* sobre los condrocitos articulares humanos en la viabilidad y la actividad mitocondrial de los condrocitos articulares humanos.

4. Analizar el efecto de los inhibidores de la CRM sobre la viabilidad y actividad mitocondrial de los condrocitos articulares humanos en condiciones estándar de cultivo y en condiciones de privación de glucosa.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

REACTIVOS.-

1. Dadores de óxido nítrico (NO).

Los dadores de *NO* son sustancias activas farmacológicamente que liberan, de forma espontánea o mediante vía metabólica, *NO* o compuestos redox. Las limitaciones de uso del auténtico *NO* gas (*NO*^{*}) en muchos sistemas experimentales es su corta vida media *in vivo*, esto ha conllevado el desarrollo de una gran variedad de dadores de *NO*.

Básicamente existen dos tipos de dadores de *NO*: los directos, con un grupo funcional nitroso o nitrosil y que liberan *NO* de forma espontánea, y aquellos que requieren el metabolismo enzimático para liberar dicho compuesto.

Tradicionalmente se han usado los llamados dadores de *NO* **clásicos**, como es el nitroprusiato sódico (*sodium nitroprusside*, *SNP*), pero poseen el inconveniente de que en su descomposición no liberan únicamente *NO*, de manera que las reacciones son bastante impredecibles y los efectos inducidos no pueden atribuirse únicamente a la acción de este compuesto.

Aunque los dadores clásicos, se han usado desde hace décadas, la importancia que se le ha dado desde la década de los 80 a la fisiología del *NO* ha hecho que se desarrollen nuevos dadores de *NO* que ofrecen varias ventajas respecto a los ya disponibles, como es el hecho de que liberen *NO* de manera espontánea en solución, que lo hagan durante un espacio prolongado de tiempo en cantidades predecibles, y que algunos de ellos puedan liberar *NO* de manera selectiva en ciertos tejidos. A este grupo de dadores de **nueva generación** pertenecen los llamados NOC o *dianeziumdiolates*.

Por otra parte, también existen los **dadores bifuncionales**; debido al hecho de que tanto los ésteres de nitrato como los S-nitrosotioles representan de manera esencial la funcionalidad de muchos dadores de *NO*, se modificaron ciertos agentes, ya existentes, con estos grupos funcionales con el objetivo de explotar algunos de los efectos beneficiosos del *NO* sin limitar el efecto farmacológico del otro compuesto.

A continuación describiremos con más detalle los dadores de *NO* utilizados en este trabajo.

1.1. Nitroprusiato sódico (*Sodium nitroprusside, SNP*).

El dador de *NO* *SNP* (Alexis, Lausen, Suiza) es un dador clásico ampliamente utilizado cuyo peso molecular es 298 y su fórmula molecular es: $C_5FeN_6Na_2O \cdot 2 H_2O$ (Figura 16).

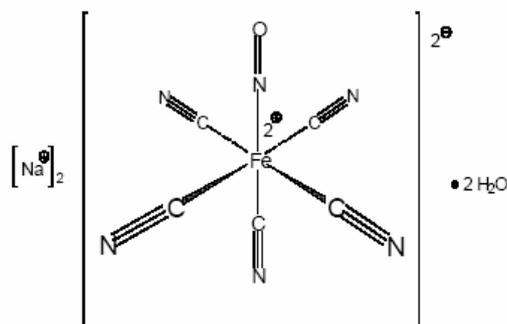


Figura 16.- Fórmula estructural del *SNP*.

El *SNP* libera *NO* de forma pH dependiente, siendo la mayor cantidad liberada la que se produce a pH 5. Hay estudios que han mostrado que se libera cianuro de *SNP* incubado con suero, plasma, sangre completa, hígado homogenado, hemoglobina y eritrocitos. El *NO* se libera del *SNP* principalmente por la descomposición de soluciones puras, por reacciones fotoquímicas o por metabolitos reductores, como por ejemplo los tioles, en orgánulos biológicos como los microsomas.

1.2. NOC-5 (3-[2-hidroxi-1-(metiletil)-2-nitrosohidrazino]-1-propanamina).

El dador de *NO* NOC-5 (EMD Biosciences Inc., La Jolla, CA), es un complejo óxido nítrico-amina estable que puede liberar espontáneamente dos equivalentes de *NO* en solución bajo condiciones fisiológicas sin ningún cofactor. La vida media en tampón fosfato salino (*Phosphate buffered saline, PBS*) pH 7,4 es de 93 minutos a 22°C. Es relativamente estable en solución alcalina (pH ≥ 10). Tiene un peso molecular de 176,2 y su fórmula molecular es: $C_6H_{16}N_4O_2$ (Figura 17).

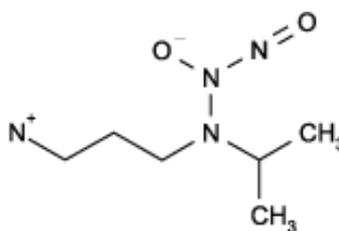


Figura 17.- Fórmula estructural del NOC-5.

1.3. NOC-12 (N-Etil-2-(1-etil-2-hidroxi-2-nitrosohidrazino) etanamina).

El dador de *NO* NOC-12 (EMD Biosciences Inc., La Jolla, CA) es similar al NOC-5 y al NOC-7 pero con una vida media del *NO* liberado mucho mayor. La vida media en *PBS* pH 7,4 es de 327' a 22°C. También es un complejo estable que libera *NO* bajo condiciones fisiológicas sin cofactor. Es relativamente estable en solución alcalina (pH≥10). Tiene un peso molecular de 176,2 y cuya fórmula es la siguiente: C₆H₁₆N₄O₂ (Figura 18).

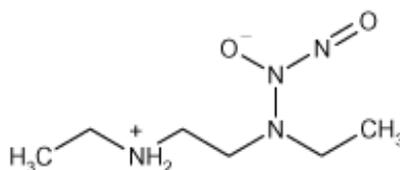


Figura 18.- Fórmula estructural del NOC-12.

2. Inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM).

2.1. Rotenona.

La rotenona (EMD Biosciences Inc., La Jolla, CA), además de ser una toxina mitocondrial, es un potente, reversible y competitivo inhibidor del complejo I de la CRM (NADH deshidrogenasa) (Higgins *et al.*, 1996). Este compuesto tiene un peso molecular de 394,4 y su fórmula molecular es: C₂₃H₂₂O₆ (Figura 19).

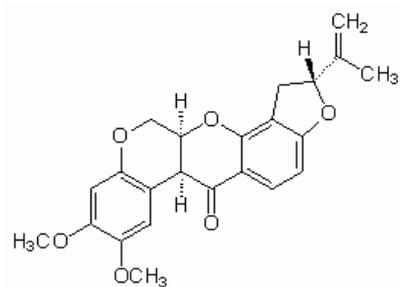


Figura 19.- Fórmula estructural de la rotenona.

2.2. Ácido 3-nitropropiónico (3-nitropropionic-acid, NPA).

El *NPA* (Sigma, St. Louis, MO) es un compuesto isoelectrónico y estructuralmente similar al succinato. Es un inhibidor específico del complejo II de la CRM.

Este compuesto tiene un peso molecular de 119,08 y su fórmula molecular es: $\text{NO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ (Figura 20).



Figura 20.- Fórmula estructural del NPA.

2.3. Antimicina A.

La antimicina A (Sigma, St. Louis, MO) es un antibiótico del género *Streptomyces* que inhibe la transferencia de electrones al complejo III de la CRM (Pietrobon *et al.*, 1981) (Figura 21).

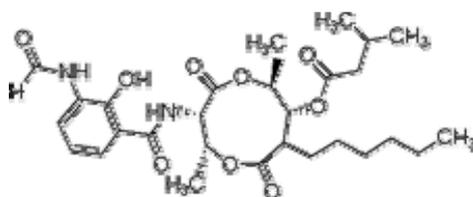


Figura 21.- Fórmula estructural de la antimicina A.

2.4. Azida sódica (NaN_3).

La NaN_3 (Sigma, St. Louis, MO) es un compuesto químico cuya fórmula es: NaN_3 y tiene un peso molecular de 65,01 (Figura 22). Inhibe de manera específica el complejo IV de la CRM (Bennett *et al.*, 1996).

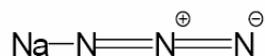


Figura 22.- Fórmula estructural de la NaN_3 .

2.5. Oligomicina.

La oligomicina (Sigma, St. Louis, MO) es un inhibidor del transporte de protones a la enzima ATP sintasa así como del transporte de iones sodio (Na^+) y potasio (K^+) a la ATP sintasa (Nagamune *et al.*, 1993). El compuesto utilizado es una mezcla de tres oligomicinas, A, B y C, aunque el 65% pertenece a la primera de ellas. El peso molecular de las tres oligomicinas oscila entre 775,1 y 805,1 (Figura 23).

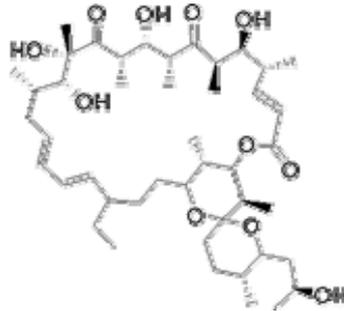


Figura 23.- Fórmula estructural de la oligomicina.

3. Reactivos empleados en el cultivo de condrocitos articulares humanos.

3.1. Colagenasa tipo IV.

La colagenasa es una enzima que hidroliza el colágeno en su conformación de triple hélice liberando fragmentos cortos y gelatina; es utilizada para la digestión de diferentes tejidos. Las preparaciones comerciales contienen otras proteasas, polisacaridasas y lipasas. Existen varios tipos, en nuestro caso utilizamos la tipo IV (Sigma, St. Louis, MO), la cual posee una baja actividad tripsina y permite el mantenimiento de la integridad de los receptores, es necesaria la presencia de iones zinc (Zn^{2+}) para su actividad.

3.2. Tripsina.

La tripsina es un miembro de la familia de las serín-proteasas. Esta enzima rompe los péptidos en el extremo carboxilo terminal de los residuos aminoácidos de lisina y arginina. El pH óptimo de la tripsina es de 7 a 9.

Puede utilizarse para levantar las células de superficies adherentes, variando la concentración utilizada en función de las diferencias en la actividad y potencia de la enzima, de los tiempos de incubación y las diferentes líneas celulares utilizadas. El hecho de incubar las células con una concentración demasiado alta o durante demasiado tiempo puede dañar las membranas celulares y matar a las células.

3.3. Penicilina-estreptomicina.

Mezcla de 5000 unidades/ml de penicilina y 500 µg/ml de estreptomicina G (Life Technologies, Paisley, UK) utilizada para evitar la contaminación de los cultivos celulares tanto con bacterias gram-negativas como gram-positivas. La penicilina interfiere en la fase final de la síntesis de la pared celular bacteriana, por otro lado, la estreptomicina cambia la forma de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, produciendo que el ARNm se lea de forma incorrecta.

4. Aislamiento de los complejos mitocondriales.

4.1. Digitonina.

La digitonina ($C_{56}H_{92}O_{29}$, peso molecular: 1229,31) (Sigma, St. Louis, MO) es un detergente no iónico suave que se utiliza para solubilizar receptores y permeabilizar membranas celulares y nucleares (Figura 24). En nuestro caso la usamos para eliminar la membrana mitocondrial externa y poder acceder a los complejos mitocondriales.

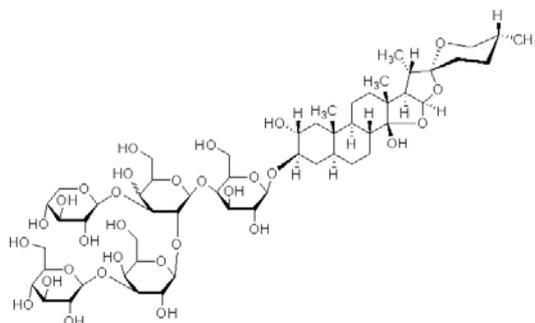


Figura 24.- Fórmula estructural de la digitonina.

5. Tinción de mitocondrias, ADN, óxido nítrico (NO) y lipoproteínas.

5.1. JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina iodada).

El compuesto fluorescente JC-1 (Figura 25) mide los cambios en el $\Delta\Psi_m$ de las células (Molecular Probes, Inc., Oregon, USA).

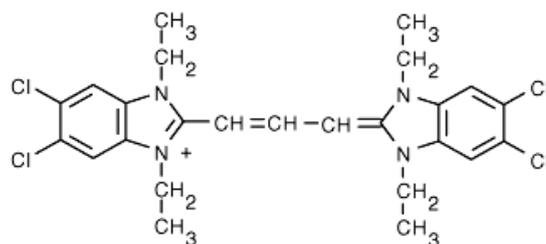


Figura 25.- Estructura del JC-1.

Este compuesto tiene un peso molecular de 652,23 y su fórmula molecular es: $C_{25}H_{27}Cl_4N_4$.

En células no apoptóticas, que tienen un $\Delta\Psi_m$ alto, JC-1 se acumula como agregados en la mitocondria, dando lugar a fluorescencia **roja** (emisión ~ 590 nm). La intensidad de esta fluorescencia es proporcional al $\Delta\Psi_m$ y existen diferencias entre diferentes tipos celulares. Sin embargo, en células apoptóticas y necróticas, las cuales tienen mitocondrias despolarizadas, JC-1 existe de forma monomérica y marca las células con fluorescencia **verde** (emisión ~ 525 nm) (Figura 26). Este compuesto puede usarse en citometría de flujo, microscopía de fluorescencia y lectores de placa fluorométricos. La aplicación más extendida de este fluorocromo es la detección de despolarización mitocondrial que ocurre en estadios tempranos de la apoptosis.

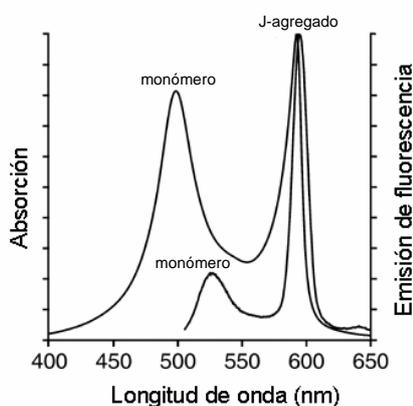


Figura 26.- Espectro de absorción y emisión de fluorescencia (excitado a 488 nm) del JC-1 en un tampón pH 8,2 que contiene 1% de dimetilsulfóxido (DMSO) (v/v).

5.2. Ioduro de propidio (IP) y ARNasa.

El colorante IP (Sigma, St. Louis, MO) es un fluorocromo que tiñe los ácidos nucleicos. Las membranas celulares íntegras excluyen el colorante, de modo que nos va a permitir diferenciar entre células viables y apoptóticas.

El IP tiene un peso molecular de 668,39 y su fórmula es: $C_{27}H_{34}I_2N_4$ (Figura 27).

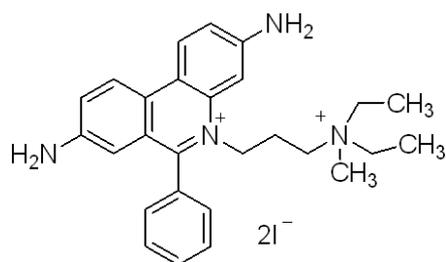


Figura 27.- Fórmula estructural del IP.

El IP es un fluorocromo que se intercala en los ácidos nucleicos incrementando su fluorescencia, esta unión es estequiométrica. Debido a que este pigmento no es específico del ADN, se une a éste independientemente de la regiones ricas en A-T, se debe tratar la muestra con ARNasa para evitar la fluorescencia colateral. Esta enzima, también conocida como ribonucleasa A ó I (Sigma, St. Louis, MO) es una única cadena polipeptídica que posee cuatro puentes disulfuro, su temperatura óptima es 60°C, pero presenta actividad entre los 15 y los 70°C. Esta enzima presenta su actividad óptima con el ARN de cadena simple.

5.3. DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorhídrico).

El compuesto DAPI (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) es un colorante que nos permite la tinción de núcleos, cuya fórmula molecular es: $C_{16}H_{15}N_5 \cdot 2HCl$ y su peso molecular es de 350,25 (Figura 28). El DAPI es un compuesto fluorescente que se une a pequeñas roturas del ADN de doble cadena, sobre todo en regiones ricas en adenina-timina (AT), formando un complejo estable cuya fluorescencia es diez veces mayor que la de dicho compuesto solo. Tiene múltiples aplicaciones, como el estudio de los cambios en el ADN, así como el análisis del contenido del ADN durante la apoptosis mediante citometría de flujo.

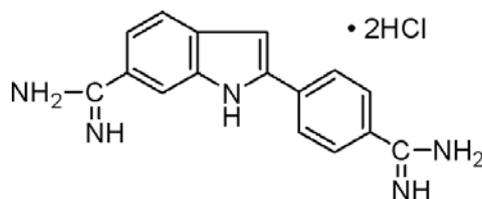


Figura 28.- Fórmula estructural del DAPI.

5.4. DAF-FM diacetato (4-amino-5-metilamino- 2',7'-difluorofluoresceína diacetato).

El DAF-FM diacetato (Molecular Probes, Inc., Oregon, USA) es un compuesto que nos va a permitir detectar el *NO* cuando se encuentra a bajas concentraciones, ya que se vuelve fluorescente cuando entra en contacto con dicho gas ($C_{25}H_{18}F_2N_2O_7$, peso molecular: 496,42) (Figura 29). Con una excitación/emisión de 495/515 nm, puede detectarse con cualquier aparato que detecte fluoresceína, como un citómetro de flujo, un microscopio de fluorescencia o un fluorímetro.

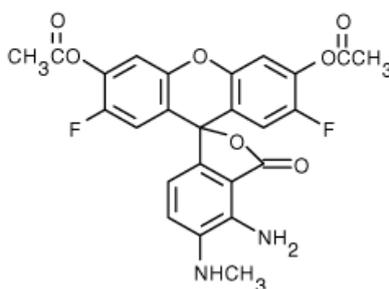


Figura 29.- Fórmula estructural del DAF-FM diacetato.

5.5. Oil-Red-O (1-[2,5-dimetil-4-(2,5-dimetilfenilazo)fenilazo]-2-naftol).

El Oil-Red-O, es un colorante que tiñe las lipoproteínas en las láminas de celulosacetato (Sigma, St. Louis, MO). Este compuesto tiene un peso molecular de 408,49 y su fórmula es: $C_{26}H_{24}N_4O$ (Figura 30).

Este colorante tiñe lípidos homofásicos, que son aquellos que se encuentran en estado puro y, precisamente por ello, están concentrados en un territorio particular de la célula, por ejemplo, una gota de grasa en el citoplasma de una célula, pero sólo los que poseen carácter neutro.

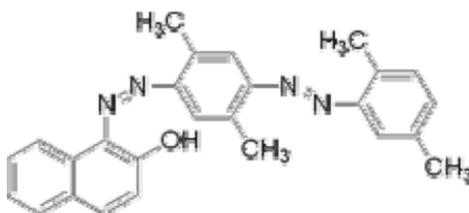


Figura 30.- Fórmula estructural del Oil-Red-O.

5.6. Sudán negro B.

El sudán negro B (Sigma, St. Louis, MO) es un colorante utilizado para eliminar o reducir autofluorescencia, además se emplea en la detección de lipoproteínas de baja densidad nativas u oxidadas y para la detección de la parte lipídica de lipoproteínas en geles de poliacrilamida. En nuestro caso nos permite detectar todos los lípidos homofásicos, ya que a diferencia del Oil-red-O que únicamente detecta los neutros, el sudán negro B los tiñe todos de forma general.

Este compuesto tiene un peso molecular de 456,6 y fórmula empírica es: $C_{29}H_{24}N_6$ (Figura 31).

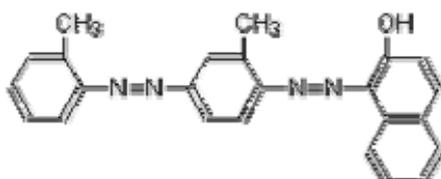


Figura 31.- Fórmula estructural del Sudán negro B.

6. Valoración de la viabilidad celular.

6.1. Azul tripán.

Este compuesto es un colorante vital ya que penetra en las células y si éstas están vivas lo eliminan, si por el contrario están muertas no son capaces y quedan teñidas de color azul, de modo que nos permite valorar la viabilidad de una muestra. El azul tripán (Sigma, St. Louis, MO) tiene un peso molecular de 960,81 y su fórmula empírica es: $C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$ (Figura 32).

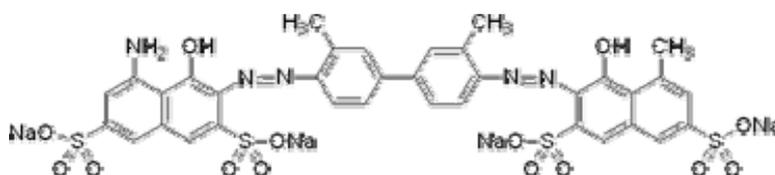


Figura 32.- Fórmula estructural del colorante azul tripán.

MÉTODOS.-

1. Cultivos celulares.

1.1. Cultivo primario de condrocitos.

Obtención de muestras: Las diferentes muestras de cartílago articular humano utilizadas en este estudio se pueden dividir en dos grupos, por una parte, el cartílago clasificado como **normal**, obtenido principalmente de rodillas procedentes de pacientes que sufrieron la amputación de alguna de sus piernas y sin historia clínica de enfermedad articular o de pacientes sometidos a recambio articular tras sufrir una fractura de cadera, siendo todas estas muestras reconocidas macroscópicamente como normales. Por otra parte, las muestras de cartílago **artrósico** provienen de pacientes que a causa del alto grado de degeneración del cartílago de alguna de sus articulaciones, son sometidos a recambio articular, tanto de cabezas femorales como de platillos tibiales.

Digestión del cartílago: En primer lugar, el cartílago se cortó con un bisturí de forma vertical quedando debajo el hueso subcondral de las cabezas femorales y los platillos tibiales. Posteriormente, las secciones de cartílago se lavaron con Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Life Technologies, Paisley, UK) suplementado únicamente con el antibiótico penicilina (100 unidades/ml)-estreptomicina (100 µg/ml) (Life Technologies, Paisley, UK). A continuación, el cartílago se troceó con un bisturí en pequeños trozos y se incubaron en tripsina 10% (Sigma, St. Louis, MO) durante 15' a 37°C, seguidamente, y tras retirar la tripsina, se incubó el cartílago en un medio de digestión que consiste en colagenasa tipo IV 2 mg/l (Sigma, St. Louis, MO) durante 12 a 16 h. Trascorrido ese tiempo se retiró este medio de digestión, que contiene las células, se le añadió DMEM nuevo para lavar las células y se centrifugó 200 x g durante 10'. Posteriormente, se contaron las células en una cámara Neubauer usando el colorante azul tripán 0,4% (Sigma, St. Louis, MO) para valorar la viabilidad de la muestra, y se sembraron en alta densidad ($3-5 \times 10^6$ en cada frasco de cultivo de 162 cm², Costar, Cambridge, MA) en DMEM suplementado con 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 1% de glutamina y 10% de suero bovino fetal (SBF) (Life Technologies, Paisley, UK). Los condrocitos se incubaron en una estufa de cultivos (Steri-cult 200 Incubator, Hucoa Erlöss) a 37°C en una atmósfera húmeda

conteniendo 5% CO₂. Estos cultivos en aproximadamente dos semanas llegaron a la confluencia y se realizó un primer subcultivo, fase en la que se usaron todas las células.

1.2. Cultivo primario de adipocitos.

Obtención de muestras: El tejido adiposo utilizado para la obtención de adipocitos procedía de piernas amputadas, las mismas de las que se extrajo el cartílago para obtener los condrocitos. Este tejido se localiza alrededor de la articulación y hay que separarlo del tejido sinovial.

Cultivo de adipocitos: El protocolo seguido para el aislamiento y cultivo de adipocitos es el de De Clercq (De Clercq *et al.*, 1997). Se pesaron aproximadamente 6 g de tejido y se troceó en pequeños fragmentos, a continuación el tejido se dejó en tampón de digestión (2 ml/g tejido) en un baño con agitación a 37°C durante 45'. Este tampón de digestión consiste en: 2 ml de tampón fosfato Hepes (Life Technologies, Paisley, UK) por cada g de tejido, 20 g/l *bovine serum albumin* (BSA) (Sigma, St. Louis, MO) y 2 g/l colagenasa II (Life Technologies, Paisley, UK). Posteriormente se filtró la suspensión con mallas de nylon de 70 µm y se centrifugó a 400 x g durante 5'. Se recogió el sobrenadante y se volvió a centrifugar de la misma forma, de modo que se obtuvo un segundo *pellet*, se juntaron los dos y se volvió a filtrar la suspensión celular. Por último, se sembraron los adipocitos. El medio utilizado para el cultivo de adipocitos es DMEM con 10% de SBF, 1% penicilina-estreptomicina, 1% antimicótico, 2% L-glutamina, 2,6 nmol/l insulina y 100 nmol/l cortisol. El cultivo se mantuvo en una estufa de cultivos (Steri-cult 200 Incubator, Hucoa Erlöss) con humedad, 5% CO₂ y 37°C durante 24 h, después se realizaron sucesivos cambios del medio de cultivo hasta que se llegó a la confluencia, así como se realizaron diferentes subcultivos hasta llegar a la densidad celular deseada.

1.3. Tratamiento de los condrocitos con diferentes dadores de óxido nítrico (NO).

Como se ha mencionado anteriormente, una vez que en el primer subcultivo los condrocitos llegaron a la confluencia se utilizaron para los experimentos. Las células se tripsinizaron, se contaron con una cámara Neubauer y, por último, se repartieron en placas con diferente densidad celular según cuál fuese la técnica que posteriormente

íbamos a realizar con ellas. Los medios de estimulación fueron dos: en primer lugar utilizamos DMEM suplementado con 100 unidades/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 1% glutamina y 5% SBF inactivado, y el segundo medio utilizado fue DMEM sin glucosa (Life Technologies, Paisley, UK) suplementado de la misma forma que el anterior. Las células se dejaron 24 h para que se repartiesen por toda la superficie de cultivo y después se estimularon con los diferentes dadores de *NO* a diferentes concentraciones y distintos tiempos (Tabla 4).

Tabla 4.- Dadores de *NO*, concentraciones y tiempos utilizados en los experimentos.

SNP	10 µM 0,5 mM 1 mM 2 mM	5, 12, 24 y 48 horas
NOC-5	10 µM 0,5 mM 1 mM 2 mM	
NOC-12	10 µM 0,5 mM 1 mM 2 mM	

1.4. Tratamiento de los condrocitos con diferentes inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM).

El procedimiento a seguir en cuanto al cultivo de los condrocitos fue igual al descrito en el apartado anterior. En este caso los condrocitos se estimularon con diferentes inhibidores de la CRM y se cuantificó el $\Delta\Psi_m$ y la viabilidad celular, respecto a las células normales control y a los condrocitos OA.

Se eligieron la rotenona como inhibidor del complejo I, el *NPA* y la antimicina A como inhibidores de los complejos II y III respectivamente, la NaN_3 como inhibidor del complejo IV y, por último, la oligomicina como inhibidor del complejo V. Las concentraciones y tiempos empleados fueron los siguientes (Tabla 5).

Tabla 5.- Inhibidores de la CRM, concentraciones y tiempos utilizados en los experimentos.

Rotenona	10 µg/ml 50 µg/ml 100 µg/ml	5, 12, 24 y 48 horas
NPA	1 mM 5 mM 10 mM	
Antimicina	10 µg/ml 25 µg/ml 50 µg/ml	
NaN₃	1 mM 5 mM 10 mM	
Oligomicina	10 µg/ml 25 µg/ml 50 µg/ml	

2. Medida de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) en condrocitos permeabilizados con digitonina.

Para medir las actividades de los complejos de la CRM, se obtuvieron los fragmentos de la membrana interna mitocondrial por rotura osmótica de la mitocondria utilizando la digitonina como detergente (Sigma, St. Louis, MO). Seguidamente dichos fragmentos se solubilizaron en un segundo detergente. La posterior resolución de la mezcla de proteínas de la membrana interna mitocondrial se realizó por cromatografía de intercambio iónico. El protocolo seguido se detalla a continuación:

Los condrocitos, al menos 10×10^6 , se recogieron por tripsinización tras haber sido estimulados previamente. A continuación se lavaron con *PBS* pH 7,4 y fueron centrifugados a $150 \times g$ durante 5' a 4°C. El *pellet* se resuspendió en 2 ml de una solución fría que contiene 20 mM MOPS (*acide N-morpholino-3-propane sulfonique*), 0,25 M sacarosa y 200 µg de digitonina (Sigma, St. Louis, MO) por cada 5×10^6 de células. Posteriormente, los condrocitos se incubaron durante 5' en hielo, la suspensión se centrifugó a $5000 \times g$ durante 3' a 4°C. A continuación, el *pellet* se trató con 1,5 ml de un tampón que contiene 20 mM MOPS, 0,25 M sacarosa y 1 mM EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*), se incubó durante 5' y posteriormente se centrifugó a $10000 \times g$ durante 3' a 4°C. El *pellet* se resuspendió en 200 µl de tampón fosfato 10 mM (KP; pH 7,4) y se congeló en nitrógeno líquido. Así permanecieron las muestras hasta

que se procedió a su descongelación para realizar una sonicación suave (5', 150W, frecuencia 50 Hz).

Los homogenados de condrocitos permeabilizados con digitonina (10-50 $\mu\text{l/ml}$ de volumen final que se va a testar) se utilizaron para medir las actividades de los complejos de la CRM y de la citrato sintasa (CS) en un espectrofotómetro DU-650 (Beckman Instruments, Palo Alto, CA). Las temperaturas de incubación fueron 30°C para el complejo I (NADH-coenzima Q1 reductasa), el complejo II (succinato deshidrogenasa), el complejo III (ubiquinol citocromo c reductasa) y la CS, y 38°C para el complejo IV (citocromo c oxidasa). Las actividades de los enzimas fueron normalizados con la actividad específica de la CS para corregir los valores por el volumen mitocondrial.

El complejo I se midió por la oxidación del NADH a 340 nm en tampón KP 20 mM (pH 8), NADH 200 μM , NaN_3 1 mM, 0,1% de albúmina sérica bovina (BSA-EDTA) y ubiquinona-1100 μM (Sigma, St. Louis, MO), en ausencia de rotenona (EMD Biosciences Inc., La Jolla, CA), que es un inhibidor específico de este complejo, y en presencia del mismo en una cantidad de 5 μM , de modo que se calcula el ratio de sensibilidad a la rotenona de oxidación de NADH. El complejo II se valoró por la reducción de 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) (Sigma, St. Louis, MO) a 600 nm en tampón tris-KP 50 mM (pH 7), KCN 1,5 mM, DCPIP 100 μM y succinato 32 mM (Sigma, St. Louis, MO). La actividad del complejo III se midió por la reducción del Cyt c a 550 nm en tampón KP 50 mM (pH 7,5), NaN_3 2 mM, BSA-EDTA 0,1%, Cyt c 50 μM (Roche Diagnostics, Penzberg, Alemania), y decil-ubiquinol 50 μM (Sigma, St. Louis, MO) en ausencia del inhibidor específico de este complejo antimicina A (Sigma, St. Louis, MO) y en presencia de 0,01 mg/ml de este inhibidor, de modo que se calculó un ratio de sensibilidad a la antimicina A de reducción del Cyt c. Se calculó la actividad del complejo IV midiendo la oxidación del NADH reducido a 550 nm en tampón KP 10 mM (pH 7) y citocromo reducido 80 μM , recién preparado para cada experimento añadiendo ditionito (Sigma, St. Louis, MO). Por último, la actividad de la CS se evaluó a 420 nm en Tris HCl 75 mM (pH 8), ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (Sigma, St. Louis, MO), acetil-coenzima a 350 $\mu\text{g/ml}$, oxalacetato 0,5 mM (Roche Diagnostics, Penzberg, Alemania) y Tritón X-100 0,1% (Sigma, St. Louis, MO).

3. Medida de los niveles de óxido nítrico (NO) mediante la reacción de Griess (cuantificación de nitritos).

Los condrocitos (5×10^4 /pocillo) se sembraron en placas de 96 pocillos y se estimularon con los diferentes dadores de NO durante 48 h, después se recogieron los sobrenadantes para la posterior medida de los nitritos (NO_2^-). La formación de NO se detectó por la acumulación de NO_2^- en estos sobrenadantes de cultivo por la reacción de Griess usando nitrito sódico (Sigma, St. Louis, MO) como estándar. Posteriormente, se incubaron 50 μl de sobrenadante con 50 μl de sulfanilamida al 1% en ácido ortofosfórico (H_3PO_4) al 5% y N-1-naptietilenediamida dihidroclorídico al 0,1% (Alexis, Lausen, Suiza) a T^a amb durante 10'. La densidad óptica se midió a 570 nm en un espectrofotómetro (Pharmacia Biotech, Ultrospec 1000).

4. Determinación de los niveles de lactato mediante colorimetría.

El lactato es un producto que se origina en la fermentación láctica a partir de la glucosa; es característica de tejidos animales en anaerobiosis, de organismos eucariotas tales como hongos y protozoos, y de las bacterias del ácido láctico.

Para cuantificar los niveles de lactato en sobrenadantes de cultivos de condrocitos estimulados durante 24 h con los diferentes dadores de NO (5×10^4 /pocillo), se usó un kit comercial (Spinreact, España). El fundamento de dicho kit se basa en el hecho de que el lactato es oxidado por la enzima lactato oxidasa a piruvato y H_2O_2 , el cual en presencia de peroxidasa, 4-aminoantipirina y 4-clorofenol forma un compuesto rosáceo. Se mezclaron 10 μl de sobrenante (previamente congelados a -80°C) con 10 μl del reactivo proporcionado por el kit y se incubaron durante 5' a T^a amb, por último, se leyó la absorbancia a 505 nm en un espectrofotómetro (Pharmacia Biotech, Ultrospec 1000). Este método es lineal hasta valores de 150 mg/dl.

5. Medida de los niveles intracelulares de ATP mediante bioluminiscencia.

El ATP es un indicador de la viabilidad celular, ya que está presente en todas las células metabólicamente activas y su concentración disminuye rápidamente cuando las células sufren apoptosis o necrosis.

Para cuantificar los niveles de ATP intracelular de condrocitos estimulados con los diferentes dadores de *NO* usamos un kit comercial de bioluminiscencia (ATPLite, PerkinElmer, Boston), el cual se basa en la producción de luz debido a la reacción del ATP con la luciferasa y la D-luciferina añadidas. La luz emitida es proporcional a la concentración de ATP dentro de unos ciertos límites.

A 100 μ l de sobrenadantes de cultivos de condrocitos (2×10^4 células/pocillo) estimulados con los dadores de *NO* durante 24 h con los diferentes medios de estimulación, se les añadió 50 μ l de una solución de lisis y tras agitar suavemente durante 5' se les añadió el sustrato enzimático (luciferasa/luciferina). El kit también nos proporciona un estándar que nos va a marcar los valores de referencia. Las lecturas se realizaron en un contador microbeta (PerkinElmer, Inc, Boston).

6. Determinación del grado de viabilidad empleando el colorante azul tripán.

Para determinar la viabilidad de los condrocitos, las células se tripsinizaron y posteriormente se lavaron con *PBS* pH 7,4, tras lo cual se contaron con una cámara Neubauer usando el colorante azul tripán 0,4% (Sigma, St. Louis, MO).

7. Citometría de flujo.

7.1. Determinación de los niveles de despolarización de la membrana mitocondrial (JC-1).

Los condrocitos (5×10^5) tras ser estimulados con los diferentes dadores de *NO* e inhibidores de la CRM, y transcurrido el tiempo correspondiente, fueron recogidos por tripsinización y lavados con *PBS* pH 7,4. Posteriormente se centrifugaron a $200 \times g$ durante 10' y, a continuación, se incubaron con el fluorocromo (10 μ g/ml) durante 15' a 37°C. Las células se volvieron a centrifugar y se lavaron con *PBS* pH 7,4. Por último, se procedió a su análisis por citometría de flujo usando un citómetro *FACScan* y el programa *Cell-Quest* (Becton Dickinson, Mountain View, CA). El umbral para el análisis se ajustó en el canal FSC (tamaño), de modo que se excluyese la mayor parte de los restos celulares. Los valores de los fotomultiplicadores se ajustaron para detectar las señales fluorescentes de los monómeros de JC-1 en el detector FL-1 (fluorescencia verde, situado ~ 390 nm) y las señales de fluorescencia de los agregados de JC-1

(fluorescencia roja, localizado ~340 nm). Los valores de las medias de las intensidades de fluorescencia para FL1 y FL2 se expresaron como canales de fluorescencia relativamente lineales. En cada experimento se analizaron al menos 20000 eventos. Para presentar los datos se usaron los valores de ratio relativo de la intensidad de fluorescencia entre agregados y monómeros (rojo/verde). La despolarización mitocondrial viene indicada por un descenso en el ratio de la intensidad de fluorescencia rojo/verde. El ratio de fluorescencia verde a roja sólo depende del potencial de membrana y no de otros factores como son el tamaño mitocondrial, forma y densidad.

7.2. Determinación del grado de apoptosis tardía (ARNasa e ioduro de propidio (IP)).

Esta técnica nos permite diferenciar la cantidad de células con núcleos hipodiploides, circunstancia típica de células apoptóticas.

Los condrocitos (5×10^5 /pocillo) se incubaron con los diferentes dadores de *NO* e inhibidores de la CRM y, una vez transcurrido el tiempo de estimulación, se recogieron por tripsinización. Se centrifugaron a $200 \times g$ durante 10' y se lavaron con *PBS* 7,4. A continuación, las células se fijaron en etanol 70% frío (Merck, KGaA, Alemania) durante 1 h a T^a amb, tras lo cual se vuelven a lavar con *PBS* pH 7,4. Por último, se incubaron con ARNasa 50 µg/ml (Sigma, St. Louis, MO) y el fluorocromo IP 100 µg/ml (Sigma, St. Louis, MO) durante 30' a T^a amb y en oscuridad. La fluorescencia del IP de los núcleos se midió por citometría de flujo en un citómetro *FACScan* y se analizó con el programa *Cell-Quest* (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Al menos se analizaron 20000 eventos usando una ventana dicromática a 560 nm y un filtro a 600 nm. Los resultados aparecen expresados como el porcentaje de núcleos hipodiploides.

8. Microscopía de fluorescencia.

En todas las técnicas englobadas dentro de este grupo se sembraron 5×10^4 células/pocillo y una vez que se repartieron de forma homogénea por toda la superficie de cultivo, fueron estimuladas con los diferentes dadores de *NO* durante 24 h.

8.1. JC-1(5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina iodada).

Trascurridas las 24 h de estimulación se retiró el sobrenadante, se lavaron las células con *PBS* 7,4 con SBF inactivado al 5%. Posteriormente, se incubaron con el fluorocromo JC-1 (10 µg/ml) durante 15' a 37°C. Por último, se volvieron a lavar y se visualizaron en el microscopio de fluorescencia (Olympus, BX-UCB) en 1 h con un filtro de amplio espectro, capaz de detectar simultáneamente las fluorescencias roja y verde.

8.2. DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorhídrico).

Una vez trascurridas las 24 h de estimulación, se lavaron las células con suero fisiológico frío. A continuación, se fijaron con acetona/etanol 70% (1:1) durante 10' a 4°C. Se dejaron secar bien las preparaciones y después se incubaron durante 10' en oscuridad con DAPI 2 µg/ml en *PBS* pH 7,4. Se lavaron brevemente con *PBS* y se montó la preparación con Glicergel (DAKO, Alemania). Se dejaron secar hasta el día siguiente a 4°C y, posteriormente, se observaron las preparaciones al microscopio de fluorescencia (Olympus, BX-UCB) con el filtro para DAPI.

8.3. DAF-FM diacetato (4-amino-5-metilamino- 2',7'-difluorofluoresceína diacetato).

En el caso de este fluorocromo, se estimularon con NOC-12 1mM tanto condrocitos como adipocitos, comparando los resultados con ambos tipos de células sin estimular.

En primer lugar se preparó el fluorocromo para que en el momento de su uso estuviese a T^a amb, en nuestro caso preparamos el DAF-FM diacetato a una concentración de 1 µM en *PBS* estéril, pH 7,4 con 5% de SBF inactivado. Una vez trascurridas las 24 h de estimulación se volvieron a lavar las células con *PBS* 7,4 con 5% de SBF inactivado. Posteriormente, se incubaron con el fluorocromo durante 40' a T^a amb y en oscuridad. De nuevo, se lavaron con *PBS* 7,4 con 5% de SBF inactivado y se incubaron durante otros 30' a T^a amb y oscuridad. Por último, se lavaron las células con *PBS* y se procedió al montaje de la *chamber slide*. Se observó en el microscopio de fluorescencia durante la siguiente hora (Olympus, BX-UCB) con el filtro de la fluoresceína.

9. Técnicas histológicas.

En todas las técnicas engobladas dentro de este grupo se pusieron 5×10^4 células/pocillo en una *chamber slide* y una vez que estuvieron bien repartidas por toda la superficie de cultivo, se les añadió su estímulo correspondiente, se puso un control sin estimular y otro pocillo estimulado con NOC-12 1 mM durante 24 h, tanto para el caso de los condrocitos como para los adipocitos.

9.1. Hematoxilina-eosina.

Trascurridas las 24 h de estimulación, las células se fijaron en metanol durante 2' a T^a amb. Sin dejar secar la *chamber slide*, se introdujo en hematoxilina de Harris (PANREAC, España) previamente filtrada durante 5'. A continuación, se puso la *chamber slide* en el chorro de agua corriente hasta que se observó un viraje en su coloración. Posteriormente se tiñó con eosina (MERK, Alemania) durante 2 a 5' (también previamente filtrada). A continuación, se deshidrataron las células con tres pases en alcohol de 96°, 10 pases en alcohol de 100°, un último pase por xilol y finalmente se montó con DePeX (VWR Internacional, Inglaterra). Posteriormente, las muestras se observaron en un microscopio óptico (Olympus-UCB).

9.2. Tinción de lípidos.

9.2.1. Oil-Red-O (1-[2,5-dimetil-4-(2,5-dimetilfenilazo)fenilazo]-2-naftol).

Una vez transcurrido el tiempo de estimulación (24 h), se lavaron las células con suero salino y, a continuación, se fijaron durante 10' con paraformaldehído al 10%. Posteriormente, se cubrieron los pocillos con alcohol isopropílico al 60% y se retiró de forma inmediata. Seguidamente se introdujo la *chamber-slide* en una solución Oil-Red-O (previamente filtrada en un baño a 56°C) durante 20'. Después se realizaron unos movimientos en zig-zag en un baño de alcohol isopropílico al 60%, tras lo cual se retiró la *chamber-slide* y se le dio un lavado en agua destilada. Las células se tiñeron durante 5' en hematoxilina de Mayer (previamente filtrada). Se dieron dos lavados de 5' en agua destilada y, por último, se montó la preparación con Glicergel (DAKO, Alemania). Las

muestras se guardaron a 4°C y se observaron a partir del día siguiente en el microscopio óptico (Olympus, BX-UCB). Los lípidos aparecen con un intenso color rojo.

9.2.2. Sudán negro B.

Una vez transcurridas las 24 h de estimulación, se fijaron las células con formol tamponado al 10% durante 2 h. Tras eliminar el formol, se añadió propilenglicol al 100% durante 5'. Se puso la solución de sudán negro B sobre las células durante 8' (colorante previamente filtrado). Se dieron unos cuantos pases en propilenglicol al 75% y se lavaron las células en agua destilada. A continuación, se tiñeron con rojo nuclear (Merck, KGaA, Alemania) al 1% durante 5' (previamente filtrado) y se volvieron a lavar con agua destilada. Por último, se procedió al montaje de la preparación con Glicergel (DAKO, Dinamarca). Posteriormente, se visualizaron las preparaciones en el microscopio óptico (Olympus, BX-UCB). Los núcleos se observan en color rojo y los lípidos en negro.

10. Microscopía electrónica de transmisión (MET).

Para caracterizar los condrocitos OA y normales estimulados con el dador de *NO* NOC-12, se estudió su ultraestructura mediante MET.

Se cogieron al menos 1×10^6 células por condición, un control tanto para células normales como para OA y células normales estimuladas durante 24 h a 37°C con NOC-12 1 mM en agitación suave. Trascurrido el tiempo de estimulación, se centrifugaron durante 10' a 200 x g y se eliminó el sobrenadante, tras lo cual se añadió el fijador (glutaraldehído 2,5% hecho en tampón cacodilato) y se dejó durante 2 h a 4°C. Posteriormente, se centrifugaron 10' a 200 x g, se cambió el fijador y se volvió a dejar durante 9-12 h a 4°C. Se lavó el *pellet* con tampón cacodilato al 2,5% varias veces (ya que la postfijación se realizó con tetróxido de osmio y son sustancias incompatibles), siempre en frío. A continuación, se postfijaron las muestras con tetróxido de osmio al 1% durante 2 h a 4°C y después se lavaron con agua destilada hervida (2 lavados de 10'). A continuación, se deshidrataron las muestras sometiéndolas a sucesivos lavados de 30' a 4°C en acetonas de concentración creciente, desde 30% a 100%, en el lavado al 70% se dejó toda la noche y en el último, 100%, se dio primero un lavado de 1 h y después otro de 30', ya a T^a amb. Posteriormente, se incluyeron en óxido de propileno

(intermediario entre la acetona y la resina) durante 30' a T^a amb. A continuación, se efectuaron los lavados en la resina, en nuestro caso se utilizó spurr (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA 19440). Se dieron 3 baños en la resina, todos a T^a amb, el primero en una proporción de 3 propileno:1 resina durante 1 h, el segundo 1 propileno:1 resina durante toda la noche a T^a amb y el tercero 1 propileno:3 resina durante 1 h. A continuación, se hicieron los bloques y se dejaron polimerizar alrededor de 72 h a 65°C. Se hicieron los cortes con el ultramicrotomo (LKB8800), los semifinos se contrastaron con azul de toulidina (Merck, KGaA, Alemania) y los ultrafinos con plomo de Reynolds (Merck, KGaA, Alemania). Por último, se visualizaron los cortes en el microscopio electrónico de transmisión (Philips, EM2085).

11. Microscopía confocal.

Mediante este tipo de microscopía se analizaron muestras teñidas tanto con el fluorocromo JC-1 como con DAF-FM diacetato, el tratamiento de las mismas fue idéntico al descrito para microscopía de fluorescencia (véanse los apartados 8.1 y 8.3 de Métodos) con la única salvedad que las *chambers-slides* que se utilizaron fueron de fondo de cobre, especiales para este tipo de microscopía. Una vez preparadas las muestras, se analizaron en el microscopio confocal Leyca.

12. Medida de los niveles de incorporación de glucosa en condrocitos articulares humanos normales y artrósicos (OA).

Para determinar los valores de incorporación de glucosa en los condrocitos articulares humanos se pusieron 2×10^5 células/pocillo en una placa de 24 pocillos tipo *visiplate* (PerkinElmer, Inc., Boston) durante 24 h en medio DMEM con 5% de SBF inactivado. Transcurrido este tiempo, se dejaron las células durante otras 24 h en la estufa de cultivos a 37°C pero con medio DMEM sin glucosa. Posteriormente, se estimularon las células con los diferentes dadores de *NO* a concentraciones patológicas pero fisiológicas, es decir, del orden de μM durante 24 h en DMEM sin glucosa. Una vez transcurrido el tiempo de estimulación, se añadió a las células 2-deoxi-[³H] glucosa (PerkinElmer, Inc., Boston) a una concentración de 10 μCi en DMEM sin glucosa a tres tiempos: 1 h, 15' y 0' (tiempo que tomamos como nuestro control). Durante todo el proceso de estimulación, las células permanecieron en la estufa de cultivos. Una vez

trascurrido el tiempo de marcaje, se eliminó el medio con la glucosa tritiada y se lavaron las células con *PBS* pH 7,4 estéril. Tras retirar este tampón, se añadieron 50 µl de solvente (PerkinElmer, Inc., Boston) para lisar las células y poder detectar la cantidad de glucosa que habían incorporado, la placa se puso en un agitador a máxima velocidad durante 5' hasta que las células estuvieron completamente lisadas. Por último, se añadieron 500 µl de líquido de centelleo (*Última Gold*, PerkinElmer, Inc. Boston) y tras agitar la placa durante unos minutos se procedió a su lectura en el contador microbeta (PerkinElmer, Inc. Boston). Los valores obtenidos fueron corregidos por mg de proteína/pocillo.

13. Expresión de los receptores de glucosa (GLUTs) en condrocitos articulares humanos normales y artrósicos (OA).

13.1. Expresión del ARNm de los receptores de glucosa (GLUTs) por RT-PCR y PCR a tiempo real.

La extracción del ARN total de los condrocitos normales (n=13) y OA (n=14), así como de normales estimulados con diferentes dadores de *NO* (n=7) se realizó mediante el reactivo TRIzol® (Life Technologies Ltd. Poole, UK): 1 ml de TRIzol/10 x 10⁶ células. Después de añadir cloroformo (0,2 ml/ml TRIzol), las muestras se centrifugaron, se separó la fase acuosa y el ARN se precipitó en isopropanol. Posteriormente se lavó con etanol 95% y por último, se resuspendió en agua con DEPC (agua tratada con dietilpirocarbonato).

La cantidad de ARN fue medida en un espectrofotómetro (Pharmacia Biotech, Ultrospec 1000) a 260 nm; el ratio de la absorbancia del ARN 260/280 y su patrón mediante electroforesis fue utilizado para evaluar su calidad.

A continuación, las muestras de ARN se trataron con ADNasa I (Life Technologies Ltd. Poole, UK) durante 25' a T^a amb, se le añadió EDTA y se calentaron en un bloque térmico durante 10' a 65°C.

La retrotranscripción (RT) se realizó durante 30' a 45°C, y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) durante 2' de desnaturalización a 94°C, 45'' de hibridación a 60°C y 1' de elongación a 72°C durante 35 ciclos. La secuencia de los cebadores específicos para humanos (GLUT1-GLUT12) fue obtenida de Richardson *et al.* (2003) (Tabla 6).

Los productos de PCR se visualizaron con luz UV en gel de 1,5% de agarosa marcado con 0,1 µg/ml de bromuro de etidio (Bio-Rad Laboratorios, Alfred Nobel Drive, Hércules, California, USA).

Tabla 6.- Secuencia de los cebadores utilizados en la RT-PCR y tamaños de amplificación de los productos obtenidos.

Gen		Secuencia	Producto (pb)
GLUT 1 (SLC2A1)	Sentido	5'-TCC ACG AGC ATC TTC GAG A-3'	392
	Antisentido	5'-ATA CTG GAA GCA CAT GCC C-3'	
GLUT 2 (SLC2A2)	Sentido	5'-CAC TGA TGC TGC ATG TGG C-3'	521
	Antisentido	5'-ATG TGA ACA GGG TAA AGG CC-3'	
GLUT 3 (SLC2A3)	Sentido	5'-TTC AAG AGC CCA TCT ATG CC-3'	457
	Antisentido	5'-GGT CTC AGG GAC TTT GAA GA-3'	
GLUT 4 (SLC2A4)	Sentido	5'-GGC ATG TGT GGC TGT GCC ATC-3'	413
	Antisentido	5'-GGG TTT CAC CTC CTG CTC TAA-3'	
GLUT 5 (SLC2A5)	Sentido	5'-CCC TTG ACG TTG CTG TGGT-3'	322
	Antisentido	5'-ACA GTG ATG AAG AGC TGG GG-3'	
GLUT 6 (SLC2A6)	Sentido	5'-GGG TGT TCC TGG CCA CC-3'	350
	Antisentido	5'-GCC TGG GGG AGC AAT CTC-3'	
GLUT 7 (SLC2A7)			-
GLUT 8 (SLC2A8)	Sentido	5'-CAT GCT GCT TCT CAT GTG C-3'	681
	Antisentido	5'-CAT GAG CCA GTT GGT GAG G-3'	
GLUT 9 (SLC2A9)	Sentido	5'-CAT CAA GGC CTT TTA CAA TGA GT-3'	900
	Antisentido	5'-AAG CCA CCA ATG AGG AGG-3'	
GLUT 10 (SLC2A10)	Sentido	5'-GGT CTT TGT CAG TGC CTT CT-3'	633
	Antisentido	5'-GAG ATG TGC AAG TCA ATG GG-3'	
GLUT 11 (SLC2A11)	Sentido	5'-GCG CTG CCG GCA TIG GTG GG-3'	501
	Antisentido	5'-CAC CTA GGA GCT CCC TGA G-3'	
GLUT 12 (SLC2A12)-set A	Sentido	5'-TCC CTC GTC ATT GGA GCC CTC CTT G-3'	812
	Antisentido	5'-GCC ATC ACA GAG GAG CCA ATG CAG A-3'	
GLUT 12 (SLC2A12)-set B	Sentido	5'-TCC ATG GCT GGA AGT ACA T-3'	1200
	Antisentido	5'-TAA GTG TTC TGG CAC TAT C-3'	
β-actina (HUMACTA1)	Sentido	5'-TTC AAC TCC ATC ATG AAG TGT GAC GTG-3'	309
	Antisentido	5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC ATT-3'	

Amplificación por PCR a tiempo real del GLUT-4. En primer lugar se llevó a cabo la retrotranscripción de ARN a ADNc, a partir de 1 µg de ARN aislado de condrocitos normales en cultivo. En la mezcla de reacción se incluyeron primers oligo-dT a 2,5µM, tampón 1x, inhibidor de ARNasa (20U), dNTP (1mM de cada) y retrotranscriptasa reversa (10U). A continuación se incubó la mezcla a 55°C durante 30', seguido de 85°C durante 5' para inactivar la enzima. Finalmente, la reacción se detuvo sometiendo a las

muestras a una temperatura de 4°C. Para llevar a cabo la amplificación por PCR, las muestras y un control negativo fueron analizados por duplicado en un termociclador LightCycler 2.0 de Roche (Roche Diagnostics, Penzberg, Alemania). El ensayo de expresión de GLUT-4 fue diseñado a través de la aplicación web <http://www.universalprobelibrary.com>, a través del cual se obtuvo la secuencia más óptima de los cebadores (GLUT-4-s: 5'-CTCCGTGGCCATCTTTTC-3' y GLUT-4-a: 5'-AGCATGGCCCTTTTCCTT-3') de la sonda Taqman. En un volumen final de 20 µl se añadieron cebadores a una concentración final de 0,5 µM, 0,2 µl de sonda Taqman, 4 µl de Master Mix de Roche, 2 µl de ADNc y el resto hasta 20 µl de agua bidestilada. La mezcla se amplificó en base al siguiente protocolo: una incubación inicial para la activación de la Taq consistente en 95°C durante 10', seguida de una fase de amplificación de 50 ciclos a 95°C, 10'', 60°C durante 30'' y una extensión final a 72°C durante 20''. Al final de cada fase de elongación se capturaba y medía la fluorescencia emitida, la cual era directamente proporcional al producto de PCR amplificado. Finalmente, el último ciclo consistió en un enfriamiento a 40°C durante 30''. Se utilizó *HPRT-1* (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*) como gen de referencia.

13.2. Análisis proteico de los receptores de glucosa (GLUTs) por western blot.

Obtención de extractos proteicos: Aproximadamente se recogieron 5×10^6 de células en PBS pH 7,4 con un *escraper* y se centrifugaron durante 10' a 200 x g. Se volvieron a lavar con PBS y por último, se resuspendieron en tampón de lisis frío (Tris-base 50 mM, NaCl 150 mM y EDTA 2 mM) al que se le añadió justo en el momento de su uso un cocktail de inhibidores de proteasas (1 ml/100 ml lisado), 0,2% Tritón X-100, 0,3% NP-40 y 0,1 mM PMSF (Sigma, St. Louis, MO) y se mantuvieron en hielo durante 1 h. Posteriormente, se centrifugó a 17500 x g durante 10' a 4°C y se recogió el sobrenadante, éste se guardó a -80°C hasta su posterior uso.

Cuantificación de proteínas y preparación de las muestras: La cuantificación de la proteínas se llevó a cabo mediante un kit comercial: DC Protein Bio Rad (Bio-Rad Laboratorios, Alfred Nobel Drive, Hércules, California, USA) y posteriormente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Pharmacia Biotech, Ultrospec 1000) a 750 nm. Para igualar las concentraciones de los diferentes extractos se adicionó tampón de lisis, tampón de carga *SDS-PAGE* (*Sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel*

electrophoresis) 5X y 10% β -mercaptoetanol. Por último, se hirvieron durante 5' y se utilizaron directamente en la electroforesis.

Electroforesis de proteínas, transferencia a membranas e *immunoblotting*: La separación de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida al 10% con SDS (*SDS-PAGE*) (Tabla 7), se cargaron en cada caso 30 μ g de proteína y se utilizó el sistema Mini-Protean II Cell (Bio-Rad Laboratorios, Alfred Nobel Drive, Hércules, California, USA) a un voltaje constante de 120-150 V.

Tabla 7.- Composición de los geles de poliacrilamida utilizados para la separación de proteínas en la técnica de western blot.

	GEL DE SEPARACIÓN (10%)	GEL DE CONCENTRACIÓN (3%)
Acrilamida/Bisacrilamida	3,3 ml	1,6 ml
Tris-base 1.5 M	2,5 ml (pH 8,8)	2,5 ml (pH 6,8)
Agua destilada	4 ml	5,8 ml
SDS 10%	0,1 ml	0,1 ml
Persulfato amónico 10%	0,1 ml	0,05 ml
TEMED	10 μ l	10 μ l

Posteriormente, las proteínas separadas en los geles se transfirieron a membranas de *PVDF (Polyvinylidene fluoride)* (previamente equilibradas en metanol y agua destilada) en cubetas de transferencia Mini Trans-Blot Transfer Cell (Bio-Rad Laboratorios, Alfred Nobel Drive, Hércules, California, USA) en tampón de transferencia con 10% metanol y se aplicó un voltaje de 18 V durante 1 h. A continuación, se lavó la membrana durante 15' con *PBS* pH 7,4 y se procedió al bloqueo de la misma con 5% de leche desnatada en tampón de bloqueo durante 1 h a T^a amb. Se lavó sucesivamente la membrana con tampón de lavado y se incubó durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente, preparado a su vez en tampón de bloqueo (Tabla 8). Tras lavar sucesivas veces la membrana con tampón de lavado para eliminar los excesos de anticuerpo primario, éste se detectó con el uso de anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa (Tabla 9) que se incubaron durante 1 h a T^a amb en tampón de bloqueo. Antes de proceder al sistema de revelado con ECL (Amersham Pharmacia, Uppsala, UK) se lavaba sucesivas veces la membrana para obtener una mejor calidad de imagen en el aparato de revelado (Intelligent Dark Box, Fujifilm, TD). En algunas ocasiones se procedía a la deshibridación de las membranas para volver a incubarlas con

otro anticuerpo (tubulina) para monitorizar la cantidad de proteína cargada en cada pocillo (Tabla 9).

Tabla 8.- Tampones utilizados para la técnica de western blot.

NOMBRE	COMPOSICIÓN
Tampón de lisis	50 mM Tris-base, 155 mM NaCl, EDTA 2 mM, 0,2% Tritón x-100, 0,3% Igepal ca-630, 0,1 mM PMSF, cocktail de inhibidores de proteasas (1ml/100 ml lisado)
Tampón de carga (5X)	10% SDS, 30% glicerol, 250 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1 mg/ml azul de bromofenol, 10% β-mercaptoetanol (momento de su uso), agua destilada
Solución acrilamida/bisacrilamida (30%)	Acrilamida/bisacrilamida (29:1)
Tampón de transferencia (1X, pH 8,2-8,4)	50 mM Tris-base, 40 mM glicina, 10% metanol (en el momento de su uso)
Tampón de electroforesis (1X)	25 mM Tris-base, 200 mM glicina, 3,5 mM SDS
Tampón de lavado (1x, pH 7,5)	10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1% Tween-20
Tampón de bloqueo	Tampón de lavado, 5% leche desnatada

Tabla 9.- Anticuerpos empleados en este trabajo.

Anticuerpo	Origen	Proteína que reconoce	Dilución	Procedencia
Anti-GLUT1	Conejo	GLUT-1	1:500	Sta. Cruz
Anti-GLUT2	Conejo	GLUT-2	1:500	USBiological
Anti-GLUT3	Conejo	GLUT-3	1:1000	Acris
Anti-GLUT4	Ratón	GLUT-4	1:500	San Antonio
Anti-GLUT5	Conejo	GLUT-5	1:1000	San Antonio
Anti-GLUT8	Cabra	GLUT-8	1:500	San Antonio
Anti-GLUT9	Conejo	GLUT-9	1:500	Sta. Cruz
Anti α-tubulina	Ratón	α-tubulina (aminoácidos 149-448)	1:3000	Sta. Cruz
Goat	Conejo	Anticuerpo primario de cabra	1:1000	Dako
Rabbit	Cabra	Anticuerpo primario de conejo	1:1000	Sta. Cruz
Mouse	Cabra	Anticuerpo primario de ratón	1:1000	Sta. Cruz

14. Análisis estadístico.

El análisis de los datos se llevó a cabo con el paquete estadístico *SPSS* versión 12.0 (*SPSS*, Chicago, IL). Los resultados aparecen expresados como la media ± desviación típica (DT). Las células de los diferentes donantes no se mezclaron entre sí en ninguno de los experimentos y se analizaron todas las condiciones por duplicado. Las comparaciones entre grupos se llevaron a cabo usando el test de *U-Mann-Whitney* de dos colas.

Los *P* valores considerados estadísticamente significativos fueron aquellos con un nivel de significación de $P \leq 0,05$.

IV. RESULTADOS

1. EFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO (*NO*) SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE LOS CONDROCITOS ARTICULARES HUMANOS.

1.1. Diferencias en la liberación de óxido nítrico (*NO*) por diferentes dadores.

Se analizaron los niveles de síntesis de *NO* por los diferentes dadores de *NO* a estudio, para escoger las concentraciones y los tiempos de estimulación en los experimentos posteriores. La formación de *NO* se detectó por la acumulación de NO_2^- en sobrenadantes de cultivo por la reacción de Griess. Los resultados se muestran en la Figura 33 donde se puede ver que a las mismas concentraciones, el *SNP* libera mucha menos cantidad de NO_2^- que los *NOC*, del orden de 800 veces menos con las dos concentraciones mayores empleadas (1 y 2 mM); concretamente el *NOC-12* libera algo más pero con poca diferencia respecto al *NOC-5*. Se puede observar que el factor que más influye es la concentración, ya que prácticamente no se observan diferencias en la liberación de NO_2^- entre 5 y 48 h para una concentración dada. En el caso de los *NOC*, existe una clara diferencia en la liberación de NO_2^- entre la menor concentración de las utilizadas (0,5 mM) y las dos más altas (1 mM y 2 mM).

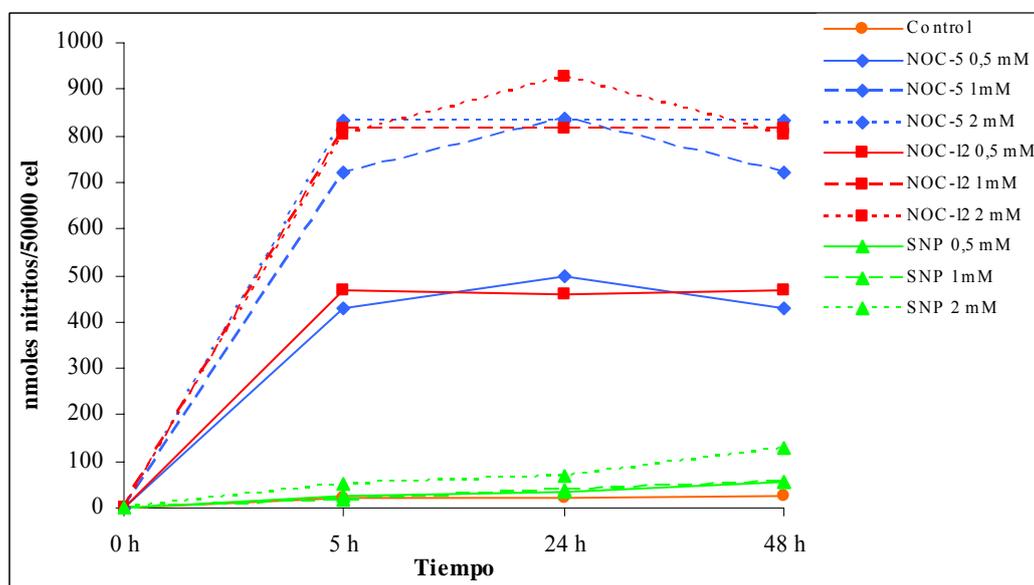


Figura 33.- Síntesis de NO_2^- por diferentes dadores de *NO* en función del tiempo y concentración en condiciones estándar de cultivo.

1.2. Efecto del óxido nítrico (*NO*) sobre la viabilidad celular de los condrocitos articulares humanos.

A continuación, estudiamos el efecto de los diferentes dadores de *NO* sobre la viabilidad de los condrocitos articulares humanos normales.

Para validar la técnica empleada para la cuantificación de la viabilidad celular, se compararon los resultados obtenidos mediante la observación directa del efecto del dador de *NO* *SNP* sobre la morfología celular de los condrocitos normales, con los datos obtenidos mediante la técnica del IP que nos permite cuantificar la cantidad de ADN hipoploide, que se relaciona con la cantidad de células muertas o apoptóticas (Figura 34).

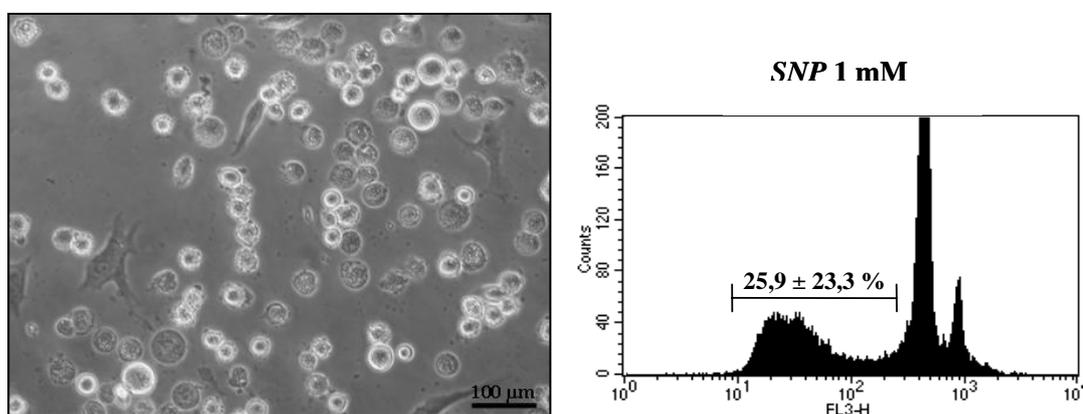


Figura 34.- Efecto del dador de *NO* *SNP* a las 24 h sobre la viabilidad de los condrocitos articulares humanos normales.

En condiciones estándar de cultivo encontramos grandes diferencias entre los efectos producidos por los diferentes dadores de *NO* sobre los condrocitos normales.

Como ejemplo de dador de *NO* que compromete de manera importante la viabilidad de los condrocitos está el *SNP*. Como se puede observar en la Figura 35, y aunque existe una gran variabilidad en los resultados obtenidos, vemos que este compuesto induce muerte celular en los condrocitos normales. Las células normales estimuladas con *SNP* 2 mM presentan un porcentaje de células muertas de $26,45 \pm 20,40$ (n=7) respecto a los condrocitos normales sin estimular $1,28 \pm 1,22$ (n=21). Este dador de *NO* induce muerte celular de manera significativa a todas las concentraciones y tiempos estudiados.

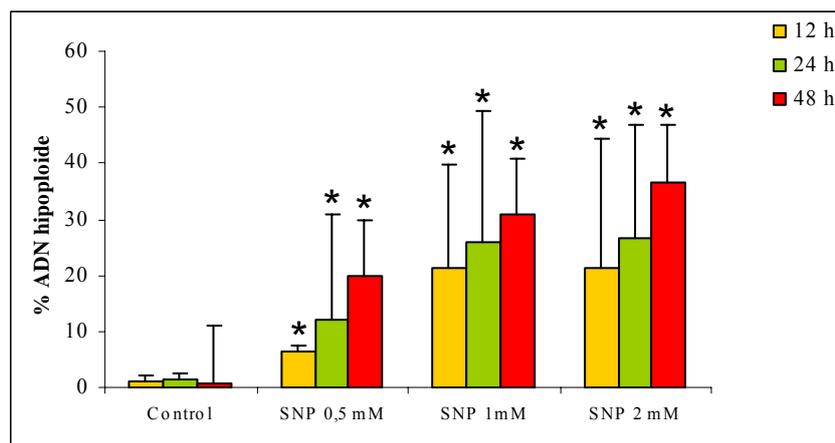


Figura 35.- Efecto del dador de *NO* *SNP* sobre la muerte celular de los condrocitos articulares humanos normales; las barras muestran la media y la DT. * = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos no tratados.

Los dos siguientes dadores de *NO* estudiados son dos compuestos que pertenecen al grupo de dadores de nueva generación.

El primero de estos dadores es el **NOC-5**, este compuesto prácticamente no induce ningún efecto sobre la viabilidad del condrocito, únicamente a las 48 h y a la mayor concentración de las empleadas (2 mM), de modo que el porcentaje de células muertas respecto al control normal sin estimular es: $4,33 \pm 4,69$ (n=4) vs. $0,83 \pm 0,49$ (n=15) (Figura 36).

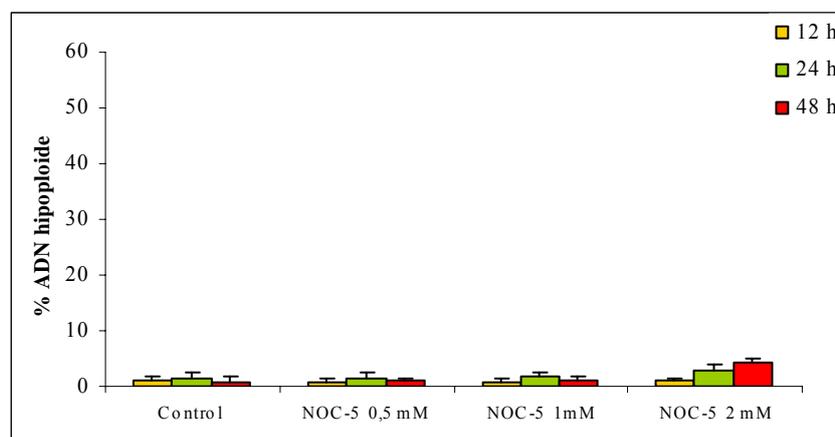


Figura 36.- Efecto del NOC-5 sobre la muerte celular de los condrocitos articulares humanos a diferentes tiempos y concentraciones; las barras muestran la media y la DT. * = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos no tratados.

El otro compuesto estudiado perteneciente a los dadores de nueva generación es el **NOC-12**, de manera contraria a los resultados encontrados con el dador anterior, este compuesto redujo la viabilidad del condrocito normal aunque no de forma tan acusada como el *SNP*. El NOC-12, exceptuando cuando se utilizó a una concentración de 0,5

mM y a las 12 h, indujo muerte celular en todos los casos; por ejemplo, a las 48 h y a la concentración mayor de las empleadas indujo un porcentaje de células no viables de $21,59 \pm 8,51$ (n=5) respecto al control de células normales sin estimular: $0,83 \pm 0,49$ (n=15) (Figura 37).

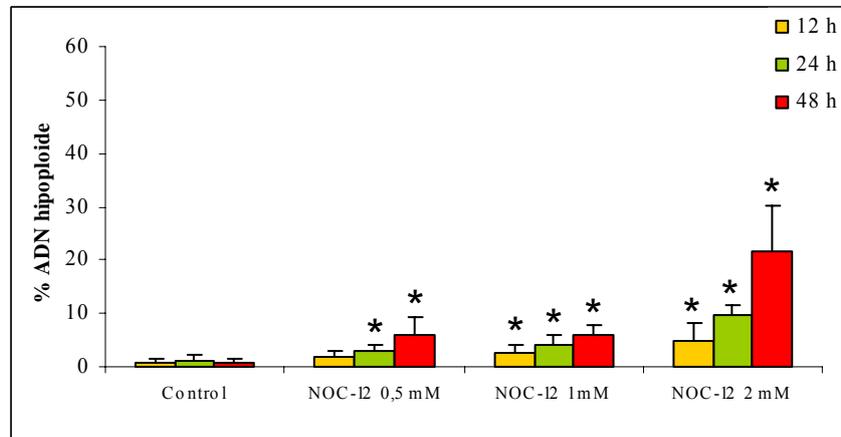


Figura 37.- Efecto del dador de *NO* NOC-12 sobre la muerte celular de condrocitos articulares humanos normales, las barras muestran la media y la DT. * = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos no tratados.

A modo de resumen mostramos los histogramas obtenidos mediante citometría de flujo, donde se puede observar el efecto de los diferentes dadores de *NO* sobre el porcentaje de ADN hipoploide de condrocitos normales respecto a las células sin estimular (Figura 38).

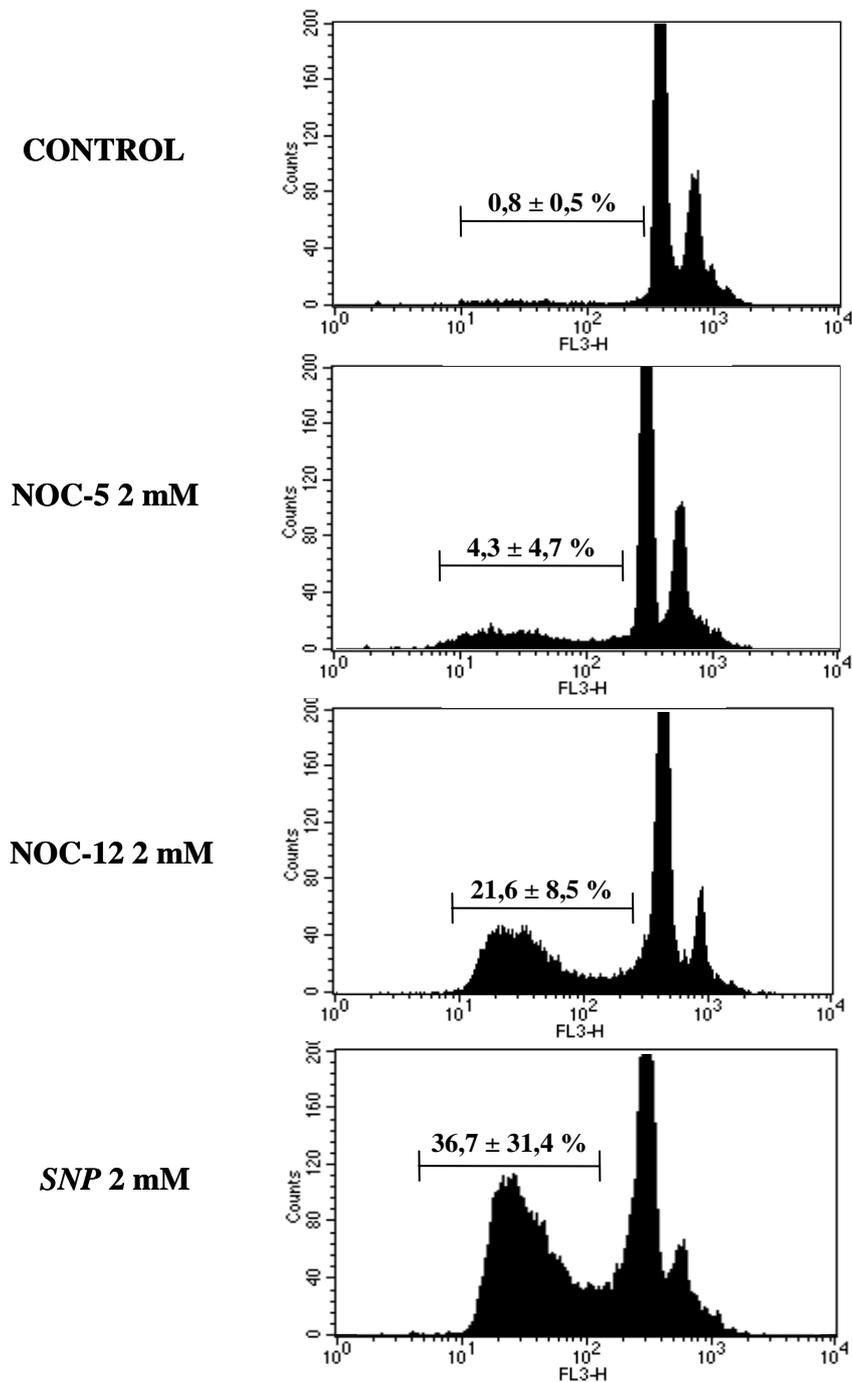


Figura 38.- Representaciones gráficas obtenidas del citómetro de flujo donde se muestra el grado de muerte celular inducido por los dadores de *NO* en condrocitos normales a las 48 h en condiciones estándar de cultivo. Los resultados aparecen como la media \pm DT.

1.3. Estudio morfológico del efecto del óxido nítrico (*NO*) sobre la viabilidad de los condrocitos articulares humanos.

La siguiente aproximación para ver las diferencias en los efectos sobre la viabilidad celular que producen los diferentes dadores de *NO* empleados, fue la observación directa de los posibles cambios en la morfología celular de los condrocitos normales tras la estimulación con los dadores NOC-5, NOC-12 y *SNP*.

1.3.1. Análisis celular mediante microscopía óptica de los condrocitos articulares humanos.

Tras realizar un análisis mediante microscopía óptica para ver los posibles cambios morfológicos inducidos en los condrocitos normales después de ser estimulados con los diferentes dadores de *NO*, se observaron grandes diferencias entre ellos.

Al comparar la morfología celular de los condrocitos normales sin estimular (Figuras 39A y a) con la adquirida tras ser estimulados con el dador clásico de *NO* *SNP*, se observaron los típicos cambios morfológicos que caracterizan al proceso apoptótico, es decir, pérdida total de adherencia a la superficie de cultivo, falta de integridad de la membrana celular, fragmentación celular y contenido celular completamente destruido (Figuras 39B y b).

Encontramos grandes diferencias después de estimular a los condrocitos normales con NOC-5 y NOC-12. Mientras que con el primero de estos dadores las células no presentaban cambios morfológicos respecto a los condrocitos control (Figuras 39C y c), la estimulación con NOC-12 originó la aparición de unas llamativas vacuolas distribuidas por todo el citoplasma de la célula a partir de las 12 h de estimulación, además las células permanecían adheridas a la superficie de cultivo y aparentemente tanto la membrana citoplasmática como el núcleo se mantenían íntegros (Figuras 39D y d). Posteriormente, comprobamos que si retirábamos el estímulo del medio y dejábamos las células con medio de cultivo nuevo, al cabo de al menos 72 h estas vacuolas desaparecían y las células presentaban el aspecto inicial.

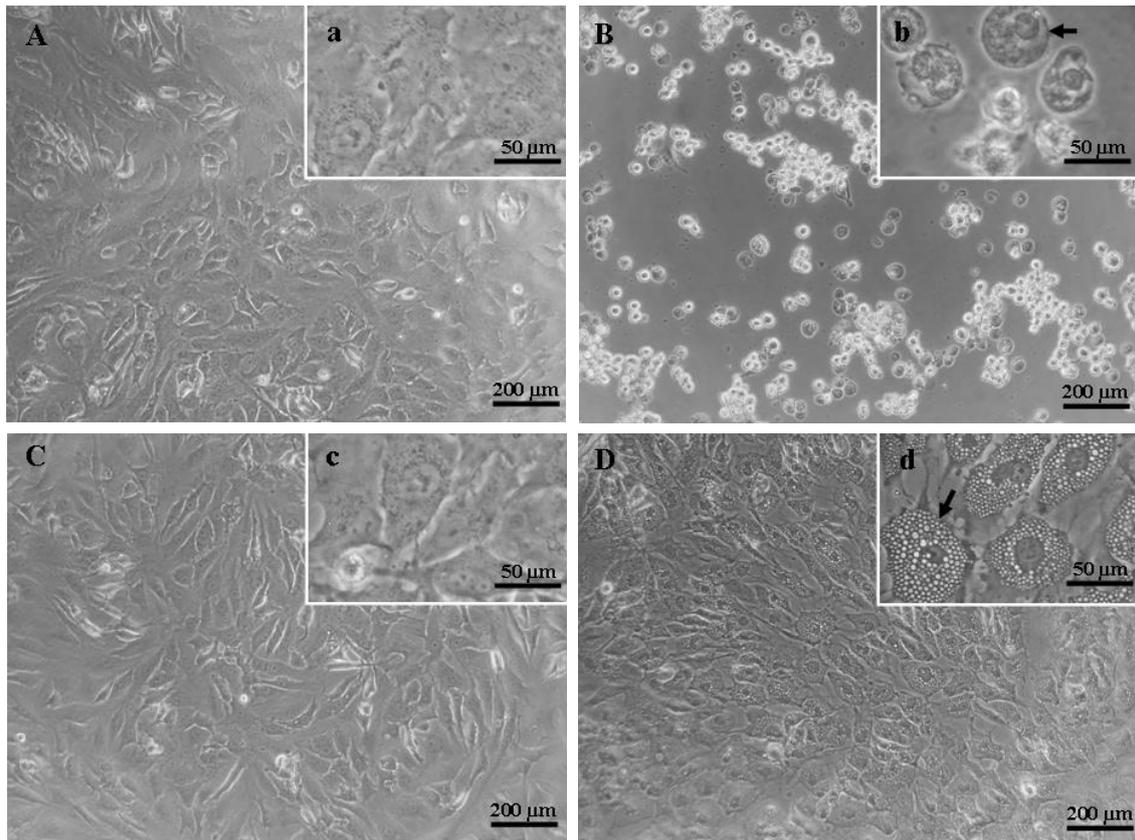


Figura 39.- Diferencias morfológicas en cultivos celulares de condrocitos normales control y estimulados con los diferentes dadores de *NO* empleados en el estudio. **A** y **a**.- Condrocitos normales control. **B** y **b**.- Condrocitos normales estimulados con *SNP* 1 mM durante 24 h. Nótese la pérdida de integridad celular (↑). **C** y **c**.- Condrocitos normales estimulados con *NOC-5* 1 mM durante 24 h. **D** y **d**.- Condrocitos normales estimulados con *NOC-12* 1 mM durante 24 h. Nótese la presencia de vacuolas citoplasmáticas (↑).

1.3.2. Estudio del núcleo de condrocitos articulares humanos por inmunofluorescencia.

Para el estudio de los cambios nucleares inducidos por los diferentes dadores de *NO* se empleó DAPI, colorante ampliamente utilizado para ver la fragmentación de los núcleos típica del proceso apoptótico.

Al comparar el marcaje con DAPI de los condrocitos normales control (Figura 40A) con los estimulados con el dador de *NO SNP*, se observó un incremento significativo de la intensidad de fluorescencia en estos últimos (Figura 40B), además los condrocitos control mostraron una morfología nuclear homogénea (Figura 40a). Sin embargo, en el caso de los condrocitos estimulados con *SNP*, se observó la típica fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos característicos de la apoptosis (Figura 40b).

Cuando se estimularon los condrocitos normales con el dador de *NO* NOC-5 (Figuras 40C y c) no encontramos prácticamente ninguna diferencia respecto al control (Figuras 40A y a), ya que no se observaron núcleos fragmentados y sólo un pequeño porcentaje presentó la típica coloración brillante, característica de un aumento de intensidad de fluorescencia del DAPI.

En las células estimuladas con NOC-12, aumentó la proporción de células con mayor intensidad de fluorescencia del DAPI respecto al control (Figura 40D), además, los núcleos presentaron un aspecto globuloso aunque no fragmentado (Figura 40d).

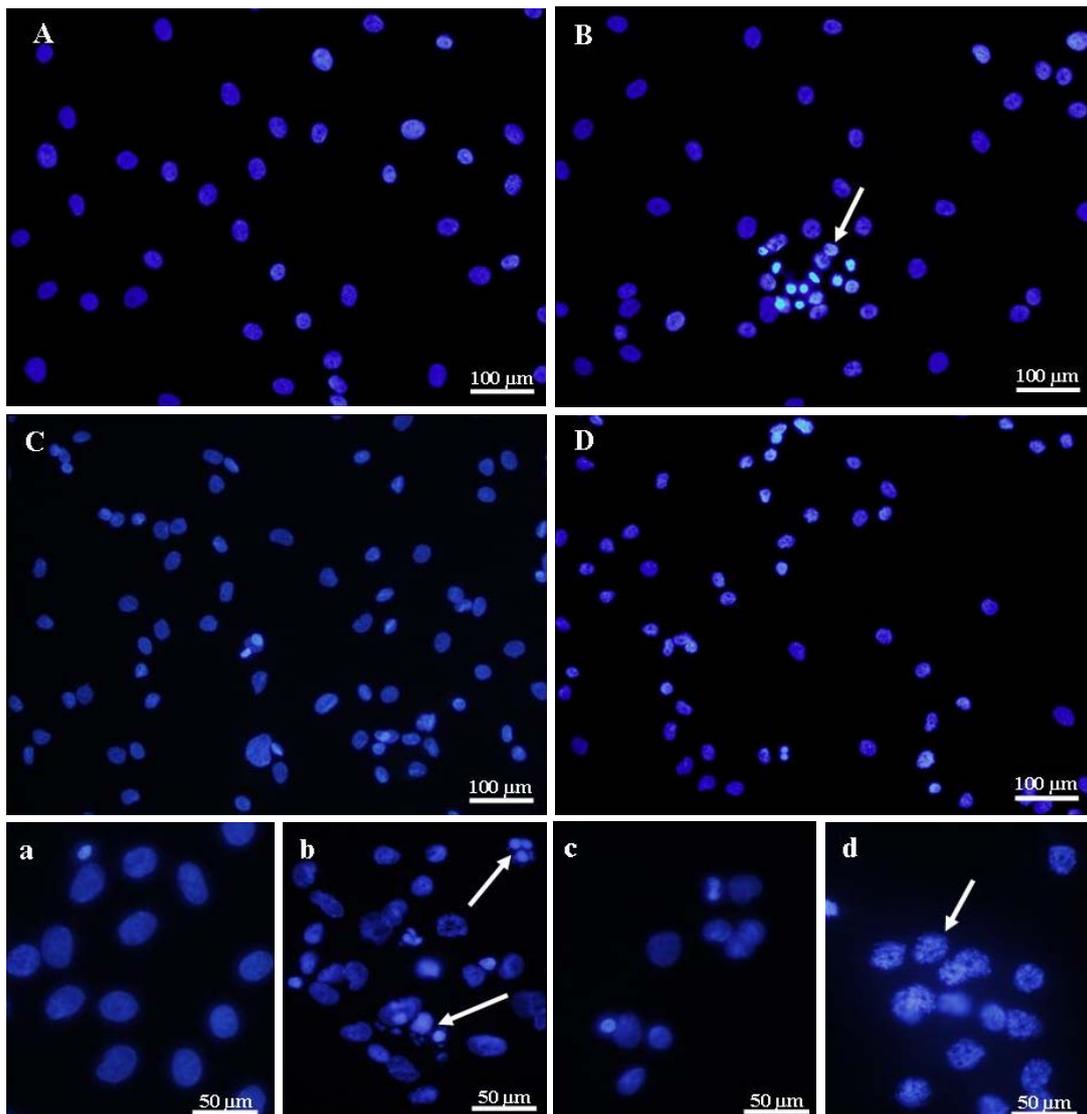


Figura 40.- Fotografías de condrocitos normales control y estimulados con los diferentes dadores de *NO* teñidos con DAPI obtenidas mediante microscopía de fluorescencia. **A** y **a**.- Condrocitos normales control. **B** y **b**.- Condrocitos normales estimulados con *SNP* 1 mM durante 24 h. Nótese el aumento de intensidad de fluorescencia así como la fragmentación de los núcleos (↑). **C** y **c**.- Condrocitos normales estimulados con NOC-5 1 mM durante 24 h. **D** y **d**.- Condrocitos normales estimulados con NOC-12 1 mM durante 24 h. Nótese el aspecto globuloso de los núcleos (↑).

1.3.3. Empleo de técnicas citoquímicas para la caracterización de las vacuolas.

Para analizar la posible naturaleza lipídica de las vacuolas inducidas por el NOC-12 sobre los condrocitos articulares, las primeras técnicas que realizamos fueron citoquímicas.

1.3.3.1. Hematoxilina-eosina.

Tras la realización de la técnica de hematoxilina-eosina, se observó un fino anillo de citoplasma alrededor de los acúmulos de grasa del tejido adiposo (Figura 41A) y de las gotas lipídicas presentes en los adipocitos (Figura 41B). Este anillo se tiñó fundamentalmente de color rosa por el colorante eosina. Sin embargo, en los condrocitos, el citoplasma circundante o la membrana de las vacuolas inducidas por la estimulación con el dador de *NO* NOC-12, adquirió una tonalidad más azulada, es decir, se tiñó con la hematoxilina (Figura 41C).

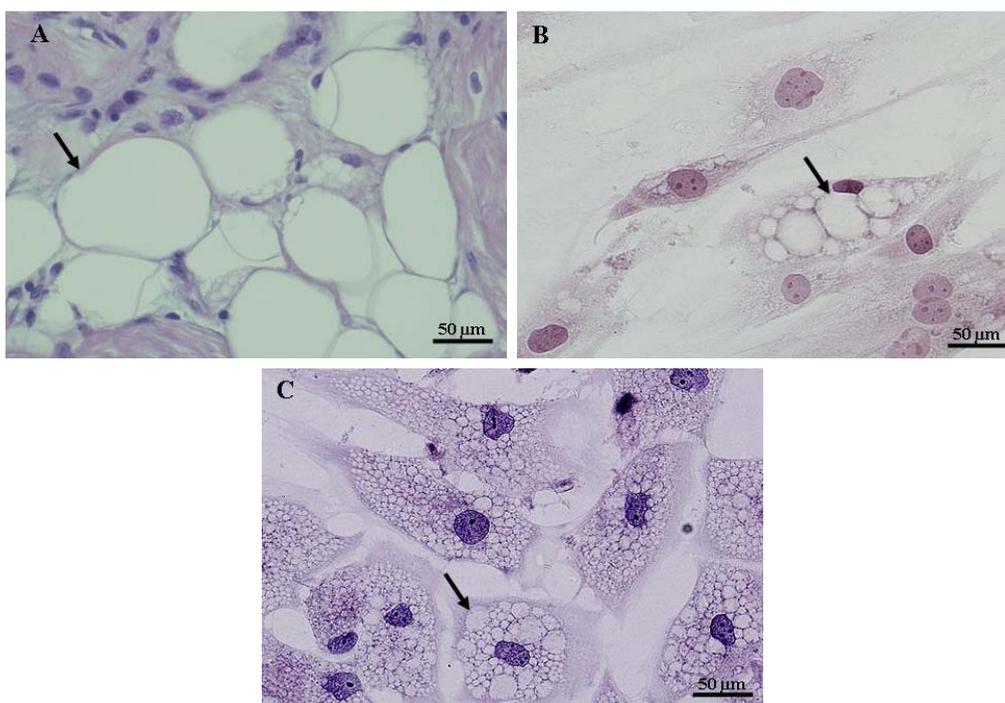


Figura 41.- Fotografías donde se muestran preparaciones de tejido adiposo, adipocitos y condrocitos normales estimulados con el dador de *NO* NOC-12, teñidos con hematoxilina-eosina. **A.-** Tejido adiposo. Nótese la coloración rosácea del anillo citoplasmático que rodea a las acumulaciones lipídicas (↑). **B.-** Adipocitos humanos. Nótese la coloración rosácea del anillo citoplasmático que rodea a las gotas lipídicas (↑). **C.-** Condrocitos articulares humanos estimulados con NOC-12 1 mM durante 24 h. Nótese la coloración azulada del anillo citoplasmático o membrana que rodea a las vacuolas (↑).

1.3.3.2. Identificación de lípidos.

Para descartar de forma definitiva la naturaleza lipídica de las vacuolas, se llevaron a cabo tinciones específicas para estructuras de esta naturaleza. Para lo cual realizamos dos tinciones, Oil-Red-O y sudán negro B, que nos permitían abarcar todos los lípidos que se hallan concentrados en un territorio particular de la célula, como una gota o una vacuola, los llamados lípidos homofásicos.

1.3.2.2.1. Oil-Red-O (1-[2,5-dimetilfenilazo]-2-naftol).

Para la realización de esta técnica se usaron adipocitos humanos como control positivo (Figuras 42B y D).

Los condrocitos normales sin estimular teñidos con este colorante no mostraron ningún tipo de tinción (Figura 42A), a diferencia de los adipocitos control que presentaron una intensa y abundante coloración roja en las gotas lipídicas (Figura 42B).

Cuando se estimularon los condrocitos normales con el dador de *NO* NOC-12 y posteriormente se tiñeron con Oil-Red-O seguimos sin observar ningún tipo de tinción (Figura 42C). Por el contrario, en el caso de los adipocitos estimulados con NOC-12, en los cuales también se observó la aparición de las mismas vacuolas que en el caso de los condrocitos, encontramos gran cantidad de gotas lipídicas teñidas con el colorante (Figura 42D). Además, mediante la realización de fotografías a mayor aumento se pudo comprobar que las gotas lipídicas marcadas con el colorante no se correspondían con las vacuolas (Figura 42d).

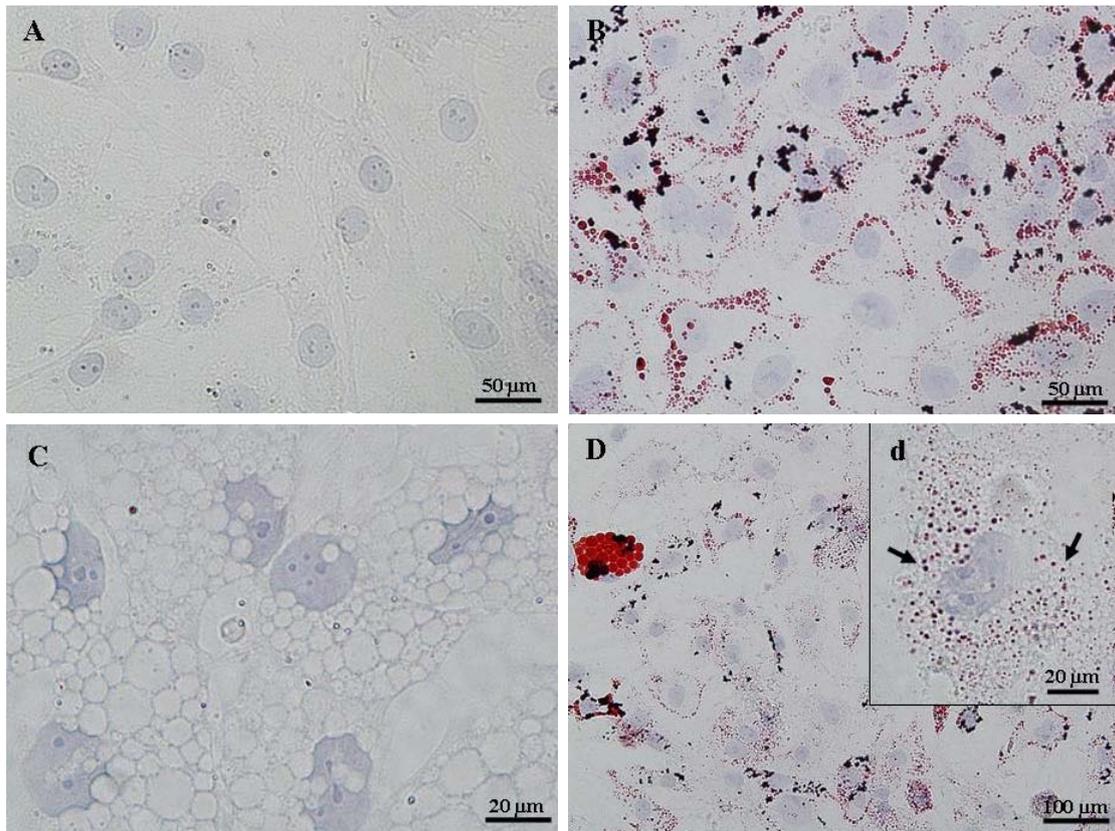


Figura 42.- Fotografías donde se muestra la tinción de lípidos homofásicos neutros con Oil-Red-O en condrocitos y adipocitos control, y estimulados con el dador de *NO* NOC-12. **A.-** Condrocitos normales sin estimular. **B.-** Adipocitos humanos control. **C.-** Condrocitos normales estimulados con NOC-12 1 mM durante 24 h. **D y d.-** Adipocitos estimulados con NOC-12 1 mM durante 24 h. Nótese que las gotas lipídicas teñidas con Oil-Red-O no se corresponden con las vacuolas inducidas por el dador de *NO* NOC-12 (↑).

1.3.2.2.2. Sudán negro B.

De igual forma que en el caso del Oil-Red-O, se usaron los adipocitos humanos como control positivo de la técnica (Figuras 43B y D).

En este caso, tras la tinción con sudán negro B, si se encontró marcaje en los condrocitos normales, tanto en las células sin estimular (Figura 43A) como en las estimuladas con el dador de *NO* NOC-12 (Figura 43C). Igualmente, encontramos marcaje de lípidos en los adipocitos humanos, tanto en los no estimulados (Figura 43B) como en los que fueron estimulados con NOC-12 (Figura 43D).

Asimismo, el marcaje de lípidos con sudán negro B no se correspondió con las vacuolas inducidas por el NOC-12 (Figura 43C).

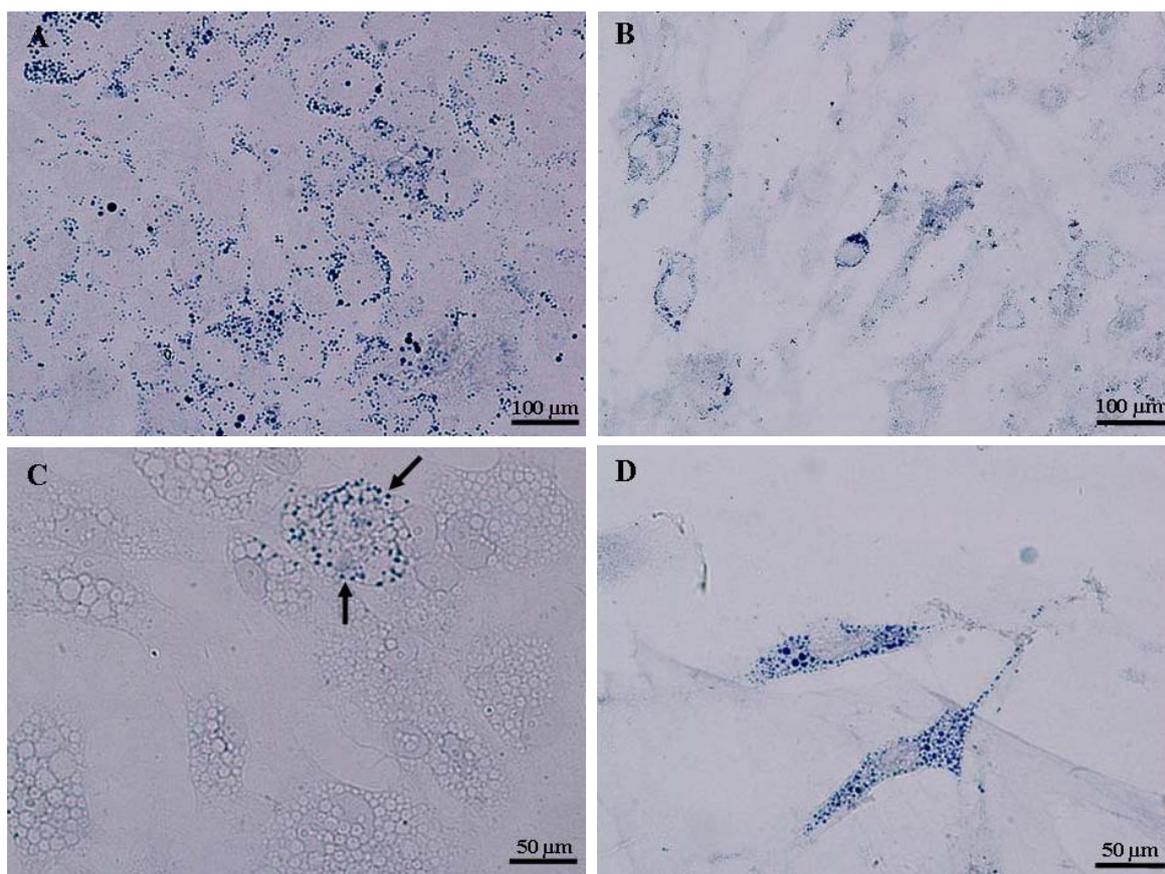


Figura 43.- Fotografías que representan el marcaje de lípidos homofásicos con sudán negro B en condrocitos y adipocitos humanos, tanto en células control como en estimuladas con el dador de *NO* NOC-12. **A.-** Condrocitos normales control. **B.-** Adipocitos control. **C.-** Condrocitos normales estimulados con NOC-12 1 mM durante 24 h. Nótese que el marcaje del sudán negro B no se corresponde con las vacuolas inducidas por la estimulación con NOC-12 (↑). **D.-** Adipocitos estimulados con NOC-12 1 mM durante 24 h.

1.3.4. Técnicas de microscopía de fluorescencia y microscopía confocal para la caracterización de las vacuolas.

El siguiente paso para caracterizar de manera más profunda la naturaleza de las vacuolas, inducidas por la estimulación de los condrocitos normales con el dador de *NO* NOC-12, fue la utilización de técnicas de microscopía de fluorescencia y microscopía confocal. Englobamos ambas metodologías dentro del mismo apartado de resultados debido al hecho de que se llegó a las mismas conclusiones tras la realización de ambos grupos de técnicas.

1.3.4.1. Detección de óxido nítrico gas (NO^{\bullet}) mediante DAF-FM diacetato.

Para comprobar si la naturaleza de las vacuolas inducidas por el NOC-12 era gaseosa se empleó un fluorocromo específico para la detección de NO^{\bullet} , el DAF-FM diacetato.

En el estudio del marcaje con DAF-FM diacetato para **microscopía de fluorescencia** no se pudo obtener un control negativo sin ningún fondo debido al hecho de que los condrocitos sin teñir son, de por sí, unas células con una alta autofluorescencia (Figuras 44A y B).

En el caso de los condrocitos normales estimulados con NOC-12, se pudo observar cómo las vacuolas aparecían totalmente marcadas con el fluorocromo DAF-FM diacetato de forma muy llamativa (Figuras 44C y D).

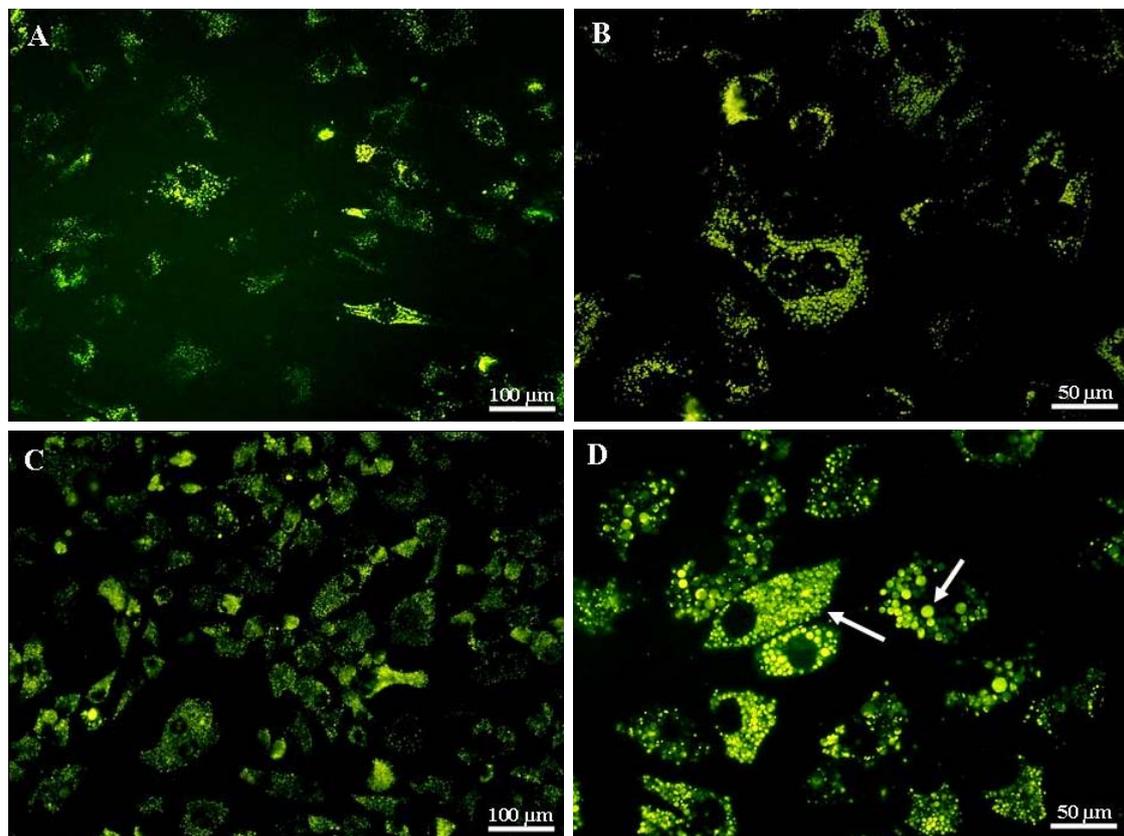


Figura 44.- Fotografías obtenidas mediante microscopía de fluorescencia del marcaje de condrocitos normales control y estimulados con el dador de NO NOC-12 1 mM durante 24 h con el fluorocromo DAF-FM diacetato. **A** y **B**.- Condrocitos normales control. **C** y **D**.- Condrocitos normales estimulados con NOC-12. Nótese la aparición de unas llamativas vacuolas citoplasmáticas marcadas con DAF-FM diacetato (↑).

Al comparar el marcaje obtenido con este fluorocromo en condrocitos normales sin estimular (Figura 45A) con el de condrocitos OA control (Figura 45B), observamos que era mucho más llamativo el encontrado en estos últimos.

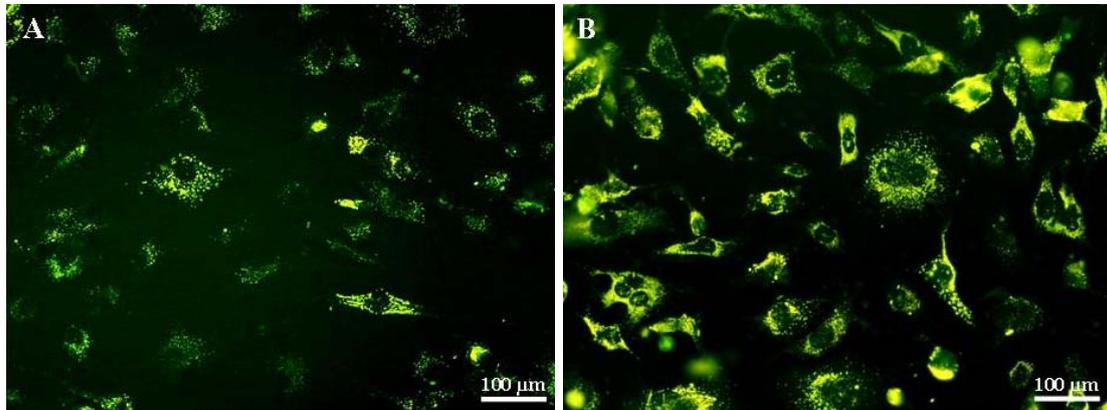


Figura 45.- Diferencias entre el marcaje con DAF-FM diacetato de condrocitos normales y OA sin estimular mediante microscopía de fluorescencia. **A.-** Condrocitos normales control. **B.-** Condrocitos OA control.

Al analizar con más detalle la tinción con el fluorocromo DAF-FM diacetato, de las vacuolas encontradas en los condrocitos estimulados con NOC-12 (Figura 46A), se pudo observar que el marcaje se localiza fundamentalmente en la membrana que rodea a las vacuolas (Figura 46B) aunque se observe una coloración verdosa por todo el contenido de dicha estructura.

Existe variedad en cuanto al tamaño de las vacuolas, en la mayoría de las ocasiones son de gran tamaño (Figuras 46C y D), otras en cambio, son de pequeño tamaño pero se reparten también por todo el citoplasma de la célula (Figura 46E).

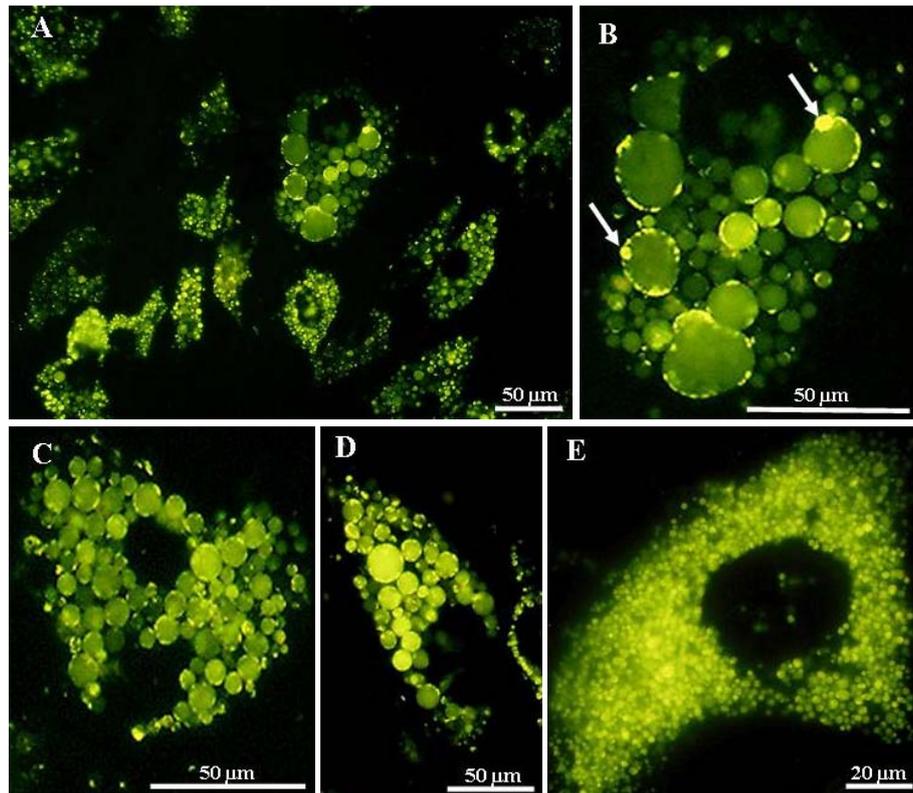


Figura 46.- Detalle del marcaje con DAF-FM diacetato de las vacuolas encontradas con el dador de *NO* NOC-12 1 mM durante 24 h en condrocitos articulares humanos normales. **A.-** Condrocitos normales estimulados con NOC-12. **B.-** Vacuolas inducidas en condrocitos normales estimulados con NOC-12 donde se puede apreciar el marcaje del DAF-FM diacetato en la membrana que rodea a la vacuola (↑). **C** y **D.-** Vacuolas de gran tamaño en condrocitos normales estimulados con NOC-12. **E.-** Vacuolas de pequeño tamaño en un condrocito normal estimulado con NOC-12.

Al haber encontrado marcaje en condrocitos sin estimular y habiendo sido descritas vacuolas de pequeño tamaño, se realizaron fotografías utilizando los objetivos de 40X y 100X, tanto de células sin estimular como de estimuladas con NOC-12, para diferenciar si realmente aparecían nuevas vacuolas o simplemente aumentaba su tamaño. En los condrocitos control no se observaron vacuolas y si un marcaje basal con el fluorocromo (Figura 47).

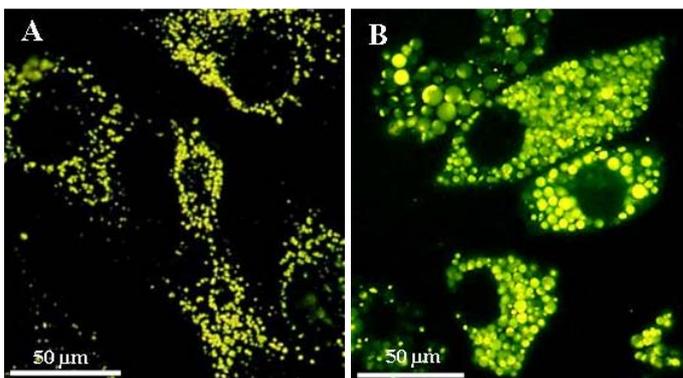


Figura 47.- Diferencias de marcaje con DAF-FM diacetato entre condrocitos control y estimulados con NOC-12 1 mM durante 24 h. **A.-** Condrocitos normales control. **B.-** Condrocitos normales estimulados con NOC-12.

Para caracterizar de manera más exhaustiva la naturaleza de las vacuolas se analizó el marcaje del DAF-FM diacetato mediante **microscopía confocal**.

Los resultados obtenidos mediante esta metodología apoyaron lo visto por microscopía de fluorescencia, el marcaje del *NO* aparecía alrededor de las vacuolas (Figura 48). Además, con este tipo de microscopía no se observó tanto fondo en las preparaciones siendo el marcaje más nítido, de modo que prácticamente sólo se marcaron los puntos donde había *NO* alrededor de las vacuolas y no en toda la estructura como ocurría en microscopía de fluorescencia.

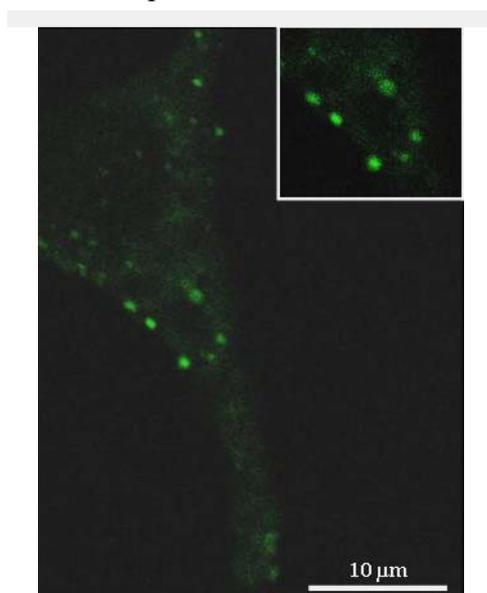


Figura 48.- Fotografía obtenida mediante microscopía confocal donde se muestra el marcaje de *NO* por el fluorocromo DAF-FM diacetato en las vacuolas inducidas en condrocitos articulares normales estimulados con el dador de *NO* NOC-12 1 mM durante 24 h (↑).

1.3.4.2. Estudio de la relación de las vacuolas con la mitocondria mediante el empleo de JC-1.

Mediante **microscopía de fluorescencia** se pudo observar que en una población de condrocitos normales sin estimular, las mitocondrias en su mayoría mostraron fluorescencia roja ($\Delta\Psi_m$ normal) y se encontraban repartidas de forma homogénea por todo el citoplasma de la célula (Figura 49A). Sin embargo, en el caso de los condrocitos normales estimulados con el dador de *NO* NOC-12, las mitocondrias se dispusieron alrededor de las vacuolas (Figuras 49B y C). En el caso concreto de las células de las figuras mostradas, la mayoría de las mitocondrias presentaron un $\Delta\Psi_m$ normal, es decir, fluorescencia roja, debido a que el tiempo de estimulación fue corto.

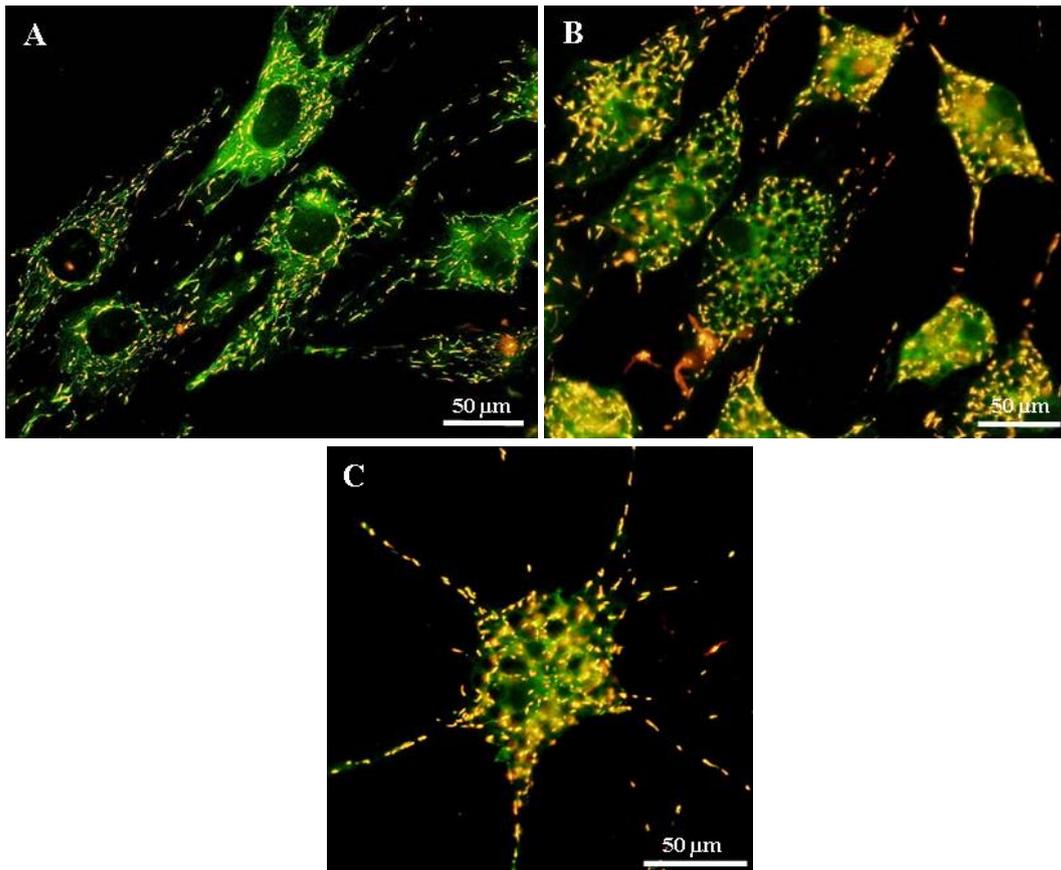


Figura 49.- Fotografías donde se muestra el marcaje de mitocondrias con el fluorocromo JC-1 en condrocitos normales control y estimulados con NOC-12. **A.-** Condrocitos sin estimular. La distribución de las mitocondrias es homogénea por todo el citoplasma. **B y C.-** Condrocitos estimulados con el dador de NO NOC-12 1 mM durante 24 h. Las mitocondrias se sitúan alrededor de las vacuolas.

Por otra parte, se emplearon técnicas de **microscopía confocal**, como en el caso del DAF-FM diacetato, para caracterizar de forma más exhaustiva las vacuolas.

Se confirmaron los resultados obtenidos mediante microscopía de fluorescencia, en el caso de condrocitos normales no estimulados, las mitocondrias se repartían por todo el citoplasma de la célula (Figuras 50A y B) y, cuando las células fueron estimuladas con el dador de NO NOC-12 se dispusieron alrededor de las vacuolas (Figuras 50C y D).

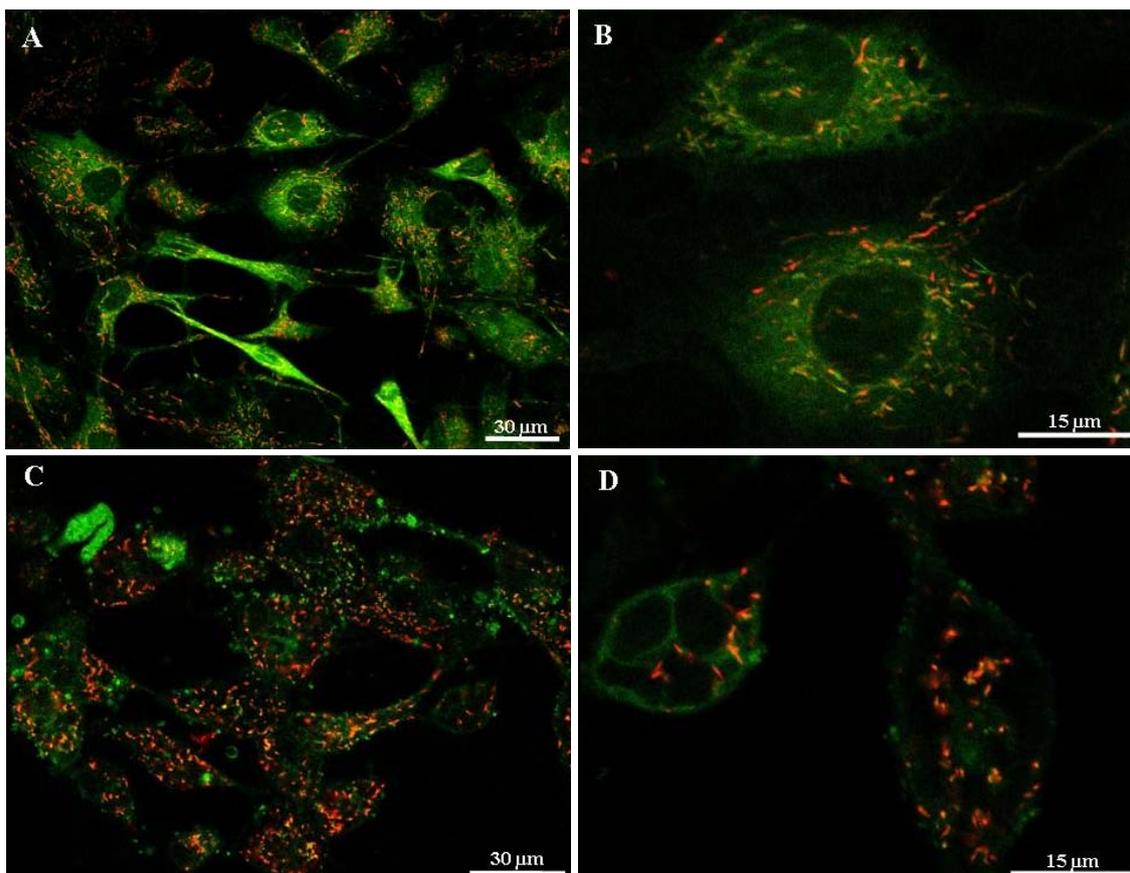


Figura 50.- Fotografías obtenidas mediante microscopía confocal para el fluorocromo JC-1 en condrocitos normales control y estimulados con NOC-12. **A y B.-** Condrocitos normales sin estimular. Las mitocondrias se reparten por todo el citoplasma de la célula. **C y D.-** Condrocitos estimulados con NOC-12 1 mM durante 24 h. Las mitocondrias se distribuyen alrededor de las vacuolas inducidas por la estimulación con NOC-12.

1.3.5. Estudio de las vacuolas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).

Para caracterizar con más detalle naturaleza de las vacuolas, se procedió al estudio de su ultraestructura mediante MET.

Como paso previo, se realizaron **cortes semifinos** de 1 μm de grosor y posteriormente se tiñeron con el colorante metacromático azul de toluidina, que tiñó principalmente el núcleo de la célula y el resto de las estructuras celulares, de modo que nos permitió escoger una buena zona de la muestra para su posterior estudio mediante cortes ultrafinos.

Con esta primera aproximación, se pudo apreciar que, en el caso de los condrocitos normales sin estimular encontramos algunas vacuolas en el citoplasma (Figura 51A),

aunque no eran tan numerosas y llamativas como las que aparecían en los condrocitos normales tras el tratamiento con el dador de *NO* NOC-12 (Figura 51B).

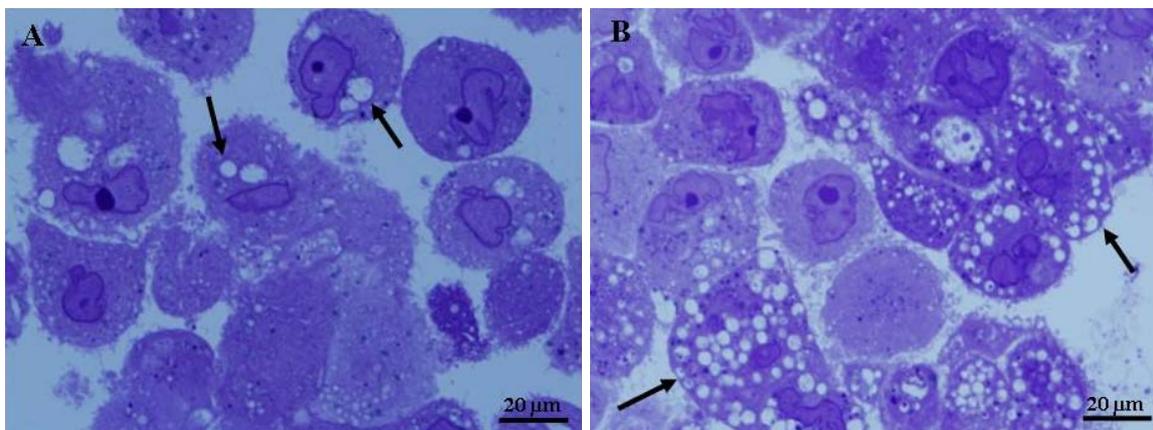


Figura 51.- Fotografías de cortes semifinos de 1 µm de grosor de condrocitos normales sin tratar y estimulados con NOC-12 teñidos con el colorante azul de toluidina. **A.-** Condrocitos normales sin estimular. Nótese la presencia de escasas vacuolas citoplasmáticas (↑). **B.-** Condrocitos normales estimulados con el dador de *NO* NOC-12 1 mM durante 24 h. Nótese la presencia de numerosas vacuolas citoplasmáticas (↑).

En la línea de comparar los resultados obtenidos en condrocitos normales estimulados con dadores de *NO* con los condrocitos OA, se procedió al estudio de su ultraestructura y, también se observaron vacuolas en el citoplasma de los condrocitos patológicos (Figura 52).

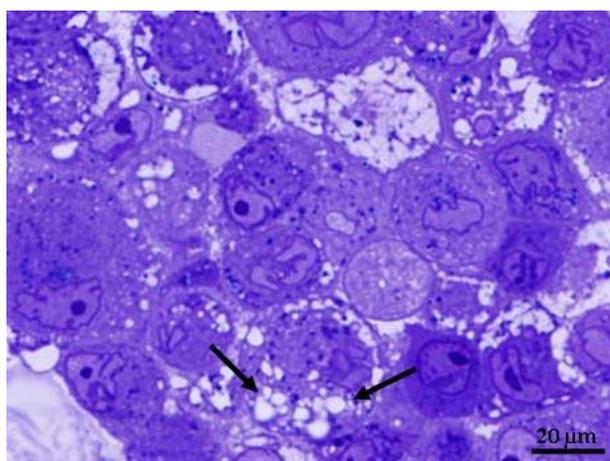


Figura 52.- Fotografía de un corte semifino de 1 µm de grosor de condrocitos OA teñido con el colorante azul de toluidina. Nótese la presencia de escasas vacuolas citoplasmáticas (↑).

El siguiente paso fue la realización de **cortes ultrafinos** en los que se confirmaron los resultados vistos con los cortes semifinos.

En los condrocitos **normales sin estimular** se detectó la presencia de vacuolas citoplasmáticas, las cuales eran pequeñas y no aparecían en un número superior a 20-30 por célula (Figura 53A), además, por norma general los núcleos presentaban una buena morfología en los que se podían diferenciar fácilmente los nucleolos (Figura 53A); en otros casos, sin embargo, se observó condensación de la cromatina alrededor de la membrana nuclear, así como pequeños fragmentos irregulares por todo el núcleo (Figura 53B). En general, se observaron pocas mitocondrias en los condrocitos normales control (Figura 53C), con más detalle se pudo observar que la mayoría presentaban una morfología redondeada, pero generalmente las crestas mitocondriales mostraban la disposición paralela normal (Figura 53D).

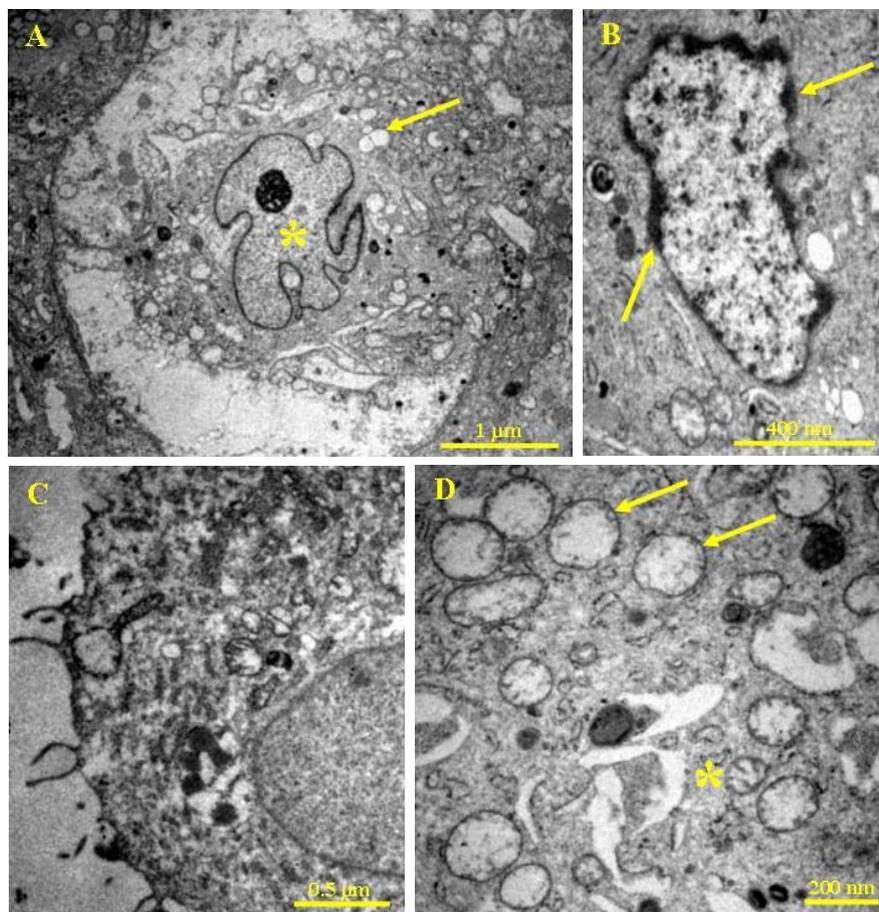


Figura 53.- Fotografías obtenidas mediante MET donde se muestra la ultraestructura de condrocitos articulares humanos normales sin estimular. **A.-** Condrocito normal sin estimular donde se observa la presencia de vacuolas citoplasmáticas (↑) y el perfecto estado del núcleo (*). **B.-** Núcleo alterado de un condrocito normal control donde se observan condensaciones de cromatina en la membrana nuclear (↑). **C y D.-** Mitocondrias de condrocitos normales sin estimular. Algunas mitocondrias muestran un aspecto hinchado (↑). Otras mitocondrias presentan la disposición paralela habitual de las crestas mitocondriales (*).

En el caso de los **condrocitos normales tratados** con el dador de *NO* NOC-12, la cantidad de vacuolas citoplasmáticas que se encontró fue superior a la de los condrocitos sin tratar, es decir, más de 30 por célula, además eran de gran tamaño (Figura 54A). Estas estructuras, las cuales poseen membrana, contenían material granular en su interior (Figuras 54B y C), así como se observaron formas concéntricas mielínicas (Figura 54D). Por otra parte, las mitocondrias presentaban un aspecto alterado ya que no mostraban la disposición normal de sus crestas (Figura 54E). No se observó fragmentación celular en cuerpos apoptóticos. Generalmente los núcleos aparecían con formas irregulares y se encontró la cromatina en pequeñas agrupaciones (Figura 54F), en el caso en que los núcleos aparecían inalterados se observó que estas células poseían nucleolos prominentes. Por otra parte, la membrana plasmática no permaneció inalterada, se observó material extruído al espacio extracelular, incluso pudiéndose ver vacuolas fuera del territorio celular (Figura 54G).

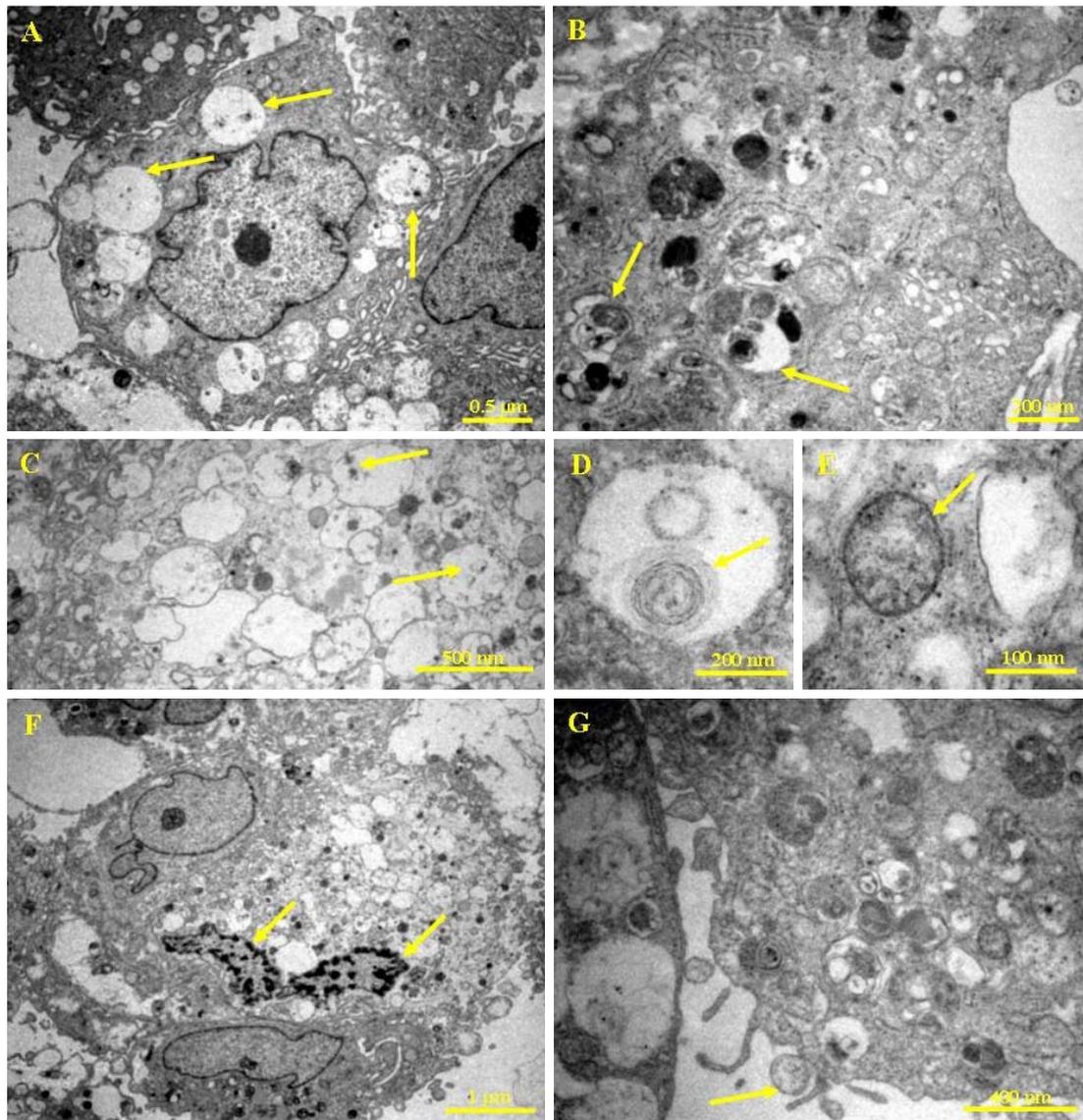


Figura 54.- Fotografías obtenidas mediante MET donde se muestra con detalle las vacuolas generadas por el NOC-12 1 mM a las 24 h en condrocitos normales. **A.-** Abundancia y gran tamaño de las vacuolas (↑). **B y C.-** Las vacuolas no son simples estructuras vacías. Nótese el material granular en su interior (↑). **D.-** Formas concéntricas mielínicas en el interior de las vacuolas (↑). **E.-** Alteración de las mitocondrias de los condrocitos estimulados con NOC-12. **F.-** Núcleos irregulares con pequeñas agrupaciones de cromatina (↑). **G.-** Alteración de la membrana plasmática. Nótese el material extruído al espacio extracelular (↑).

Las vacuolas observadas en **condrocitos OA** también fueron analizadas mediante MET.

Se analizó la estructura de condrocitos OA en el **primer subcultivo** (fase en la que se utilizaron todas las células) y se pudo observar claramente la existencia en el citoplasma de vacuolas idénticas a las observadas tras el tratamiento con el NOC-12 en

condrocitos normales (Figura 55A). Por otra parte, se vio que había células que mantenían un núcleo con buena morfología y un llamativo nucleolo (Figura 55A), mientras que había otras en las que el núcleo aún presentaba buen aspecto pero no había indicios de la presencia de ningún nucleolo (Figura 55B) y, por último, condrocitos en los que no se observaba núcleo (Figura 55C). En general, el aspecto de estas células era bastante similar al encontrado en condrocitos normales estimulados con NOC-12 pero las vacuolas eran menos numerosas, de igual forma se pudo observar que estas estructuras también presentaban material granular en su interior (Figura 55D).

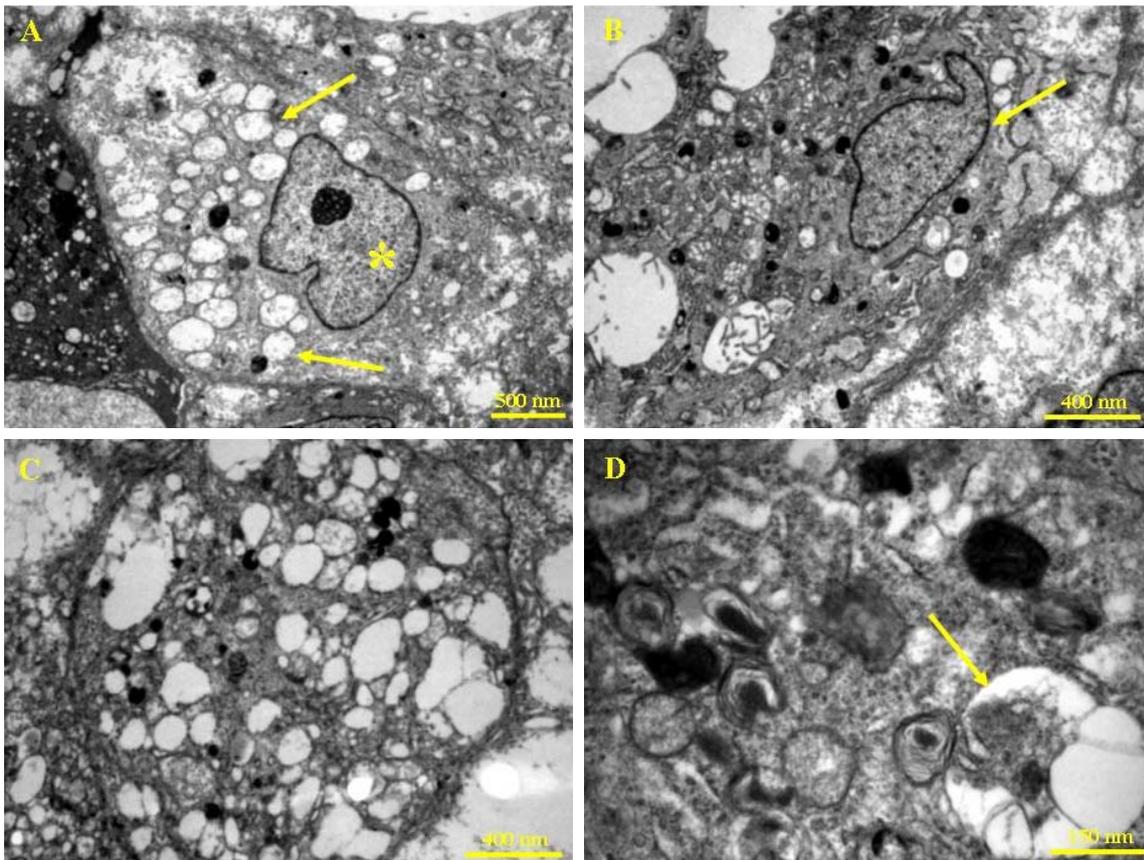


Figura 55- Fotografías obtenidas mediante MET donde se muestra la ultraestructura de condrocitos OA. **A.-** Condrocitos OA sin tratar con numerosas vacuolas en el citoplasma (↑). Nótese la presencia del núcleo inalterado (*). **B.-** Condrocitos OA con núcleo sin nucleolo (↑). **C.-** Condrocitos OA sin núcleo. **D.-** Material granular en el interior de las vacuolas citoplasmáticas de condrocitos OA (↑).

Por último, estudiamos la ultraestructura de condrocitos OA obtenidos a partir de **cartílago recién digerido**. Los restos de MEC interfirieron de forma considerable en el tratamiento de las muestras, además la mayor parte de las células obtenidas tras la digestión del cartílago no eran viables.

Fue llamativa la presencia de gotas lipídicas en el citoplasma de los condrocitos OA (Figura 56A), además se observaron núcleos alterados con los característicos acúmulos irregulares de cromatina alrededor de la membrana nuclear y dispersos por el núcleo (Figura 56A). En otros condrocitos el núcleo apareció totalmente fragmentado y se observaron las ubicuas vacuolas en el citoplasma (Figura 56B).

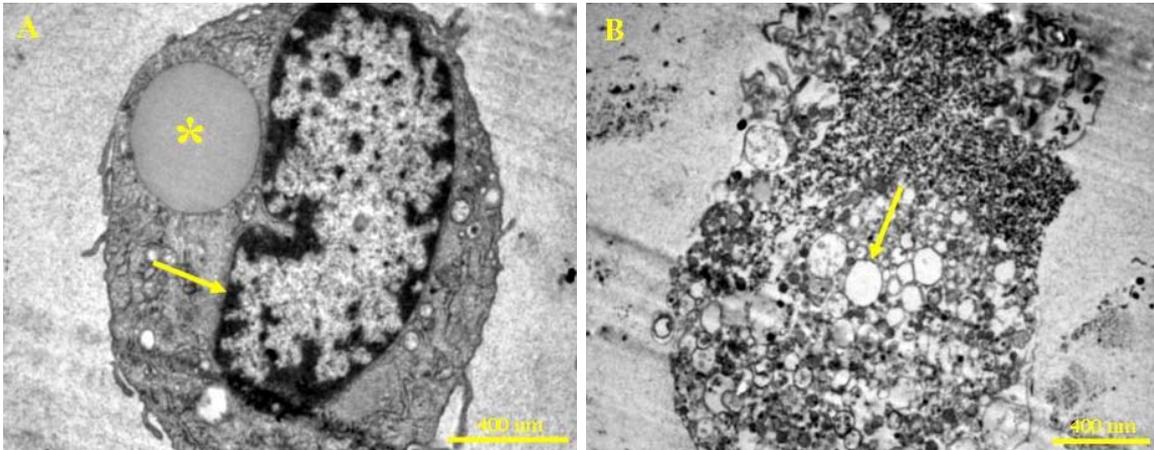


Figura 57.- Estudio de la ultraestructura mediante MET de condrocitos articulares OA obtenidos de cartílago humano recién digerido. **A.-** Condrocito OA de cartílago recién digerido donde se observa un llamativa gota lipídica en el citoplasma (*), así como acúmulos de cromatina alrededor de la membrana nuclear (↑). **B.-** Condrocito OA de cartílago recién digerido con vacuolas citoplasmáticas (↑).

2. EFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO (NO) SOBRE LA MITOCONDRIA.

2.1. Efecto del óxido nítrico (NO) sobre la actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM).

Como una primera aproximación al estudio del efecto del *NO* sobre la actividad mitocondrial de los condrocitos articulares normales, se analizó la influencia del dador clásico de *NO SNP* sobre la actividad de los complejos de la CRM.

Los condrocitos normales estimulados con el dador de *NO SNP*, a una concentración de 0,5 mM durante 5 h, presentaron una reducción significativa de la actividad del complejo IV ($40,2 \pm 11,3$ vs. $53,6 \pm 11,9$) (Tabla 10), sin embargo, las actividades de los complejos I, II y III, así como la de la CS no se vieron afectadas.

Tabla 10.- Valores de las actividades de los complejos de la CRM en cultivos de condrocitos humanos articulares de pacientes normales control y pacientes normales tratados con el dador de *NO SNP* 0,5 mM durante 5 h *.

	Condrocitos normales	Condrocitos normales tratados con <i>SNP</i> 0,5 mM
Edad, años	$59,7 \pm 21,8$ (30)	$59,7 \pm 18,9$ (11)
Proteínas, mg/ml	$3,6 \pm 1,3$ (30)	$4,2 \pm 1,4$ (11)
Actividad enzimática de la CS, nmoles/minuto/mg proteína	$111,7 \pm 29,8$ (29)	$106,6 \pm 26,2$ (11)
Actividad de los complejos mitocondriales ‡		
Complejo I	$27,9 \pm 13,6$ (22)	$22,8 \pm 19,1$ (11)
Complejo II	$11,5 \pm 5,7$ (25)	$10,2 \pm 1,8$ (11)
Complejo III	$54,2 \pm 13,6$ (25)	$46,3 \pm 9,7$ (11)
Complejo IV	$53,6 \pm 11,9$ (29)	$40,2 \pm 11,3$ (11) †

* Los valores son la media \pm DT (n). CS: Citrato sintasa

† $P \leq 0,05$ condrocitos normales tratados con *SNP* vs. condrocitos normales control.

‡ La actividad de los complejos corregida por la CS se expresa como (nmoles/minuto/mg proteína)/(actividad específica de la CS) x 100.

Complejo I: NADH-coenzima Q1 reductasa; Complejo II: Succinato deshidrogenasa;

Complejo III: Ubiquinol citocromo c reductasa; Complejo IV: Citocromo c oxidasa.

A continuación, analizamos el efecto de los dadores de *NO* de nueva generación NOC-5 y NOC-12 sobre la actividad de los complejos de la CRM, los resultados encontrados fueron bastante llamativos.

Cuando los condrocitos normales fueron estimulados con el dador de *NO* **NOC-5** a una concentración de 1 mM durante 24 h, ninguno de los complejos de la CRM se vio afectado; el descenso en las actividades en ningún caso fue significativo, incluso la actividad del complejo II incrementó ligeramente ($8,3 \pm 0,6$ vs. $7,4 \pm 2,3$), la actividad de la CS tampoco se vio afectada (Tabla 11).

Las diferencias encontradas entre el **NOC-5** y el **NOC-12** en los cambios de las actividades de los complejos de la CRM fueron considerables, ya que a diferencia de los que se había observado con el **NOC-5**, los condrocitos normales estimulados con el dador de *NO* **NOC-12**, a una concentración de 1 mM durante 24 h, presentaron alteraciones en todos los complejos excepto en el II: complejo I ($6,8 \pm 2,3$ vs. $30,1 \pm 13,4$), complejo III ($35,2 \pm 9,3$ vs. $53,5 \pm 18,4$) y complejo IV ($15,7 \pm 3,1$ vs. $61,2 \pm 8,3$), así como se encontraron diferencias en la actividad de la CS pero no estadísticamente significativas ($146,9 \pm 54,7$ vs. $108,9 \pm 38,5$) (Tabla 11).

Tabla 11.- Valores de las actividades de los complejos de la CRM en cultivos de condrocitos humanos articulares de pacientes normales control y pacientes normales tratados con los dadores de *NO* **NOC-5** y **NOC-12** 1 mM durante 24 h*.

	Condrocitos normales	Condrocitos normales tratados con NOC-5 1 mM	Condrocitos normales tratados con NOC-12 1 mM
Edad, años	$49,8 \pm 21,2$ (14)	$50,2 \pm 19,8$ (5)	$44,2 \pm 19,4$ (5)
Proteínas, mg/ml	$3,1 \pm 0,9$ (14)	$2,4 \pm 0,5$ (5)	$2,8 \pm 1,4$ (5)
Actividad enzimática de la CS, nmoles/minuto/mg proteína	$108,9 \pm 38,5$ (14)	$117,6 \pm 39,0$ (5)	$146,9 \pm 54,7$ (5)
Actividad de los complejos mitocondriales ‡			
Complejo I	$30,1 \pm 13,4$ (14)	$20,7 \pm 7,6$ (5)	$6,8 \pm 2,3$ (5) †
Complejo II	$7,4 \pm 2,3$ (14)	$8,3 \pm 0,6$ (5)	$6,8 \pm 1,6$ (5)
Complejo III	$53,5 \pm 18,4$ (14)	$46,5 \pm 9,1$ (5)	$35,2 \pm 9,3$ (5) †
Complejo IV	$61,2 \pm 8,3$ (14)	$57,1 \pm 15,8$ (5)	$15,7 \pm 3,1$ (5) †

* Los valores son la media \pm DT (n). CS: Citrato sintasa

† $P \leq 0,05$ condrocitos normales tratados con **NOC-5** vs. condrocitos normales control.

‡ La actividad de los complejos corregida por la CS se expresa como (nmoles/minuto/mg proteína)/(actividad específica de la CS) x 100.

Complejo I: NADH-coenzima Q1 reductasa; Complejo II: Succinato deshidrogenasa;

Complejo III: Ubiquinol citocromo c reductasa; Complejo IV: Citocromo c oxidasa.

2.2. Medida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) en condrocitos articulares humanos normales y artrósicos (OA). Efecto del óxido nítrico (NO).

El dador de NO *SNP* indujo despolarización mitocondrial en condrocitos normales a todas las concentraciones y tiempos utilizados. A las 5 h, el porcentaje de células despolarizadas en condrocitos normales control fue de $9,53 \pm 6,88$ (n=22) vs. $27,71 \pm 7,30$ (n=5) obtenido tras la estimulación con *SNP* 2 mM (Figura 57).

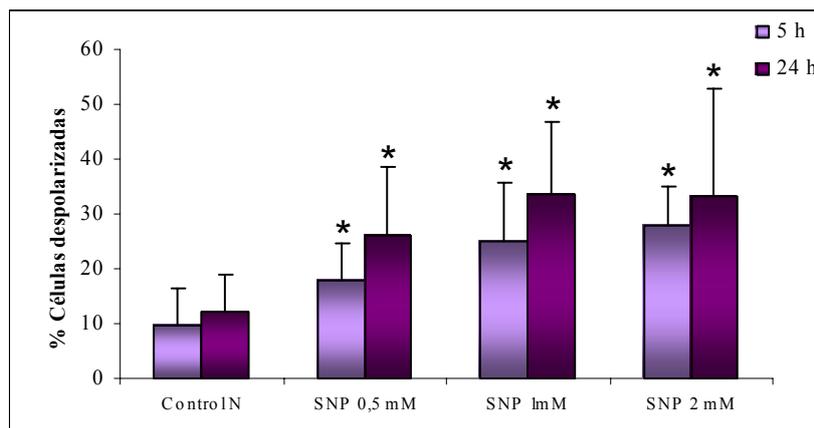


Figura 57.- Efecto del dador de NO *SNP* a las 5 y 24 h sobre el $\Delta\Psi_m$ de los condrocitos articulares humanos normales; las barras muestran la media y la DT. * = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos no tratados.

Tras analizar el efecto de los dadores de nueva generación NOC-5 y NOC-12 sobre el $\Delta\Psi_m$, se encontraron diferentes efectos dependiendo del compuesto empleado.

Por una parte, el **NOC-5** no indujo despolarización mitocondrial a ninguna de las concentraciones y tiempos utilizados. El porcentaje de condrocitos normales con despolarización mitocondrial a las 24 h de estimulación con NOC-5 2 mM fue de $11,41 \pm 6,16$ (n=5) vs. $12,15 \pm 6,63$ (n=19) de las células control (Figura 58).

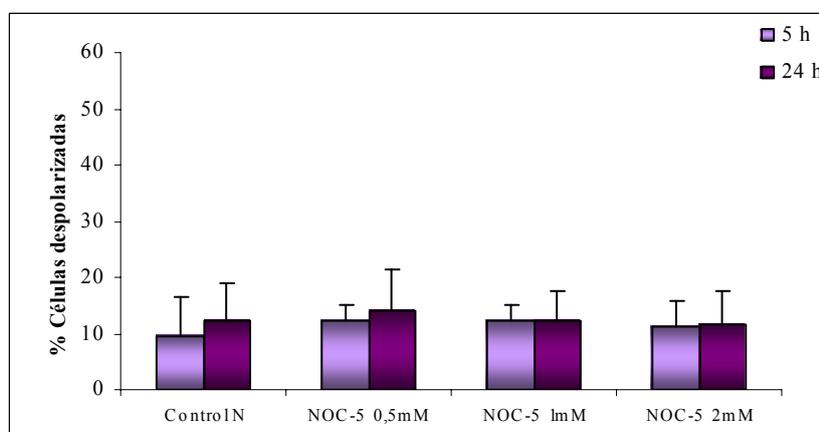


Figura 58.- Efecto del dador de NO NOC-5 a las 5 y a las 24 h sobre el $\Delta\Psi_m$ de los condrocitos articulares humanos normales; las barras muestran la media y la DT. * = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos no tratados.

Sin embargo, con el **NOC-12** se observaron efectos considerables sobre el $\Delta\Psi_m$, a las 5 h indujo despolarización mitocondrial de forma significativa: $15,59 \pm 2,77$ (n=5) con NOC-12 0,5 mM vs. $9,53 \pm 6,88$ (n=22) de las células normales control (Figura 59). Por otra parte, este dador también disminuyó de forma estadísticamente significativa el porcentaje de células con polarización normal, a las 5 h el porcentaje pasó de $34,87 \pm 26,11$ (n=22) en el control a $10,51 \pm 8,08$ (n=5) con NOC-12 2 mM.

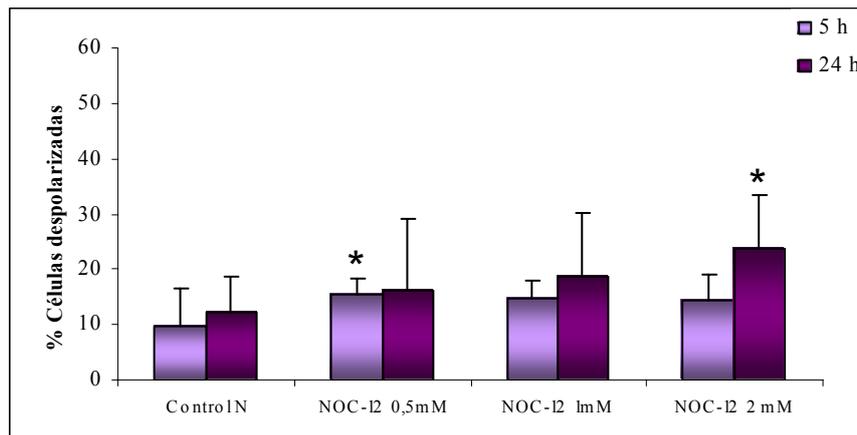


Figura 59.- Efecto del NOC-12 sobre el $\Delta\Psi_m$ a las 5 y a las 24 h en condrocitos humanos normales; las barras muestran la media y la DT. * = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos no tratados.

En la descripción morfológica de las vacuolas inducidas en condrocitos normales tras la estimulación con NOC-12, ya se mencionó que trascurridas 72 h tras la retirada del estímulo del medio las células recuperaban el aspecto inicial. De igual modo se pudo comprobar que los condrocitos normales recuperaron el porcentaje de células despolarizadas encontrado de forma basal (Figura 60).

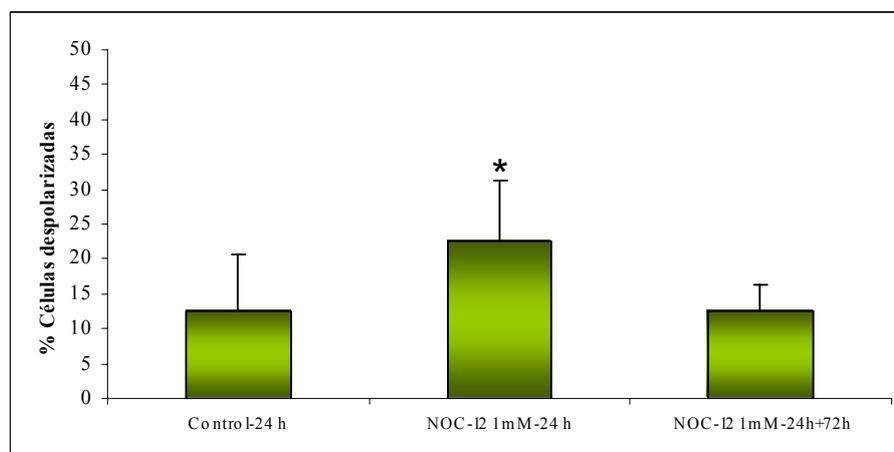


Figura 60.- Reversibilidad del efecto del NOC-12 sobre el $\Delta\Psi_m$ en condrocitos humanos normales; las barras muestran la media y la DT. * = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos no tratados.

Los condrocitos OA mostraron de forma significativa un índice de despolarización más elevado que las células normales: $20,13 \pm 11,71$ (n=44) vs. $9,53 \pm 6,88$ (n=22) (Figura 61).

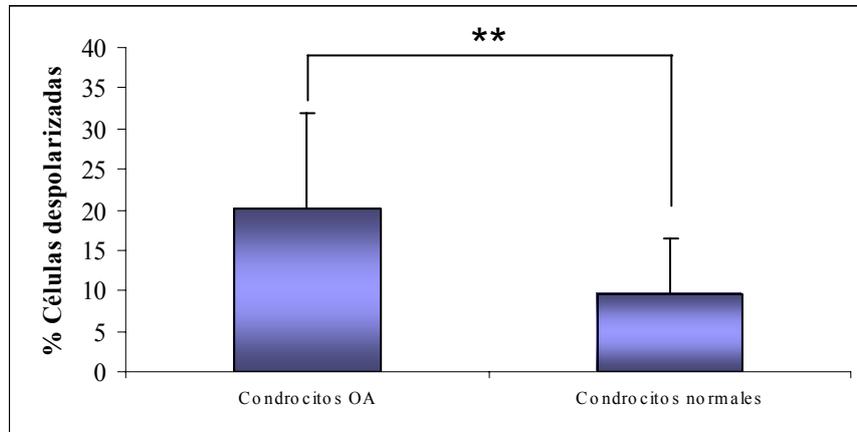


Figura 61.- Diferencias en el nivel de despolarización mitocondrial entre condrocitos normales y OA; las barras muestran la media \pm DT * = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos normales.

En la Figura 62 se muestra un resumen de las representaciones obtenidas por citometría de flujo con el fluorocromo JC-1 del $\Delta\Psi_m$ de condrocitos normales y OA, así como el efecto de los diferentes dadores de *NO* sobre el $\Delta\Psi_m$ de condrocitos normales.

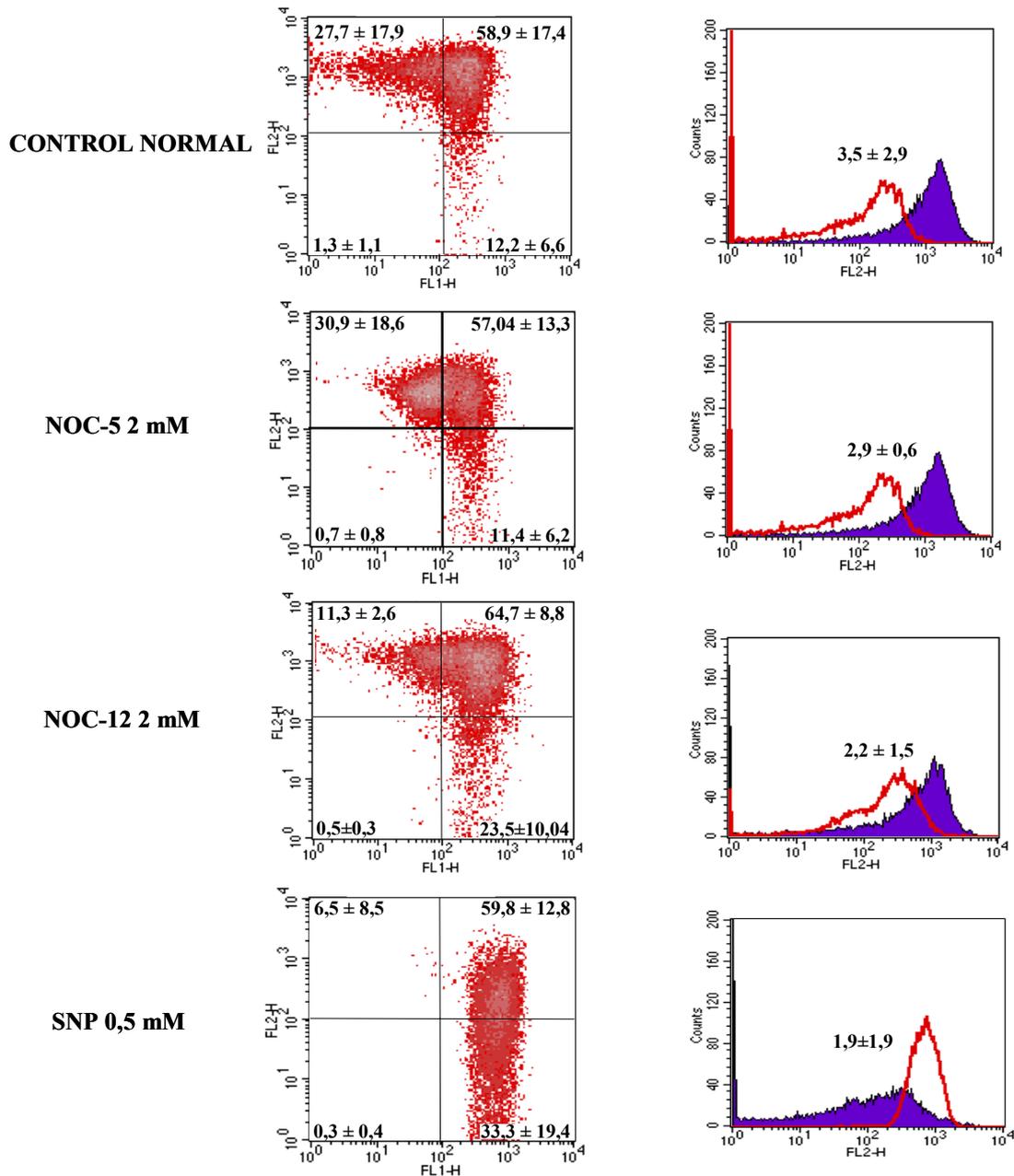


Figura 62.- Representaciones gráficas obtenidas del citómetro de flujo donde se muestra el grado de despolarización mitocondrial en condiciones estándar de cultivo de condrocitos normales control y normales estimulados durante 24 h con los diferentes dadores de *NO*. Los resultados aparecen como la media \pm DT.

2.3. Medida de los niveles de ATP intracelular y lactato en condrocitos articulares humanos y artrósicos (OA). Efecto del óxido nítrico (NO).

La siguiente aproximación al estudio del efecto del *NO* sobre el metabolismo energético de los condrocitos articulares humanos, fue analizar la influencia de los diferentes dadores de *NO* a estudio sobre la síntesis de ATP intracelular y lactato. Posteriormente, se comparó si existían diferencias en la síntesis de ambos compuestos por parte de condrocitos normales y OA.

2.3.1. Efecto del óxido nítrico (NO) sobre la producción de ATP intracelular y lactato en condrocitos articulares humanos normales.

Tras 24 h de estimulación con los diferentes dadores de *NO*, el compuesto que produjo un efecto más acusado sobre condrocitos normales en estas condiciones fue el *SNP*, bajando los niveles de producción de ATP prácticamente a 0 nmoles: $0,01 \pm 0,01$ (n=7) con *SNP* 2 mM. Tras la estimulación con el dador de *NO* *NOC-5* no se encontró descenso significativo en los niveles de ATP intracelular en ningún caso. Sin embargo, el *NOC-12*, excepto con la mayor de las concentraciones empleadas, redujo los niveles de forma significativa, por ejemplo en el caso de la concentración más alta (2 mM), los niveles descendieron desde $0,57 \pm 0,19$ (n=7) en los condrocitos normales control a $0,43 \pm 0,18$ (n=7) (Tabla 12).

Respecto a los niveles de producción de lactato, el único de los dadores de *NO* a estudio que redujo de manera significativa la producción fue el *SNP*. Este dador, a las 24 h y a las dos concentraciones mayores empleadas (1 y 2 mM), produjo un descenso significativo, en concreto, con *SNP* 2 mM los niveles descendieron desde $2,30 \pm 0,58$ (n=7) en condrocitos normales control a $1,01 \pm 0,30$ (n=7). Por otra parte, el *NOC-5* no tuvo ningún efecto y el *NOC-12* incrementó la producción de lactato en condrocitos normales aunque no de forma significativa, desde $2,30 \pm 0,58$ (n=7) en las células control a $2,90 \pm 0,66$ (n=23) con *NOC-12* 1 mM (Tabla 12).

Tabla 12.- Diferencias en los niveles de producción de ATP intracelular y lactato en condrocitos normales estimulados con diferentes dadores de *NO* durante 24 h en condiciones estándar de cultivo.

	ATP (nmoles/20000 células)	LACTATO (μ M/500000 células)
Condrocitos normales control	0,57 \pm 0,19 (7)	2,30 \pm 0,58 (7)
SNP 0,5 mM	0,21 \pm 0,19 (7) *	1,83 \pm 0,65 (7)
SNP 1 mM	0,03 \pm 0,04 (7) *	1,33 \pm 0,38 (7) *
SNP 2 mM	0,01 \pm 0,01 (7) *	1,01 \pm 0,3 (7) *
NOC-5 0,5 mM	0,54 \pm 0,20 (7)	2,50 \pm 0,62 (7)
NOC-5 1 mM	0,52 \pm 0,19 (7)	2,48 \pm 0,59 (7)
NOC-5 2 mM	0,45 \pm 0,14 (7)	2,49 \pm 0,58 (7)
NOC-12 0,5 mM	0,39 \pm 0,15 (7) *	2,91 \pm 0,58 (7)
NOC-12 1 mM	0,40 \pm 0,16 (7) *	2,9 \pm 0,66 (7)
NOC-12 2 mM	0,43 \pm 0,18 (7)	2,86 \pm 0,77 (7)

* = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos no tratados.

2.3.2. Diferencias en los niveles de ATP intracelular y lactato en condrocitos articulares humanos normales y artrósicos (OA).

Tras analizar los niveles de producción de ATP por parte de los condrocitos articulares humanos normales y OA, encontramos que los primeros producen de forma estadísticamente significativa menos cantidad que las células OA: $0,57 \pm 0,19$ (n=7) vs. $0,79 \pm 0,07$ (n=14) (Figura 62).

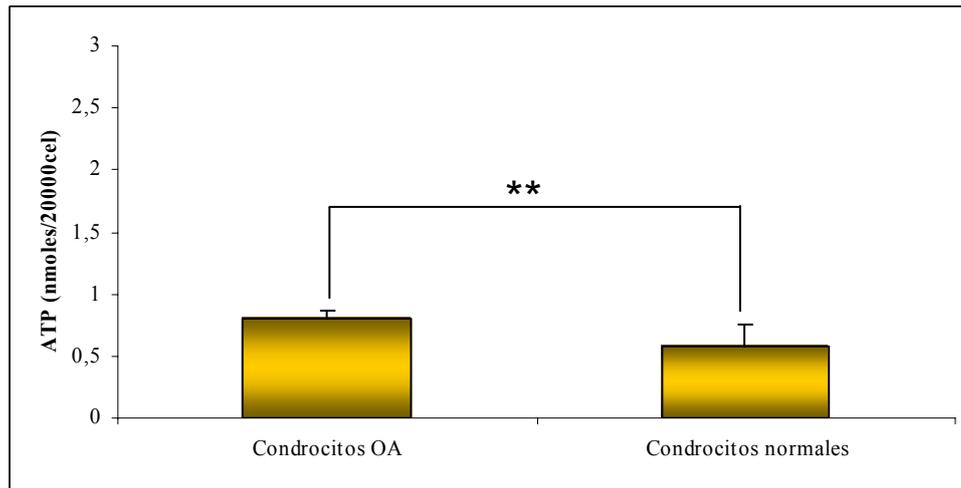


Figura 63.- Diferencias en los niveles de producción de ATP intracelular en condrocitos normales y OA a las 24 h en cultivo, las barras muestran la media \pm DT; * = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos normales.

A la hora de comparar los niveles de producción de lactato en condrocitos normales y OA se encontró que éstos últimos produjeron mayor cantidad de forma significativa: $7,70 \pm 2,54$ vs. $2,30 \pm 0,58$ (n=7) (n=23) (Figura 63).

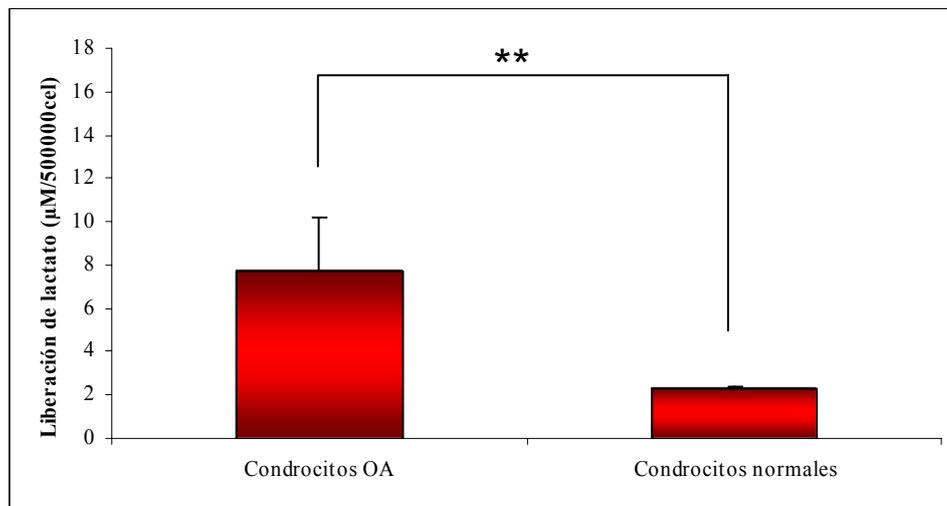


Figura 64.- Diferencias en los niveles de liberación de lactato en condrocitos normales y OA. Las barras muestran la media \pm DT; * = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos normales.

3. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LA GLUCOSA PARA MODIFICAR LOS EFECTOS DEL ÓXIDO NÍTRICO (NO) SOBRE LOS CONDROCITOS ARTICULARES HUMANOS.

Debido a que el metabolismo del cartílago es esencialmente glucolítico, estudiamos con detalle la incorporación de glucosa en la célula y los receptores a través de los cuales dicho compuesto entra en los condrocitos. Por una parte, analizamos la influencia de los diferentes dadores de *NO* a estudio sobre los niveles de incorporación de glucosa y expresión de GLUTs y, además se estudiaron las diferencias entre condrocitos normales y OA en ambos aspectos.

Por otra parte, analizamos las consecuencias de la privación de glucosa en el medio de cultivo, tanto sobre la viabilidad celular como sobre el metabolismo mitocondrial, comparando los resultados con los obtenidos en condiciones estándar de cultivo.

3.1. Diferencias en la liberación de óxido nítrico (NO) por diferentes dadores en condiciones de privación de glucosa.

Analizamos la influencia de la glucosa en la síntesis de *NO* por los diferentes dadores a estudio.

La formación de *NO* se detectó por la acumulación de NO_2^- en sobrenadantes de cultivo por la reacción de Griess. De nuevo se observó que los NOC liberan mayor cantidad de NO_2^- que el *SNP*, del orden de 800 veces más con las dos concentraciones mayores empleadas (1 y 2 mM). Así mismo, el factor que más influencia tuvo fue la concentración del dador, ya que la síntesis de NO_2^- no varió prácticamente a lo largo del tiempo para una concentración dada. En este caso, el NOC que liberó más cantidad de NO_2^- fue el NOC-5 aunque con poca diferencia respecto al NOC-12 (Figura 65).

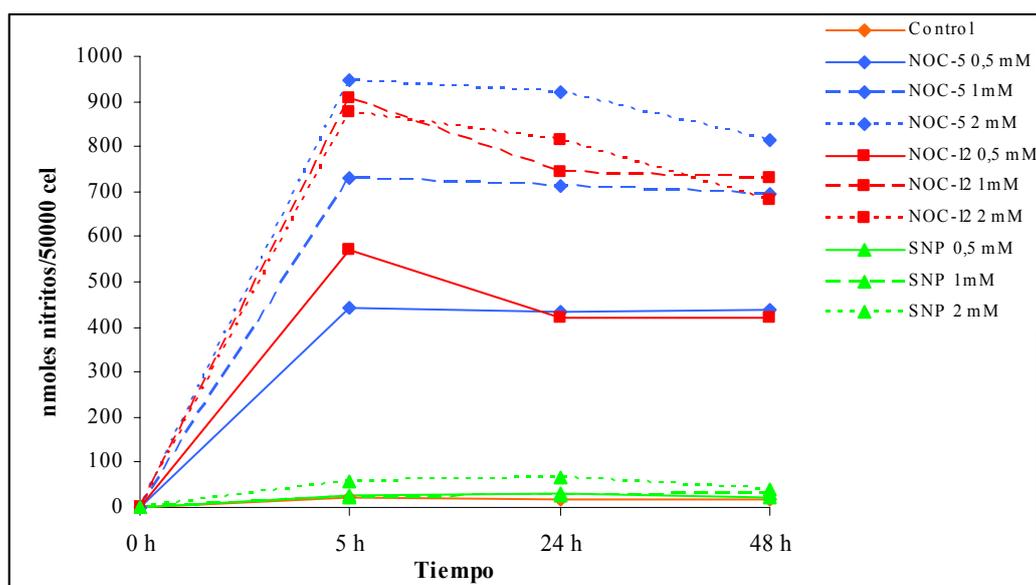


Figura 65.- Síntesis de NO_2^- por diferentes dadores de NO en función del tiempo y concentración en condiciones de privación de glucosa.

3.2. Incorporación de glucosa en condrocitos articulares humanos normales y artrósicos (OA). Efecto del óxido nítrico (NO).

Para medir los niveles de incorporación de glucosa en condrocitos articulares humanos se utilizó glucosa marcada radiactivamente con tritio, concretamente 2-deoxi-glucosa y, posteriormente, se analizó su entrada en la célula en un contador de centelleo.

3.2.1. Efecto del óxido nítrico (NO) sobre la incorporación de glucosa en condrocitos normales.

Las concentraciones empleadas en la estimulación de los condrocitos con los diferentes dadores de NO fueron fisiológicas, es decir, del orden μM . En pruebas preliminares, se intentaron utilizar las usadas hasta el momento en los experimentos, es decir, del orden mM y no fue posible medir la incorporación de glucosa debido a que las células estaban muy afectadas, sobre todo las estimuladas con SNP , no permanecían en monocapa en la superficie de cultivo, de modo que no se analizaba la incorporación en la misma cantidad de células en todas las condiciones.

La entrada de glucosa en la célula es un proceso rápido, se observaron diferencias a un tiempo de 15'. En condrocitos normales estimulados con los diferentes dadores de

NO, la incorporación de glucosa únicamente disminuyó de forma significativa respecto al control en el caso del dador de *NO* *SNP*: $4082,4 \pm 531,3$ (n=7) vs. $5265,7 \pm 1593,8$ (n=7). En el caso de las células estimuladas tanto con *NOC-5* como *NOC-12*, los niveles de entrada de glucosa en la célula fueron prácticamente iguales a los del control (Figura 66).

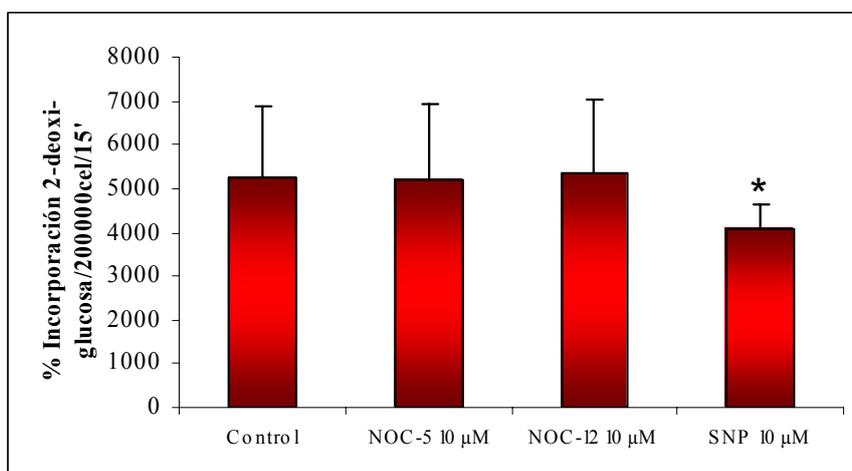


Figura 66.- Niveles de incorporación de 2-deoxi-glucosa a los 15' en condrocitos normales estimulados con diferentes dadores de *NO* durante 24 h; las barras representan la media \pm DT; * = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos normales no tratados.

3.2.2. Diferencias en los niveles de incorporación de glucosa en condrocitos articulares humanos normales y artrósicos (OA).

Los condrocitos articulares humanos OA, tras 1 h de estimulación, incorporaron más glucosa que las células normales de forma significativa: $23889,9 \pm 9941,6$ (n=11) vs. $14669,5 \pm 3127,1$ (n=7) (Figura 67).

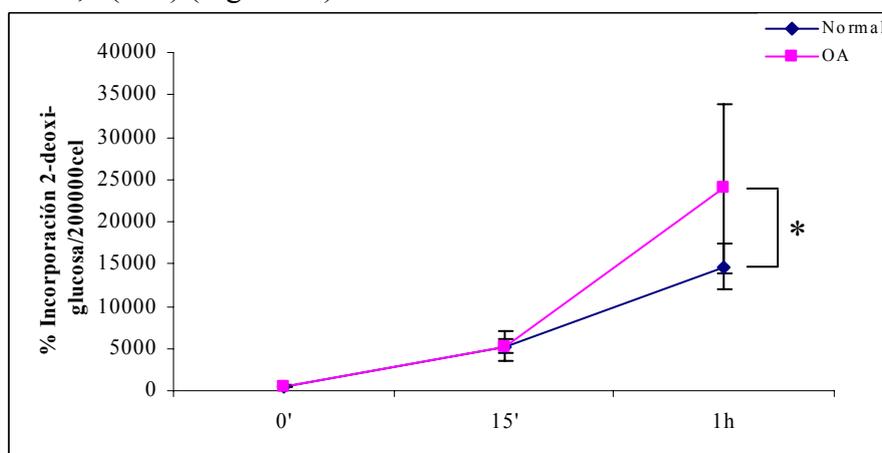


Figura 67.- Diferencias en los niveles de incorporación de glucosa en condrocitos articulares humanos normales y OA en función del tiempo, las barras representan la media \pm DT; * = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos normales.

3.3. Expresión de los receptores de glucosa (GLUTs) en condrocitos articulares humanos normales y artrósicos (OA). Efecto del óxido nítrico (NO).

Estudiamos la expresión de estos receptores a través de dos aproximaciones, una a nivel de su ARNm mediante RT-PCR y, por otra parte, una aproximación más funcional mediante el estudio de la expresión proteica de dichos receptores.

3.3.1. Efecto del óxido nítrico (NO) sobre la expresión de los GLUTs en condrocitos articulares humanos normales.

El efecto del *NO* sobre la expresión de los GLUTs se analizó en condrocitos normales estimulados con los diferentes dadores de *NO* a estudio: *SNP*, *NOC-5* y *NOC-12* durante 24 h, tanto a nivel del ARNm como proteico.

3.3.1.1. Patrón de expresión del ARNm de los GLUTs en condrocitos articulares normales.

No se observaron grandes diferencias en el patrón de expresión de los GLUTs de los condrocitos normales estimulados con los diferentes dadores de *NO* respecto al obtenido en condrocitos normales control. Encontramos expresión del GLUT-4, no descrito hasta el momento en condrocitos, pero en menor medida que el resto de receptores (Figura 68).

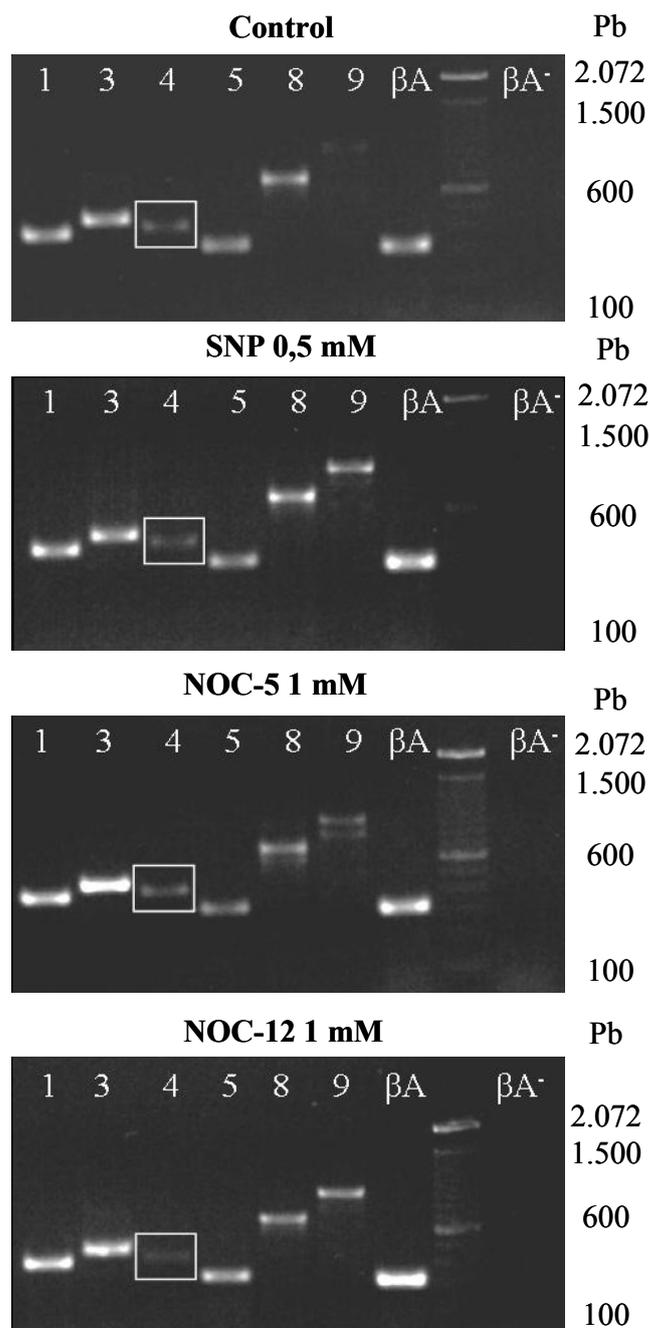


Figura 68.- Patrón de expresión de los GLUTs en condrocitos articulares humanos normales estimulados con diferentes dadores de *NO*. Nótese la expresión del GLUT-4 en todos los casos (βA : β -actina, control positivo de la técnica).

La presencia del GLUT-4 en condrocitos normales a nivel de ARNm también fue demostrada mediante PCR a tiempo real respecto al gen de referencia *HPRT-1*. Se analizaron 22 donantes normales y la amplificación se detectó alrededor del ciclo 34 frente al gen *HRPT-1* que fue en torno al ciclo 24 (Figura 69A). Aunque existe

expresión de GLUT-4 en condrocitos normales está expresión es 8×10^3 veces superior en miocitos, valor normalizado con el gen de referencia *HPRT-1* (Figura 69B).

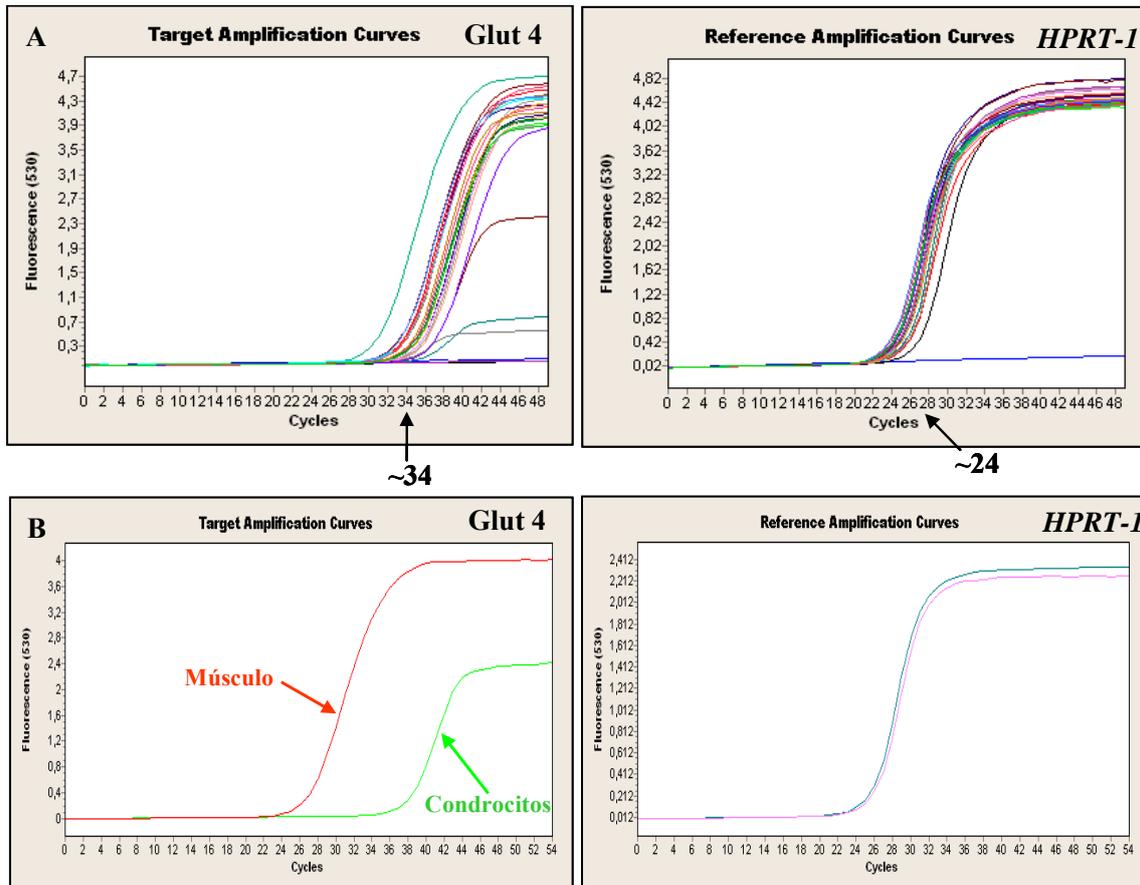


Figura 69.- Expresión del GLUT-4 por PCR a tiempo real en condrocitos articulares humanos normales. **A.-** La amplificación del GLUT-4 en condrocitos normales se produce en torno al ciclo 34 frente al gen de referencia *HPRT-1* que lo hace alrededor del ciclo 24. **B.-** La expresión del GLUT-4 en miocitos es 8×10^3 veces superior a la observada en condrocitos normales (*HPRT-1*: *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*, gen de referencia de la técnica).

Los únicos cambios se detectaron en condrocitos normales estimulados con NOC-12, en los cuales aumentó la expresión del GLUT-4 respecto a las células control y se observaron mejor las isoformas del GLUT-9 (Figura 70).

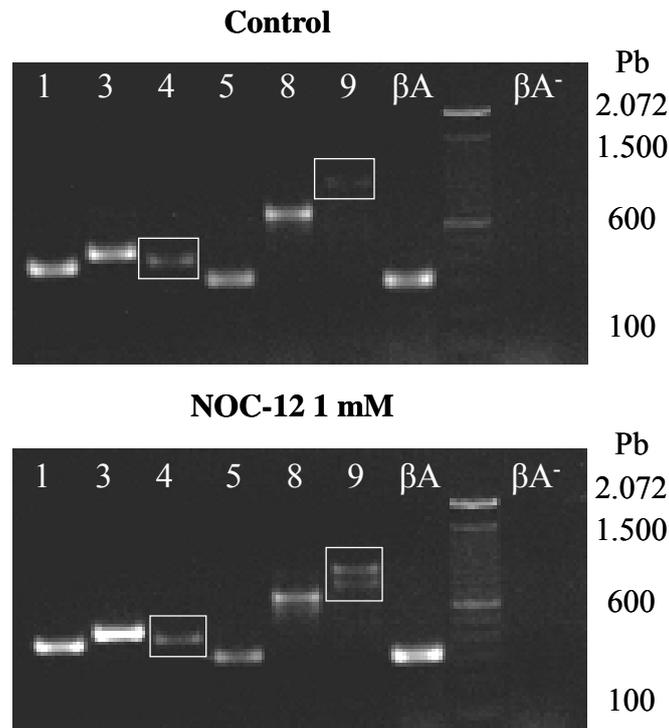


Figura 70.- Cambios observados en condrocitos normales estimulados con el dador de *NO* NOC-12. Nótese una mayor expresión del GLUT-4 así como la aparición de dos isoformas del GLUT-9 (β A: β -actina, control positivo de la técnica).

3.3.1.2. Patrón de expresión proteica de los GLUTs en condrocitos articulares humanos.

Al llevar a cabo los experimentos de expresión proteica de los GLUTs, encontramos innumerables contratiempos que no nos permitieron llegar a demasiadas conclusiones. El GLUT-1 fue el único receptor que nos proporcionó buenos resultados. La estimulación de los condrocitos normales con los dadores de *NO* no modificó la expresión de este GLUT (Figura 71).

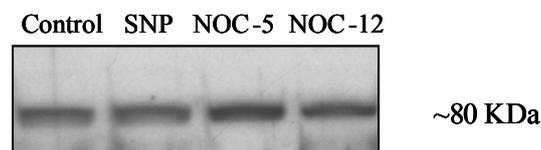


Figura 71.- Expresión del GLUT-1 en condrocitos articulares normales. Nótese la ausencia de cambios en la expresión tras la estimulación con diferentes dadores de *NO*.

3.3.2. Patrón de expresión de los GLUTs en condrocitos articulares humanos normales y artrósicos (OA).

Una vez analizado el efecto del *NO* sobre la expresión de los GLUTs en condrocitos normales, se estudiaron las posibles diferencias entre condrocitos normales y OA. Igualmente se analizó tanto la expresión del ARNm como a nivel proteico.

3.3.2.1. Diferencias en el perfil de expresión del ARNm de los GLUTs en condrocitos articulares humanos normales y artrósicos (OA).

Los condrocitos articulares humanos normales y OA expresaron tanto el GLUT-1 como el GLUT-3, y no el GLUT-2. Además, presentaron expresión del GLUT-4, generalmente en menor cantidad que el resto de receptores (Figura 72). Por otra parte, algunos donantes OA no expresaron ni el GLUT-8 ni el GLUT-9, a diferencia de los condrocitos normales que lo expresan en el 100% de los casos (Tabla 13).

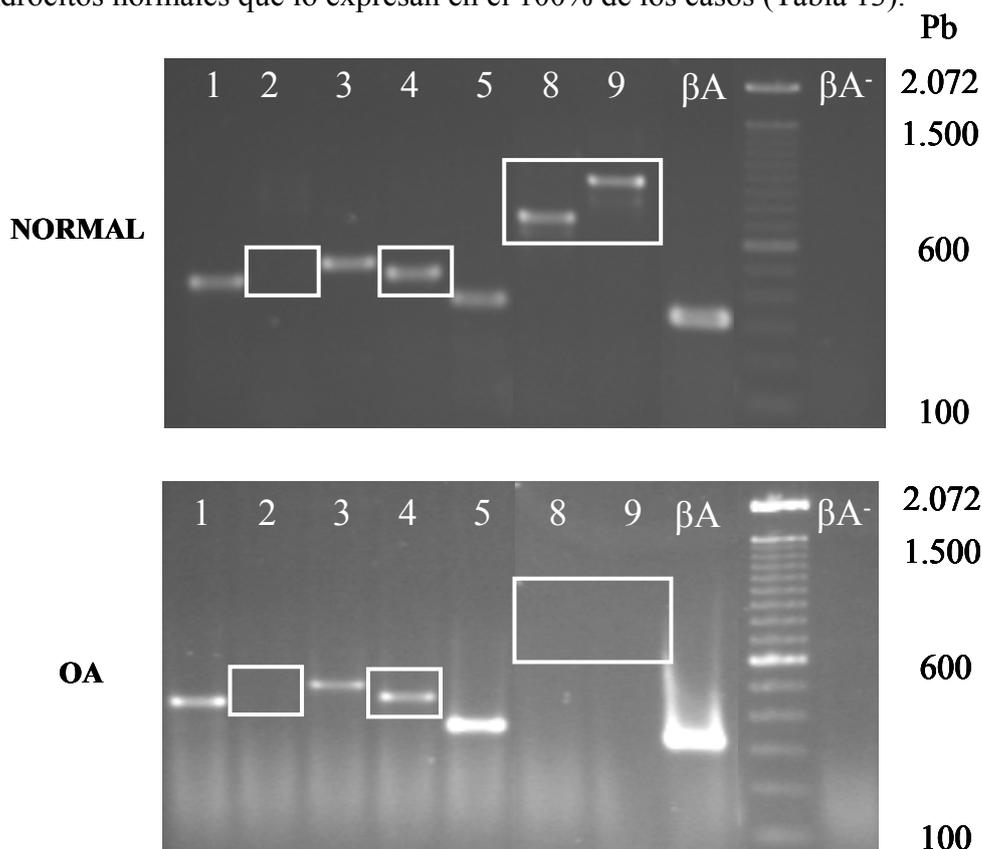


Figura 72.- Resultados obtenidos por RT-PCR de la expresión de los GLUTs de donantes normales y OA. Nótese la ausencia de GLUT-2 y la presencia de GLUT-4, así como la falta de expresión del GLUT-8 y GLUT-9 en condrocitos OA (βA : β -actina, control positivo de la técnica).

Tabla 13.- Expresión de los GLUTs a nivel de ARNm en condrocitos normales y OA.

	Condrocitos Normales	Condrocitos OA
GLUT-1	100 %	100 %
GLUT-2	0 %	0 %
GLUT-3	100 %	100 %
GLUT 4	100 %	100 %
GLUT 5	100 %	100 %
GLUT 8	100 %	85,7 %
GLUT 9	100 %	71,4 %
Nº casos	13	14

3.3.2.2. Diferencias en el perfil de expresión proteica de los GLUTs en condrocitos articulares humanos normales y artrósicos (OA).

Al llevar a cabo el estudio de la expresión proteica de los GLUTs en condrocitos normales y OA encontramos multitud de inconvenientes que no hicieron posible la obtención de demasiados resultados.

Se encontró expresión proteica mediante western blot del GLUT-1, GLUT-3, GLUT-4, GLUT-8 y GLUT-9, y no se detectaron diferencias en el nivel de expresión entre condrocitos normales y OA (Figura 73)

Como hasta ese momento no había sido descrita la expresión de GLUT-4 por otros autores, intentamos verificar que la banda obtenida realmente era de esa proteína, para lo cual realizamos una inmunoprecipitación, posterior electroforesis y, por último, identificación en un espectrofotómetro de masas. No se obtuvieron resultados satisfactorios, y en la identificación se detectaron proteínas del grupo de las actinas.

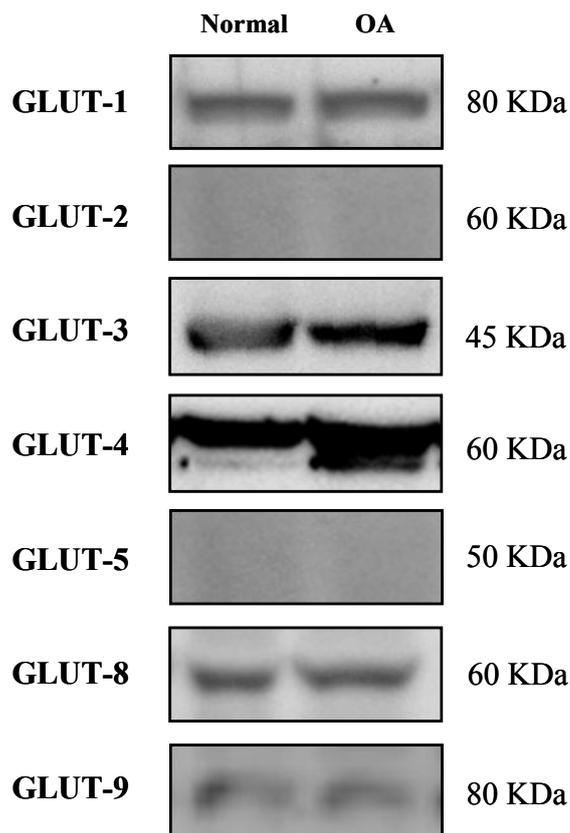


Figura 73.- Expresión proteica de los GLUTs obtenida mediante western blot en condrocitos normales y OA.

3.4. Consecuencias de la privación de glucosa sobre el efecto del óxido nítrico (*NO*) en la viabilidad celular de los condrocitos articulares humanos normales.

El efecto de los dadores de *NO* sobre los condrocitos normales en condiciones de privación de glucosa fue muy variable según el compuesto utilizado. Como norma general, el efecto fue más acusado que el encontrado en condiciones estándar de cultivo.

El *SNP* redujo de forma significativa la cantidad de condrocitos normales vivos a todas las concentraciones y tiempos utilizados, llegando el porcentaje de células muertas a superar el 80%. A las 24 h con *SNP* 2 mM se obtuvo un porcentaje de células muertas de $71,55 \pm 22,03$ (n=5) respecto al control: $0,91 \pm 0,84$ (n=14) (Figura 74).

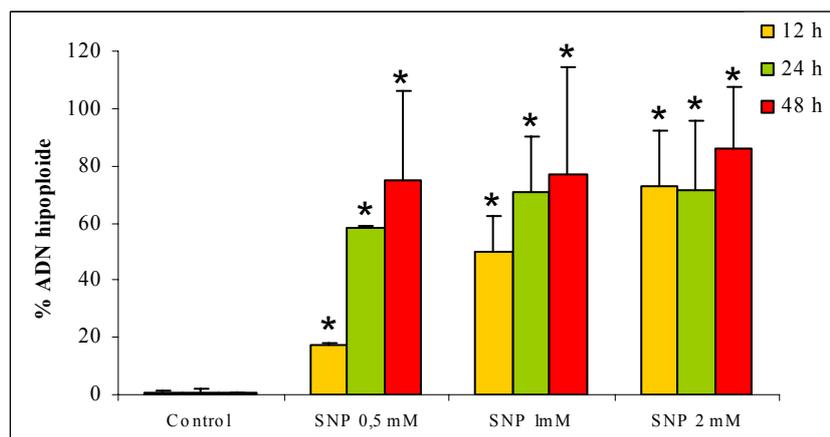


Figura 74.- Efecto del *SNP* en condiciones de privación de glucosa sobre la muerte de condrocitos articulares humanos normales. Las barras muestran la media \pm DT; * = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos normales sin tratar.

El **NOC-5** no indujo en ningún caso la muerte en condrocitos normales, el porcentaje de células no vivas encontrado en células normales estimuladas con este dador, por ejemplo en el caso de la concentración de 2 mM a las 12 h fue de $1,09 \pm 0,91$ (n=3), mientras que el de células normales sin estimular fue de $0,88 \pm 0,77$ (n=9) (Figura 75).

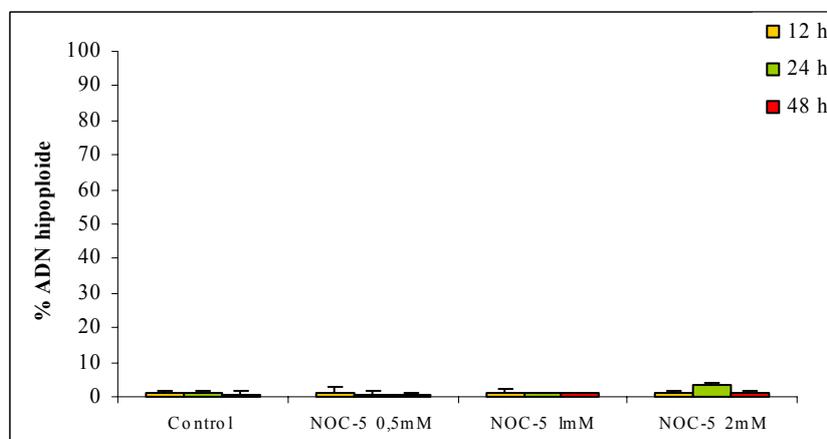


Figura 75.- Efecto del **NOC-5** sobre la muerte de condrocitos normales a diferentes tiempos y concentraciones. Las barras muestran la media \pm DT.

Sin embargo, el **NOC-12** afectó a la cantidad de condrocitos articulares normales vivos de forma significativa. A las concentraciones de 1 y 2 mM, y a partir de las 24 h produjo un descenso significativo en la proporción de células vivas. Por ejemplo, a las 24 h el **NOC-12** 2 mM indujo un porcentaje de células muertas de: $2,59 \pm 1,56$ (n=4) siendo el del control: $0,91 \pm 0,84$ (n=14) (Figura 76).

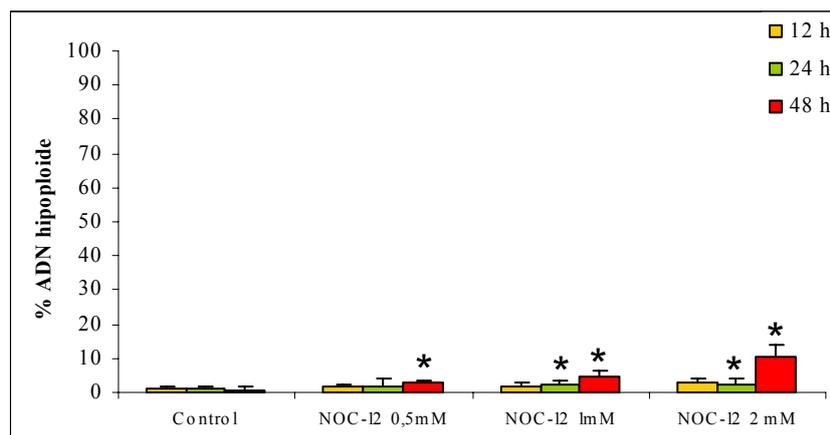


Figura 76.- Efecto del NOC-12 sobre la viabilidad de condrocitos articulares normales en condiciones de privación de glucosa. Las barras muestran la media \pm DT; * = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos normales sin tratar.

Debido a la gran influencia de la falta de glucosa en el medio en el incremento de la muerte celular tras la estimulación de los condrocitos normales con los dadores de *NO SNP* y NOC-12, se hizo una curva de concentraciones de glucosa desde 0 mM (medio sin glucosa) hasta 5 mM (las condiciones estándar de cultivo son 4,5 mM de glucosa), para ver exactamente a partir de qué concentración la glucosa protege a la célula del proceso de muerte.

Con ambos compuestos se observó un descenso gradual en la inducción de muerte proporcional a la concentración de glucosa en el medio. En torno a los valores de 1-2 mM de glucosa el porcentaje de muerte en los condrocitos normales no superó el 10% (Figura 77).

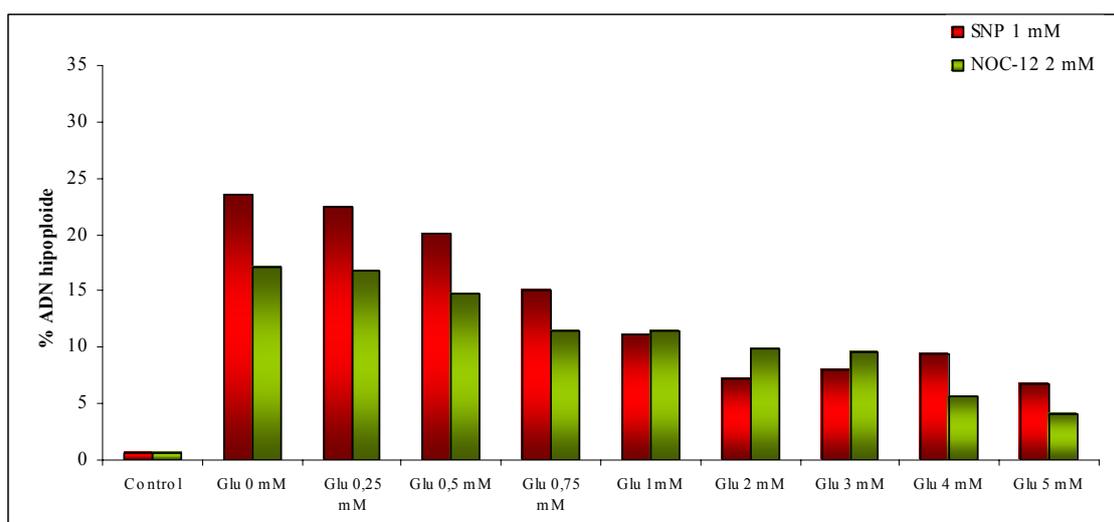


Figura 77.- Efecto de la concentración de glucosa en la inducción de muerte celular con *SNP* y NOC-12 en condrocitos articulares normales a las 24 h.

A modo de resumen, vemos los diagramas obtenidos mediante citometría de flujo donde se muestra el efecto de los diferentes dadores de *NO* sobre la viabilidad de los condrocitos normales en condiciones de privación de glucosa (Figura 78).

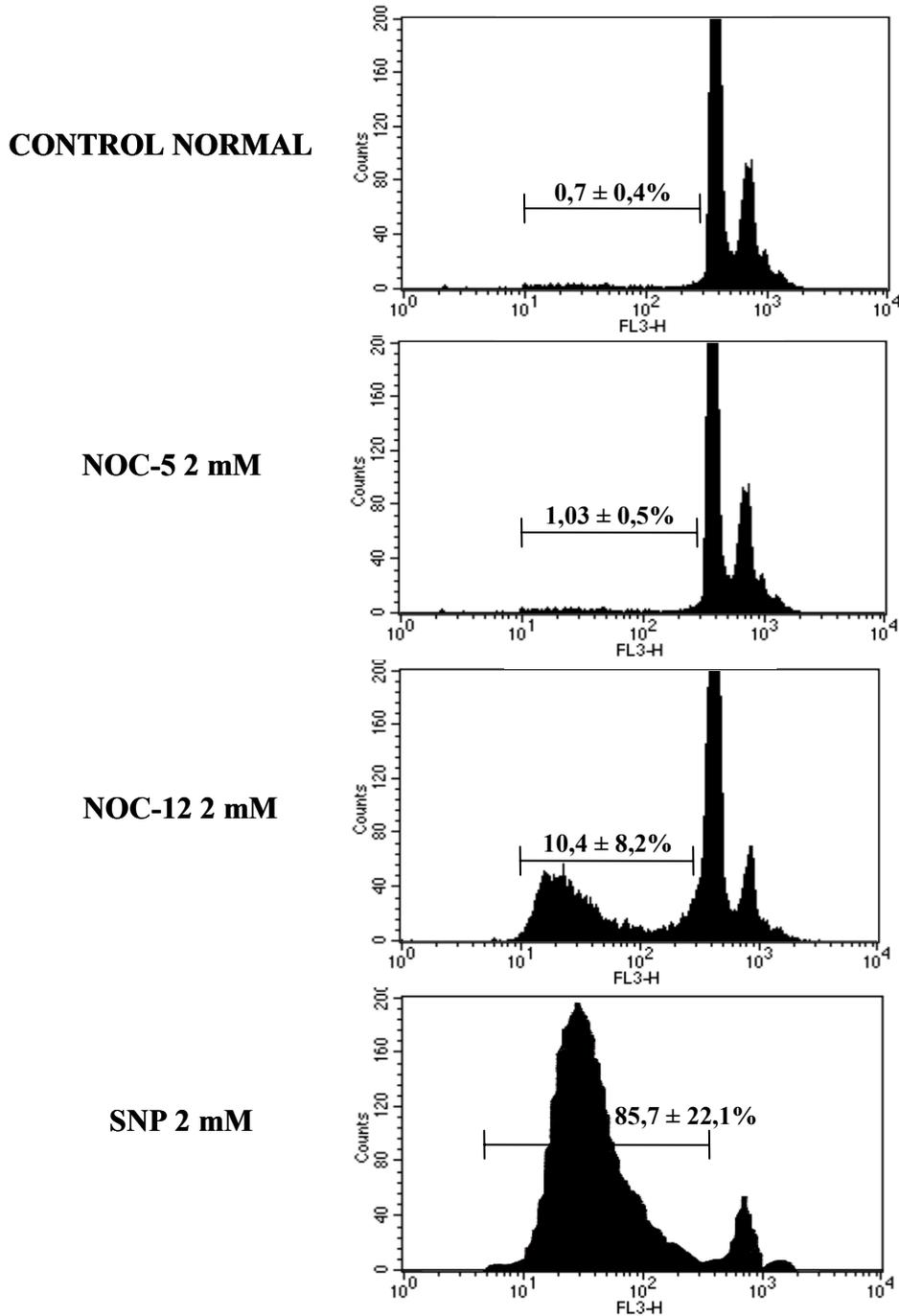


Figura 78.- Representaciones gráficas obtenidas por citometría de flujo donde se muestra el grado de muerte celular inducido por los dadores de *NO* a las 48 h en condiciones de privación de glucosa. Los resultados aparecen como la media \pm DT.

3.5. Influencia de la privación de glucosa sobre la mitocondria en condrocitos articulares humanos.

De igual forma que en el caso de las condiciones estándar de cultivo, se analizaron varios aspectos que nos permiten el estudio del metabolismo energético de la célula, como es el análisis de las actividades de los complejos de la CRM, producción de niveles de ATP intracelular y de lactato, así como la medida de los niveles de despolarización de la membrana mitocondrial.

3.5.1. Efecto de la glucosa sobre los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) en condrocitos articulares humanos.

En el caso de los condrocitos articulares **normales** encontramos que, tras cuatro días de cultivo en medio sin glucosa, las células presentaron una mayor actividad enzimática de la CS respecto a las mismas células cultivadas en presencia de glucosa durante el mismo periodo de tiempo: $126,5 \pm 44,4$ vs. $108,9 \pm 38,5$, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. En general, la actividad de todos los complejos de la CRM apareció algo reducida en condiciones de privación de glucosa, exceptuando el complejo II donde aumentó ligeramente ($7,6 \pm 4,7$ vs. $7,4 \pm 2,3$) (Tabla 14).

Tabla 14.- Valores de los complejos de la CRM en cultivos de condrocitos procedentes de donantes normales cultivados en presencia y ausencia de glucosa*.

	Condrocitos normales en presencia de glucosa	Condrocitos normales en ausencia de glucosa
Edad, años	$49,8 \pm 21,2$ (14)	$53,4 \pm 21,4$ (10)
Proteínas, mg/ml	$3,1 \pm 0,9$ (14)	$3,1 \pm 1,4$ (10)
Actividad enzimática de la CS, nmoles/minuto/mg proteína	$108,9 \pm 38,5$ (14)	$126,5 \pm 44,4$ (10)
Actividad de los complejos mitocondriales ‡		
Complejo I	$30,1 \pm 13,4$ (14)	$25,2 \pm 9,3$ (10)
Complejo II	$7,4 \pm 2,3$ (14)	$7,6 \pm 4,7$ (10)
Complejo III	$53,5 \pm 18,4$ (12)	$46,4 \pm 22,4$ (10)
Complejo IV	$61,2 \pm 8,3$ (14)	$59,6 \pm 10,3$ (10)

* Los valores son la media \pm DT (n). CS: Citrato sintasa.

† $P \leq 0,05$ condrocitos normales sin glucosa vs. condrocitos normales con glucosa control.

‡ La actividad de los complejos corregida por la CS se expresa como (nmoles/minuto/mg proteína)/(actividad específica de la CS) x 100.

Complejo I: NADH-coenzima Q1 reductasa; Complejo II: Succinato deshidrogenasa;

Complejo III: Ubiquinol citocromo c reductasa; Complejo IV: Citocromo c oxidasa.

En el caso de los condrocitos **OA**, se encontraron diferencias en los resultados respecto a los descritos para los normales, ya que presentaron un incremento significativo en la actividad de la CS cuando las células estaban en condiciones de privación de glucosa respecto las condiciones estándar de cultivo ($116,4 \pm 36,4$ vs. $83,2 \pm 20,9$). De igual forma que en el caso de los condrocitos normales, se observó un descenso en las actividades de todos los complejos excepto el II, cuya actividad ascendió ligeramente ($6,5 \pm 1,7$ vs. $6,4 \pm 2,1$) (Tabla 15).

Tabla 15.- Valores de los complejos de la CRM en cultivos de condrocitos procedentes de donantes OA cultivados en presencia y ausencia de glucosa*.

	Condrocitos OA en presencia de glucosa	Condrocitos OA en ausencia de glucosa
Edad, años	$70,0 \pm 10,7$ (15)	$69,4 \pm 10,8$ (14)
Proteínas, mg/ml	$3,5 \pm 1,7$ (15)	$4,3 \pm 2,9$ (14)
Actividad enzimática de la CS, nmoles/minuto/mg proteína	$83,2 \pm 20,9$ (15)	$116,4 \pm 36,4$ (14)†
Actividad de los complejos mitocondriales ‡		
Complejo I	$29,6 \pm 11,4$ (15)	$25,7 \pm 7,6$ (14)
Complejo II	$6,4 \pm 2,1$ (15)	$6,5 \pm 1,7$ (14)
Complejo III	$56,1 \pm 29,7$ (15)	$50,9 \pm 22,3$ (14)
Complejo IV	$65,7 \pm 11,5$ (15)	$60,5 \pm 13,2$ (14)

* Los valores son la media \pm DT (n). CS: Citrato sintasa

† $P \leq 0,05$ condrocitos OA sin glucosa vs. condrocitos OA con glucosa control.

‡ La actividad de los complejos corregida por la CS se expresa como (nmoles/minuto/mg proteína)/(actividad específica de la CS) x 100.

Complejo I: NADH-coenzima Q1 reductasa; Complejo II: Succinato deshidrogenasa;

Complejo III: Ubiquinol citocromo c reductasa; Complejo IV: Citocromo c oxidasa.

3.5.2. Medida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) en condrocitos normales y artrósicos (OA) en condiciones de privación de glucosa. Efecto del óxido nítrico (NO).

En el caso del **SNP**, se encontró un efecto más acusado sobre la pérdida del $\Delta\Psi_m$ que en condiciones estándar de cultivo. Por ejemplo, a las 5 h el porcentaje de células despolarizadas con **SNP** 2 mM pasó de $27,71 \pm 7,30$ (n=5) en condiciones estándar de cultivo a $50,26 \pm 11,98$ (n=5) en condiciones de privación de glucosa (Figura 79). En estas condiciones no sólo fue superior, de forma estadísticamente significativa, la cantidad de células con despolarización mitocondrial sino que además, también se

encontró un descenso significativo en la cantidad de células con polarización normal; por ejemplo, en el caso de *SNP* 1 mM a las 5 h este porcentaje pasó de $25,78 \pm 16,52$ (n=12) en las células normal control a $2,69 \pm 3,51$ (n=5) en las estimuladas.

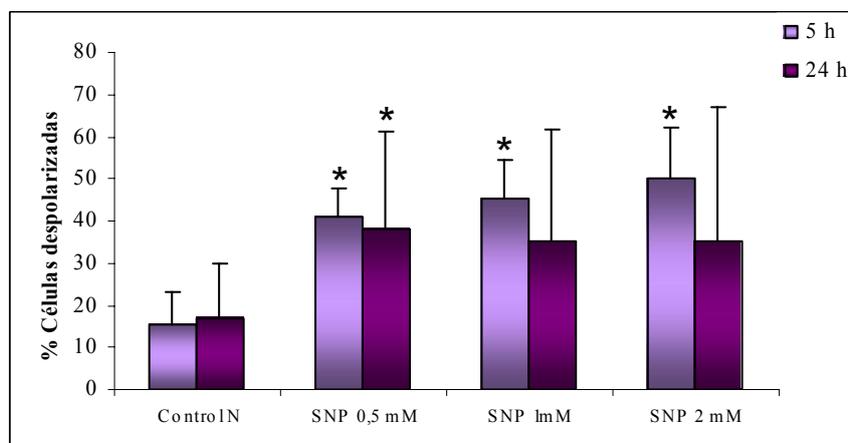


Figura 79.- Efecto del dador de *NO* *SNP* sobre el $\Delta\Psi_m$ en condrocitos articulares normales en condiciones de privación de glucosa. Las barras muestran la media \pm DT; * = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos normales sin tratar.

El efecto del dador de *NO* **NOC-5** sobre el $\Delta\Psi_m$ en condiciones de privación de glucosa prácticamente no se vio incrementado respecto a las condiciones estándar de cultivo. En el caso de **NOC-5** 0,5 mM a las 5 h, el porcentaje de células despolarizadas pasó de $12,44 \pm 2,75$ (n=5) a $17,19 \pm 7,27$ (n=6) (Figura 80). La cantidad de células con polarización normal tampoco se vio significativamente alterada al retirar la glucosa del medio de cultivo.

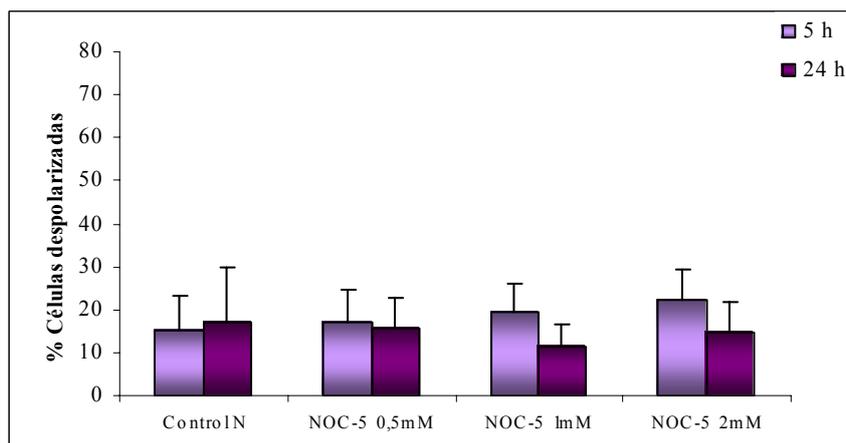


Figura 80.- Gráfico donde se muestra el efecto del **NOC-5** sobre el $\Delta\Psi_m$ en condrocitos articulares humanos normales en medio sin glucosa a las 5 y a las 24 h. Las barras muestran la media \pm DT.

Por otra parte, con el **NOC-12** si encontramos algunas diferencias respecto a los resultados obtenidos en condiciones estándar de cultivo. Mientras que con glucosa en el

medio únicamente se encontraba significación a las 24 h y a la mayor de las concentraciones utilizadas (2 mM), al retirar la glucosa del medio a las 5 h ya se observó una clara tendencia hacia la despolarización mitocondrial. A las 24 h ya se vio despolarización mitocondrial a la concentración de 1 mM: $24,81 \pm 9,52$ (n=6) vs. $16,86 \pm 12,98$ (n=14) de las células control (Figura 81), además se encontró un descenso significativo en la cantidad de condrocitos con $\Delta\Psi_m$ normal: $6,04 \pm 5,74$ (n=6) en células estimuladas con NOC-12 2 mM frente a $27,48 \pm 19,00$ (n=14) de las células normales control.

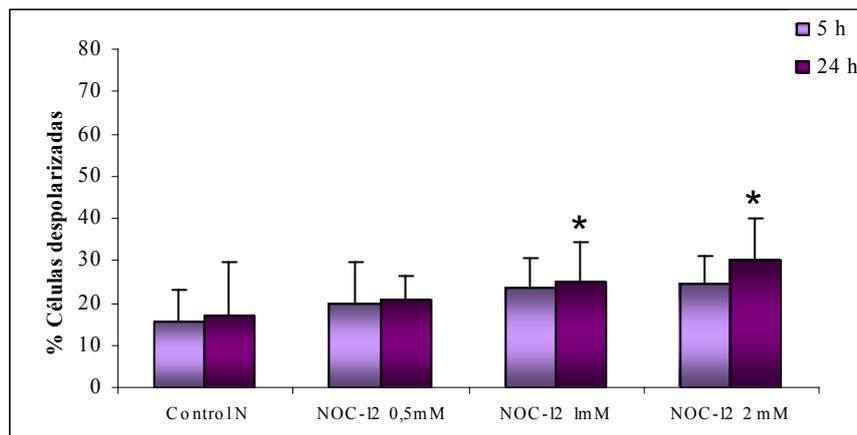


Figura 81.- Efecto del NOC-12 sobre el $\Delta\Psi_m$ en condrocitos articulares humanos normales en condiciones de privación de glucosa. Las barras muestran la media \pm DT; * = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos normales sin tratar.

A diferencia de las condiciones estándar de cultivo, en los condrocitos OA no se observó un incremento significativo en la proporción de células despolarizadas en condiciones basales respecto a las células normales: $15,38 \pm 7,87$ (n=12) vs. $18,35 \pm 11,57$ (n=40) (Figura 82).

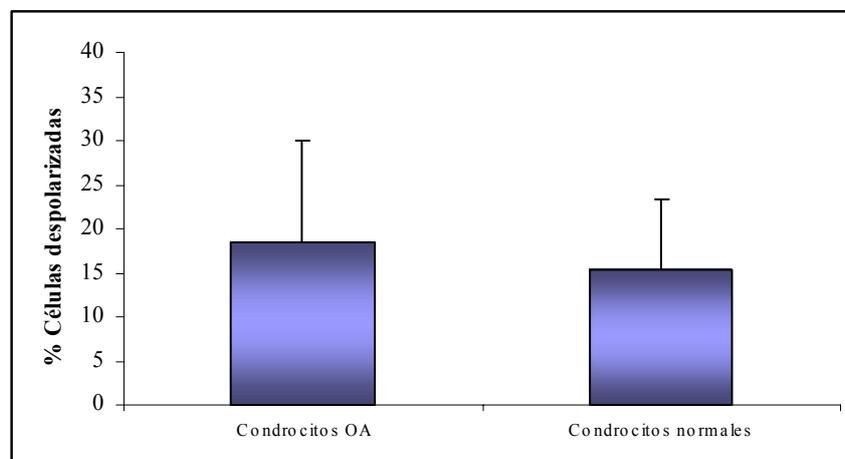


Figura 82.- Comparación del $\Delta\Psi_m$ de condrocitos normales y OA. Las barras muestran la media \pm DT.

A modo de resumen del efecto de los diferentes dadores de *NO* empleados en este estudio sobre el $\Delta\Psi_m$ en condiciones de privación de glucosa, se muestran los diagramas obtenidos por citometría de flujo mediante el empleo del fluorocromo JC-1 (Figura 83).

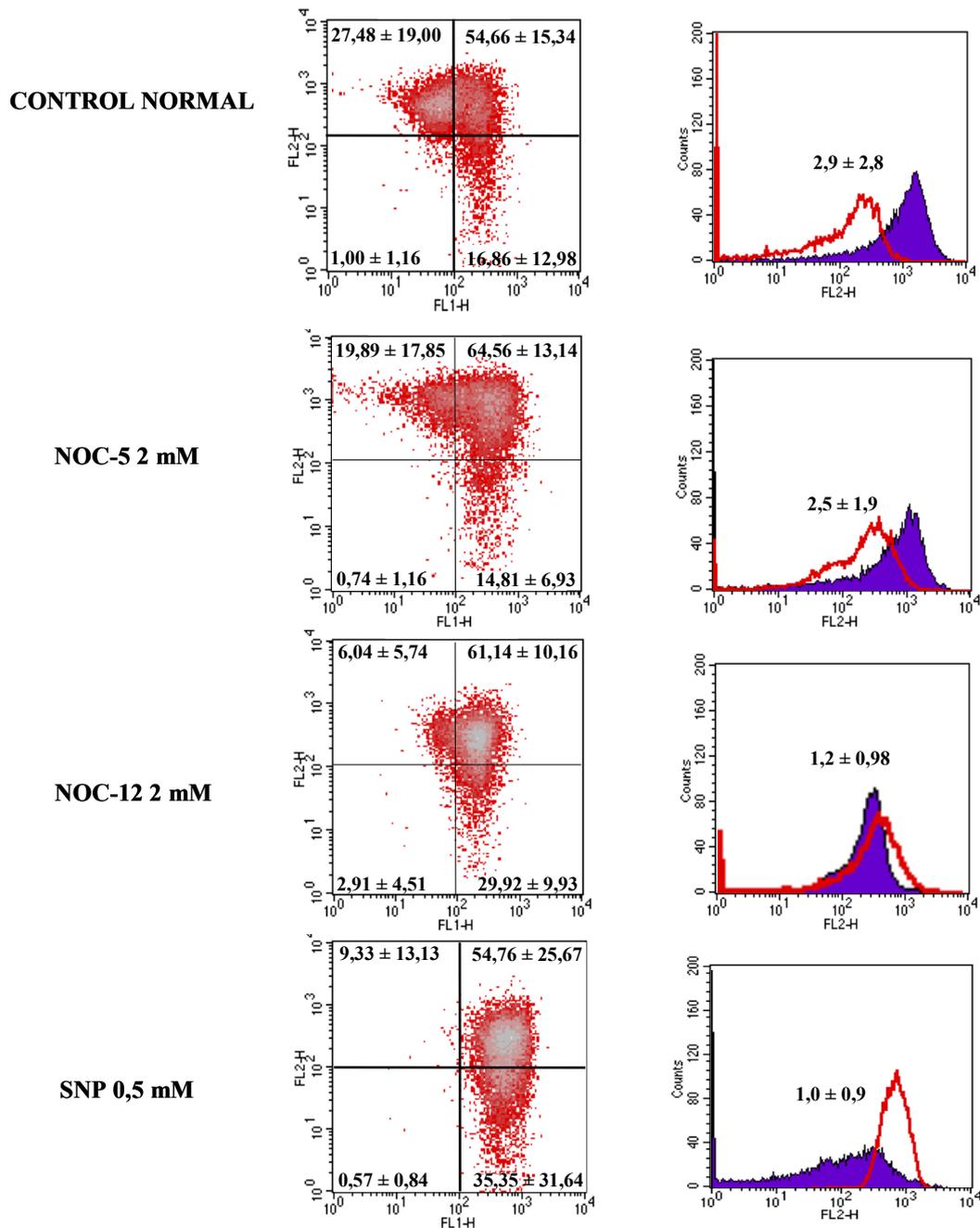


Figura 83.- Representaciones gráficas donde se muestra el grado de despolarización mitocondrial de condrocitos articulares humanos normales en condiciones de privación de glucosa estimulados durante 24 h con los diferentes dadores de *NO*. Los resultados aparecen como la media ± DT.

3.5.3. Medida de los niveles de producción de ATP intracelular y lactato en condrocitos articulares humanos normales y artrósicos (OA) en condiciones de privación de glucosa. Efecto del óxido nítrico (NO).

De igual forma que en el caso de las condiciones estándar de cultivo, se analizó la influencia de los diferentes dadores de *NO* a estudio sobre la síntesis de ATP intracelular y lactato. Posteriormente, se comparó si existían diferencias en la síntesis de ambos compuestos por parte de condrocitos normales y OA.

3.5.3.1. Efecto del óxido nítrico (NO) en condiciones de privación de glucosa sobre los niveles de producción de ATP intracelular y lactato en condrocitos articulares humanos normales.

En condiciones de privación de glucosa se acentuó el efecto del *NO* sobre la síntesis de ATP intracelular en condrocitos articulares normales, ya que se observó una reducción significativa en dicha síntesis tras la estimulación con todos los dadores de *NO* a estudio durante 24 h. La reducción más acusada en estos niveles se encontró con el dador NOC-12, pasando de $0,75 \pm 0,24$ (n=7) en condrocitos normales control a $0,09 \pm 0,13$ (n=7) en condrocitos tratados con NOC-12 2 mM, a diferencia de las condiciones estándar de cultivo, en las cuales era el *SNP* el dador que producía el efecto más acusado (Tabla 16).

En estas condiciones todos los dadores de *NO* a estudio incrementaron los niveles de lactato de forma significativa, en torno a los mismos valores, duplicando aproximadamente el valor obtenido en condrocitos normales control: $0,26 \pm 0,18$ (n=7) (Tabla 16).

Tabla 16.- Diferencias en los niveles de producción de ATP intracelular en condrocitos normales estimulados con diferentes dadores de *NO* durante 24 h en condiciones de privación de glucosa.

	ATP (nmoles/20000 células)	LACTATO (μ M/500000 células)
Condrocitos normales control	0,75 \pm 0,24 (7)	0,26 \pm 0,18 (7)
SNP 0,5 mM	0,54 \pm 0,17 (7)*	0,42 \pm 0,19 (7)*
SNP 1 mM	0,48 \pm 0,24 (7)*	0,44 \pm 0,22 (7)*
SNP 2 mM	0,26 \pm 0,12 (7)*	0,48 \pm 0,24 (7)*
NOC-5 0,5 mM	0,60 \pm 0,18 (7)	0,38 \pm 0,21 (7)
NOC-5 1 mM	0,52 \pm 0,18 (7)*	0,40 \pm 0,20 (7)*
NOC-5 2 mM	0,40 \pm 0,19 (7)*	0,41 \pm 0,20 (7)*
NOC-12 0,5 mM	0,27 \pm 0,12 (7)*	0,47 \pm 0,20 (7)*
NOC-12 1 mM	0,20 \pm 0,10 (7)*	0,43 \pm 0,19 (7)*
NOC-12 2 mM	0,09 \pm 0,13 (7)*	0,42 \pm 0,19 (7)*

* = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos normales sin tratar.

3.5.3.2. Influencia de la glucosa en las diferencias en los niveles de producción de ATP intracelular y lactato en condrocitos articulares humanos normales y artrósicos (OA).

Tras analizar los niveles de producción de ATP intracelular por parte de los condrocitos normales y OA en condiciones de privación de glucosa, no se observaron diferencias significativas entre ambos tipos de células, mientras que en condrocitos OA la producción fue de $0,64 \pm 0,20$ (n=22) en normales ascendió a $0,75 \pm 0,23$ (n=7) (Figura 84). Al comparar los resultados con los obtenidos en condiciones estándar de cultivo, se observó un comportamiento opuesto en los dos tipos de condrocitos, mientras que en células OA los niveles de ATP descendieron de forma significativa: $0,64 \pm 0,20$ (n=22) vs. $0,79 \pm 0,07$ (n=14), en condrocitos normales estos niveles aumentaron también de forma estadísticamente significativa: $0,75 \pm 0,23$ (n=7) vs. $0,57 \pm 0,19$ (n=7) (Figura 84).

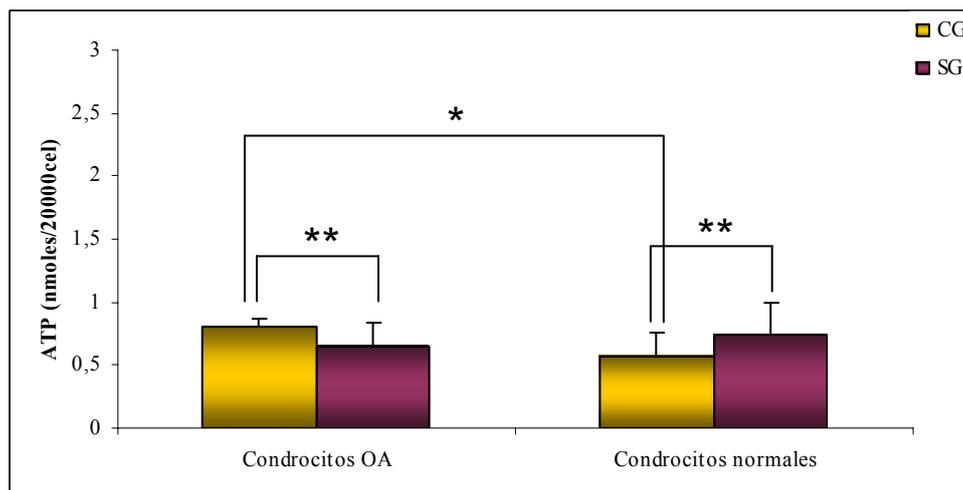


Figura 84.- Diferencias en los niveles de producción de ATP intracelular en condrocitos normales y OA a las 24 h en cultivo en condiciones de privación de glucosa. Las barras muestran la media \pm DT. * = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos normales. ** = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos en condiciones estándar de cultivo (con glucosa).

En condiciones de privación de glucosa, los condrocitos OA mostraron mayor liberación de lactato que los condrocitos normales de forma significativa: $0,89 \pm 1,1$ (n=49) vs. $0,26 \pm 0,18$ (n=7) (Figura 85).

Así mismo, se produjo un acusado descenso en los niveles de liberación de lactato por parte de ambos tipos de condrocitos en condiciones de privación de glucosa respecto a las condiciones estándar de cultivo, llegando a niveles cercanos a $0 \mu\text{M}$ (Figura 85).

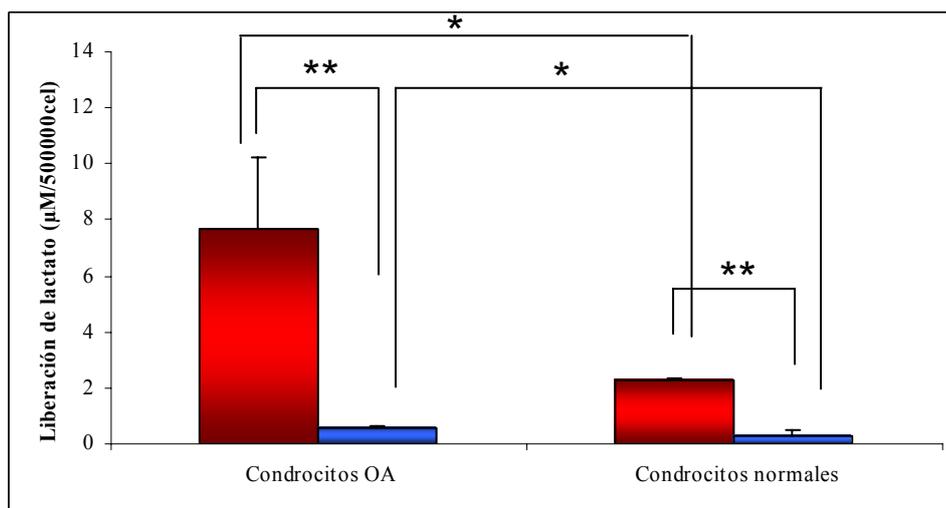


Figura 85.- Diferencias en los niveles de liberación de lactato en condrocitos normales y OA a las 24 h en cultivo en condiciones estándar de cultivo y de privación de glucosa. Las barras muestran la media \pm DT. * = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos normales. ** = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos en condiciones estándar de cultivo (con glucosa).

4. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL (CRM) SOBRE LA VIABILIDAD Y EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_m$) DE LOS CONDROCITOS ARTICULARES HUMANOS.

Como el tratamiento de los condrocitos articulares normales con los diferentes dadores de *NO* inhibió los complejos de la CRM y los condrocitos OA tienen alteradas las actividades de los complejos II y III de la CRM, estudiamos la relevancia de las alteraciones de la CRM sobre la viabilidad y el $\Delta\Psi_m$ de los condrocitos normales mediante el empleo de diferentes inhibidores de los complejos de la CRM.

4.1. Diferencias en la liberación de óxido nítrico (*NO*) por los diferentes inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM).

Tras analizar los niveles de liberación de *NO* por la acumulación de NO_2^- en sobrenadantes de cultivo tras la inhibición de los complejos de la CRM, sólo se observó un incremento significativo tras el tratamiento de los condrocitos normales con el inhibidor del complejo II (*NPA*) tanto en condiciones estándar de cultivo: $23,75 \pm 4,90$ (n=4) vs. $6,76 \pm 0,63$ (n=4), como en condiciones de privación de glucosa: $20,90 \pm 2,36$ (n=4) vs. $6,20 \pm 0,73$ (n=4) (Figura 86).

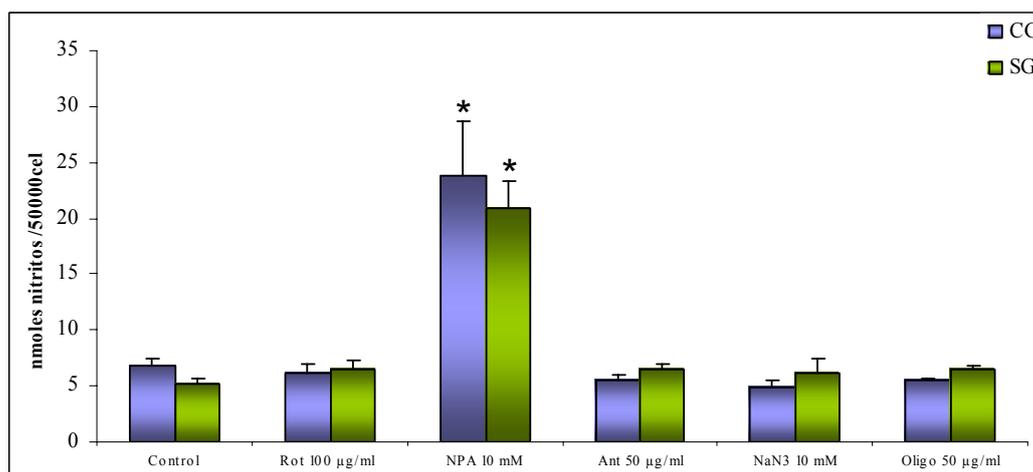


Figura 86.- Efecto de los inhibidores de los complejos de la CRM sobre la liberación de NO_2^- por parte de los condrocitos humanos normales, en condiciones estándar de cultivo y de privación de glucosa. Las barras muestran la media \pm DT. * = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos normales sin tratar.

4.2. Efecto de los inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) sobre la viabilidad de los condrocitos articulares humanos.

En condiciones estándar de cultivo, con el inhibidor del complejo I (**rotenona**), a las 24 h sólo se observó un descenso en la viabilidad a la concentración más elevada de las utilizadas: 100 $\mu\text{g/ml}$, ya que la proporción de células con ADN hipodiploide pasó de $1,28 \pm 1,22$ de las células normales control ($n=21$) a $3,37 \pm 2,74$ ($n=6$). Sin embargo, en condiciones de privación de glucosa encontramos una clara inducción de muerte celular, siendo el porcentaje de células no viables de $33,74 \pm 18,93$ ($n=5$) con rotenona 10 $\mu\text{g/ml}$ a las 24 h, cantidad muy superior a la encontrada en células normales control: $0,68 \pm 0,42$ ($n=14$) (Figura 87).

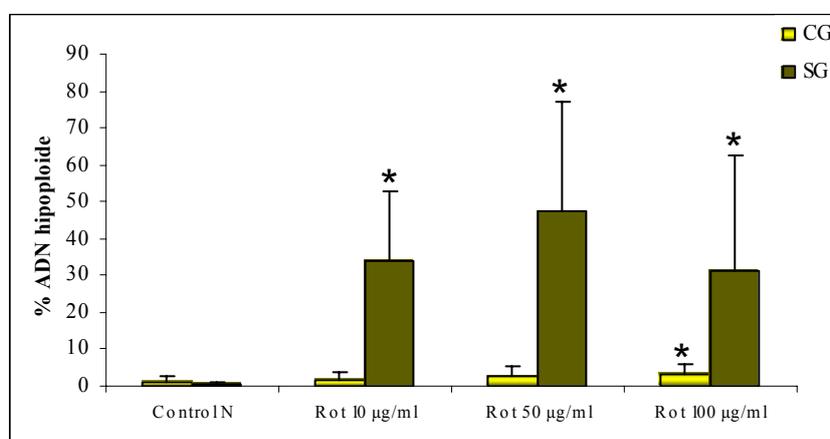


Figura 87.- Efecto del inhibidor del complejo I de la CRM (rotenona) sobre la viabilidad de los condrocitos articulares humanos normales en condiciones estándar de cultivo y de privación de glucosa a las 24 h. Las barras muestran la media \pm DT. * = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos normales sin tratar.

En el caso del inhibidor del complejo II de la CRM (**NPA**), no se observó muerte celular a las 24 h con ninguna de las concentraciones estudiadas ni en condiciones estándar de cultivo ni en situación de privación de glucosa. En esta última condición se encontró una respuesta dependiente de la dosis y, debido a algún donante con comportamiento atípico, un porcentaje algo superior a la tendencia general, aún así esta proporción fue de $8,50 \pm 15,57$ ($n=5$) respecto a los condrocitos normales control: $0,68 \pm 0,42$ ($n=14$) (Figura 88).

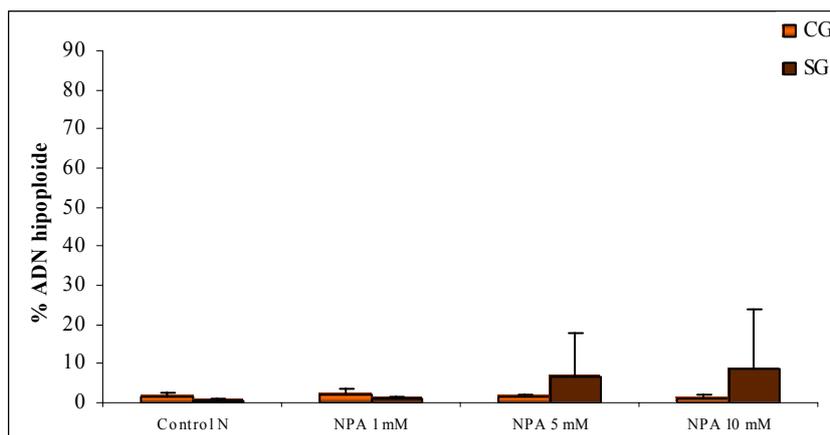


Figura 88.- Efecto del inhibidor del complejo II de la CRM (*NPA*) sobre la viabilidad de los condrocitos articulares humanos normales a las 24 h en presencia y ausencia de glucosa en el medio. Las barras muestran la media \pm DT.

En el caso del inhibidor del complejo III (**antimicina A**), en ambas condiciones se observó una clara tendencia dosis-respuesta en condrocitos normales. En condiciones estándar de cultivo sólo se redujo la viabilidad de forma significativa con la mayor de las concentraciones utilizadas (50 μ g/ml), el porcentaje de células muertas fue de $4,24 \pm 3,25$ (n=7) respecto al control: $1,28 \pm 1,22$ (n=17). Por otra parte, en condiciones de privación de glucosa, la proporción de células no viables a las 24 h fue muy superior a la encontrada en células control normales: $0,68 \pm 0,42$ (n=14) a todas las concentraciones, a la mayor de ellas este porcentaje fue de $31,35 \pm 28,12$ (n=5) (Figura 89).

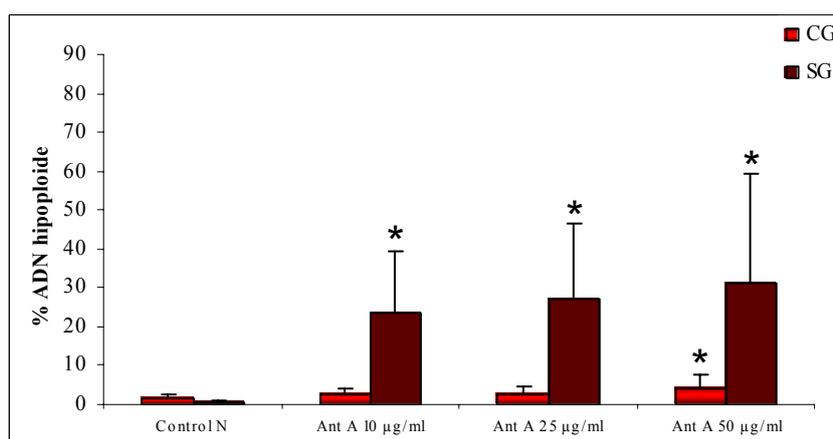


Figura 89.- Efecto del inhibidor del complejo III de la CRM (antimicina A) sobre la viabilidad de los condrocitos articulares humanos normales a las 24 h en condiciones estándar de cultivo y de privación de glucosa. Las barras muestran la media \pm DT. * = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos normales sin tratar.

Con el inhibidor del complejo IV de la CRM, la NaN_3 , las diferencias observadas en ambos tipos de situaciones fueron muy llamativas, mientras que en condiciones estándar de cultivo no se encontró ningún efecto en cuanto a la viabilidad de las células, ya que el porcentaje de células normales estimuladas con NaN_3 10 mM no viables fue de $1,53 \pm 0,95$ (n=7), prácticamente igual al de células normales control: $1,18 \pm 0,71$ (n=17), sin embargo, en condiciones de privación de glucosa se observó un fuerte efecto, ya que el porcentaje de células muertas a las 24 h con NaN_3 10 mM fue de $45,62 \pm 41,06$ (n=5) respecto a las células control: $0,68 \pm 0,42$ (n=14) (Figura 90), aunque hubo una gran variabilidad en las respuestas de los diferentes donantes normales analizados.

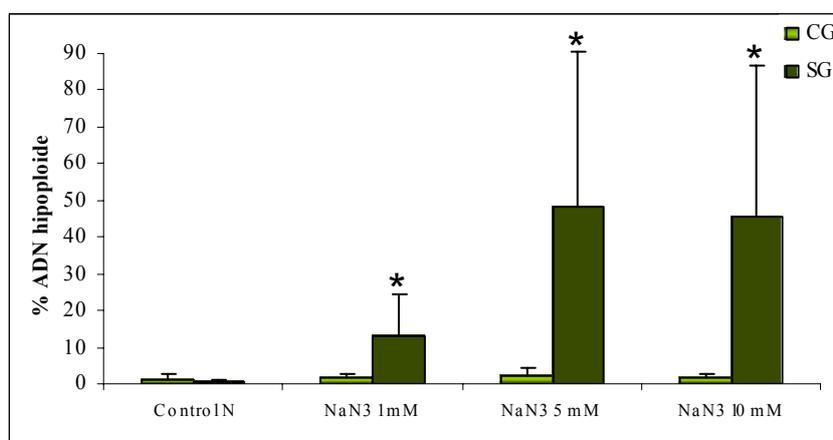


Figura 90.- Efecto del inhibidor del complejo IV de la CRM (NaN_3) sobre la viabilidad de los condrocitos articulares humanos normales en presencia y ausencia de glucosa en el medio. Las barras muestran la media \pm DT. * = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos normales sin tratar.

Con el inhibidor del complejo V de la CRM (**oligomicina A**), fue con el único que se observó una reducción significativa de la viabilidad celular a todas las concentraciones en condiciones estándar de cultivo en condrocitos normales, siendo el porcentaje de células no viables con oligomicina A 50 $\mu\text{g/ml}$ a las 24 h de $12,21 \pm 11,42$ (n=6) respecto a las células normales control: $1,28 \pm 1,22$ (n=21). En condiciones de privación de glucosa este efecto se acentuó, de modo que el porcentaje de células muertas a las 24 h con oligomicina A 50 $\mu\text{g/ml}$ fue de $44,30 \pm 22,73$ (n=5) respecto al encontrado de forma basal: $0,68 \pm 0,42$ (n=14), efecto constante y bastante homogéneo entre todos los donantes normales analizados (Figura 91).

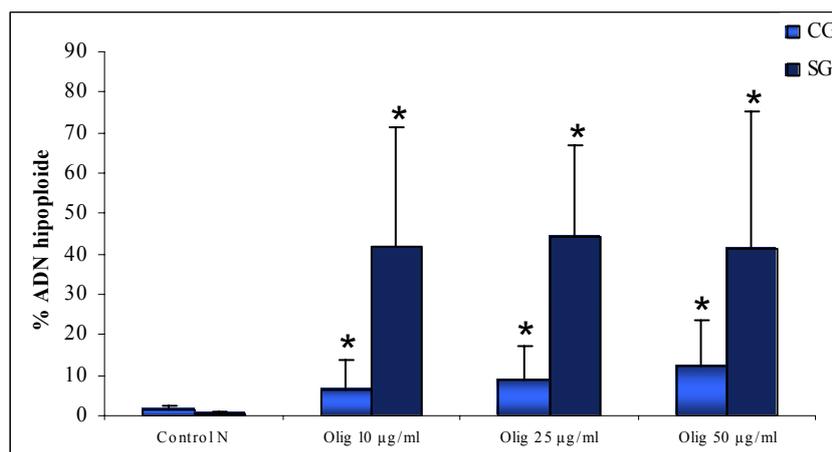


Figura 91.- Efecto del inhibidor del complejo V de la CRM (oligomicina A) sobre la viabilidad de los condrocitos articulares humanos normales en condiciones estándar de cultivo y de privación de glucosa. Las barras muestran la media \pm DT. * = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos normales sin tratar.

Debido a la influencia de la falta de glucosa en el medio para la reducción de la viabilidad celular por inhibición de los complejos mitocondriales, se hizo una curva de concentraciones de glucosa desde 0 mM (medio sin glucosa) hasta 5 mM (las condiciones estándar de cultivo son 4,5 mM de glucosa), para ver exactamente a partir de qué concentración la glucosa protege a la célula del proceso de muerte.

Todos los inhibidores de la CRM, excepto el *NPA* que fue el único que no indujo muerte celular en condrocitos normales, con una concentración de glucosa inferior a 0,5 mM indujeron la muerte de los condrocitos articulares de forma significativa; por otra parte, a partir de esa concentración el efecto sobre la viabilidad de los condrocitos articulares se mantuvo constante hasta la concentración más alta (Figura 92).

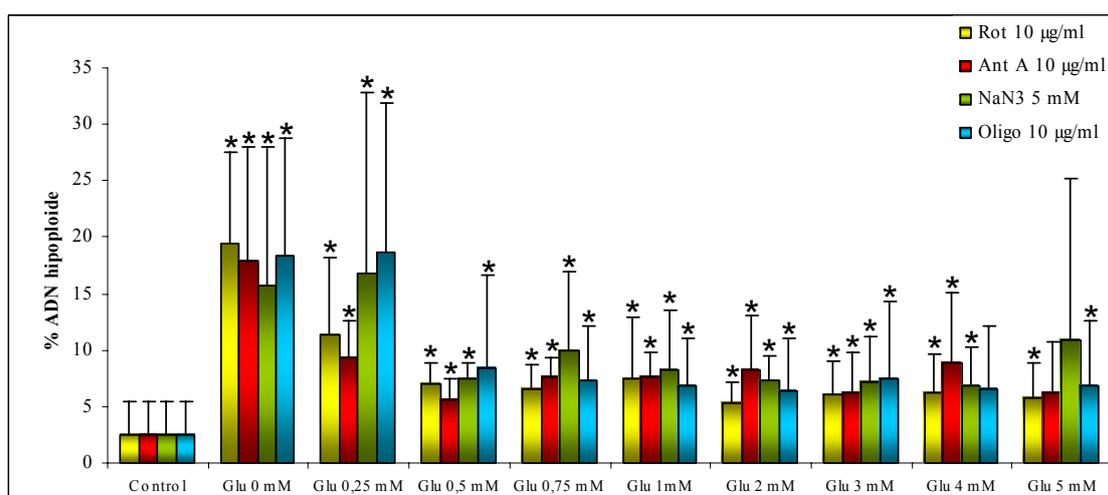


Figura 92.- Efecto de la concentración de glucosa en la inducción de muerte celular por inhibición de los complejos mitocondriales en condrocitos articulares normales a las 24 h. Las barras muestran la media \pm DT

4.3. Efecto de los inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) sobre el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).

En condiciones estándar de cultivo, el inhibidor del complejo I de la CRM (**rotenona**) a las 5 h no produjo ningún efecto sobre el $\Delta\Psi_m$, aunque el porcentaje de células despolarizadas con rotenona 100 $\mu\text{g/ml}$ fue de $17,30 \pm 11,95$ (n=5) respecto al control de células normales sin estimular: $9,53 \pm 6,88$ (n=22), estas diferencias no fueron significativas. Por el contrario, en condiciones de privación de glucosa se encontraron diferencias significativas con las dos concentraciones superiores, de modo que el porcentaje de células despolarizadas con rotenona 100 $\mu\text{g/ml}$ a las 5 h fue de $27,48 \pm 4,12$ (n=3) respecto al control de células normales sin estimular: $15,38 \pm 7,87$ (n=12) (Figura 93).

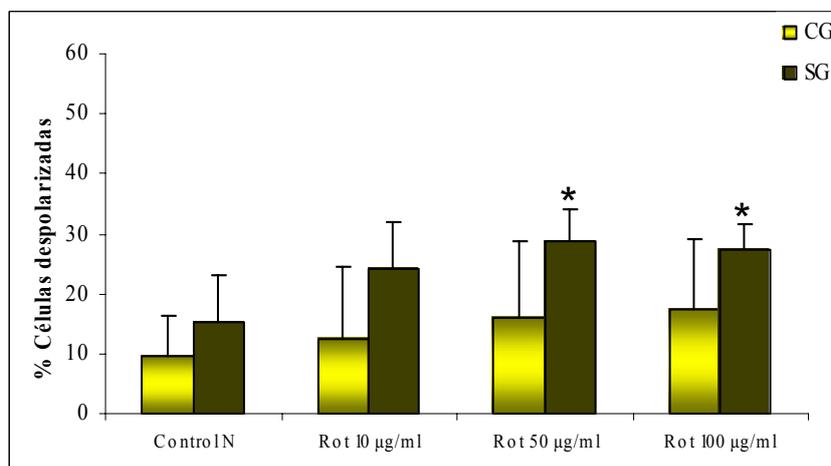


Figura 93.- Efecto del inhibidor del complejo I (rotenona) sobre el $\Delta\Psi_m$ de condrocitos articulares normales a las 5 h en condiciones estándar de cultivo y de privación de glucosa. Las barras muestran la media \pm DT. * = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos normales sin tratar.

En condiciones estándar de cultivo, si se observó un grado de despolarización mitocondrial significativo con las dos concentraciones más bajas empleadas del inhibidor del complejo II (**NPA**), siendo el porcentaje de células despolarizadas con NPA 1 mM de $22,26 \pm 9,26$ (n=6) respecto al control: $9,53 \pm 6,88$ (n=22). Sin embargo, en condiciones de privación de glucosa no se encontraron diferencias significativas aunque la cantidad de células despolarizadas fue superior al control de células normales: $15,38 \pm 7,87$ (n=40) pero con una elevada DT. Por ejemplo, en el caso de NPA 5 mM encontramos un porcentaje de $20,92 \pm 11,26$ (n=6) (Figura 94).

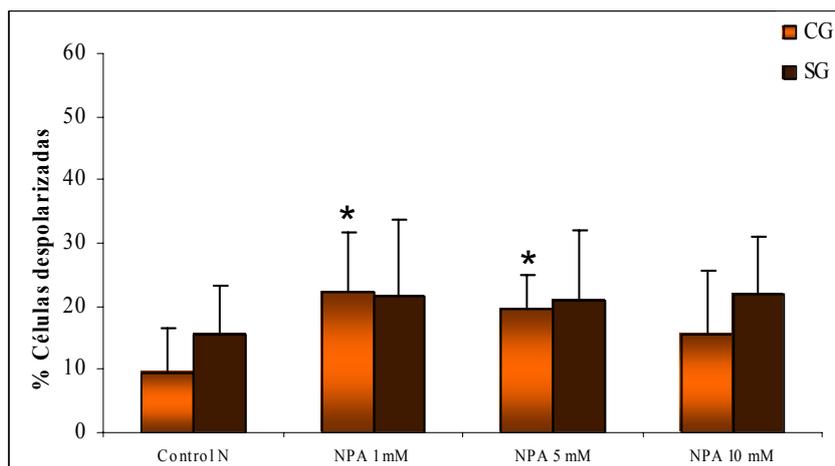


Figura 94.- Efecto del inhibidor del complejo II (*NPA*) sobre el $\Delta\Psi_m$ de condrocitos normales a las 5 h en condiciones estándar de cultivo y de privación de glucosa. Las barras muestran la media \pm DT. * = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos normales sin tratar.

Con el inhibidor del complejo III (**antimicina A**) en condiciones estándar de cultivo, se observó un efecto similar al encontrado con la rotenona; aunque la proporción de células despolarizadas aumentó respecto al control, no lo hizo de forma significativa. Por ejemplo, con antimicina A 10 $\mu\text{g/ml}$ el porcentaje fue de $14,43 \pm 12,82$ ($n=5$) siendo el de células normales control de $9,53 \pm 6,88$ ($n=22$). En situación de privación de glucosa, tampoco se encontró una inducción significativa de despolarización mitocondrial, en el caso de antimicina A 10 $\mu\text{g/ml}$ fue de $18,87 \pm 1,60$ ($n=3$), muy similar al encontrado en condrocitos normales control: $15,38 \pm 7,87$ ($n=12$) (Figura 95).

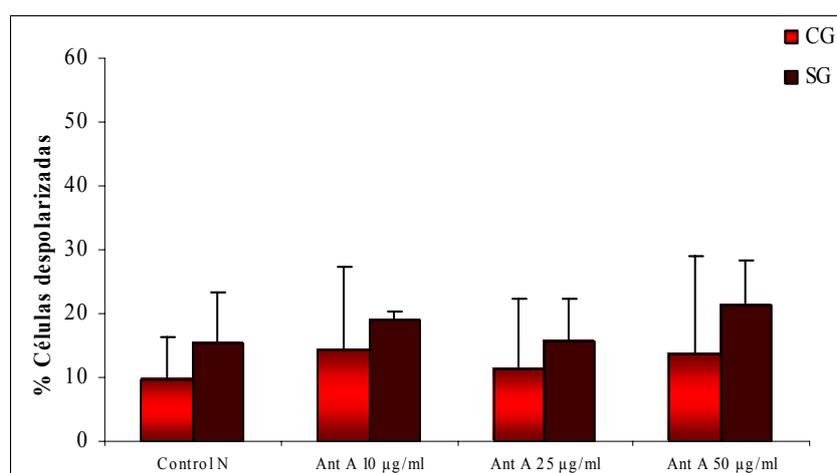


Figura 95.- Efecto del inhibidor del complejo III (antimicina A) sobre el $\Delta\Psi_m$ de condrocitos normales a las 5 h en condiciones estándar de cultivo y de privación de glucosa. Las barras muestran la media \pm DT.

Con el inhibidor del complejo IV de la CRM, la NaN_3 , en condiciones estándar de cultivo se encontró un efecto significativo sobre la despolarización mitocondrial a todas las concentraciones estudiadas. Por ejemplo, con NaN_3 10 mM se obtuvo un porcentaje de células despolarizadas de $16,00 \pm 3,95$ (n=6) respecto al control de células normales: $9,53 \pm 6,88$ (n=22). Este efecto se acentuó en condiciones de privación de glucosa y se observó una clara tendencia dosis-respuesta. A la mayor de las concentraciones empleadas (10 mM) la proporción de células despolarizadas fue de: $39,95 \pm 18,39$ (n=5), considerablemente superior al porcentaje encontrado en células normales control: $15,38 \pm 7,87$ (n=12) (Figura 96).

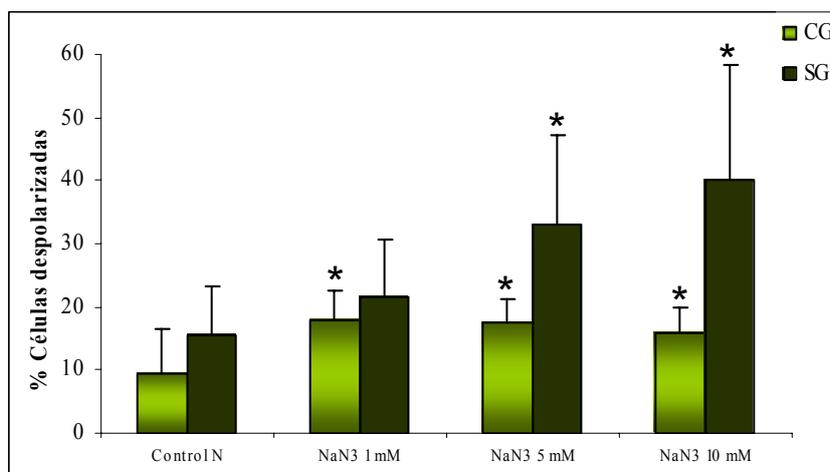


Figura 96.- Efecto del inhibidor del complejo IV (NaN_3) sobre el $\Delta\Psi_m$ de condrocitos articulares normales a las 5 h en condiciones estándar de cultivo y de privación de glucosa. Las barras muestran la media \pm DT. * = $P \leq 0,05$ vs. condrocitos normales sin tratar.

Con el inhibidor del complejo V (**oligomicina A**) no se encontró ningún efecto sobre el $\Delta\Psi_m$ de condrocitos normales en condiciones estándar de cultivo, siendo el porcentaje de células despolarizadas con oligomicina A 50 $\mu\text{g/ml}$ a las 5 h de $12,22 \pm 4,73$ (n=5) prácticamente igual al encontrado en células normales control: $9,53 \pm 6,88$ (n=22). De igual modo, en condiciones de privación de glucosa tampoco indujo despolarización mitocondrial a ninguna de las concentraciones estudiadas a las 5 h, siendo además el porcentaje encontrado en las células estimuladas poco superior al de las células sin tratar, de modo que en células normales estimuladas con oligomicina A 50 $\mu\text{g/ml}$ la proporción de células despolarizadas fue de $16,43 \pm 8,36$ (n=3) siendo en las células control: $15,38 \pm 7,87$ (n=12) (Figura 97).

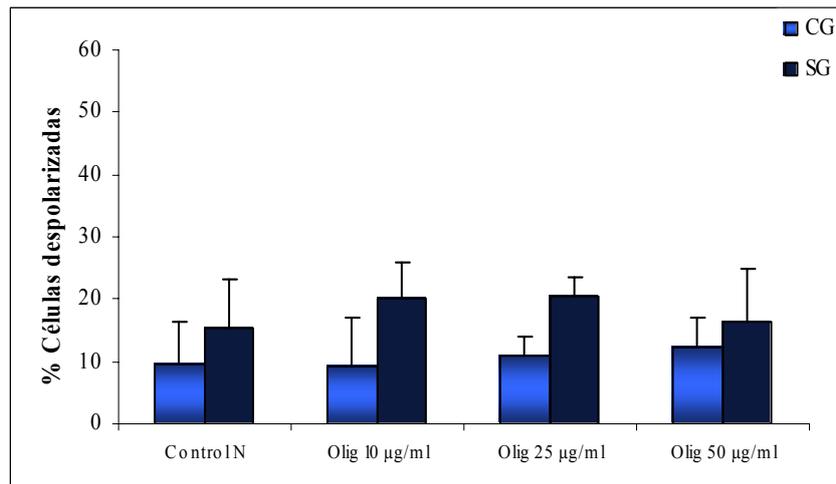


Figura 97.- Efecto del inhibidor del complejo V (oligomicina A) sobre el $\Delta\Psi_m$ de condrocitos normales a las 5 h en condiciones estándar de cultivo y de privación de glucosa. Las barras muestran la media \pm DT.

El nivel de despolarización mitocondrial encontrado en condrocitos OA de forma basal en condiciones estándar de cultivo ($0,13 \pm 11,71$ ($n=44$)) fue muy similar al encontrado en condrocitos normales estimulados con los diferentes inhibidores de la CRM a las 5 h; sin embargo, en condiciones de privación de glucosa el porcentaje de células OA despolarizadas basales ($18,35 \pm 11,57$ ($n=40$)) generalmente es menor que el de condrocitos tratados (Figura 98).

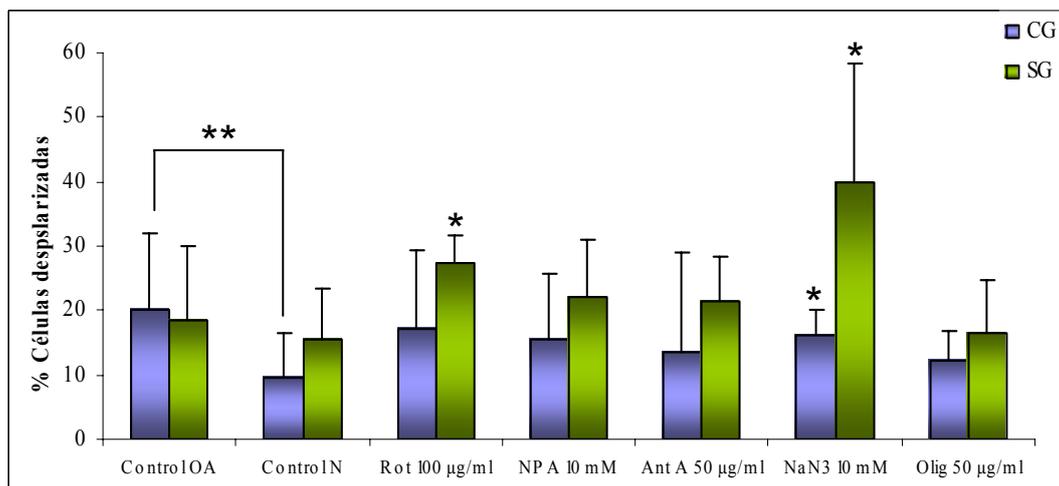


Figura 98.- Efecto del inhibidor del complejo V de la CRM (oligomicina A) sobre la viabilidad de los condrocitos articulares humanos normales en condiciones estándar de cultivo, $P \leq 0,05$ vs. condrocitos normales sin tratar.

V. DISCUSIÓN

1. EFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO (NO) SOBRE LA VIABILIDAD DEL CONDROCITO ARTICULAR HUMANO.

Tradicionalmente, el incremento en la producción de *NO* endógeno por el cartílago articular humano se ha asociado a la degeneración articular. Sin embargo, los modelos *in vitro* con diferentes dadores de *NO*, no han resuelto cuál es el papel del *NO* en la degradación articular debido a la falta de uniformidad en los resultados obtenidos (Del Carlo *et al.*, 2002).

El papel preciso del *NO* sobre la inducción de la muerte del condrocito está sujeto a debate. Aunque se ha visto que el tratamiento con dadores de *NO* induce claramente la muerte celular de los condrocitos en cultivo cuando se utilizó *SNP* (Blanco *et al.*, 1995a; Del Carlo *et al.*, 2003), la producción de altos niveles de *NO* endógeno por la sobreexpresión de *iNOS* en condrocitos transfectados no causa la muerte de las células (Studer *et al.*, 2000). Esta discrepancia puede ser atribuida al uso de dadores químicos de *NO*, los cuales no sólo generan *RNS* sino también varias reacciones secundarias dependiendo del entorno celular *in vitro* (Kim HA *et al.*, 2005).

En nuestro estudio hemos utilizado dos tipos de dadores de *NO*, el *SNP* y los *diazoniumdiolates*. Los dadores tradicionales como el *SNP*, no liberan *NO* de forma espontánea en ausencia de una activación *redox* (Fitzhugh *et al.*, 2000). Los *diazoniumdiolates*, también denominados “*NONOate*” o “*NOC*”, han ido sustituyendo al *SNP* como fuentes de *NO* exógeno, ya que no reaccionan dando compuestos secundarios (Hou *et al.*, 1999). Los *diazoniumdiolates* son cualquier especie química que contiene el grupo funcional $[N(O)NO]^-$. Poseen varias ventajas fundamentales sobre otras fuentes de *NO* exógeno: los ratios de generación de *NO* son conocidos y cubren un amplio rango de vida media que va de 2’’ a 20 h, además la generación de *NO* es espontánea y, se pueden utilizar como fuente de liberación de otros *ROS* (Keefer *et al.*, 1996). Se ha visto que son una fuente estable de *NO* bajo una gran variedad de condiciones de cultivo (Hrabie *et al.*, 1993; Fitzhugh *et al.*, 2000). Así mismo estos dadores no liberan productos tóxicos en su descomposición. En este trabajo hemos empleado dos *diazoniumdiolates*: *NOC-5* y *NOC-12*, los cuales tienen una vida media de 93’ y 327’ respectivamente.

Para caracterizar el comportamiento de estos dadores en nuestras condiciones de cultivo y experimentación, medimos la concentración de NO_2^- en el sobrenadante de los cultivos después de varios tiempos. Los resultados mostraron que los *NOCs* liberan

alrededor de 800 veces más *NO* que el *SNP*. Así mismo no se encontraron diferencias en la cantidad de NO_2^- liberada entre el NOC-5 y el NOC-12.

Para estudiar el efecto sobre la viabilidad celular empleamos técnicas clásicas morfológicas como el empleo de colorantes vitales. Para su cuantificación utilizamos la técnica del IP, ampliamente utilizada en la mayoría de los estudios de apoptosis. Tradicionalmente, en esta técnica siempre se han expresado los resultados como el porcentaje de núcleos hipoploides, haciéndolo equivalente al porcentaje de células apoptóticas. Nuestro grupo tiene amplia experiencia en el uso de esta técnica y ha confirmado utilizando microscopia de luz, inmunofluorescencia y MET que la población detectada por citometría de flujo como células con DNA hipoploide se corresponden a células no viables (Blanco *et al.*, 1995a; Blanco *et al.*, 1998a).

Los resultados mostrados en este trabajo confirmaron que el *SNP* reduce la supervivencia del condrocito e induce muerte celular a concentraciones mayores de 0,5 mM, con cambios morfológicos característicos de la apoptosis del condrocito. Es conocido que el *SNP* en el medio de cultivo se descompone dando *NO* y ONOO^- . El efecto inductor puede estar mediado por un efecto secundario y no directamente por el *NO* (Takuma *et al.*, 2002).

Por otra parte, con el empleo de *diazoniumdiolates* se encontraron efectos bastante diferentes entre ellos y respecto al *SNP*. El NOC-5 sólo redujo la viabilidad de los condrocitos de forma significativa con la mayor de las concentraciones empleadas (reducción del 2% con 2 mM) y al mayor de los tiempos analizados (48 h); no se observaron alteraciones morfológicas. Sin embargo, con el NOC-12, sin llegar a los niveles encontrados con el *SNP*, encontramos efectos significativos sobre la viabilidad de los condrocitos en prácticamente todas las condiciones de estudio. Así mismo, se observaron evidentes cambios morfológicos en los condrocitos tras la estimulación con dicho dador, siendo estas alteraciones morfológicas completamente diferentes a las inducidas por el *SNP* y alejadas de lo que podría denominarse como morfología típicamente apoptótica. Estas diferencias pueden deberse al tiempo activo de liberación del *NO*, el NOC-5 tiene un tiempo medio de 93' y el NOC-12 de 327'. Por otro lado, el *NO* es una molécula gaseosa reactiva y el daño que ocasiona va a depender de la zona donde se genere, de su trayectoria aleatoria y de los elementos con los que interaccione. Estudios realizados en el sistema nervioso demuestran que el *NO*, al igual que en el cartílago, puede tener tanto efectos beneficiosos (Mannick *et al.*, 1997; Melino *et al.*, 2000) como perjudiciales (Uehara *et al.*, 1999; Moriya *et al.*, 2000) sobre la actividad

celular. En los condrocitos, la mayoría de los autores proponen que en el efecto protector o dañino del *NO* influyen varios factores como son, la isoforma de *NOS* implicada, la concentración de *NO* y el tipo de células en las cuales es sintetizado, la disponibilidad del sustato L-arginina, la generación de GMPc a partir de GC soluble y el conjunto del ambiente tanto extra como intracelular en el cual el *NO* es producido (Thippeswamy *et al.*, 2006). Otra posible explicación a estas diferencias entre los dadores de *NO* es la capacidad de estos compuestos para liberar *ROS* adicionales. Un nivel intracelular elevado de *ROS* es una condición demostrada bajo la cual el estatus *redox* intracelular del condrocito puede mediar directamente si el *NO* puede llegar a ser citotóxico a través de la formación de otras *RNS* (Lizasoain *et al.*, 1996). Sin embargo, la cantidad de *NO* producido por un dador de *NO* no se correlacionó con el número de condrocitos no viables. El *SNP* fue el dador que menos cantidad de *NO* exógeno liberó en condiciones estándar de cultivo (~50 nmoles nitritos/50000 células) y sin embargo fue el que tuvo un efecto más acusado sobre la muerte de las células (~30% ADN hipoide). Datos similares han sido obtenidos por otros autores (Kim HA *et al.*, 2005).

Los datos mostrados en este trabajo en cuanto al descenso de viabilidad, apoyan la teoría de que las concentraciones excesivas de *NO* inducen profundos efectos sobre las funciones del condrocito, incluyendo el descenso en la regulación de la síntesis de COL, proliferación del condrocito (Blanco *et al.*, 1995b), inhibición de la polimerización de la actina (Frenkel *et al.*, 1996), descenso en la regulación de la expresión de IL-1ra (Pelletier *et al.*, 1996), activación de metaloproteasas (Murrell *et al.*, 1995), inducción de apoptosis (Blanco *et al.*, 1995a) y alteraciones de la CRM (Maneiro *et al.*, 2003). Estos efectos del *NO* pueden conducir a la degradación del cartílago en la OA mediante diferentes mecanismos inducidos por el *NO*, ya que es ampliamente conocido que el cartílago OA produce más *NO* que el normal (Stadler *et al.*, 1991).

Sin embargo, al *NO* se le ha atribuido también una función protectora, evitando la destrucción de la célula. La capacidad del *NO* para inducir citotoxicidad depende de la concentración utilizada. En astrocitos, concentraciones bajas (del orden μM) inhiben la apoptosis bloqueando el descenso del $\Delta\Psi\text{m}$ y la activación de la caspasa-3, a través de la producción de GMPc; mientras que altos niveles de *NO* (del orden mM) mostraron citotoxicidad a través de una vía independiente al CMPc. Los dadores de *NO* SNAP (s-nitroso-n-acetilpenicilamina) y *SNP*, a una concentración de 100 μM no mostraron este perfil (Takuma *et al.*, 2002). Nuestros resultados muestran que el NOC-12 induce muerte celular de forma significativa en cultivo (~20%). Sin embargo, algunos autores

no han observado dicha reducción en condrocitos con concentraciones de 2 mM tanto de NOC-12 como de NOC-5 (Del Carlo *et al.*, 2002). En otros tipos celulares se ha sugerido que estos dadores tienen la capacidad de proporcionar protección contra el estrés oxidativo cuando se añade H₂O₂ (Wink *et al.*, 1996; Joshi *et al.*, 1999; Rosenberg *et al.*, 1999), lo cual podría explicar esta discrepancia.

En resumen, la clase y concentración de dador usado, así como el tipo celular son críticos a la hora de determinar la respuesta inducida por el *NO*. Además, la cantidad y el índice de liberación de *NO* y el estatus redox de la célula diana parecen ser factores clave en la respuesta celular a la exposición al *NO*, y ciertos dadores de *NO* parecen ser más efectivos que otros promoviendo la apoptosis. También es importante tener en cuenta que la concentración del dador de *NO* utilizada puede no reflejar la concentración de *NO* a la que están expuestas las células. Concentraciones equivalentes de diferentes dadores de *NO* pueden liberar *NO* con diferente alcance o a diferente tasa, o pueden producir diferentes *RNS*, como es el ONOO⁻. Las condiciones de cultivo también pueden afectar a los niveles de *NO*. La concentración de *NO* libre en las células adyacentes a un tiempo dado puede variar de un compuesto a otro, y es necesario medir la concentración de *NO* en el sistema para poder comparar de forma directa a los diferentes dadores de *NO* (Taylor *et al.*, 2003). En nuestro caso, la concentración de los diferentes dadores muestra grandes diferencias, siendo el efecto del *SNP* mayor que el del NOC-12 y, éste a su vez mayor que el NOC-5.

1.1. Estudio morfológico del efecto del óxido nítrico (*NO*) sobre la viabilidad de los condrocitos articulares humanos.

A pesar de que el *SNP* y el NOC-12 redujeron la viabilidad celular, los cambios morfológicos que se observaron por microscopio de luz en los condrocitos fueron diferentes. Tras el análisis celular mediante microscopía óptica, observamos que al estimular los condrocitos con *SNP*, las células se desprendían de la superficie de cultivo, el contenido celular aparecía degradado y había fragmentación celular; cambios semejantes a los detectados previamente por otros autores (Blanco *et al.*, 1995a). Sin embargo, en los condrocitos estimulados con NOC-12 se observó la aparición de vacuolas por todo el citoplasma de la célula y de tamaño medio de 0,5 µm, y aunque aparecían más células desprendidas de la superficie de cultivo que en el caso del control, no presentaban un aspecto tan deteriorado como las estimuladas con *SNP*. Este

efecto no fue descrito en la bibliografía consultada sobre el NOC-12. Sin embargo, al retirar el NOC-12 del medio de cultivo celular, se observó que trascurridas 72 h aproximadamente, las vacuolas citoplasmáticas desaparecieron por completo y las células mostraron el aspecto inicial, lo cual fue confirmado mediante la realización de las técnicas empleadas en su caracterización.

Es ampliamente conocido que en el caso de muerte celular por apoptosis se produce fragmentación del núcleo y formación de cuerpos apoptóticos, de modo que realizamos una tinción con DAPI para detectar estos cambios morfológicos. La morfología nuclear en condrocitos estimulados con NOC-12 utilizando DAPI, a diferencia del *SNP*, no mostró fragmentación nuclear ni formación de cuerpos apoptóticos. En general, los núcleos aparecían con aspecto globuloso, probablemente debido a la existencia de las vacuolas en el citoplasma de las células tras la estimulación con NOC-12. De acuerdo con lo publicado por otros autores (Blanco *et al.*, 1995a), nuestros resultados confirmaron que el dador de *NO SNP* induce muerte celular por apoptosis.

Sin embargo, nuestros hallazgos sobre el efecto del NOC-12 eran discordantes con lo publicado previamente (De Carlo *et al.*, 2002). El NOC-12 redujo la viabilidad celular de forma significativa y el único efecto visible de este dador sobre los condrocitos es la formación de vacuolas en el citoplasma del condrocito.

A primera vista, y simplemente por su parecido morfológico, lo primero que nos sugirió la aparición de las vacuolas fue su posible naturaleza lipídica. Las acumulaciones de lípidos, tanto en el tejido adiposo como en los adipocitos, no se rodean de membrana y existe un fino anillo de citoplasma que contiene todos los orgánulos celulares. Este anillo citoplasmático, se tiñe fundamentalmente con eosina (colorante ácido) debido a que la mayoría de sus componentes presentan carácter basófilo. Teñimos grasa blanca, adipocitos con gotas lipídicas fácilmente identificables al microscopio y condrocitos normales estimulados con NOC-12. En el caso del tejido adiposo y de las gotas lipídicas presentes en los adipocitos, el fino anillo de citoplasma alrededor de los acúmulos de grasa se tiñó con la eosina debido a su carácter básico. Sin embargo, en los condrocitos, el citoplasma circundante o la membrana de las vacuolas inducidas por la estimulación con el dador de *NO* NOC-12 se tiñó con la hematoxilina (colorante básico), en esta estructura la mayoría de los componentes tienen carácter ácido, de forma contraria a lo observado en las estructuras lipídicas.

A continuación, realizamos técnicas específicas para lípidos. Los lípidos se pueden dividir en dos grupos: homofásicos (aquellos que se encuentran en estado puro y por

ello están concentrados en un territorio particular de la célula) y heterofásicos (no se encuentran en estado puro sino mezclados con otras sustancias, se localizan dispersos por determinadas estructuras, como por ejemplo las membranas celulares) (Stevens *et al.*, 2001). Llevamos a cabo tinciones que abarcaban todos los tipos de lípidos englobados en el subgrupo de los homofásicos. Por una parte, se realizó la tinción de Oil-Red-O que tiñe los lípidos homofásicos neutros y por otra parte se empleó el colorante negro sudán B, el cual tiñe los lípidos homofásicos en general.

La tinción con Oil-Red-O, sugiere que los condrocitos no poseen lípidos homofásicos neutros, ya que no se encontró tinción ni en las células control ni en las estimuladas con NOC-12. Sin embargo, la tinción con sudán negro B sugiere la existencia de lípidos homofásicos, tanto en condrocitos sin estimular como en los tratados con NOC-12, sin embargo, esta tinción fue negativa en las vacuolas, descartando la naturaleza lipídica de las vacuolas inducidas tras la estimulación con NOC-12.

El marcaje de las células con DAF-FM diacetato, un fluorocromo específico para la detección de *NO* gas (*NO*•) nos permitió ver que el marcaje, más que en el interior de la vacuola podía distinguirse en la membrana de dicha estructura. El estudio del marcaje con DAF-FM diacetato mediante microscopía confocal nos permitió corroborar los resultados obtenidos mediante microscopía de fluorescencia. Además un estudio reciente demuestra que el *NO* no puede ser almacenado en vesículas rodeadas de membrana como los neurotransmisores clásicos, tiene que ser producido como y cuando sea requerido (Thippeswamy *et al.*, 2006). Estos resultados sugieren que la naturaleza de las vacuolas inducidas por la estimulación con NOC-12 no es gaseosa.

Cada vez existen más evidencias de que la mitocondria posee su propia *NOS* (*mtNOS*). Se ha demostrado que la principal ruta catabólica del *NO* es la citocromo c oxidasa, por lo que es posible que se haya infraestimado la producción de *NO* mitocondrial debido a su rápida eliminación (Pearce *et al.*, 2002).

El marcaje con JC-1 nos permitió el estudio del estado del $\Delta\Psi_m$ así como la disposición de las mitocondrias tras la estimulación de los condrocitos con NOC-12 y consecuente aparición de las vacuolas citoplasmáticas.

En condrocitos normales sin estimular se observó que las mitocondrias se distribuían de forma homogénea por todo el citoplasma, el $\Delta\Psi_m$ mostró mayoritariamente fluorescencia roja, es decir, las células poseían un potencial normal.

Cuando los condrocitos fueron estimulados con NOC-12, las mitocondrias se dispusieron alrededor de las vacuolas y no se observó despolarización mitocondrial ya que las células fueron estimuladas durante 24 h a una concentración de 1 mM, condiciones ideales para el estudio de las vacuolas en cuanto a la morfología de las células pero no suficientes para la inducción de la despolarización mitocondrial. Estos resultados se confirmaron mediante microscopía confocal.

El estudio de la ultraestructura de las vacuolas mediante MET nos permitió observar que los núcleos aparecían con formas irregulares y se encontró la cromatina en pequeñas agrupaciones, a diferencia de los grandes cúmulos encontrados en el proceso apoptótico. En el caso en que los núcleos aparecían inalterados se observó que estas células tenían nucleolos prominentes, indicando síntesis activa de proteínas. Sin embargo, las células eran claramente viables aunque existía vacuolización del citoplasma (*blebbing*) y liberación de vacuolas, el hecho de haber perdido la integridad de la membrana celular nos indica que es un evento relativamente temprano en este proceso de muerte inducido en los condrocitos por el *NO* (Roach *et al.*, 2000). Estos resultados sugieren que el NOC-12 no induce una muerte celular típica.

En la siguiente tabla se indican las principales características que diferencian los principales mecanismos de muerte, lo que nos sugiere que la muerte inducida por el dador de *NO* NOC-12 se asemeja al proceso condroptótico (Tabla 17).

Tabla 17.- Principales características de los tipos de muerte celular. Las características observadas mediante MET en condrocitos normales estimulados con NOC-12 se señalan en amarillo (Modificada de Roach *et al.*, 2004).

	Muerte celular fisiológica (programada)			Muerte patológica
	Apoptosis clásica	Condroptosis	Paraptosis	Necrosis
<i>Núcleo</i>	Condensación de la cromatina en el perimetro	Condensaciones irregulares de la cromatina por todo el núcleo	No existe o hay poca condensación de cromatina	Condensación nuclear (picnosis)
<i>Aparato de Golgi</i>	No aumenta	Aumenta en estadios tempranos	No aumenta	No aumenta
<i>Retículo endoplasmático</i>	No hay cambios	Aumenta su cantidad y se expande el lumen	Hay vacuolas derivadas del RE	No hay cambios
<i>Vacuolas autofágicas</i>	No están presentes	Presentes de manera frecuente	No hay vacuolas autofágicas	No hay cambios
<i>“Blebbing” vs. “Budding”-cuerpos apoptóticos</i>	“Budding” en cuerpos apoptóticos	“Blebbing” de material citoplasmático/vacuolas	No existe “blebbing” ni cuerpos apoptóticos	“Blebbing” extensivo
<i>Eliminación final</i>	Heterofagocitosis de cuerpos apoptóticos	Autodigestión de la mayoría del material celular, final en vesículas, fagocitosis?	?	Desintegración general
<i>¿Liberación de enzimas lisosomales?</i>	No, los lisosomas permanecen intactos dentro de los cuerpos apoptóticos	No, los lisosomas permanecen en “islas” citoplasmáticas o vacuolas autofágicas	?	Si, liberación incontrolada de enzimas lisosomales
<i>Función</i>	Eliminación de células sin inflamación	Autoeliminación en ausencia de fagocitosis	Muerte celular neuronal	Muerte celular inevitable, inflamación

Frecuentemente, la apoptosis es referida como un sinónimo de *PCD*. La *PCD* es una expresión que insinúa que la muerte de la célula ha sido genéticamente programada, y este es el caso durante el desarrollo y el envejecimiento. La *PCD* generalmente se contrapone al término de muerte celular accidental, que es la necrosis inducida por estímulos patológicos. Sin embargo, hay muchas circunstancias que hacen difícil considerar la muerte programada o accidental cuando se añaden agentes citotóxicos a los cultivos de células, como es el caso de los dadores de *NO*.

Nuestros resultados sobre la ultraestructura de condrocitos estimulados con NOC-12 son semejantes a los publicados en la placa de crecimiento (Gibson *et al.*, 1995; Zenmyo *et al.*, 1996; Fujita *et al.*, 1997; Gibson, 1998) y cartílago articular (Hwang,

1978; Hwang *et al.*, 1979; Blanco *et al.*, 1998b; Hashimoto *et al.*, 1998c; Hashimoto *et al.*, 1998a; Kim HA *et al.*, 2000; Matsuo *et al.*, 2001), donde se denomina condroptosis (Roach *et al.*, 2004).

De momento, los mecanismos inductores de la condroptosis *in vivo* sólo pueden ser especulados. *In vitro*, los condrocitos responden a los mismos agentes que inducen muerte en otros tipos de células, como son FasL/CD95 (Hashimoto *et al.*, 1997), TNF-alfa (Aizawa *et al.*, 2001) y TRAIL (Pettersen *et al.*, 2002). Los condrocitos parecen ser particularmente sensibles al NO (Blanco *et al.*, 1995a; Greisberg *et al.*, 2002; Kuhn *et al.*, 2003). La mayoría de los datos disponibles acerca de la apoptosis del condrocito son de células en cultivo (Gibson *et al.*, 1997; Mansfield *et al.*, 1999; Gibson *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2001), pero lo que sucede *in vivo* aún es desconocido. Para mantener su fenotipo, los condrocitos *in vivo* dependen de las interacciones con su ambiente extracelular. Se sabe desde hace tiempo que el aislamiento de los condrocitos y el cultivo en monocapa alteran su fenotipo, de modo que los condrocitos llegan a tener características de fibroblastos y expresan COL tipo I más que el típico II (Dessau *et al.*, 1978). La pérdida de unión vía integrinas desencadena la muerte celular o aumenta la susceptibilidad a señales que la inducen en muchas células (Stupack *et al.*, 2002), y especialmente en condrocitos (Hirsch *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 1999). En condrocitos de ratón con pérdida de COL II, la morfología es la típica de apoptosis (Yang *et al.*, 1997) no de condroptosis. Esto es consistente con el hecho de que la MEC del cartílago regula de algún modo el tipo de muerte de los condrocitos.

Los ejecutores de la muerte celular, las caspasas, están involucrados en los tres procesos apoptóticos y presumiblemente son importantes tanto en la apoptosis clásica como en la condroptosis. Lo que va a diferenciar a esta última es la intervención adicional de proteasas lisosomales, como son las catepsinas, en el aspecto autofágico de la condroptosis (Bursch, 2001).

La condroptosis define un tipo, probablemente el mayoritario, de muerte del condrocito, cuya función será eliminar células sin inflamación, en situaciones en las que la fagocitosis sea complicada (y sin depender de ella). Esto constituye una ventaja crucial para los condrocitos que están generalmente embebidos en la MEC. La apoptosis clásica en esa situación es probable que lleve a una necrosis secundaria con todas las desventajas que conlleva. Esto puede ser una razón por la cual la PCD de los condrocitos *in vivo* siga más el patrón condroptótico que el apoptótico clásico, como se refleja en los resultados obtenidos mediante MET.

En otras células como las neuronas, se han documentado variaciones en la apoptosis clásica, denominada paraptosis, la cual se caracteriza por la vacuolización citoplasmática pero no por la fragmentación nuclear (Sperandio *et al.*, 2000; Roach *et al.*, 2000).

Las vacuolas observadas en condrocitos estimulados con NOC-12 presentan membrana. Dicha membrana podría ser de retículo endoplasmático, ya que encontramos gran cantidad de esta organela celular. Debido al hecho de que la condroptosis involucre al retículo endoplasmático, es interesante recalcar que hay un mecanismo apoptótico que ha sido identificado recientemente en el cual el retículo endoplasmático juega un papel central (Nakagawa *et al.*, 2000; Morishima *et al.*, 2002). El hecho de que se produzca una expansión masiva del retículo endoplasmático solamente en este tipo de muerte y que la digestión citoplasmática preceda a los cambios nucleares (prácticamente lo contrario a lo que ocurre en apoptosis) nos indica que esto no representa estadios tempranos de la apoptosis (Roach *et al.*, 1999).

La apoptosis depende de la fagocitosis o la eliminación de los cuerpos apoptóticos por células vecinas. Esto no debe ser muy apropiado cuando es necesario eliminar una cantidad considerable de células (Clarke, 1990; Schwartz *et al.*, 1993; Majno *et al.*, 1995; Zakeri *et al.*, 1995) de modo que los mecanismos heterofágicos estarán sobrecargados o cuando no hay fagocitos para eliminar los restos de la apoptosis. Si los cuerpos apoptóticos no son fagocitados rápidamente, sufrirán necrosis secundaria, seguramente con liberación descontrolada de lisosomas o enzimas que degradan la matriz. Los condrocitos están separados de las células vecinas por la MEC y, además pueden requerir, una forma de muerte celular que prevenga los efectos negativos hacia las células vecinas, pero que no dependa de la fagocitosis para neutralizar o inactivar células no funcionales. Parece que los condrocitos se eliminan ellos mismos mediante la formación de vacuolas, digiriendo y expulsando su contenido celular (Roach *et al.*, 1999).

Es posible que, como un resultado de la degradación de la MEC, las células sean inducidas a sufrir apoptosis. Esta forma de muerte celular, la cual es un resultado de la pérdida de señales de la MEC que promueven la supervivencia, ha sido recientemente definida como anoikis (Frisch *et al.*, 1994; Cardone *et al.*, 1997). A la inversa, la apoptosis del condrocito también puede contribuir a la degradación de la MEC. La apoptosis del condrocito da como resultado la formación de cuerpos apoptóticos, que en otros tejidos son eliminados por células fagocitarias para evitar la respuesta

inflamatoria. El destino de los cuerpos apoptóticos en el cartílago es desconocido, ya que este tejido no contiene células fagocitarias, y es posible que los cuerpos apoptóticos que permanecen en la matriz pericelular o en la laguna del condrocito vayan liberando su contenido eventualmente, incluyendo las proteasas (Hashimoto *et al.*, 1998b).

2. EFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO (NO) SOBRE LA MITOCONDRIA EN CONDROCITOS ARTICULARES HUMANOS.

Debido al hecho de que los condrocitos articulares son unas células altamente glicolíticas, cada vez es más aceptada la implicación de la mitocondria en modelos de patogénesis de la OA. Las mitocondrias de los condrocitos respiran *in vivo* y muestran hinchamiento y cambios en el número *in situ* en la evolución de la OA. La disfunción mitocondrial puede mediar varias vías patogénicas específicas implicadas en la OA, entre las que se incluyen el estrés oxidativo, respuestas inadecuadas biosintéticas y de crecimiento del condrocito, regulación positiva del catabolismo de la MEC y la inflamación mediada por las citoquinas en el condrocito, aumento en la apoptosis del condrocito, y calcificación patológica de la MEC del cartílago. Además, la incapacidad directa y subletal de la síntesis de ATP mitocondrial del condrocito *in vitro* desciende la síntesis de MEC y aumenta su calcificación. Existen evidencias de que la alteración mitocondrial es un mediador del establecimiento y progresión de la OA (Terkeltaub *et al.*, 2002; Maneiro *et al.*, 2003).

En condrocitos, nuestro grupo ha sugerido que el efecto más directo del NO parece ser la supresión del metabolismo energético en la fosforilación oxidativa (Maneiro *et al.*, 2003); sin embargo, es reconocido el metabolismo esencialmente glucolítico.

Una valoración precisa del $\Delta\Psi_m$ de las células vivas bajo condiciones fisiológicas es esencial para entender el papel de la mitocondria en la función celular alterada después de la inhibición de los enzimas mitocondriales (Gottlieb *et al.*, 2002). El potencial del gradiente electroquímico de protones es la suma del $\Delta\Psi_m$ y el gradiente de protones. Debido al hecho de que el componente del pH es generalmente pequeño, el $\Delta\Psi_m$ refleja el estatus funcional de la mitocondria (Almeida *et al.*, 2001; Gottlieb *et al.*, 2002). La actividad tanto de las caspasas como de la apoptosis depende de la reducción en $\Delta\Psi_m$ y/o la inducción de la permeabilidad transitoria mitocondrial (Kroemer *et al.*, 2000).

En un trabajo anterior llevado a cabo por nuestro grupo, se puso en evidencia que los condrocitos OA tienen alterado el $\Delta\Psi_m$ respecto a los normales, es decir, muestran mayor número de mitocondrias despolarizadas (Maneiro *et al.*, 2003). Además se encontró que el *SNP*, a todos los tiempos y concentraciones estudiados, induce la despolarización mitocondrial en condrocitos humanos normales, como se demostró tanto por un aumento en la fluorescencia verde (despolarización mitocondrial) como por un descenso en la fluorescencia roja (polarización mitocondrial normal) (Maneiro *et al.*, 2005). El efecto inducido por los *diazoniumdiolates* es muy diferente, tanto entre ellos como respecto al *SNP*. El NOC-5 no indujo despolarización mitocondrial de forma significativa en ninguno de los casos, sin embargo, el NOC-12 a las 24 h y a una concentración elevada (2 mM) indujo despolarización, eso sí, en menor grado que el observado con el *SNP*. El mantenimiento del $\Delta\Psi_m$ es importante para la supervivencia de la célula porque se ha visto que su colapso representa un fase de la muerte celular que ya es irreversible (Zamzami *et al.*, 1995). Sin embargo, nosotros demostramos que tanto el efecto del *SNP* (Maneiro *et al.*, 2005) como el del NOC-12 sobre el $\Delta\Psi_m$ es reversible. El poro de permeabilidad transitoria a menudo es referido como un fenómeno que implica el hinchamiento de la matriz mitocondrial acompañado por la pérdida del potencial transmembrana (membrana interna mitocondrial). Hay evidencias de que existen vías de permeabilización de la membrana mitocondrial alternativas a la apertura del poro (Zamzami *et al.*, 2005). La permeabilización de la membrana externa mitocondrial frecuentemente es el punto de no retorno del proceso letal (Kroemer *et al.*, 2000; Green *et al.*, 2004).

A la hora de analizar el efecto del *NO* sobre las actividades de los complejos de la CRM se encontró que los diferentes dadores de *NO* estudiados en este trabajo ejercieron efectos muy diferentes. Se verificaron los resultados obtenidos por otros autores en cuanto al *SNP*, ya que se observó una reducción significativa en la actividad del complejo IV, por otra parte, no se detectó descenso en la actividad de ninguno de los complejos tras la estimulación de los condrocitos con NOC-5, y sin embargo, el tratamiento con NOC-12 indujo una reducción en la actividad de todos los complejos, exceptuando el II.

El trabajo presentado en esta Tesis doctoral es el primero en analizar el efecto del *NO* exógeno (*SNP*, 0,5 mM durante 5 h) sobre la actividad enzimática de los complejos I-IV de la CRM, de la CS y sobre el $\Delta\Psi_m$ de los condrocitos normales articulares

humanos (Maneiro *et al.*, 2005). Se midió la actividad de los complejos de la CRM normalizados por la CS porque se considera que esta enzima es un marcador de la masa mitocondrial y porque el ratio entre un complejo respiratorio específico y la CS indica si las diferencias en las actividades de los complejos se deben a un enriquecimiento en proteínas mitocondriales o a un cambio en la función metabólica mitocondrial (Maneiro *et al.*, 2003). Sin embargo, hasta ese momento no existían estudios que aclarasen el efecto del *NO* en la actividad de la CRM de los condrocitos humanos normales. El *SNP* aumentó la citotoxicidad mediante la formación de ONOO^- . Éste reacciona con las membranas mitocondriales de manera significativa inhibiendo las actividades de los complejos I, II y III. El hecho de que nosotros sólo hayamos encontrado inhibido el complejo IV, y el grupo de Loeser hayan mostrado que el *SNP* sigue siendo citotóxico incluso en presencia de compuestos que eliminan *ROS* (*scavengers*) (Del Carlo *et al.*, 2002) hacen que sea improbable que el *SNP* use este mecanismo de acción. Se ha visto que el *NO* también puede inhibir directamente el complejo IV por la unión reversible del *NO* a la citocromo c oxidasa en competición con O_2 (Lizasoain *et al.*, 1996; Leary *et al.*, 2002).

Por otra parte, el uso de *diazoniumdiolates* arrojó resultados muy diferentes. El NOC-5 (1mM durante 24 h) no modificó el descenso en la actividad de ningún complejo, lo cual probablemente se deba al reducido tiempo de liberación de *NO*, el cual no debe ser suficiente para inducir defectos a este nivel. Sin embargo, el NOC-12 (1 mM durante 24 h) que tiene un tiempo de liberación muy superior al NOC-5 produjo profundos cambios en los complejos, concretamente redujo las actividades de los complejos I, III y IV, los cuales conforman el llamado respirasoma. La inhibición continua del complejo IV lleva al estrés oxidativo, el cual ya se ha visto que da como resultado la inhibición del complejo I y de otras enzimas en un proceso semejante a la S-nitrosilación (Clementi *et al.*, 1998; Beltrán *et al.*, 2000), posiblemente el largo tiempo de liberación de *NO* así como la cantidad liberada por parte del NOC-12 hace que se acabe reduciendo la actividad de prácticamente todos los complejos de la CRM.

La medida de los niveles de ATP intracelular así como la liberación de lactato nos permitió ver el efecto del *NO* sobre el metabolismo energético de los condrocitos normales, así como su posterior comparación con las células OA.

En este trabajo observamos que la cantidad de ATP intracelular disminuyó de manera significativa con *SNP* y NOC-12, sobre todo con el primero de estos dadores de *NO*; además los condrocitos OA produjeron significativamente mayor cantidad de ATP

que los normales. En un estudio se mostró que tanto el NOC-5 como el NOC-12 aumentaron de manera significativa los niveles celulares de NADH y NADPH (Del Carlo *et al.*, 2002) de manera consistente con la supresión del metabolismo energético (Brown *et al.*, 1994; Lizasoain *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 2000; Olson *et al.*, 2000; Tomita *et al.*, 2001). Es importante mencionar que los condrocitos residen en un ambiente avascular con bajas tensiones de O₂ en comparación con otros tejidos (Tschan *et al.*, 1990). La inhibición competitiva de la citocromo c oxidasa (complejo IV) o de la cadena de transporte de electrones por el NO puede actuar atenuando la síntesis de ATP que es generado a través de la fosforilación oxidativa. Como consecuencia, el metabolismo energético debe entonces depender de la ineficiente vía anaeróbica para la síntesis de ATP. Esto llega a ser relevante bajo condiciones citotóxicas, cuando la decisión de invocar a la apoptosis depende en gran medida de la cantidad de ATP intracelular (Ritcher *et al.*, 1996), y que esta supresión de energía puede representar un mecanismo adicional mediante el cual el NO es capaz de prevenir la muerte del condrocito (Del Carlo *et al.*, 2002). Una limitación de este estudio es que los experimentos se llevaron a cabo con condrocitos que fueron separados enzimáticamente de la MEC, lo cual puede influir sobre la respuesta celular observada al NO.

Por otra parte, nuestros resultados muestran que únicamente el SNP redujo de forma significativa los niveles de lactato liberado por parte los condrocitos normales. De forma basal, los condrocitos OA producen mayor cantidad de lactato que los normales, lo cual es lógico ya que al tener alterados los complejos II y III de la CRM producen menos ATP y como mecanismo compensatorio realizan más glucólisis anaerobia y posterior reducción del piruvato, dando como compuesto resultante ácido láctico. La acumulación de ácido láctico puede tener efectos perjudiciales sobre la MEC y puede contribuir a la patogénesis y a la progresión de la OA (Mobasher *et al.*, 2006).

3. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LA GLUCOSA PARA MODIFICAR LOS EFECTOS DEL ÓXIDO NÍTRICO (NO) SOBRE LOS CONDROCITOS ARTICULARES HUMANOS.

En condiciones de privación de glucosa, y de igual forma que en el caso de las condiciones estándar de cultivo, mediante la reacción de Griess se observó que los *dianeziumpulates* liberan en torno a 800 veces más NO que el SNP.

Debido al hecho de que los condrocitos residen en un ambiente hipóxico, la glicólisis anaerobia es el proceso central para la obtención de ATP para el mantenimiento de la síntesis de MEC y la viabilidad. En este contexto, la fosforilación oxidativa mitocondrial posiblemente actúa como una reserva fisiológica de generación de ATP.

Por este motivo estudiamos el efecto del *NO* sobre el metabolismo de la glucosa. La regulación del transporte facilitado de glucosa puede ser mediado a través de dos mecanismos principalmente: modificaciones en la síntesis de GLUTs y en la incorporación a la membrana y, por otra parte, cambios en la afinidad de los GLUTs por la glucosa (Shikhman *et al.*, 2004).

De los tres dadores a estudio, únicamente el *SNP* redujo de forma significativa los niveles de incorporación de esta hexosa. Asimismo se encontraron diferencias significativas entre los condrocitos normales y OA, siendo éstos los que incorporaron mayor cantidad de glucosa.

La glucosa es la principal fuente de energía en condrocitos (Otte, 1991; Lee *et al.*, 1997), así como el principal precursor de la síntesis de GAG (Kim JJ *et al.*, 1976; Sweeney *et al.*, 1993) y además actúa como un regulador de la respuesta celular ante ciertos factores de crecimiento (Kelley *et al.*, 1999). La placa de crecimiento epifisaria, donde proliferan y se diferencian los condrocitos, es el sitio principal para el crecimiento de los huesos longitudinales, la síntesis de MEC y la mineralización. Estos datos indican que los condrocitos en las zonas hipertróficas usan la glucosa como fuente de energía (Ohara *et al.*, 2001). La glucosa es también muy importante en el cartílago articular completamente desarrollado debido a que es un tejido muy poco vascularizado y tiene una naturaleza altamente glucolítica, una situación que aún se hace más exacerbada por las bajas tensiones de O_2 y la glicólisis anaerobia llevada a cabo por los condrocitos (Otte, 1991; Mobasher *et al.*, 2002b; Rajpurohit *et al.*, 2002). Además, incluso pequeños cambios en las concentraciones de glucosa en el microambiente extracelular de los condrocitos puede perjudicar las actividades anabólicas y catabólicas (Shikhman *et al.*, 2001b; Mobasher *et al.*, 2002b). Los condrocitos adultos completamente desarrollados expresan multitud de isoformas de la familia GLUT/SLC2A de los transportadores de glucosa, entre los que se incluyen GLUT-1, GLUT-3, GLUT-5, GLUT-6, GLUT-8, GLUT-9, GLUT-10, GLUT-11 y GLUT-12 (Shikhman *et al.*, 2001b; Mobasher *et al.*, 2002a,b; Richardson *et al.*, 2003). La razón de por qué hay esta diversidad en isoformas de los GLUTs aún no está muy clara. Se ha

visto que el GLUT-1 es un transportador de glucosa inducible por las citoquinas en el cartílago debido al hecho de que puede ser inducido por citoquinas proinflamatorias, catabólicas (Shikhman *et al.*, 2001b; Richardson *et al.*, 2003; Shikhman *et al.*, 2004; Phillips *et al.*, 2005). Los GLUTs también participan en el transporte facilitado de la glucosamina y la N-acetilglucosamina (Rauchman *et al.*, 1992; Cloherty *et al.*, 1995), las cuales pueden modificar la respuesta inflamatoria de los condrocitos (Shikhman *et al.*, 2001a) y servir como eficientes precursores de la síntesis de GAG (Mason *et al.*, 1982). Finalmente, los GLUTs (predominantemente el GLUT-1 y el GLUT-3) facilitan el transporte del ácido dehidroascórbico (Rumsey *et al.*, 1997), el cual induce la diferenciación de los condrocitos (Farquharson *et al.*, 1998) y regula la expresión génica de la MEC, incluyendo el COL tipo II (Sandell *et al.*, 1988).

Estos hallazgos coinciden con nuestros resultados, ya que nosotros encontramos expresión tanto a nivel de ARNm como proteico de las diferentes isoformas de los GLUTs descritos hasta el momento por otros autores, tanto en condrocitos normales como OA, con la salvedad que se detectó el transportador sensible a la insulina GLUT-4, no descrito hasta el momento en condrocitos y, tanto el GLUT-8 como el GLUT-9 no se expresaron en el 100% de los donantes OA. Además, el estudio de los GLUTs en los tejidos conectivos, como el cartílago, requiere experiencia adicional del manejo de tejidos calcificados sumado a marcadores de alta calidad y anticuerpos para hibridación *in situ* y experimentos inmunológicos para identificar las isoformas de los GLUTs expresadas a nivel del ARNm y de proteína (Hocquette *et al.*, 2000).

Estudios recientes sugieren que la degeneración del cartílago ocurre de forma concomitante con la disfunción endocrina, el desequilibrio de la glucosa y la diabetes *mellitus* (Rosenbloom *et al.*, 1996; Denko *et al.*, 1999; Okma-Keulen *et al.*, 2001). Incluso modestos cambios en la concentración de glucosa en el microambiente de la MEC pueden perjudicar las actividades anabólicas mediadas por IGF-1 y promover una variedad de patologías de la articulación (Rosenbloom *et al.*, 1996; Lioté *et al.*, 2000). Además, el cartílago sano depende de un sistema endocrino funcional que regule de manera fina la cantidad de glucosa en sangre y, por lo tanto, los niveles de glucosa en el tejido sinovial. Un mejor conocimiento de la nutrición del condrocito y la regulación de los sistemas de transporte responsables de la incorporación de los nutrientes en condrocitos normales y OA podría revelar los desequilibrios metabólicos subyacentes directamente responsables de la degradación del cartílago en la OA y otras artropatías (Denko *et al.*, 1999; Lioté *et al.*, 2000). De modo que se ha planteado una hipótesis

novedosa que implica a los transportadores de glucosa y las enzimas responsables de la glucólisis y el metabolismo energético en la fisiología y patofisiología del cartílago (Mobasher *et al.*, 2002b). La expresión de isoformas de GLUTs múltiples puede ser una importante adaptación tanto fisiológica como bioenergética para los condrocitos en la MEC tanto en desarrollo como en el cartílago maduro (Mobasher *et al.*, 2002a).

La diversidad en las isoenzimas GLUTs en los condrocitos puede reflejar un requerimiento específico del cartílago para los transportadores “rápidos” (como son el GLUT-3 y el GLUT-10) y los “basales” (GLUT-1) que operan de forma más eficiente a concentraciones bajas de sustrato sujetas a condiciones fisiológicas (Mobasher *et al.*, 2002b). Sin embargo, estos autores no encontraron evidencias del receptor sumamente sensible a la insulina que es el GLUT-4 (Richardson *et al.*, 2003). Aunque la expresión de este receptor ha sido descrita en condroblastos mesenquimales craneofaciales de ratón en desarrollo, cartílago de ratón en desarrollo (Vannucci *et al.*, 2000) y en condrocitos de la placa de crecimiento de ratón (Wang *et al.*, 1999), los estudios seguidos por este grupo muestran que en el cartílago adulto humano normal no está presente este GLUT. Sin embargo, han sido capaces de mostrar la presencia del GLUT-8 y el GLUT-12, de los cuales se dice que pueden ser sensibles a la insulina a largo plazo (Carayannopoulos *et al.*, 2000; Rogers *et al.*, 2002). Aunque los condrocitos articulares humanos expresan el receptor para la leptina (Figenschau *et al.*, 2001), la ausencia de GLUT-4 en cartílago maduro (Ohara *et al.*, 2001; Mobasher *et al.*, 2002a) ha hecho que se haya descartado un papel en la regulación sensible a la insulina del transporte de glucosa en el cartílago articular humano maduro y completamente desarrollado. No obstante, la insulina y el IGF-1 regulan la incorporación de glucosa en condrocitos durante un largo periodo de tiempo (Richardson *et al.*, 2003). Hay diferencias importantes en la expresión del GLUT-4 entre músculos oxidativos y glucolíticos en animales de ganado (Hocquette *et al.*, 1995; Hocquette *et al.*, 1996). Nosotros encontramos de forma clara expresión del GLUT-4, tanto a nivel de ARNm, probablemente debido a la utilización de un *kit* de RT-PCR más sensible que el empleado de forma tradicional, en el cual se amplificaron todas las copias obtenidas de ADN complementario, además se estudió su expresión mediante PCR a tiempo real; y a nivel proteico, por el empleo de un anticuerpo monoclonal, no disponible hasta hace relativamente poco tiempo. La expresión de GLUT-4 a nivel de ARNm estaba aumentada cuando los condrocitos habían sido tratados previamente con dadores de NO.

Un transportador descubierto más recientemente es el GLUT-9, el cual se expresa de forma muy abundante en el hígado y el riñón (Phay *et al.*, 2000), ambos tejidos gluconeogénicos. Debido al hecho de que los condrocitos también poseen la capacidad para la gluconeogénesis a través de la vía del glioxilato (Davis *et al.*, 1989), puede ser que el GLUT-9 esté involucrado en la incorporación de la glucosa, el transporte de glucosa a través del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, glicosilación de proteínas de la MEC o en la gluconeogénesis (Mobasheri *et al.*, 2005). Mediante análisis por northern blot se reveló que el gen del GLUT-9 produce, mediante *splicing* alternativo, tres clases de ARNm, los cuales son abundantemente detectados en riñón e hígado, pero están presentes en bajos niveles en otros tejidos entre los que se incluye la placenta, pulmón, leucocitos sanguíneos, corazón y músculo esquelético (Phay *et al.*, 2000). En nuestro caso, estas tres especies de ARNm se detectaron de forma más llamativa cuando los condrocitos fueron tratados con el dador de NO NOC-12.

Otra forma de analizar la importancia de la glucosa en el metabolismo del condrocito es privando a las células de este nutriente. En estas condiciones de privación de glucosa, nuestros resultados muestran que el efecto de los dadores de NO SNP y NOC-12 sobre la viabilidad de los condrocitos normales es más acusado (el NOC-5 no ocasiona alteraciones en la viabilidad). Una posible explicación es que la inhibición del complejo IV (SNP) o de los complejos I, III y IV (NOC-12) exclusivamente no fue suficiente para inducir muerte celular y otros eventos celulares, debido al metabolismo esencialmente glucolítico de los condrocitos.

De igual forma que en caso del efecto de los dadores de NO sobre la viabilidad de los condrocitos normales, la falta de glucosa en el medio de cultivo hizo que el efecto sobre el $\Delta\Psi_m$ fuese más acusado, en el caso del SNP no sólo aumentó el número de células despolarizadas sino que descendió de forma significativa la cantidad de condrocitos con polarización normal.

En comparación con las condiciones estándar de cultivo, la privación de glucosa en el medio no provocó una reducción significativa en la actividad de ninguno de los complejos de la CRM ni en la de la CS en condrocitos normales, se observaron los mismos resultados en células OA exceptuando que mostraron un incremento significativo en la actividad de la CS. En ambos tipos de células, todos los complejos mostraron un pequeño descenso en la actividad exceptuando el II que aumentó un poco, pero no de forma significativa. Un incremento en la masa mitocondrial (medido por un incremento en la actividad de la CS), puede representar un mecanismo para mejorar el

rendimiento de la fosforilación oxidativa por célula para compensar la baja producción de ATP (Maneiro *et al.*, 2003), ya no sólo por los defectos de los condrocitos OA en los complejos II y III de la CRM, sino por la ausencia de glucosa en el medio. Ciertos autores están de acuerdo con la idea de que el metabolismo celular íntegro de los condrocitos OA parece estar aumentado, lo que lleva a la hipótesis de que los condrocitos OA están “activados”. El cartílago es un tejido en tres dimensiones en el cual los eventos locales pueden ser diferentes. El desarrollo de la enfermedad articular degenerativa es un proceso continuo desde el tejido funcional normal hasta la degeneración (Sandell, 2007).

Los niveles de ATP intracelular descendieron con todos los dadores de *NO* pero los efectos inducidos no son comparables, con el NOC-5 aunque se produjo descenso, éste no fue significativo; el *SNP* sí que produjo una reducción significativa pero el NOC-12 fue el dador de *NO* que provocó el descenso más acusado. Es llamativo el hecho de que los condrocitos mostraron una tendencia a sintetizar mayor cantidad de ATP en condiciones estándar de cultivo que en situación de privación de glucosa. Además, recordemos que el *SNP* fue el único dador de *NO* en reducir la incorporación de glucosa, y es en condiciones estándar de cultivo cuando reduce casi por completo la formación de ATP, sin embargo, el NOC-12 tiene este efecto cuando no hay glucosa en el medio de cultivo. Esto se debe a que el NOC-12 inhibe casi todos los complejos mitocondriales, de modo que no puede obtener energía de forma aerobia, sólo anaerobia.

Por otra parte, igual que en el caso del medio estándar de cultivo, los condrocitos OA produjeron mayor cantidad de lactato que los normales. En estas condiciones, todos los dadores redujeron los niveles de lactato a prácticamente 0.

Así mismo aunque el cultivo de condrocitos en medio sin glucosa no modificó la supervivencia, la inhibición de los complejos de la CRM por la estimulación con los dadores de *NO* junto con la privación de glucosa en el medio además de aumentar el porcentaje de condrocitos no viables redujo el ratio de la fluorescencia roja/verde mostraron un perfil de despolarización muy similar al descrito para el *SNP* (reducción en el número de células con $\Delta\Psi_m$ normal e incremento en el número de células con despolarización mitocondrial) (Maneiro *et al.*, 2005).

Mediante la realización de una curva de concentraciones de glucosa se observó que el efecto de los dadores de *NO* sobre la viabilidad es proporcional a la cantidad de glucosa en el medio.

4. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL (CRM) SOBRE LOS CONDROCITOS ARTICULARES HUMANOS.

Para explicar el significado funcional de los defectos en las actividades individuales de los complejos de la CRM que expresan los condrocitos artrósicos así como los condrocitos normales cuando fueron estimulados con los diferentes dadores de *NO*, estudiamos el efecto de los inhibidores de la CRM sobre la viabilidad y el $\Delta\Psi_m$ de los condrocitos normales.

El efecto de los inhibidores de la CRM sobre la viabilidad de los condrocitos normales se vio modificado por la presencia/ausencia de glucosa en el medio de cultivo. En condiciones estándar de cultivo, se observó que los inhibidores de los complejos I y III, reducen la actividad mitocondrial. Sin embargo la oligomicina, el inhibidor de la ATPsintasa, fue el único que indujo un descenso significativo en la viabilidad de los condrocitos. Estos efectos fueron mucho más intensos si los condrocitos fueron cultivados en medio sin glucosa. Todos los inhibidores de la CRM excepto el NPA (inhibidor del complejo II), redujeron la supervivencia de los condrocitos.

Por otra parte, en cuanto a los efectos sobre el $\Delta\Psi_m$ fueron muy variables en función del inhibidor empleado así como de la presencia o no de glucosa en el medio. En condiciones estándar de cultivo únicamente el NPA y la NaN_3 indujeron despolarización mitocondrial, sin embargo, en condiciones de privación de glucosa, fueron la rotenona y la NaN_3 las que la produjeron.

Previamente nuestro grupo observó que la inhibición del complejo III (pero no del complejo II) causó un deterioro del $\Delta\Psi_m$. Para reproducir el mismo perfil que el de las células OA (la reducción en los complejos II y III), los condrocitos normales se cultivaron con antimicina A y NPA simultáneamente. El efecto de esta combinación sobre el $\Delta\Psi_m$ fue más fuerte que el efecto individual de cada uno de los inhibidores (Maneiro *et al.*, 2003).

El *NO* también puede inhibir directamente el complejo IV por la unión reversible del *NO* a la citocromo c oxidasa en competición con O_2 (Lizasoain *et al.*, 1996; Leary *et al.*, 2002). Una aproximación para determinar si la muerte celular causada por el *SNP* es mediada directamente por la inhibición del complejo IV es determinar el efecto de la NaN_3 sobre la citotoxicidad y la actividad mitocondrial. Nuestros resultados mostraron

que la inhibición del complejo con NaN_3 modificó el $\Delta\Psi_m$ y la supervivencia de los condrocitos en ambas condiciones, siendo este efecto mucho más llamativo en condiciones de privación de glucosa (Maneiro *et al.*, 2005).

El grupo de Tomita observó que los inhibidores del transporte de electrones descenden los niveles de ATP, sobre todo en los periodos tempranos de estimulación (aproximadamente 2 h) (Tomita *et al.*, 2001). La cantidad total de ATP sintetizada por las células podría ser significativamente más bajo comparado con el obtenido en ausencia de inhibidores. El ATP es la fuente principal de energía para la proliferación, diferenciación y apoptosis (Bernardi *et al.*, 1999; Hubbard, 1999). A pesar del incremento en la glucólisis, la cantidad de ATP que puede ser utilizada para el mantenimiento del metabolismo celular, incluyendo la síntesis de PG, puede verse limitada de manera significativa en presencia de los inhibidores de la respiración (Tomita *et al.*, 2001).

De igual forma que en el caso de los dadores de *NO*, el grupo de Bal-Price no detectó muerte celular con los inhibidores mediante el método del IP en condiciones de privación de glucosa (Bal-Price *et al.*, 2000). Los inhibidores de la CRM por sí mismos causaron necrosis en ausencia de glucosa, debido a la falta de ATP que es requerido en varios pasos de la vía apoptótica (Richter *et al.*, 1996; Eguchi *et al.*, 1997), y apoptosis en presencia de ella; y la apoptosis se debió a la activación de caspasas acompañada de la liberación de Cyt c, pero la permeabilidad transitoria mitocondrial aparentemente no estaba involucrada (Bal-Price *et al.*, 2000).

La realización de una curva de concentraciones de glucosa, nos permitió ver que el efecto negativo de los inhibidores sobre la viabilidad de los condrocitos es fuertemente dependiente de la glucosa, ya que dicho efecto es revertido por la presencia de una concentración muy baja de glucosa (0,25 mM).

RESUMEN FINAL

El metabolismo de los condrocitos ocurre principalmente a través de la glucólisis, de modo que requieren glucosa para su supervivencia y producen gran cantidad de ácido láctico. El O_2 también es necesario para la actividad celular pero no para su supervivencia (Grunhagen *et al.*, 2006). Los gradientes que se dan en el cartílago dependen de la densidad celular y del consumo por parte de las células. El gradiente de la presión parcial de O_2 puede proporcionar las condiciones para el efecto Pasteur. Hay una estrecha relación entre la tensión de O_2 y la concentración y consumo de glucosa, de modo que proporciona una supresión de la respiración por la glucosa (efecto Crabtree). Bajo condiciones fisiológicas, el nivel de glucosa en el líquido sinovial reduce el consumo de O_2 en la capa superior del cartílago, la cual está bien suplementada de glucosa, permitiendo una compensación oxidativa del descenso glucolítico ocurrido en la zona profunda.

Nuestro trabajo muestra que los dadores de *NO* tienen la capacidad de producir dos tipos de muerte diferente en los condrocitos articulares humanos. Una de ellas se caracteriza por cambios morfológicos similares a los de la apoptosis. Este tipo de muerte es causado por el *SNP*, un dador de *NO* que además origina liberación de *ROS* y $ONOO^-$. Así mismo este dador tiene la capacidad de inhibir la CRM (complejo IV), reducir la síntesis ATP y ocasionar despolarización mitocondrial. Además el *SNP* reduce la entrada de glucosa en los condrocitos. El otro tipo de muerte celular es la ocasionada por el *NOC-12* que se asemeja a la autofagocitosis (condroptosis). Este dador de *NO* no tiene la capacidad de reducir la entrada de glucosa en los condrocitos, pero si es capaz de alterar la actividad mitocondria (reduce actividad de complejos mitocondriales I, III y IV, reduce síntesis de ATP e incrementa el numero de condrocitos con despolarización mitocondrial).

Estos datos son importantes porque nos ayudan a entender mejor algunos aspectos de la patogénesis de la OA. En el cartílago OA se han descrito la presencia de ambas formas de muerte mencionadas anteriormente (apoptosis y autofagocitosis). Nuestros datos apoyan la teoría que la apoptosis aparecerá en aquellos cartílagos OA en los que exista de forma simultánea una inhibición de la CRM y una reducción de la glucólisis o del aporte de glucosa. Estas circunstancias metabólicas se presentan en aquellas situaciones en las que existen altos niveles de *NO* y *ROS* con producción de $ONOO^-$. Sin embargo la autofagocitosis aparecería en aquellas circunstancias en las que, a pesar

de existir una reducción de la CRM, el condrocito puede asegurar un aporte de glucosa que le permite mantener la glucólisis. Esta situación aparece en ambientes con niveles muy altos de *NO* pero con escasa presencia de *ROS*.

Otra aportación importante de este trabajo es la capacidad que tiene la glucosa para revertir la muerte inducida por los donadores de *NO* y por los inhibidores de la CRM. Estos datos sugieren que el tratamiento de la OA con fármacos que faciliten la entrada de glucosa en el condrocito, mejore la glucólisis o la función mitocondrial puede reducir la pérdida del elemento celular del cartílago y por lo tanto frenar la progresión de la OA.

VI. CONCLUSIONES

1. Los dadores de *NO* reducen la viabilidad de los condrocitos articulares humanos normales. Este efecto es dependiente de la naturaleza del dador de *NO* utilizado.
2. Los dadores *NO* tienen diferentes efectos sobre el tipo de muerte que tiene lugar en el cartílago articular humano. La muerte celular inducida por el dador clásico de *NO* *SNP* presenta las características típicas de la apoptosis y, el proceso de muerte inducido por el dador de *NO* de nueva generación NOC-12, sugiere un proceso de muerte por autofagocitosis.
3. Los dadores de *NO* alteran la CRM y los efectos encontrados sobre los diferentes complejos mitocondriales dependen de la naturaleza del dador de *NO* utilizado. El dador clásico de *NO* *SNP* alteró únicamente el complejo IV, sin embargo, el dador de *NO* de nueva generación NOC-12, alteró todos los complejos excepto el II.
4. El $\Delta\Psi_m$ de los condrocitos articulares normales es alterado por los dadores de *NO* (*SNP* y NOC-12) de forma tiempo y dosis dependiente.
5. Los dadores de *NO* de nueva generación (NOC-5 y NOC-12) no modifican el metabolismo glucolítico de los condrocitos articulares normales (incorporación de glucosa, producción de lactato y ATP intracelular, expresión de GLUTs). El dador clásico de *NO* (*SNP*) reduce la incorporación de glucosa a los condrocitos así como la síntesis de ATP intracelular y lactato.
6. La privación de glucosa por si sola no induce la muerte de los condrocitos, sin embargo potencia el efecto de muerte celular del *SNP* y NOC-12. La suplementación del medio de cultivo con glucosa reduce el efecto del *SNP* y NOC-12 sobre la supervivencia de los condrocitos normales. Los condrocitos articulares humanos OA son más dependientes de la glucólisis que los normales.
7. La inhibición de los complejos de la CRM de los condrocitos cultivados en ausencia de glucosa, a excepción de la inhibición del complejo II, induce la muerte del condrocito. La glucosa revierte este efecto de forma dosis dependiente.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS ME, BRANDT KD. Hypertrophic repair of canine articular cartilage in osteoarthritis after anterior cruciate ligament transaction. *J Rheumatol* 1991; 18(3):428-35.
- ADAMS CS, HORTON WE JR. Chondrocyte apoptosis increases with age in the articular cartilage of adult animals. *Anat Rec* 1998; 250(4):418-25.
- AHERN GP, KLYACHKO VA, JACKSON MB. cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. *Trends Neurosci* 2002; 25(10):510-7.
- AIGNER T, HEMMEL M, NEUREITER D, GEBHARD PM, ZEILER G, KIRCHNER T, MCKENNA L. Apoptotic cell death is not a widespread phenomenon in normal aging and osteoarthritis human articular knee cartilage: a study of proliferation, programmed cell death (apoptosis), and viability of chondrocytes in normal and osteoarthritic human knee cartilage. *Arthritis Rheum* 2001; 44(6):1304-12.
- AIGNER T, KIM HA, ROACH HI. Apoptosis in osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2004; 30(3):639-53, xi.
- AIGNER T, SOEDER S, HAAG J. IL-1beta and BMPs-interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration. *Eur Cell Mater* 2006; 12:49-56.
- AIZAWA T, KON T, EINHORN TA, GERSTENFELD LC. Induction of apoptosis in chondrocytes by tumor necrosis factor-alpha. *J Orthop Res* 2001; 19(5):785-96.
- ALDERTON WK, COOPER CE, KNOWLES RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357(Pt 3):593-615.
- ALMEIDA A, ALMEIDA J, BOLANOS JP, MONCADA S. Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(26):15294-9.
- ALTMAN RD. Classification of disease: osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1991; 20(6 Suppl 2):40-7.
- ALTMAN RD, LOZADA CJ. Practice guidelines in the management of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1998; 6 Suppl A: 22-4.
- AMIN AR, DI CESARE PE, VYAS P, ATTUR M, TZENG E, BILLIAR TR, STUCHIN SA, ABRAMSON SB. The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. *J Exp Med* 1995a; 182(6):2097-102.

- AMIN AR, VYAS P, ATTUR M, LESZCZYNSKA-PIZIAK J, PATEL IR, WEISSMANN G, ABRAMSON SB. The mode of actions of aspirin-like drugs: effects on inducible nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995b; 92(17):7926-30.
- ARDEN N, NEVITT MC. Osteoarthritis: epidemiology. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006; 20(1):3-25.
- ATHANASIOU KA, ROSENWASSER MP, BUCKWALTER JA, MALININ TI, MOW VC. Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage. *J Orthop Res* 1991; 9(3):330-40.
- AYDELOTTE MB, SCHUMACHER BL, KUETTNER KE. Heterogeneity of articular chondrocytes, in Kuerrner KE, Schleyerbach R, Peyron JG, Hascall VC (eds). *Articular Cartilage and Osteoarthritis*. New York, NY, Raven Press 1992:237-49.
- AYDELOTTE MB, MICHAL LE, REID DR, SCHUMACHER BL. Chondrocytes from the articular surface and deep zones express different, but stable phenotypes in alginate gel culture. *Trans Ortho Res Soc* 1996; 21:317.
- BAL-PRICE A, BROWN GC. Nitric-oxide-induced necrosis and apoptosis in PC12 cells mediated by mitochondria. *J Neurochem* 2000; 75(4):1455-64.
- BATES TE, LOESCH A, BURNSTOCK G, CLARK JB. Mitochondrial nitric oxide synthase: a ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation? *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 218(1):40-4.
- BELTRÁN B, MATHUR A, DUCHEN MR, ERUSALIMSKY JD, MONCADA S. The effect of nitric oxide on cell respiration: A key to understanding its role in cell survival or death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(26):14602-7.
- BELTRÁN B, QUINTERO M, GARCÍA-ZARAGOZA E, O'CONNOR E, ESPLUGUES JV, MONCADA S. Inhibition of mitochondrial respiration by endogenous nitric oxide: a critical step in Fas signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(13):8892-7.
- BENITO P, MONFORT J. Etiopatogenia, clasificación y epidemiología de la artrosis. En: Alonso Ruíz A, Álvaro-Gracia JM^a, Andreu Sánchez JL, Blanch i Rubió J, Collantes Estévez E, Cruz Martínez J, Gratacos Masmitjá J, Laffón Rocss A, Martín Mola E, Martínez Tabeada V, Rodríguez Lozano C, Tornero Molina J, editores. *Manual SER de la Enfermedades Reumáticas*, 3^a ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2000; 463-75.

- BENNETT MC, MLADY GW, KWON YH, ROSE GM. Chronic *in vivo* sodium azide infusion induces selective and stable inhibition of cytochrome c oxidase. *J Neurochem* 1996; 66(6):2606-11.
- BERNARDI P, SCORRANO L, COLONNA R, PETRONILLI V, DI LISA F. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem* 1999; 264(3):687-701.
- BERNASSOLA F, CATANI MV, CORAZZARI M, ROSSI A, MELINO G. Inactivation of multiple targets by nitric oxide in CD95-triggered apoptosis. *J Cell Biochem* 2001; 82(1):123-33.
- BIBBY SR, JONES DA, RIPLEY RM, URBAN JP. Metabolism of the intervertebral disc: effects of low levels of oxygen, glucose, and pH on rates of energy metabolism of bovine nucleus pulposus cells. *Spine* 2005; 30(5):487-96.
- BIRKEDAL-HANSEN H, MOORE WG, BODDEN MK, WINDSOR LJ, BIRKEDAL-HANSEN B, DECARLO A, ENGLER JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Biol Med* 1993; 4(2):197-250.
- BIRKEDAL-HANSEN H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7(5):728-35.
- BLANCO FJ, OCHS RL, SCHWARZ H, LOTZ M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* 1995a; 146(1):75-85.
- BLANCO FJ, LOTZ M. IL-1-induced nitric oxide inhibits chondrocyte proliferation via PGE2. *Exp Cell Res* 1995b; 218(1):319-25.
- BLANCO FJ, GUITIAN R, VÁZQUEZ-MARTUL E, DE TORO FJ, GALDO F. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A posible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum* 1998a; 41(2):284-9.
- BLANCO GARCÍA FJ. Estudio *in vitro* del efecto del óxido nítrico sobre los condrocitos articulares humanos: proliferación, viabilidad y envejecimiento. Tesis doctoral. 1998b.
- BLANCO GARCÍA FJ, FERNÁNDEZ-SUEIRO JL. Artrosis, concepto, clasificación, epidemiología y patogenia. En: Pascual E, Rodríguez-Valverde V, Carbonell J, Gómez-Reino J, directores. Reumatología: Enfermedades del Aparato Locomotor. Madrid: Arán Ed 1998c:1.609-42.
- BLANCO FJ, GUITIAN R, MORENO J, DE TORO FJ, GALDO F. Effect of antiinflammatory drugs on COX-1 and COX-2 activity in human articular chondrocytes. *J Rheumatol* 1999a; 26(6):1366-73.

- BLANCO GARCÍA FJ. Inflamación en la artrosis. En: Egido J, Gómez Reino J, Herrero-Beaumont G, Rodríguez de la Serna A, editores. Manual de la inflamación, 1ª ed. Madrid: *Medical and Marketing Communications* 1999b:339-54.
- BOVERIS A, ÁLVAREZ S, NAVARRO A. The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(9):1186-93.
- BOYA P, GONZÁLEZ-POLO RA, CASARES N, PERFETTINI JL, DESSEN P, LAROCLETTE N, METIVIER D, MELEY D, SOUQUERE S, YOSHIMORI T, PIERRON G, CODOGNO P, KROEMER G. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* 2005; 25(3):1025-40.
- BRECKENRIDGE DG, GERMAIN M, MATHAI JP, NGUYEN M, SHORE GC. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 2003; 22(53):8608-18.
- BRECKENRIDGE DG, XUE D. Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16(6):647-52.
- BRIGHTON CT, KITAJIMA T, HUNT RM. Zonal analysis of cytoplasmic components of articular cartilage chondrocytes. *Arthritis Rheum* 1984; 27(11):1290-9.
- BRÖKER LE, KRUYT FA, GIACCONE G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* 2005; 11(9):3155-62.
- BRONCKERS AL, GOEI W, LUO G, KARSENTY G, D'SOUZA RN, LYARUU DM, BURGER EH. DNA fragmentation during bone formation in neonatal rodents assessed by transferasa-mediated end labelling. *J Bone Miner Res* 1996; 11(9):1281-91.
- BROOKES PS, BOLANOS JP, HEALES SJ. The assumption that nitric oxide inhibits mitochondrial ATP synthesis is correct. *FEBS Lett* 1999; 446(2-3):261-3.
- BROOKS PM. Impact of osteoarthritis on individuals and society: how much disability? Social consequences and health economic implications. *Curr Opin Rheumatol* 2002; 14(5):573-7.
- BROWN GC, COOPER CE. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett* 1994; 356(2-3):295-8.

- BROWN GC, BORUTAITE V. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(11):1440-50.
- BROWN GC. Nitric oxide and mitochondria. *Front Biosci* 2007; 12:1024-33.
- BUCKWALTER JA, ROSENBERG LA, HUNZIKER EB. Articular cartilage: Composition, structure, response to injury, and methods of facilitation repair, in Ewing JW (ed). *Articular Cartilage and Knee Joint Function: Basic Science and Arthroscopy*. New York, NY, Raven Press 1990:19-56.
- BUCKWALTER JA, MOW VC. Cartilage repair in osteoarthritis, in Moskowitz RW, Howell DS, Goldberg VM, Mankin HJ (eds). *Osteoarthritis: Diagnosis and Management*, ed 2. Philadelphia, PA, WB Saunders 1992:71-107.
- BUCKWALTER JA, MARTIN J. Degenerative joint disease. *Clin Symp* 1995;47(2):1-32.
- BUCKWALTER JA, MANKIN HJ. Articular cartilage: tissue desing and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect* 1998a; 47:477-86.
- BUCKWALTER JA, MANKIN HJ. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect* 1998b; 47:487-504.
- BUCKWALTER JA, MARTIN J, MANKIN HJ. Synovial joint degeneration and the syndrome of osteoarthritis. *Instr Course Lect* 2000; 49:481-9.
- BUCKWALTER JA, MANKIN HJ, GRODZINSKY AJ. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect* 2005; 546:465-80.
- BURSCH W. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ* 2001; 8(6):569-81.
- CAIN K, BRATTON SB, COHEN GM. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* 2002; 84(2-3):203-14.
- CAO M, WESTERHAUSEN-LARSON A, NIYIBIZI C, KAVALKOVICH K, GEORGESCU HI, RIZZO CF, HEBDA PA, STEFANOVIC-RACIC M, EVANS CH. Nitric oxide inhibits the synthesis of type-II collagen without altering Col2A1 mRNA abundance: prolyl hydroxylase as a possible target. *Biochem J* 1997; 324(Pt 1):305-10.
- CAO L, LEE V, ADAMS ME, KIANI C, ZHANG Y, HU W, YANG BB. beta-Integrin-collagen interaction reduces chondrocyte apoptosis. *Matrix Biol* 1999; 18(4):343-55.

- CARAYANNOPOULOS MO, CHI MM, CUI Y, PINGSTERHAUS JM, MCKNIGHT RA, MUECKLER M, DEVASKAR SU, MOLEY KH. GLUT8 is a glucose transporter responsible for insulin-stimulated glucose uptake in the blastocyst. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(13):7313-8.
- CARDONE MH, SALVESEN GS, WIDMANN C, JOHNSON G, FRISCH SM. The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell* 1997; 90(2):315-23.
- CASTILLO EC, KOURI JB. A new role for chondrocytes as non-professional phagocytes. An *in vitro* study. *Microsc Res Tech* 2004; 64(3):269-8.
- CHARLES IG, PALMER RM, HICKERY MS, BAYLISS MT, CHUBB AP, HALL VS, MOSS DW, MONCADA S. Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(23):11419-23.
- CHAUTAN M, CHAZAL G, CECCONI F, GRUSS P, GOLSTEIN P. Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr Biol* 1999; 9(17):967-70.
- CHOI BM, PAE HO, JANG SI, KIM YM, CHUNG HT. Nitric oxide as a proapoptotic as well as anti-apoptotic modulator. *J Biochem Mol Biol* 2002; 35(1):116-26.
- CLANCY RM, REDISKE J, TANG X, NIJHER N, FRENKEL S, PHILIPS M, ABRAMSON SB. Outside-in signaling in the chondrocyte. Nitric oxide disrupts fibronectin-induced assembly of a subplasmalemmal actin/rho A/focal adhesion kinase signaling complex. *J Clin Invest* 1997; 100(7):1789-96.
- CLARKE PG. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 1990; 181(3):195-213.
- CLEETER MW, COOPER JM, DARLEY-USMAR VM, MONCADA S, SCHAPIRA AH. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett* 1994; 345(1):50-4.
- CLEMENTI E, BROWN GC, FEELISCH M, MONCADA S. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(13):7631-6.

- CLOHERTY EK, SULTZMAN LA, ZOTTOLA RJ, CARRUTHERS A. Net sugar transport is a multistep process. Evidence for cytosolic sugar binding sites in erythrocytes. *Biochemistry* 1995; 34(47):15395-406.
- COLETTI JM Jr, AKESON WH, WOO SL. A comparison of the physical behaviour of normal articular cartilage and the arthroplasty surface. *J Bone Joint Surg Am* 1972; 54(1):147-60.
- CORNFORD EM, HYMAN S, CORNFORD ME, DAMIAN RT, RALEIGH MJ. A single glucose transporter configuration in normal primate brain endothelium: comparison with resected human brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57(7):699-713.
- CROFFORD LJ, WILDER RL, RISTIMAKI AP, SANO H, REMMERS EF, EPPS HR, HLA T. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. *J Clin Invest* 1994; 93(3):1095-101.
- CROMPTON M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999; 341(Pt 2):233-49.
- DARAKHSHAN F, HAJDUCH E, KRISTIANSSEN S, RICHTER EA, HUNDAL HS. Biochemical and functional characterization of the GLUT5 fructose transporter in rat skeletal muscle. *Biochem J* 1998; 336(Pt 2):361-6.
- DAVIS WL, JONES RG, FARMER GR, MATTHEWS JL, GOODMAN DB. Glyoxylate cycle in the epiphyseal growth plate: isocitrate lyase and malate synthase identified in mammalian cartilage. *Anat Rec* 1989; 223(4):357-62.
- DE CLERCQ L, MOUROT J, GENART C, DAVIDTS V, BOONE C, REMACLE C. An anti-adipocyte monoclonal antibody is cytotoxic to porcine preadipocytes *in vitro* and depresses the development of pig adipose tissue. *J Anim Sci* 1997; 75(7):1791-7.
- DEL CARLO M Jr, LOESER RF. Nitric oxide-mediated chondrocyte cell death requires the generation of additional reactive oxygen species. *Arthritis Rheum* 2002; 46(2):394-403.
- DEL CARLO MD JR, LOESER RF. Increased oxidative stress with aging reduces chondrocyte survival: correlation with intracellular glutathione levels. *Arthritis Rheum* 2003; 48(12):3419-30.
- DENKO CW, MALEMUD CJ. Metabolic disturbances and synovial joint responses in osteoarthritis. *Front Biosci* 1999; 4:D686-93.

- DESAGHER S, OSEN-SAND A, NICHOLS A, ESKES R, MONTESSUIT S, LAUPER S, MAUNDRELL K, ANTONSSON B, MARTINOU JC. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 1999; 144(5):891-901.
- DESSAU W, SASSE J, TIMPL R, JILEK F, VON DER MARK K. Synthesis and extracellular deposition of fibronectin in chondrocyte cultures. Response to the removal of extracellular cartilage matrix. *J Cell Biol* 1978; 79(2 Pt 1):342-55.
- DEWIRE P, EINHORN TA. The joints as an organ. In: Moskowitz RW, Howell DS, Altman RD, Buckwalter JA, Goldberg VM, editors. *Osteoarthritis*, 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2001; 49-68.
- DEWITT DL, SMITH WL. Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85(5):1412-6.
- DIMMELER S, HAENDELER J, NEHLS M, ZEIHNER AM. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 β -converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med* 1997; 185(4):601-7.
- DOEGE H, SCHURMANN A, BAHRENBERG G, BRAUERS A, JOOST HG. GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *J Biol Chem* 2000a; 275(21):16275-80.
- DOEGE H, BOCIANSKI A, JOOST HG, SCHURMANN A. Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes. *Biochem J* 2000b; 350 Pt 3:771-6.
- ESCAMES G, LEÓN J, MACÍAS M, KHALDY H, ACUNA-CASTROVIEJO D. Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J* 2003; 17(8):932-4.
- ESPALLARGUES M, ALONSO J, RUIGÓMEZ A, ANTO JM. Osteoarticular disorders in the elderly: an approach to their population impact. *Med Clin (Barc)* 1996; 106(16):601-6.
- FARQUHARSON C, BERRY JL, MAWER EB, SEAWRIGHT E, WHITEHEAD CC. Ascorbic acid-induced chondrocyte terminal differentiation: the role of the extracellular matrix and 1,25-dihydroxyvitamin D. *Eur J Cell Biol* 1998; 76(2):110-8.

- FARRELL AJ, BLAKE DR, PALMER RM, MONCADA S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 1992; 51(11):1219-22.
- FIGENSCHAU Y, KNUTSEN G, SHAHAZEYDI S, JOHANSEN O, SVEINBJORNSSON B. Human articular chondrocytes express functional leptin receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287(1):190-7.
- FITZHUGH AL, KEEFER LK. Diazeniumdiolates: pro- and antioxidant applications of the "NONOates". *Free Radic Biol Med* 2000; 28(10):1463-9.
- FOGHSGAARD L, WISSING D, MAUCH D, LADEMANN U, BASTHOLM L, BOES M, ELLING F, LEIST M, JAATTELA M. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol* 2001; 153(5):999-1010.
- FRADE JM, MICHAELIDIS TM. Origin of eukaryotic programmed cell death: a consequence of aerobic metabolism? *Bioessays* 1997; 19(9):827-32.
- FRANCHIMONT P, BASSLEER C. Effects of hormones and local growth factors on articular chondrocyte metabolism. *J Rheumatol Suppl* 1991; 27:68-70.
- FRENKEL SR, CLANCY RM, RICCI JL, DI CESARE PE, REDISKE JJ, ABRAMSON SB. Effects of nitric oxide on chondrocyte migration, adhesion, and cytoskeletal assembly. *Arthritis Rheum* 1996; 39(11):1905-12.
- FRISCH SM, FRANCIS H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 1994; 124(4):619-26.
- FUENTES-BOQUETE I, GALDO-FERNÁNDEZ F, BLANCO-GARCÍA FJ. Remodelación del cartílago articular: perspectivas terapéuticas. *Seminarios de la Fundación Española de Reumatología* 2001; 2(1):3-14.
- FUJITA I, HIRATA S, ISHIKAWA H, MIZUNO K, ITOH H. Apoptosis of hypertrophic chondrocytes in rat cartilaginous growth plate. *Journal of Orthopaedic science* 1997; 2: 328-333.
- GE Z, HU Y, HENG BC, YANG Z, OUYANG H, LEE EH, CAO T. Osteoarthritis and therapy. *Arthritis Rheum* 2006; 55(3):493-500.
- GENG Y, BLANCO FJ, CORNELISSON M, LOTZ M. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in normal human articular chondrocytes. *J Immunol* 1995; 155(2):796-801.
- GIBSON GJ, Kohler WJ, Schaffler MB. Chondrocyte apoptosis in endochondral ossification of chick sterna. *Dev Dyn* 1995; 203(4):468-76.

- GIBSON G, LIN DL, ROQUE M. Apoptosis of terminally differentiated chondrocytes in culture. *Exp Cell Res* 1997; 233(2):372-82.
- GIBSON G. Active role of chondrocyte apoptosis in endochondral ossification. *Microsc Res Tech* 1998; 43(2):191-204.
- GIBSON G, LIN DL, WANG X, ZHANG L. The release and activation of transforming growth factor beta2 associated with apoptosis of chick hypertrophic chondrocytes. *J Bone Miner Res* 2001; 16(12):2330-8.
- GOLDRING MB. Degradation of articular cartilage in culture: regulatory factors. En: Woessner & Howell, editors. *Joint cartilage degradation*. New York: Marcel Dekker, Inc 1993:281-345.
- GOLDRING MB. Articular cartilage. En: Klippel JH, director. *Primer on the Rheumatic Diseases*. 11^a ed. Atlanta: Arthritis Foundation 1997:14-8.F
- GOLDRING MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(9):1916-26.
- GOLDRING MB. Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006; 20(5):1003-25.
- GOLSTEIN P, KROEMER G. Cell death by necrosis: toward a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 2007; 32(1):37-43.
- GONZÁLEZ-POLO RA, BOYA P, PAULEAU AL, JALIL A, LAROCLETTE N, SOUQUERE S, ESKELINEN EL, PIERRON G, SAFTIG P, KROEMER G. The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt 14):3091-102.
- GOTTLIEB RA, GRANVILLE DJ. Analyzing mitochondrial changes during apoptosis. *Methods* 2002; 26(4):341-7.
- GOZUACIK D, KIMCHI A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 2004; 23(16):2891-906.
- GREEN DR, REED JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281(5381):1309-12.
- GREEN DR, KROEMER G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004; 305(5684):626-9.
- GREISBERG J, BLISS M, TEREK R. The prevalence of nitric oxide in apoptotic chondrocytes of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10(3):207-11.
- GRIMSHAW MJ, MASON RM. Bovine articular chondrocyte function *in vitro* depends upon oxygen tension. *Osteoarthritis Cartilage* 2000; 8(5):386-92.

- GRUETTER C, BARRY BK, McNAMARA DB, GRUETTER DY, KADOWITZ PJ, IGNARRO L. Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. *J Cyclic Nucleotide Res* 1979; 5(3):211-24.
- GRUNHAGEN T, WILDE G, SOUKANE DM, SHIRAZI-ADL SA, URBAN JP. Nutrient supply and intervertebral disc metabolism. *J Bone Joint Surg Am* 2006; 88 Suppl 2:30-5.
- GUILAK F, RATCLIFFE A, LANE L, ROSENWASSER MP, MOW VC. Mechanical and biochemical changes in the superficial zone of articular cartilage in canine experimental osteoarthritis. *J Orthop Res* 1994; 12(4):474-84.
- GULBINS E, DRESCHERS S, BOCK J. Role of mitochondria in apoptosis. *Exp Physiol* 2003; 88(1):85-90.
- HARDINGHAM TE, FOSANG AJ. The structure of aggrecan and its turnover in cartilage. *J Rheumatol Suppl* 1995; 43:86-90.
- HASHIMOTO S, SETAREH M, OCHS RL, LOTZ M. Fas/Fas ligand expression and induction of apoptosis in chondrocytes. *Arthritis Rheum* 1997; 40(10):1749-55.
- HASHIMOTO S, OCHS RL, ROSEN F, ROSEN F, QUACH J, McCABE G, SOLAN J, SEEGMILLER JE, TERKELTAUB R, LOTZ M. Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998a; 95(6):3094-9.
- HASHIMOTO S, TAKAHASHI K, AMIEL D, COUTTS RD, LOTZ M. Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998b; 41(7):1266-74.
- HASHIMOTO S, OCHS RL, KOMIYA S, LOTZ M. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998c; 41(9):1632-8.
- HATORI M, KLATTE KJ, TEIXEIRA CC, SHAPIRO IM. End labelling studies of fragmented DNA in the avian growth plate: evidence of apoptosis in terminally differentiated chondrocytes. *J Bone Miner Res* 1995; 10(12):1960-8.
- HAYASHI T, ABE E, YAMATE T, TAGUCHI Y, JASIN HE. Nitric oxide production by superficial and deep articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 1997; 40(2); 261-9.

- HIGGINS DS Jr, GREENAMYRE JT. [³H]dihydrorotenone binding to NADH: ubiquinone reductase (complex I) of the electron transport chain: an autoradiographic study. *J Neurosci* 1996; 16(12):3807-16.
- HIRSCH MS, LUNSFORD LE, TRINKAUS-RANDALL V, SVOBODA KK. Chondrocyte survival and differentiation in situ are integrin mediated. *Dev Dyn* 1997; 210(3):249-63.
- HOCQUETTE JF, BORNES F, BALAGE M, FERRE P, GRIZARD J, VERMOREL M. Glucose-transporter (GLUT4) protein content in oxidative and glycolytic skeletal muscles from calf and goat. *Biochem J* 1995; 305 (Pt 2):465-70.
- HOCQUETTE JF, GRAULET B, CASTIGLIA-DELAUVAUD C, BORNES F, LEPETIT N, FERRE P. Insulin-sensitive glucose transporter transcript levels in calf muscles assessed with a bovine GLUT4 cDNA fragment. *Int J Biochem Cell Biol* 1996; 28(7):795-806.
- HOCQUETTE JF, ABE H. Facilitative glucose transporters in livestock species. *Reprod Nutr Dev* 2000; 40(6):517-33.
- HODGE JA, McKIBBIN B. The nutrition of mature and immature cartilage in rabbits. An autoradiographic study. *J Bone Joint Surg Br* 1969; 51(1):140-7.
- HOLM S, MAROUDAS A, URBAN JP, SELSTAM G, NACHEMSON A. Nutrition of the intervertebral disc: solute transport and metabolism. *Connect Tissue Res* 1981; 8(2):101-19.
- HONNER R, THOMPSON RC. The nutritional pathways of articular cartilage. An autoradiographic study in rabbits using ³⁵S injected intravenously. *J Bone Joint Surg Am* 1971; 53(4):742-8.
- HORN TF, WOLF G, DUFFY S, WEISS S, KEILHOFF G, MACVICAR BA. Nitric oxide promotes intracellular calcium release from mitochondria in striatal neurons. *FASEB J* 2002; 16(12):1611-22.
- HORTELANO S, DALLAPORTA B, ZAMZAMI N, HIRSCH T, SUSIN SA, MARZO I, BOSCA L, KROEMER G. Nitric oxide induces apoptosis via triggering mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett* 1997; 410(2-3):373-7.
- HORTON WE Jr, FENG L, ADAMS C. Chondrocyte apoptosis in development, aging and disease. *Matrix Biol* 1998; 17(2):107-15.
- HOU YC, JANCZUK A, WANG PG. Current trends in the development of nitric oxide donors. *Curr Pharm Des* 1999; 5(6):417-41.

- HRABIE JA, KLOSE JR. New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines. *J Org Chem* 1993; 58:1472-76.
- HUBBARD SR. Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Prog Biophys Mol Biol* 1999; 71(3-4):343-58.
- HUNZIKER EB. Articular cartilage structure in human and experimental animals. En: Kuettner KE, Schleyerbach R, Peyron J, Hascall VC, directores. Articular cartilage and osteoarthritis. New York. *Raven Press* 1992:183-9.
- HWANG WS. Ultrastructure of human foetal and neonatal hyaline cartilage. *J Pathol* 1978; 126(4):209-14.
- HWANG WS, TOCK EP, TAN KL, TAN LK. The pathology of cartilage in chondrodysplasias. *J Pathol* 1979; 127(1):11-8.
- IANNONE F, LAPADULA G. The pathophysiology of osteoarthritis. *Aging Clin Exp Res* 2003; 15(5):364-72.
- IGNARRO LJ, LIPPTON H, EDWARDS H, BARICOS WH, HYMAN AL, KADOWITZ PJ, GRUETTER CA. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther* 1981; 218(3):739-49.
- IGNARRO LJ. Physiology and pathophysiology of nitric oxide. *Kidney Int Suppl* 1996; 55:S2-5.
- INEROT S, HEINEGARD D, AUDELL L, OLSSON SE. Articular-cartilage proteoglycans in aging and osteoarthritis. *Biochem J* 1978; 169(1):143-56.
- INGELMARK BE. The nutritive supply and nutritional value of synovial fluid. *Acta Orthop Scand* 1950; 20(2):144-55.
- JOHNSON K, JUNG A, MURPHY A, ANDREYEV A, DYKENS J, TERKELTAUB R. Mitochondrial oxidative phosphorylation is a downstream regulator of nitric oxide effects on chondrocyte matrix synthesis and mineralization. *Arthritis Rheum* 2000; 43(7):1560-70.
- JOHNSON K, SVENSSON CI, ETTEN DV, GHOSH SS, MURPHY AN, POWELL HC, TERKELTAUB R. Mediation of spontaneous knee osteoarthritis by progressive chondrocyte ATP depletion in Hartley guinea pigs. *Arthritis Rheum* 2004; 50(4):1216-25.

- JOOST HG, THORENS B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol* 2001; 18(4):247-56.
- JOSHI MS, PONTHER JL, LANCASTER JR JR. Cellular antioxidant and pro-oxidant actions of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1999; 27(11-12):1357-66.
- KANZAKI M, WATSON RT, ARTEMYEV NO, PESSIN JE. The trimeric GTP-binding protein (G(q)/G(11)) alpha subunit is required for insulin-stimulated GLUT4 translocation in 3T3L1 adipocytes. *J Biol Chem* 2000; 275(10):7167-75.
- KEEFER LK, NIMS RW, DAVIES KM, WINK DA. "NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. *Methods Enzymol* 1996; 268:281-93.
- KELLEY KM, JOHNSON TR, ILAN J, MOSKOWITZ RW. Glucose regulation of the IGF response system in chondrocytes: induction of an IGF-I-resistant state. *Am J Physiol* 1999; 276(4 Pt 2):R1164-71.
- KELLNER K, LIEBSCH G, KLIMANT I, WOLFBEIS OS, BLUNK T, SCHULZ MB, GOPFERICH A. Determination of oxygen gradients in engineered tissue using a fluorescent sensor. *Biotechnol Bioeng* 2002; 80(1):73-83.
- KERR JF. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 1971; 105(1):13-20.
- KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4):239-57.
- KERR JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 2002; 181-182:471-4.
- KIM HA, SONG YW. Apoptotic chondrocyte death in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42(7):1528-37.
- KIM HA, LEE YJ, SEONG SC, CHOE KW, SONG YW. Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis. *J Rheumatol* 2000; 27(2):455-62.
- KIM HA, LEE KB, BAE SC. The mechanism of low-concentration sodium nitroprusside-mediated protection of chondrocyte death. *Arthritis Res Ther* 2005; 7(3):R526-35.
- KIM HA, BLANCO FJ. Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage. *Current Drug Targets* 2007; 8(2):333-45.

- KIM JJ, CONRAD HE. Kinetics of mucopolysaccharide and glycoprotein synthesis by chick embryo chondrocytes. Effect of D-glucose concentration in the culture medium. *J Biol Chem* 1976; 251(20):6210-7.
- KIM YM, TALANIAN RV, BILLIAR TR. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem* 1997; 272(49):31138-48.
- KIM YM, BOMBECK CA, BILLIAR TR. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ Res* 1999; 84(3):253-6.
- KOP'EVA TN, BEL'SKAIA OB, ASTAPENKO MG, ARUTIUNOV AG. Morphology of articular cartilage in osteoarthritis. *Arkh Patol* 1986; 48(12):40-6.
- KOSEL S, HOFHAUS G, MAASSEN A, VIEREGGE P, GRAEBER MB. Role of mitochondria in Parkinson disease. *Biol Chem* 1999; 380(7-8):865-70.
- KREBS HA. The Pasteur effect and the relations between respiration and fermentation. *Essays Biochem* 1972; 8:1-34.
- KROEMER G, ZAMZAMI N, SUSIN SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997a; 18(1):44-51.
- KROEMER G. Mitochondrial implication in apoptosis. Towards an endosymbiont hypothesis of apoptosis evolution. *Cell Death Differ* 1997b; 4(6):443-56.
- KROEMER G, REED JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000; 6(5):513-9.
- KROEMER G. Introduction: mitochondrial control of apoptosis. *Biochimie* 2002; 84(2-3):103-4.
- KROEMER G, EL-DEIRY WS, GOLSTEIN P, PETER ME, VAUX D, VANDENABEELE P, ZHIVOTOVSKY B, BLAGOSKLONNY MV, MALORNI W, KNIGHT RA, PIACENTINI M, NAGATA S, MELINO G, NOMENCLATURE COMMITTEE ON CELL DEATH. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 2005a; 12:1463-7.
- KROEMER G, MARTIN SJ. Caspase-independent cell death. *Nat Med* 2005b; 11(7):725-30.
- KUBES P, SUZUKI M, GRANGER DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(11):4651-5.
- KUHN K, LOTZ M. Mechanisms of sodium nitroprusside-induced death in human chondrocytes. *Rheumatol Int* 2003; 23(5):241-7.

- LACHAAL M, RAMPAL AL, RYU J, LEE W, HAH J, JUNG CY. Characterization and partial purification of liver glucose transporter GLUT2. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1466(1-2):379-89.
- LACZA Z, SNIPES JA, ZHANG J, HORVATH EM, FIGUEROA JP, SZABO C, BUSIJA DW. Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS. *Free Radic Biol Med* 2003; 35(10):1217-28.
- LEARY SC, HILL BC, LYONS CN, CARLSON CG, MICHAUD D, KRAFT CS, KO K, GLERUM DM, MOYES CD. Chronic treatment with azide in situ leads to an irreversible loss of cytochrome c oxidase activity via holoenzyme dissociation. *J Biol Chem* 2002; 277(13):11321-8.
- LEE RB, URBAN JP. Evidence for a negative Pasteur effect in articular cartilage. *Biochem J K* 1997; 321(1):95-102.
- LEE RB, URBAN JP. Functional replacement of oxygen by other oxidants in articular cartilage. *Arthritis Rheum* 2002; 46(12):3190-200.
- LEHNINGER AL, NELSON DL, COX MM. Principios de Bioquímica. 2ª ed. Ed. Omega 1999.
- LEIGH JP, SEAVEY W, LEISTIKOW B. Estimating the cost of job related arthritis. *J Rheumatol* 2001; 28(7):1647-54.
- LEONARD JV, SCHAPIRA AH. Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects. *Lancet* 2000; 355(9200):299-304.
- LI P, NIJHAWAN D, BUDIHardjo I, SRINIVASULA SM, AHMAD M, ALNEMRI ES, WANG X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91(4):479-89.
- LIOTÉ F, ORCEL P. Osteoarticular disorders of endocrine origin. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol* 2000; 14(2):251-76.
- LIZASOAIN I, MORO MA, KNOWLES RG, DARLEY-USMAR V, MONCADA S. Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose. *Biochem J* 1996; 314 (Pt 3):877-80.
- LOEFFLER M, KROEMER G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res* 2000; 256(1):19-26.

- LOESCH A, BELAI A, BURNSTOCK G. An ultrastructural of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthase in the perivascular nerves and vascular endothelium of the rat basilar artery. *J Neurocytol* 1994; 23(1):49-59.
- LOESER RF, SHAKOOR N. Aging or osteoarthritis: which is the problem? *Rheum Dis Clin North Am* 2003; 29(4):653-73.
- LOESER RF. Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide. *Arthritis Rheum* 2006; 54(5):1357-60.
- LÓPEZ-FARRÉ A, CAMELO C, ESTEBAN A, ALBEROLA ML, MILLÁS I, MONTÓN M, CASADO S. Effects of aspirin on platelet-neutrophil interactions. Role of nitric oxide and endothelin-1. *Circulation* 1995; 91(7):2080-8.
- LOTZ M, BLANCO FJ, VON KEMPIS J, DUDLER J, MAIER R, VILLIGER PM, GENG Y. Cytokine regulation of chondrocyte functions. *J Rheumatol Suppl* 1995; 43: 104-8.
- LOWENSTEIN CJ, DINERMAN JL, SNYDER SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994; 120(3):227-37.
- MACHEDA ML, KELLY DJ, BEST JD, ROGERS S. Expression during rat fetal development of GLUT12--a member of the class III hexose transporter family. *Anat Embryol (Berl)* 2002; 205(5-6):441-52.
- MAEDA S, MIYABAYASHI T, YAMAMOTO JK, ROBERTS GD, LEPINE AJ, CLEMMONS RM. Temporal dynamic changes in synthesis of chondroitin sulfate isomers in canine articular chondrocyte culture. *J Vet Med Sci* 2003; 65(12):1373-6.
- MAHER F, DAVIES-HILL TM, SIMPSON IA. Substrate specificity and kinetic parameters of GLUT3 in rat cerebellar granule neurons. *Biochem J* 1996; 315(Pt 3):827-31.
- MAIER R, BILBE G, REDISKE J, LOTZ M. Inducible nitric oxide synthase from human articular chondrocytes: cDNA cloning and analysis of mRNA expression. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1208(1):145-50.
- MAJNO G, JORIS I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146(1):3-15.
- MANEIRO E, FERNÁNDEZ-SUEIRO JL, TORO FJ, GALDO F, BLANCO FJ. Efecto del condroitín sulfato sobre la producción de óxido nítrico por los condrocitos humanos artrósicos. *Rev Esp Reumatol* 2001a; 28(1):12-7.
- MANEIRO E, LÓPEZ-ARMADA MJ, FERNÁNDEZ-SUEIRO JL, LEMA B, GALDO F, BLANCO FJ. Aceclofenac increases the synthesis of interleukin 1

- receptor antagonist and decreases the production of nitric oxide in human articular chondrocytes. *J Rheumatol* 2001b; 28(12):2692-9.
- MANEIRO E, MARTIN MA, DE ANDRÉS MC, LÓPEZ-ARMADA MJ, FERNÁNDEZ-SUEIRO JL, DEL HOYO P, GALDO F, ARENAS J, BLANCO FJ. Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritis human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2003; 48(3):700-8.
 - MANEIRO E, DE ANDRÉS MC, FERNÁNDEZ-SUEIRO JL, GALDO F, BLANCO FJ. The biological action of hyaluronan on human osteoarthritic articular chondrocytes: the importance of molecular weight. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22(3):307-12.
 - MANEIRO E, LOPEZ-ARMADA MJ, DE ANDRES MC, CARAMES B, MARTIN MA, BONILLA A, DEL HOYO P, GALDO F, ARENAS J, BLANCO FJ. Effect of nitric oxide on mitochondrial respiratory activity of human articular chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 2005; 64(3):388-95.
 - MANKIN HJ. The structure, chemistry and metabolism of articular cartilage. *Bull Rheum Dis* 1967;17(7):447-52.
 - MANKIN HJ, LIPPIELLO L. The glycosaminoglycans of normal and arthritic cartilage. *J Clin Invest* 1971; 50(8):1712-9.
 - MANKIN HJ. The water of articular cartilage, in Simon WH (ed). *The Human Joint in Health and Disease*. Philadelphia, PA, University of Pennsylvania Press 1978:37-42.
 - MANKIN HJ, BRANDT KD, SHULMAN LE. Workshop on etiopathogenesis of osteoarthritis: proceeding and recommendations. *J Rheumatol* 1986; 13:1127.
 - MANNICK JB, MIAO XQ, STAMLER JS. Nitric oxide inhibits Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1997; 272(39):24125-8.
 - MANSFIELD K, RAJPUROHIT R, SHAPIRO IM. Extracellular phosphate ions cause apoptosis of terminally differentiated epiphyseal chondrocytes. *J Cell Physiol* 1999; 179(3):276-86.
 - MARCUS RE. The effect of low oxygen concentration on growth glycolysis, and sulphate incorporation by articular chondrocytes in monolayer culture. *Arthritis Rheum* 1973; 16(5):646-56.
 - MARKS DS, VITA JA, FOLTS JD, KEANEY JF Jr, WELCH GN, LOSCALZO J. Inhibition of neointimal proliferation in rabbits after vascular injury by a single treatment with a protein adduct of nitric oxide. *J Clin Invest* 1995; 96(6):2630-8.

- MARTIN JA, BUCKWALTER JA. The role of chondrocyte-matrix interactions in maintaining and repairing articular cartilage. *Biorheology* 2000; 37(1-2):129-40.
- MARTIN JA, BUCKWALTER JA. Aging, articular cartilage chondrocyte senescence and osteoarthritis. *Biogerontology* 2002; 3(5):257-64.
- MASON RM, KIMURA JH, HASCALL VC. Biosynthesis of hyaluronic acid in cultures of chondrocytes from the Swarm rat chondrosarcoma. *J Biol Chem* 1982; 257(5):2236-45.
- MASON RM, SPENCER CA, PALMER NT. Chondrocyte energy metabolism and its modulation by iodoacetate and diclofenac. In: Moskowitz R, Hirorata K, editors. Diclofenac (Voltaren) and cartilage in osteoarthritis. Toronto: Hogrefe and Huber; 1989:33-41.
- MATSUO M, NISHIDA K, YOSHIDA A, MURAKAMI T, INOUE H. Expression of caspase-3 and -9 relevant to cartilage destruction and chondrocyte apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Acta Med Okayama* 2001; 55(6):333-40.
- MAUCH C, KRIEG T, BAUER EA. Role of the extracellular matrix in the degradation of connective tissue. *Arch Dermatol Res* 1994; 287(1):107-14.
- McALINDON TE, LAVALLEY MP, GULIN JP, FELSON DT. Glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis: a systematic quality assessment and meta-analysis. *JAMA* 2000; 283(11):1469-75.
- McKIBBIN B, HOLDSWORTH FW. The nutrition of immature joint cartilage in the lamb. *J Bone Joint Surg Br* 1966; 48(4):793-803.
- MELINO G, BERNASSOLA F, KNIGHT RA, CORASANITI MT, NISTICO G, FINAZZI-AGRO A. S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature* 1997; 388(6641):432-3.
- MELINO G, BERNASSOLA F, CATANI MV, ROSSI A, CORAZZARI M, SABATINI S, VILBOIS F, GREEN DR. Nitric oxide inhibits apoptosis via AP-1-dependent CD95L transactivation. *Cancer Res* 2000; 60(9):2377-83.
- MESSMER UK, REED UK, BRUNE B. Bcl-2 protects macrophages from nitric oxide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1996; 271(33):20192-7.
- MIGNOTTE F, CHAMPAGNE AM, FROGER-GAILLARD B, BENEL L, GUERIDE M, ADOLPHE M, MOUNOLOU JC. Mitochondrial biogenesis in rabbit articular chondrocytes transferred to culture. *Boil Cell* 1991; 71(1-2):67-72.

- MOBASHERI A, NEAMA G, BELL S, RICHARDSON S, CARTER SD. Human articular chondrocytes express three facilitative glucose transporter isoforms: GLUT1, GLUT3 and GLUT9. *Cell Biol Int* 2002a; 26(3):297-300.
- MOBASHERI A, VANUCCI SJ, BONDY CA, CARTER SD, INNES JF, ARTEAGA MF, TRUJILLO E, FERRAZ I, SHAKIBAERI M, MARTIN-VASALLO P. Glucose transport and metabolism in chondrocytes: a key to understanding chondrogenesis, skeletal development and cartilage degradation in osteoarthritis. *Histol Histopathol* 2002b; 17(4):1239-67.
- MOBASHERI A, DOBSON H, MASON SL, CULLINGHAM F, SHAKIBAERI M, MOLEY JF, MOLEY KH. Expression of the GLUT1 and GLUT9 facilitative glucose transporters in embryonic chondroblast and mature chondrocytes in ovine articular cartilage. *Cell Biol Int* 2005; 29(4):249-60.
- MOBASHERI A, PLATT N, THORPE C, SHAKIBAERI M. Regulation of 2-deoxy-D-glucose transport, lactate metabolism, and MMP-2 secretion by the hypoxia mimetic cobalt chloride in articular chondrocytes. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1091:83-93.
- MOHR S, ZECH B, LAPETINA EG, BRUNE B. Inhibition of caspase-3 by S-nitrosation and oxidation causes by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 238(2):387-91.
- MONCADA S, PALMER RM, HIGGS EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43(2):109-42.
- MONCADA S, ERUSALIMSKY JD. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3(3):214-20.
- MORA S, PESSIN JE. The MEF2A isoform is required for striated muscle-specific expression of the insulin-responsive GLUT4 glucose transporter. *J Biol Chem* 2000; 275(21):16323-8.
- MORALES TI, HASCALL VC. Factors involved in the regulation of proteoglycan metabolism in articular cartilage. *Arthritis Rheum* 1989; 32(10):1197-201.
- MORALES TI. The role of signalling factors in articular cartilage homeostasis and osteoarthritis, in Kuettner KE, Goldberg VM (eds). *Osteoarthritic Disorders*. Rosemont, IL, American Academy of Orthopaedic Surgeons 1995:261-70.
- MORISHIMA N, NAKANISHI K, TAKENOUCI H, SHIBATA T, YASUHIKO Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis.

- Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 2002; 277(37):34287-94.
- MORIYA R, UEHARA T, NOMURA Y. Mechanism of nitric oxide-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *FEBS Lett* 2000; 484(3):253-60.
 - MOW VC, ROSENWASSER MP. Articular cartilage: Biomechanics, in Woo SL, Buckwalter JA (eds). *Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues*. Park Ridge, IL, American Academy of Orthopaedic Surgeons 1988:427-63.
 - MOW VC, SETTON LA, GUILAK F, RATCLIFFE A. Mechanical factors in articular cartilage and their role in osteoarthritis, in Kuettner KE, Goldberg VM (eds). *Osteoarthritic Disorders*. Rosemont, IL, American Academy of Orthopaedic Surgeons 1995:147-71.
 - MUECKLER M. Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* 1994; 219(3):713-25.
 - MUECKLER M, HRESKO RC, SATO M. Structure, function and biosynthesis of GLUT1. *Biochem Soc Trans* 1997; 25(3):951-4.
 - MUIR H. The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *Bioessays* 1995; 17(12):1039-48.
 - MURPHY AN, FISKUM G, BEAL MF. Mitochondria in neurodegeneration: bioenergetic function in cell life and death. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19(3):231-45.
 - MURRELL GA, JANG D, WILLIAMS RJ. Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 206(1):15-21.
 - NAGAMUNE H, FUKUSHIMA Y, TAKADA J, YOSHIDA K, UNAMI A, SHIMOOKA T, TERADA H. The lipophilic weak base (Z)-5-methyl-2-[2-(1-naphthyl)ethenyl]-4-piperidinopyridine (AU-1421) is a potent protonophore type cationic uncoupler of oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1141(2-3):231-7.
 - NAGATA S, NAGASE H, KAWANE K, MUKAE N, FUKUYAMA H. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ* 2003; 10(1):108-16.
 - NAHIR AM. Aerobic glycolysis: a study of human articular cartilage. *Cell Biochem Funct* 1987; 5(2):109-12.

- NAKAGAWA T, ZHU H, MORISHIMA N, LI E, XU J, YANKNER BA, YUAN J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000; 403(6765):98-103.
- NEWSHOLME EA, LEECH AR. *Biochemistry for the Medical Sciences*. New York, NY: John Wiley & Sons; 1984.
- NICOTERA P, LEIST M, FERRANDO-MAY E. Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett* 1998; 102-103:139-42.
- NICOTERA P, LEIST M, FERRANDO-MAY E. Apoptosis and necrosis: different execution of the same death. *Biochem Soc Symp* 1999; 66:69-73.
- NOTOYA K, JOVANOVIC DV, REBOUL P, MARTEL-PELLETIER J, MINEAU F, PELLETIER JP. The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E2 via the induction of cyclooxygenase-2. *J Immunol* 2000; 165(6):3402-10.
- OEGEMA TR Jr, THOMPSON RC Jr. Articular Cartilage Biochemistry, in Kuettner KE, Schleyerbach R, Hascall VS (eds.) *Raven Press*, NY 1986:257-271.
- OEGEMA TR, THOMPSON RC. Histopathology and pathobiochemistry of the cartilage-bone interface in osteoarthritis, in Kuettner KE, Goldberg VM (eds): *Osteoarthritic Disorders*. Rosemont, IL, American Academy of Orthopaedic Surgeons 1995:205-17.
- OGATA K, WHITESIDE LA. 1980 Volvo award winner in basic science. Nutritional pathways of the intervertebral disc. An experimental study using hydrogen washout technique. *Spine* 1981; 6(3):211-6.
- OGURA T, TATEMACHI M, ESUMI H. Nitric oxide inhibits CPP32-like activity under redox regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236(2):365-9.
- OHARA H, TAMAYAMA T, MAEMURA K, KANBARA K, HAYASAKI H, ABE M, WATANABE M. Immunocytochemical demonstration of glucose transporters in epiphyseal growth plate chondrocytes of young rats in correlation with autoradiographic distribution of 2-deoxyglucose in chondrocytes of mice. *Acta Histochem* 2001; 103(4):365-78.
- OKADA H, MAK TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(8):592-603.
- OKMA-KEULEN P, HOPMAN-ROCK M. The onset of generalized osteoarthritis in older women: a qualitative approach. *Arthritis Rheum* 2001; 45(2):183-90.

- OLSON LE, MERKER MP, PATEL MK, BONGARD RD, DAUM JM, JOHNS RA, DAWSON CA. Cyanide increases reduction but decreases sequestration of methylene blue by endothelial cells. *Ann Biomed Eng* 2000; 28(1):85-93.
- OTTE P. Basic cell metabolism of articular cartilage. Manometric studies. *Z Rheumatol* 1991; 50(5):304-12.
- PALMER RM, FERRIGE AG, MONCADA S. Nitric oxide release for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327(6122):524-6.
- PALMER RM, ANDREWS T, FOXWELL NA, MONCADA S. Glucocorticoids do not affect the induction of a novel calcium-dependent nitric oxide synthase in rabbit chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 188(1):209-15.
- PANTALEON M, KAYE PL. Glucose transporters in preimplantation development. *Rev Reprod* 1998; 3(2):77-81.
- PANTALEON M, RYAN JP, GIL M, KAYE PL. An unusual subcellular localization of GLUT1 and link with metabolism in oocytes and preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* 2001; 64(4):1247-54.
- PAQUET P, PIERARD GE. Toxic epidermal necrolysis: revisiting the tentative link between early apoptosis and late necrosis (review): *Int J Mol Med* 2007; 19(1):3-10.
- PARONE PA, JAMES D, MARTINOUC JC. Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie* 2002; 84(2-3):105-11.
- PEARCE LL, KANAI AJ, BIRDER LA, PITT BR, PETERSON J. The catabolic fate of nitric oxide: the nitric oxide oxidase and peroxynitrite reductase activities of cytochrome oxidase. *J Biol Chem* 2002; 277(16):13556-62.
- PELLETIER JP, DIBATTISTA JA, ROUGHLEY P, MCCOLLUM R, MARTEL-PELLETIER J. Cytokines and inflammation in cartilage degradation. *Rheum Dis Clin North Am* 1993; 19(3):545-68.
- PELLETIER JP, MINEAU F, RANGER P, TARDIF G, MARTEL-PELLETIER J. The increased synthesis of inducible nitric oxide inhibits IL-1ra synthesis by human articular chondrocytes: possible role in osteoarthritic cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 1996; 4(1):77-84.
- PETIT PX, LECOEUR H, ZORN E, DAUQUET C, MIGNOTTE B, GOUGEON ML. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol* 1995; 130(1):157-67.

- PETIT PX, ZAMZAMI N, VAYSSIERE JL, MIGNOTTE B, KROEMER G, CASTEDO M. Implication of mitochondria in apoptosis. *Mol Cell Biochem* 1997; 174(1-2):185-8.
- PETTERSEN I, FIGENSCHAU Y, OLSEN E, BAKKELUND W, SMEDSROD B, SVEINBJORNSSON B. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces apoptosis in human articular chondrocytes *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296(3):671-6.
- PETTIPHER ER, HIGGS GA, HENDERSON B. Interleukin 1 induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83(22):8749-53.
- PHAY JE, HUSSAIN HB, MOLEY JF. Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9). *Genomics* 2000; 66(2):217-20.
- PHILLIPS T, FERRAZ I, BELL S, CLEGG PD, CARTER SD, MOBASHERI A. Differential regulation of the GLUT1 and GLUT3 glucose transporters by growth factors and pro-inflammatory cytokines in equine articular chondrocytes. *Vet J* 2005; 169(2):216-22.
- PIETROBON D, AZZONE GF, WALZ D. Effect of funiculosin and antimycin A on the redox-drive H⁺-pumps in mitochondria: on the nature of "leaks". *Eur J Biochem* 1981; 117(2):389-94.
- POOLE AR. Imbalances of anabolism and catabolism of cartilage matrix components in osteoarthritis, in Kuettner KE, Goldberg VM (eds). *Osteoarthritic Disorders*. Rosemont, IL, *American Academy of Orthopaedic Surgeons* 1995:247-60.
- PRITZKER KP, GAY S, JIMÉNEZ SA, OSTERGAARD K, PELLETIER JP, REVELL PA, SALTER D, VAN DEN BERG WB. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14(1):13-29.
- RADI R. Reactions of nitric oxide with metalloproteins. *Chem Res Toxicol* 1996; 9(5):828-35.
- RADOMSKI MW, PALMER RM, MONCADA S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987; 2(8567):1057-8.
- RAJPUROHIT R, RISBUD MV, DUCHEYNE P, VRESILOVIC EJ, SHAPIRO IM. Phenotypic characteristics of the nucleus pulposus: expression of hypoxia inducing factor-1, glucose transporter-1 and MMP-2. *Cell Tissue Res* 2002; 308(3):401-7.

- RAUCHMAN MI, WASSERMAN JC, COHEN DM, PERKINS DL, HEBERT SC, MILFORD E, GULLANS SR. Expression of GLUT-2 cDNA in human B lymphocytes: analysis of glucose transport using flow cytometry. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1111(2):231-8.
- REDISKE JJ, KOEHNE CF, ZHANG B, LOTZ M. The inducible production of nitric oxide by articular cell types. *Osteoarthritis Cartilage* 1994; 2(3):199-206.
- REGINSTER JY. The prevalence and burden of arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2002; 41 Supp 1:3-6.
- RICHARDSON S, NEAMA G, PHILLIPS T, BELL S, CARTER SD, MOLEY KH, MOLEY JF, VANUCCI SJ, MOBASHERI A. Molecular characterization and partial cDNA cloning of facilitative glucose transporters expressed in human articular chondrocytes; stimulation of 2-deoxyglucose uptake by IGF-I and elevated MMP-2 secretion by glucose deprivation. *Osteoarthritis Cartilage* 2003; 11(2):92-101.
- RICHTER C, SCHWEIZER M, COSSARIZZA A, FRANCESCHI C. Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS Lett* 1996; 378(2):107-10.
- ROACH HI, CLARKE NM. "Cell paralysis" as an intermediate stage in the programmed cell death of epiphyseal chondrocytes during development. *J Bone Miner Res* 1999; 14(8):1367-78.
- ROACH HI, CLARKE NM. Physiological cell death of chondrocytes *in vivo* is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate. *J Bone Joint Surg Br* 2000; 82(4):601-13.
- ROACH HI, AIGNER T, KOURI JB. Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes? *Apoptosis* 2004; 9(3):265-77.
- ROBERTS ED, ZEMAN DH, MIWA T, SHOJE H. Morphometric evaluation of rhesus articular cartilage: correlation of hexosamine and ³⁵SO₄ = incorporation. *Vet Pathol* 1989; 26(4):309-13.
- ROGERS S, MACHEDA ML, DOCHERTY SE, CARTY MD, HENDERSON MA, SOELLER WC, GIBBS EM, JAMES DE, BEST JD. Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 282(3):E733-8.
- ROSENBERG PA, LI Y, ALI S, ALTIOK N, BACK SA, VOLPE JJ. Intracellular redox state determines whether nitric oxide is toxic or protective to rat oligodendrocytes in culture. *J Neurochem* 1999; 73(2):476-84.

- ROSENBLOOM AL, SILVERSTEIN JH. Connective tissue and joint disease in diabetes mellitus. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1996; 25(2):473-83.
- ROTH V, MOW VC. The intrinsic tensile behaviour of the matrix of bovine articular cartilage and its variation with age. *J Bone Joint Surg Am* 1980; 62(7):1102-17.
- ROUGHLEY PJ, WHITE RJ. Age-related changes in the structure of the proteoglycan subunits from human articular cartilage. *J Biol Chem* 1980; 255(1):217-24.
- RUMSEY SC, KWON O, XU GW, BURANT CF, SIMPSON I, LEVINE M. Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. *J Biol Chem* 1997; 272(30):18982-9.
- SAMPSON HW, CANNON MS. Zonal analysis of metabolic profiles of articular-epiphyseal cartilage chondrocytes: a histochemical study. *Histochem J* 1986; 18(5):233-8.
- SANDELL LJ, DANIEL JC. Effects of ascorbic acid on collagen mRNA levels in short term chondrocyte cultures. *Connect Tissue Res* 1988; 17(1):11-22.
- SANDELL LJ. Anabolic factors in degenerative joint disease. *Curr Drug Targets* 2007; 8(2):359-65.
- SANTALUCÍA T, CAMPS M, CASTELLO A, MUNOZ P, NUEL A, TESTAR X, PALACIN M, ZOEZANO A. Developmental regulation of GLT-1 (erythroid/Hep G2) and GLUT-4 (muscle/fat) glucose transporter expression in rat heart, skeletal muscle, and brown adipose tissue. *Endocrinology* 1992; 130(2):837-46.
- SCHILLER AL. Pathology of osteoarthritis, in Kuettner KE, Goldberg VM (eds). *Osteoarthritic disorders*. Rosemont, IL, *American Academy of Orthopaedic Surgeons* 1995:5-12.
- SCHWARTZ LM, SMITH SW, JONES ME, OSBORNE BA. Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(3):980-4.
- SCHWARTZ LM, OSBORNE BA. In *Cell Death*, (Schwartz LM and Osborne BA), *Academic Press*, San Diego 1995:xv.
- SHIKHMAN AR, KUHN K, ALAAEDDINE N, LOTZ M. N-acetylglucosamine prevents IL-1 beta-mediated activation of human chondrocytes. *J Immunol* 2001a; 166(8):5155-60.

- SHIKHMAN AR, BRINSON DC, VALBRACHT J, LOTZ MK. Cytokine regulation of facilitated glucose transport in human articular chondrocytes. *J Immunol* 2001b; 167(12):7001-8.
- SHIKHMAN AR, BRINSON DC, LOTZ MK. Distinct pathways regulate facilitated glucose transport in human articular chondrocytes during anabolic and catabolic responses. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 286(6):E980-5.
- SHULZ R. La familia de las enzimas sintetizadoras del óxido nítrico. En: P. López-Jaramillo, editor. Ediciones científicas. La vía L-arginica óxido nítrico: de su descubrimiento a sus aplicaciones clínicas. Quito, 1995:23-50.
- SILVER IA. Measurement of pH and ionic composition of pericellular sites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1975; 271(912):261-72.
- SIMON LS. Osteoarthritis: a review. *Clin Cornerstone* 1999; 2(2):26-37.
- SORBARA LR, DAVIES-HILL TM, KOEHLER-STEEN EM, VANNUCCI SJ, HORNE MK, SIMPSON IA. Thrombin-induced translocation of GLUT3 transporters in human platelets. *Biochem J* 1997; 328(Pt 2):511-6.
- SPECTOR TD, HOCHBERG MC. Methodological problems in the epidemiological study of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1994; 53(2):143-6.
- SPENCER CA, PALMER TN, MASON RM. Intermediary metabolism in the Swarm rat chondrosarcoma chondrocyte. *Biochem J* 1990; 265(3):911-4.
- SPERANDIO S, DE BELLE I, BREDESEN DE. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(26):14376-81.
- STADLER J, STEFANOVIC-RACIC M, BILLIAR TR, CURRAN RD, McINTYRE LA, GEORGESCU HI, SIMMONS RL, EVANS CH. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J Immunol* 1991; 147(11):3915-20.
- STEFANOVIC-RACIC M, MORALES TI, TASKIRAN D, McINTYRE LA, EVANS CH. The role of nitric oxide in proteoglycan turnover by bovine articular cartilage organ cultures. *J Immunol* 1996; 156(3):1213-20.
- STEVENS A, LOWE J. Anatomía Patológica. 2ª ed. Harcourt. Madrid. 2001.
- STOCKWELL RA. The interrelationship of cell density and cartilage thickness in mammalian articular cartilage. *J Anat* 1971; 109(Pt 3):411-21.
- STOCKWELL RA. Biology of cartilage cells. *Cambridge University Press*, Cambridge 1979:81-5.

- STOCKWELL RA. Metabolism of cartilage. In: Hall BK, editor. Cartilage: molecular aspects. New York: *Academic Press* 1983; 253-80.
- STUDER RK, LEVICOFF E, GEORGESCU H, MILLER L, JAFFURS D, EVANS CH. Nitric oxide inhibits chondrocyte response to IGF-I: inhibition of IGF-IRbeta tyrosine phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279(4):C961-9.
- STUPACK DG, CHERESH DA. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci* 2002; 115(Pt 19):3729-38.
- SWEENEY C, MACKINTOSH D, MASON RM. UDP-sugar metabolism in Swarm rat chondrosarcoma chondrocytes. *Biochem J* 1993; 290 (Pt 2):563-70.
- SWEET IR, MATSCHINSKY FM. Are there advantages of GLUT2 in pancreatic glucose sensing? *Diabetologia* 1997; 40(1):112-9.
- TAKUMA K, PHUAGPHONG P, LEE E, ENOMOTO R, MORI K, BABA A, MATSUDA T. The nitric oxide donor NOC12 protects cultured astrocytes against apoptosis via a cGMP-dependent mechanism. *Jpn J Pharmacol* 2002; 89(1):64-71.
- TASKIRAN D, STEFANOVIC-RACIC M, GEORGESCU H, EVANS C. Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200(1):142-8.
- TAYLOR EL, MEGSON IL, HASLETT C, ROSSI AG. Nitric oxide: a key regulator of myeloid inflammatory cell apoptosis. *Cell Death Differ* 2003; 10(4):418-30.
- TEIXEIRA CC, MANSFIELD K, HERTKORN C, ISCHIROPOULOS H, SHAPIRO IM. Phosphate-induced chondrocyte apoptosis is linked to nitric oxide generation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281(3):C833-9.
- TERKELTAUB R, JOHNSON K, MURPHY A, GHOSH S. Invited review: the mitochondrion in osteoarthritis. *Mitochondrion* 2002; (4):301-19.
- THIPPESWAMY T, MCKAY JS, MORRIS R. Bax and caspases are inhibited by endogenous nitric oxide in dorsal root ganglion neurons *in vitro*. *Eur J Neurosci* 2001; 14(8):1229-36.
- THIPPESWAMY T, MCKAY JS, QUINN JP, MORRIS R. Nitric oxide, a biological double-faced janus--is this good or bad?. *Histol Histopathol* 2006; 21(4):445-58.
- THONAR EJ, MASUDA K, MANICOURT DH, KUETTNER KE. Structure and function of normal human articular cartilage. En: Reginster JY, Pelletier JP, Martell-

- Pelletier J, Henrotin Y, directores. *Osteoarthritis, clinical and experimental aspects*. Berlin: Springer 1999:1-19.
- TOMITA M, SATO EF, NISHIKAWA M, YAMANO Y, INOUE M. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and functions of articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2001; 44(1):96-104.
 - TRIPPEL SB. Growth factor actions on articular cartilage. *JRheumatol Suppl* 1995; 43:129-32.
 - TSCHAN T, HOERLER I, HOUZE Y, WINTERHALTER KH, RICHTER C, BRUCKNER P. Resting chondrocytes in culture survive without growth factors, but are sensitive to toxic oxygen metabolites. *J Cell Biol* 1990; 111(1):257-60.
 - UEHARA T, KIKUCHI Y, NOMURA Y. Caspase activation accompanying cytochrome c release from mitochondria is possibly involved in nitric oxide-induced neuronal apoptosis in SH-SY5Y cells. *J Neurochem* 1999; 72(1):196-205.
 - URBAN JP, BAYLISS MT. Regulation of proteoglycan synthesis rate in cartilage *in vitro*: influence of extracellular ionic composition. *Biochim Biophys Acta* 1989; 992(1):59-65.
 - VAN DEN BERG WB. Growth factor in experimental osteoarthritis: transforming growth factor beta pathogenic? *J Rheumatol Suppl* 1995; 43:143-5.
 - VAN DEN BERG WB, VAN DER KRAAN PM, VAN BEUNINGEN HM. Role of Growth Factors and Cartilage Repair. En: Reginster JY, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Henrotin Y, editores. *Osteoarthritis, Clinical and Experimental Aspects*. Berlín: Springer 1999; 188-209.
 - VANDER HEIDEN MG, CHANDEL NS, LI XX, SCHUMACKER PT, COLOMBINI M, THOMPSON CB. Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. *Proc Natl Acad USA* 2000; 97(9):4666-71.
 - VANNUCCI SJ, RUTHERFORD T, WILKIE MB, SIMPSON IA, LAUDER JM. Prenatal expression of the GLUT4 glucose transporter in the mouse. *Dev Neurosci* 2000; 22(4):274-82.
 - VAYSSIÈRE JL, PETIT PX, RISLER Y, MIGNOTTE B. Commitment to apoptosis is associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cell lines conditionally immortalized with simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(24):11752-6.

- VERCAMMEN D, BEYAERT R, DENECKER G, GOOSSENS V, VAN LOO G, DECLERCQ W, GROOTEN J, FIERS W, VANDENABEELE P. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1998; 187(9):1477-85.
- VERZIIL N, DEGROOT J, BEN ZC, BRAU-BENJAMIN O, MAROUDAS A, BANK RA, MIZRAHI J, SCHALKWIJK CG, THORPE SR, BAYNES JW, BIJLSMA JW, LAFEVER FP, TEKOPPELE JM. Crosslinking by advanced glycation end products increases the stiffness of the collagen network in human articular cartilage: a possible mechanism through which age is a risk factor for osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46(1):114-23.
- VIEIRA H, KROEMER G. Mitochondria as targets of apoptosis regulation by nitric oxide. *IUBMB Life* 2003; 55(10-11):613-6.
- VIGNON E, ARLOT M, PATRICOT LM, VIGNON G. The cell density femoral head cartilage. *Clin Orthop Relat Res* 1976; (121):303-8.
- WANG J, ZHOU J, BONDY CA. Igf1 promotes longitudinal bone growth by insulin-like actions augmenting chondrocyte hypertrophy. *FASEB J* 1999; 13(14):1985-90.
- WHITE KA, MARLETTA MA. Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry* 1992; 31(29):6627-31.
- WILKINS RJ, WINDHABER RAJ, BROWNING JA. Characterisation of glucose uptake by isolated bovine articular chondrocytes. *J Physiology-London* 2002; 539:8P-9P.
- WINK DA, COOK JA, PACELLI R, DEGRAFF W, GAMSON J, LIEBMANN J, KRISHNA MC, MITCHELL JB. The effect of various nitric oxide-donor agents on hydrogen peroxide-mediated toxicity: a direct correlation between nitric oxide formation and protection. *Arch Biochem Biophys* 1996; 331(2):241-8.
- WOO SL, BUCKWALTER JA. AAOS/NIH/ORS workshop. Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues. Savannah, Georgia, June 18-20, 1987. *J Orthop Res* 1988; 6(6):907-31.
- WOOD IS, TRAYHURN P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* 2003; 89(1):3-9.
- WYLLIE AH, KERR JF, CURRIE AR. Cell death in the normal neonatal rat adrenal cortex. *J Pathol* 1973; 111(4):255-61.

- YAMAMOTO T, GAY CV. Ultrastructural analysis of cytochrome oxidase in chick epiphyseal growth plate cartilage. *J Histochem Cytochem* 1988; 36(9):1161-6.
- YANG J, LIU X, BHALLA K, KIM CN, IBRADO AM, CAI J, PENG TI, JONES DP, WANG X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; 275(5303):1129-32.
- YOUNG B, HEATH JW. Histología funcional. Texto y atlas en color. Ed. Harcourt, Madrid 2000:172-5.
- YUYAMA K, YAMAMOTO H, NISHIZAKI I, KATO T, SORA I, YAMAMOTO T. Caspase-independent cell death by low concentration of nitric oxide in PC12 cells: involvement of cytochrome C oxidase inhibition and the production of reactive oxygen species in mitochondria. *J Neurosci Res* 2003; 73(3):351-63.
- ZAKERI Z, BURSCH W, TENNISWOOD M, LOCKSHIN RA. Cell death: programmed, apoptosis, necrosis, or other? *Cell Death Differ* 1995; 2(2):87-96.
- ZAMZAMI N, MARCHETTI P, CASTADE M, ZANIN C, VAYSSIÈRE JL, PETIT PX, KROEMER G. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death *in vivo*. *J Exp Med* 1995; 181(5):1661-72.
- ZAMZAMI N, HIRSCH T, DALLAPORTA B, PETIT PX, KROEMER G. Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. *J Bioenerg Biomembr* 1997; 29(2):185-93.
- ZAMZAMI N, LAROCLETTE N, KROEMER G. Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ* 2005; 12 Suppl 2:1478-80.
- ZECH B, KOHL R, VON KNETHEN A, BRUNE B. Nitric oxide donors inhibit formation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome and activation of caspases. *Biochem J* 2003; 371(Pt 3):1055-64.
- ZENMYO M, KOMIYA S, KAWABATA R, SASAGURI Y, INOUE A, MORIMATSU M. Morphological and biochemical evidence for apoptosis in the terminal hypertrophic chondrocytes of the growth plate. *J Pathol.* 1996; 180(4):430-3.
- ZHANG JZ, ISMAIL-BEIGI F. Activation of Glut1 glucose transporter in human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 1998; 356(1):86-92.
- ZONG WX, THOMPSON CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev* 2006; 20(1):1-15.

PÁGINAS WEB:

- <http://bifi.unizar.es>
- <http://escuela.med.puc.cl>
- <http://fai.unne.edu.ar>
- <http://www.afh.bio.br>
- <http://www.artritisylupus.com>
- <http://www.biooncology.com>
- <http://www.colvet.es>
- <http://www.sigma-aldrich.com>
- <http://www.universalprobelibrary.com>

VIII. ABREVIATURAS

$\Delta\Psi_m$: potencial de membrana mitocondrial

ΔpH : gradiente químico

': minutos

μCi : microcurie

μl : microlitro

μM : micromolar

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADP: adenosín difosfato

AINE: antiinflamatorios no esteroideos

ANT: adenina nucleótido translocasa

Apaf-1: apoptosis protease-activating factor-1

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ATP: adenosín trifosfato

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

BMPs: proteínas morfogenéticas derivadas del hueso

BSA: seroalbúmina bovina

Ca^{+2} : ión calcio

CADV: canal de aniones dependiente de voltaje

COL: colágeno

COX: enzima ciclooxigenasa

COX-1: enzima ciclooxigenasa constitutiva

COX-2: enzima ciclooxigenasa inducible

CRM: cadena respiratoria mitocondrial

CS: citrato sintasa

Cyt c: citocromo c

DAF-FM diacetato: *4-Amino-5methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetato*

DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorohidrato

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO: dimetil sulfóxido

DT: desviación típica

eNOS: isoforma de la óxido nítrico sintasa variedad endotelial

FAD: flavín adenina nucleótido
FADD: *fas associated protein with death domain*
FADH₂: forma reducida del dinucleótido de flavina y adenina
FMN: flavín mononucleótido
GAG: glucosaminoglicanos
GLUTs: *glucosa transporters*
GMPc: guanosina monofosfato cíclica
GSH: enzima glutatión peroxidasa
GTP: guanosina trifosfato
h: hora
H₂O₂: agua oxigenada
HPRT: *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*
IGF: *insulin growth factor*
IL: interleuquinas
IL-1ra: receptor antagonista de la IL-1
iNOS: isoforma de la óxido nítrico sintasa variedad macrofágica o citoquina-inducible
IP: yoduro de propidio
JC-1: 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'tetraetilbenzimidazolilcarbocianina iodada
MEC: matriz extracelular
MET: microscopia electrónica de transmisión
mg: miligramo
ml: mililitro
mM: milimolar
MOPS: *acide N-morpholino-3-propane sulfonique*
mtNOS: isoforma de la óxido nítrico sintasa variedad mitocondrial
N₂O₃: trióxido de dinitrógeno
NAD⁺: forma oxidada de la nicotinamida adenina dinucleótido
NADH: nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaN₃: azida sódica
nm: nanómetro
nNOS: isoforma de la óxido nítrico sintasa variedad neuronal
NO: óxido nítrico
NO₂⁻: nitritos

NOC-12: N-Etil-2-(1-etil-2-hidroxi-2-nitrosohidrazino) etanamina
NOC-5: 3-[2-hidroxi-1-(metiletil)-2-nitrosohidrazino]-1-propanamina
NOC-7: 3-(2-hydroxy-1-methyl-2-nitroso-hydrazino)-N-methyl-1-propanamine
NOS: óxido nítrico sintasa
NPA: ácido 3-nitropropiónico
O₂: oxígeno molecular
O₂⁻: radical superóxido
OA: artrosis
°C: grados centígrados
OH: radical hidroxilo
Oil-Red-O: 1-[2,5-dimetilfenilazo]-2-naftol
ONOO⁻: peroxinitrito
PBS: tampón fosfato salino
PCD: muerte celular programada
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PG: proteoglicanos
Pi: fosfato inorgánico
PPT: complejo del poro de permeabilidad transitoria
RNS: especies reactivas de nitrógeno
ROS: especies reactivas de oxígeno
RT: retrotranscripción
SBF: suero bovino fetal
SGLT: *sodium-glucose transporters*
SLC2A: gen del transportador de azúcares
SNP: nitroprusiato sódico
SOD: enzima superóxido dismutasa
T^a amb: temperatura ambiente
TNA: traslocador de nucleótidos de adenosina
TNF-α: factor de necrosis tumoral
TUNEL: *TdT-mediated dUTP-biotin nick and labelling method*
UV: luz ultravioleta
x g: fuerza centrífuga relativa

