

# EL SULFURO DE HIDRÓGENO COMO DIANA TERAPÉUTICA EN LA ARTROSIS

Ángela Vela Anero

---

TESIS DOCTORAL UDC / 2015

**Directoras:**

Rosa Meijide Faílde

Elena Fernández Burguera

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



**Dña. Rosa Meijide Faílde**, Catedrática E.U. del Departamento de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de A Coruña y **Dña. Elena Fernández Burguera**, investigadora post-doctoral del CIBER-BBN y del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC).

**CERTIFICAN:**

Que Dña. **Ángela Vela Anero**, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo: **“EL SULFURO DE HIDRÓGENO COMO DIANA TERAPÉUTICA EN LA ARTROSIS”**.

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

Dña. Rosa Meijide Faílde

Dña. Elena Fernández Burguera

En A Coruña, 3 de Marzo de 2015





A mis padres

A mi familia

A Marcos





## **AGRADECIMIENTOS**

Aunque parezca paradójico tengo que empezar agradeciendo esta tesis a muchos desconocidos. Desconocidos que por el bien de los demás han mirado más allá de sus propios problemas y han sabido que darle a la investigación algo de sí mismos es ofrecer esperanza y posibilidades al resto del mundo. Gracias a todos los donantes.

Para continuar, gracias al Dr. Francisco J. Blanco, que me abrió las puertas de su laboratorio. A mis directoras de tesis la Dra. Rosa Mejjide que confió en mí el llevar a buen puerto algo sobre lo que sabía tan poco cuando nos conocimos y la Dra. Elena Fernández Burguera, por el tiempo invertido, los documentos perdidos y por su paciencia. Gracias por su dedicación y apoyo durante todo este tiempo

A la universidad de A Coruña y a la Deputación de A Coruña, por haberme dado los recursos necesarios para seguir adelante.

En este punto podría resumir, agrupar a las personas y agradecerles su trabajo y su apoyo, pero no quiero que aquellos que están entre cada línea de esta tesis no tengan, al menos, su propia línea.

Nada habría sido lo mismo sin Tamara, sin su energía. En estos años te has convertido en alguien especial para mí. Has sido la experiencia, el apoyo, y la amiga. Has sido la voz que te enseña el camino. Has sido lo que siempre serás, la mejor persona que conozco.

A Mariajo, porque aún no la he oído decirme que no a nada, porque sin su trabajo y su ayuda esta tesis no existiría.

A Emma, por su inagotable energía, y porque desde lejos, tu fuerza ha seguido llegando a la silla que dejaste.

A Joana, por ser mi duende tantas tardes, por regañarme cuando lo necesitaba, por enseñarme que mis fallos sólo eran la excusa que necesitaba para ser mejor.

A Lucía, por su inestimable ayuda, porque tú también le has echado horas a esta tesis y aun así jamás se te ha borrado la sonrisa.

A Clara, porque tus susurros esconden una persona llena de energía y tu presencia es como un claro en un cielo tormentoso.

A Nacho, pocos a tu altura han sabido escuchar cada una de mis dudas con tu filosofía, resolverlas con paciencia y enseñarme con maestría.

A Noa, por estar siempre ahí, pasando tempestades sin hundirse nunca. Estás en cada línea de esta tesis.

A Pury, por saber ver siempre más allá, por sacarnos de nuestro mundo confortable para que aprendamos a ser mejores.

Al Dr. José Luis Fernández-Sueiro, que nos dejó por el camino. Por darse cuenta de mis ganas de aprender y darme la oportunidad de hacerlo.

Y por supuesto, no me olvidaré de toda la gente que me ha enseñado tanto: Al grupo de genómica; A María Eugenia, Estefa, Ángel, Juan, Merce y Sara por su paciencia y toda la ayuda que me han dado. A todo el grupo de inflamación, por echarme una mano siempre que me hacía falta. A Bea, Lucia, Carolina, Valentina y a todo el grupo de proteómica por resolver siempre mis dudas.

Y por último, aunque nunca menos importante...

Gracias a mis padres, porque me lo han dado todo, porque siempre han estado a mi lado incluso en la distancia, queriéndome sin condiciones. A Marcos, por aguantar mis ausencias, mi estrés y recordarme mirar al mar de vez en cuando. A mi familia, la mejor familia que podría tener, inmensa e imperfecta. Sois perfectos.

A mis niñas, Ale, Chiqui, Claudía y Cova porque a pesar de la distancia, a pesar del tiempo, siempre consiguen hacer que todo sea como siempre.

Y, por supuesto. Gracias a Marian, por tantos y tantos años, para ti harían falta páginas enteras, pero tú lo sabes, así que, simplemente, gracias.

Tampoco puedo olvidar a mi familia de Puerta de Hierro, Mercedes, Jesús, Laurita, Celia, Conchi, Ali y a todo el equipo por dejarme formar parte de su mundo todo el tiempo que estuve allí.

Ni a la gente de la clínica, porque ellos hacen el mundo un poco más divertido.

Y mención aparte para Martín y Paco, porque como en todo artículo que se precie lo que todo el mundo sabe pero nadie dice es que si no son los primeros, es porque su lugar está al final. Ellos me metieron en este mundo y, sin ellos, nunca hubiera llegado donde estoy. Me enseñaron a ser el espíritu de la contradicción y me hicieron saber que tener preguntas nos hace mejores que saber las respuestas.

Gracias.



# ÍNDICE

---



<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>XVII</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>XXIII</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>XXVII</b>
<b>RESÚMENES .....</b>	<b>XXXV</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. ARTROSIS .....</b>	<b>3</b>
1.1. <i>Epidemiología y coste socio-económico de la artrosis .....</i>	<i>3</i>
1.2. <i>Aspectos básicos: La articulación diartrodial .....</i>	<i>4</i>
1.3. <i>El cartílago articular.....</i>	<i>5</i>
1.4. <i>Otros tejidos de la articulación: Tejido óseo .....</i>	<i>12</i>
1.5. <i>Otros tejidos: Membrana sinovial.....</i>	<i>13</i>
1.6. <i>Proceso degenerativo articular.....</i>	<i>14</i>
<b>2. EL SULFURO DE HIDRÓGENO.....</b>	<b>22</b>
2.1. <i>Bioquímica del sulfuro de hidrógeno .....</i>	<i>22</i>
2.2. <i>El sulfuro de hidrógeno en el cuerpo humano .....</i>	<i>23</i>
2.3. <i>La aplicación actual del sulfuro de hidrógeno: La balneoterapia.....</i>	<i>28</i>
2.4. <i>Balneoterapia y sulfuro de hidrógeno: Actualidad en la artrosis.....</i>	<i>30</i>
<b>JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS .....</b>	<b>33</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
<b>1. MATERIALES .....</b>	<b>43</b>
<b>2. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.....</b>	<b>46</b>
2.1. <i>Obtención de cartílago articular.....</i>	<i>46</i>
2.2. <i>Obtención y cultivo de condrocitos .....</i>	<i>46</i>
2.3. <i>Obtención de membrana sinovial.....</i>	<i>47</i>
2.4. <i>Obtención del hueso subcondral .....</i>	<i>47</i>
2.5. <i>Línea celular T/C-28a2 .....</i>	<i>47</i>
2.6. <i>Obtención de suero sanguíneo .....</i>	<i>47</i>

3.	CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SULFURO DE HIDRÓGENO ENDÓGENO .....	48
3.1.	<i>Medición de la concentración de sulfuro de hidrógeno en suero sanguíneo .....</i>	<i>48</i>
3.2.	<i>Biosíntesis de sulfuro de hidrógeno en cartílago .....</i>	<i>48</i>
4.	CONDICIONES DE LOS EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> .....	49
5.	ESTUDIO DE VIABILIDAD CELULAR .....	52
6.	CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE <i>qRT-PCR</i> .....	53
6.1.	<i>Extracción de ARN .....</i>	<i>53</i>
6.2.	<i>Cuantificación y medidas de calidad del ARN .....</i>	<i>55</i>
6.3.	<i>Síntesis de ADN complementario .....</i>	<i>55</i>
6.4.	<i>Experimentos de qRT-PCR.....</i>	<i>55</i>
7.	TINCIONES HISTOQUÍMICAS, INMUNOHISTOQUÍMICAS, INMUNOCITOQUÍMICAS Y DE INMUNOFLUORESCENCIA.....	58
7.1.	<i>Hematoxilina-eosina.....</i>	<i>58</i>
7.2.	<i>Tricrómico de Masson.....</i>	<i>58</i>
7.3.	<i>Safranina O .....</i>	<i>59</i>
7.4.	<i>Azul alcian – PAS.....</i>	<i>60</i>
7.5.	<i>Azul de toluidina.....</i>	<i>61</i>
7.6.	<i>Tinciones inmunohistoquímicas .....</i>	<i>62</i>
7.7.	<i>Tinciones inmunocitoquímicas .....</i>	<i>62</i>
7.8.	<i>Visualización de la translocación nuclear de NFκB p65 mediante inmunofluorescencia.....</i>	<i>63</i>
7.9.	<i>Análisis de las imágenes de microscopía .....</i>	<i>63</i>
8.	CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE <i>NO</i> MEDIANTE LA REACCIÓN DE GRIESS .....	64
9.	ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS Y <i>ELISAS</i> .....	65
10.	CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSAMINOGLICANOS .....	67
11.	ANÁLISIS DE <i>ROS</i> MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO .....	68
12.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS .....	69

<b>RESULTADOS .....</b>	<b>71</b>
1. PRODUCCIÓN ENDÓGENA DE SULFURO DE HIDRÓGENO EN LA ARTICULACIÓN .....	73
1.1. Cuantificación de la concentración de sulfuro de hidrógeno en sueros .....	73
1.2. Biosíntesis de sulfuro de hidrógeno en cartílago .....	74
1.3. Análisis de la expresión génica de las enzimas de síntesis de sulfuro de hidrógeno en cartílago, membrana sinovial y hueso subcondral .....	76
1.4. Análisis inmunohistoquímico de las enzimas de síntesis de sulfuro de hidrógeno en cartílago .....	80
2. EFECTOS DEL SULFURO DE HIDRÓGENO EXÓGENO .....	83
2.1. Efecto de los compuestos de sulfuro de hidrógeno sobre la viabilidad celular ....	83
2.2. Efecto de los compuestos de sulfuro de hidrógeno sobre la morfología celular...	84
2.3. Efectos del sulfuro de hidrógeno sobre el estrés oxidativo .....	85
2.4. Efecto de los compuestos de H <sub>2</sub> S sobre marcadores de inflamación .....	90
2.5. Visualización de la translocación de NFκB p65 por inmunofluorescencia. ....	96
2.6. Efectos de los compuestos de sulfuro de hidrógeno sobre el desequilibrio anabólico-catabólico en la artrosis.....	98
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>127</b>
1. SÍNTESIS Y CONCENTRACIÓN DEL H <sub>2</sub> S ENDÓGENO EN LA OA .....	129
2. H <sub>2</sub> S EXÓGENO COMO AGENTE TERAPÉUTICO EN LA OA .....	135
2.1. Efectos del H <sub>2</sub> S sobre el estrés oxidativo .....	136
2.2. El sulfuro de hidrógeno y su efecto en el proceso inflamatorio .....	140
2.3. Visualización de la translocación de NFκB p65 por inmunofluorescencia .....	143
2.4. El sulfuro de hidrógeno y su efecto en el desequilibrio anabólico-catabólico. ...	144
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>151</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>155</b>
<b>PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....</b>	<b>175</b>
1. ARTÍCULOS .....	177
2. CAPÍTULOS DE LIBROS .....	177

3. PROCEEDINGS DE CONFERENCIAS:.....	177
4. COMUNICACIONES ORALES .....	178
5. COMUNICACIONES A CONGRESOS .....	178

# ÍNDICE DE FIGURAS

---





Fig. 1: Ejemplo de una articulación diartrodial: Anatomía de la rodilla .....	4
Fig. 2: Estructura del agregano .....	8
Fig. 3: Estructura del cartílago articular .....	10
Fig. 4: Corte histológico de cartílago y hueso en un platillo tibial.....	11
Fig. 5: Anatomía macroscópica y microscópica del cartílago sano y OA .....	14
Fig. 6: Ilustración de los mediadores de la OA.....	15
Fig. 7: Expresión génica y proteica de cartílago normal frente a OA.....	16
Fig. 8: Resumen esquemático de la ruta de síntesis de PGE <sub>2</sub> .....	17
Fig. 9: Síntesis del H <sub>2</sub> S a partir de la L-cisteína.....	24
Fig. 10: Resumen esquemático del ensayo viabilidad celular con <i>AlamarBlue</i> ® .....	52
Fig. 11: Esquema de la estimulación para el análisis de <i>NFκB</i> .....	63
Fig. 12: Cuantificación de NO mediante la reacción de Griess.....	64
Fig. 13: Esquema de la técnica empleada para la detección de PGE <sub>2</sub> en los sobrenadantes celulares. ....	65
Fig. 14: Concentración de H <sub>2</sub> S en sueros de pacientes OA y de donantes sanos. ....	74
Fig. 15: Biosíntesis de H <sub>2</sub> S en cartílago procedente de pacientes OA y sanos.....	75
Fig. 16: Expresión génica de las enzimas CBS CTH y MPST en cartílago OA frente al cartílago N .....	77
Fig. 17: Expresión génica de las enzimas CBS CTH y MPST en membrana sinovial procedente de articulaciones OA frente a la procedentes de articulaciones N. ....	78
Fig. 18: Expresión génica de las enzimas CBS CTH y MPST en hueso subcondral procedente de articulaciones OA frente al procedente de articulaciones sanas N. .	79
Fig. 19: Imágenes representativas de la IHQ de CBS en cartílago sano y OA.....	80
Fig. 20: Imágenes representativas de la IHQ de CTH en cartílago sano y OA .....	81
Fig. 21: Imágenes representativas de la IHQ de MPST en cartílago sano y OA.....	82
Fig. 22: Tinción de H-E de condrocitos co-estimulados con IL-1β y las diferentes concentraciones de los compuestos de sulfuro .....	84
Fig. 23: Cuantificación de los niveles de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> en condrocitos OA y N estimulados con IL-1β y las distintas concentraciones de NaSH o GYY4137 .....	86
Fig. 24: Expresión génica de <i>iNOS</i> de los donantes individuales de condrocitos OA estimulados con IL-1β y NaSH o GYY4137.....	87
Fig. 25: Imágenes representativas de las ICQ de <i>iNOS</i> en condrocitos OA .....	88
Fig. 26: Fluorescencia para el anión superóxido en la línea celular inmortalizada de condrocitos T/C-28a2 .....	89

Fig. 27: Fluorescencia para el anión superóxido en condrocitos <i>OA</i> estimulados con diferentes concentraciones de GYY4137 frente a la condición basal .....	90
Fig. 28: Niveles de IL-6 en condrocitos <i>OA</i> co-estimulados con IL-1 $\beta$ y NaSH o GYY4137. ....	90
Fig. 29: Expresión génica de IL-6 en condrocitos <i>OA</i> estimulados con IL-1 $\beta$ y NaSH o GYY4137.. ....	91
Fig. 30: Niveles de PGE <sub>2</sub> en condrocitos <i>OA</i> co-estimulados con IL-1 $\beta$ y NaSH o GYY4137.....	92
Fig. 31: Expresión génica de COX-2 en condrocitos <i>OA</i> co-estimulados con IL-1 $\beta$ y NaSH o GYY4137.....	93
Fig. 32: Expresión génica de PTGES en condrocitos <i>OA</i> co-estimulados con IL-1 $\beta$ y NaSH o GYY4137.....	94
Fig. 33: Expresión génica de COX-1 en condrocitos <i>OA</i> co-estimulados con IL-1 $\beta$ y NaSH o GYY4137.....	95
Fig. 34: Efecto de las diferentes concentraciones de H <sub>2</sub> S de NaSH y GYY4137 sobre la localización intracelular de la subunidad p65 de <i>NF<math>\kappa</math>B</i> .....	97
Fig. 35: Expresión génica de <i>MMP1</i> , <i>MMP3</i> y <i>MMP13</i> , de cada uno de los donantes en condrocitos <i>OA</i> estimulados con IL-1 $\beta$ y NaSH .....	99
Fig. 36: Expresión génica de <i>MMP1</i> , <i>MMP3</i> y <i>MMP13</i> , de cada uno de los donantes en condrocitos <i>OA</i> estimulados con IL-1 $\beta$ y NaSH. ....	100
Fig. 37: Efecto de las diferentes concentraciones de NaSH y GYY4137 sobre la proteína <i>MMP3</i> .....	101
Fig. 38: Efecto de las diferentes concentraciones de NaSH y GYY4137 sobre la proteína <i>MMP13</i> . ....	102
Fig. 39: Niveles de <i>MMP13</i> en condrocitos <i>OA</i> co-estimulados con IL-1 $\beta$ y NaSH o GYY4137. ....	103
Fig. 40: IHQ de <i>MMP3</i> en la capa superficial de discos de cartílago co-estimulados con IL-1 $\beta$ y diferentes concentraciones de NaSH y GYY4137 .....	104
Fig. 41: IHQ de <i>MMP13</i> en la capa superficial de discos de cartílago co-estimulados con IL-1 $\beta$ y diferentes concentraciones de NaSH y GYY4137 .....	104
Fig. 42: Expresión génica de ACAN en los donantes individuales de condrocitos <i>OA</i> co-estimulados con IL-1 $\beta$ y NaSH o GYY4137.....	105

Fig. 43: Expresión génica de COLII en los donantes individuales de condrocitos <i>OA</i> co-estimulados con IL-1 $\beta$ y NaSH o GYY4137.....	106
Fig. 44: IHQ de col II en la capa superficial de discos de cartílago <i>OA</i> co-estimulados con IL-1 $\beta$ y diferentes concentraciones de NaSH o GYY4137 .....	107
Fig. 45: IHQ de col II en la capa profunda de discos de cartílago co-estimulados con IL-1 $\beta$ y diferentes concentraciones de NaSH o GYY4137 .....	107
Fig. 46: IHQ de agg en la capa superficial de discos de cartílago co-estimulados con IL-1 $\beta$ y diferentes concentraciones de NaSH y GYY4137 .....	108
Fig. 47: IHQ de agg en la capa profunda de discos de cartílago co-estimulados con IL-1 $\beta$ y diferentes concentraciones de NaSH o GYY4137. ....	108
Fig. 48: Porcentaje de GAGs retenidos en el cartílago <i>OA</i> y liberados al sobrenadante tras 21 días de co-estimulación con IL-1 $\beta$ y NaSH o GYY4137 <i>in vitro</i> .....	110
Fig. 49: Porcentaje de GAGs retenidos en el cartílago sano y liberados al sobrenadante tras 21 días de co-estimulación con IL-1 $\beta$ y NaSH o GYY4137 <i>in vitro</i> .....	110
Fig. 50: Tinción de S-O en cartílago <i>OA</i> tras 21 días en cultivo en <i>DMEM</i> 10%.....	111
Fig. 51: Tinción de S-O de cartílago <i>OA</i> tras 21 días en las diferentes condiciones experimentales .....	112
Fig. 52: Tinción de S-O centrada en las células del cartilago <i>OA</i> tras 21 días en las diferentes condiciones experimentales. ....	112
Fig. 53: Tinción de S-O en cartílago N tras 21 días en las diferentes condiciones experimentales .....	113
Fig. 54: Tinción de azul de toluidina en cartílago <i>OA</i> tras 21 días en las diferentes condiciones experimentales .....	114
Fig. 55: Tinción de azul de toluidina en cartílago N tras 21 días en las diferentes condiciones experimentales .....	115
Fig. 56: Tinción de azul alcían - <i>PAS</i> en cartílago <i>OA</i> tras 21 días en las diferentes condiciones experimentales.....	116
Fig. 57: Tinción de azul alcían- <i>PAS</i> en cartílago N tras 21 días en las diferentes condiciones experimentales.....	117
Fig. 58: Tinción de tricrómico de Masson en cartílago <i>OA</i> tras 21 días en las diferentes condiciones experimentales.....	118
Fig. 59: Tinción de tricrómico de Masson en una muestra de cartílago N tras 21 días en las diferentes condiciones experimentales.....	119

Fig. 60: Inmunohistoquímica de <i>KS</i> en cartílago <i>OA</i> tras 21 días en las diferentes condiciones experimentales .....	120
Fig. 61: Inmunohistoquímica de <i>KS</i> en cartílago <i>N</i> tras 21 días en las diferentes condiciones experimentales .....	121
Fig. 62: Inmunohistoquímica de <i>CH-S</i> en cartílago <i>OA</i> tras 21 días en las diferentes condiciones experimentales .....	122
Fig. 63: Inmunohistoquímica de <i>CH-S</i> en cartílago <i>N</i> tras 21 días en las diferentes condiciones experimentales .....	123
Fig. 64: Diagrama de flujo de los posibles efectos citoprotectores y/o anti-inflamatorios de la suplementación de $H_2S$ en diferentes situaciones patológicas.....	134
Fig. 65: Esquema de la oxidación del $H_2S$ en la mitocondria. ....	139
Fig. 66: Desarrollo patológico de la <i>OA</i> . Cambios en la MEC y en el número y tipo de condrocitos .....	145

# ÍNDICE DE TABLAS

---



Tabla 1: Anticuerpos utilizados en las tinciones IHQ e ICQ. ....	45
Tabla 2: Resumen de las condiciones experimentales de los distintos ensayos <i>in vitro</i> realizados. ....	51
Tabla 3: Lista de cebadores y sondas utilizados en los experimentos de <i>qRT-PCR</i> . ....	56
Tabla 4: Cebadores y sondas empleados para la amplificación de los genes de referencia. ....	57
Tabla 5: Genes de referencia utilizados para los diferentes tipos de muestra. ....	57
Tabla 6: Concentración de H <sub>2</sub> S en suero normal y OA .....	73
Tabla 7: Datos demográficos de los donantes de suero sanguíneo para cuantificar el H <sub>2</sub> S.....	73
Tabla 8: Biosíntesis de H <sub>2</sub> S en cartílago normal y OA.....	74
Tabla 9: Datos demográficos de los donantes de cartílago para cuantificar el de H <sub>2</sub> S. .	75
Tabla 10: Porcentaje de positividad medio de las enzimas a nivel intracelular en cartílago sano y OA. ....	82
Tabla 11: Viabilidad de los condrocitos expuestos a NaSH o GYY4137 medida con el método <i>AlamarBlue</i> ®. ....	83
Tabla 12: Porcentajes de positividad de las tinciones AA y PAS de tejido OA tras 21 días de estimulación .....	116
Tabla 13: Porcentajes de positividad de las tinciones AA y PAS en tejido N tras 21 días de estimulación. ....	117
Tabla 14: Resumen de los porcentajes de liberación de GAGs y de positividad de las tinciones histoquímicas o inmunohistoquímicas en tejido OA.....	124
Tabla 15: Resumen de los porcentajes de liberación de GAGs y de positividad de las tinciones histoquímicas o inmunohistoquímicas en tejido N. ....	125
Tabla 16: Estudios en los que NaSH exhibieron efectos antioxidantes. ....	138
Tabla 17: Estudios en los que NaSH o GYY4137 exhibieron efectos inflamatorios....	140





# **ABREVIATURAS**

---



A	Absorbancia
AA-PAS	Azul alcían- <i>Peryodic Acid Schiff</i>
AC	Anticuerpo
ACAN, agg	Agrecano (gen o proteína, respectivamente)
ACR	<i>American Colleague of Rheumatology/</i> Colegio Americano de Reumatología
ADAMTS	<i>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs/</i> Una desintegrina y metaloproteasa con motivos tipo trombospondina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AINEs	Anti-inflamatorios no esteroideos
ANOVA	<i>Analysis of variance/</i> Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AT	Azul de toluidina
ATP	Adenosín trifosfato
β- ACT	β Actina
BSA	<i>Bovine serum albumine/</i> Albumina bovina
c/p	Células por pocillo
CAT	Catalasa
CBS	Cistationina beta sintasa
CHUAC	Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña
CH-S	Condroitín sulfato
CO	Monóxido de carbono
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COL	Colágeno
COLII, col II	Colágeno tipo II (gen o proteína, respectivamente)
COMP	<i>Cartilage oligomeric matrix protein/</i> Proteína oligomérica de

## Abreviaturas

---

	la matriz del cartílago
<i>cNOS</i>	<i>Constitutive nitric oxide synthase</i> / Sintasa constitutiva del óxido nítrico
COX	Ciclooxigenasa
CTH	Cistationina gamma liasa
CRM	Cadena respiratoria mitocondrial
DAB	3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorada
<i>DAPI</i>	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> / 4',6-diamino-2-fenilindol
<i>DAS</i>	<i>Diallyl sulfide</i> / Sulfuro de dialilo
<i>DCFH-DA</i>	<i>2',7'-dichlorofluorescein diacetate</i> / 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína
<i>DMEM</i>	<i>Dulbecco's Modified Eagle medium</i> / Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco
<i>DMPD</i>	<i>N,N-dimethyl-p-phenylenediamine</i> / N,N-dimetil-p-fenildiamina
<i>EDTA</i>	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> / Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Error estándar
<i>EIA</i>	<i>Enzymatic immunoassay</i> / Ensayo inmunoenzimático
<i>ELISA</i>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> / Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<i>eNOS</i>	<i>Endotelial nitric oxide synthase</i> / Sintasa endotelial del óxido nítrico
<i>ERK</i>	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i> / Quinasas reguladas por señales extracelulares
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAGs	Glucosaminoglicanos
GSH	Glutación
GGY4137, GYY	<i>(p-methoxyphenyl)morpholino-phosphinodithioic acid</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
H <sub>2</sub> S	Sulfuro de hidrógeno
XXX	

<i>HBSS</i>	<i>Hank's balanced salt solution/</i> Solución salina balanceada de Hank
H-E	Hematoxilina-eosina
<i>HIF</i>	<i>Hypoxia induced factors/</i> Factores inducidos por hipoxia
<i>HPRT1</i>	<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase/</i> Fosforribosiltransferasa de hipoxantina-guanina
HS <sup>-</sup>	Anión hidrógeno sulfuro
ICQ	Inmunocitoquímica
IF	Inmunofluorescencia
<i>IGF</i>	<i>Insulin growth factor/</i> Factor de crecimiento insulínico
IHQ	Inmunohistoquímica
IκBs	Inhibidores de kappa B
IL	Interleuquina
IMSERSO	Instituto de Mayores y Servicios Sociales
INIBIC	Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña
<i>iNOS</i>	<i>Inducible nitric oxide synthase/</i> Sintasa inducible del óxido nítrico
<i>JNK</i>	<i>c-Jun N-terminal kinases/</i> Quinasas c-Jun N-terminal
KATPc	Canales de potasio dependientes de ATP
<i>KS</i>	<i>Keratan sulfate/</i> Queratán sulfato
<i>LPS</i>	<i>Lipopolysaccharide/</i> Lipopolisacárido
<i>LTP</i>	<i>Long term potentiation/</i> Potenciación a largo plazo
<i>MAPK</i>	<i>Mitogen activated protein kinase/</i> Proteína quinasa activada por mitógenos
MD	Medio deplecionado
ME	Medio de expansión
MEC	Matriz extracelular
<i>MMP</i>	<i>Matrix metalloproteinase/</i> Metaloproteasa de matriz
MPST	Mercaptopiruvato azufre transferasa
N	Tejido sano o normal

n	Tamaño muestral
NaSH	Hidrosulfuro de sodio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido hidrógeno
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<i>NFκB</i>	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> / Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<i>NO</i>	<i>Nitric oxide</i> / Óxido nítrico
<i>NOS</i>	<i>Nitric oxide synthase</i> / Sintasa del óxido nítrico
<i>nNOS</i>	<i>Neuronal nitric oxide synthase</i> / Sintasa neuronal del óxido nítrico
O <sub>2</sub>	Oxígeno
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión superóxido
<i>OA</i>	<i>Osteoarthritis</i> / Artrosis
OH <sup>-</sup>	Grupo hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAG	Proparglicina
P/E	Penicilina/Estreptomina
Pb	Pares de bases
<i>PBS</i>	<i>Phosphate buffered saline</i> / Tampón de fosfato salino
<i>PCR</i>	<i>Polymerase chain reaction</i> / Reacción en cadena de la polimerasa
PIB	Producto interior bruto
PG	Prostaglandina
<i>PTGES, mPGES</i>	<i>Microsomal prostaglandin E synthase</i> / Sintasa microsomal de la prostaglandina E (gen o proteína, respectivamente)
<i>qRT-PCR</i>	<i>Quantitative real time PCR</i> / <i>PCR</i> cuantitativa a tiempo real
<i>RA</i>	<i>Rheumatoid arthritis</i> / Artritis reumatoide
<i>RNS</i>	<i>Reactive nitrogen species</i> / Especies reactivas de nitrógeno
<i>ROS</i>	<i>Reactive oxygen species</i> / Especies reactivas de oxígeno

<i>Runx2</i>	<i>Runt-related transcription factor 2/</i> Factor de transcripción 2 relacionado con runt
SER	Sociedad Española de Reumatología
S-O	Safranina O
So	Sulfito oxidasa
SOD	Superóxido dismutasa
<i>SySADOA</i>	<i>Symptomatic slow action drugs for osteoarthritis/</i> Medicamentos de acción lenta para la artrosis
<i>TIMP</i>	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase/</i> Inhibidor tisular de metaloproteasa
TM	Tricrómico de Masson
<i>TNF</i>	<i>Tumor necrosis factor/</i> Factor de necrosis tumoral
TX	Tromboxano
v/v	Porcentaje en volumen
<i>x g</i>	Fuerza centrífuga relativa





# RESÚMENES

---



La *OA* es una de las enfermedades más prevalentes e incapacitantes del mundo desarrollado. En una articulación con *OA* todos los tejidos articulares se ven afectados, pero la degeneración del cartílago articular es el punto clave en el desarrollo de la patología. El cartílago articular es un tejido conectivo especializado compuesto por una pequeña proporción de células, los condrocitos, que son responsables de la síntesis y el mantenimiento de la MEC. Entre los factores que contribuyen a la progresión de la *OA* se encuentra un proceso inflamatorio persistente que resulta en niveles anormalmente elevados de citoquinas tales como la IL-1 $\beta$  y la IL-6, de prostaglandinas, fundamentalmente la PGE<sub>2</sub>, y de metaloproteasas de matriz tales como la colagenasa 3 (*MMP13*) o la estromelina (*MMP3*). También se produce un incremento de especies reactivas de nitrógeno y de oxígeno, que someten a las células a un aumento de estrés oxidativo y desencadenan la muerte celular de los condrocitos. Globalmente, todos estos mediadores actúan destruyendo la MEC de manera irreversible.

Actualmente no existe ningún tratamiento que cure o cuando menos detenga la progresión de la *OA* y los tratamientos existentes (combinación de terapia física y terapia farmacológica analgésica e anti-inflamatoria) tienen efectos secundarios indeseados.

Un tratamiento en exploración es la balneoterapia con aguas minero medicinales sulfuradas, pero se desconoce el mecanismo de acción por el cual alivian la sintomatología de patologías como la *OA*. El H<sub>2</sub>S, que es el componente principal de estas aguas, ha sido identificado recientemente como un gas endógeno (se produce en el organismo a través de las enzimas CBS, CTH y MPST) y como un mediador de la inflamación. La relación entre el cartílago y el H<sub>2</sub>S es el aspecto clave en el que se ha centrado esta Tesis. Se ha comprobado la presencia de las enzimas de producción de H<sub>2</sub>S en los tejidos de la articulación (membrana sinovial, hueso subcondral y cartílago) y al cuantificar su biosíntesis se ha encontrado que en el cartílago *OA* se produce menos H<sub>2</sub>S que en cartílago sano. Esto es consecuencia, cuando menos, de una menor expresión de MPST en este tejido.

Además, se han utilizado diferentes dosis de dos compuestos, el NaSH, que produce H<sub>2</sub>S de manera instantánea, y el GYY4137, que lo hace gradualmente, para administrar H<sub>2</sub>S de manera exógena a condrocitos y cartílago *OA*. Se ha comprobado que ambos, pero sobretodo el GYY4137, son capaces de revertir el proceso inflamatorio y reducir el estrés oxidativo en las células, así como prevenir el desequilibrio anabólico-catabólico en la MEC.

Colectivamente nuestros resultados sugieren que la administración exógena de H<sub>2</sub>S resulta beneficiosa en la OA porque la articulación OA presenta unos niveles inferiores a la articulación sana. Esto proporciona evidencias científicas que apoyan el hecho empírico de que las aguas mineromedicinales sulfuradas mejoren la sintomatología de los pacientes con OA.

Osteoarthritis is one of the most prevalent and incapacitating diseases of the developed world. All the tissues of the affected joint are involved, but cartilage degradation is the key event in the progression of the disease. Articular cartilage is a specialized connective tissue with a small proportion of cells, chondrocytes, that are responsible for the synthesis and maintenance of the extracellular matrix. Prominent among the intervening factors that contribute to OA is a persistent inflammatory process that results in abnormally high concentrations of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , IL-6, of prostaglandins, mainly PGE<sub>2</sub>, and metalloproteinases such as collagenase 3 (MMP13) and stromelysin (MMP3). There is also an increase in reactive nitrogen and oxygen species that subject cells to increased oxidative stress resulting in increased chondrocyte apoptosis. Collectively, all these mediators act to destroy the extracellular matrix irreversibly.

As of now there is no cure for OA and current treatments (combined physical and pain and anti-inflammatory therapy) have undesirable side effects.

Balneotherapy, and in particular the use of sulfurous thermal waters, is currently being explored as a treatment for OA. However, the mechanisms that could explain why these treatments reduce OA symptoms are not known. Hydrogen sulfide, the active component of these waters, has been recently identified as an endogenous gas (it is produced in the body by the enzymes CBS, CTH and MPST) and as mediator in inflammation.

The relationship between H<sub>2</sub>S and cartilage has been the central topic of this Dissertation. The presence of the three H<sub>2</sub>S synthesizing enzymes has been demonstrated in synovium, subchondral bone and cartilage, and the quantification of H<sub>2</sub>S biosynthesis in cartilage has shown its levels to be reduced in OA with respect to normal tissue. This is the result of, at least, the reduced expression of MPST in this tissue.

In addition, different doses of two compounds, NaSH, that produces H<sub>2</sub>S instantaneously and GYY4137, with slow H<sub>2</sub>S production, were used to exogenously supply H<sub>2</sub>S to OA chondrocytes and cartilage. It was shown that both compounds, but especially GYY4137, were able to reduce the inflammatory response and to reduce the oxidative stress affecting the cells, as well as to prevent the anabolic-catabolic disequilibrium in the cartilage matrix.

Overall, our results suggest that exogenous administration of H<sub>2</sub>S has a beneficial effect in OA because the OA joint suffers from lower than normal H<sub>2</sub>S levels. This provides

## *Summary*

---

scientific evidence supporting the empirical fact that sulfurous thermal waters provide relief for patients with OA.

A artrose é unha das enfermidades máis prevalentes e incapacitantes do mundo desenvolvido. Na articulación con *OA* todos os tecidos están afectados mais a dexeneración da cartilaxe articular é o punto clave no desenrolo da patoloxía. A cartilaxe articular é un tecido conectivo especializado composto por unha pequena proporción de células, os condrocitos, que son os responsables da síntese e mantemento da MEC. Entre os factores que contribúen á progresión da *OA* atópase un proceso inflamatorio persistente que resulta en niveis anormalmente elevados de citoquinas tales coma a IL-1 $\beta$ , a IL-6, de prostaglandinas, fundamentalmente a PGE<sub>2</sub>, e de metaloproteasas de matriz tales coma a colaxenasa 3 (*MMP13*) e a estromelisin (*MMP3*). Tamén se produce un incremento das especies reactivas de nitróxeno e osíxeno, que someten ás células a un aumento de estrés oxidativo, e desencadean a morte celular dos condrocitos. Globalmente, todos estes mediadores actúan destruindo a MEC de maneira irreversible.

A data de hoxe non existe ningún tratamento que cure ou polo menos deteña a progresión da *OA* e os tratamento existentes (combinacións de terapia física e terapia farmacolóxica analxésica e anti-inflamatoria) teñen efectos secundarios indeseados.

Un tratamento en exploración é a balneoterapia con augas mineromedicinais sulfuradas, pero descoñécese o mecanismo de acción polo cal melloran a sintomatoloxía de patoloxías coma a *OA*. O H<sub>2</sub>S, que é o compoñente principal destas augas, identificouse recentemente coma un gas endóxeno (prodúcese no organismo a través das enzimas *CBS*, *CTH* e *MPST*) e coma un mediador da inflamación. A relación entre a cartilaxe e o H<sub>2</sub>S é o aspecto clave no que se centrou esta Tese. Comprobouse a presenza das tres enzimas de produción de H<sub>2</sub>S nos tecidos da articulación (membrana sinovial, oso subcondral e cartilaxe) e ao cuantificar a súa biosíntese atopouse que na cartilaxe *OA* se produce menos H<sub>2</sub>S que no tecido normal. Isto é a consecuencia cando menos dunha menor expresión de *MPST* neste tecido.

Ademais, utilizáronse diferentes doses de dous compostos, o NaSH, que produce H<sub>2</sub>S de maneira instantánea, e o GYY4137, que o fai gradualmente, para administrar H<sub>2</sub>S de maneira esóxena aos condrocitos e a cartilaxe artrósicos. Comprobouse que ambos, mais sobre todo o GYY4137, foron capaces de reverter o proceso inflamatorio e reducir o estrés oxidativo nas células, así coma previr o desequilibrio anabólico-catabólico na MEC.

Colectivamente, os nosos resultados suxiren que a administración esóxena de H<sub>2</sub>S resulta beneficiosa na *OA* porque a articulación *OA* presenta uns niveis inferiores á

articulación sa. Isto achega evidencias científicas que apoian o feito empírico de que as augas mineromedicinais sulfuradas melloran a sintomatoloxía dos doentes con *OA*.



# INTRODUCCIÓN

---



## 1. ARTROSIS

### 1.1. Epidemiología y coste socio-económico de la artrosis

La artrosis (*osteoarthritis, OA*) además de ser una de las enfermedades reumáticas más dolorosas es, asimismo, la artropatía más frecuente en la población. Esto es así hasta el punto de que más del 70% de las personas mayores de 50 años tiene signos radiológicos de *OA* en alguna articulación.

Las estimaciones mundiales son que el 9,6% de los hombres y el 18% de las mujeres mayores de 60 años padecen *OA* sintomática. De hecho, estudios radiológicos realizados en pacientes mayores de 45 años de las poblaciones europeas y estadounidenses revelan que el 14,1% de los hombres y el 22% de las mujeres padecen *OA* de rodilla, aunque en general, la *OA* es más prevalente en Europa y en Estados Unidos que en el resto del mundo (1).

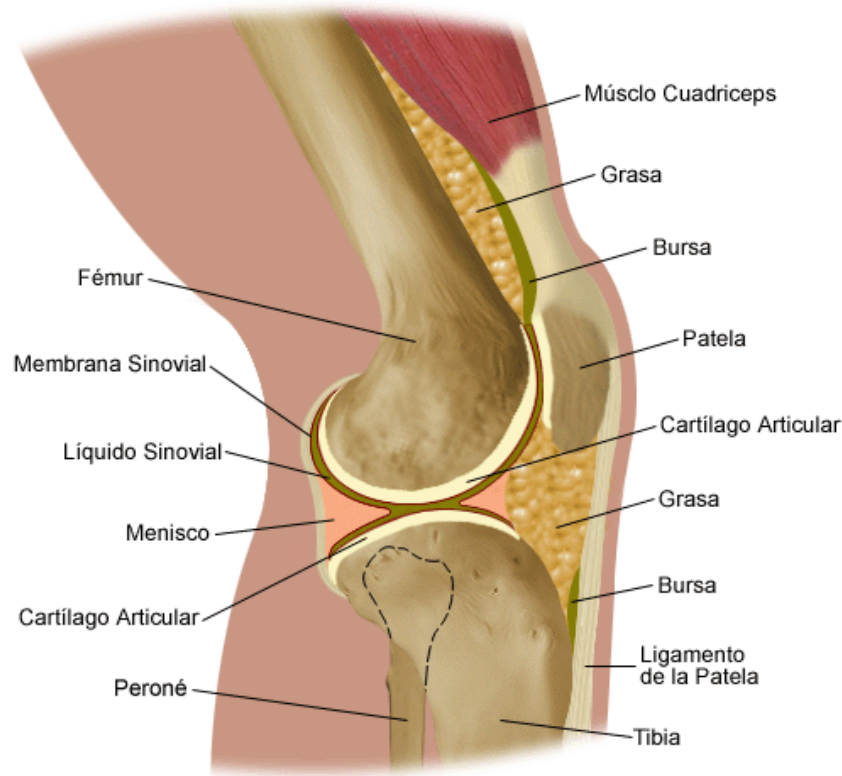
Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), además, se encuentra entre las cuatro primeras enfermedades que reducen los años de vida, ajustados por calidad. En España, la *OA* de rodilla y cadera tienen una elevada prevalencia, del 10,2% y 4% respectivamente. La Sociedad Española de Reumatología (SER) calcula que el tratamiento de estas patologías supone en España un coste anual superior a 4.738 millones de euros, equivalente al 0,5% del producto interior bruto (PIB) (2,3).

El Colegio Americano de Reumatología (*American Colleague of Rheumatology, ACR*) define la *OA* como un grupo heterogéneo de condiciones que conducen a síntomas y signos articulares, los cuales se asocian con defectos en la integridad del cartílago articular, alteraciones relacionadas con el hueso subcondral y con cambios en los márgenes articulares (1).

Aunque la *OA* es una enfermedad en la que participa la articulación afectada al completo, el aspecto más característico es la destrucción progresiva del cartílago articular. Esta destrucción se atribuye a menudo al desgaste natural, sin embargo, la relación que existe entre envejecimiento y *OA* supone que el primero aumente la susceptibilidad al desarrollo de la *OA*, aunque por sí mismo no la causa. De hecho, son muchos los factores implicado en la *OA*, razones por las que se la considera una patología de origen multifactorial.

## 1.2. Aspectos básicos: La articulación diartrodial

Las articulaciones se clasifican en distintos tipos de acuerdo con la naturaleza del material que separa los huesos. Concretamente la articulación diartrodial es una articulación sinovial, caracterizada por tener una gran movilidad ([Fig. 1](#)).



**Fig. 1: Ejemplo de una articulación diartrodial: Anatomía de la rodilla.**

Figura tomada de <http://nyp.org/espanol/library/orthopaedics/kneepain.html>.

Estas articulaciones poseen una cavidad articular y las superficies óseas de contacto, denominadas superficies articulares, están recubiertas de cartílago hialino con formas comparables a superficies geométricas, casi siempre concordantes, que encajan recíprocamente.

Las articulaciones sinoviales constan de elementos de protección, de amortiguación, de adaptación y de estabilización.

Entre los elementos de protección encontramos la cápsula articular, que cierra la cavidad articular extendiéndose hasta las zonas óseas de la articulación. Esta cápsula está formada por un manguito fibroso en la zona externa, que le aporta resistencia, y por la membrana sinovial en contacto con la cavidad articular en la zona interna, responsable de la producción del líquido sinovial. Esta membrana sinovial es, además, uno de los tejidos que interviene en los procesos inflamatorios ya que sus células, los

sinoviocitos, son capaces de comportarse como células presentadoras de antígeno y de producir citoquinas (interleuquina 1 (IL-1), factor de necrosis tumoral (*tumor necrosis factor, TNF*)...etc) (4).

Los elementos de amortiguación fundamentales son el cartílago, del que hablaremos más adelante, y el líquido sinovial que, además de poseer la característica de los líquidos y no ser comprimible, lubrica la articulación y nutre al cartílago articular como funciones principales.

En cuanto a los elementos de adaptación nos referimos a aquellos elementos fibrocartilagosos que permiten que las articulaciones sean totalmente congruentes, concretamente los rodetes articulares, como el existente en la articulación escapulohumeral, en el hombro o los discos articulares, como los meniscos de la rodilla.

Y por último, los elementos de estabilidad articular son aquellos tendones, ligamentos y recubrimientos fibrosos que aportan un medio de unión a las articulaciones y que pueden ser tanto intracapsulares (como los ligamentos cruzados de la rodilla) o extra capsulares (ligamentos de refuerzo, la membrana fibrosa de la cápsula o los tendones de la musculatura adyacente).

### **1.3. El cartílago articular**

El cartílago articular es un tejido conectivo especializado, compuesto por matriz extracelular (MEC) y por un reducido número de células, los condrocitos. Estas células son las responsables de la síntesis y mantenimiento de la matriz y representan menos del 1-2% del volumen total del cartílago.

La MEC está compuesta por un 70-80% de agua distribuida de forma desigual. Su concentración es más elevada en la superficie y va disminuyendo gradualmente a medida que aumenta la profundidad (4). El 20-30% restante son proteínas, y entre ellas encontramos aquellas que le aportan al cartílago sus características biomecánicas y morfológicas, convirtiéndolo en un tejido excepcional y difícil de reproducir. Estas proteínas se pueden clasificar en tres grandes grupos: el colágeno (COL) (50%), los proteoglicanos (30-35%) y otras proteínas de la matriz (15-20%) (4).

#### *1.3.1 Matriz extracelular: Colágeno*

El principal colágeno presente en el cartílago articular es el colágeno de tipo II, constituyendo un 90% de la totalidad de colágeno de la MEC. El 10% restante son

pequeñas cantidades de colágenos “menores”, de los tipos III, V, VI, IX, X, XI, XII y XIV. De estos colágenos, el colágeno tipo XI corresponde a un 10% en el feto y un 3% en el cartílago articular adulto. Igual ocurre con el colágeno de tipo IX, del que hay un 10% en el cartílago inmaduro y del 1-5% en el adulto (5). A pesar de esto, los colágenos tipo IX y XI son relativamente específicos del cartílago, mientras que el resto se distribuye por otros tejidos conectivos.

El colágeno II es característico del cartílago articular adulto, aunque también está presente en otras estructuras como el humor vítreo del globo ocular. Es un colágeno consistente en una triple hélice compuesta por tres cadenas alfa idénticas, que se sintetiza como pro-colágeno en el interior de las células en dos formas, tipo IIA, presente en células condroprogenitoras y tipo IIB, expresado en condrocitos maduros (6). El diámetro de cada fibrilla es variable en las diferentes zonas de cartílago articular, presentando un menor diámetro en las zonas superficial y media con relación a la zona más profunda.

La síntesis del colágeno comienza en el interior de las células cuando, a través del gen COL2A1, se sintetiza pro-colágeno tipo II (IIA y IIB) en el citosol de las mismas. Éste es liberado al exterior de las células donde se transforma en moléculas de tropocolágeno, las cuales se disponen en fibrillas y éstas, a su vez, forman fibras con otros colágenos (IX y XI) que son estabilizadas por uniones cruzadas interfibrilares. Estas uniones cruzadas interfibrilares confieren una mayor estabilidad estructural y posiblemente, una menor susceptibilidad a la calcificación y, aún más, posibilitan una mayor eficacia de la interacción del colágeno con los proteoglicanos de la matriz lo que ayuda a mantener el elevado contenido de agua del cartílago (5).

En la MEC, las fibrillas de colágeno forman un entramado tridimensional a modo de mallas, orientado para descargar las fuerzas de tracción y proporcionar así resistencia a la tensión. Se ha sugerido que el colágeno tipo IX, que contiene una cadena de condroitín sulfato, actúa como intermediario entre las fibras de colágeno tipo II y los proteoglicanos, contribuyendo de esta manera a aumentar esa estabilidad estructural de la MEC (7).

### 1.3.2 Matriz extracelular: Proteoglicanos

Los proteoglicanos son macromoléculas sintetizadas por los condrocitos, constituidas por una proteína central a la que se unen, de forma covalente, un tipo especial de glúcidos del tipo polisacáridos, denominados glucosaminoglicanos (GAGs). Entre estos encontramos ácido hialurónico, condroitín sulfato (*CH-S*), dermatán sulfato, heparán sulfato y queratán sulfato (*KS*). Los más representados en el cartílago son el condroitin-4-sulfato, el condroitín-6-sulfato, el dermatán sulfato y el *KS*.

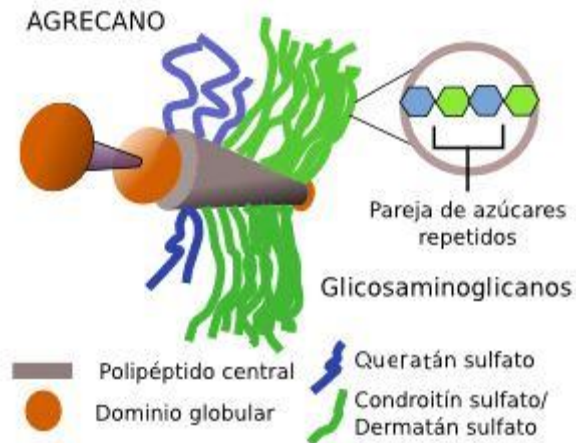
El ácido hialurónico, único GAG que no está sulfatado, tiene la función de enlazar entre sí los diversos proteoglicanos formando voluminosos agregados de éstos que van a ocupar los espacios entre las redes de fibrillas de colágeno.

Existe una enorme variedad de proteoglicanos, dependiendo del tipo y longitud de la proteína central, así como de la cantidad y longitud de los GAGs asociados a ella.

Estos proteoglicanos tienen una estructura interna que consta de cinco dominios: dos de tipo fibroso y tres globulares denominados G1, que actúa en la adhesión celular, G2 y G3 que participan en el reconocimiento celular así como en la adhesión y estabilización de la MEC.

Entre la diversidad de proteoglicanos que suponen las distintas cadenas de GAGs y las variedades en la proteína central encontramos uno que es característico y muy predominante en el cartílago articular: el agregano.

El agregano (agg) ([Fig. 2](#)) está codificado por el gen ACAN en humanos. Esta proteína es una parte muy importante de la matriz del cartílago ya que ayuda a resistir la compresión del mismo en la carga. Es un proteoglicano con grandes hidratos de carbono, un total de 2.316 aminoácidos de longitud y se puede expresar en múltiples isoformas. Los GAGs que lo forman son el *CH-S* y el *KS* que se unen a un núcleo proteico extendido. Sus tres dominios globulares G1, G2 y G3 están implicados en la agregación a través del ácido hialurónico, la adhesión celular y la apoptosis de condrocitos.



**Fig. 2: Estructura del agregano.**

Imagen tomada de <http://www.ehu.es/biomoleculas/hc/sugar35a.htm>.

Actualmente, la síntesis y degradación del agregano, al igual que la del colágeno II, son objeto de estudio por su participación en el deterioro del cartílago durante la OA. Ambos son dos de los marcadores más importantes debido a las diferencias existentes entre el cartílago normal y el OA, en el que se encuentran muy disminuidos.

### 1.3.3 Matriz extracelular: Otras proteínas

El cartílago articular, además de colágeno y proteoglicanos, posee pequeñas cantidades de otras proteínas en la MEC que interactúan entre sí. Las más conocidas son la ancorina y ancorina II, la condronectina, la fibronectina y la *cartilage oligomeric matrix protein (COMP)* (4).

La ancorina es una proteína situada en la superficie de los condrocitos y participa en las interacciones entre las células y la matriz, actuando como mecanorreceptores y transmitiendo determinadas fuerzas desde las fibras de colágeno hasta los condrocitos. Se cree que la fibronectina puede contribuir al mantenimiento de la estructura del cartílago a través de su interacción con componentes como el colágeno tipo II. La *COMP* es una proteína muy abundante en el cartílago de crecimiento y que, probablemente participa en mecanismos de reparación tisular y en la regulación del crecimiento celular.

### 1.3.4 Componente celular: Los condrocitos

Los condrocitos son la única población celular del cartílago articular y, al mismo tiempo, solo representan un 2% de la totalidad del cartílago (8). A pesar de ello, estas células tan minoritarias son las responsables de que la MEC del cartílago articular se



mantenga en condiciones fisiológicas regulando los procesos anabólicos y catabólicos que ocurren en ella.

Los condrocitos varían en tamaño, posición, forma y número en las diferentes capas del cartílago articular, y su actividad está condicionada por factores genéticos y ambientales, por fuerzas electrocinéticas y mecánicas, y por la presión de los fluidos (9). Dentro de la MEC cada condrocito ocupa un espacio denominado laguna, formando el condrón, que es el condrocito contenido en la laguna y rodeado de MEC. A pesar de que estas células están embebidas y aisladas dentro de sus lagunas y de la MEC, recientemente se ha descubierto que los condrocitos tienen la capacidad de comunicarse a través de proyecciones intercelulares y uniones gap (10).

La reducción del número de células con el envejecimiento del cartílago y la producción alterada de la MEC por estas células contribuyen a la patogénesis de la destrucción del cartílago y a la aparición de la OA. De hecho, la densidad celular de un cartílago envejecido es de aproximadamente la mitad que la de uno joven, y esta baja celularidad del cartílago que se da con la edad no está limitada a zonas de carga, sino que también sucede en cartílago que no está sometido a carga, como el cartílago hialino articular.

### 1.3.5 Estructura del cartílago articular

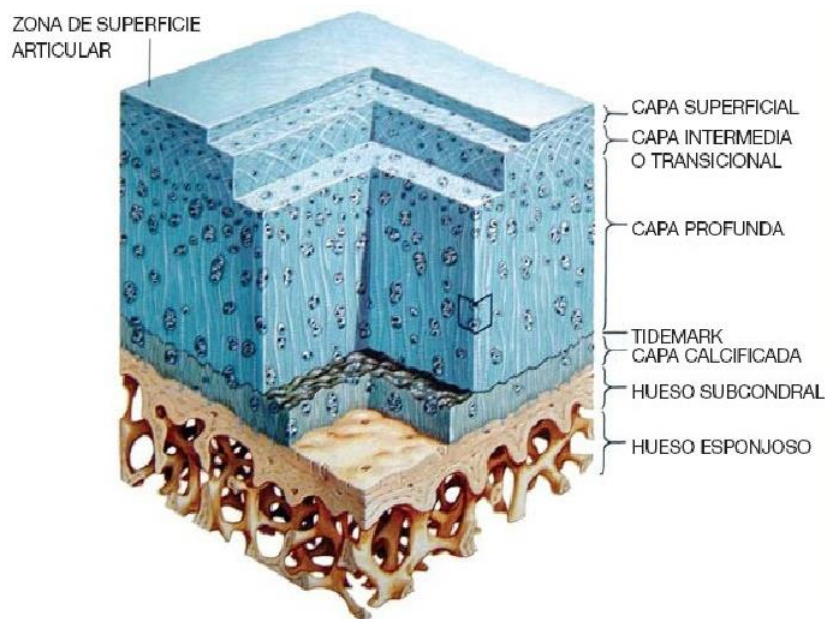
La composición y organización del cartílago, así como su actividad metabólica varía en función de la profundidad del mismo, distinguiéndose cuatro zonas concretas y diferenciadas ([Fig. 3](#) y [Fig. 4](#)):

- Zona superficial o zona I: Es la zona de “rozamiento” de la articulación, y supone hasta el 10-20% del espesor total del cartílago. Se caracteriza por tener una población de condrocitos pequeños, aplanados y colocados de forma paralela a la superficie articular. Lo mismo ocurre con las fibras de colágeno de esta zona, que, según la mayoría de los autores, transcurren paralelas a la superficie (11), si bien en algunos estudios se propone una morfología más compleja con orientaciones oblicuas de las mismas (12). En su parte más superficial esta zona tangencial posee una pequeña capa desprovista de células denominada *lámina splendens*, que protege al cartílago de la abrasión a la vez que transmite las fuerzas de compresión desde la superficie a los márgenes del cartílago. Esta zona superficial es muy importante en el proceso de la OA, ya que

cuando se degrada da comienzo una fase exponencial del empeoramiento de la enfermedad (12).

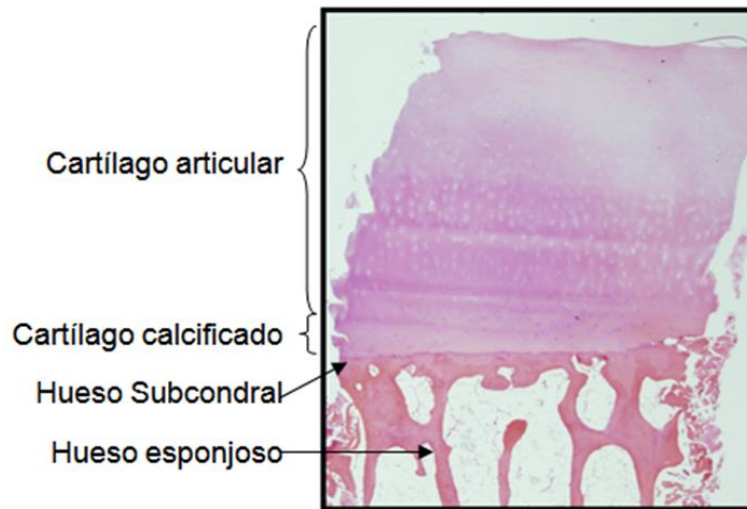
- Zona media de transición o zona II: Es la continuación de la anterior y contiene un mayor porcentaje de proteoglicanos distribuidos de forma homogénea. Los condrocitos son más grandes, esféricos y están distribuidos de forma aleatoria. Las fibras de colágeno cambian su dirección y se vuelven oblicuas al entrar en esta zona.
- Zona profunda, radial o zona III: Los condrocitos son más elípticos y forman columnas de 2-6 células orientándose perpendiculares con respecto a la superficie articular. Las fibras de colágeno que eran oblicuas en la zona de transición siguen cambiando su dirección para orientarse de forma paralela a las columnas de células y así, igualmente perpendiculares a la superficie articular.
- Zona de cartílago calcificado o zona IV: Los condrocitos son más escasos, están más esparcidos e hipertróficos, aunque en su mayoría son viables. La matriz está calcificada con sales de calcio y la cantidad de proteoglicanos es mucho más reducida.

Entre la zona profunda y la calcificada se encuentra lo que se denomina “frente de calcificación” o *tidemark*, que se perfila como una línea cuando se tiñe con las técnicas habituales.



**Fig. 3: Estructura del cartílago articular**

De la página web: <http://es.slideshare.net/leconca/6-biomecanica-de-cartilago>.



**Fig. 4: Corte histológico de cartílago y hueso en un platillo tibial.**  
Tinción con hematoxilina – eosina (H-E) (4X).

### 1.3.6 Propiedades biomecánicas del cartílago articular

El cartílago articular es un tejido avascular y aneural que está constituido por una población celular escasa rodeada por MEC, cuyos componentes mayoritarios son el agua, colágeno y proteoglicanos. La interacción entre el agua y los proteoglicanos proporciona al cartílago su característica viscoelasticidad y su resistencia a las fuerzas de compresión, actuando como un amortiguador hidrodinámico, mientras que el colágeno amortigua las fuerzas de tensión ayudando a aumentar su resistencia.

En general, las articulaciones sufren multitud de fuerzas, presiones, tracciones y torsiones, que aumentan hasta 10 veces en movimientos tales como correr y saltar. En condiciones normales, el cartílago debe soportar dichas fuerzas, ayudado por las partes blandas periarticulares, donde también se distribuyen las fuerzas y por la contracción muscular, y transmitirlas y distribuirlas al hueso subyacente. Esto hace que el cartílago posea unas propiedades físicas únicas como tejido conjuntivo que dependen, en última instancia, de la organización y mantenimiento de los componentes de la MEC y, por tanto, del buen funcionamiento de los condrocitos.

El cartílago sano es un tejido sometido a una constante presión. Las fuerzas de compresión sobre él producen un efecto de arrastre en el cual el agua se desplaza de la MEC a la cavidad articular, y la morfología de las fibras de colágeno permite que éste se comprima. Cuando la presión desaparece, el agua retorna a la matriz y se produce una recuperación del cartílago (4). Este proceso, además de ser fisiológico, es necesario

para el mantenimiento del cartílago, ya que este movimiento de líquido es lo que hace que los condrocitos se nutran de forma eficiente. Sin embargo, cuando existe un exceso de presiones aplicadas a una articulación o por el contrario, cuando hay una inmovilización completa, el metabolismo de los condrocitos se reduce y se produce un desequilibrio entre la destrucción y el mantenimiento de la matriz, dándose unas tasas elevadas de la primera que pueden suponer el inicio de la *OA*.

### **1.4. Otros tejidos de la articulación: Tejido óseo**

Al igual que el cartílago, el hueso está formado por células y una MEC predominantemente colágena, aunque en este caso, el colágeno principal es de tipo I.

Sin embargo, en el hueso encontramos vascularización, innervación y diferentes tipos celulares (osteoblastos, osteocitos y osteoclastos), además, según la orientación y formación de la MEC encontramos dos estructuras óseas morfológicamente diferentes, el hueso esponjoso y el hueso compacto.

Concretamente, adyacente a la estructura del cartílago hialino en las articulaciones sinoviales existe una pequeña capa de hueso compacto, la placa subcondral, que reposa sobre la red trabecular de hueso esponjoso de la epífisis. En ambos tipos de hueso, igual que ocurre con el tejido cartilaginoso, son las propias células de hueso, los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos, los encargados del mantenimiento de la MEC. En este caso, concretamente los osteoclastos, son las células responsables de la reabsorción ósea mientras que los osteoblastos sintetizan matriz, quedando imbuidos en ella y convirtiéndose en osteocitos (13).

Aunque en principio el tejido óseo no es un tejido en contacto con la articulación, los estudios de las últimas décadas realizados sobre la patogénesis de la *OA* incluyen al hueso como un tejido muy involucrado en el proceso. En él se producen muchas alteraciones, como consecuencia o inclusive causa de esta enfermedad, tales como la esclerosis ósea, la formación de osteofitos o de quistes óseos (14).

Obviamente, la degradación del cartílago articular es el mecanismo principal de progresión de la *OA*. Sin embargo, tanto estudios *in vitro* como en animales demuestran que la inhibición de la actividad osteoclástica en el hueso reduce de forma significativa la escala histopatológica de la *OA* (*Mankin score*), y que los cambios en el hueso

subcondral, tales como su esclerosis, suceden en paralelo con el desarrollo de la OA (15,16).

De hecho, yendo más allá, en los últimos años se ha comprobado que los tratamientos frente a la degradación ósea, como la calcitonina, o los estrógenos, también tienen un efecto positivo inhibiendo la degradación del cartílago (17).

Todos estos estudios aportan evidencias de que en la etiopatogenia de la OA el cartílago articular no es el único tejido involucrado, aportando pruebas de que existe una fuerte relación entre el hueso y la OA.

### **1.5. Otros tejidos: Membrana sinovial**

La membrana sinovial es una membrana clara y transparente que forma la capa interna de la cápsula articular, adhiriéndose a la capa externa, la membrana fibrosa. Se encuentra normalmente, además, revistiendo a los ligamentos intraarticulares, de tal forma que estos quedan excluidos de cavidad articular.

Como su propio nombre indica, la membrana sinovial es la responsable de la síntesis del líquido sinovial que baña la articulación, que, como mencionamos previamente, lubrica la articulación y nutre al cartílago articular como funciones principales.

A diferencia del cartílago articular, la membrana sinovial posee abundantes vasos sanguíneos y una abundante inervación, y su superficie está constituida por células sinoviales o sinoviocitos entre fibras de colágeno.

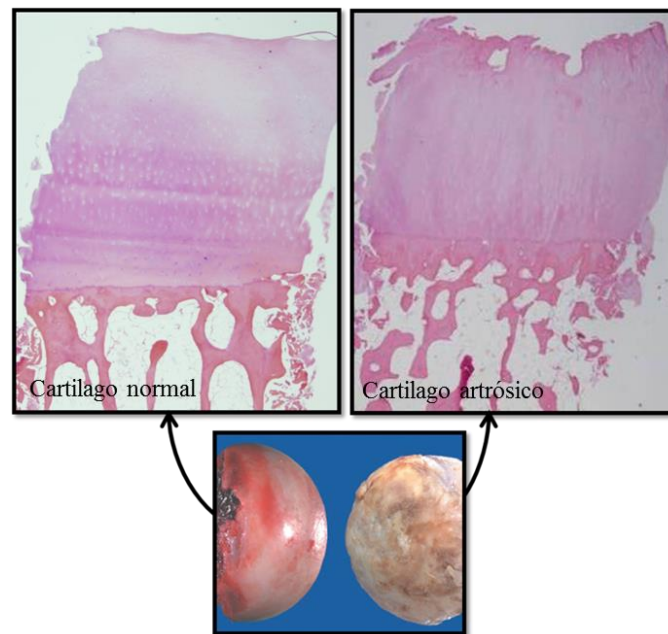
En una articulación normal, la membrana sinovial es muy delgada, de un tono blanquecino rosáceo y secreta de forma equilibrada el líquido sinovial, manteniendo así un sistema de fluidos intraarticular que previene frente a las fuerzas de compresión y que nutre al cartílago.

En el proceso OA, de forma habitual, se encuentra una membrana sinovial inflamada, hipervascularizada, engrosada y algunas veces enrojecida. Como también mencionábamos anteriormente, los sinoviocitos son capaces de comportarse como células presentadoras de antígeno y de producir citoquinas (IL-1, *TNF*...etc.) (4). Sin embargo, la membrana sinovial también sintetiza citoquinas anti-inflamatorias (IL-4, IL-10, IL-13), que disminuyen los niveles de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y la liberación de IL-1, *TNF*α y las metaloproteasas de matriz (*Matrix metalloproteinases*, *MMPs*).

## 1.6. Proceso degenerativo articular

### 1.6.1 Etiopatogenia de la artrosis

La degeneración del cartílago articular es el episodio clave en el desarrollo de la *OA* y tiene una etiología multifactorial. Entre los factores involucrados en su destrucción destacan los factores mecánicos y los mediadores biológicos, dos causas ligadas la una a la otra y que no se pueden tratar de manera independiente. Por un lado, las articulaciones en las que más se padece *OA*, la cadera y la rodilla, soportan el peso del cuerpo y están sometidas a cargas mecánicas repetidas y localizadas. En una situación normal, la anatomía y fisiología de la articulación son capaces de disipar estas cargas sin que se produzcan alteraciones. Sin embargo, cuando éstas son muy repetitivas o de alta intensidad, producen daños microscópicos en la matriz del cartílago articular, daños que los condrocitos son capaces de reparar, pero que, si el proceso continúa, terminan de forma irreversible en la degradación del tejido ([Fig. 5](#)).



**Fig. 5: Anatomía macroscópica y microscópica del cartílago sano y *OA*.**

Las imágenes histológicas están teñidas con H-E y tomadas a 4 aumentos.

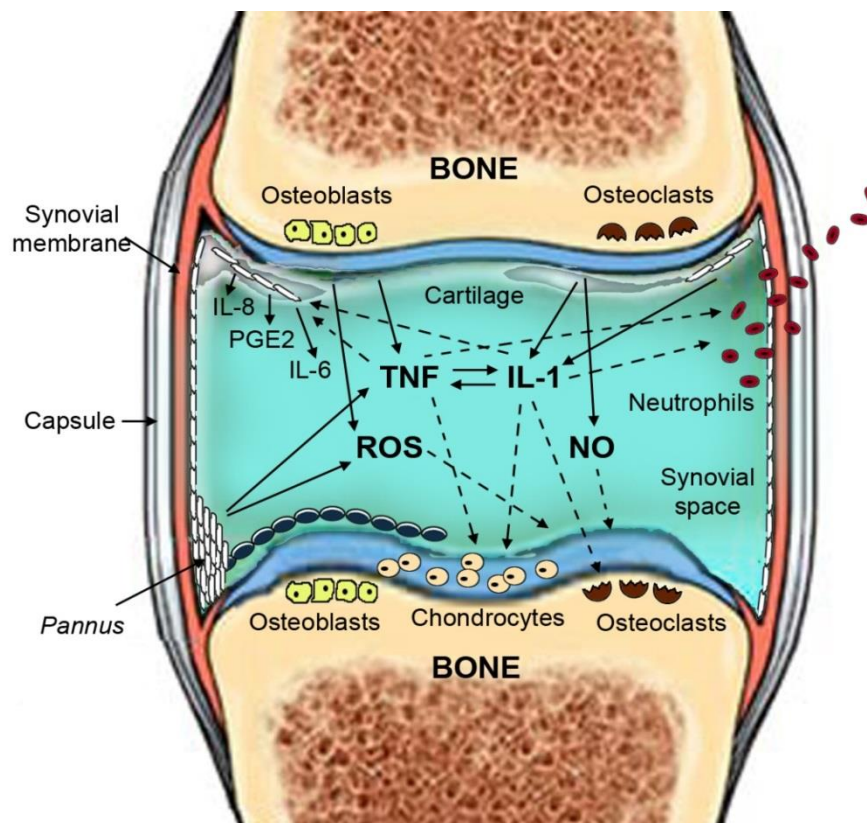
También, las lesiones focales, debidas normalmente a daños traumáticos, pueden progresar en *OA* si no reparan bien y, normalmente, debido a su tamaño, no lo hacen. Otra opción, es que, bajo factores mecánicos normales, ya exista una alteración química de la articulación, lo cual contribuye a una pérdida de líquido sinovial. Por otro lado, la síntesis de una gran variedad de mediadores biológicos de la inflamación por parte de



los condrocitos y los sinoviocitos aumenta los procesos catabólicos y se suma de forma sinérgica a los procesos mecánicos, agravando el desgaste articular (8).

Debido a estos efectos (mecánicos y biológicos), se ha demostrado que el cartílago OA es hipocelular (debido a un aumento de muerte celular por apoptosis), está sometido a un aumento de estrés oxidativo y presenta una elevación de marcadores inflamatorios y catabólicos. Esto, a la postre, conduce a un desequilibrio entre los mecanismos de reparación y destrucción del tejido, dando lugar a su destrucción progresiva.

En concreto, existe un consenso en múltiples estudios de que en una articulación con OA se pueden encontrar cantidades elevadas de mediadores inflamatorios sintetizados por los condrocitos, tales como diversas citoquinas pro-inflamatorias (Fig. 6) como la IL-1 $\beta$ , la IL-6 o el TNF $\alpha$ , el óxido nítrico (*nitric oxide*, NO) y la PGE<sub>2</sub>, entre otros (4).

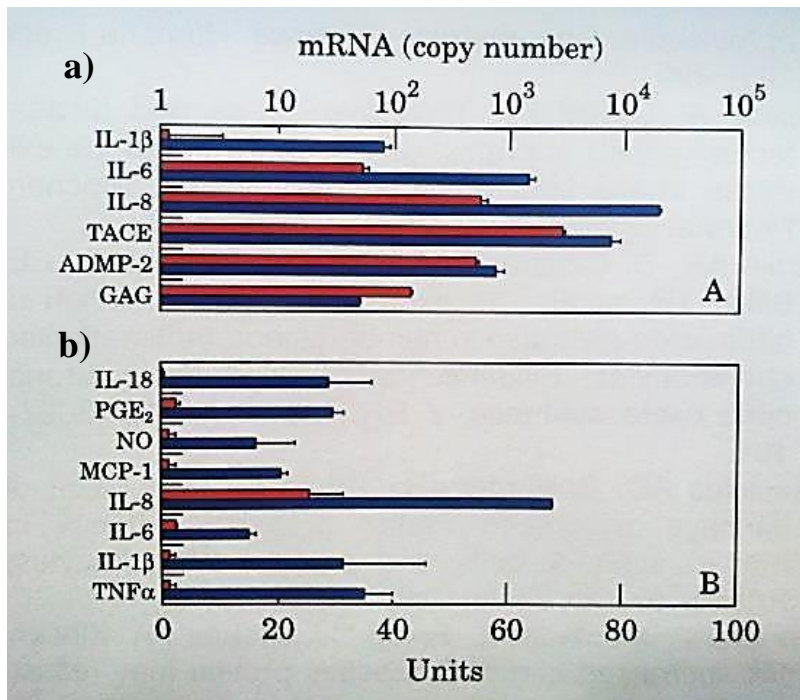


**Fig. 6: Ilustración de los mediadores de la OA.**

En una articulación con OA se encuentran niveles aumentados de diversos marcadores inflamatorios, tales como la IL-1 $\beta$ , el TNF $\alpha$ , el NO y las especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS), entre otros. Imagen tomada y modificada de la ref (18).

1.6.2 La inflamación y la artrosis

Clásicamente la OA no se ha considerado una enfermedad inflamatoria debido a la escasez de neutrófilos presentes en las articulaciones afectadas, y a que, salvo en una OA avanzada, no existe una infiltración y proliferación leucocitaria en el líquido sinovial (19,20). Además, el hecho de que el cartílago sea avascular y aneural supone la ausencia de las manifestaciones representativas de la inflamación descritas por la tetrada de Celsius. Sin embargo, en los últimos años los avances en biología celular y molecular han demostrado que comparado con el cartílago normal, el cartílago OA muestra una sobreexpresión de diversos marcadores pro-inflamatorios, tanto a nivel de expresión génica como de sus niveles proteicos, como se puede ver en la Fig. 7.



**Fig. 7: Expresión génica y proteica de cartílago normal frente a OA.**

a) PCR a tiempo real en cartílago normal (rojo) y OA (azul). b) Producción espontánea de mediadores de la inflamación en cartílago normal (rojo) y OA (azul). Tomada de la referencia (19).

La IL-1β es la molécula pro-inflamatoria por excelencia en el proceso OA, y su efecto lesivo sobre esta patología se conoce desde principios de los años 80 del siglo XX (21-25). En resumen, la IL-1β favorece los procesos catabólicos en la articulación, siendo capaz de estimular su propia síntesis, la de otras interleuquinas pro-inflamatorias como la IL-6 y la IL-8, además de MMPs, colagenasas y agrecanasas (26,27). Por otro lado, otra de las consecuencias del aumento en la expresión de IL-1β es la activación de la

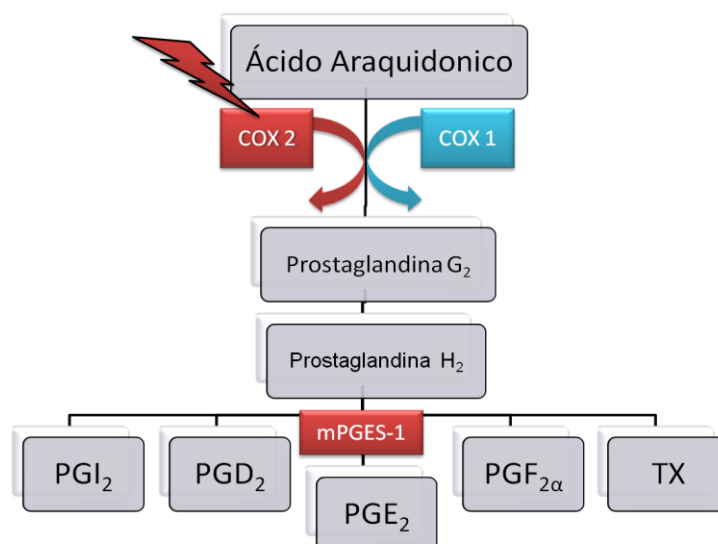


isoforma inducible de la sintasa del *NO* (*iNOS*), aumentando los niveles de *NO* y la estimulación de la síntesis de eicosanoides ( $\text{PGE}_2$  en particular).

Normalmente, este aumento de la  $\text{PGE}_2$  es el resultado de la sobreexpresión de la ciclooxigenasa 2 (*COX-2*), que conduce a una síntesis aumentada de la enzima sintasa microsomal de la prostaglandina E (*mPGES-1*) (Fig. 8). Sin embargo, el efecto de la  $\text{PGE}_2$  en el cartílago aún tiene algo de controversia, y es que aunque ejerce efectos beneficiosos en el cartílago sano (N), favoreciendo la síntesis de proteoglicanos y promoviendo la producción de colágeno tipo II, es perjudicial en cartílago OA, desplegando efectos contrarios (28,29).

En cuanto a otro malo conocido, el  $\text{TNF}\alpha$ , afecta de forma similar al condrocito que la  $\text{IL-1}\beta$  (30), incluidas la estimulación de las *MMPs* y la disminución de la síntesis de proteoglicanos. Sin embargo, a la misma concentración, la  $\text{IL-1}\beta$  es de 100 a 1.000 veces más potente que el  $\text{TNF}\alpha$ , aunque ambas citoquinas tienen efectos sinérgicos (19).

En síntesis, lo que es evidente es que hay una interrelación importante en la sobreproducción de mediadores de la inflamación y, aunque no existe una manifestación clínica evidente del proceso a nivel celular y genómico, existe un proceso inflamatorio claro.



**Fig. 8: Resumen esquemático de la ruta de síntesis de  $\text{PGE}_2$ .**  
TX: Tromboxano.

### 1.6.3 *Catabolismo y anabolismo*

Como se definió previamente, el cartílago articular es un tejido conectivo de sostén cuyas características derivan esencialmente de la naturaleza de su MEC. La formación del cartílago comienza con la diferenciación de células mesenquimales en condroblastos, que son las células precursoras propias del cartílago. Estos condroblastos se dividen y sintetizan la MEC hasta obtener el cartílago maduro, momento en el cual se convierten, finalmente, en condrocitos. A pesar de ser las únicas células del cartílago, los condrocitos son los responsables de mantener la integridad de la MEC, ya que, aunque no tienen la función de sintetizar y crear matriz como hacían siendo condroblastos, si son los responsables de mantener sus componentes y el equilibrio de un cartílago articular en continuo desgaste debido al movimiento articular, a la fricción y al soporte de cargas.

La creencia general actualmente es que los condrocitos cambian su fenotipo en respuesta a estrés químico o mecánico, y de hecho, se han propuesto diferentes fenotipos en estas células (17). El fenotipo catabólico, con una expresión aumentada de enzimas proteolíticas; el fenotipo anabólico capaz de regenerar la MEC, secretando colágeno tipo II y proteoglicanos y otros fenotipos como el hipertrófico, el desdiferenciado y el condroblástico.

Desde un punto de vista catabólico, el elemento más importante en la degradación del cartílago articular son las proteasas y aunque existen diversas familias de éstas, las más destacadas son las *MMPs*. Estas proteínas son endopeptidasas de las que, actualmente, se han descrito 28 tipos, capaces de degradar diferentes sustratos como colágenos, proteoglicanos, gelatina o fibronectina (31). Las *MMPs* pueden clasificarse en función de su preferencia por los sustratos, dividiéndose en colagenasas (*MMP1*, *MMP13*), gelatinasas, estromelisininas (*MMP3*) y otras. Estas endopeptidasas, en condiciones normales se hallan en el cartílago adulto en muy baja cantidad, sin embargo sus niveles se elevan en determinadas patologías en las que se dan procesos de destrucción de la MEC, como lo es la *OA* (30).

### 1.6.4 *Estrés Oxidativo; Especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno*

El oxígeno molecular ( $O_2$ ) es esencial para la supervivencia de los seres humanos y, en general, de todos los organismos aeróbicos. El metabolismo energético aeróbico se basa en la fosforilación oxidativa, un proceso fundamental por el cual la óxido-reducción

energética del transporte electrónico mitocondrial es finalmente convertida en Adenosín trifosfato (ATP). Los organismos aeróbicos utilizan  $O_2$  como aceptor final de electrones durante la fosforilación oxidativa mitocondrial, sin embargo, metabolitos de  $O_2$  parcialmente reducidos y altamente reactivos, incluyendo el anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), se pueden formar dentro de las células (32). Estos radicales libres de oxígeno, poseen uno o más electrones desapareados. Eso los vuelve inestables y con tendencia a buscar el equilibrio deshaciéndose o acaparando un electrón con las moléculas con las que entran en reacción, haciéndolas a su vez inestables (33). La acción destructiva de los radicales libres se dirige hacia los lípidos de las membranas celulares, ácidos nucleicos y proteínas produciendo consecuentes alteraciones estructurales y celulares que son la base de diferentes enfermedades incluyendo envejecimiento celular prematuro, cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, OA o artritis reumatoide (33).

Estos metabolitos de  $O_2$  reactivos o radicales libres de oxígeno son por lo general colectivamente conocidos como especies reactivas del oxígeno (*ROS*). Su generación en un medio biológico expone a los organismos vivos a lo que se conoce como la “paradoja de oxígeno”, ya que por un lado el oxígeno es necesario para la vida, pero también es potencialmente peligroso ya que las *ROS* pueden convertirse fácilmente en una fuente de daño tisular, como fue reconocido por los primeros pioneros de la investigación de los radicales libres (34-38).

Sin embargo, como una consecuencia natural de esta paradoja, los organismos aeróbicos han desarrollado mecanismos y estrategias evolutivamente conservados para controlar cuidadosamente la generación de *ROS* y mantener la homeostasis redox. Una de estas estrategias es la producción de enzimas anti-oxidantes como la catalasa, la glutatión peroxidasa o la superóxido dismutasa (32).

Existen además otras formas de protección a través de moléculas como el ácido ascórbico, el glutatión reducido o el ácido úrico que tienen la capacidad de actuar como reductores frente a los radicales libres de oxígeno y también en los sistemas tiorredoxina y glutarredoxina que actúan como agentes reductores oxidándose de forma reversible (32).

Otro elemento del estrés oxidativo es el *NO*. Es un radical gaseoso descubierto en los años 80, sintetizado en el organismo a partir de L-arginina por una familia de tres

enzimas llamadas sintasas del *NO* (*NOS*). Estas enzimas se clasifican, en función de su localización y síntesis, en: la sintasa del *NO* constitutiva (*cNOS*), que cuando está localizada en neuronas se denomina *nNOS* y en células endoteliales *eNOS* y la sintasa del *NO* inducible (*iNOS*) que está asociada a la respuesta inmune y como su nombre indica se sobreexpresa como respuesta a diversos estímulos (39,40).

Se ha demostrado que, debido a sus propiedades eminentemente destructivas en cartílago articular, el *NO* puede ser un mediador muy importante en la lesión articular crónica de la *OA* (41). En este sentido, inhibe la síntesis de agregano, aumenta la actividad de las *MMPs*, incrementa la susceptibilidad de los condrocitos a oxidantes como el  $H_2O_2$  y contribuye a la resistencia a los efectos anabólicos del factor de crecimiento insulínico (*insulin growth factor, IGF*) (41). Por otro lado, se ha demostrado que los condrocitos *OA* expresan *iNOS* y producen *NO* de forma espontánea, y que las cantidades en el líquido sinovial en pacientes con *OA* o artritis reumatoide son significativamente mayores que en pacientes sanos (42). Además, existe también evidencia de que la producción de *NO* está intrínsecamente ligada a la síntesis de la  $PGE_2$  y que el aumento de esta prostaglandina, una de las moléculas más relacionadas con el proceso inflamatorio en cartílago *OA*, está también implicado en la desregulación o incremento de diversos procesos en el tejido articular tales como el catabolismo tisular, el dolor, la apoptosis celular y el aumento de las *MMPs* (40,43).

### 1.6.5 Activación de la inflamación artrosis

Algo que queda patente en los múltiples estudios y revisiones realizadas (19,29,44) es que existe una diferencia significativa en la expresión de algunos genes, como se vio en la [Fig. 7](#), principalmente aquellos que regulan mediadores como la  $PGE_2$ , o el *NO*, o citoquinas como la IL-6, IL-8 o la IL-1 $\beta$ .

Las vías de activación, por las cuales se produce un aumento o una disminución de la expresión de los genes que se modulan en la *OA*, vienen dadas a través de una serie de rutas de señalización o transcripción que pueden ser estimuladas por señales en el citoplasma celular. En concreto, la estimulación de los condrocitos con la IL-1 $\beta$ , la citoquina más importante del proceso *OA*, supone una activación en estas células de dos rutas principales, por un lado la ruta de señalización de quinasas reguladas por señales extracelulares (*extracellular signal-regulated kinase, ERK*) y por otro, la del factor de

transcripción nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NFκB*) (45).

*NFκB* se encuentra en la mayoría de las células, y está involucrado en la activación de una gran cantidad de genes, en respuesta a inflamación, infección y otras situaciones de estrés celular. De forma fisiológica esta proteína se encuentra inerte y secuestrada en el citoplasma de células no estimuladas, y se transloca al núcleo para reprogramar la expresión génica cuando la célula se ve expuesta a un estímulo frente al que es capaz de responder. En mamíferos, existen cinco tipos de factores de transcripción *NFκB*, por lo que podríamos decir que, en realidad, *NFκB* es una familia de proteínas. Estas son RelA (también denominada p65), RelB, c-Rel, *NFκB1* (o p50) y *NFκB2* (o p52). Estas dos últimas son sintetizadas como precursores p105 y p100 respectivamente y requieren de un proceso proteolítico para convertirse en las unidades funcionales p50 y p52, respectivamente (46). La posición citoplasmática de *NFκB*, es controlada por un conjunto de proteínas inhibitorias (Inhibidores de kappaB, IκBs) que, en presencia de un estímulo extracelular son degradadas dejando en libertad a *NFκB* para translocarse al núcleo, donde regula la transcripción génica de enzimas y citoquinas proinflamatorias tales como iNOS, COX2 o IL-6..

#### 1.6.6 *Tratamiento actual de la artrosis*

Actualmente, el tratamiento de la *OA* es multidireccional y principalmente sintomático. No existe un tratamiento definitivo en ninguno de sus múltiples ámbitos, ni farmacológico, ni físico, ni con medicina alternativa, que cure o cuando menos detenga la progresión de la enfermedad. Las personas que la padecen ligan su vida a una serie de pautas, como la pérdida de peso para aliviar los factores mecánicos, el manejo de terapia física supervisada, y la aplicación de terapia farmacológica analgésica y anti-inflamatoria. Entre esta última, se incluye el uso de anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs), con una buena efectividad pero nocivos efectos adversos, los fármacos de acción lenta (*symptomatic slow action drugs for osteoarthritis, SySADOA*:) y la terapia intra-articular, todos ellos con una eficacia inconsistente. Recientemente también se han aprobado y se están utilizando algunos agentes de acción central y terapia biológica, sin embargo, en ambos casos, si bien la eficacia es buena, los efectos adversos son mayores de lo esperado (47). En general, cuando la *OA* es severa y el paciente supera los 60 años el tratamiento más usado es el reemplazamiento de la articulación por una prótesis mediante artroplastia.

## **2. EL SULFURO DE HIDRÓGENO**

---

El sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) es un gas conocido por su olor característico a huevos podridos y que, hasta mediados de los 90, se consideraba principalmente tóxico para el ser humano y dañino para el medio ambiente. Sus mecanismos de acción fueron completamente desconocidos hasta las últimas décadas del siglo XX (48-50), y lo único destacado eran los estudios realizados a mediados y finales de siglo, que demostraban su toxicidad en mamíferos fundamentalmente por vía inhalatoria, afectando a órganos como el pulmón, el cerebro y el corazón.

Sin embargo, a finales del siglo XX, se descubrió que el H<sub>2</sub>S es un gas producido de forma endógena en los tejidos. Se sintetiza a partir del aminoácido L-cisteína a través de una serie de enzimas cuya expresión y regulación molecular en diversos tejidos ha sido caracterizada por varios grupos (51,52). Al igual que el NO y el monóxido de carbono (CO), el H<sub>2</sub>S ha sido recientemente identificado como una molécula de señalización gaseosa, un mediador endógeno de la inflamación (53) y como un potencial compuesto citoprotector (54).

De esta forma el H<sub>2</sub>S ha sido el tercer gas en la historia identificado como “compuesto gasotransmisor” (55). Con el mismo pedigrí tóxico que ya caracterizó al NO y al CO y tras la demostración de la presencia de H<sub>2</sub>S en el sistema nervioso en la década de los 90 (56), los estudios y publicaciones en torno a este gas han tenido un crecimiento exponencial que aun continua en nuestro tiempo (57).

### **2.1. Bioquímica del sulfuro de hidrógeno**

Este gas, en solución acuosa, se comporta como un ácido débil disociándose en el protón H<sup>+</sup> y el anión hidrosulfuro (HS<sup>-</sup>), que a su vez, se disocia en H<sup>+</sup> y S<sup>2-</sup>, como podemos ver en la siguiente reacción (58):



A temperatura ambiente y bajo un pH fisiológico (7,35 – 7,45), el 20% del H<sub>2</sub>S persiste en la forma no disociada y el 80% restante como el anión HS<sup>-</sup>. De esta forma, en condiciones fisiológicas, coexisten cantidades significativas de H<sub>2</sub>S y HS<sup>-</sup>. Dado que en la actualidad se desconoce si sólo una de ellas o ambas especies son las responsables de los efectos biológicos del H<sub>2</sub>S, en esta tesis el término H<sub>2</sub>S se utiliza para hacer referencia a estas dos especies.

Por el contrario, los niveles presentes de  $S^{2-}$  en estas condiciones son inapreciables ya que para la correcta disociación del  $HS^-$  se necesitan valores de pH superiores a los fisiológicos.

El  $H_2S$  es altamente lipofílico, razón por la cual atraviesa con facilidad las membranas celulares y es capaz de llegar a la mayoría de los tejidos del organismo y, por ejemplo, el  $HS^-$ , que como hemos visto es la especie de sulfuro prevalente, tiene afinidad por los núcleos celulares uniéndose a los centros metálicos de ciertas moléculas como la zona de unión del oxígeno a la hemoglobina (58). Esto le confiere al  $H_2S$  un alto potencial biológico.

## **2.2. El sulfuro de hidrógeno en el cuerpo humano**

### *2.2.1 Síntesis*

Los estudios de la síntesis del  $H_2S$  a nivel endógeno en los tejidos de mamíferos apuntan a dos vías diferentes, la enzimática y la no enzimática (58). La forma no enzimática, aunque menos importante, viene de la reducción del azufre elemental a  $H_2S$  utilizando reductores que provienen de la oxidación de la glucosa, como el lactato, u otros como el NADH (nicotinamida adenina dinucleótido hidrógeno), NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) y el glutatión.

Con respecto a la vía enzimática, el  $H_2S$  se sintetiza a nivel endógeno fundamentalmente a través de tres enzimas, la cistationina beta sintasa (CBS, EC 4.2.1.22), la cistationina gamma liasa (CTH, EC 4.4.1.1) y en menor medida por la mercaptopiruvato azufre transferasa (MPST, EC 2.8.1.2) (59). El sustrato de estas enzimas es un aminoácido, la L-cisteína, que se encuentra tanto en alimentos como en otras proteínas y que también puede ser sintetizado a través de la L-metionina ([Fig. 9](#)).

Desde hace décadas se conoce el proceso de producción del  $H_2S$  a través de estas enzimas, como ya describieron Stipanuk y Beck en 1982 (60). Actualmente son muchos los grupos que han estudiado su expresión en los tejidos de mamíferos, concluyendo que CBS es la enzima predominante en cuanto a la producción de  $H_2S$  en el cerebro y sistema nervioso y está presente en hígado, riñón, íleo, útero, placenta e islotes pancreáticos (59). La CTH es capaz de producir  $H_2S$ , tanto a través de cisteína en un 70% como de homocisteína en un 30% y se expresa en hígado, riñón, íleo, útero,





### 2.2.2 *Mecanismo de liberación del sulfuro de hidrógeno*

El H<sub>2</sub>S en el organismo se puede encontrar en dos formas diferentes. Por un lado, se encuentra en forma “libre” en líquido extracelular y plasma, con temperatura de 37°C y pH 7,35 – 7,45 existe un equilibrio constante descrito anteriormente:  $\text{H}_2\text{S} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HS}^-$ . Y por otro lado, podemos encontrar H<sub>2</sub>S “inmovilizado” o almacenado mediante su unión a otras moléculas para su posterior liberación en respuesta a estímulos fisiológicos. Así, en el organismo podemos encontrar un amplio rango de átomos de azufre unidos covalentemente a otro átomo de azufre formando los llamados compuestos de “azufre sulfano”. Estos compuestos, sintetizados en mamíferos a través de la ruta anaerobia de la cisteína a través de enzimas que incluyen, entre otras, la CBS, CTH y MPST, incluyen múltiples formas entre las que encontramos los tiosulfatos, persulfuros, trisulfuros, politionatos y el azufre elemental (Fig. 9). En todos estos compuestos se encuentra almacenado sulfuro, que es liberado en forma de H<sub>2</sub>S en condiciones reductoras como el exceso de glutatión (GSH) o en situaciones de alcalinidad celular (65).

### 2.2.3 *Efectos fisiológicos en el organismo*

El H<sub>2</sub>S atraviesa fácilmente las membranas celulares sin necesidad de proteínas transportadoras ejerciendo una gran variedad de funciones en múltiples dianas biológicas. Estas interacciones, sin embargo, pueden resultar en efectos citotóxicos o citoprotectores, una variación que depende fundamentalmente de las concentraciones del H<sub>2</sub>S (59).

Los efectos de este compuesto estudiados hasta ahora apuntan a que la concentración que ejerce funciones protectoras está dentro de un rango micromolar, y que estos bajos niveles de H<sub>2</sub>S tienen unos efectos significativos en múltiples sistemas fisiológicos y también patológicos. Sin embargo, actualmente, donde más referencias encontramos del H<sub>2</sub>S es en el sistema nervioso y cardiovascular, probablemente debido a que este compuesto está íntimamente relacionado con la regulación de la presión arterial. Por tanto tiene sentido que sea en estos sistemas donde parece ejercer los mayores efectos y producir las alteraciones más frecuentes.

En general, los estudios realizados demuestran que el H<sub>2</sub>S, a bajas concentraciones (entre 50 y 160 μM) está presente de forma endógena en el cerebro humano. Estas concentraciones fisiológicas potencian la actividad del receptor N-metil-D-aspartato

poniendo en marcha el mecanismo de inducción de la potenciación a largo plazo (*LTP*), por lo que se le acepta como neuromodulador a nivel del sistema nervioso central (56,66).

Por otro lado, las investigaciones recientes, tanto en inflamación como en estrés oxidativo sobre células nerviosas, demuestran que las concentraciones bajas de H<sub>2</sub>S exógeno tienen un efecto neuroprotector, aumentando los niveles de GSH inhibido por glutamato (66-68). Por otro lado, Li *et al.* demuestran la importancia de las concentraciones moderadas de H<sub>2</sub>S frente a concentraciones más altas para obtener un efecto citoprotector en isquemia cerebral (69).

En 1997 se demostró que el H<sub>2</sub>S tiene un efecto vaso relajante a nivel de arteria aórtica de rata *in vitro* (70), lo que más adelante en 2001, dio lugar a que se evidenciara que concentraciones de 300 µM de H<sub>2</sub>S administrado intravenoso producen una disminución transitoria pero significativa de la presión arterial media. Además, también se concluyó que esta relajación está causada por una disminución en la resistencia de las arterias debido a un bloqueo de los canales de potasio dependientes de ATP (KATPc) (71). En este mismo estudio se mostró una relajación de la arteria aorta a concentraciones entre 18 y 60 µM. Aunque otros estudios reportaron unas concentraciones plasmáticas de H<sub>2</sub>S en ratas de aproximadamente 10 µM (72), ellos encontraron niveles de aproximadamente 50 µM.

Siguiendo esta misma línea, en 2004 se comprobó en un modelo de shock hemorrágico en rata, que la hipotensión encontrada en dicho modelo se debe en parte a una concentración más elevada de H<sub>2</sub>S con respecto a la concentración basal, y que el bloqueo de la síntesis de éste producía un aumento de la presión arterial media, recuperándose también la frecuencia cardiaca (73).

### 2.2.4 *Efectos sobre diferentes patologías*

El rol del H<sub>2</sub>S en diferentes tejidos y patologías, a pesar de haber sido bastante estudiado, todavía suscita bastante controversia. Y es que, aunque la mayoría de los artículos publicados sugieren que conduce a una reducción de agentes oxidantes e inflamatorios (74,75), algunos autores encuentran un efecto pro-inflamatorio y tóxico en ciertas patologías (53,76).

Concretamente se comprobó en pacientes sépticos que los niveles plasmáticos de H<sub>2</sub>S en esta patología aumentan de forma significativa de ~50 μM a ~150 μM (77), y que la adición de inhibidores de su producción en un modelo endotóxico de sepsis en ratas tiene un efecto protector frente al daño inflamatorio producido por la adición de lipopolisacárido (LPS). Otros autores también describen efectos inflamatorios (74,78-80). En células musculares de los vasos sanguíneos se encontró que el H<sub>2</sub>S potenciaba la producción de *iNOS* y *NO* inducidos por IL-1β (81). También se describió un efecto pro-inflamatorio al administrar NaSH en las patas de las ratas (79), la inhibición del H<sub>2</sub>S protegió a ratones frente a la pancreatitis aguda y el daño pulmonar asociado (78) y también en un estudio de daño renal inducido por cisplatino se obtuvieron los mismos resultados (80).

Por el contrario, la administración exógena y la producción endógena de H<sub>2</sub>S también han demostrado ser anti-inflamatorias. En un modelo de inflamación pulmonar aguda con ácido oleico en ratas, se encontró una disminución de los niveles de H<sub>2</sub>S tanto en plasma como en tejido pulmonar, y una reducción de las interleuquinas 6 y 8 (junto con un aumento de la IL-10) (82) en la administración conjunta de ácido oleico y H<sub>2</sub>S (NaSH 56 μM). Esto sugiere un efecto anti-inflamatorio en el daño pulmonar intrínseco, como también se demostró (83) en un modelo de exposición al humo de tabaco en el que la administración de NaSH (14 μg/kg) produce un efecto anti-inflamatorio, disminuyendo, entre otras cosas los niveles de *TNFα* e IL-8 en ratas. Fiorucci *et al.* (84) también encuentran que una dosis de NaSH de 10 μM/kg en ratas produce una disminución del 60-70% en el daño de la mucosa gástrica, y que el H<sub>2</sub>S parece ser un regulador fisiológico de la microcirculación gástrica. Otro estudio encontró (85) resultados en el mismo sentido en la inducción de colitis en ratas, concluyendo que la inhibición de la producción del H<sub>2</sub>S tiene un efecto negativo sobre el desarrollo de la enfermedad, y la pérdida de peso, el sangrado intestinal y la consistencia de las heces mejoran con la adición de H<sub>2</sub>S respecto a su bloqueo.

#### 2.2.5 Estudios del sulfuro de hidrógeno en las enfermedades reumáticas

A pesar de que los efectos del agua sulfurada sobre la OA están descritos desde hace tiempo, los estudios del mecanismo de acción y los efectos concretos del H<sub>2</sub>S en las enfermedades reumáticas son relativamente recientes. En 2010, un relevante estudio realizado por Whiteman *et al.* encontraron que, aunque los niveles de H<sub>2</sub>S son similares

en plasma de pacientes sanos, pacientes con artritis reumatoide (*rheumatoid arthritis*, RA) o con OA (~37  $\mu\text{M}$ ) existen diferencias significativas entre los niveles endógenos de  $\text{H}_2\text{S}$  en el líquido sinovial. Estos fueron mucho mayores en pacientes con RA (~62  $\mu\text{M}$ ) frente a pacientes con OA (~25  $\mu\text{M}$ ) (86). Además, un dato muy interesante es que dentro del grupo de pacientes con RA aquellos que poseían el factor reumatoide positivo tenían, comparativamente, los niveles más bajos de  $\text{H}_2\text{S}$ . En este estudio, el grupo de Whiteman concluye que los niveles del  $\text{H}_2\text{S}$  están íntimamente relacionados con el proceso inflamatorio, sin saber aun si corresponde a un aumento pro-inflamatorio o anti-inflamatorio.

Posteriormente se demostró la expresión de las enzimas de producción de  $\text{H}_2\text{S}$  en condrocitos y células madre mesenquimales diferenciadas a condrocitos y que el uso *in vitro* de un compuesto liberador de  $\text{H}_2\text{S}$  puede reducir la muerte celular inducida por estrés oxidativo en estas células (87). Este estudio también sugiere que la síntesis del  $\text{H}_2\text{S}$  asociada a la inflamación está regulada a través de *NF $\kappa$ B*, p38 y *ERK1*.

Ya en 2013 Li *et al.* (88), cuyos estudios previos habían descrito un efecto inflamatorio del  $\text{H}_2\text{S}$ , utilizan otro compuesto liberador de  $\text{H}_2\text{S}$ , el (*p-methoxyphenyl*) *morpholino-phosphinodithioic acid* (GYY4137, GYY) en sinoviocitos y condrocitos humanos, y en un modelo animal de OA en ratas. En el estudio *in vitro* concluyen que el  $\text{H}_2\text{S}$  tiene un efecto anti-inflamatorio inhibiendo *NO*, *PGE<sub>2</sub>*, *TNF $\alpha$* , *IL-6*, *iNOS* y *COX-2* y que uno de los blancos probables de actuación del mismo es la inhibición de *NF $\kappa$ B*. *In vivo*, sus estudios llegan a la misma conclusión, aportando un dato interesante y es que el GYY4137 tiene un buen efecto anti-inflamatorio cuando se administra de forma terapéutica, una vez establecida la inflamación, pero tiene efectos pro-inflamatorios cuando se hace de forma profiláctica.

### 2.3. La aplicación actual del sulfuro de hidrógeno: La balneoterapia

La historia de la civilización supone una mención constante al agua, como forma de vida, como parte de la sociedad y como método de curación. En la era a.C casi todas las ciudades del antiguo Egipto, Roma o Grecia disponían de un espacio público dedicado al agua con una importante función terapéutica.

Tras un periodo de relativo abandono durante la Edad Media, en el Renacimiento comienza a resurgir el uso de las aguas minerales alcanzando a finales del siglo XIX y principios del XX un gran auge.

En España en 1939, al término de la guerra civil, la mayoría de los balnearios no reabren sus puertas lo que supuso un duro mazazo al termalismo del que tardaría décadas en recuperarse. En los años 60, se produce un pequeño impulso de esta terapia, sin embargo, la frecuencia de la utilización de los baños sigue siendo escasa.

En la mayor parte de los países de Europa incluyendo Rusia, los tratamientos en balnearios son incorporados a las prestaciones sanitarias de la Seguridad Social a partir de mediados de los años 40 continuando hasta la actualidad con un amplio uso en la terapéutica de las enfermedades reumáticas especialmente. La balneoterapia es definida en los países europeos como el uso de aguas minerales naturales, peloides naturales y barros, fuentes naturales de diferentes gases (dióxido de carbono, hidrógeno sulfurado), en la prevención, tratamiento y rehabilitación de diversas afecciones médicas. Se utilizan las aguas minerales, peloides y gases bajo diferentes técnicas de aplicación: baños, inhalaciones, ingestión y aplicación de emplastos de peloides (89).

En España a principios de 1990 la aparición del programa IMSERSO (Instituto de Mayores y Servicios Sociales) facilita el acceso de las personas mayores a tratamientos en balnearios, lo que supone una renovación necesaria de muchos establecimientos. A partir de entonces aparece un incremento en el uso de los balnearios, tanto con fines terapéuticos como con fines lúdicos, incremento que ha continuado hasta nuestros días.

Sin embargo, aunque como vemos su uso se remonta a la antigüedad, los estudios sobre sus mecanismos de acción como método coadyuvante en el tratamiento de las enfermedades, y en concreto en las enfermedades reumáticas, apenas tienen unos años (33,90-92).

Actualmente hay una gran cantidad de aguas mineromedicinales, clasificándose en función de su origen, temperatura, mineralización, acción fisiológica, actividad terapéutica...etc. Una de las clasificaciones más utilizadas en el ámbito de la balneoterapia se hace por su composición química, pudiendo ser aguas de tipo clorurada, sulfatada, bicarbonatada, sulfuradas, carbogaseosas, radiactivas o de mineralización débil. A cada una de estas aguas se les atribuyen unas funciones

diferentes dentro del organismo, siendo las cloruradas estimulantes, las bicarbonatadas hepatoprotectoras y antiácidas y las radiactivas analgésicas, como ejemplos.

Algunas de estas aguas están especialmente indicadas para el campo de la reumatología, como el agua cuyo principio activo es el H<sub>2</sub>S. En concreto, respecto a este agua se pueden encontrar algunos estudios que sustentan sus efectos beneficiosos sobre la OA y otras enfermedades reumáticas, observándose no solamente una mejora sintomática en los pacientes sometidos a balneoterapia en aguas sulfuradas (91,93) si no también disminución de los marcadores de inflamación y de degradación del cartílago articular (90,94).

### **2.4. Balneoterapia y sulfuro de hidrógeno: Actualidad en la artrosis**

El efecto beneficioso de la balneoterapia en las enfermedades reumáticas se conoce desde hace siglos, siendo utilizada como remedio terapéutico desde la antigüedad en diferentes países y culturas. Actualmente, en varios países europeos, la balneoterapia se utiliza de una manera sistemática como método coadyuvante de tratamiento de las enfermedades reumáticas en fase no aguda, por su eficacia en la resolución de la sintomatología dolorosa y en la disminución de la reacción inflamatoria que acompaña el proceso de deterioro y de destrucción cartilaginosa de estas enfermedades (90,91). Sin embargo, como muchos estudios clínicos describen, la balneoterapia en aguas sulfuradas, aunque efectiva por sí sola, tiene aún mayor eficacia cuando se aplica en conjunto con un tratamiento de peloterapia con peloides de componentes sulfurados o con hidropinoterapia con agua sulfurada (90,95). La peloterapia, en patología reumática crónica, consiste en la aplicación local mediante emplastos sobre las zonas afectadas, o bien la inmersión de todo el cuerpo en el peloide a temperatura elevada (39-48°C), por 20-30 min, durante 12-15 días de tratamiento. Aunque se le atribuye desde hace tiempo una acción beneficiosa a los peloides en patología reumática y enfermedades músculo-esqueléticas, es a partir de 1990 cuando se llevan a cabo los principales estudios que nos permiten empezar a comprender los mecanismos biológicos a través de los cuales se producen sus acciones (96).

En los últimos años se han realizado estudios con resultados positivos en la mejoría de la sintomatología de la OA con balneoterapia (94,97-101) y la revisión Cochrane, realizada por Verhagen en 2007 (102), resuelve que los datos obtenidos hasta el momento aunque no son concluyentes indican que este tratamiento podría ser efectivo.

Además, centrándonos en los estudios realizados únicamente con aguas sulfuradas tanto en balneoterapia, peloterapia, como en agua bebida en pacientes con *OA* revelan que estas aguas aumentan los niveles de  $H_2S$  en plasma tras los tres tipos de tratamientos en conjunto (90) y que en general tienen un efecto anti-oxidante (90,103,104), mejoran la movilidad y la calidad de vida de los pacientes (95).





# **JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS**

---



La *OA* es una de las enfermedades más prevalentes e incapacitantes del mundo desarrollado. Si bien, en una articulación afectada todos los tejidos intervienen, la degeneración del cartílago articular es el punto clave en el desarrollo de la patología. El cartílago articular es un tejido conectivo especializado compuesto por una pequeña proporción de células, los condrocitos, que son responsables de la síntesis de la MEC. Esta matriz está compuesta por una densa red de colágeno tipo II, proteoglicanos y, principalmente, agua. Toda esta matriz es sintetizada por los condrocitos que, al producirla, quedan embebidos en ella (2,4,105).

El desarrollo de la *OA* supone la degradación de los tejidos articulares y, aunque su etiología aún no se conoce completamente y se sabe que son muchas las causas que actúan en el proceso, la mayor parte de los factores que intervienen sí son conocidos y se utilizan como diana en el tratamiento de la *OA*. Entre ellos, se encuentra un proceso inflamatorio persistente que acelera la degradación del cartílago articular. En esta vía inflamatoria intervienen muchos factores, y el resultado final es la presencia de niveles anormalmente elevados de citoquinas tales como la IL-1 $\beta$  y la IL-6, la sobreproducción de prostaglandinas, fundamentalmente la PGE<sub>2</sub> y la sobreproducción de *MMPs* tales como la colagenasa 3 (*MMP13*) o la estromelisina (*MMP3*) que, globalmente, actúan destruyendo la MEC (40-43). Otro de los factores más importantes es la producción de *NO*, que también contribuye a la degradación del cartílago articular ya que actúa destruyendo la MEC y produciendo la muerte celular de los condrocitos y cuya concentración en articulaciones *OA* es mucho mayor que en articulaciones sanas, donde su síntesis es mínima.

En resumen, la *OA* está caracterizada por una pérdida progresiva del cartílago articular que afecta a la calidad de vida de quienes la padecen ya que resulta en un dolor intenso, pérdida de función de la articulación afectada, inestabilidad, discapacidad física y, como consecuencia, la imposibilidad de realizar una vida normal. Esta enfermedad afecta al 34% de la población mayor de 65 años en países industrializados suponiendo un impacto económico muy fuerte para un país y, lo que es más importante, una condición de discapacidad física y muchas veces emocional para una persona.

Actualmente no existe ningún tratamiento que cure o cuando menos detenga la progresión de la *OA*. Los tratamientos existentes se basan en una combinación de terapia física y terapia farmacológica analgésica e anti-inflamatoria que, en muchos

casos tiene efectos secundarios indeseados. Es más, para muchos pacientes la progresión de la enfermedad termina irremediablemente en la necesidad de una operación de reemplazo articular con una prótesis.

Un tratamiento en exploración actualmente es la balneoterapia, y más concretamente, el uso de aguas minero medicinales sulfuradas, si bien el mecanismo de acción por el cual son capaces de aliviar patologías como la *OA* aún es desconocido. Sin embargo, el  $H_2S$ , que es el componente principal de estas aguas, ha sido identificado recientemente como un gas endógeno producido en el organismo a través de tres enzimas, la CBS, la CTH y la MPST (59,61). Este gas pertenece a la misma familia de gases transmisores que el *NO* y el *CO*, y como ellos, es un gas nocivo para el ser humano a concentraciones elevadas, mientras que, según recientes estudios tiene un efecto citoprotector a bajas concentraciones (106,107).

Actualmente, si bien su papel aún no está totalmente claro, hay algunos estudios que apuntan a que tiene una función importante en procesos inflamatorios (75,108,109) y que podría ser tanto una diana terapéutica como un tratamiento de elección en enfermedades con carácter inflamatorio como es el caso de la *OA*.

Por todo esto, para desarrollar esta tesis, se han planteado las siguientes hipótesis:

- El  $H_2S$  se produce de forma endógena en los tejidos de la articulación y en tejidos con *OA* su producción está disminuida respecto a la situación normal.
- El  $H_2S$  es un compuesto que, administrado de forma exógena, es capaz de disminuir los marcadores de la inflamación en condrocitos articulares obtenidos de articulaciones *OA*.
- La administración exógena de  $H_2S$  también es capaz de proteger frente a la evolución del metabolismo catabólico a los condrocitos articulares de articulaciones *OA* y comportarse como un compuesto anti-oxidante.

# **OBJETIVOS**

---



## OBJETIVOS GENERALES

1. Determinar la concentración endógena de H<sub>2</sub>S en suero y su biosíntesis en cartílago de pacientes con *OA* y compararla con la de donantes sanos.
2. Analizar el efecto de la administración exógena de diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>S, *in vitro*, en el proceso de la *OA*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la concentración de H<sub>2</sub>S en suero sanguíneo.
2. Comparar los valores obtenidos en sueros de pacientes *OA* con los de donantes sanos.
3. Cuantificar la biosíntesis de H<sub>2</sub>S en cartílago articular de pacientes *OA* y compararla con la de cartílago de donantes sanos.
4. Comparar la expresión de las enzimas CBS, CTH y MPST, productoras de H<sub>2</sub>S, en cartílago articular, membrana sinovial y hueso subcondral de pacientes *OA* con la de tejido de donantes sanos.
5. Estudiar el efecto del H<sub>2</sub>S exógeno sobre el estrés oxidativo en condrocitos articulares *OA*.
6. Determinar la capacidad anti-inflamatoria de diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>S exógeno en condrocitos *OA* sobre diferentes marcadores de la inflamación.
7. Evaluar si la ruta *NFκB* puede estar implicada en los efectos de H<sub>2</sub>S exógeno sobre condrocitos *OA*.
8. Evaluar si las diferentes concentraciones del H<sub>2</sub>S exógeno ejercen efectos anti-catabólicos en condrocitos *OA*.
9. Analizar el efecto protector del H<sub>2</sub>S exógeno frente a la degradación de la MEC articular en cartílago *OA*.
10. Analizar el efecto protector del H<sub>2</sub>S exógeno frente a la degradación de la MEC articular en cartílago sano.





# **MATERIALES Y MÉTODOS**

---



## **1. MATERIALES**

### *Cultivos celulares*

- El medio de cultivo: *Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM)*, el suero bovino fetal (SBF) y la penicilina/estreptomicina (100 u/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina, P/E) se adquirieron en Gibco, España.
- Los frascos de cultivo y el resto de los fungibles plásticos para cultivo celular que se utilizaron fueron de BD *Bioscience*, España.
- El hidrosulfuro sódico (NaSH), la IL-1β, la tripsina 10x (5 g de tripsina porcina + 2 g de EDTA 4Na por litro de 0,9% NaCl), la colagenasa IV, el salicilato de sodio y el ácido ascórbico se compraron a Sigma-Aldrich Química S.A, España. El GYY4137 se adquirió a *Santa Cruz Biotechnology*, Alemania.
- El estereomicroscopio que se utilizó para visualizar algunas muestras fue el SMZ445 de Nikon, España.

### *Test de Viabilidad*

- El *AlamarBlue*® se adquirió a *Invitrogen S.A.*, España y el espectrofotómetro utilizado fue el *Nanoquant Infinite M200* de Tecan Ibérica Instrumentación, España.

### *Análisis de NO*

- El reactivo de Griess utilizado fue Enzo *Life Science*, España.
- El nitrito sódico (NaNO<sub>2</sub>) fue a Sigma-Aldrich Química S.A, España.

### *Inmunoensayos y ELISAs*

- El inmunoensayo enzimático (*Enzymatic Immunoassay, EIA*) para PGE<sub>2</sub> se compró a GE *Healthcare*, España y el de glucosaminoglicanos es un kit (*Blyscan Sulfated Glycosaminoglycan Assay*) de Biocolor, Reino Unido y los ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (*enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*) para *MMP13* e IL-6 se compraron de *R&D systems*, España.
- Para deshidratar las muestras se utilizó una *SpeedVac* (Savant SPD121P *SpeedVac Concentrator, Thermo Scientific, España*) y la papaína es de Panreac-Química, España.
- El acetato de sodio, el *EDTA* y la cisteína HCl utilizados para preparar la dilución de papaína se compraron a Sigma-Aldrich Química S.A.

*Medición de H<sub>2</sub>S*

- El electrodo ión selectivo utilizado para las mediciones de H<sub>2</sub>S fue el modelo LIS-146AGSCM *Micro sulfide ion electrode*, Lazar Research Laboratory, Inc. EEUU, acoplado a un medidor portátil de pH, voltaje y temperatura (*Model 6230N Jenco Electronics*, LTD Taiwán). El Na<sub>2</sub>S utilizado para este proceso se adquirió a Sigma-Aldrich Química S.A.

*Análisis de ROS*

- Para las citometrias de flujo se utilizó el citómetro BD FACScalibur de *BD Bioscience*, con el programa informático *Cell Quest Pro* de Beckton Dickinson, Mountain View, EEUU. La solución salina balanceada de Hank (*HBSS*) se compró a *Invitrogen S.A.*, España y el 1 fluoroforo utilizado fue el MitoSox™Red de *Life Technologies*, España.

*Análisis de la expresión génica por qRT-PCR.*

Los reactivos y equipos utilizados para el análisis de la expresión génica fueron los siguientes:

- RNaseZap® y TRIZol® y Superscript® Vilo™ *cDNA Synthesis Kit Life technologies*.
- QIAzol lysis reagent®, Qiagen, España.
- Ultra-Turrax: IKA T10, España.
- Termociclador a tiempo real: LightCycler® 480 Instrument, LightCycler® 480 Probes Master, sondas Taqman y agua: H<sub>2</sub>O PCR Grade de Roche, Alemania.
- Espectrofotómetro: NanoDrop™ *Thermo Scientific*.
- Bioanalizador Agilent 2000 y Dnasa de *Agilent Technologies* España.
- Termociclador Gene Amp PCR System 9700, *Applied Biosystems*, España.

*Tinciones, inmunocitoquímicas (ICQ) e inmunohistoquímicas (IHQ) e inmunofluorescencia (IF)*

- Los anticuerpos utilizados se describen en la [Tabla 1](#).
- El anticuerpo de NFκB se adquirió a *Santa Cruz Biotechnology*, Alemania.
- Los reactivos para inmunocitoquímica e inmunohistoquímica se adquirieron de *Dako*, España.

- De los reactivos de tinción, la eosina, el sulfato amónico férrico, el cloruro férrico, la fucsina ácida, el ponceau, ácido fosfomolibdico y el azul de anilina, además del hidróxido sódico eran de Merck, Alemania. La safranina O de Sigma-Aldrich. La hematoxilina de Harris, el ácido clorhídrico, el ácido pícrico y el ácido acético eran de Panreac Química S.A y la hematoxilina férrica fue de Fluka, España. El DePex se compró a Gurr® VWR *International Eurolab S.L*, España y el Glycergel® a Dako, España.

**Tabla 1: Anticuerpos utilizados en las tinciones IHQ e ICQ.**

<i>Anticuerpo</i>		<i>Clon Isotipo</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Pre-tratamiento</i>	<i>Dilución (IHQ)</i>	<i>Dilución (ICC)</i>
<i>COL I</i>	<i>Mouse monoclonal</i>	COL-1 IgG1	Abcam®	Proteinasas K	1:100	1:100
<i>COL II</i>	<i>Mouse monoclonal</i>	5B2.5 IgG <sub>1</sub> κ	Abcam®	Condroitinasa ABC pH 8,0	1:25	1:25
<i>Agg</i>	<i>Mouse monoclonal</i>	BC-3 IgG	Abcam®	Condroitinasa ABC pH 6,8	1:50	1:50
<i>K-S</i>	<i>Mouse monoclonal</i>	4B3/D10 IgG <sub>1</sub>	<i>Santa cruz biotechnology</i>	Sin Pret.	1:100	1:100
<i>CH-S</i>	<i>Mouse monoclonal</i>	CS-56 IgM	Abcam®	Condroitinasa ABC pH 6,8	1:100	1:100
<i>MMP3</i>	<i>Mouse monoclonal</i>	SL-1 IID4 IgG2b	<i>Millipore</i>	Condroitinasa ABC pH 6,8	1:25	1:50
<i>MMP13</i>	<i>Mouse monoclonal</i>	VIIIA2 IgG1 κ	<i>Thermo Scientific</i>	Proteinasas K	1:50	1:40
<i>iNOS</i>	<i>Rabbit policlonal</i>	Policlonal IgG	Abcam®	Tritón X-100 al 0,1% 5min	1:500	1:500
<i>CBS</i>	<i>Mouse monoclonal</i>	Recombinante IgG2a	Abcam®	TRIS- EDTA PH: 9	1:500	-
<i>CTH</i>	<i>Mouse monoclonal</i>	Recombinante IgG1	Abcam®	TRIS- EDTA PH: 9	1:500	-
<i>MPST</i>	<i>Mouse monoclonal</i>	H-11 IgG1	<i>Santa cruz biotechnology</i>	TRIS- EDTA PH: 9	1:500	-

## **2. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS**

---

Todas las muestras de tejido humano se obtuvieron, tras la adquisición del correspondiente consentimiento informado (Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica), de pacientes sometidos a operaciones de sustitución articular ocasionadas por *OA* o fracturas, o de amputaciones supracondíleas (generalmente ocasionadas por problemas vasculares) realizadas en el Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC). Las muestras de suero sanguíneo se obtuvieron de pacientes *OA* del Servicio de Reumatología del CHUAC o bien de voluntarios sin antecedentes de patologías reumáticas, también tras la obtención del correspondiente consentimiento informado. En todos los casos se garantizó la confidencialidad de los datos identificativos de dichos pacientes, de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. La denominación de células o tejido *OA* hace referencia a aquellos obtenidos de pacientes con *OA* diagnosticada y la denominación de células o tejido normal o sano (N) hace referencia a aquellos obtenidos de donantes sin antecedentes de patología artrósica y sin signos macroscópicos y microscópicos de *OA*.

### **2.1. Obtención de cartílago articular**

Los explantes de cartílago articular se obtuvieron de las cabezas o cóndilos femorales y patillos tibiales mediante resección con bisturí, primero formando láminas gruesas y posteriormente cortando piezas cilíndricas con un disco de biopsia de 4 o 6 mm de diámetro, en función de para qué experimento se fueran a utilizar.

### **2.2. Obtención y cultivo de condrocitos**

El aislamiento de los condrocitos se realizó según el método descrito por Blanco *et al.* (40). El cartílago aislado, se troceó de forma mecánica, y se sometió a una primera digestión con una dilución 1:9 de tripsina-EDTA 10x en DMEM con P/E (tripsina 1X) durante 15 min a 37°C. Tras eliminar la tripsina, se realizó una segunda digestión enzimática con 2 mg/ml de colagenasa tipo IV durante un mínimo de 8 h en agitación en medio DMEM con 5% de SBF y P/E. Una vez finalizada la digestión, se centrifugó a 1800 x g, 10 min y las células se contaron, sembrándose en frascos de cultivo en medio de expansión (ME, DMEM con 10% de SBF suplementado con P/E) y se cultivaron a 37°C en una estufa humidificada y con 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez alcanzada la confluencia, las células sembradas se expandieron a mayor superficie, separándolas del frasco con

una dilución 1:4 de tripsina 10x en suero salino y volviéndolas a resembrar en mayor número de frascos de cultivo. Todos los experimentos se realizaron en el segundo pase.

### **2.3. Obtención de membrana sinovial**

La membrana sinovial se obtuvo de rodillas procedentes de amputaciones supracondíleas mediante la disección manual y su separación mediante bisturí del resto de los tejidos articulares. A todas las muestras se les realizó un *screening* morfológico previo, realizando una tinción hematoxilina – eosina (H-E) a un pequeño fragmento de la misma, para comprobar que el tejido era, de hecho, membrana sinovial. El resto de tejido se congeló en nitrógeno líquido para la extracción de ácido ribonucleico (ARN).

### **2.4. Obtención del hueso subcondral**

El hueso subcondral se obtuvo de los platillos tibiales provenientes de cirugía de reemplazo articular. Se realizó la resección del cartílago articular remanente en la parte superior y la eliminación del hueso esponjoso de la parte inferior con la utilización de un bisturí. La manipulación del hueso se hizo en frío confirmando la completa eliminación de cartílago, hueso esponjoso, sangre y médula ósea mediante la observación con un estereomicroscopio.

### **2.5. Línea celular T/C-28a2**

Para los experimentos de citometría se realizaron unas pruebas preliminares utilizando la línea celular T/C-28a2. Se trata de una línea de condrocitos humanos inmortalizados provenientes de articulación costo-esternal (110).

### **2.6. Obtención de suero sanguíneo**

El suero sanguíneo humano se obtuvo de donaciones de sangre de voluntarios sin síntomas ni historial de artrosis y de pacientes con artrosis diagnosticada en cualquier articulación. Para obtener suero sanguíneo se extrajo sangre periférica de los donantes en tubos con gel separador de suero Vacuette. Los tubos se centrifugaron a  $900 \times g$  durante 10 min y se recogieron los sueros de la parte superior del gel.

### **3. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SULFURO DE HIDRÓGENO ENDÓGENO**

---

#### **3.1. Medición de la concentración de sulfuro de hidrógeno en suero sanguíneo humano**

Para la medición del H<sub>2</sub>S en sueros se utilizó un micro-electrodo ion-selectivo. El electrodo proporciona medidas de voltaje que se pueden convertir en concentraciones de H<sub>2</sub>S utilizando una curva de calibrado de Na<sub>2</sub>S.

Se prepararon los siguientes reactivos según las instrucciones especificadas en el electrodo:

- Tampón anti-oxidante: 50 g de salicilato de sodio + 13 g de ácido ascórbico + 17 g de hidróxido de sodio enrasado a 125 ml de agua destilada (solución *stock*). Esta es una solución básica, como recomienda el fabricante, para prevenir la formación del gas H<sub>2</sub>S a concentraciones tóxicas. La solución de trabajo se preparó diluyendo la solución *stock* en agua destilada en dilución 1:4 y esta es la que se utilizó para diluir tanto los estándares de la curva de calibrado como las muestras.
- Soluciones para la curva de calibrado: Se preparó una disolución *stock* 10 mM de Na<sub>2</sub>S a partir de la cual se prepararon diluciones para una curva estándar con concentraciones de 1 mM, 500 μM, 200 μM, 100 μM, 50 μM, 10 μM y 1 μM.

Las muestras de suero sanguíneo se introdujeron en tubos de poliestireno y se diluyeron con la solución de trabajo del buffer anti-oxidante descrita previamente en una relación 1:1. Los tubos se sellaron cuidadosamente con parafilm y se incubaron a 37°C durante 1 h. Pasado este tiempo se sumergió el electrodo selectivo en las muestras, obteniéndose un valor de voltaje para cada una. Entre muestras el electrodo se lavó abundantemente con agua destilada. Para estimar la cantidad de H<sub>2</sub>S producida se utilizó la curva de calibrado.

Se compararon las concentraciones obtenidas en los sueros procedentes de pacientes con OA con las de donantes sanos.

#### **3.2. Biosíntesis de sulfuro de hidrógeno en cartílago**

El cartílago se extrajo tal y como se describió en el apartado 2.1 de obtención y procesado de las muestras, utilizando explantes de 6 mm de diámetro. Estos se



introdujeron en tubos de poliestireno con 200 µl de la solución de trabajo del tampón anti-oxidante descrita previamente.

Los tubos se sellaron cuidadosamente con parafilm y se incubaron a 37°C durante 2 h. Pasado este tiempo se tomaron las medidas con el electrodo selectivo y se utilizó la curva de calibrado correspondiente para calcular la concentración de H<sub>2</sub>S.

Se compararon las concentraciones de H<sub>2</sub>S obtenidas de los cartílagos procedentes de articulaciones artrósicas frente a los procedentes de articulaciones sanas.

#### **4. CONDICIONES DE LOS EXPERIMENTOS *IN VITRO***

---

Las condiciones en las que se realizaron los distintos experimentos *in vitro* están resumidas en la [Tabla 2](#). Los condrocitos utilizados se sembraron con la densidad adecuada para cada experimento en ME, dejándolos 24 h de adaptación previas a la administración de los estímulos. Los discos de cartílago también se dejaron en ME durante 24 h antes de la estimulación. Los estímulos se administraron en medio deplecionado (MD, *DMEM* con 0,5% de SBF y P/E), excepto para los experimentos de citometría de flujo que se administraron en *HBSS* sin calcio ni magnesio, y fueron:

- IL-1β: Los condrocitos y discos de cartílago se estimularon con una concentración de 5 ng/ml de IL-1β en el medio de cultivo, para reproducir *in vitro* las condiciones de la *OA* en su fase aguda.
- NaSH y GYY4137: Se utilizaron concentraciones de 50, 100, 200, 500 y 1000 µM de estos compuestos para intentar contrarrestar los efectos negativos inducidos en las células o en el tejido por la IL-1β.

Con carácter general, las células se estimularon durante un tiempo de 48 h hasta el análisis de los resultados. Las excepciones fueron las siguientes:

- El estudio del efecto de los compuestos de sulfuro sobre la viabilidad celular, en el que las células se estimularon con NaSH y GYY4137 durante 24 h.
- El estudio de la translocación de *NFκB* al núcleo de los condrocitos mediante inmunofluorescencia, en el que el análisis se realizó 45 min post-estimulación.
- El estudio de las propiedades anti-oxidantes por citometría de flujo, en el que las células sólo se estimularon durante 15 min con GYY4137.

- La cuantificación de GAGs en sobrenadantes se midió a los 21 días, recogiendo y renovando los estímulos a los 3,7,14 y 21 días. A los 21 días se cuantificaron los GAGs, además de en los sobrenadantes, en los discos de tejido.

**Tabla 2: Resumen de las condiciones experimentales de los distintos ensayos *in vitro* realizados.**

Para todos los experimentos descritos en la tabla las células se incubaron en ME durante 24 h, el medio se cambió entonces a medio deplecionado (MD) (*DMEM* con 0,5% SBF y P/E) (excepto para los experimentos de citometría de flujo, que se utilizó *HBSS* sin calcio ni magnesio) con las diferentes concentraciones de compuestos de H<sub>2</sub>S (NaSH o GYY4137), 0 (Basal), 50, 100, 200, 500 y 1000 μM, y con o sin 5 ng/ml de IL-1β durante el tiempo de incubación adicional especificado en la tabla. c/p, células por pocillo.

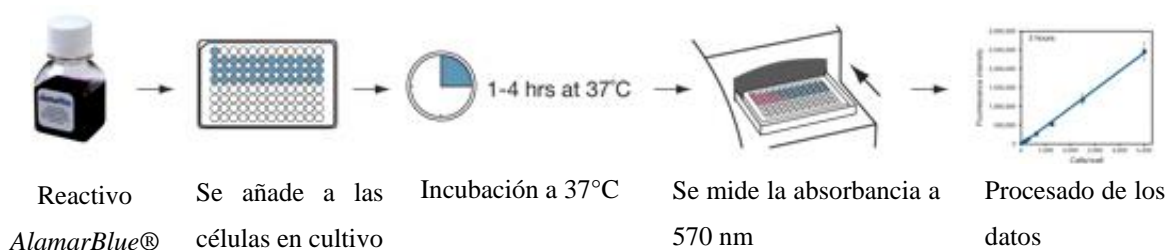
Ensayo	Densidad celular	Cultivo	Tiempo de incubación	Estímulos
Viabilidad celular	5·10 <sup>4</sup> c/p	Placa de 96 pocillos	24 h	Basal y (NaSH o GYY4137)
Cuantificación de <i>NO</i>	5·10 <sup>4</sup> c/p	Placa de 96 pocillos	48 h	Basal y 5 ng/mL IL-1β + (NaSH o GYY4137)
Inmunocitoquímicas (ICQ)	3·10 <sup>4</sup> c/p	<i>Chamber-slides</i> de 8 pocillos	48 h	Basal y 5 ng/mL IL-1β + (NaSH o GYY)
Inmunofluorescencia (IF)	3·10 <sup>4</sup> c/p	<i>Chamber-slides</i> de 8 pocillos	45 min	Basal y 5 ng/mL IL-1β + (NaSH o GYY4137)
<i>EIAs</i> y <i>ELISAs</i>	5·10 <sup>4</sup> c/p	Placa de 96 pocillos	48 h	Basal y 5 ng/mL IL-1β + (NaSH o GYY4137)
<i>qRT-PCR</i>	3·10 <sup>5</sup> c/p	Placa de 12 pocillos	48 h	Basal y 5 ng/mL IL-1β + (NaSH o GYY4137)
Citometría de flujo	10 <sup>5</sup> c/p	Placa de 6 pocillos	15 min	Basal y 5 ng/mL IL-1β + (NaSH o GYY4137)
Cuantificación de GAGs en tejido	2 discos	Placa de 24 pocillos	21 días	Basal y 5 ng/mL IL-1β + (NaSH o GYY4137)

## 5. ESTUDIO DE VIABILIDAD CELULAR

Para estudiar el efecto de los compuestos de sulfuro sobre la viabilidad celular de los condrocitos se utilizó el test *AlamarBlue*®, una técnica colorimétrica que evalúa la respiración celular (Fig. 10). *AlamarBlue*® es un reactivo cuyo principio activo es el resazurin, un compuesto no tóxico, permeable a las células y de color azul. El fundamento de este ensayo se basa en la capacidad de las células vivas de reducir el resazurin a resorufin, de color rojo intenso que puede medirse a una absorbancia de 570 nm.

Para este estudio, los condrocitos se sembraron en una placa de 96 pocillos, a una concentración de  $5 \cdot 10^4$  células por pocillo (c/p) en ME y, tras 24 h, se estimularon durante 24 h con las concentraciones de 50 a 1000  $\mu\text{M}$  en MD de cada uno de los compuestos de  $\text{H}_2\text{S}$ .

Tras este tiempo, se añadió *AlamarBlue*® al 10% (v/v) en cada pocillo, y se incubó durante 4 h adicionales en oscuridad a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . Se utilizó un espectrofotómetro para cuantificar la reacción colorimétrica a 570 nm con una longitud de onda de referencia de 600 nm. Cada condición se ensayó por duplicado. Este test se realizó con  $n=3$  donantes.



**Fig. 10: Resumen esquemático del ensayo viabilidad celular con *AlamarBlue*®.**

## **6. TÉCNICA DE CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE *qRT-PCR***

---

### **6.1. Extracción de ARN:**

#### *6.1.1 Cartílago*

Para la extracción de ARN, el cartílago articular se congeló en nitrógeno líquido en el momento de su obtención y todo el procesado se realizó a 4°C para impedir su degradación. Este procesado se divide en los siguientes pasos.

#### **Paso 1: Disgregación del tejido**

De cada muestra de cartílago articular se utilizaron de 100 a 130 mg que se machacaron manualmente usando un mortero metálico. Antes de machacar cada muestra, el mortero se limpió con RNAsas y se sumergió en nitrógeno líquido para mantenerlo frío durante todo el proceso. El polvo de cartílago obtenido se introdujo en un eppendorf de fondo redondo de 2 ml y se le añadió 1 ml de Qiazol®.

Para disgregar mejor cada muestra y romper los trozos más pequeños de cartílago provenientes del mortero, el cartílago sumergido en Qiazol®, se pasó por un disgregador Ultra-Turrax. Tras ello, esta mezcla se sometió a agitación circular durante 20 min a 4°C.

#### **Paso 2: Aislamiento y recuperación del ARN total**

En el siguiente paso se realizó una separación trifásica de ARN, ADN y proteínas mediante la adición de 0,2 ml de cloroformo, seguido de una centrifugación a 12000  $\times$  g durante 15 min, tras lo que se traspasó la fase con el ARN a un tubo *QIAshredder* de Qiagen. Este tubo tipo eppendorf consta de una membrana que filtra los restos insolubles y reduce la viscosidad. Se centrifugó entonces a 14000  $\times$  g durante 2 min, recuperando el eluido. Éste se lavó con etanol al 75% frío (4°C) y el eluido se transfirió a otro tubo *RNeasy mini spin* del kit. Los *RNeasy mini spin* se centrifugaron a 8000  $\times$  g durante 15 s, desechando el eluido y conservando lo retenido en la membrana. Se añadieron 700  $\mu$ l de tampón RW1 al tubo y se repitió la centrifugación, tirando el eluido y añadiendo 500  $\mu$ l de tampón RPE. Ambos tampones RW1 y RPE son específicos del kit de extracción de ARN. Tras centrifugar a 8000  $\times$  g 15 s, se volvieron a añadir 500  $\mu$ l de tampón RPE y se centrifugaron los tubos a 8000  $\times$  g 2 min, tirando el eluido. Se

añadieron entonces 30  $\mu$ l de agua para recoger el ARN en el eluido con una última centrifugación a 8000  $\times$  g durante 1 min.

### 6.1.2 *Condrocitos (células)*

Para la cuantificación de la expresión génica de los experimentos *in vitro*, la células se sembraron en placas de 6 pocillos con una densidad de  $3 \cdot 10^5$  c/p. Pasadas 24 h del sembrado, se co-estimularon durante 48 h con 5 ng/ml de IL-1 $\beta$  y las distintas concentraciones de los compuestos de sulfuro, excepto para la condición Basal, que no se estimuló. Para extraer el ARN de las células tras el tiempo de estimulación se utilizó el reactivo Trizol®. Primeramente, se lavaron las células con *PBS* para eliminar los restos de medio de cultivo y a continuación se añadieron 0,8 ml de Trizol® en cada pocillo. Tras romper las membranas celulares con ayuda de la pipeta, se trasladó el contenido de cada pocillo a un tubo eppendorf. Tras esperar 5 min a temperatura ambiente, se hizo una separación trifásica de ARN, ADN y proteínas mediante la adición de 0,2 ml de cloroformo. Se agitaron los tubos y se centrifugaron a 12000  $\times$  g 15 min a 4°C, tras lo que se traspasó la fase con el ARN a otro tubo. Se añadieron entonces 0,5 ml de isopropanol y 1  $\mu$ l de glicógeno para precipitar el ARN. Una vez precipitado, se descartó la fase isopropílica y se lavó el ARN con alcohol al 75% y absoluto, de forma consecutiva. Una vez eliminados los restos de alcohol por evaporación, se resuspendió el *pellet* en 10  $\mu$ l de agua.

### 6.1.3 *Membrana sinovial*

Para la extracción de ARN de la membrana sinovial, el tejido se congeló en nitrógeno líquido en el momento de su obtención y todo el procesado se realizó en hielo o a 4°C para impedir la degradación del ARN.

De cada muestra se utilizaron de 80 a 120 mg. Inicialmente se troceó manualmente con tijeras y posteriormente se procesó con el disgregador Ultra Turrax en Trizol®, hasta la completa disgregación macroscópica de la membrana. Los tubos se mantuvieron en agitación circular durante 20 min a 4°C y se comenzó la separación de fases con cloroformo, utilizando el mismo protocolo previamente descrito en la extracción de ARN de condrocitos (véase apartado 6.1.2).

#### 6.1.4 *Hueso subcondral*

Para la extracción de ARN del hueso subcondral se siguió el Paso 1 de la extracción a partir de cartílago, tras lo que se continuó de la misma manera que en la extracción de ARN de los condrocitos.

### 6.2. **Cuantificación y medidas de calidad del ARN**

Se comprobó la pureza y concentración del ARN con un espectrofotómetro *nanodrop* y su integridad mediante un bioanalizador *Agilent 2000*. Con el espectrofotómetro se midieron las absorbancias (A) a 280 nm, 260 nm y 230 nm para valorar la concentración de ARN (A260), la contaminación con proteínas (razón A260/A280) y la contaminación con sales y/o alcoholes (razón A260/A230). Con el bioanalizador se valoró la integridad del ARN obtenido y se confirmó su concentración, en base a la definición de las bandas electroforéticas correspondientes a las subunidades ribosomales 5S, 18S y 28S, y a la intensidad de la fluorescencia emitida, respectivamente.

### 6.3. **Síntesis de ADN complementario**

Al ARN obtenido se le trató con 1,5 µl por cada 500 ng de ARN de la enzima DNasa para eliminar el ADN genómico que pudiera contaminar la muestra. Para ello se incubó el ARN con la enzima durante 10 min a 37°C. Para la retrotranscripción en ADN complementario (ADNc) se utilizó el kit VILO™ y 500 ng de ARN (o bien todo el ARN disponible si la cantidad era menor de 500 ng) en cada reacción en un volumen total de 10 µl en el termociclador.

### 6.4. **Experimentos de *qRT-PCR***

Los experimentos de *PCR* cuantitativa a tiempo real se realizaron en un *LightCycler® 480 Instrument*, con *LightCycler® 480 Probes Master* y con sondas *Taqman*. Los cebadores utilizados se diseñaron utilizando la aplicación de Roche para diseño de ensayos ([www.universalprobelibrary.com](http://www.universalprobelibrary.com)). Los ensayos seleccionados se detallan en la [Tabla 3](#). Las reacciones de *PCR* consistieron en una pre-incubación (95°C, 10 min), (hasta) 45 ciclos de amplificación incluyendo incubación (10 s a 95°C), extensión (30 s a 60°C) y enfriamiento (1 s a 72°C), y una rampa final de enfriamiento (20 s a 40°C). Cada reacción contenía 2 µl de ADNc, 5 µl de *LightCycler® 480 Probes Master*, 0,35 µl de cebadores sentido y antisentido y 0,2 µl de sonda en una concentración de 200 nM.

Los niveles relativos de expresión se calcularon utilizando el programa qBase+ ([www.biogazelle.com/qbaseplus](http://www.biogazelle.com/qbaseplus)) y con un mínimo de 2 genes de referencia.

**Tabla 3: Lista de cebadores y sondas utilizados en los experimentos de *qRT-PCR*.**

GEN	Ref Seq (ARNm)	Secuencias de los cebadores	Posición	Sonda n#	Amplicon (bp)
<i>INOS</i>	NM_000625.4	5'-gctgccaagctgaaattga-3'	3562-3580	68	73
		5'-gatagcgtcttgctcttg-3'	3615-3634		
<i>PTGES</i>	NM_004878.4	5'-ctgggatgacaggcatgaat-3'	1237-1256	83	69
		5'-gactcacatgggagcctttt-3'	1286-1305		
<i>COX1</i>	NM_000962.2	5'-tccatgttggtggactatgg-3'	1366-1385	81	96
		5'-gtggtgtccatgttctctg-3'	1443-1461		
<i>COX-2</i>	NM_000963.2	5'-cttcacgcatcagttttcaag-3'	707-728	23	96
		5'-tcaccgtaaatatgattaagtccac-3'	777-802		
<i>IL-6</i>	NM_000600.3	5'-gctgagtacaaaagtctgatcca-3'	548-571	40	130
		5'-ctgcagccactggttctgt-3'	659-677		
<i>MMP1</i>	NM_001145938.1	5'-gctaacctttgatgctataactacga-3'	834-859	7	75
		5'-tttgtgcgcatgtagaatctg-3'	888-908		
<i>MMP3</i>	NM_002422.3	5'-caaaacatatttctttgtagaggacaa-3'	1259-1285	36	91
		5'-ttcagctatttgcttggaaa-3'	1329-1349		
<i>MMP13</i>	NM_002427.2	5'-ccagtctccgaggagaaaca-3'	909-928	73	85
		5'-aaaaacagctccgcatcacc-3'	974-993		
<i>COLII</i>	NM_001844.4	5'-tggtgctaatggcgagaag-3'	2572-2590	4	94
		5'-cccagtctctccacgttcac-3'	2646-2665		
<i>ACAN</i>	NM_001135.3	5'-cggtctacctctaccctaacca-3'	2329-2350	38	93
		5'-gagaaggaaccgctgaaatg-3'	2402-2421		
<i>CBS</i>	NM_000071.2	5'-aggagaagtgtcctggatgc-3'	1051-1070	17	97
		5'-taggtgtctgctccgtctg-3'	1128-1147		
<i>CTH</i>	NM_001902.4	5'-gcattcaaaaacggaatgg-3'	948-967	61	100
		5'-ctcatgctgtggatgagagg-3'	1028-1047		
<i>MPST</i>	NM_021126	5'-acatcaaggagaacctggaatc-3'	739-760	77	113
		5'-gatgtggccaggttcaatg-3'	833-851		

#### 6.4.5 Estabilidad de expresión de los genes de referencia

Para seleccionar los genes de referencia más apropiados, se realizaron análisis de estabilidad de expresión de una batería de 6 genes de referencia utilizando de 5 a 10



muestras de cada tipo utilizado (condrocitos, cartílago, hueso y membrana sinovial). Los genes valorados fueron hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (*hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*, *HPRT1*), proteína ribosomal L13A (*ribosomal protein L13A*, *RPL13A*), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, *GAPDH*), proteína de unión a la caja TATA (*TATA box binding protein*, *TBP*), beta-actina ( $\beta$ -Act) y porfobilinógeno desaminasa (PBGD) (Tabla 4). Para determinar los genes de expresión más estables se utilizó el algoritmo geNorm (111) y los genes de referencia que se obtuvieron para cada tipo de muestra están detallados en la Tabla 5.

**Tabla 4: Cebadores y sondas empleados para la amplificación de los genes de referencia.**

GEN	Ref Seq (ARNm)	Secuencias de los cebadores	Posición	Sonda n#	Amplicon (bp)
HPRT1	NM_000194.2	5'-tgatagatccattcctatgactgtaga -3' 3'-caagacattcttccagttaaagttg-5'	434-460 535-560	22	127
RPL13A	NM_012423.2	5'-caagcggatgaacaccaac -3' 3'-tgtggggcagcatacctc-5''	199-217 276-293	28	95
GAPDH	NM_002046.4	5'-agccacatcgctcagacac -3' 3'-gcccaatacgaccaaattcc-5'	41-59 88-106	60	66
TBP	NM_003194.4	5'-gcccatagtgatcttgcagt -3' 3'-cgctggaactcgtctcacta-5'	104-124 223-242	67	139
$\beta$ -Act	NM_001101.3	5'-agagctacgagctgctgac -3' 3'-ggatgccacaggactcca-5'	1048-1067 1164-1182	11	135
PBGD	NM_000190.2	5'-agctatgaaggatgggcaac -3' 3'-ttgtatgctatctgagccgtcta-5'	958-977 1005-1027	25	70

**Tabla 5: Genes de referencia utilizados para los diferentes tipos de muestra.**

MUESTRA	GENES DE REFERENCIA UTILIZADOS
Condrocitos	<i>HPRT1</i> y <i>TBP</i>
Cartílago	<i>HPRT1</i> y <i>TBP</i>
Membrana sinovial	<i>HPRT1</i> , <i>TBP</i> y <i>RPL13A</i>
Hueso	<i>TBP</i> , $\beta$ -ACT y <i>RPL13A</i>

## **7. TINCIONES HISTOQUÍMICAS, INMUNOHISTOQUÍMICAS, INMUNOCITOQUÍMICAS Y DE INMUNOFLUORESCENCIA**

---

Para los distintos estudios histoquímicos e inmunohistoquímicos, los discos de cartílago se fijaron en paraformaldehído 3,7-4% durante 24 h, se deshidrataron con alcoholes de graduaciones crecientes (70°, 96° y absoluto) y se incluyeron en parafina. Para realizar las tinciones se obtuvieron secciones de 4 µm con un microtomo, se desparafinaron (10 min en estufa, 37°C), se aclararon con xilol (10 min) y se rehidrataron en una secuencia de alcoholes decrecientes (absoluto, 10 min; 96°, 10 min y 70°, 10 min), seguido de 10 min en agua destilada. Una vez que las secciones estuvieron rehidratadas se procedió con los protocolos de las distintas tinciones.

### **7.1. Hematoxilina-eosina**

La tinción de hematoxilina–eosina (H-E) permite valorar la estructura y morfología general de los tejidos. La eosina es un colorante ácido que tiñe estructuras del citoplasma y la hematoxilina es un colorante básico que tiñe el núcleo celular.

*Reactivos:*

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

*Protocolo de tinción:*

Inmersión en hematoxilina de Harris durante 5 min. Tras ellos se realiza un lavado con agua destilada 5 min y de agua corriente. Se realiza una inmersión en eosina 1 min, se deshidratan con pases (lavados breves) en alcohol (96° y absoluto), lavado en xilol (10 min) y se montan DePex. El resultado es que los núcleos celulares se tiñen de azul y los citoplasmas de rosa.

### **7.2. Tricrómico de Masson**

la tinción con tricrómico de Masson (TM) tiñe las fibras de colágeno, que tienen afinidad por los colorantes ácidos debido a su riqueza en grupos catiónicos.

*Reactivos:*

- Solución de alumbre férrico: Sulfato amónico férrico al 5% en agua destilada.
- Solución de hematoxilina de Weigert: Se mezclan las soluciones A y B a partes iguales.
  - Solución A: 1g de hematoxilina férrica en 100 ml de alcohol absoluto.

- Solución B: 4 ml de cloruro férrico al 20% y 1 ml de ácido clorhídrico en 95 ml de agua destilada.
- Solución de ácido pícrico: Ácido pícrico a saturación en alcohol de 96°.
- Solución de fucsina de Ponceau: 700 ml de la solución A y 450 ml de la B.
  - Solución A: 0,5 g de fucsina ácida, 1 ml de ácido acético que se enrasan a un litro con agua destilada.
  - Solución B: 1 g de Ponceau y 1 ml de ácido acético que se enrasan a un litro con agua destilada.
- Ácido fosfomolibdánico al 1%.
- Solución de azul de anilina: Ácido acético al 2,5% y azul de anilina a saturación.

*Protocolo de tinción:*

El portaobjetos se sumerge en el alumbre férrico durante 30 min, y tras ello en hematoxilina férrica de Weighert, durante 10 minutos para continuar con la solución de ácido pícrico 6 min. Tras ello, la preparación pasa por la fucsina de Ponceau 8 min, seguido de ácido fosfomolibdánico 5 min. Se continúa con el azul de anilina durante 12 min. Tras el azul de anilina se lavan los portaobjetos en agua, se deshidratan con pases de alcohol hasta xilol y se montan con DePex.

Cuando se utiliza este método el colágeno adquiere un color azul intenso, el tejido conjuntivo verde, los núcleos se tiñen de azul–negro y el citoplasma de rosa.

### **7.3. Safranina O**

La safranina O (S-O) es un colorante que indica la presencia de glucosaminoglicanos sulfatados (tales como el condroitín sulfato y el queratán sulfato), haciendo que la muestra adquiera mayor o menor intensidad de rojo en función de la cantidad de glucosaminoglicanos presentes.

*Reactivos:*

- Ácido acético al 1%: 1 ml de ácido acético glacial en 99 ml de agua destilada.
- Solución de safranina O al 0,1%: 0,1 g de safranina O en 100 ml de ácido acético glacial.
- Solución de hematoxilina férrica de Weighert: Como para la tinción de TM.

+

*Protocolo de tinción:*

Los portaobjetos se sumergen en hematoxilina durante 7 min, tras lo cual se lavan 5 min en agua destilada y se pasan a la S- O durante 15 min. A partir de ahí se deshidratan, se aclaran y se montan con DePeX.

Con esta tinción los núcleos se tiñen de negro y la MEC del cartílago se tiñe de tonalidad naranja-roja en función del contenido en glucosaminoglicanos, cuanto mayor contenido mayor es la intensidad de la tinción.

#### **7.4. Azul alcian – PAS**

*Técnica de PAS*

Esta reacción oxida los tejidos mediante el ácido periódico, o a veces el ácido crómico, para aumentar el número de grupos carbonilo, es decir, grupos aldehídos o grupos cetónicos en los tejidos. Después se aplica el reactivo de Schiff que se une a esos grupos y los detecta. Por ejemplo, polisacáridos simples como el glucógeno, los mucopolisacáridos neutros y las mucoproteínas son compuestos PAS positivos, en cambio, los mucopolisacáridos ácidos (tales como el condroitin-4-sulfato y el ácido hialurónico) son PAS negativos.

*Técnica del azul alcian*

El azul alcian (AA) es un colorante básico que se une a los grupos ácidos de los mucopolisacáridos ácidos, dando lugar a la formación de un compuesto salino entre ambos, sobre todo cuando el pH es suficientemente ácido. A un pH de 2,5, que es el que se ha utilizado, el azul alcian colorea los mucopolisacáridos ácidos, los sulfatados y los no sulfatados. En cambio, a un pH aproximado de 1, el azul alcian sólo colorea los mucopolisacáridos sulfatados y a un pH aproximado de 0,5 solamente los mucopolisacáridos ácidos sulfatados más ionizables.

*Reactivos:*

- Solución de azul alcian: 1g de azul alcian en 97 ml de agua destilada y 3 ml de ácido acético glacial.
- Ácido periódico al 0,5% en agua destilada.
- Reactivo de Schiff.
- Bisulfito sódico al 2% en agua destilada.

*Protocolo de tinción:*

Los portaobjetos se sumergen en azul alcian durante 30 min, tras lo que se lavan en agua destilada y se cubren con ácido periódico durante 10 min. Se lavan de nuevo con agua destilada y se pasan al reactivo de Schiff de 10 min a 1 h dependiendo de la maduración del reactivo y, sin lavar, se pasan al bisulfito sódico, 10 min. Tras este paso se lavan en agua corriente caliente, después fría y se realiza una contra tinción con hematoxilina para posteriormente montar con DePeX.

Con esta técnica, los mucopolisacáridos ácidos se tiñen de azul, los núcleos se observan en una tonalidad violácea y los mucopolisacáridos neutros presentan una tonalidad rosa fucsia debido a la reacción con PAS.

### **7.5. Azul de toluidina**

El azul de toluidina (AT) es un colorante metacromático, es decir, que cambia de color al teñir determinadas estructuras. La estructura responsable del cambio recibe el nombre de cromotropa, para distinguirla de las restantes que se colorean normalmente (ortocromáticas). La metacromasia está ligada esencialmente a la presencia de cargas electronegativas dispuestas con un determinado patrón de densidad en la superficie de las estructuras cromotropas. La distancia mínima entre éstas debe ser de 0,5 nm.

*Reactivos:*

- Tampón acetato a pH 4,2:
  - Solución A: 2,7 g de acetato de sodio en 100 ml de agua destilada.
  - Solución B: 1,1 ml de ácido acético 0,5 M y 100 ml de agua destilada.
  - Mezclar 30 ml de la solución A (pH 4,2) y 90 ml de la solución B.
- Solución al 0,2% de azul de toluidina en tampón a pH 4,2.
- Solución acuosa al 4% de molibdato de amonio.

*Protocolo de tinción:*

Los portaobjetos se sumergen en AT 5 min y se lavan, primero con tampón de acetato acético a pH 4,2 y después con agua destilada. Después, se tratan con molibdato de amonio 10 min, se pasan por el alcohol, xilol y se montan con DePeX.

Así el AT cambia su color azul por un color rojizo al contactar con los proteoglicanos, estructuras ricas en lugares aniónicos de la MEC. Sin embargo, los núcleos y los citoplasmas adquieren la propia tonalidad del colorante, resultando azules.

### **7.6. Tinciones inmunohistoquímicas**

En las secciones de cartílago también se realizaron IHQ para la detección de determinadas proteínas en el tejido. El protocolo se inicia así que el tejido está rehidratado. La zona del portaobjetos donde está el tejido se rodea con lápiz de aceite para concentrar los reactivos encima del tejido. A continuación se realiza, si es necesario en función del anticuerpo utilizado, un pretratamiento enzimático para la desenmascaración epítipo antigénica ([Tabla 1](#)), y se lava con *PBS*. Tras este lavado, se inhibe la peroxidasa endógena con la solución de bloqueo durante 10 min y se repite el lavado con *PBS* (10 min). Se incuba con el anticuerpo primario durante 1 h a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se realizan tres lavados con *PBS* (10 min) y se procede a la incubación con el anticuerpo secundario o el polímero marcado del kit *EnVision System-HRP (AEC)* de Dako 1 h a temperatura ambiente. *EnVision System, HRP* es una técnica de tinción en dos pasos. Este sistema está basado en un polímero marcado con HRP (peroxidasa) que se conjuga con anticuerpos secundarios. El polímero marcado no contiene avidina ni biotina. En consecuencia, la tinción no específica resultante de la actividad de la avidina-biotina endógena queda eliminada o significativamente reducida. Tras este paso se realizan de nuevo tres lavados con *PBS* (10 min) y finalmente se revela la reacción con 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorada (DAB; 1/50) durante 3-5 min, deteniendo la reacción con agua destilada. A continuación se pasan los portaobjetos por hematoxilina de Harris, 2 min, se vuelve a lavar en agua destilada y se deshidratan en una serie de alcoholes. Finalmente, se aclaran en xilol y se montan con DePeX.

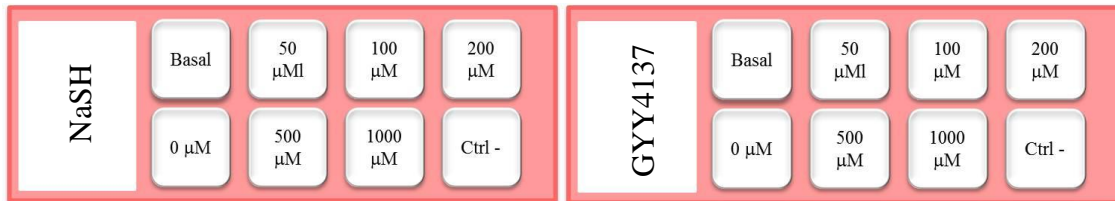
### **7.7. Tinciones inmunocitoquímicas**

Las células se fijaron en acetona a 4 °C durante 10 min. Una vez fijadas, la acción de la peroxidasa endógena se bloqueó con la solución *peroxidase blocking solution* de Dako Real™ durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación se lavaron con una solución tampón de fosfato y se incubaron durante 1 h con el anticuerpo primario. Para determinar las interacciones antígeno-anticuerpo se utilizó el kit de *EnVision System-HRP* de Dako de igual manera que en el apartado anterior.

Tras este paso, los portaobjetos se deshidrataron con alcoholes graduados, se aclararon en xilol y se montaron en DePex. En todos los casos se incluyó un control negativo al cual no se añadió el anticuerpo primario.

### 7.8. Visualización de la translocación nuclear de *NFκB* p65 mediante inmunofluorescencia

Los condrocitos se sembraron en *chamber-slides* con  $3 \cdot 10^4$  c/p y se co-estimularon con 5 ng/ml de IL-1 $\beta$  y las diferentes dosis de ambos compuestos de sulfuro (Fig. 11), tal como se describió en la Tabla 2.



**Fig. 11: Esquema de la estimulación para el análisis de *NFκB*.**

Todos los pocillos se estimularon con 5 ng/ml de IL-1 $\beta$  salvo el basal y el ctrl-. Se utilizó una *chamber-slide* para analizar cada uno de los compuestos de sulfuro.

A los 45 min de la estimulación, los pocillos se lavaron con 500  $\mu$ l de *PBS* y se fijaron con paraformaldehído (4°C) y se siguió el siguiente protocolo:

1. Lavar tres veces con *PBS* (pH 7,4) y dejar 5 min cada lavado.
2. Pretratar con tritón al 3% durante 5 min.
3. Lavar con H<sub>2</sub>O y *PBS*.
4. Poner el anticuerpo de *NFκB*, marcado con isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate/ FITC*), dilución 1:10, durante 8-12 h.
5. Lavar con *PBS* tres veces, 5 min cada una.
6. Teñir con 4',6-diamidino-2-fenilindol (4',6-diamidino-2-phenylindole, *DAPI*) con dilución 1:10000, media hora.
7. Montar con glycerol.

### 7.9. Análisis de las imágenes de microscopía

Los portaobjetos se visualizaron por microscopía óptica o de fluorescencia en un microscopio Olympus Dx61 equipado con una cámara digital Olympus DP70 (Olympus España S.A., Barcelona) y utilizando el software analySIS (versión D; Olympus, Alemania).

En alguno de los experimentos realizados también se utilizó el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) para cuantificar la intensidad (positividad) de las tinciones en las diferentes condiciones experimentales. En estos casos se realizaron dos fotografías

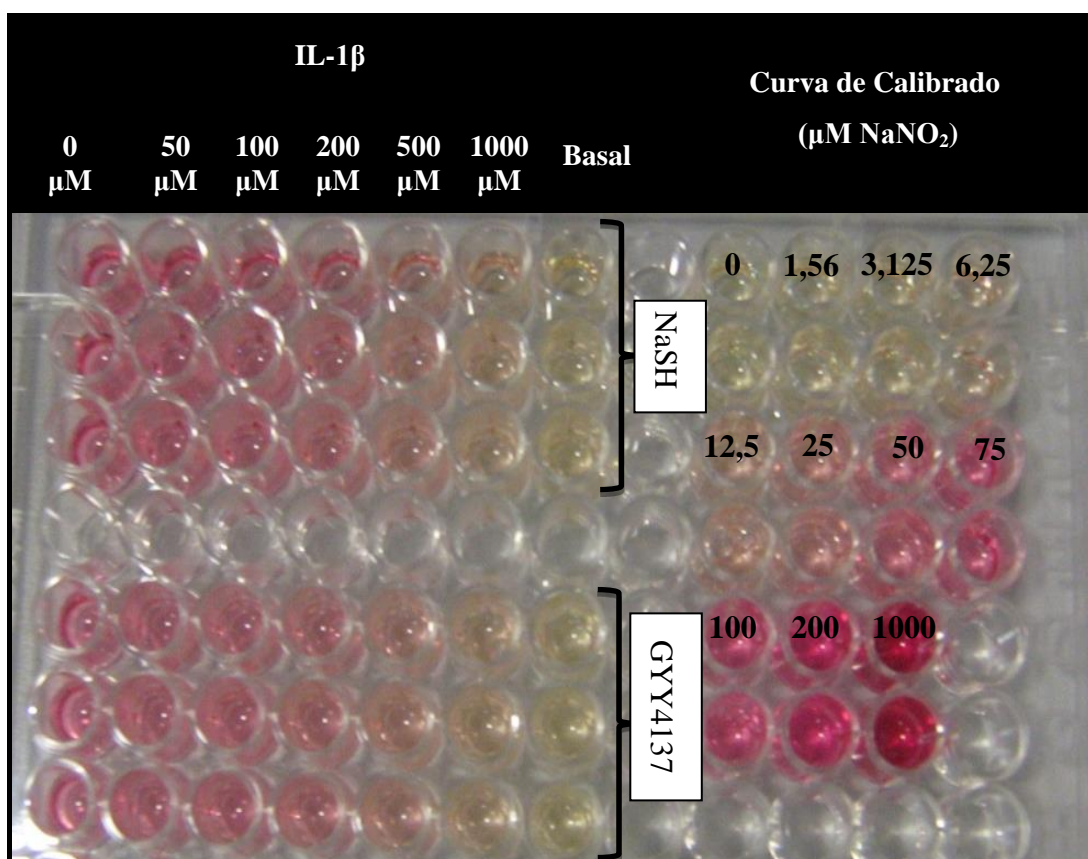


representativas de cada condición que se cuantificaron y se obtuvo la media de la positividad de ambas.

Los porcentajes están calculados con  $n=2$  y son el promedio de positividad por cada 100 células cuando la tinción es intracelular y de la imagen general cuando la tinción también es extracelular.

### 8. CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE NO MEDIANTE LA REACCIÓN DE GRIESS

La reacción de Griess es un ensayo químico que detecta la presencia de nitritos. Este método se basa en la reacción del analito (el sobrenadante de las células estimuladas) en medio ácido para formar una sal diazonio que, acoplada a las aminas aromáticas del reactivo de Griess, produce un colorante azo de color rosa (diazotización de Griess). Esta reacción de color se puede detectar por espectrofotometría (Fig. 12).



**Fig. 12: Cuantificación de NO mediante la reacción de Griess.**

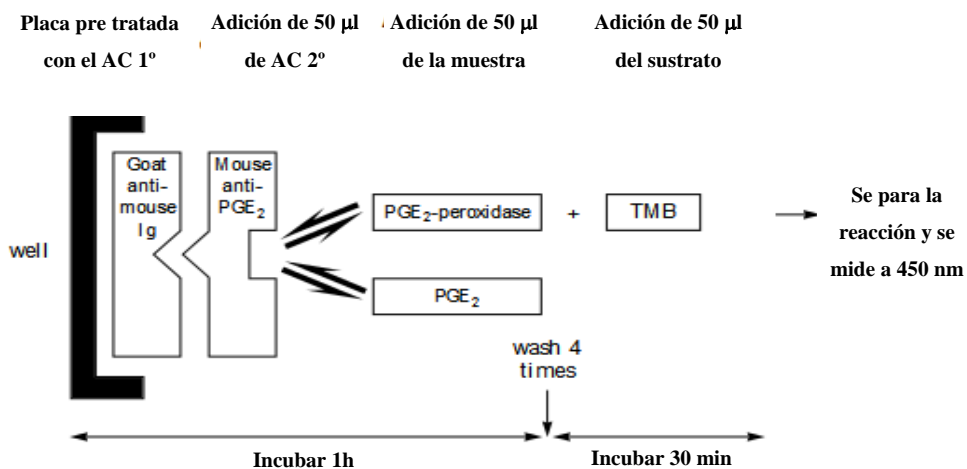
A la derecha se encuentran los pocillos de la curva de calibrado, realizada por duplicado, y a la izquierda los de los sobrenadantes de las células por triplicado. Todos los pocillos están estimulados con IL-1 $\beta$  excepto los basales y la curva de calibrado.



Para realizar este estudio, los condrocitos se sembraron a una concentración de  $5 \cdot 10^4$  c/p en una placa de 96 pocillos en ME. Pasadas 24 h, se co-estimularon con 5 ng/ml de IL-1 $\beta$  y las diferentes dosis de uno u otro compuesto de sulfuro durante 48 h. A una de las condiciones no se le añadió ni IL-1 $\beta$  ni compuesto de sulfuro, estableciendo así la condición basal. A las 48 h se recogieron 50  $\mu$ l de sobrenadante por pocillo de cada condición y se trasladaron a otra placa de 96 pocillos. A cada pocillo de esta placa se añadieron 50  $\mu$ l de reactivo de Griess. La placa se incubó durante 10 min en ligera agitación (para una buena mezcla del sobrenadante y el reactivo de Griess) y el resultado de la reacción colorimétrica se leyó a una densidad óptica de 570 nm. Cada condición se analizó por triplicado. Los datos de A obtenidos se convirtieron en concentración de nitritos utilizando una curva de calibrado realizada con concentraciones conocidas de nitrito sódico y analizada simultáneamente con las muestras a cuantificar.

## 9. ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS Y ELISAS

La producción de la proteína PGE<sub>2</sub> se cuantificó mediante un inmunoensayo específico con una sensibilidad de 40 pg/ml. La metodología de sembrado, estimulación y tratamiento fue la misma que para el análisis de la producción de NO, tras lo que se recogieron los sobrenadantes de cada una de las condiciones y se procedió al análisis de la PGE<sub>2</sub> siguiendo el protocolo establecido por el fabricante para sobrenadantes celulares (Fig. 13). Los resultados obtenidos fueron analizados a una densidad óptica de 630 nm y los datos obtenidos comparados con una curva estándar realizada con reactivos propios del kit.



**Fig. 13:** Esquema de la técnica empleada para la detección de PGE<sub>2</sub> en los sobrenadantes celulares. AC: Anticuerpo, TMB: tetrametilbenzidina

También se estudiaron los niveles de la citoquina pro-inflamatoria IL-6 y de la *MMP13* producidos por condrocitos *OA* co-estimulados con IL-1 $\beta$  y NaSH o GYY4137 mediante *ELISA*.

*Reactivos:*

- Anticuerpo de captura (720  $\mu\text{g/ml}$ )
- Anticuerpo de detección
- Estándares
- Estreptavidina- *HRP* (*horseradish peroxidase*/ Peroxidasa de rábano)
- *PBS*
- Tampón de lavado (0,05% Tween® 20 en *PBS*)
- Diluyente (1% de albúmina bovina (*BSA*) en *PBS*)
- Solución sustrato (1:1 Reactivo A y Reactivo B (R&D Systems # DY999))
- Solución de parada (2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ )

***Protocolo de ELISA:***

Primero se diluyó, como especifica el fabricante, el anticuerpo de captura en la solución de trabajo (4  $\mu\text{g/ml}$  de *PBS*) y se repartió en los pocillos que se iban a utilizar de la placa de 96 pocillos, que se incubó a temperatura ambiente toda la noche.

Al día siguiente se realizaron tres lavados con tampón de lavado, se bloqueó durante 1 h con el diluyente y se volvieron a lavar los pocillos tres veces con el tampón de lavado. En ese momento, se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de nuestra muestra o de estándar en su pocillo correspondiente y se dejaron incubar 2 h a temperatura ambiente. Después de este tiempo se realizaron otros tres lavados con el tampón de lavado y se añadió en cada pocillo 100  $\mu\text{l}$  del AC de detección. Se volvieron a realizar tres lavados y se incubó la placa con 100  $\mu\text{l}$  por pocillo de estreptavidina durante 20 min en oscuridad.

Se volvieron a lavar los pocillos, se incubaron otros 20 min en oscuridad con la solución sustrato y se paró la reacción con la solución de parada. A continuación, se leyeron los resultados a 450 nm y se referenciaron a la curva de calibrado realizada con las diluciones estándares aportadas en el kit, para obtener las concentraciones de IL-6 y *MMP13* en los sobrenadantes celulares.

## **10. CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSAMINOGLICANOS**

Para estudiar si los compuestos de sulfuro podían ejercer efectos protectores en la MEC del cartílago, se realizaron experimentos en los que se introdujeron discos de cartílago en medio de cultivo y se estimularon con IL-1 $\beta$  y NaSH o GYY4137. Los explantes de cartílago se prepararon con un sacabocados de biopsia y se incubaron en ME durante 24 h para su estabilización. Se estimularon entonces con 5 ng/ml y NaSH o GYY4137 (200 o 1000  $\mu$ M) y se incubaron durante 21 días en placas de 24 pocillos en una proporción de dos explantes por pocillo en 500  $\mu$ l de medio. Los días 3, 7, 10, 14 y 21 de cada experimento se retiraron y congelaron los sobrenadantes, para analizarlos posteriormente, y se renovaron los medios con los estímulos. Estos experimentos se realizaron con cartílago de 4 donantes OA y 2 donantes normales.

La cuantificación de GAGs se realizó, tanto en los sobrenadantes como en los explantes de cartílago, mediante el kit comercial *Blyscan sulfated glycosaminoglycan assay* que se basa en la formación de complejos entre los GAGs y el reactivo de color 1,9-azul de dimetilmetileno.

### *Reactivos*

- *Dye reagent*
- *Glycosaminoglycan standard* (100  $\mu$ g/ml)
- Agente de disociación

### *Curva de calibrado*

Se prepararon unas diluciones estándar con una concentración conocida de GAGs a partir del estándar del kit utilizando, tal y como recomienda el protocolo, concentraciones de 0, 1, 2, 3, 4, y 5  $\mu$ g de GAGs y enrasando hasta 100  $\mu$ l de agua destilada en tubos de 1,5 ml.

### *Protocolo en sobrenadantes*

Los 500  $\mu$ l de cada sobrenadante congelado de cada tiempo se mezclaron (resultando un total de 2,5 ml) y se utilizaron 20  $\mu$ l de esa mezcla para realizar el análisis, enrasando a 100  $\mu$ l con agua destilada. Se añadió a cada tubo 1 ml de *dye reagent*, se agitó la mezcla durante 30 min y se centrifugó a 12.000  $\times$  g durante 10 min. A continuación, se retiró el sobrenadante, observando la aparición de un precipitado morado en el fondo del tubo. Se añadieron 500  $\mu$ l de agente de disociación aportado en el kit, para disolver el

precipitado y se volvió a centrifugar. Entonces se traspasaron 200  $\mu$ l (por duplicado) a una placa de 96 pocillos para su lectura en el espectrofotómetro a 656 nm. Los resultados se expresaron en  $\mu$ moles de GAGs por g de tejido en relación con los valores obtenidos en la curva estándar.

### ***Protocolo en explantes de tejido***

Al terminar cada experimento se recuperaron los explantes de cartílago. Cada disco se dividió en dos y una mitad se utilizó para realizar tinciones histoquímicas e inmunohistoquímicas tras su inclusión en parafina y la otra para la cuantificación de GAGs. Cada mitad de tejido utilizado para este protocolo se pesó en húmedo y los resultados se expresaron, como recomienda el fabricante del kit, en  $\mu$ g de GAG/mg de peso húmedo. El tejido se deshidrató completamente en una *SpeedVac* y se realizó una digestión con 1 ml de disolución de papaína durante 18 h. La disolución de papaína se preparó mezclando 50 ml de tampón *buffer* fosfato, 400 mg de acetato de sodio, 200 mg de EDTA, 40 mg de cisteína HCl y 5 mg de papaína. Tras el tiempo de digestión, se comprobó que el cartílago estaba totalmente digerido y la solución se centrifugó para recoger el sobrenadante. A partir de aquí se siguió el mismo protocolo que para los sobrenadantes.

Para analizar los resultados obtenidos de GAGs se consideró que la suma de la cantidad de GAGs en tejido y la cantidad de GAGs en los sobrenadantes suponía el 100% de la cantidad de GAGs y se transformaron los resultados en % de GAGs retenido en el tejido y % de GAGs liberados al sobrenadante, respectivamente.

## **11. MÉTODOS: ANÁLISIS DE ROS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO**

Para este estudio se cuantificaron los niveles de  $O_2^-$ , utilizando el fluoróforo mitocondrial *Mitox*<sup>TM</sup>Red, que reacciona de forma específica con este anión.

Para estos experimentos primero se utilizó una línea de condrocitos inmortalizados, la T/C-28a2, ya que el número de células a utilizar era muy elevado. Una vez comprobado que el modelo de estudio era adecuado, se realizó con condrocitos de cultivo primario. Para ambos casos, las células se sembraron a razón de  $3 \cdot 10^5$  c/p en placas de seis pocillos con ME. Tras un periodo de aclimatación de 24 h, se estimularon con las concentraciones de GYY4137 y NaSH las células T/C-28a2 y sólo con GYY4137 los

condrocitos de cultivo primario. En cada caso, dos pocillos no se estimularon y otro se utilizó como control positivo, estimulándolo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Todos los estímulos se dejaron 15 min en medio *HBSS* sin calcio y sin magnesio en estufa a 37°C. Pasados los 15 min, se les añadió el *Mitoxox*<sup>TM</sup>Red a todos los pocillos en una concentración 5 µM, salvo a uno de los pocillos sin estimular que se utilizó para definir la población celular en el citómetro de flujo.

Pasados 10 min de la adición del *Mitoxox*<sup>TM</sup>Red, las células se lavaron con suero salino, se recogieron utilizando tripsina 2x para separarlas de las placas y tras neutralizar la tripsina y centrifugar las células a 450 x g durante 10 min, se resuspendieron en *PBS* frío y se analizaron en el citómetro de flujo. Los resultados se procesaron con el programa *CellQuest*.

## **12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS**

---

Todos los experimentos, salvo que se indique lo contrario, se realizaron con tejido o células de al menos tres donantes diferentes ( $n \geq 3$ ) y con duplicados o triplicados técnicos en cada experimento. Los resultados están expresados como media  $\pm$  error estándar (EE) o como media e intervalos de confianza superior e inferior de las réplicas biológicas. En los experimentos de *qRT-PCR*, las gráficas se representan como datos individuales pero los valores de expresión relativa se calcularon con el *software qBase* + con la media geométrica de todos ellos y están expresados como la media geométrica  $\pm$  EE. En este caso el análisis estadístico también se realizó con el *software qBase+*. Para el resto de los experimentos, el análisis estadístico se realizó con el software R (versión 2.15.2). Para los diferentes datos se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguidos de un test Tukey de comparaciones múltiples, excepto en el caso de que no pasaran el test de normalidad (*Shapiro-Wilk*) o el de homocedasticidad (test de Bartlett o de Levene). En todos los casos, las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ . En el caso de los resultados obtenidos para las diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>S en suero y la biosíntesis de H<sub>2</sub>S en cartílago se realizaron análisis de varianza univariante siendo el padecer o no *OA* la variable independiente y la edad y el sexo de los donantes como cofactores, para descartar las influencias de estos últimos parámetros en los resultados obtenidos. En estos casos se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguido de un test de comparaciones múltiples.



# RESULTADOS

---





## 1. PRODUCCIÓN ENDÓGENA DE SULFURO DE HIDRÓGENO EN LA ARTICULACIÓN

### 1.1. Cuantificación de la concentración de sulfuro de hidrógeno en sueros

Como se describe en el apartado de material y métodos, el H<sub>2</sub>S se midió utilizando un electrodo ión selectivo y los resultados, obtenidos en mV, se compararon con una curva de calibrado obtenida con estándares de concentración de H<sub>2</sub>S conocida.

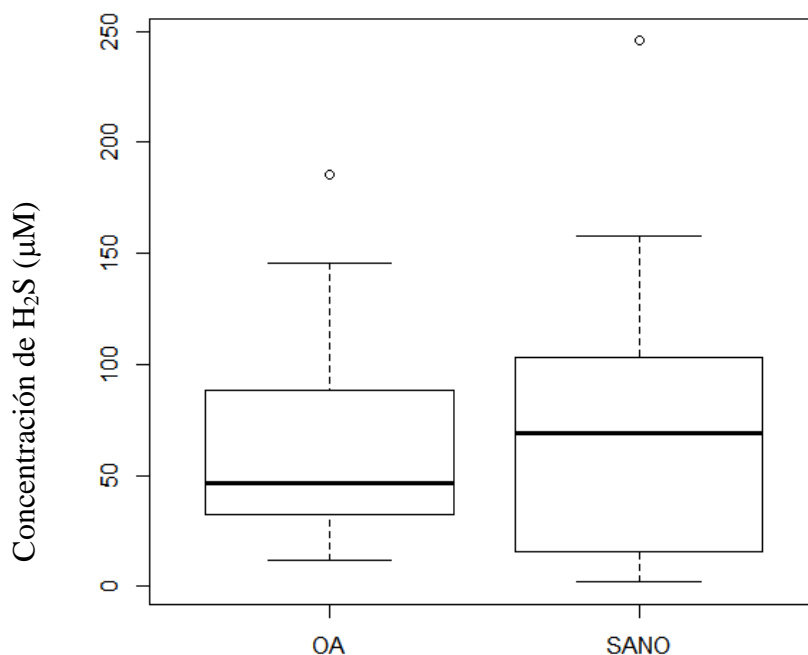
El suero obtenido de pacientes con *OA* contenía unos niveles de H<sub>2</sub>S (mediana [cuantil 25-cuantil 75]) de 45,02 [20,9-79,3] μM frente a 68,9 [16,4-95,1] μM en los pacientes sanos (Tabla 6 y Fig. 14). ). Los datos demográficos de estos donantes están incluidos en la Tabla 7. Se realizó un análisis de varianza univariante y no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos *OA* y *N* ( $p=0.678$ ). Dado que las medias de edad de los dos grupos son bastante diferentes, para descartar que fuera un factor que influyera en los resultados se incluyó la edad junto con el sexo, como co-variables en el análisis univariante. El resultado fue que ninguno de estos dos parámetros tuvo una influencia significativa ( $p=0,783$ ,  $p=0,589$ , respectivamente) en el resultado.

**Tabla 6: Concentración (μM) de H<sub>2</sub>S en suero normal y *OA* (media ± EE).**

μM h <sub>2</sub> s en suero sanguíneo			
Media ± EE		Mediana [cuantil 25-cuantil 75]	
<i>OA</i> (n=38)	<i>N</i> (n=28)	<i>OA</i> (n=38)	<i>N</i> (n=28)
56,48 ±7,24	72,18 ±10,66	45,02 [20,9-79,3]	68,9 [16,4-95,1]

**Tabla 7: Datos demográficos de los donantes de suero sanguíneo para cuantificar H<sub>2</sub>S.**

	Pacientes <i>OA</i> (n=38)	Donantes <i>N</i> (n=28)
Edad media en años (rango)	68,3 (51, 92)	33,2 (23, 68)
Hombres/mujeres	6/27	5/23



**Fig. 14: Concentración de H<sub>2</sub>S en sueros de pacientes OA y de donantes sanos.**

Esta figura representa la mediana, los cuartiles 1 (25%) y 3 (75%) (cajas) y los máximos y mínimos de la concentración de H<sub>2</sub>S en suero de pacientes con OA a la izquierda y sanos a la derecha.

### 1.2. Biosíntesis de sulfuro de hidrógeno en cartílago

Los resultados que se obtuvieron de mediciones de H<sub>2</sub>S liberado de discos de cartílago de 6 mm de diámetro están en la [Tabla 8](#) y en la [Fig. 15](#). Los datos demográficos de los donantes de tejido están en la [Tabla 9](#). Igual que para los datos en los sueros, se realizó un análisis de varianza univariante con la condición patológica (OA o sano), como variable independiente y el sexo y la edad como co-variables, para ver si podían tener alguna influencia sobre el resultado del análisis. Aquí sí que se observaron diferencias entre los valores obtenidos del cartílago OA (n=14) y del sano (n=6), siendo significativamente más bajos los niveles del primero. De nuevo, ni el sexo ni la edad influyeron de forma significativa en este resultado ( $p=0.556$ ,  $p=0.798$ , respectivamente).

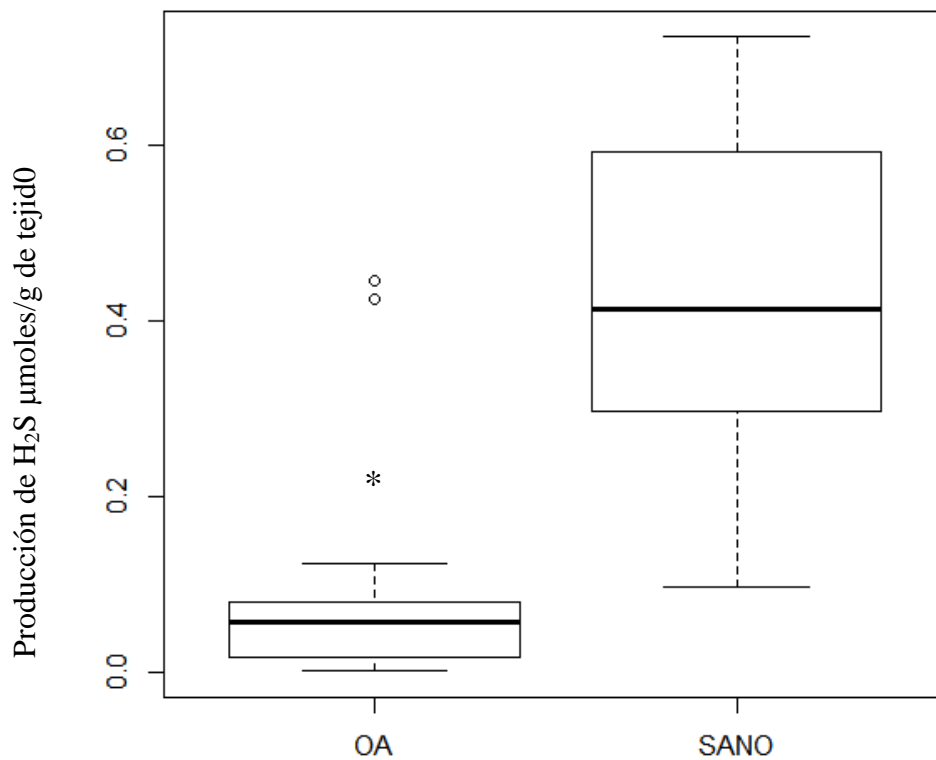
**Tabla 8: Biosíntesis (µmoles/mg de tejido) de H<sub>2</sub>S en cartílago normal y OA (media± EE)**

\*  $p < 0,05$ .

µM H <sub>2</sub> S por mg de tejido	
Media ± EE	
OA	N
*0,10 ± 0,04	0,42 ± 0,09

**Tabla 9: Datos demográficos de los donantes de cartílago para cuantificar el de H<sub>2</sub>S.**

	<b>Pacientes OA</b>	<b>Donantes sanos</b>
Edad media en años (rango)	75,2 (53, 96)	73,2 (67, 80)
Hombres/mujeres	5/8	1/4



**Fig. 15: Biosíntesis (µmoles/mg de cartílago) de H<sub>2</sub>S en cartílago procedente de pacientes OA y sanos.**

Esta figura representa la mediana, los cuartiles 1 (25%) y 3 (75%) y los máximos y mínimos de la producción de H<sub>2</sub>S en cartílago de pacientes con OA a la izquierda y sanos a la derecha. \* $p < 0,05$  con respecto a la condición sano.

### 1.3. Análisis de la expresión génica de las enzimas de síntesis de sulfuro de hidrógeno en cartílago, membrana sinovial y hueso subcondral

#### 1.3.1 Cartílago

Se comparó la expresión génica de las tres enzimas relevantes en la síntesis de H<sub>2</sub>S en el organismo, en cartílago *OA* frente a cartílago N ([Fig. 16](#)). En este análisis se observó que los niveles de expresión de CTH en el cartílago *OA* (n=15) y el cartílago N (n=4) fueron similares ([Fig. 16b](#)), y que la expresión génica de CBS fue ligeramente inferior en el cartílago *OA* (n=15), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa ([Fig. 16a](#)).

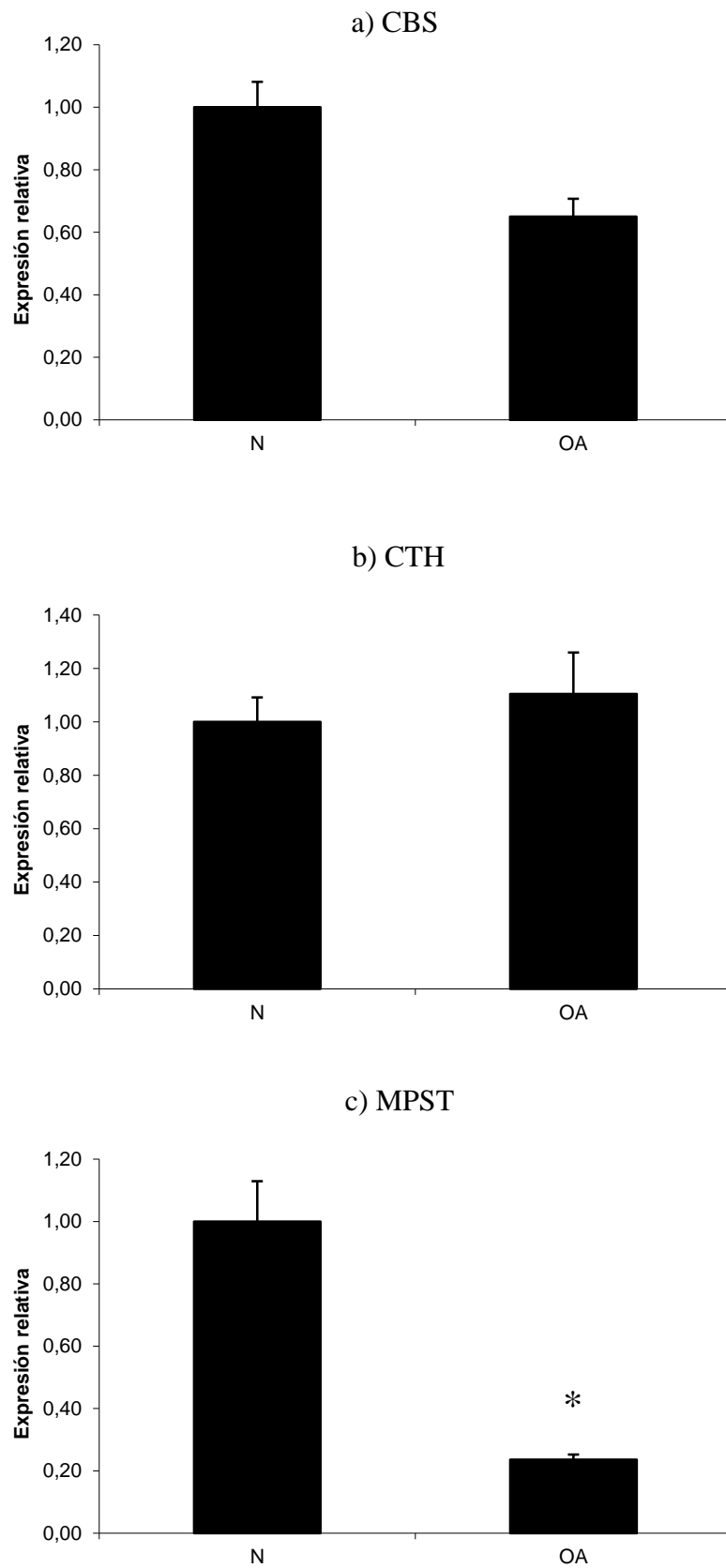
Lo más relevante fue la diferencia encontrada en la expresión génica de MPST, la enzima mitocondrial, que en cartílago *OA* (n=14) se encuentra significativamente disminuida, casi en un 80% ([Fig. 16c](#)), respecto a la expresión en el cartílago N (n=4).

#### 1.3.2 Membrana sinovial

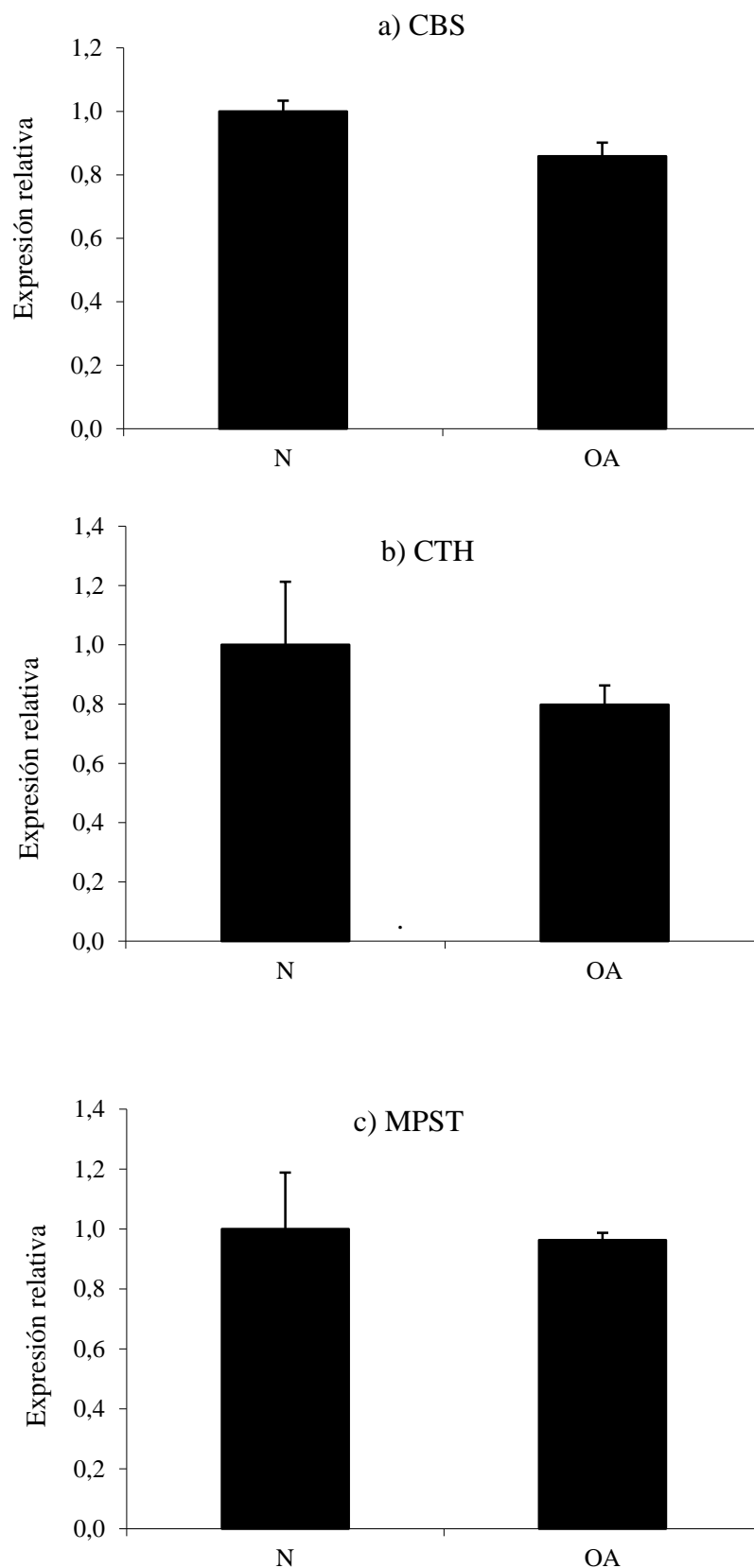
Igual que en cartílago, se comparó la expresión génica de las tres enzimas relevantes en la síntesis de H<sub>2</sub>S en membrana sinovial procedente de articulaciones *OA* (n=6) frente a las procedentes de articulaciones sanas (n=3). En este análisis no se encontraron diferencias significativas en la expresión génica de ninguna de las tres enzimas, CBS, CTH o MPST,  $p > 0.05$  ([Fig. 17](#)).

#### 1.3.3 Hueso subcondral

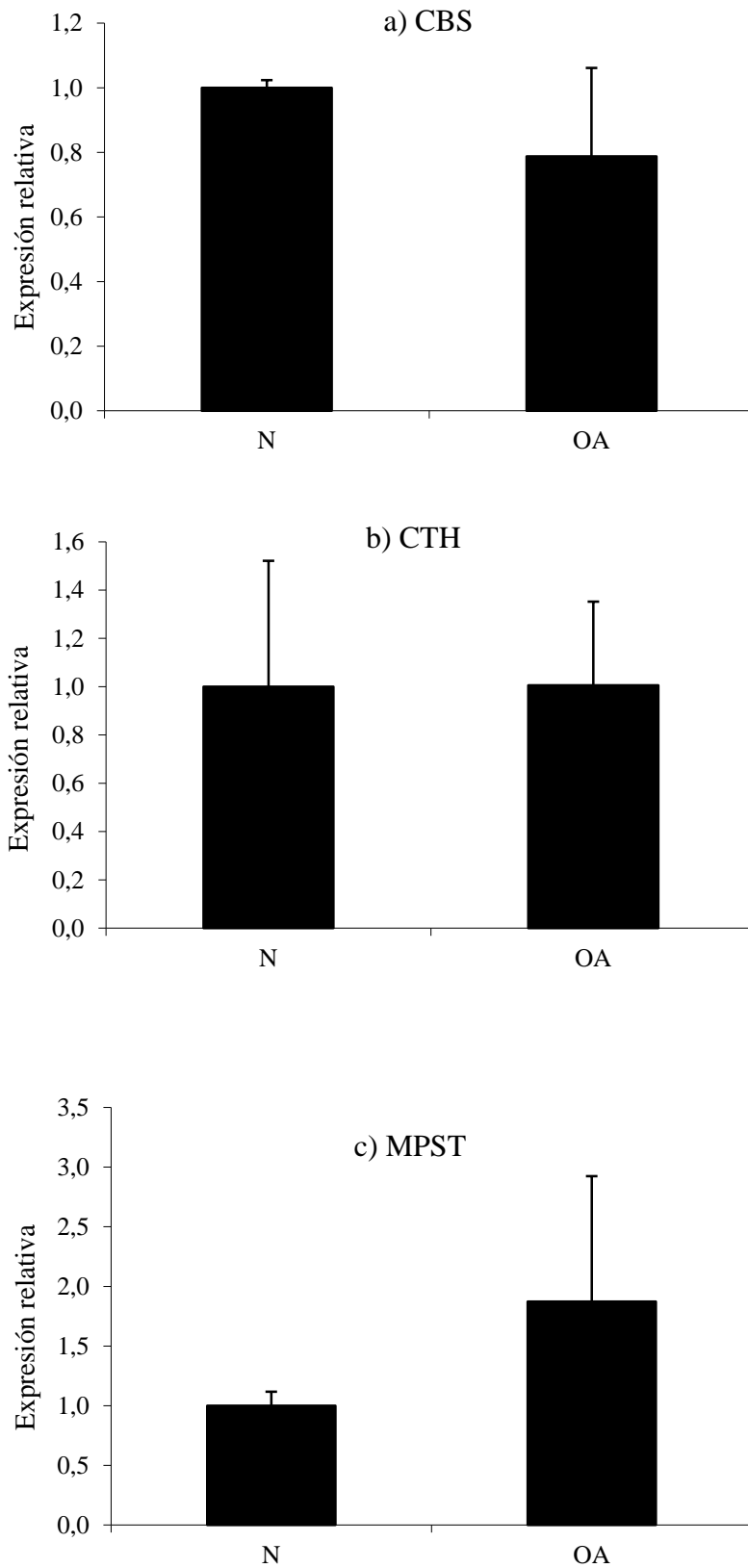
Los resultados en hueso subcondral fueron similares a los encontrados en membrana sinovial, ya que no se encontraron diferencias significativas en la expresión génica de CBS, CTH o MPST entre el tejido *OA* (n=6) y el sano (n=3),  $p > 0,05$  ([Fig. 18](#)).



**Fig. 16:** Expresión génica de las enzimas CBS (a) CTH (b) y MPST (c) en cartílago OA frente al cartílago N. \* $p < 0,05$  respecto a la condición N.



**Fig. 17:** Expresión génica de las enzimas CBS (a) CTH (b) y MPST (c) en membrana sinovial procedente de articulaciones *OA* frente a la procedentes de articulaciones *N*.

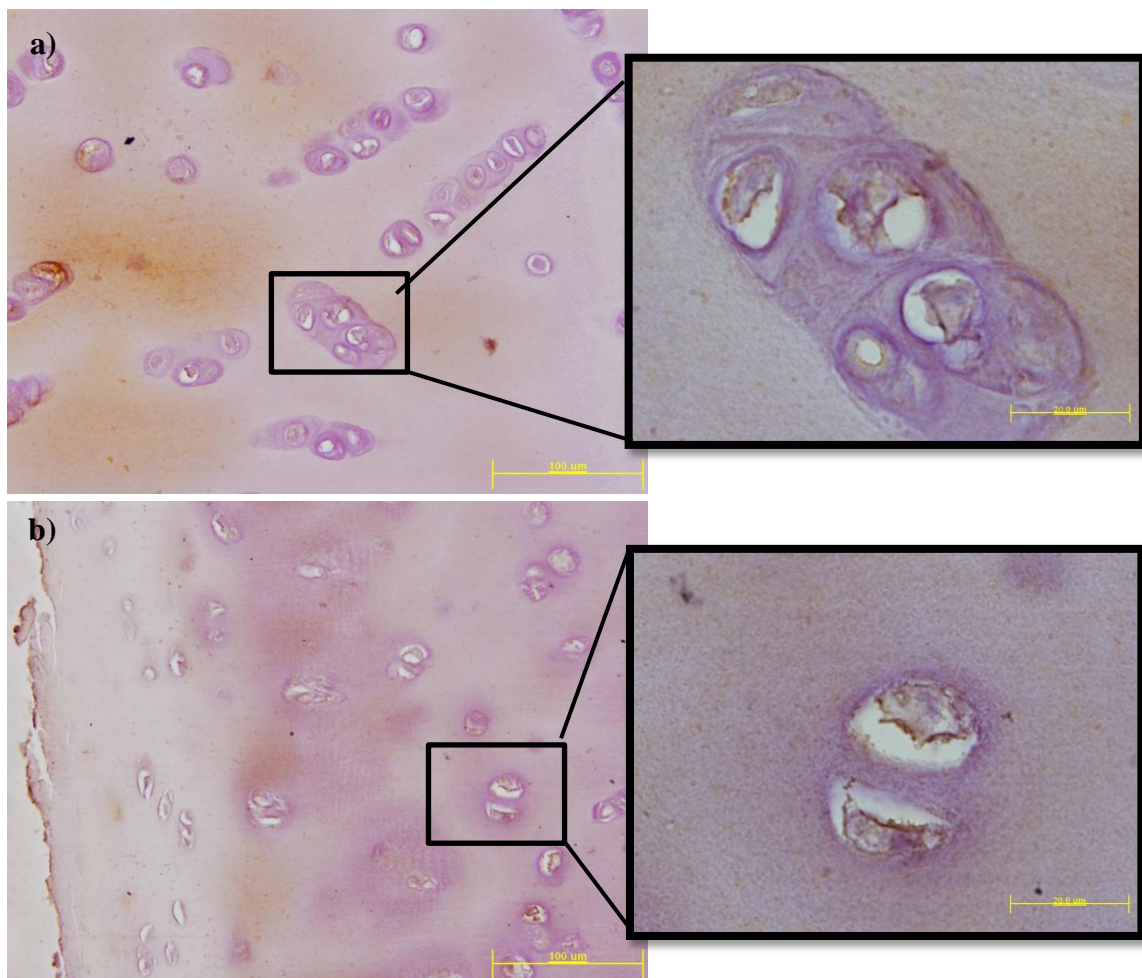


**Fig. 18:** Expresión génica de las enzimas CBS (a), CTH (b) y MPST (c) en hueso subcondral procedente de articulaciones OA frente al procedente de articulaciones sanas N.

#### 1.4. Análisis inmunohistoquímico de las enzimas de síntesis de sulfuro de hidrógeno en cartílago

Los resultados de las IHQ de las enzimas en cartílago articular confirmaron los datos obtenidos en el estudio de la expresión génica. Sin embargo, en la valoración de estos datos e imágenes hay que tener en cuenta que el anticuerpo utilizado se localiza, según el fabricante, únicamente de manera intracelular, por lo que solamente se analizó su positividad dentro de los condrocitos. Estas imágenes se cuantificaron haciendo doce fotografías de cada preparación y se cuantificaron solamente 5 células en cada imagen, por lo que los datos de la [Tabla 10](#) son la media  $\pm$  EE de 60 células.

Según nuestras preparaciones, la enzima CBS parece ser la más escasa de las tres en el cartílago. Aun así, encontramos una clara expresión dentro de los condrocitos y, aunque la diferencia no es significativa, en el cartílago *OA* parece que existe una tendencia a que sus niveles sean menores ([Fig. 19](#) y [Tabla 10](#)).

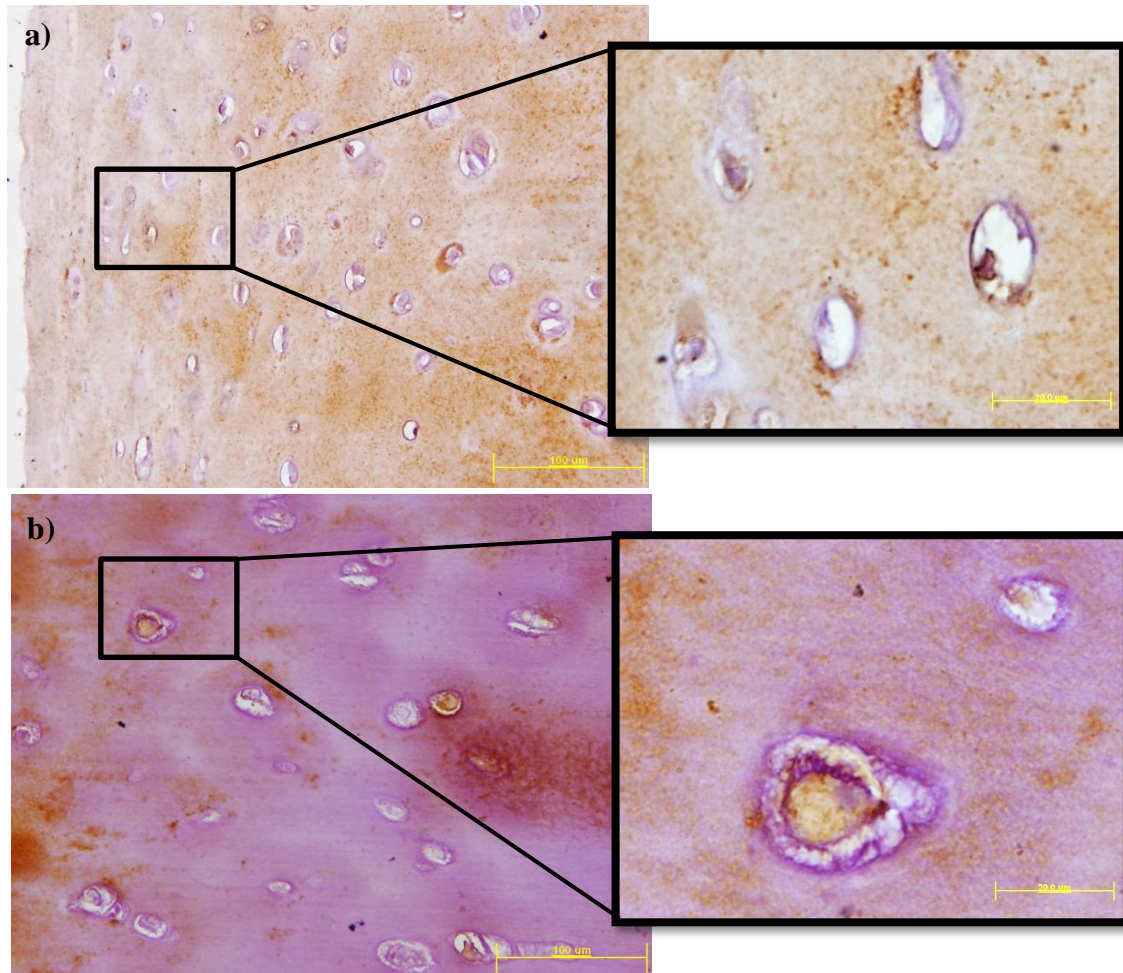


**Fig. 19: Imágenes representativas de la IHQ de CBS en cartílago sano (a) y *OA* (b).**

Las imágenes de la izquierda están tomadas a 20x y la barra de calibración representa 100 µm. Las de la derecha están tomadas a 100x y la barra de calibración representa 20 µm.

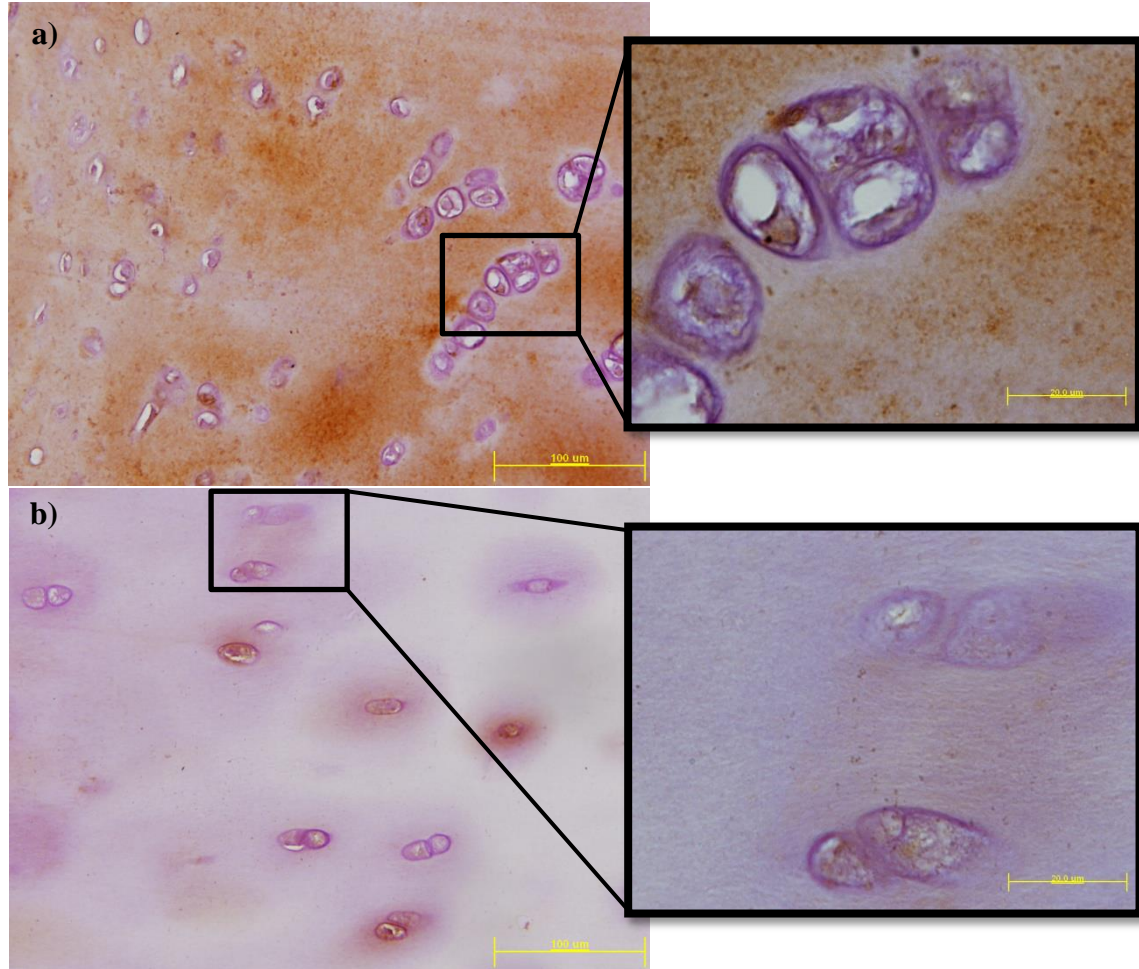


En cuanto a la enzima CTH, también se observa patrón similar al encontrado en la expresión génica ya que según la cuantificación los niveles de esta enzima son similares en tejido sano y OA ([Fig. 20](#) y [Tabla 10](#)).



**Fig. 20: Imágenes representativas de la IHQ de CTH en cartílago sano (a) y OA (b).** Las imágenes de la izquierda están tomadas a 20x y la barra de calibración representa 100 µm. Las de la derecha están tomadas a 100x y la barra de calibración representa 20 µm.

Por último, de nuevo encontramos diferencias significativas en los niveles de la enzima MPST. Ésta está presente en cartílago sano en una proporción similar a la CTH, sin embargo, en cartílago OA se encuentra considerablemente disminuida ([Fig. 21](#) y [Tabla 10](#)).



**Fig. 21: Imágenes representativas de la IHQ de MPST en cartílago sano (a) y OA (b).** Las imágenes de la izquierda están tomadas a 20x y la barra de calibración representa 100 µm. Las de la derecha están tomadas a 100x y la barra de calibración representa 20 µm.

**Tabla 10: Porcentaje de positividad medio de las enzimas a nivel intracelular en cartílago sano y OA.**

Los valores se representan como media ± EE. \*  $p < 0,05$  respecto a la condición normal.

	Normal	OA
CBS	6,60 ± 4,03	4,38 ± 1,30
CTH	12,18 ± 2,02	12,92 ± 4,14
MPST	14,63 ± 4,41	*5,72 ± 1,84

## **2. EFECTOS DEL SULFURO DE HIDRÓGENO EXÓGENO**

En este apartado se estudiaron los efectos de los compuestos de sulfuro sobre diversos parámetros celulares. El objetivo era, por un lado, comprobar que los compuestos no son tóxicos para las células y por otro, ver si al simular las condiciones inflamatorias a las que están sometidos los condrocitos en la articulación OA los compuestos de sulfuro pueden ejercer efectos anti-inflamatorios, anti-catabólicos y/o anti-oxidantes. Esto se hizo co-estimulando las células con IL-1 $\beta$  y las distintas concentraciones de los compuestos de H<sub>2</sub>S (ver [Tabla 2](#)).

### **2.1. Efecto de los compuestos de sulfuro de hidrógeno sobre la viabilidad celular**

Los efectos de la adición de los compuestos de H<sub>2</sub>S, NaSH y GYY4137 sobre la viabilidad de los condrocitos articulares OA se evaluaron con el método *AlamarBlue*®. Los valores obtenidos (n=3) se normalizaron con respecto a las condiciones basales a las que se les adjudicó un valor del 100%. No se observó ninguna diferencia significativa entre la viabilidad de las células en la condición basal y la de las células expuestas a las diferentes concentraciones de ambos compuestos de sulfuro, NaSH y GYY4137 ( $p > 0,05$ ) ([Tabla 11](#)).

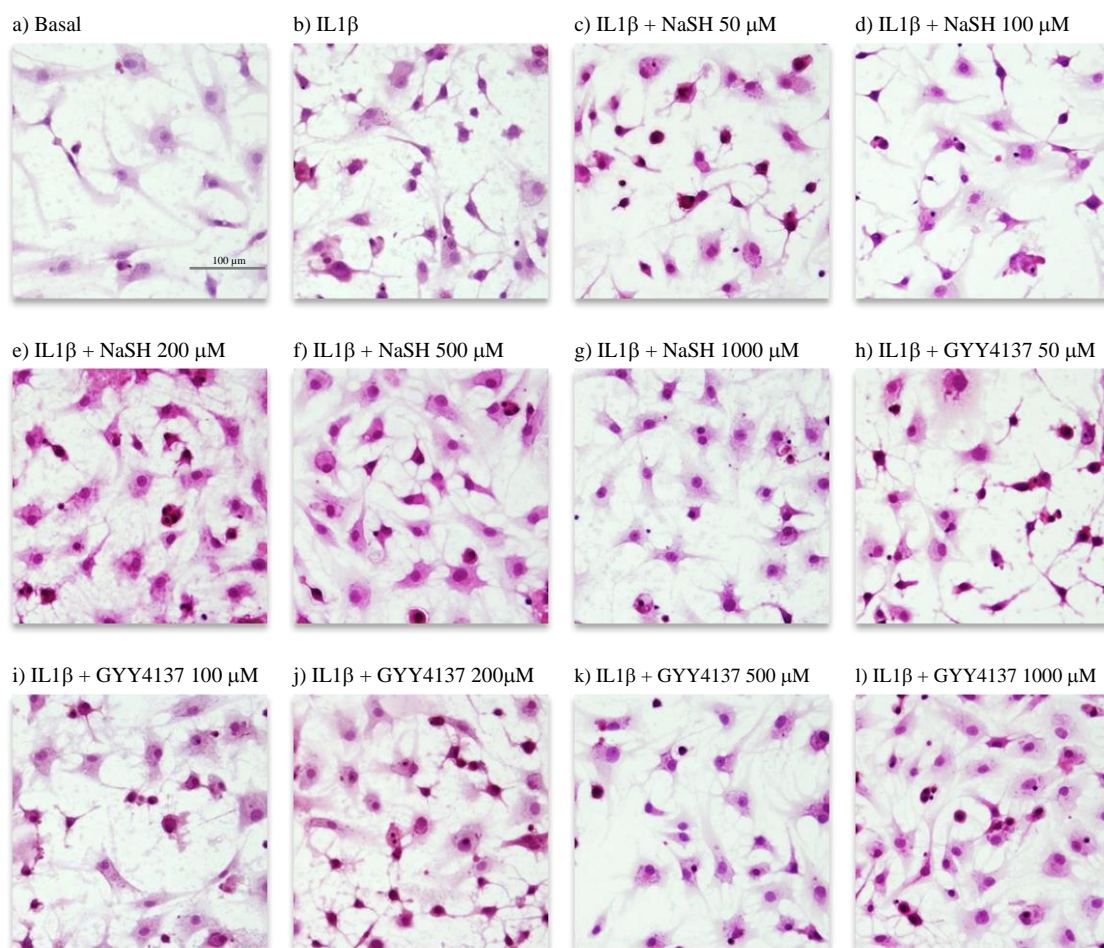
**Tabla 11: Viabilidad de los condrocitos expuestos a NaSH o GYY4137 medida con el método *AlamarBlue*®.** Los resultados se presentan como la media con un intervalo de confianza del 95% (límite superior LS - límite inferior LI), n=3.

	Basal	IL-1 $\beta$	Concentración de NaSH o GYY4137				
			50 $\mu$ M	100 $\mu$ M	200 $\mu$ M	500 $\mu$ M	1000 $\mu$ M
<b>NaSH</b>	100,0 (46,3-153,7)	106,5 (34,5-181,4)	107,2 (54,0-156,7)	103,4 (43,8-161,2)	104,4 (43,6-163,1)	100,0 (42,7-157,7)	98,2 (41,3-156,1)
<b>GYY</b>	100,0 (53,7-146,3)	106,5 (45,7-170,8)	98,9 (50,4-150,5)	94,9 (51,0-143,2)	93,7 (48,1-143,5)	98,6 (54,1-143,8)	99,4 (50,2-149,4)



## 2.2. Efecto de los compuestos de sulfuro de hidrógeno sobre la morfología celular

Para estudiar el efecto de los compuestos de  $H_2S$  sobre los cambios morfológicos inducidos por la estimulación con  $IL-1\beta$ , se realizó una tinción con H-E (Fig. 22). Para esto, los condrocitos se sembraron en *chamber-slides* y se estimularon con  $IL-1\beta$  y los compuestos de  $H_2S$ , tal como se describió en Material y Métodos. Se pudo observar que al estimular los condrocitos con  $IL-1\beta$  se produjo un cambio en su morfología. Se observó una reducción en su tamaño y una tendencia a replegarse ocupando menos superficie de cultivo, (Fig. 22b). Con los tratamientos de sulfuro se moderan estos cambios morfológicos, incluso hasta casi desaparecer en las concentraciones más elevadas (Fig. 22 k-l). Se observó, por tanto, un efecto protector dosis-dependiente y más efectivo a las concentraciones de 200 a 1000  $\mu M$ .



**Fig. 22: Tinción de H-E de condrocitos co-estimulados con  $IL-1\beta$  y las diferentes concentraciones de los compuestos de sulfuro.**

Se observa el efecto de la  $IL-1\beta$  en la morfología de los condrocitos (b) frente a la condición basal (a) y comprobamos como a mayor concentración de NaSH (c, d, e, f y g) o GYY4137 (h, i, j, k y l) este cambio morfológico va desapareciendo. Fotos hechas a 20 x, la escala representada en la imagen a representa 100  $\mu m$ .

## **2.3. Efectos del sulfuro de hidrógeno sobre el estrés oxidativo**

### *2.3.1 Efecto sobre las especies reactivas de nitrógeno*

#### *Efecto sobre los niveles de óxido nítrico*

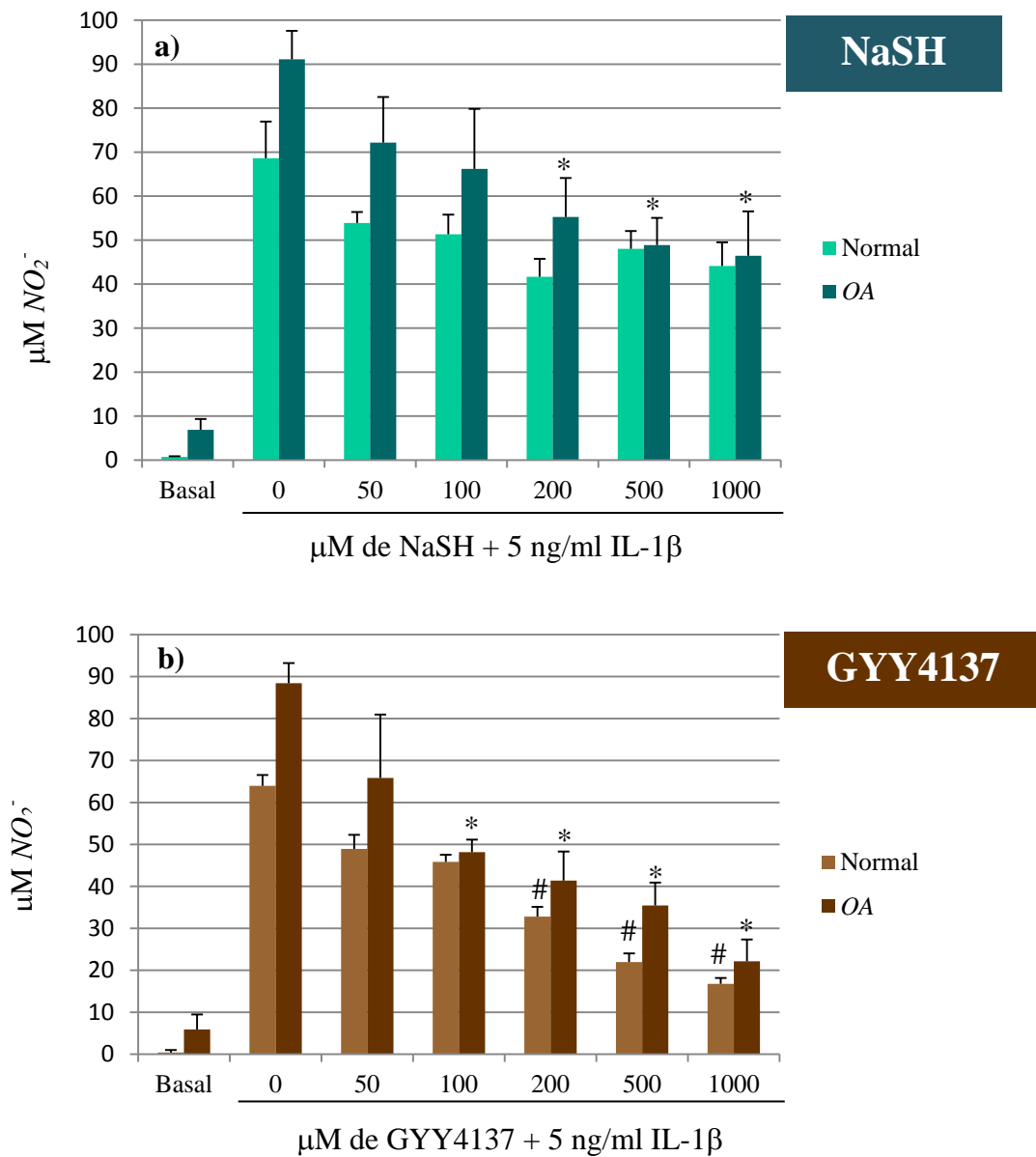
Se cuantificó la producción de *NO* en condrocitos *OA* y normales co-estimulados con IL-1 $\beta$  y NaSH o GYY4137 (Tabla 2), utilizando el reactivo de Griess. Como era de esperar la estimulación con IL-1 $\beta$  provocó un aumento de la producción de *NO* en ambos tipos de células (Fig. 23). Respecto a los efectos de los compuestos de H<sub>2</sub>S en las células *OA* (n=7) se pudo observar para el compuesto NaSH un descenso significativo para las concentraciones de 200, 500 y 1000  $\mu$ M respecto a la condición con sólo IL-1 $\beta$  (Fig. 23a). Y lo mismo ocurrió con el GYY4137 con las condiciones 100, 200, 500 y 1000  $\mu$ M (Fig. 23b). Cuando comparamos estos resultados con los obtenidos al realizar el mismo experimento en condrocitos obtenidos de pacientes sanos (n=3), observamos que, si bien hay una menor cantidad de *NO* de forma basal, la estimulación con IL-1 $\beta$  (Fig. 23a) también produce un aumento significativo de la producción de óxido nítrico en estas células. El efecto del NaSH sobre este aumento es evidente, pero no es estadísticamente significativo, mientras que los efectos de GYY4137 (Fig. 23b) son similares a los observados en condrocitos *OA*, con un descenso dosis-dependiente y significativo en las concentraciones de 200, 500 y 1000  $\mu$ M.

#### *Efecto sobre la expresión y síntesis de la enzima inducible sintasa del óxido nítrico*

La expresión de ARN mensajero (ARNm) de *iNOS* se cuantificó por *qRT-PCR* en condrocitos *OA* (NaSH n=4, GYY4137 n=5) (Fig. 24 a y b). Correspondiéndose con los efectos encontrados en los niveles de *NO*, la estimulación con IL-1 $\beta$  supuso un aumento en la expresión génica de *iNOS* y la administración de las diferentes concentraciones de los compuestos que producen sulfuro de hidrógeno atenuó visiblemente esta sobreexpresión de manera dosis dependiente, siendo las concentraciones más elevadas las más efectivas. Sin embargo este efecto no resultó significativo en el análisis estadístico debido a las diferencias de expresión entre los diferentes donantes a pesar de que la tendencia era la misma en todos.

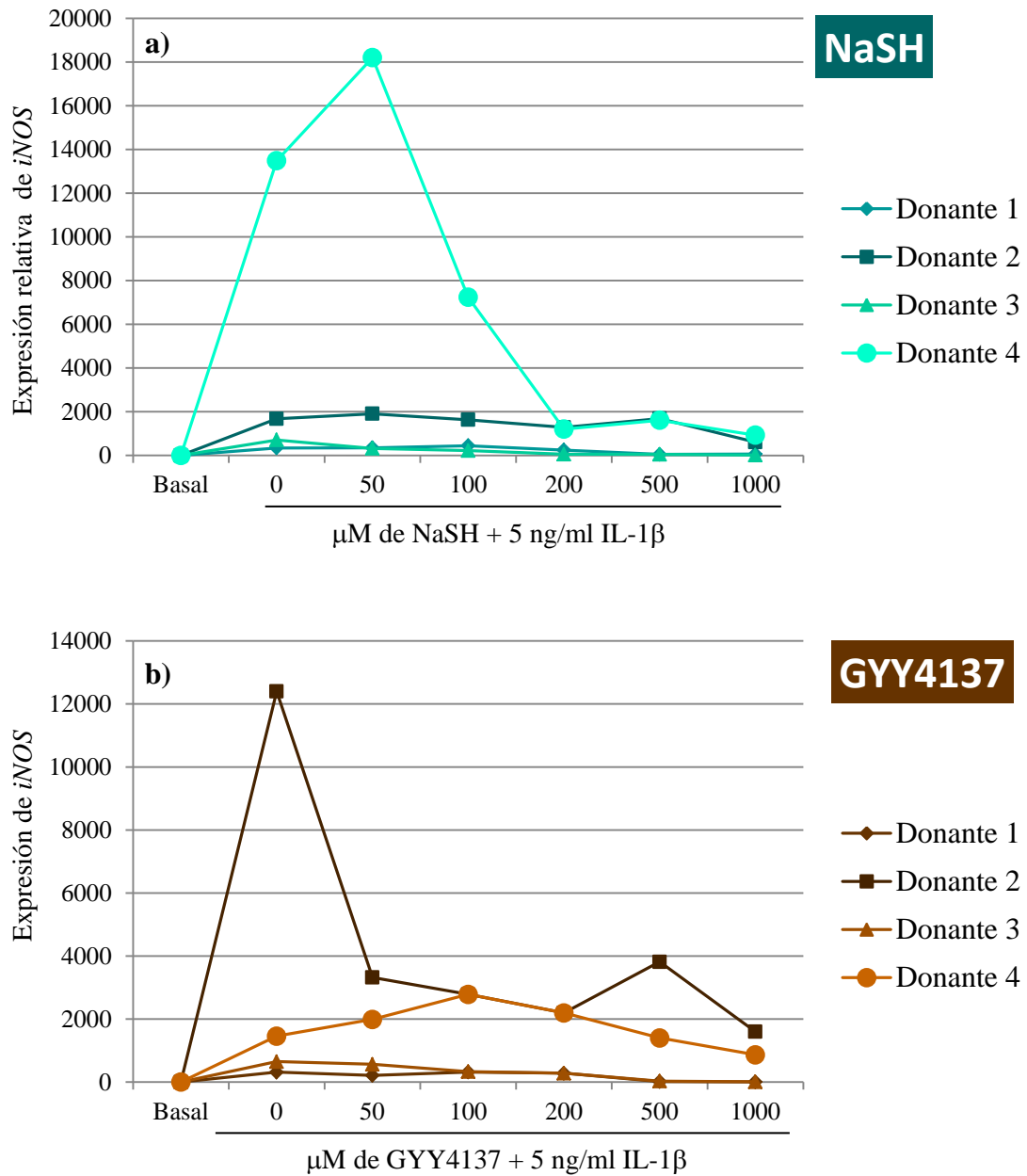
Para comprobar que esta disminución en la expresión de ARNm se continuaba con una disminución en la síntesis de la proteína se realizaron inmunocitoquímicas de *iNOS* (n=3) en condrocitos *OA* (Fig. 25). Con esta técnica pudimos observar de nuevo un aumento de *iNOS* en la condición con IL-1 $\beta$  (Fig. 25b) y cómo sus niveles se atenuaban

al administrar NaSH (Fig. 25 c, d, e, f y g) o GYY4137 (Fig. 25 h, i, j, k y l). Curiosamente en este caso mientras que GYY4137 se mostró marcadamente efectivo a partir de 100  $\mu\text{M}$ , NaSH mostró su mayor efectividad con la concentración de 100  $\mu\text{M}$ , siendo las concentraciones más altas menos efectivas.



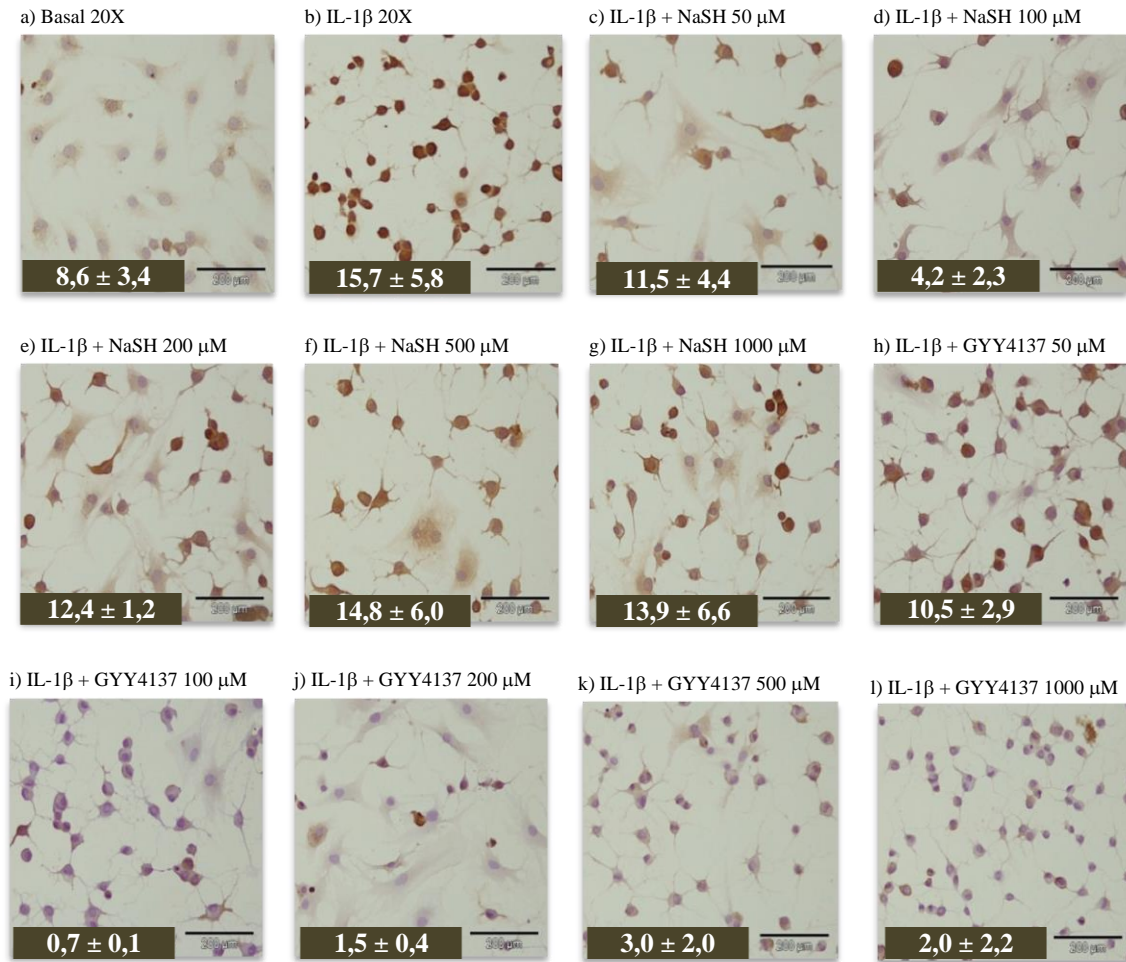
**Fig. 23: Cuantificación de los niveles de  $\text{NO}_2^-$  en condrocitos OA y N estimulados con IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) y las distintas concentraciones de NaSH o GYY4137.**

Se observó una reducción dosis-dependiente al aumentar la concentración de NaSH (a) y GYY4137 (b). \* $p < 0,05$  con respecto a IL-1 $\beta$  en condrocitos OA. #  $p < 0,05$  con respecto a IL-1 $\beta$  en condrocitos normales.



**Fig. 24: Expresión génica de *iNOS* de los donantes individuales de condrocitos OA estimulados con IL-1 $\beta$  y NaSH o GYY4137.**

a) NaSH, b) GYY4137. Todas las condiciones están normalizadas al basal al que se le ha adjudicado un valor de 1. Se observó un efecto dosis dependiente con ambos compuestos.



**Fig. 25: Imágenes representativas de las ICQ de *iNOS* en condrocitos OA.**

Se observa una mayor expresión de *iNOS* en la condición con IL-1β (b) con respecto a la basal (a) y ambos compuestos, pero sobretodo GYY4137 (h, i, j, k y l) reducen esta expresión. En cada esquina inferior izquierda de cada foto se representa la positividad en porcentaje de *iNOS*. Las barras representan 200 µm.

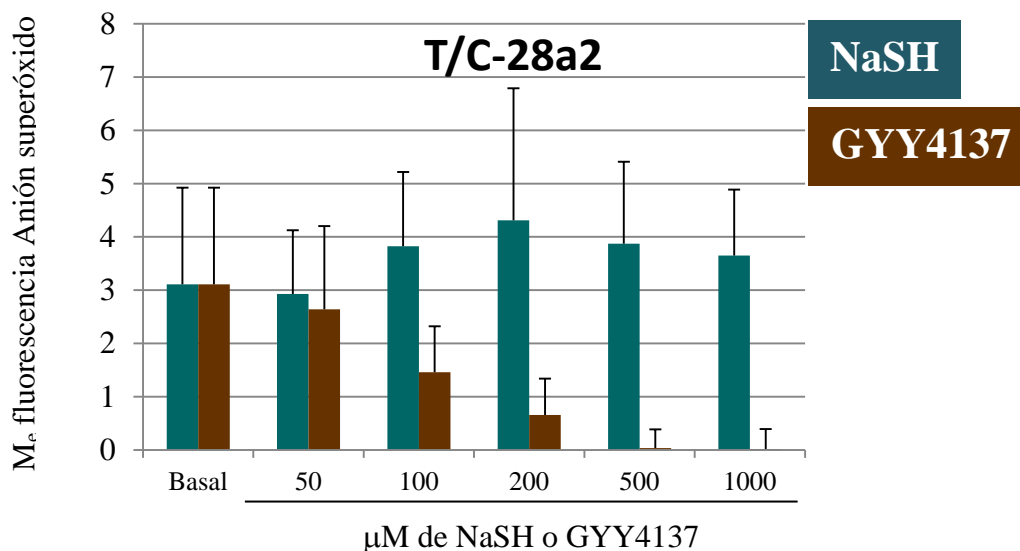


### 2.3.2 Efecto sobre las especies reactivas de oxígeno

Las propiedades anti-oxidantes de los compuestos de H<sub>2</sub>S se estudiaron utilizando citometría de flujo. En estos experimentos las células se estimularon únicamente con los compuestos de sulfuro y se estudió la producción de ROS con el fluoróforo *Mitosox<sup>TM</sup>Red*. Se realizaron unos experimentos preliminares (n=3) utilizando la línea celular T/C-28a2, con la que se obtuvieron los siguientes resultados (Fig. 26):

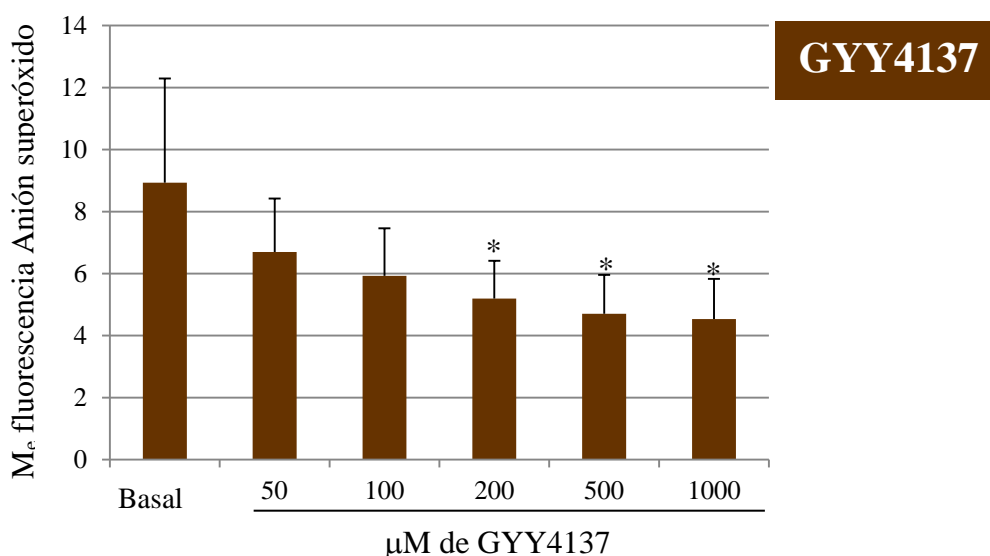
- Los niveles basales del O<sub>2</sub><sup>-</sup> se ven reducidos con la administración de GYY4137, pero no con el compuesto NaSH.
- Además, la reducción de ROS con GYY4137 parece ser dosis dependiente alcanzando un efecto techo en 500 μM.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con la línea celular, se estudiaron a continuación los efectos de solamente GYY4137 (50, 100, 200, 500 y 1000 μM) sobre los cultivos primarios de condrocitos OA. Los resultados se presentan en la Fig. 27. Se encontró, al igual que con la línea celular, una reducción dosis dependiente del O<sub>2</sub><sup>-</sup> que fue significativa para las concentraciones de 200, 500 y 1000 μM.



**Fig. 26: Fluorescencia para el anión superóxido en la línea celular inmortalizada de condrocitos TC28a2.**

La línea celular fue estimulada con las diferentes concentraciones de los compuestos de sulfuro y la fluorescencia correspondiente con los niveles de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, se comparó con la de la condición basal.

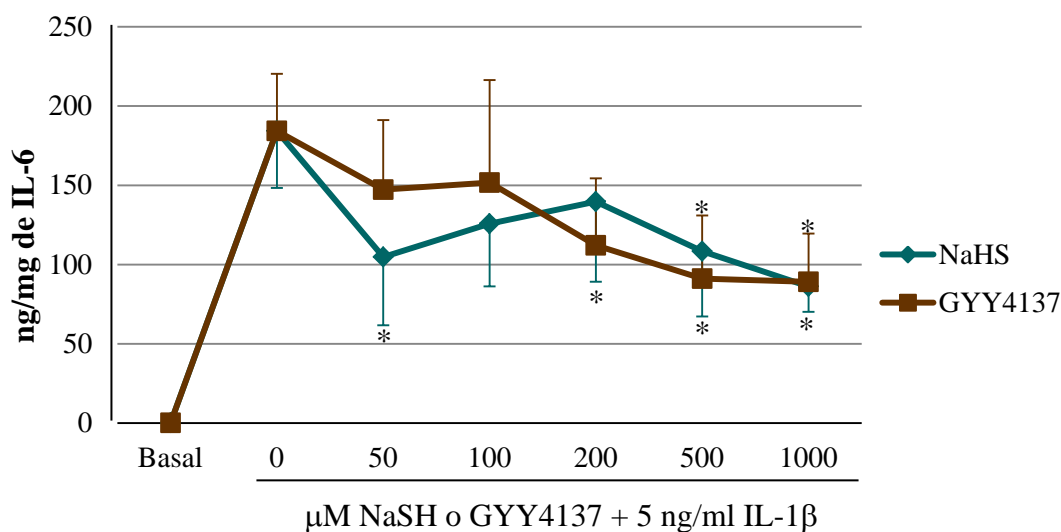


**Fig. 27: Fluorescencia para el anión superóxido en condrocitos OA estimulados con diferentes concentraciones de GYY4137 frente a la condición basal.** n=6, \* $p < 0,01$  respecto a la condición basal.

## 2.4. Efecto de los compuestos de H<sub>2</sub>S sobre marcadores de inflamación

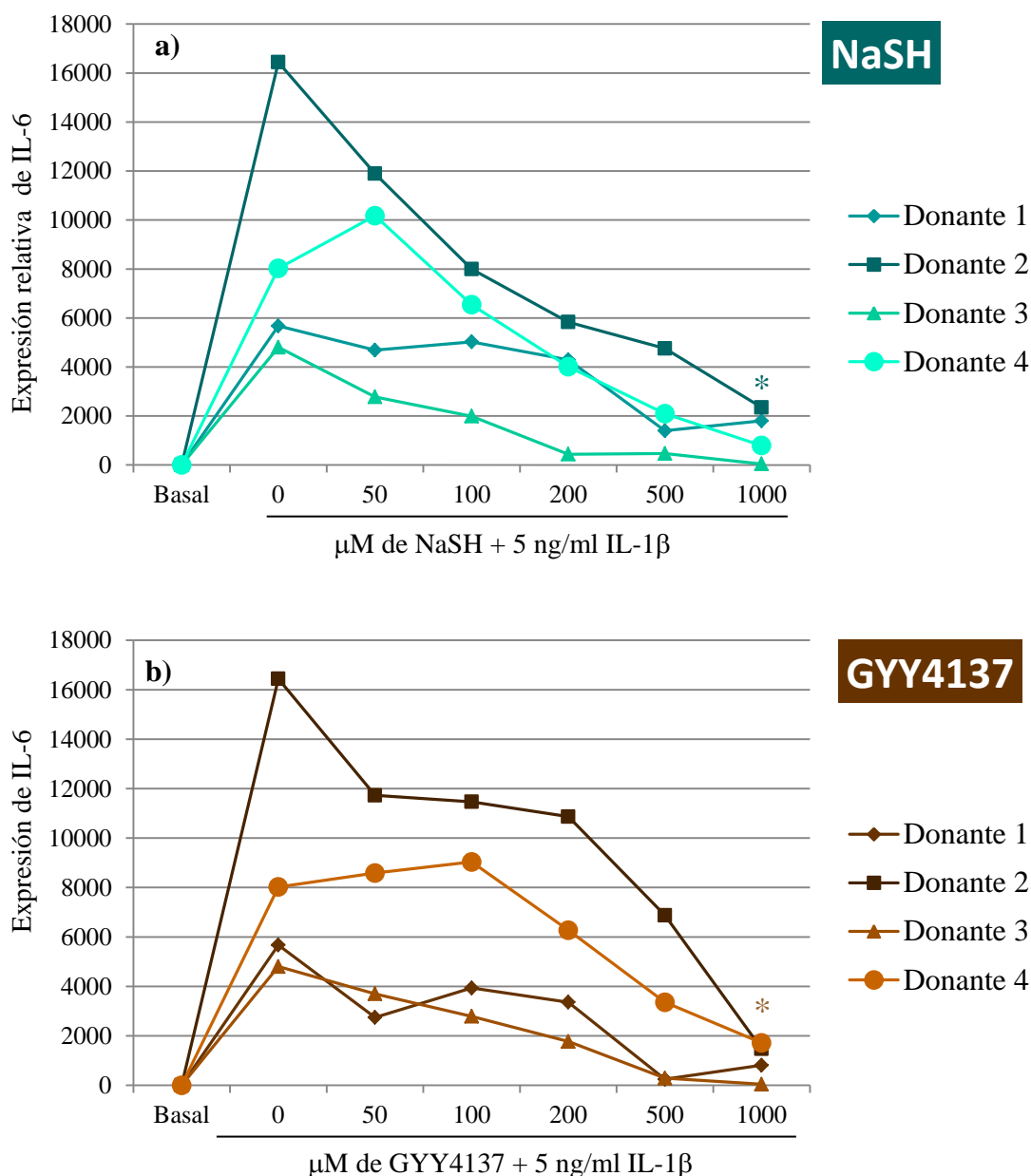
### 2.4.1 Efecto sobre la producción de la citoquina IL-6

Los niveles de proteína analizados mediante *ELISA* mostraron, como se esperaba, un aumento significativo de la IL-6 con respecto al basal en la condición estimulada con IL-1 $\beta$  (Fig. 28). La co-estimulación con ambos compuestos de H<sub>2</sub>S revirtió este aumento. En el caso de GYY4137 se observó un efecto dosis dependiente que a concentraciones iguales o superiores a 200  $\mu$ M resultó significativo, mientras que NaSH con 50 ya se alcanzó una reducción significativa produciéndose un efecto techo ya a partir de esta concentración.



**Fig. 28: Niveles de IL-6 en condrocitos OA co-estimulados con IL-1 $\beta$  y NaSH o GYY4137.** n=3. \* $p < 0,05$  con respecto a IL-1 $\beta$ .

Los resultados obtenidos respecto a la liberación de la proteína a los sobrenadantes celulares se correspondieron con los resultados encontrados en la expresión de ARNm (Fig. 29). En este análisis se comprobó como la IL-1 $\beta$  aumentó la expresión génica de IL-6 y la co-estimulación con NaSH y GYY4137 supuso un descenso dosis dependiente con un resultado estadísticamente significativo para la concentración de 1000  $\mu$ M de ambos compuestos de sulfuro, con la que podemos observar que la expresión génica se acerca a la encontrada en el basal.

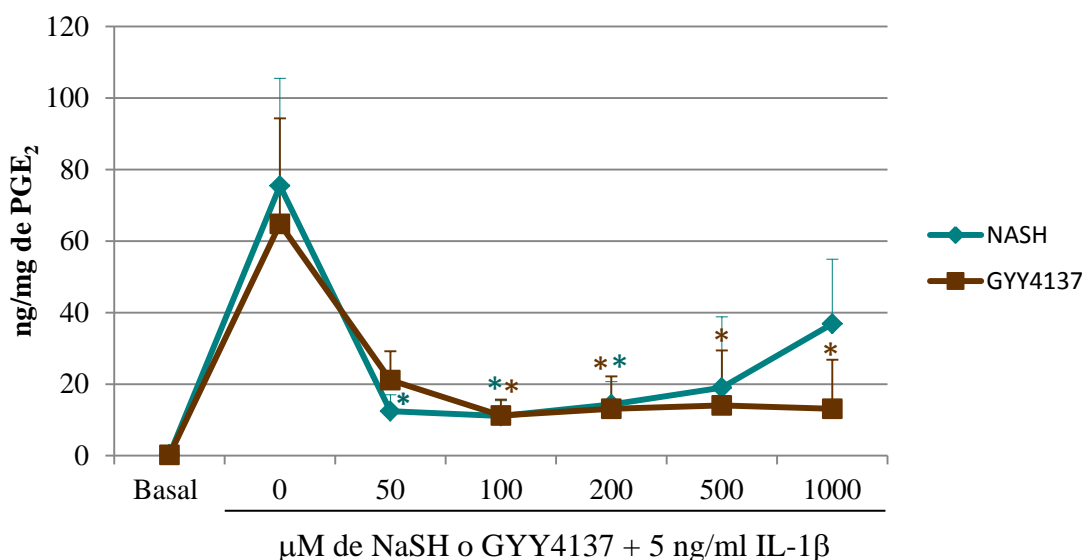


**Fig. 29: Expresión génica de IL-6 en condrocitos OA estimulados con IL-1 $\beta$  y NaSH (a) o GYY4137 (b).** Todas las condiciones están normalizadas al basal al que se le ha adjudicado un valor de 1. \* $p < 0,05$  con respecto a IL-1 $\beta$ .

### 2.4.2 Efecto de los compuestos de sulfuro de hidrógeno sobre la producción de PGE<sub>2</sub> y sus enzimas de síntesis

La producción de PGE<sub>2</sub> en las células estimuladas con IL-1 $\beta$ , se cuantificó en sobrenadantes celulares utilizando un ensayo inmunoenzimático específico (n=3). También se cuantificó la expresión génica de sus principales enzimas de producción, COX-1, COX-2 y *PTGES* en las células. Éstas se sembraron y se estimularon como se especificó en la [Tabla 2](#).

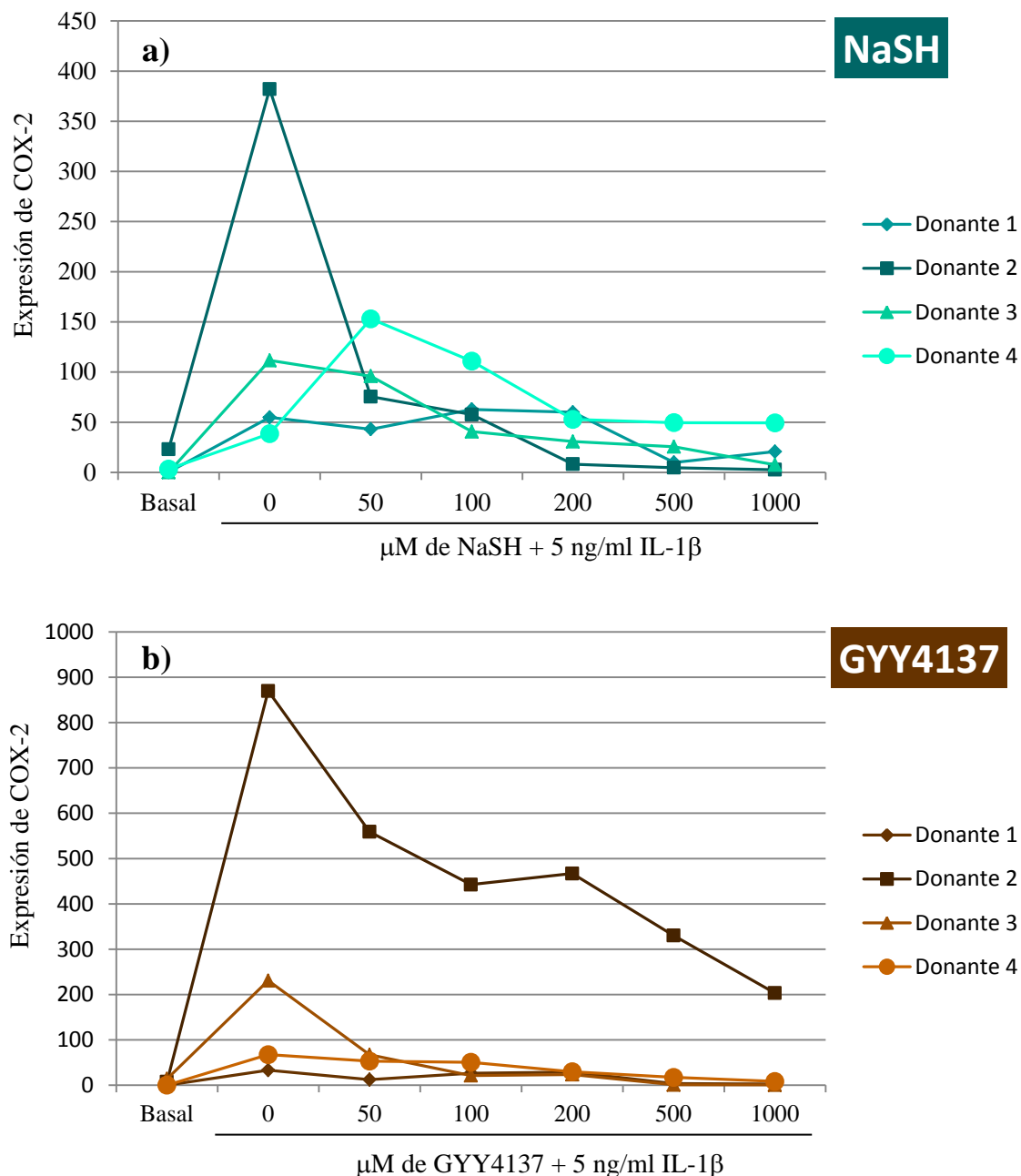
Los niveles basales de PGE<sub>2</sub> en los condrocitos OA fueron de 0,25 (0,13-0,36) ng/ml. La estimulación con IL-1 $\beta$  produjo un incremento de esta proteína hasta 64,72 (41,78-87,66) ng/ml. Las diferentes concentraciones de NaSH y GYY4137 añadidas a las células junto con IL-1 $\beta$  supusieron una disminución significativa respecto a las células estimuladas únicamente con la IL-1 $\beta$  ([Fig. 30](#)).



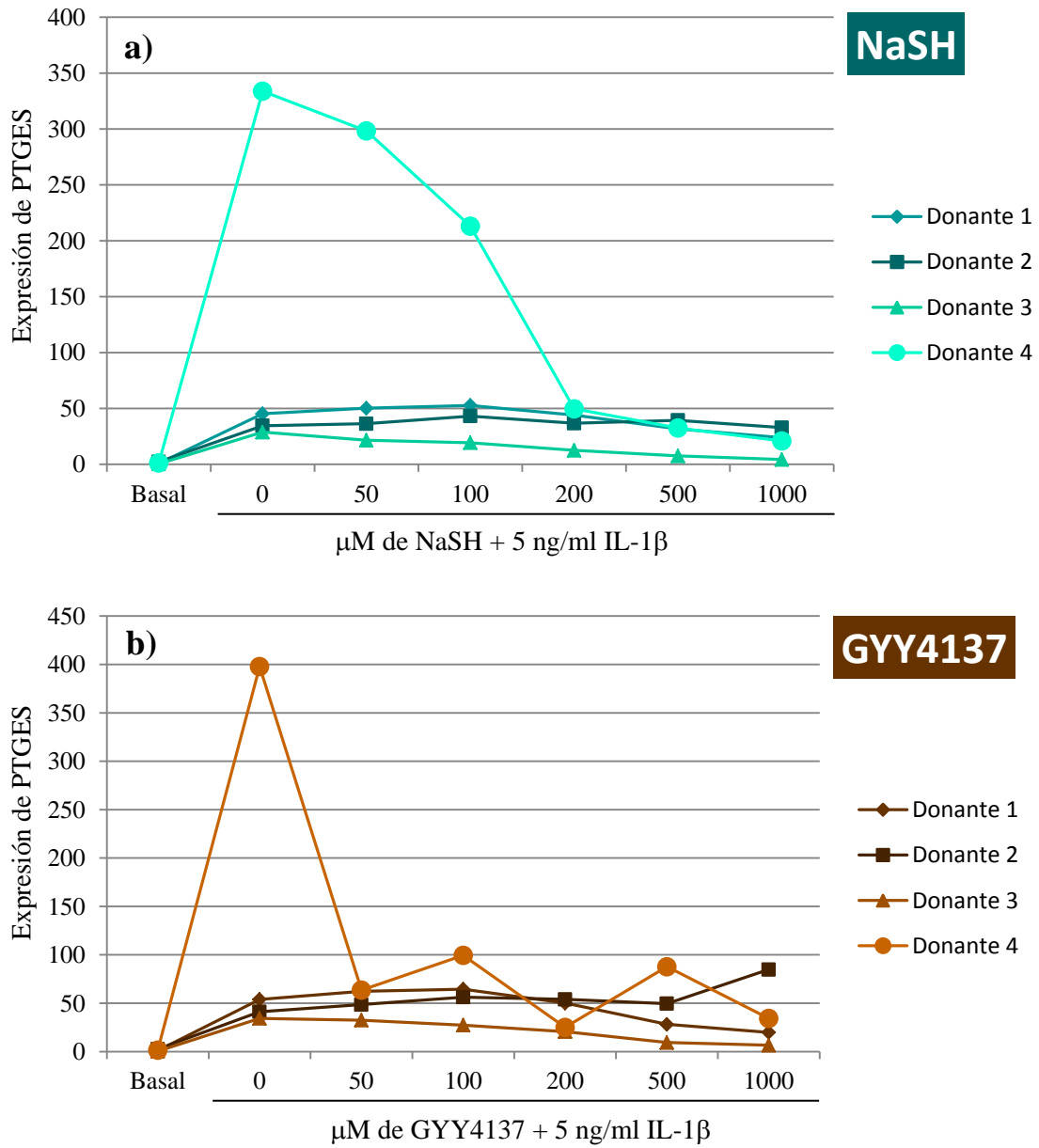
**Fig. 30:** Niveles de PGE<sub>2</sub> en condrocitos OA co-estimulados con IL-1 $\beta$  y NaSH o GYY4137. \* $p < 0,05$  con respecto a IL-1 $\beta$ . Se puede observar como la co-estimulación de NaSH y GYY4137 con la IL-1 $\beta$  evita el aumento de la PGE<sub>2</sub>.

En cuanto a la expresión de ARNm de las dos enzimas involucradas en la síntesis de la PGE<sub>2</sub>, en condiciones patológicas, se encontró una importante reducción dosis dependiente para COX-2, respecto al incremento que se observó al estimular con IL-1 $\beta$ . Concretamente, el valor de la inducción de COX-2 con la IL-1 $\beta$  fue 97,5 (19,5-487,9) veces la expresión basal, disminuyendo esta expresión hasta retornarla a valores próximos a los basales 12,0 (1,6-89,13) y 7,6 (0,4-142,1) al co-estimular con NaSH y GYY4137 1000  $\mu$ M, respectivamente ([Fig. 31](#)) (n=4). Por otro lado, IL-1 $\beta$  también

indujo un incremento de la expresión génica de *PTGES* (68,5 (19,8, 236,7) vs. Basal) mostrando 1000  $\mu\text{M}$  NaSH y GYY4137 unos valores considerablemente más reducidos 16,3 (3,8, 69,2) y 31,7 (8,3, 120,7), respectivamente (n=4) (Fig. 32).



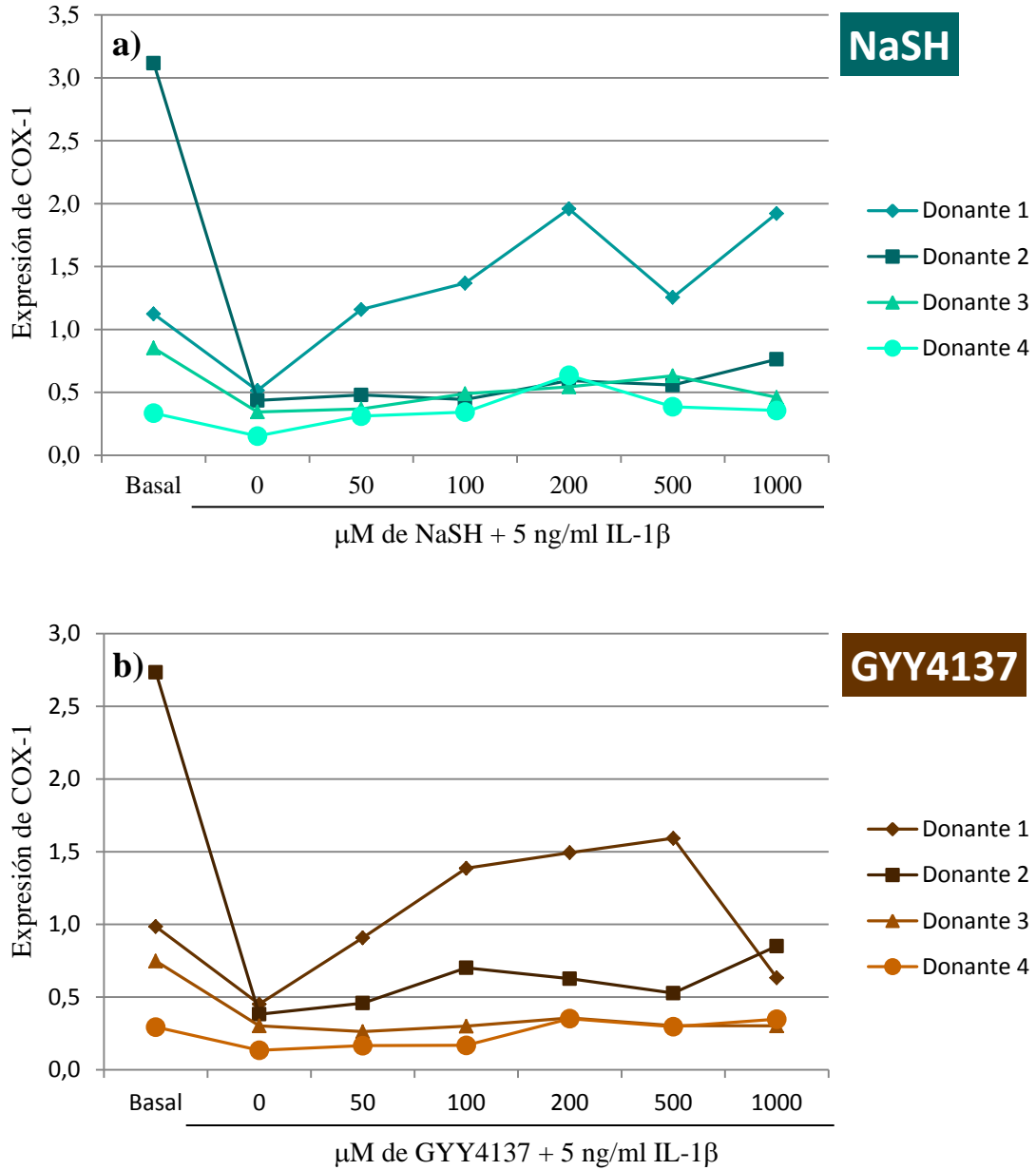
**Fig. 31: Expresión génica de COX-2 en condrocitos OA co-estimulados con IL-1 $\beta$  y NaSH (a) o GYY4137 (b).** Todas las condiciones están normalizadas al basal al que se le ha adjudicado un valor de 1. # $p < 0,05$  con respecto a la condición basal.



**Fig. 32: Expresión génica de PTGES en condrocitos OA co-estimulados con IL-1β y NaSH (a) o GYY4137 (b).**

Todas las condiciones están normalizadas al basal al que se le ha adjudicado un valor de 1.

Al analizar la expresión génica de la enzima fisiológica COX-1, (n=5), se observó un descenso al estimular los condrocitos con IL-1 $\beta$  que se revirtió parcialmente al añadir los compuestos de H<sub>2</sub>S (Fig. 33), aunque las diferencias no fueron significativas.



**Fig. 33: Expresión génica de COX-1 en condrocitos OA co-estimulados con IL-1 $\beta$  y NaSH (a) o GYY4137 (b).**

Todas las condiciones están normalizadas al basal al que se le ha adjudicado un valor de 1.

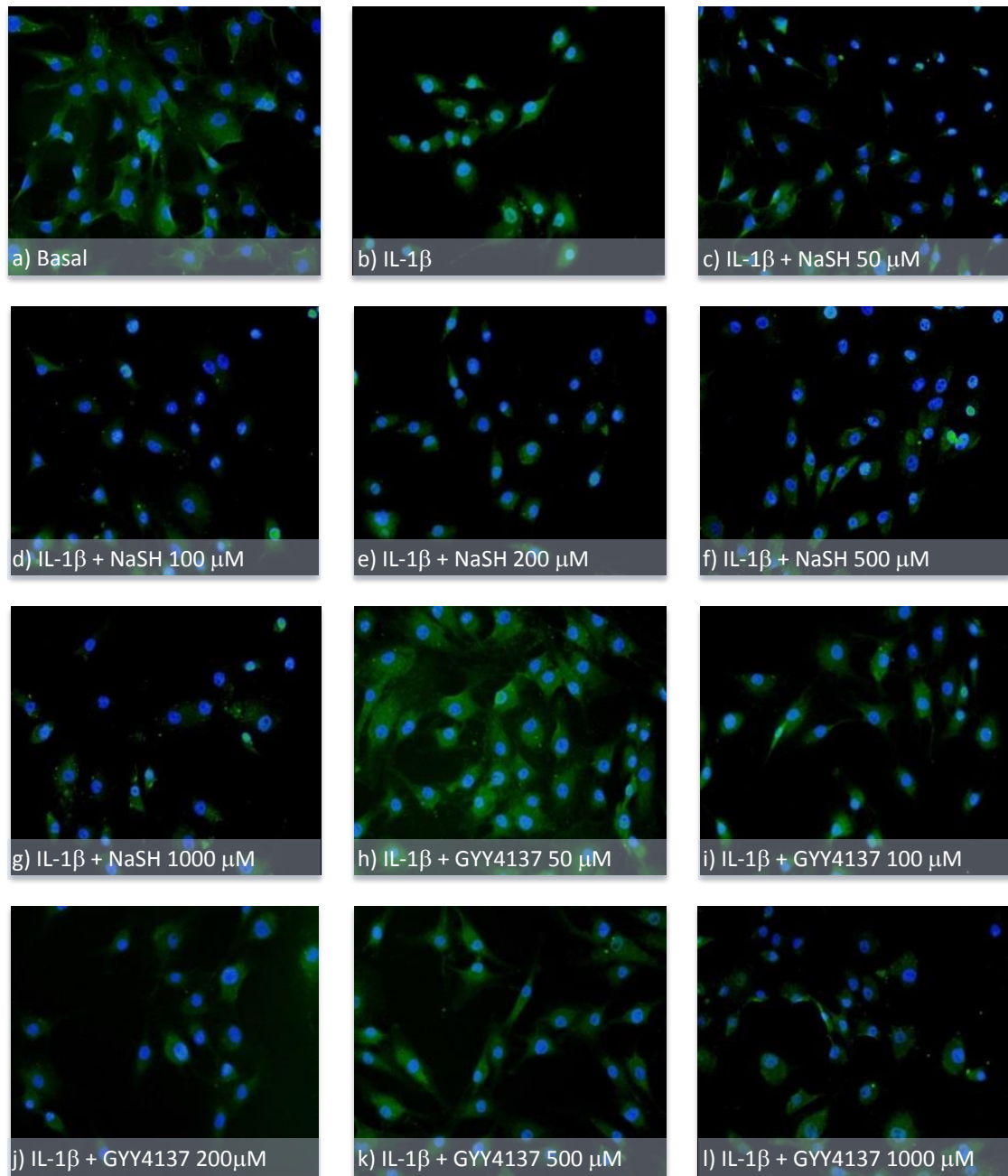
### 2.5. Visualización de la translocación de *NFκB* p65 por inmunofluorescencia.

Dado que la activación del factor de transcripción *NFκB* es una de las principales rutas de iniciación de la cascada de la inflamación, nos planteamos si los compuestos de sulfuro podrían ejercer los efectos anti-inflamatorios que acabamos de ver a través de una inhibición de la activación de esta ruta. Por ello se realizó un ensayo de inmunofluorescencia para comprobar si los compuestos de sulfuro afectaban a la translocación nuclear de la unidad p65 de *NFκB*. Lo que pudimos observar, plasmado en la [Fig. 34](#), fue lo siguiente:

- En la condición basal ([Fig. 34a](#)) la subunidad p65 se encuentra principalmente en el citoplasma de las células, y la estimulación con 5 ng/ml de IL-1β ([Fig. 34b](#)) produce una clara translocación al núcleo celular, donde se observa un aumento de la fluorescencia.
- La co-estimulación con las diferentes concentraciones de los compuestos de H<sub>2</sub>S (NaSH [Fig. 34 c, d, e, f y g](#) y GYY4137 [Fig. 34 h, i, j, k y l](#)) produjo una reducción en la intensidad de fluorescencia en el núcleo celular, aunque no se alcanzó la fluorescencia de la condición basal.

Por tanto los efectos anti-inflamatorios del H<sub>2</sub>S están mediados, como mínimo a través de la ruta *NFκB*.





**Fig. 34:** Efecto de las diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>S de NaSH y GYY4137 sobre la localización intracelular de la subunidad p65 de *NF $\kappa$ B*.

Las imágenes están tomadas en zonas representativas de los pocillos de la *chamber-slide* a 20x, y con los mismos parámetros de fluorescencia.

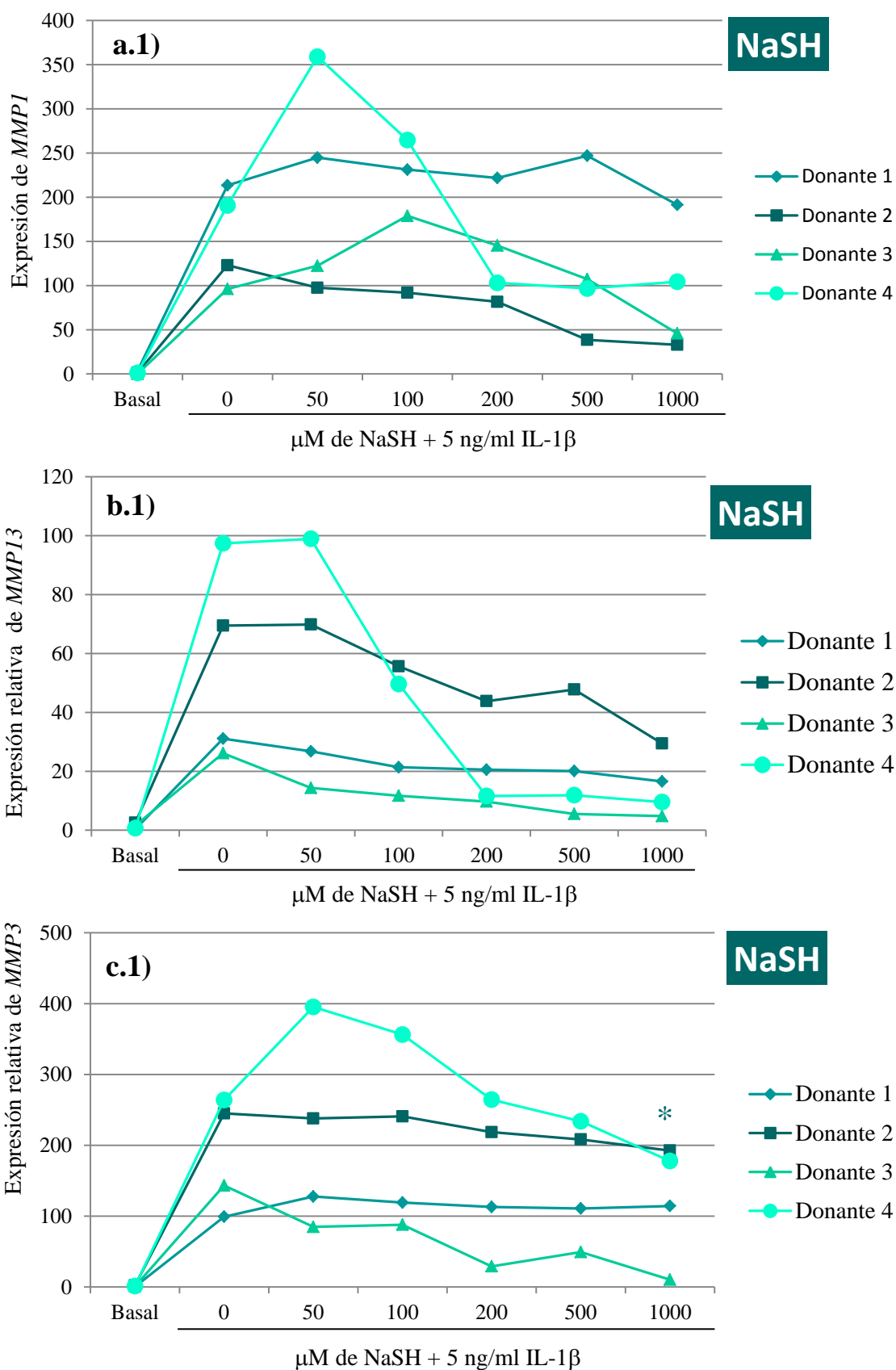
### 2.6. Efectos de los compuestos de sulfuro de hidrógeno sobre el desequilibrio anabólico-catabólico en la artrosis

Tras estudiar las propiedades anti-inflamatorias y anti-oxidantes de los reactivos de H<sub>2</sub>S, en este apartado nos propusimos estudiar sus propiedades anti-catabólicas y pro-anabólicas en condrocitos OA, y sus posibles propiedades como protectores frente a la destrucción de la MEC en cartílago. Para lo primero, se estudiaron los efectos sobre la expresión génica de marcadores de catabolismo y anabolismo en los cultivos celulares. En la segunda parte se realizaron experimentos con explantes de cartílago *in vitro* y estimulados también con IL-1 $\beta$  y los compuestos de H<sub>2</sub>S, y se analizó la liberación de GAGs utilizando un kit comercial. También se examinó el estado final de la MEC a los 21 días utilizando diversas tinciones histoquímicas e IHQ.

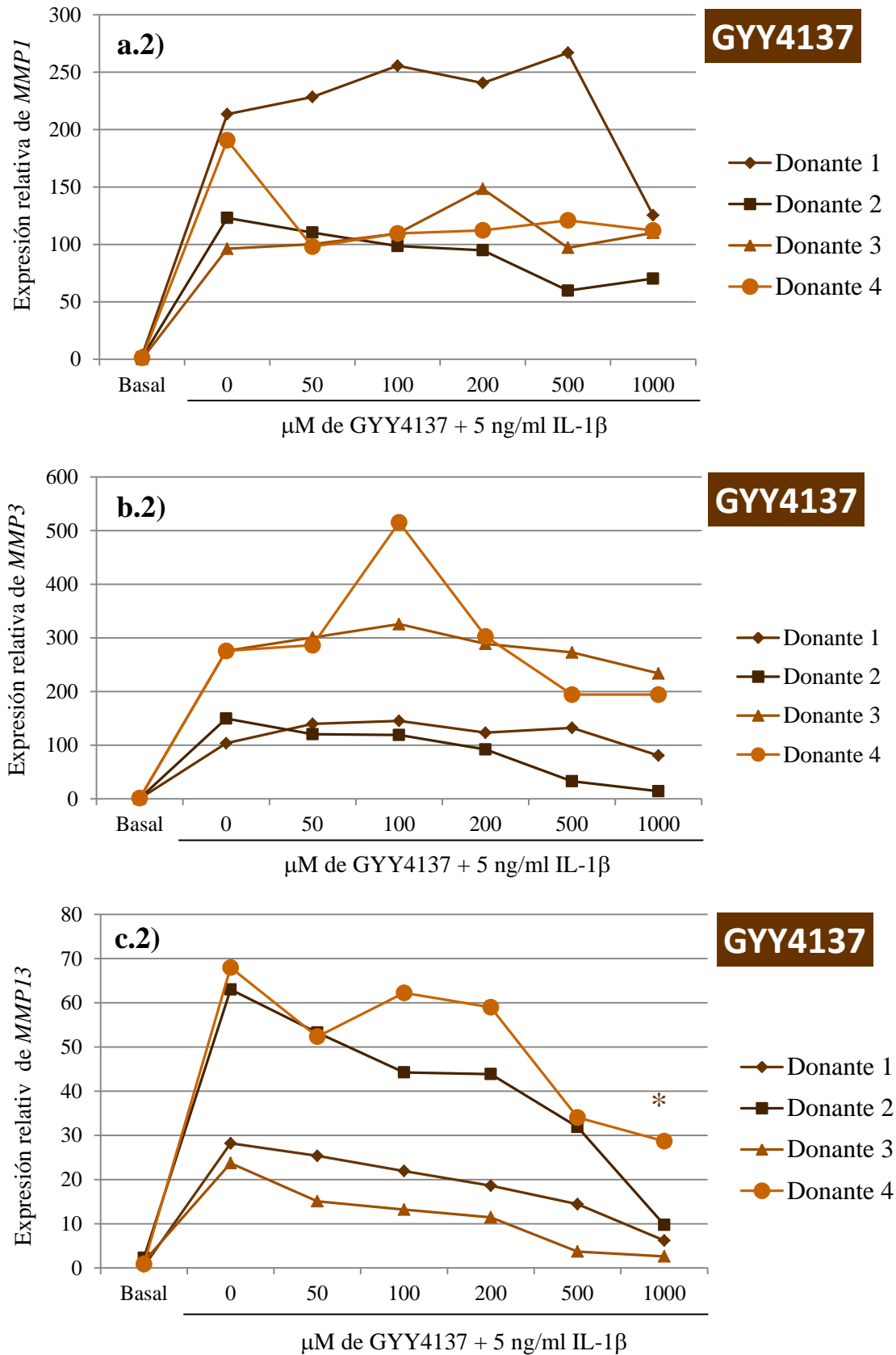
#### 2.6.1 Efectos de los compuestos de sulfuro de hidrógeno sobre la producción de las metaloproteasas de matriz MMP1, MMP3 y MMP13

Dado su papel en la destrucción de la matriz cartilaginosa, se seleccionaron como marcadores de catabolismo en el cartílago OA las MMPs de matriz 1, 3 y 13. Inicialmente, se analizó su expresión génica por *qRT-PCR* en condrocitos OA estimulados tal como se describió en la [Tabla 2](#). Este análisis reveló, por un lado, que la IL-1 $\beta$  produce un aumento significativo de las tres MMPs a las 48 h de estimulación, siendo este efecto más llamativo en MMP1 y MMP3 ([Fig. 35 y 36a](#) y [Fig. 35 y 36b](#)). Por otro lado, la co-estimulación con NaSH y GYY4137 tuvo, a su vez, un efecto similar en estas dos MMPs. Se observó un cierto efecto protector exclusivamente a partir de concentraciones de 200  $\mu$ M y siendo la dosis más efectiva para ambos compuestos la más elevada.

Para la MMP13, sin embargo, el efecto del H<sub>2</sub>S en su expresión génica es marcadamente dosis dependiente ([Fig. 35 y 36c](#)). En el caso de NaSH, se produjo un descenso muy marcado con 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M (20, 40 y 60% respectivamente), en cambio al aumentar a 500 y 1000  $\mu$ M sólo se consiguió un 5% y 10% de reducción adicional. Por el contrario, con GYY4137 se observó poca diferencia entre las concentraciones de 50, 100 y 200  $\mu$ M en las que hubo un descenso de entre el 20 y 30% respecto a IL-1 $\beta$ , mientras que con 500  $\mu$ M y 1000  $\mu$ M se acentuó y la expresión génica de MMP13 disminuyó un total de 60 y 80% respectivamente. En el caso de las dos concentraciones de 1000  $\mu$ M las diferencias fueron significativas.

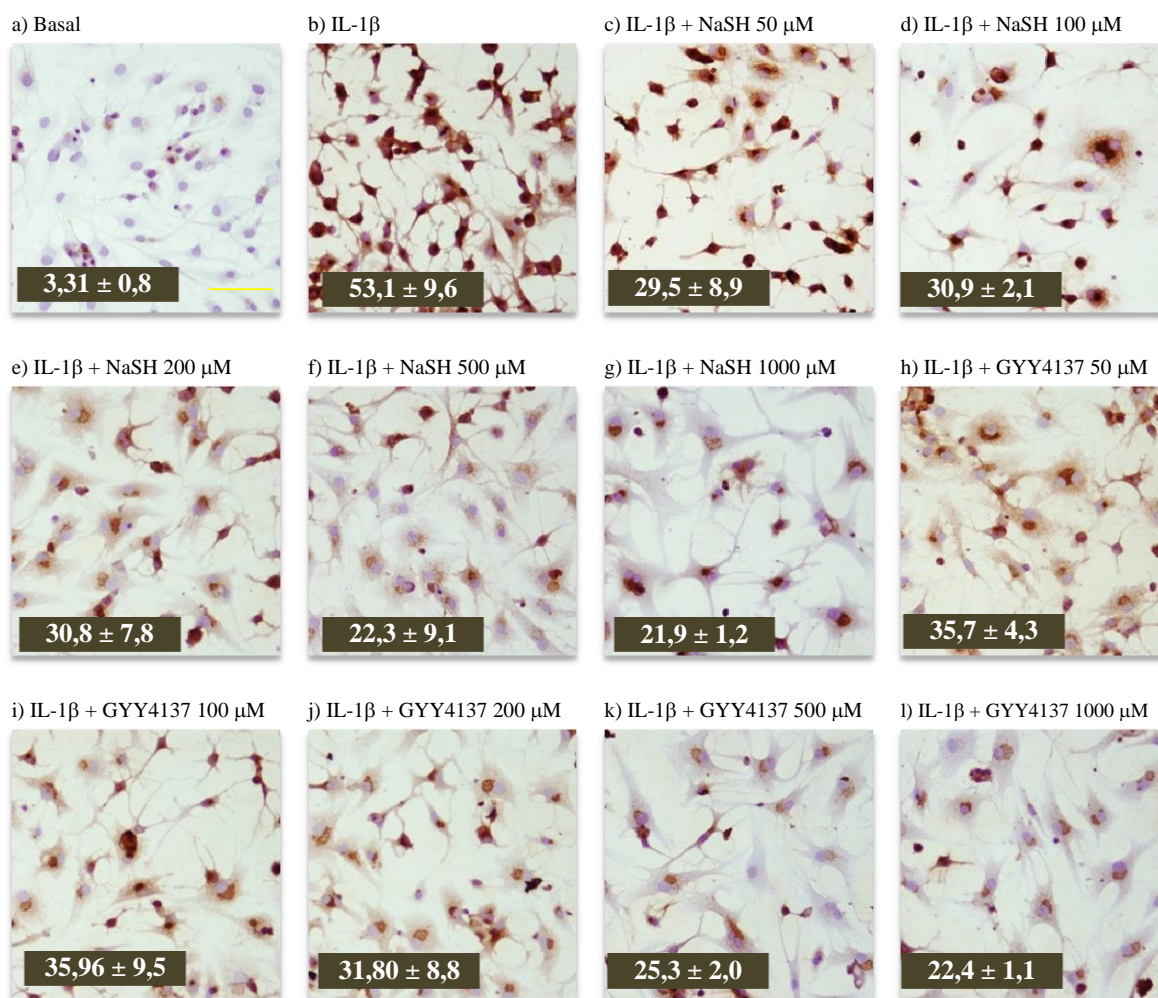


**Fig. 35:** Expresión génica de *MMP1* (a.1), *MMP3* (b) y *MMP13* (c), de cada uno de los donantes en condrocitos OA estimulados con IL-1 $\beta$  y NaSH (a.1, b.1, y c.1). Todas las condiciones están normalizadas al basal.



**Fig. 36:** Expresión génica de *MMP1* (a), *MMP3* (b) y *MMP13* (c), de cada uno de los donantes en condrocitos OA estimulados con IL-1β y NaSH (a.2, b.2, y c.2). Todas las condiciones están normalizadas al basal. \*  $p < 0,05$  con respecto a la IL-1β.

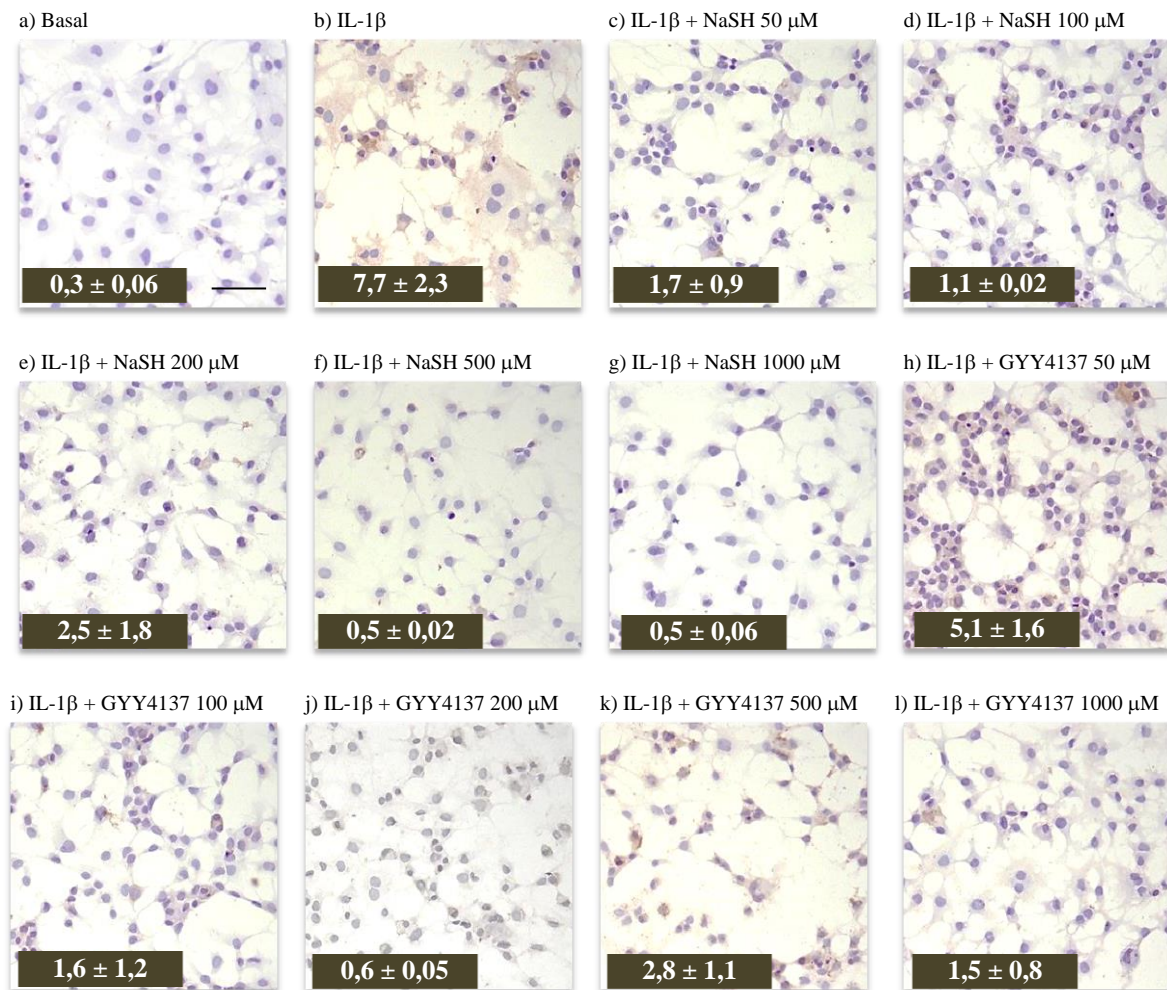
Estos resultados se complementaron realizando inmunocitoquímicas para *MMP3* (Fig. 37) y *MMP13* (Fig. 38) en los condrocitos estimulados. En ambos casos se pudo ver una reducción en la presencia de la proteína en las células, demostrando que las concentraciones más elevadas de los compuestos de sulfuro son efectivas para reducir la presencia de *MMP3* y *MMP13* inducida por la IL-1 $\beta$  en los condrocitos OA.



**Fig. 37: Efecto de las diferentes concentraciones de NaSH y GYY4137 sobre la proteína *MMP3*.**

Las imágenes están tomadas en zonas representativas de los pocillos de la *chamber-slide* a 20 aumentos. Los porcentajes están calculados con n=3 imágenes y son el promedio de positividad por cada 100 células. Podemos observar como los compuestos de sulfuro disminuyen considerablemente la positividad de *MMP3* producida por la IL-1 $\beta$  (b), siendo más efectivos a las dosis más elevadas. La escala de la imagen a representa 100  $\mu$ m.

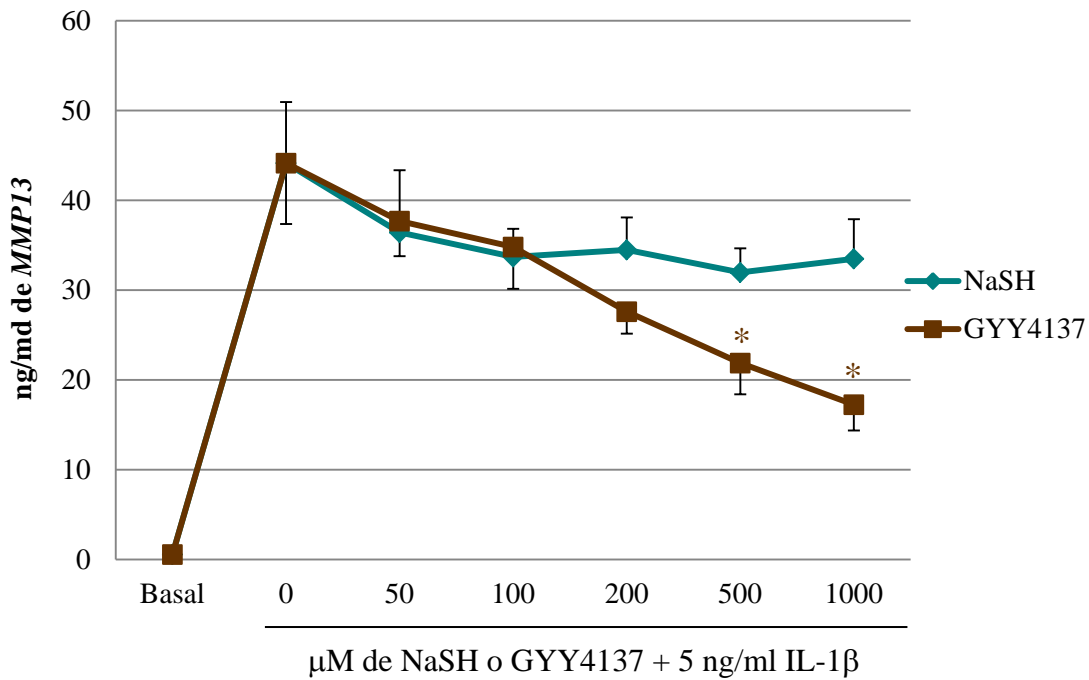




**Fig. 38: Efecto de las diferentes concentraciones de NaSH y GYY4137 sobre la proteína *MMP13*.**

Las imágenes están tomadas en zonas representativas de los pocillos de las *chamber-slides* a 20 aumentos. Los porcentajes están calculados con n=3 imágenes y son el promedio de positividad por cada 100 células. Podemos observar como los compuestos de sulfuro disminuyen la positividad de *MMP13* producida por la IL-1β (b), alcanzando su mayor efectividad con GYY4137 a 200 μM y NaSH a 1000 μM. La escala de la imagen a representa 100 μm.

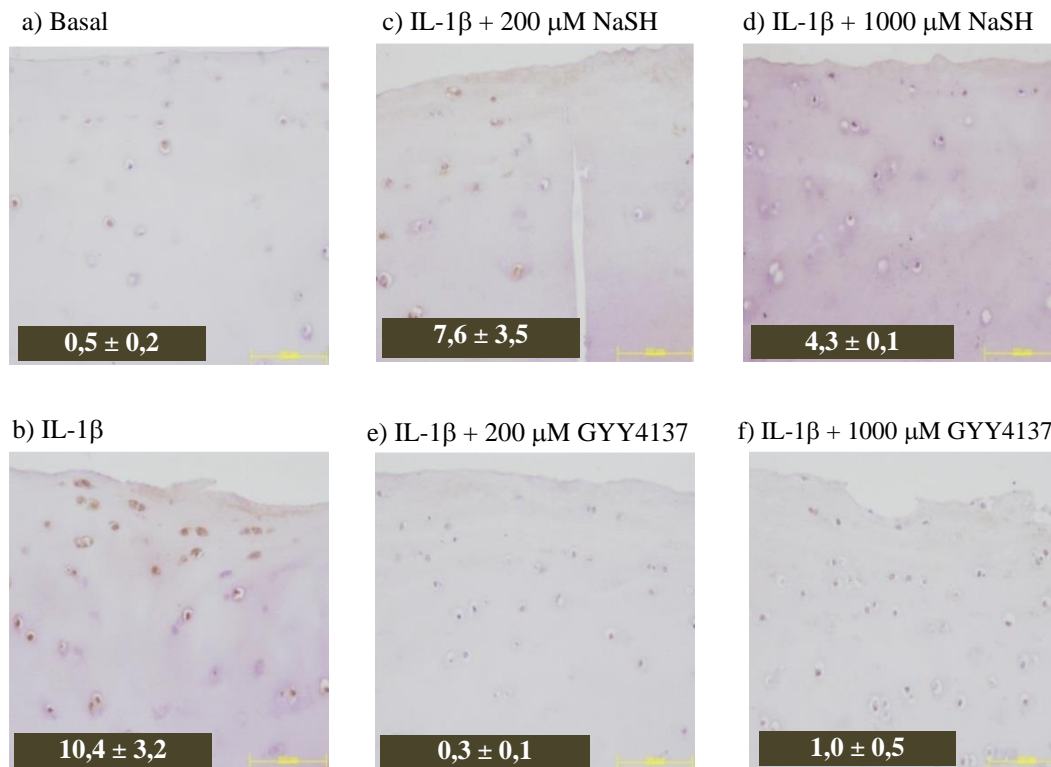
A mayores, dado que los efectos sobre la *MMP13* fueron los más pronunciados en la expresión génica y es la colagenasa más importante en el cartílago se realizó también una cuantificación de sus niveles en los sobrenadantes celulares con un *ELISA* específico (Fig. 39) (n=3). Con estos ensayos se observó una disminución dosis-dependiente con un patrón muy similar al de la expresión génica (Fig. 35) sobre todo en el caso de GYY4137 (Fig. 36).



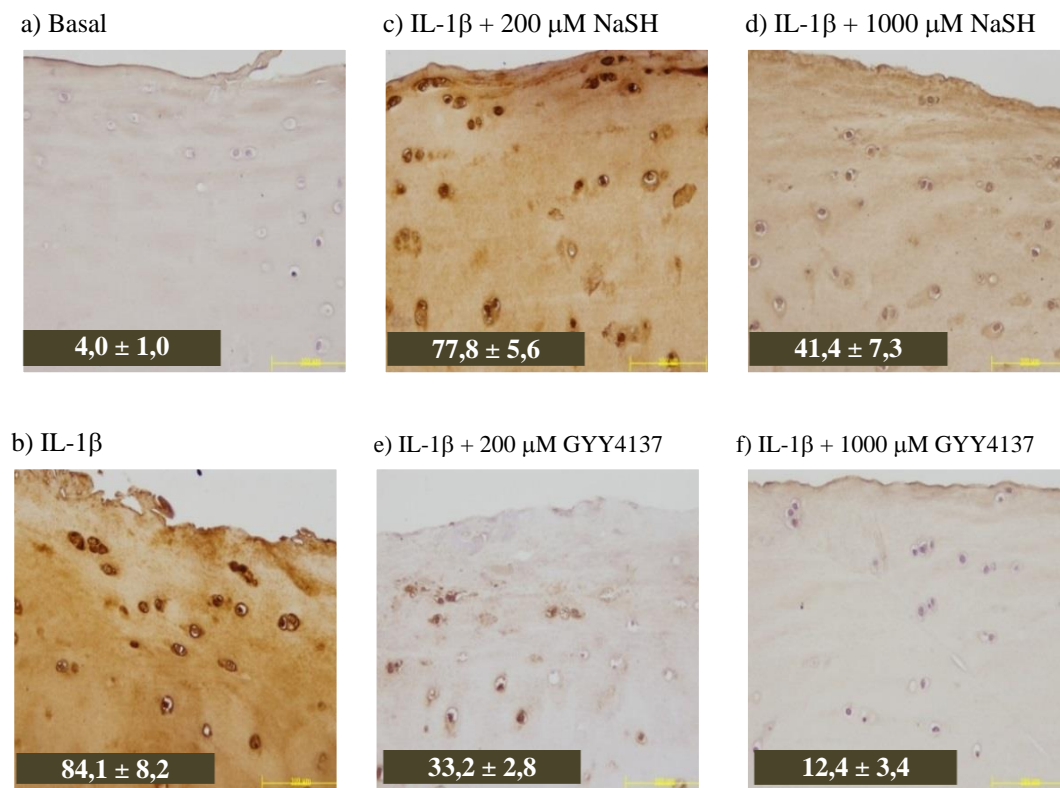
**Fig. 39: Niveles de *MMP13* en condrocitos OA co-estimulados con IL-1 $\beta$  y NaSH o GYY4137.**

Se puede observar como la co-estimulación de NaSH y GYY4137 con la IL-1 $\beta$  reduce la producción de *MMP13*. \* $p < 0,05$  respecto a la condición estimulada únicamente con IL-1 $\beta$ .

Además, también se analizaron ambas *MMPs* en los discos de cartílago que estuvieron 21 días en cultivo (Tabla 2, cuantificación de GAGs en tejido). En el caso de la *MMP3* se puede observar en la Fig. 40 que la condición basal presenta una positividad muy baja y la IL-1 $\beta$  indujo la síntesis de esta *MMP* por parte de los condrocitos, ya que aparece una fuerte positividad en el interior de los mismos. La adición de NaSH (Fig. 40 b y c) y GYY4137 (Fig. 40 d y e) produce una reducción de esta positividad, aunque GYY4137 parece ser más efectivo. En cuanto a *MMP13*, la positividad fue mucho más intensa tras 21 días en cultivo con IL-1 $\beta$  (Fig. 41b). La estimulación con los compuestos de sulfuro disminuyó la síntesis de esta *MMP*, sin embargo, sólo en 1000  $\mu$ M de ambos compuestos vemos que desaparece la positividad del tejido en el interior de los condrocitos (Fig. 41).



**Fig. 40: IHQ de *MMP3* en la capa superficial de discos de cartílago co-estimulados con IL-1 $\beta$  y diferentes concentraciones de NaSH y GYY4137 tras 21 días en cultivo. Los porcentajes están calculados con n=3 imágenes. La escala de la imagen a representa 100  $\mu$ m.**

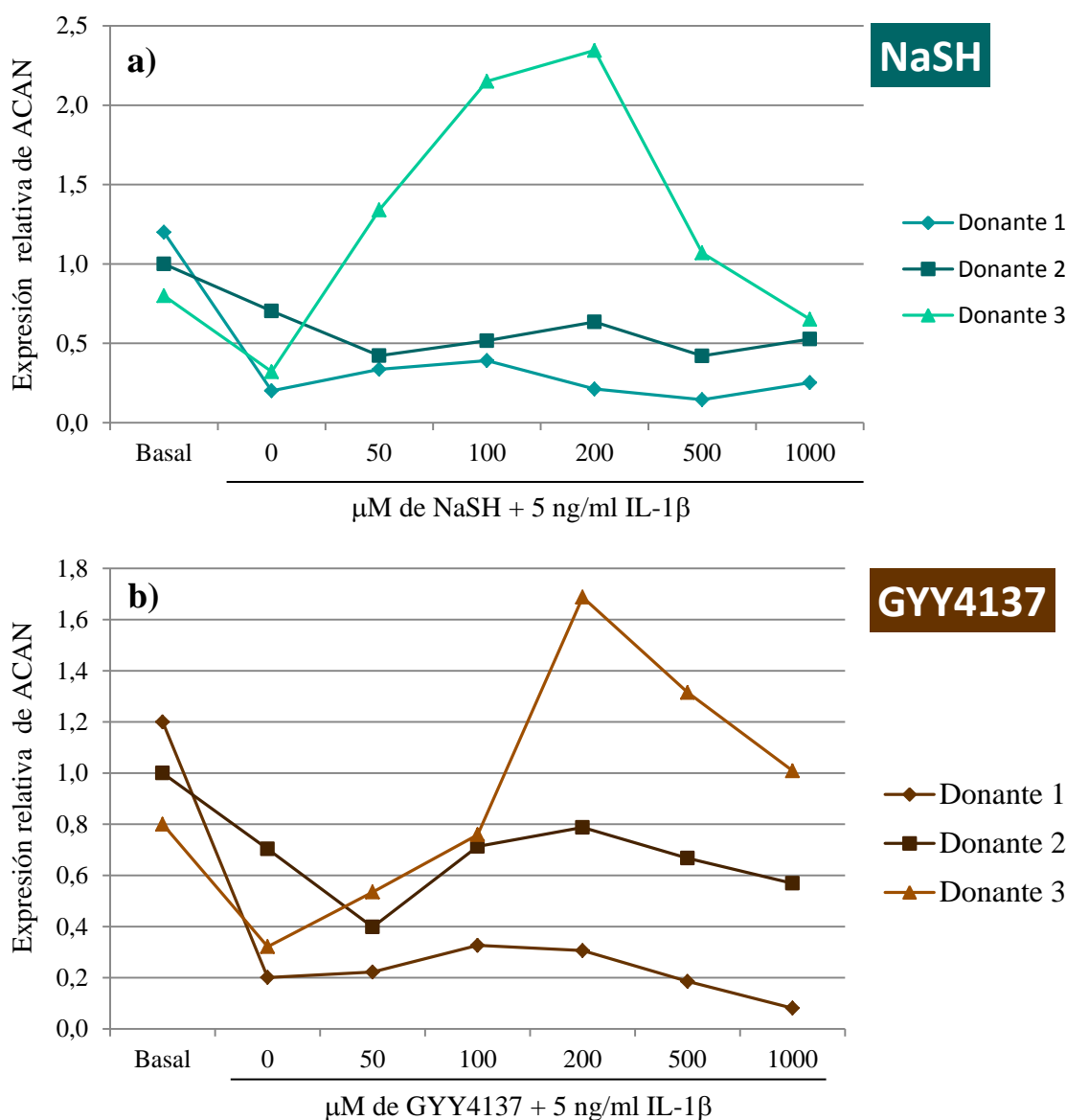


**Fig. 41: IHQ de *MMP13* en la capa superficial de discos de cartílago co-estimulados con IL-1 $\beta$  y diferentes concentraciones de NaSH y GYY4137 tras 21 días en cultivo. Los porcentajes están calculados con n=3 imágenes. La escala de la imagen a representa 100  $\mu$ m.**

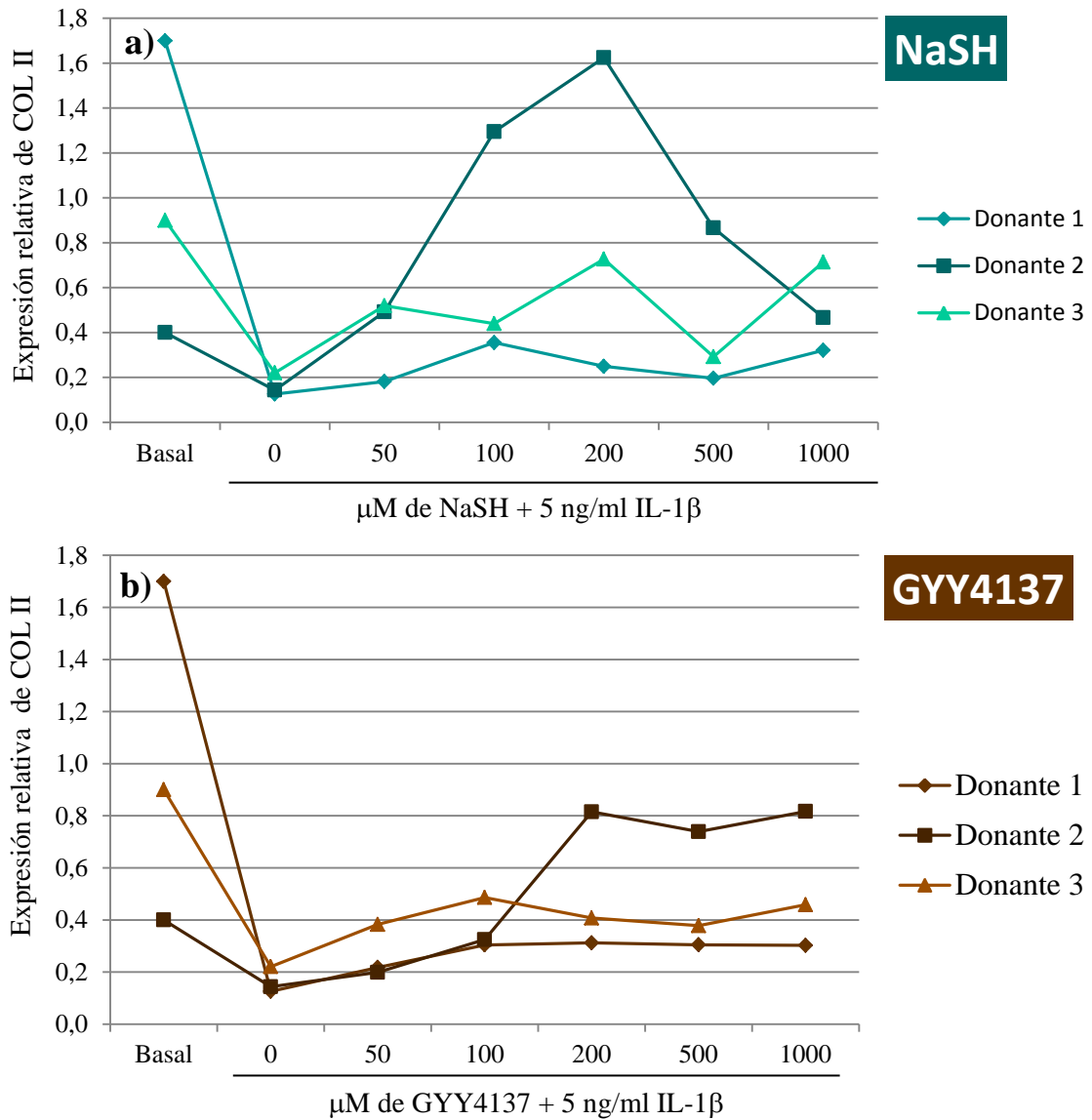


## 2.6.2 Efectos sobre la síntesis de agrecano y colágeno II

Como marcadores de producción de matriz en los condrocitos se seleccionaron el agrecano y el colágeno tipo II. Se estudió su expresión génica en células OA estimuladas con IL-1 $\beta$  y los compuestos de sulfuro, tal como se definió en la Tabla 2. En el caso del agrecano (ACAN), se puede observar en la Fig. 42 que la IL-1 $\beta$  indujo una reducción de su expresión y que algunas concentraciones de NaSH (Fig. 42a) y GYY4137 (Fig. 42b) contrarrestaron parcialmente este descenso. En el caso del COLII (Fig. 43), el efecto de la IL-1 $\beta$  fue similar y únicamente las concentraciones intermedias, sobre todo de NaSH, resultaron en una recuperación de su expresión.



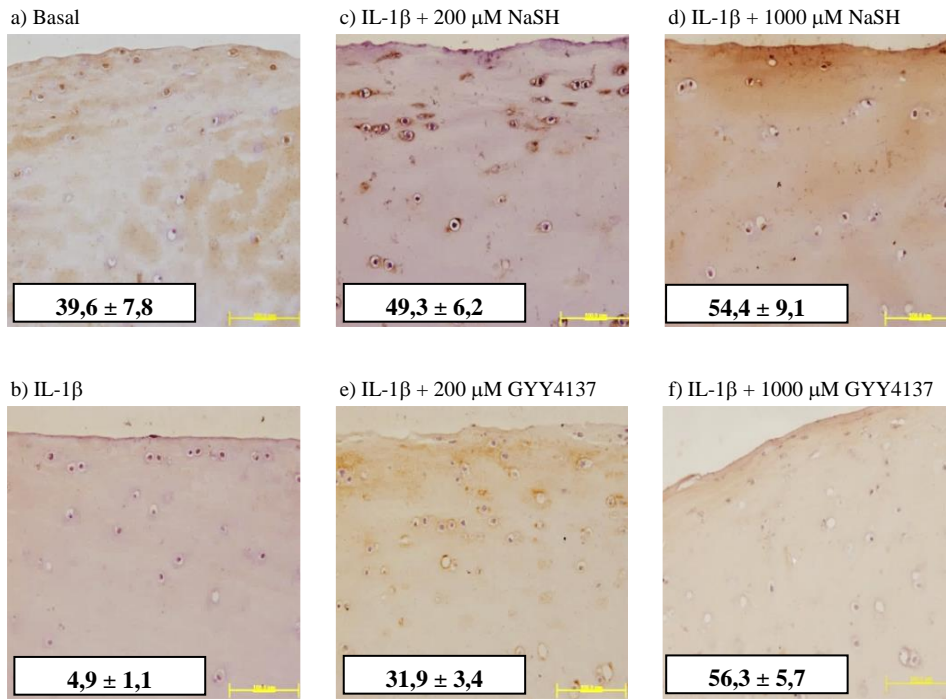
**Fig. 42:** Expresión génica de ACAN en los donantes individuales de condrocitos OA co-estimulados con IL-1 $\beta$  y NaSH (a) o GYY4137 (b). Todas las condiciones están normalizadas al basal al que se le ha adjudicado un valor de 1.



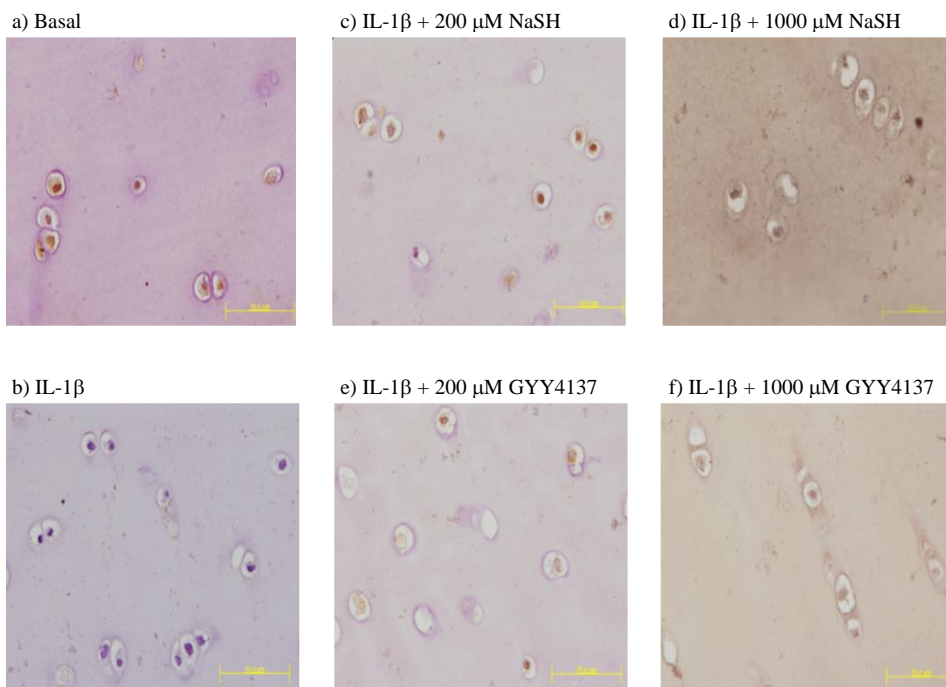
**Fig. 43: Expresión génica de COLII en los donantes individuales de condrocitos OA co-estimulados con IL-1β y NaSH (a) o GYY4137 (b).**

Todas las condiciones están normalizadas al basal al que se le ha adjudicado un valor de 1

También se analizó la presencia de las proteínas agregano y colágeno II en los discos de cartílago que estuvieron 21 días en cultivo (Tabla 2). Tanto en el caso del col II (Fig. 44 y Fig. 45), como del agg (Fig. 46 y Fig. 47) se observó que la IL-1β indujo una reducción en la matriz del cartílago, sin embargo esta reducción no se produce, e inclusive los condrocitos sintetizan mayores cantidades en presencia de ambos compuestos de sulfuro. También es destacable que la administración de la IL-1β parece no sólo degradar el col II y el agg en la matriz, si no también inhibir su producción en las células, como se deduce de la falta de coloración intracelular. La administración conjunta de NaSH o GYY4137 con IL-1β también mejora este aspecto, puesto que las imágenes de estas condiciones revelan tinción intracelular.

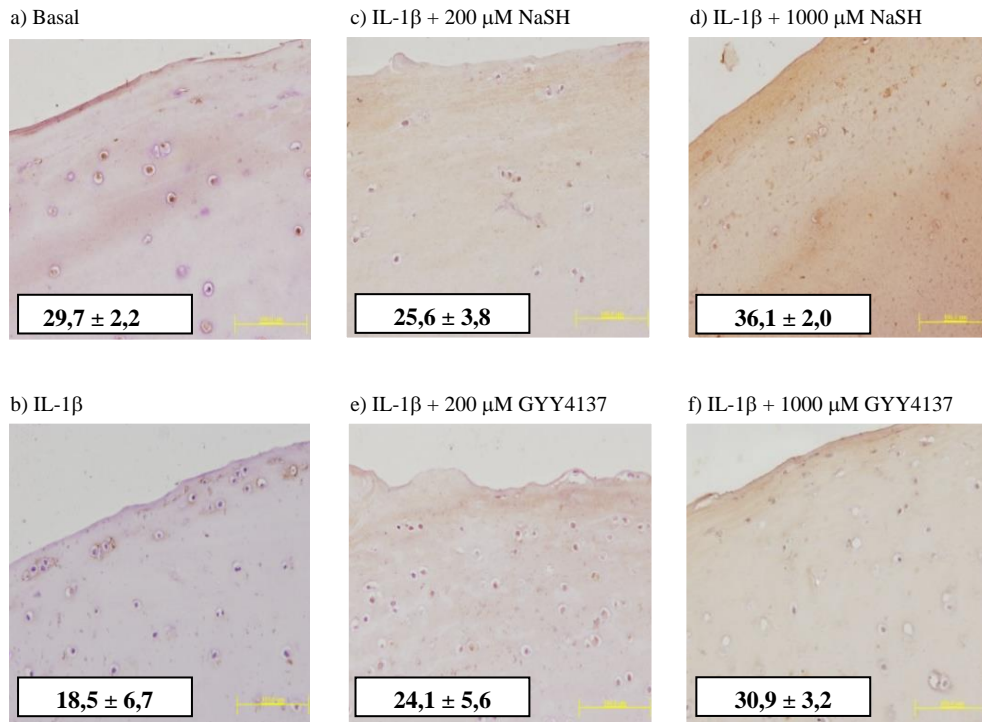


**Fig. 44: IHQ de col II en la capa superficial de discos de cartílago OA co-estimulados con IL-1 $\beta$  y diferentes concentraciones de NaSH o GYY4137 tras 21 días en cultivo. Los porcentajes están calculados con n=3 imágenes. La escala de la imagen a representa 100  $\mu$ m. Podemos observar como los compuestos de sulfuro protegen frente a la pérdida de col II inducida por la IL-1 $\beta$ , alcanzando su mayor efectividad a 1000  $\mu$ M NaSH (d) y GYY4137 (f).**

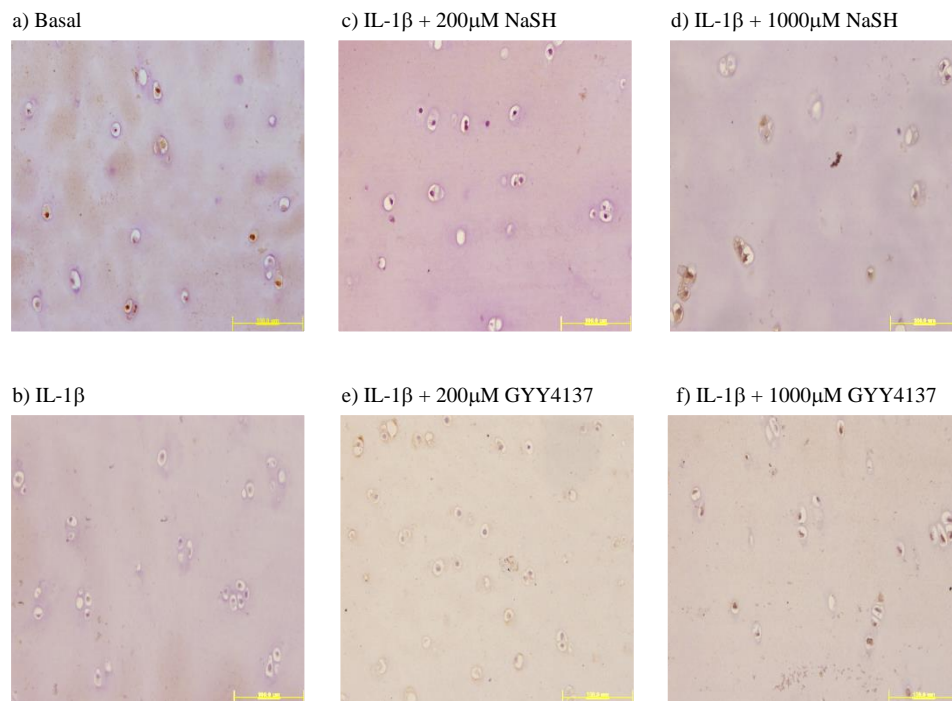


**Fig. 45: IHQ de col II en la capa profunda de discos de cartílago co-estimulados con IL-1 $\beta$  y diferentes concentraciones de NaSH o GYY4137 tras 21 días en cultivo.**

Las imágenes están tomadas en zonas representativas del tejido a 40x. Podemos observar como la IL-1 $\beta$  inhibe la síntesis de la proteína por parte de los condrocitos (b). Los compuestos de sulfuro protegen frente a esta inhibición, ya que en el resto de condiciones (c-f) se puede observar que la presencia intracelular de col II se mantiene.



**Fig. 46: IHQ de agg en la capa superficial de discos de cartílago co-estimulados con IL-1 $\beta$  y diferentes concentraciones de NaSH y GYY4137 tras 21 días en cultivo.** Los porcentajes están calculados con n=3 imágenes. La escala de la imagen a representa 100  $\mu$ m. Podemos observar como los compuestos de sulfuro protegen frente a la pérdida de agg inducida por la IL-1 $\beta$  (b), alcanzando su mayor efectividad a 1000  $\mu$ M NaSH (d) y GYY4137 (f).



**Fig. 47: IHQ de agg en la capa profunda de discos de cartílago co-estimulados con IL-1 $\beta$  y diferentes concentraciones de NaSH o GYY4137 tras 21 días en cultivo.**

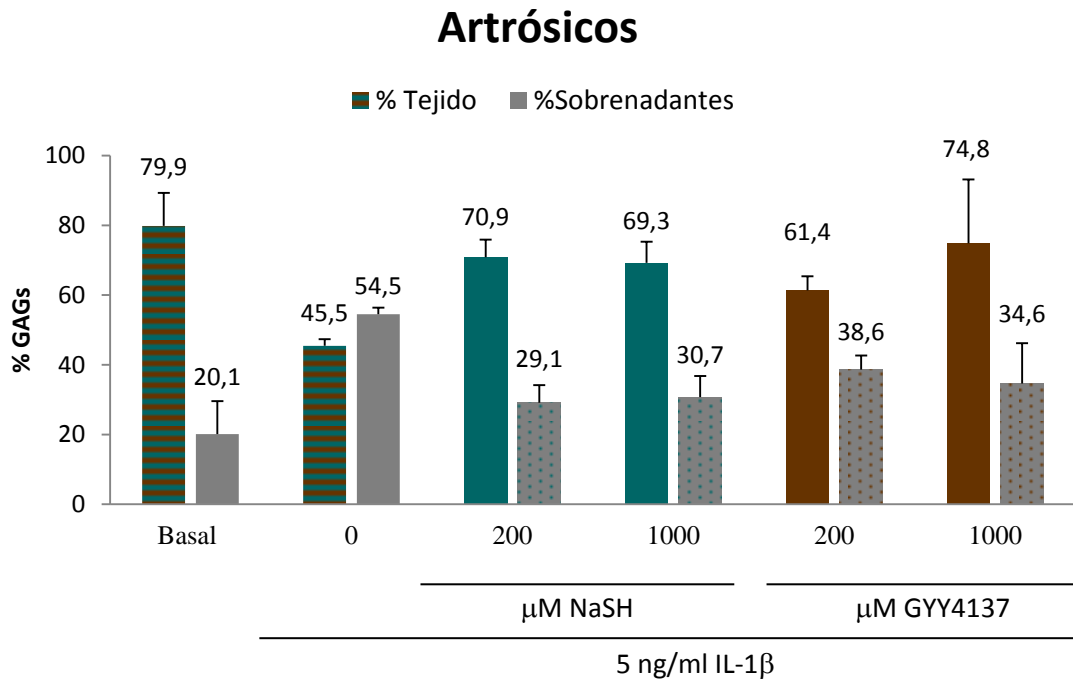
Las imágenes están tomadas en zonas representativas del tejido a 40x. Podemos observar como la IL-1 $\beta$  inhibe la síntesis de la proteína por parte de los condrocitos (b). Los compuestos de sulfuro protegen frente a esta inhibición, ya que en el resto de condiciones (c-f) se puede observar que la presencia intracelular de agg se mantiene.

### 2.6.3 Efectos sobre la pérdida de GAGs en cartílago estimulado con IL-1 $\beta$

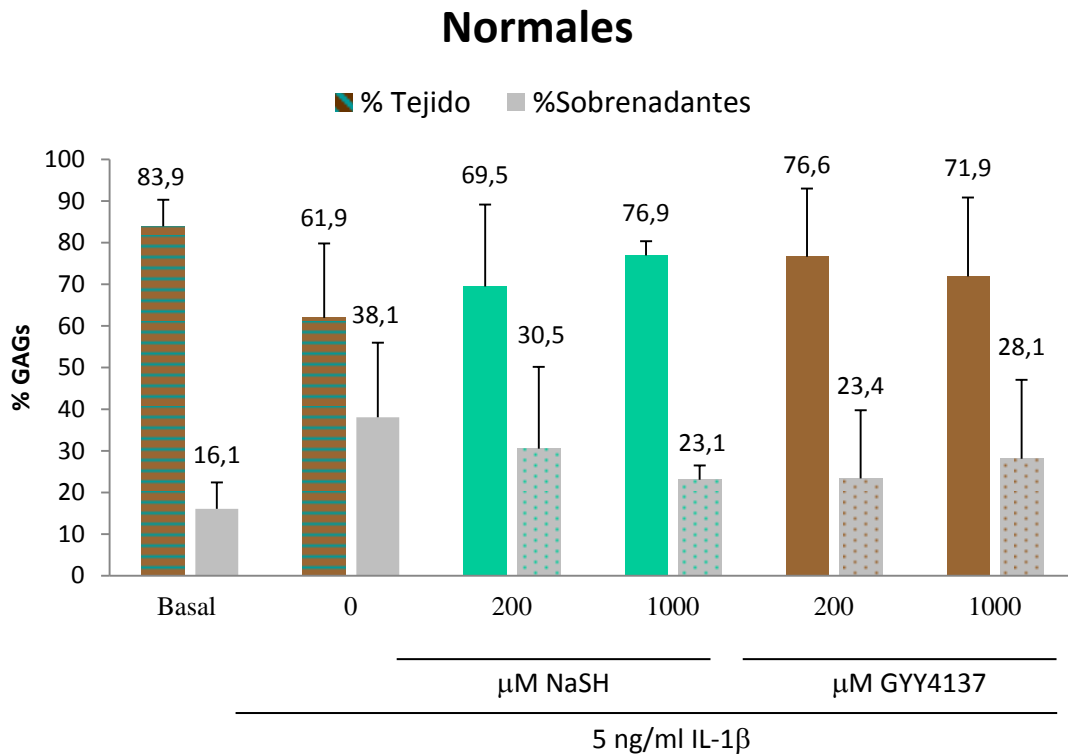
En estos experimentos se cultivaron discos de cartílago *OA* o normal *in vitro* y se estimularon con IL-1 $\beta$  y NaSH o GYY4137 (200 y 1000  $\mu$ M). Los explantes se mantuvieron hasta 21 días en cultivo y los sobrenadantes se recogieron a los 3, 7, 10, 14 y 21 días para cuantificar la liberación de GAGs. También se cuantificaron los GAGs retenidos en el tejido al finalizar el experimento. Para la cuantificación se utilizó un kit comercial cuyo protocolo se describió en Material y Métodos. El objetivo era comprobar si la co-estimulación con los compuestos de sulfuro podría proteger al cartílago de la pérdida de GAGs inducida por la citoquina.

Al analizar los resultados obtenidos ([Fig. 48](#) y [Fig. 49](#)) pudimos ver que:

- En condiciones basales, las cantidades de GAGs que permanecen en el tejido normal ([Fig. 49 basal](#)) y en el tejido *OA* ([Fig. 48 basal](#)) tras 21 días son muy similares con aproximadamente, 80% - 85% de GAGs remanentes en el tejido y un 15% - 20% que se pierden al sobrenadante, aunque la retención en cartílago *N* es un poco mejor.
- La exposición durante 21 días a la IL-1 $\beta$  supone, para el tejido *OA* un relevante descenso de la cantidad de GAGs en el cartílago y un aumento de la pérdida hacia el sobrenadante. De hecho la cantidad de GAGs perdida al sobrenadante es, en porcentaje, superior a la que permanece en el tejido. Además el efecto es mucho más pronunciado en el tejido *OA* que en el normal.
- La co-estimulación con los compuestos liberadores de sulfuro, supone una mejoría en todos los casos, aumentando la cantidad de GAGs retenida en el tejido y protegiendo o inhibiendo su pérdida hacía el sobrenadante.
- Para el tejido normal ([Fig. 49](#)), parece que las dosis más efectivas son 1000  $\mu$ M de NaSH y 200  $\mu$ M de GYY4137, mientras que en cartílago *OA* la dosis más efectiva de NaSH es 200  $\mu$ M y la de GYY4137 1000  $\mu$ M.



**Fig. 48: Porcentaje de GAGs retenidos en el cartílago OA y liberados al sobrenadante tras 21 días de co-estimulación con IL-1 $\beta$  y NaSH o GYY4137 *in vitro*.**  
 En marrón y azul se representa el porcentaje en tejido y en gris el sobrenadante.



**Fig. 49: Porcentaje de GAGs retenidos en el cartílago sano y liberados al sobrenadante tras 21 días de co-estimulación con IL-1 $\beta$  y NaSH o GYY4137 *in vitro*.**  
 En marrón y azul se representa el porcentaje en tejido y en gris el sobrenadante.

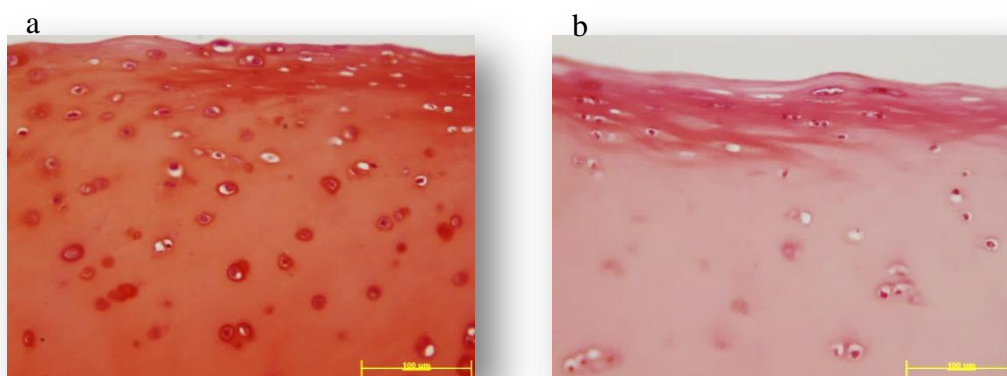


2.6.4 *Efectos sobre el estado de la matriz extracelular del cartílago estimulado IL-1 $\beta$*   
*Análisis histoquímico e inmunohistoquímico*

Al finalizar los experimentos de liberación de GAGs, una mitad de un explante de cada condición se incluyó en parafina. Estos bloques se utilizaron para estudiar diversos componentes de la MEC usando tinciones histoquímicas e inmunohistoquímicas. Los resultados se describen a continuación. En las figuras se presentan imágenes representativas de los discos de cartílago estimulados con IL-1 $\beta$  y las distintas concentraciones de los compuestos de sulfuro, así como los porcentajes de positividad (media  $\pm$  desviación estándar) obtenidos al cuantificar las tinciones (dos imágenes de cada donante n=2, es decir, cuatro imágenes en total). Todas las cuantificaciones obtenidas en este apartado, además de las de los GAGs en el apartado anterior se encuentran resumidas en la [Tabla 14](#) para el tejido OA y en la [Tabla 15](#) para el tejido normal.

*Safranina O*

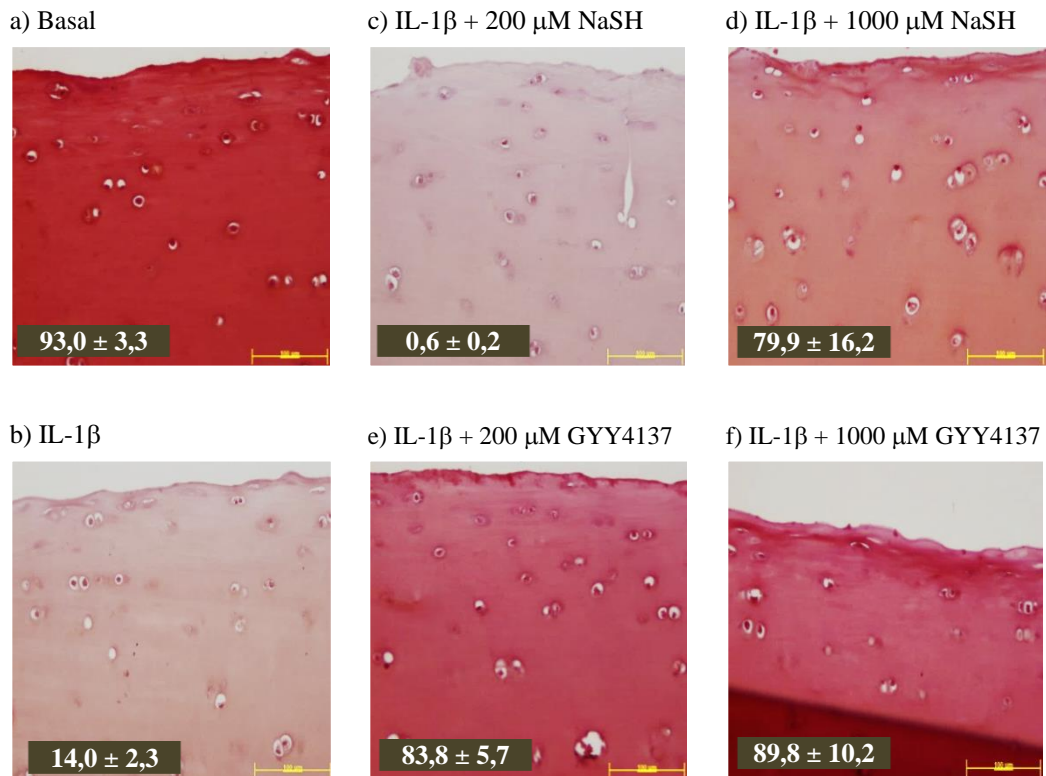
En la tinción para GAGs en tejido OA observamos que los discos estimulados con IL-1 $\beta$  sufrieron una pérdida de GAGs pronunciada, aunque con diferencias entre los diferentes donantes (n=2). También es llamativo que en la condición basal se observó que la región interterritorial, que rodea a los condrocitos, es más positiva que el resto de la matriz ([Fig. 50a](#)), mientras que en los discos estimulados con IL-1 $\beta$  esta positividad se perdió ([Fig. 50b](#)).



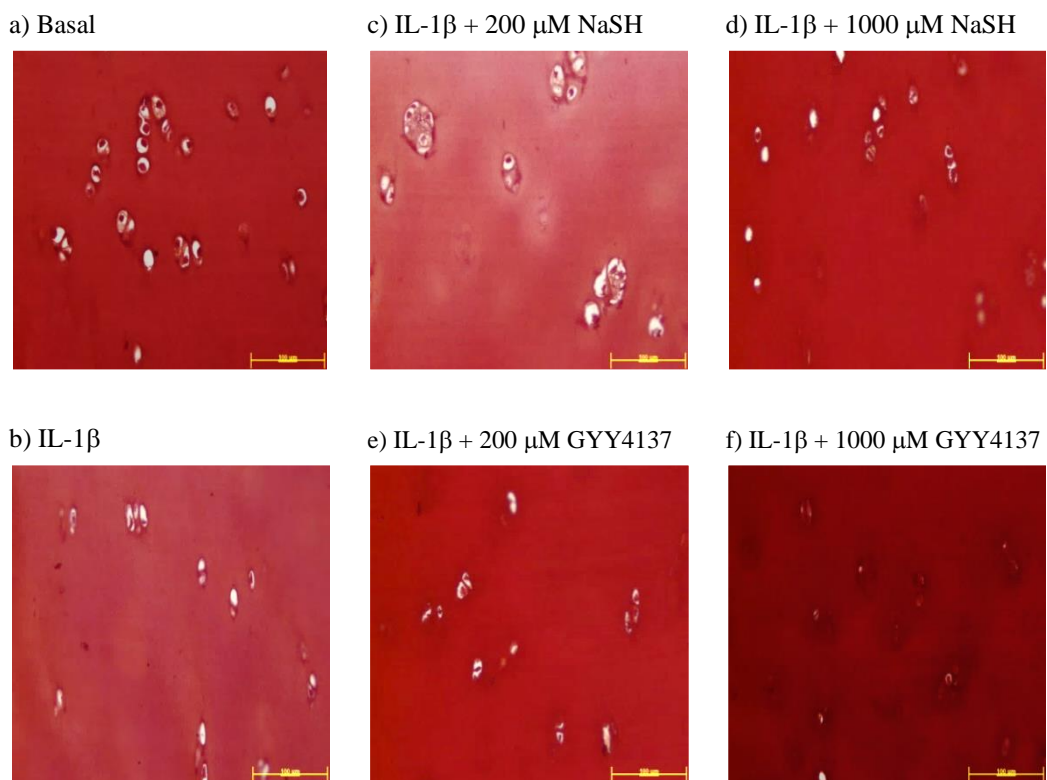
**Fig. 50: Tinción de S-O en cartílago OA tras 21 días en cultivo en DMEM 10%.**  
a) Basal, b) estimulado con 5 ng/ml de IL-1 $\beta$ .

En las [Fig. 51](#) y [Fig. 52](#) se incluyen imágenes representativas de la tinción de S-O de los discos de cartílago OA estimulados con IL-1 $\beta$  y las distintas concentraciones de los compuestos de sulfuro. Se observó que las dosis de GYY4137 utilizadas protegieron al

tejido de la pérdida de GAGs ocasionada por la estimulación con IL-1 $\beta$ , mientras que en el caso de NaSH solamente la concentración más elevada ejerció este efecto.



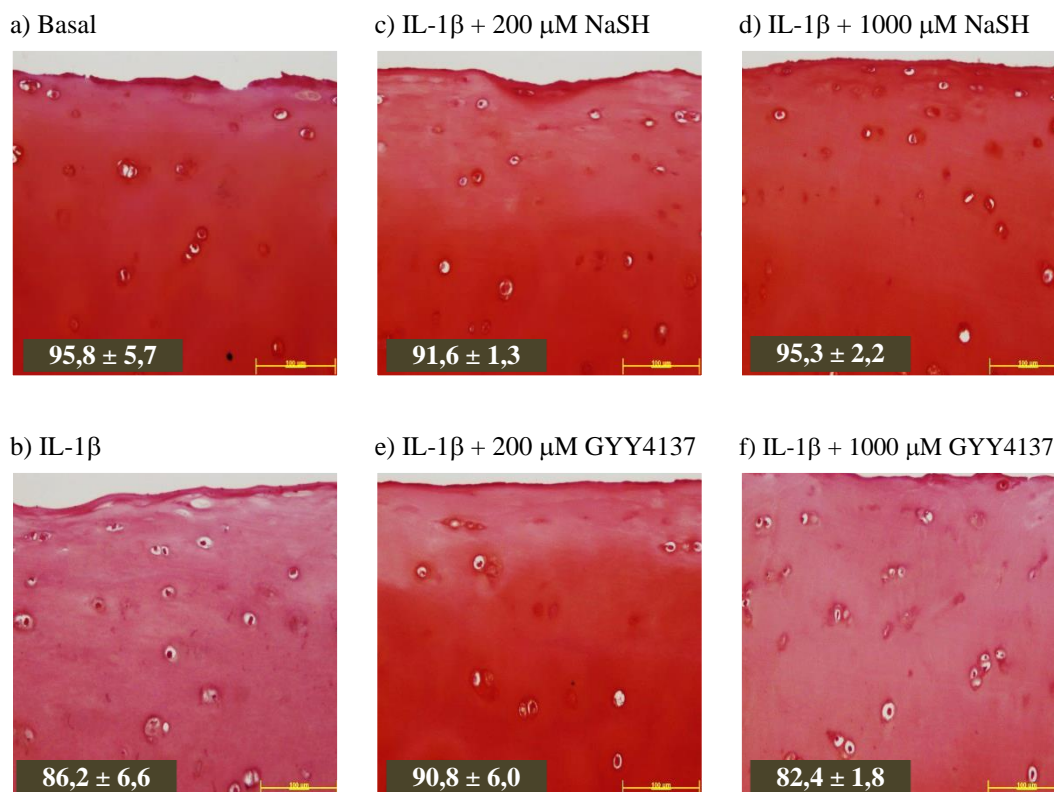
**Fig. 51: Tinción de S-O de cartílago OA tras 21 días en las diferentes condiciones experimentales. La escala representada es de 100  $\mu$ m.**



**Fig. 52: Tinción de S-O centrada en las células del cartílago OA tras 21 días en las diferentes condiciones experimentales. La escala representada es de 100  $\mu$ m.**



En el caso del tejido sano ([Fig. 53](#)), también observamos una pérdida de GAGs en la condición con IL-1 $\beta$  ([Fig. 53b](#)) aunque mucho menos pronunciada, y todas las dosis de los compuestos de sulfuro excepto 1000  $\mu$ M de GYY4137 ([Fig. 53f](#)) parecen evitar esta pérdida aunque la diferencia es pequeña.



**Fig. 53: Tinción de S-O en cartílago N tras 21 días en las diferentes condiciones experimentales.** La escala representada es de 100  $\mu$ m.

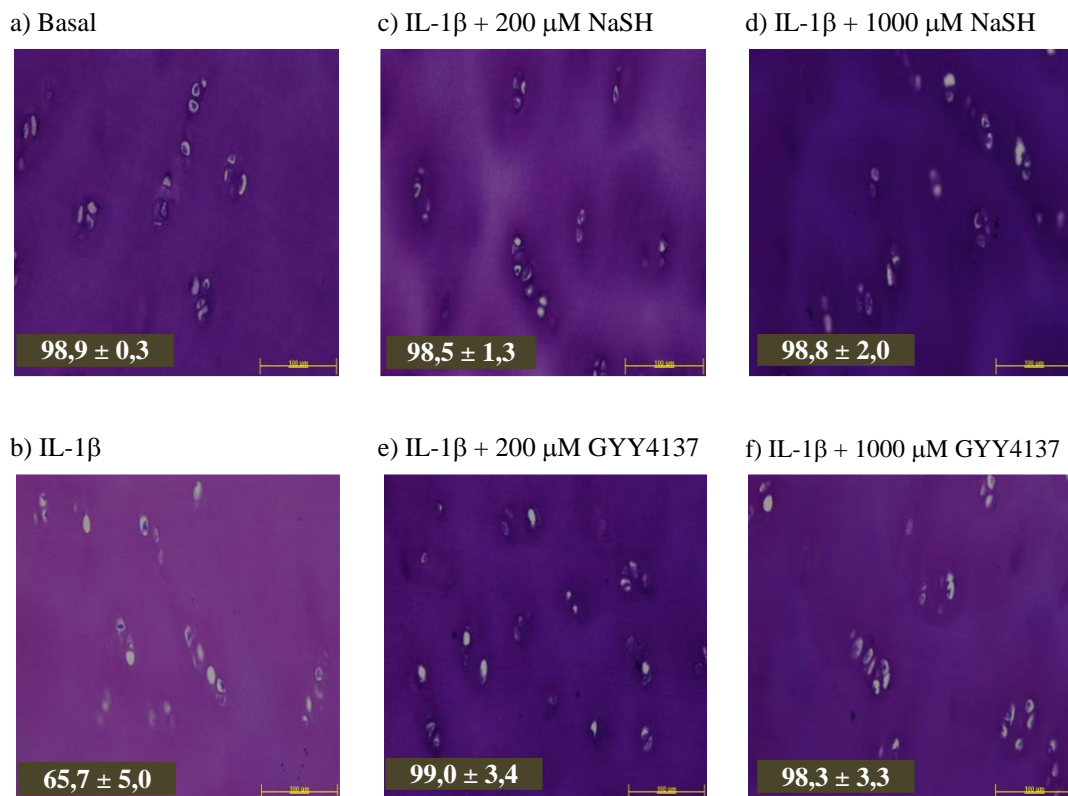
#### Azul de toluidina

En la tinción para componentes metacromáticos, entre los que se encuentra principalmente el ácido hialurónico, no se observaron grandes diferencias a nivel de la capa superficial y, tanto el efecto de la IL-1 $\beta$  como el de los compuestos de sulfuro eran más evidentes a nivel de la capa profunda del cartílago. En el tejido OA ([Fig. 54](#)) la condición con IL-1 $\beta$  ([Fig. 54b](#)) presenta una pérdida de tinción bastante pronunciada, que es similar en las muestras de los diferentes donantes (n=2). Este proceso mejora con ambos compuestos de H<sub>2</sub>S (NaSH [Fig. 54 c y d](#) y GYY4137 [Fig. 54 e y f](#)) aunque parece que la concentración de 200  $\mu$ M ya es totalmente efectiva para ambos. En esta tinción, la región interterritorial prácticamente pierde su positividad en la condición con

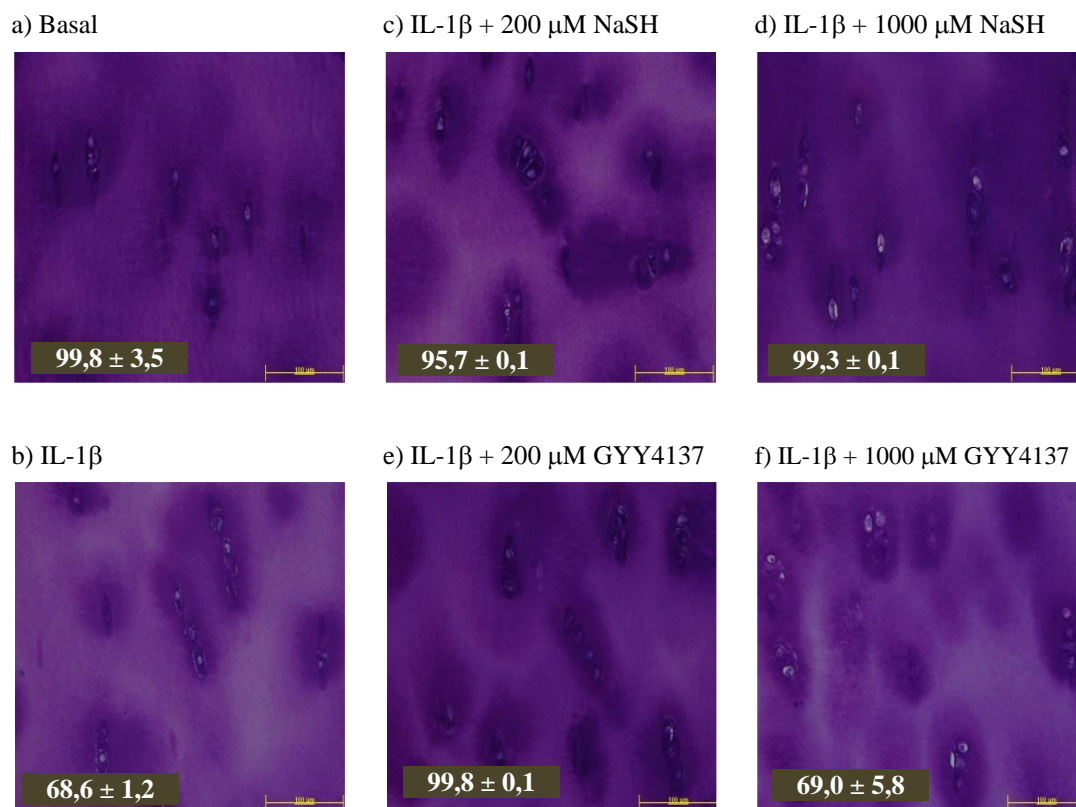
## Resultados

IL-1 $\beta$  y vemos como además los condrocitos dejan de ser positivos, mientras que con NaSH y GYY4137, y ya a 200  $\mu$ M estas dos regiones son muy positivas.

En el caso del tejido sano, observamos que entre la condición basal (Fig. 55a) y la de IL-1 $\beta$  (Fig. 55b) la pérdida es muy similar al tejido OA y de la misma manera la recuperación que producen los compuestos de H<sub>2</sub>S ya es efectiva a 200  $\mu$ M (Fig. 55 c y e), siendo la concentración de GYY4137 1000  $\mu$ M (Fig. 55 f) no es efectiva en estas muestras.



**Fig. 54:** Tinción de azul de toluidina en cartílago OA tras 21 días en las diferentes condiciones experimentales. La escala representada es de 100  $\mu$ m.



**Fig. 55:** Tinción de azul de toluidina en cartílago N tras 21 días en las diferentes condiciones experimentales. La escala representada es de 100 µm.

#### Azul alcian-PAS

La tinción de azul alcian-PAS, es, quizá, uno de los resultados más curiosos que encontramos entre las diferentes tinciones, y es que, en todas las muestras de cartílago OA (Fig. 56) observamos un aumento muy llamativo de la tinción de PAS en la condición con sólo IL-1β (Fig. 56 b), concretamente en la zona profunda del cartílago y con la región interterritorial muy marcada para esta tinción. Esto nos hace suponer que existe un aumento en la producción de hidratos de carbono, algo que no observamos en las muestras de tejido sano, que después comentaremos. Las cuantificaciones de estas imágenes están en la Tabla 12. Por otro lado, observamos una ligera pérdida de la tinción de azul alcian en esta misma condición, aunque posiblemente además quede camuflada por la saturación del PAS.

En las condiciones co-estimuladas con IL-1β y NaSH (Fig. 56 c y d) o GYY4137 (Fig. 56 e y f) observamos que la expresión de carbohidratos con la tinción de PAS vuelve prácticamente al estado basal, perdiéndose el marcaje en la región interterritorial que se observó en la condición estimulada solo con IL-1β. En este caso, no vemos una

diferencia clara entre las diferentes dosis o entre NaSH y GYY4137. En cuanto a la tinción de azul alcian, no parece recuperarse la situación basal con ninguna de las condiciones ensayadas.

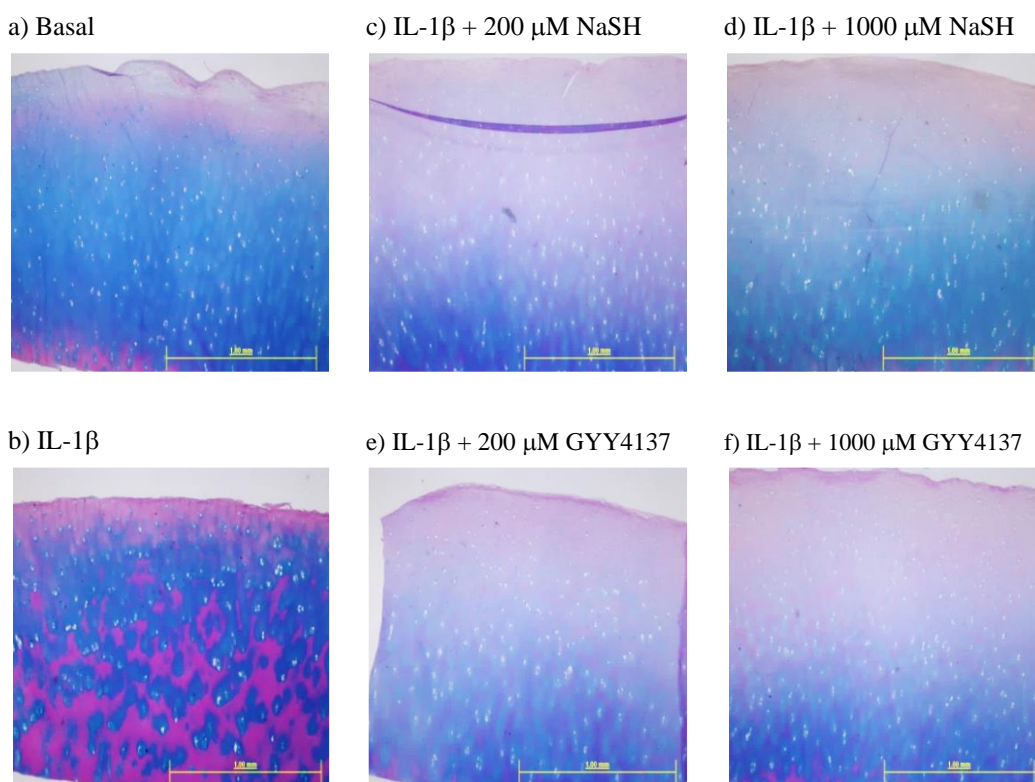


Fig. 56: Tinción de azul alcian - PAS en cartílago OA tras 21 días en las diferentes condiciones experimentales. La escala representada es de 200  $\mu$ m.

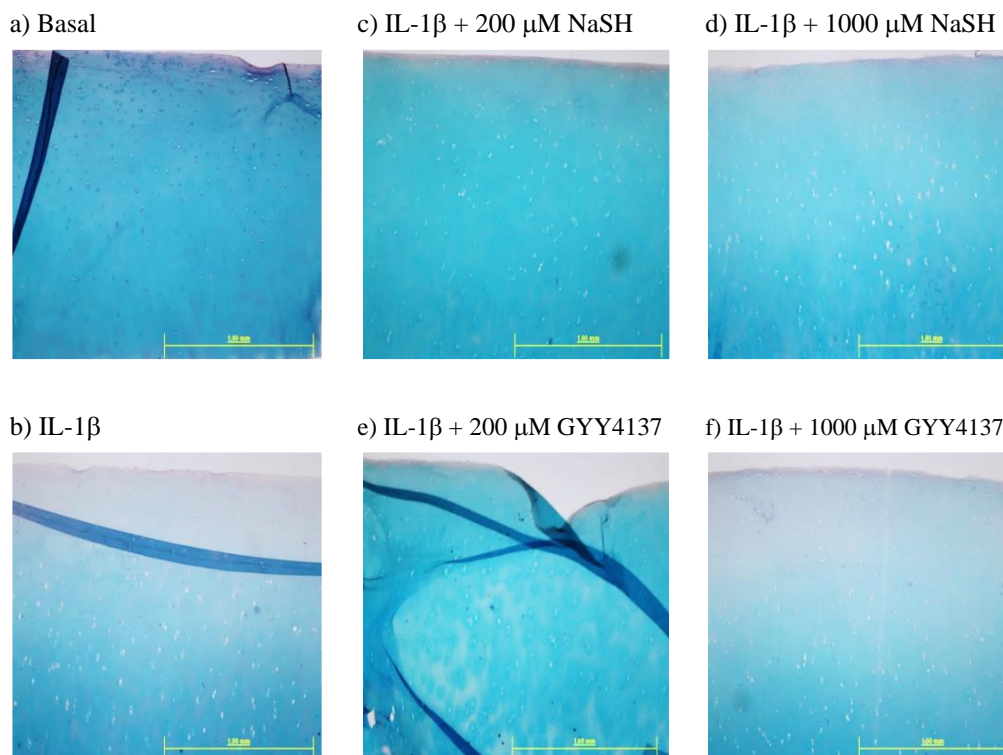
Tabla 12: Porcentajes de positividad de las tinciones AA y PAS de tejido OA tras 21 días de estimulación (Tabla 2). Los valores están expresados como la media  $\pm$  EE

		AA	PAS
Basal		80,1 $\pm$ 13,2	7,8 $\pm$ 4,2
IL-1 $\beta$	0	55,6 $\pm$ 18,5	38,0 $\pm$ 8,7
	NaSH 200 $\mu$ M	54,6 $\pm$ 8,0	7,4 $\pm$ 8,8
	NaSH 1000 $\mu$ M	70,6 $\pm$ 11,8	10,8 $\pm$ 4,1
	GYY4137 200 $\mu$ M	67,4 $\pm$ 18,3	7,9 $\pm$ 2,0
	GYY4137 1000 $\mu$ M	66,7 $\pm$ 10,1	8,7 $\pm$ 2,9

Cuando analizamos el cartílago sano (Fig. 57 y Tabla 13), sin embargo, es cuando comparativamente encontramos el dato más interesante, y es que para estas muestras estimuladas con IL-1 $\beta$  la tinción con PAS no indica un aumento de la presencia de

carbohidratos (Fig. 57b), si no que produce de forma similar una pérdida tanto de mucopolisacáridos ácidos como neutros.

Con los tratamientos con NaSH (Fig. 57 c y d) y GYY4137 (Fig. 57 e y f) se observa una recuperación con ambas tinciones, aunque la de azul alcían es mucho más llamativa que la de PAS. Además, de nuevo, la concentración de 1000  $\mu\text{M}$  de GYY4137 parece ser significativamente menos efectiva que los demás tratamientos.



**Fig. 57:** Tinción de azul alcían-PAS en cartílago N tras 21 días en las diferentes condiciones experimentales. La escala representada es de 200  $\mu\text{m}$ .

**Tabla 13:** Porcentajes de positividad de las tinciones AA y PAS en tejido N tras 21 días de estimulación (Tabla 2). Los valores están expresados como la media  $\pm$  EE.

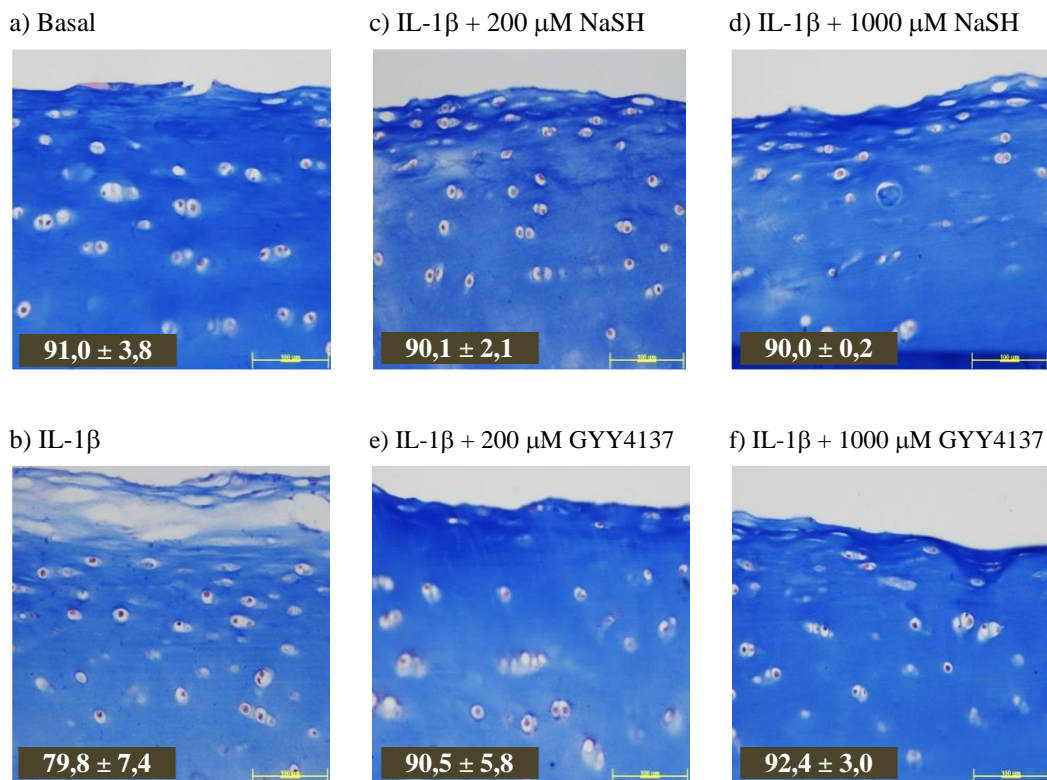
		AA	PAS
Basal		95,9 $\pm$ 4,7	1,2 $\pm$ 0,2
IL-1 $\beta$	0	68,2 $\pm$ 8,6	1,8 $\pm$ 0,1
	NaSH 200 $\mu\text{M}$	94,6 $\pm$ 2,2	1,3 $\pm$ 0,1
	NaSH 1000 $\mu\text{M}$	93,0 $\pm$ 6,0	1,0 $\pm$ 0,6
	GYY4137 200 $\mu\text{M}$	94,2 $\pm$ 4,7	1,6 $\pm$ 0,4
	GYY4137 1000 $\mu\text{M}$	70,5 $\pm$ 11,1	1,0 $\pm$ 0,1



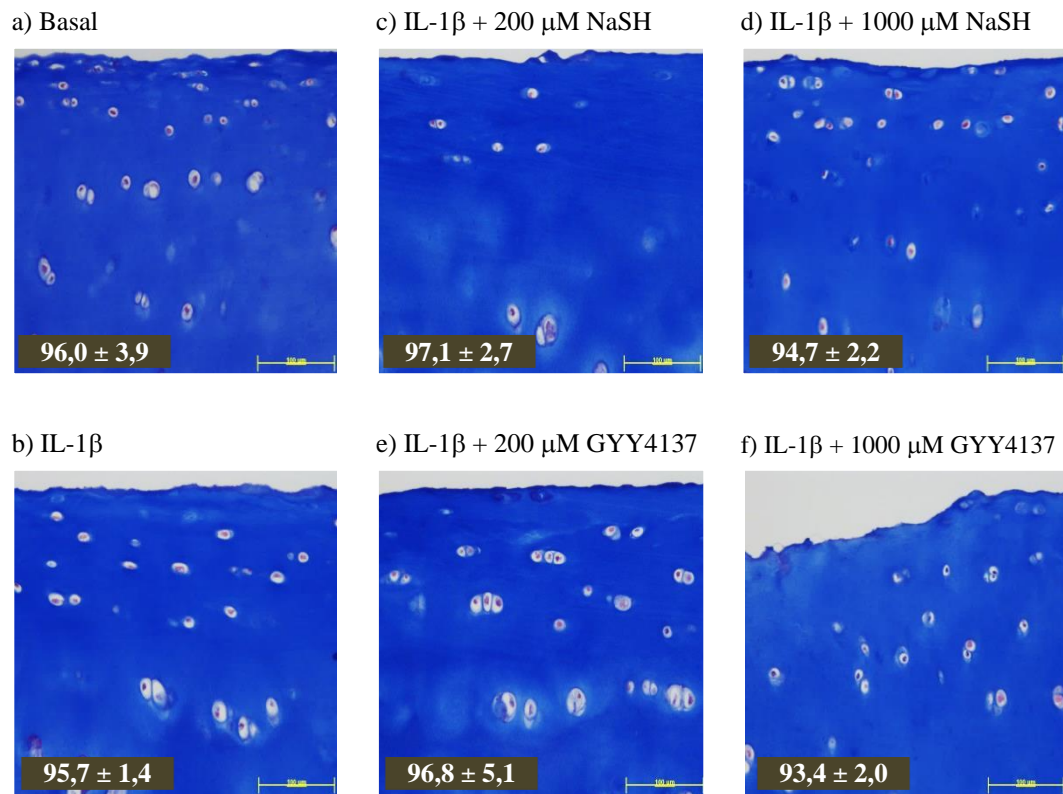
*Tricrómico de Masson*

Con la tinción tricrómico de Masson se observaron muy pocas diferencias entre las distintas condiciones ensayadas (Fig. 58 y Fig. 59). Esta tinción refleja el contenido de colágenos en las muestras. En general, el cartílago OA tras 21 días de estimulación con IL-1 $\beta$  (Fig. 58 b) es sólo ligeramente menos positivo que la condición sin estimular, y la adición de las diferentes concentraciones de NaSH (Fig. 58 c y d) y GYY4137 (Fig. 58 e y f) parece evitar esa ligera pérdida.

En cuanto a las muestras de cartílago sano (Fig. 59), los resultados fueron muy similares a los del tejido OA. Ninguna de las muestras analizadas mostró diferencias claras entre las diferentes condiciones. Lo único reseñable fue que una de las muestras de cartílago sano presentaba una región interterritorial positiva en su condición basal, positividad que se perdía en el resto de condiciones.



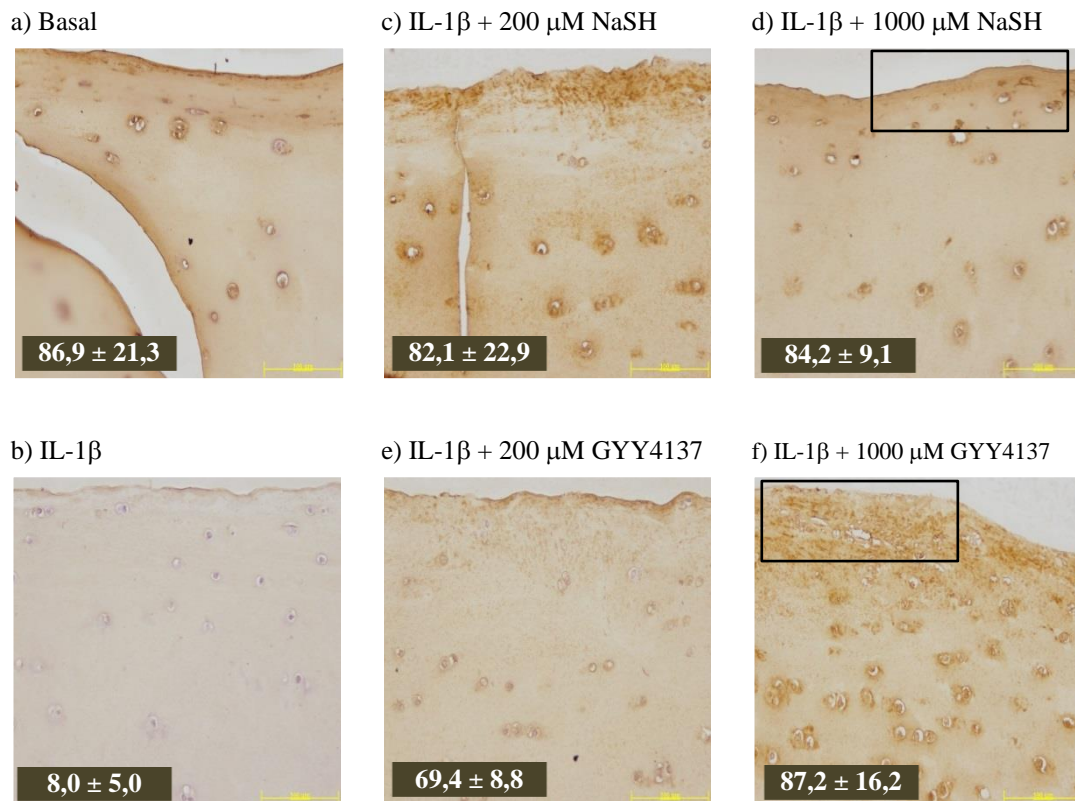
**Fig. 58:** Tinción de tricrómico de Masson en cartílago OA tras 21 días en las diferentes condiciones experimentales. La escala representada es de 100  $\mu$ m.



**Fig. 59: Tinción de tricrómico de Masson en una muestra de cartílago N tras 21 días en las diferentes condiciones experimentales. La escala representada es de 100  $\mu$ m.**

***Queratán – sulfato***

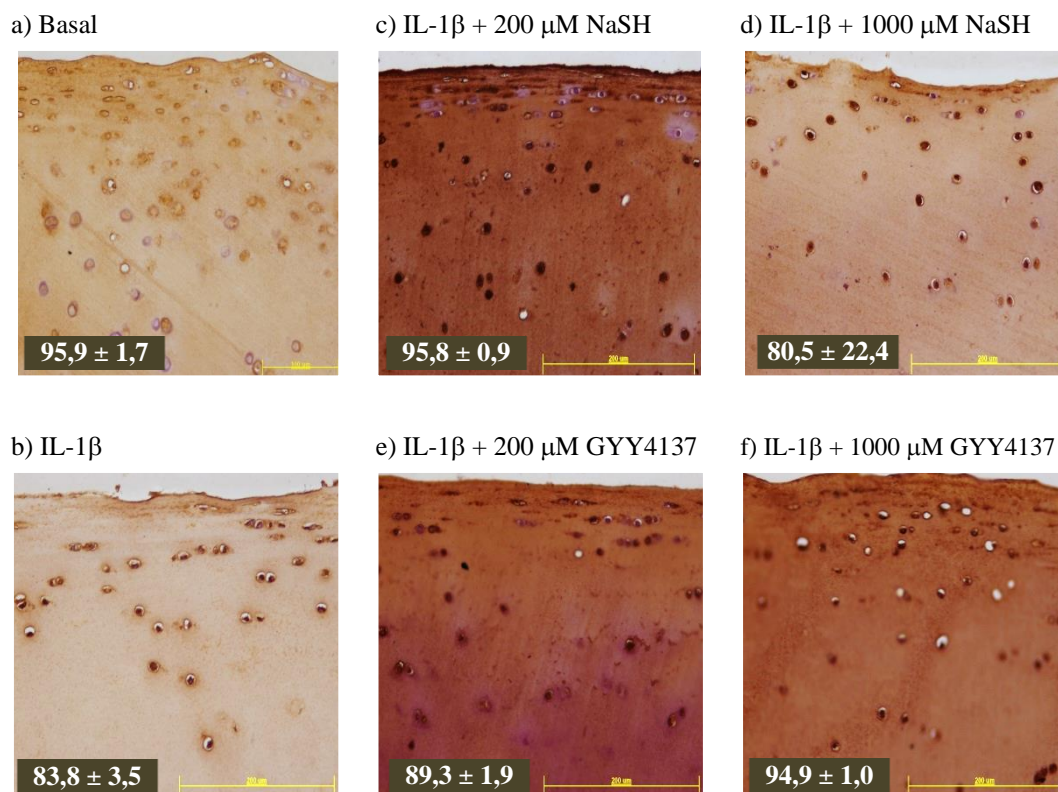
En la inmunohistoquímica para queratán-sulfato (KS) en tejido OA (Fig. 60) observamos que la condición con IL-1 $\beta$  indica una pérdida de este GAG en todas las muestras (Fig. 60 b). Para todos los casos, la co-estimulación de la IL-1 $\beta$  con NaSH (Fig. 60 c y d) supone una mejoría relevante y lo mismo ocurre con GYY4137 (Fig. 60 e y f), y, para ambos compuestos parece que la mejor concentración es la más elevada. Algo que llama la atención también es, de nuevo, la marcación en la región interterritorial, que se pierde de forma evidente en la condición de la IL-1 $\beta$  pero se recupera con la co-estimulación con NaSH y GYY4137. Además, en la Fig. 60 también vemos como el KS está más presente en las zonas de reparación de los discos que se ven principalmente en NaSH 200  $\mu$ M (c) y GYY 1000  $\mu$ M (f) (marcadas con un cuadro) que en el resto de la MEC.



**Fig. 60: Inmunohistoquímica de KS en cartílago OA tras 21 días en las diferentes condiciones experimentales. La escala representada es de 100  $\mu$ m.**



En el caso del tejido sano (Fig. 61), observamos una ligera pérdida de KS en la condición con IL-1 $\beta$  (Fig. 61b), que se revierte con NaSH a 200  $\mu$ M (Fig. 61c) y con las dos concentraciones de GYY4137 (Fig. 61 d y e). Como vemos, a diferencia del resto de tinciones, en este caso NaSH 1000  $\mu$ M (Fig. 61d) no es eficaz para evitar la pérdida de KS.

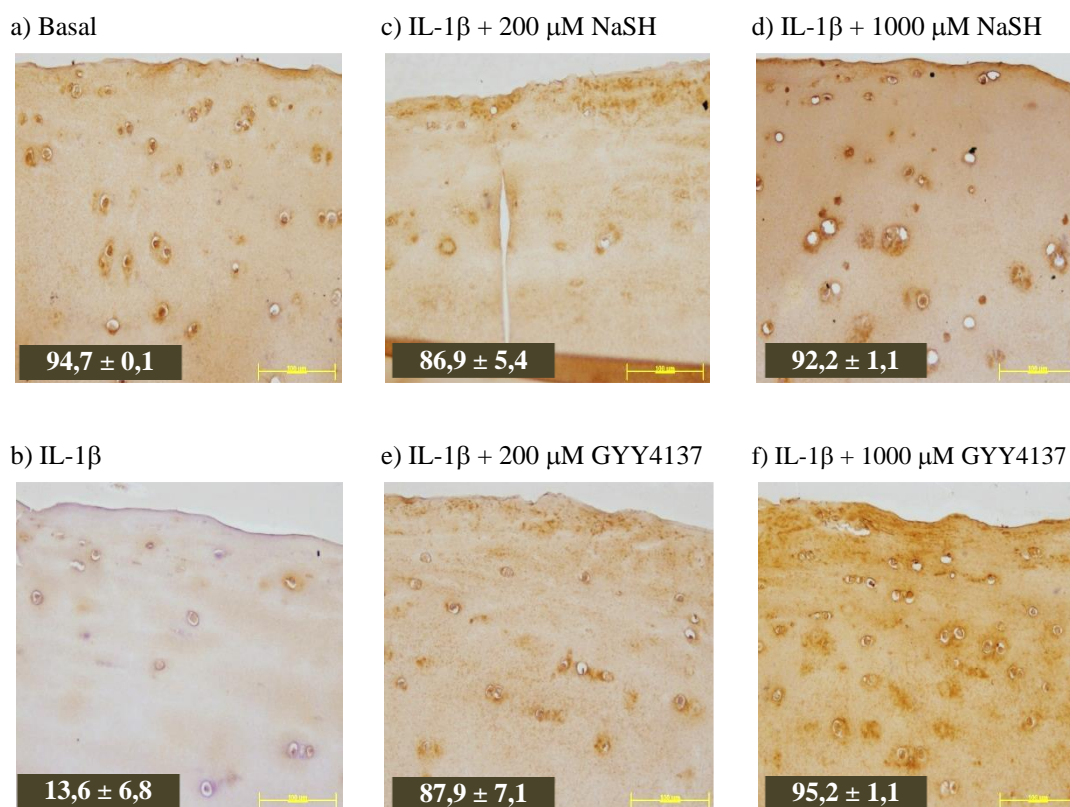


**Fig. 61: Inmunohistoquímica de KS en cartílago N tras 21 días en las diferentes condiciones experimentales. La escala representada es de 200  $\mu$ m.**

### Condroitín sulfato.

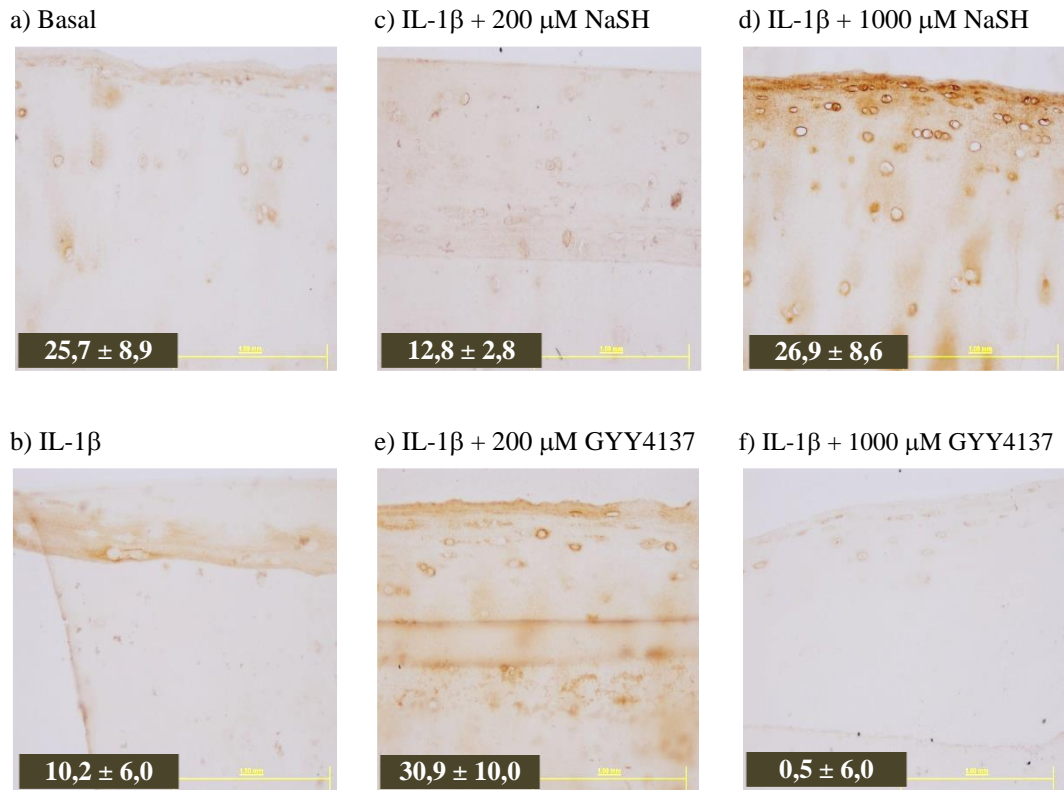
En la inmunohistoquímica para *CH-S* en tejido *OA* (Fig. 62) observamos que la condición con IL-1 $\beta$  presenta una pérdida de esta proteína bastante importante (Fig. 62b).

Las diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>S (NaSH Fig. 62 c y d y GYY4137 Fig. 62 e y f) parecen aumentar los niveles de *CH-S* de la matriz. Además, para ambos compuestos parece que el efecto beneficioso es dosis dependiente.



**Fig. 62:** Inmunohistoquímica de *CH-S* en cartílago *OA* tras 21 días en las diferentes condiciones experimentales. La escala representada es de 100  $\mu$ m.

En el caso del tejido sano (Fig. 63), observamos que la tendencia es la misma que en el resto de tinciones, salvando al *KS*. Una leve pérdida de tinción en la condición con IL-1 $\beta$  (Fig. 63b), una recuperación dosis dependiente con el NaSH (Fig. 63 c y d) y con la concentración de 200  $\mu$ M de GYY4137 (Fig. 63e). De la misma manera que en el resto de las tinciones en cartílago normal (salvo, como mencionamos, el *KS*) la concentración de 1000  $\mu$ M de GYY4137 no parece contrarrestar el efecto de la IL-1 $\beta$  (Fig. 63f).



**Fig. 63:** Inmunohistoquímica de *CH-S* en cartílago N tras 21 días en las diferentes condiciones experimentales. La escala representada es de 200 μm.

Tabla 14: Resumen de los porcentajes de liberación de GAGs y de positividad de las tinciones histoquímicas o inmunohistoquímicas en tejido OA

	Basal	IL-1 $\beta$				
		0 $\mu$ M	200 $\mu$ M NaSH	1000 $\mu$ M NaSH	200 $\mu$ M GYY4137	1000 $\mu$ M GYY4137
<b>GAGs tejido</b>	79,9 $\pm$ 9,46	45,5 $\pm$ 1,9	70,9 $\pm$ 5,1	69,3 $\pm$ 6,1	61,4 $\pm$ 4,0	74,8 $\pm$ 11,6
<b>GAGs sobrenadantes</b>	20,1 $\pm$ 9,5	54,5 $\pm$ 1,9	29,1 $\pm$ 5,1	30,7 $\pm$ 6,1	38,6 $\pm$ 4,0	34,6 $\pm$ 11,6
<b>Safranina-O</b>	93,0 $\pm$ 3,3	14,0 $\pm$ 2,3	0,6 $\pm$ 0,2	79,9 $\pm$ 16,2	83,8 $\pm$ 5,7	89,8 $\pm$ 10,2
<b>Azul de toluidina</b>	98,9 $\pm$ 0,3	65,7 $\pm$ 5,0	98,5 $\pm$ 1,3	98,8 $\pm$ 2,0	99,0 $\pm$ 3,4	98,3 $\pm$ 3,3
<b>Azul alcian</b>	80,1 $\pm$ 13,2	55,6 $\pm$ 18,5	54,6 $\pm$ 8,0	70,6 $\pm$ 11,8	67,4 $\pm$ 18,3	66,7 $\pm$ 10,1
<b>PAS</b>	7,8 $\pm$ 4,2	38,0 $\pm$ 8,7	7,4 $\pm$ 8,8	10,8 $\pm$ 4,1	7,9 $\pm$ 2,0	8,7 $\pm$ 2,9
<b>Tricrómico de Masson</b>	91,0 $\pm$ 3,8	79,8 $\pm$ 7,4	90,1 $\pm$ 2,1	90,0 $\pm$ 0,2	90,5 $\pm$ 5,8	92,4 $\pm$ 3,0
<b>MMP3</b>	0,5 $\pm$ 0,2	10,4 $\pm$ 3,2	7,6 $\pm$ 3,6	4,3 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,5
<b>MMP13</b>	4,0 $\pm$ 1,0	84,2 $\pm$ 8,2	77,8 $\pm$ 5,8	41,4 $\pm$ 7,3	33,2 $\pm$ 2,9	12,5 $\pm$ 3,5
<b>Colágeno II</b>	39,6 $\pm$ 7,9	4,9 $\pm$ 1,0	49,3 $\pm$ 6,2	54,4 $\pm$ 9,1	31,9 $\pm$ 3,4	56,3 $\pm$ 5,8
<b>Agrecano</b>	29,7 $\pm$ 2,2	18,5 $\pm$ 6,7	25,6 $\pm$ 3,8	36,1 $\pm$ 2,0	24,1 $\pm$ 5,6	30,9 $\pm$ 3,2
<b>Queratán sulfato</b>	86,9 $\pm$ 21,3	8,0 $\pm$ 5,0	82,1 $\pm$ 22,9	84,2 $\pm$ 9,1	69,4 $\pm$ 8,8	87,2 $\pm$ 16,2
<b>Condrotín sulfato</b>	94,7 $\pm$ 0,1	13,6 $\pm$ 6,8	86,9 $\pm$ 5,4	92,2 $\pm$ 1,1	87,9 $\pm$ 7,1	95,2 $\pm$ 1,1

Tabla 15: Resumen de los porcentajes de liberación de GAGs y de positividad de las tinciones histoquímicas o inmunohistoquímicas en tejido N.

	Basal	IL-1 $\beta$				
		0 $\mu$ M	200 $\mu$ M NaSH	1000 $\mu$ M NaSH	200 $\mu$ M GYY4137	1000 $\mu$ M GYY4137
<b>GAGs tejido</b>	83,9 $\pm$ 6,4	61,9 $\pm$ 17,9	65,5 $\pm$ 19,7	76,9 $\pm$ 3,4	76,6 $\pm$ 16,4	71,9 $\pm$ 18,9
<b>GAGs sobrenadantes</b>	16,1 $\pm$ 6,4	38,1 $\pm$ 17,9	30,5 $\pm$ 19,7	23,1 $\pm$ 3,4	23,4 $\pm$ 16,4	28,1 $\pm$ 18,9
<b>Safranina-O</b>	95,8 $\pm$ 5,7	86,2 $\pm$ 6,6	91,6 $\pm$ 1,3	95,3 $\pm$ 2,2	90,8 $\pm$ 6,0	82,4 $\pm$ 1,8
<b>Azul de toluidina</b>	99,8 $\pm$ 3,5	68,6 $\pm$ 1,2	95,7 $\pm$ 0,1	99,3 $\pm$ 0,1	99,8 $\pm$ 0,1	69,0 $\pm$ 5,8
<b>Azul alcian</b>	95,9 $\pm$ 4,7	68,2 $\pm$ 8,6	94,6 $\pm$ 2,2	93,0 $\pm$ 6,0	94,2 $\pm$ 4,7	70,5 $\pm$ 11,1
<b>PAS</b>	1,2 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,6	1,6 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 0,1
<b>Tricrómico de Masson</b>	96,0 $\pm$ 3,9	95,7 $\pm$ 1,4	97,1 $\pm$ 2,7	94,6 $\pm$ 2,2	96,8 $\pm$ 5,1	93,4 $\pm$ 2,0
<b>Queratán - sulfato</b>	95,9 $\pm$ 1,7	83,8 $\pm$ 3,5	95,8 $\pm$ 0,9	80,5 $\pm$ 22,4	89,3 $\pm$ 1,9	94,9 $\pm$ 1,0
<b>Condroitín - sulfato</b>	25,7 $\pm$ 8,9	10,2 $\pm$ 6,0	12,8 $\pm$ 2,8	26,9 $\pm$ 8,6	30,9 $\pm$ 10,0	0,5 $\pm$ 6,0



# DISCUSIÓN

---





En esta tesis se ha querido hacer una aproximación al papel que juega el H<sub>2</sub>S en el proceso de la OA, evaluándolo desde dos puntos de vista. Por un lado, como posible agente causante que contribuye al desarrollo del proceso artrósico y por otro, como potencial agente terapéutico.

## **1. SÍNTESIS Y CONCENTRACIÓN DEL H<sub>2</sub>S ENDÓGENO EN LA OA**

Aunque los tiempos en los cuales el H<sub>2</sub>S se consideraba únicamente un gas tóxico no quedan tan lejos, actualmente es un hecho bien asentado en la comunidad científica que este gas es también un compuesto endógeno con numerosas funciones fisiológicas. Como molécula de señalización, puede modular la transmisión neuronal, actuar como relajante de la musculatura lisa, regular la liberación de insulina y está implicado en la inflamación (61). Sus dianas moleculares incluyen proteínas, enzimas, factores de transcripción y canales iónicos de membrana (112). Esto ha hecho que el H<sub>2</sub>S sea aceptado, junto con el NO y el CO, como la tercera molécula gasotransmisora endógena (55). De hecho, estas tres moléculas comparten muchas similitudes, además de haberse considerado únicamente tóxicos antes de descubrirse su existencia en el organismo; los tres ejercen efectos vasodilatadores, afectan al metabolismo celular a través de, como mínimo, la citocromo C oxidasa, ejercen efectos anti-inflamatorios endógenos a bajas concentraciones y resultan tóxicos cuando se superan estos valores fisiológicos (59).

En esta tesis, se ha querido comprobar si el sulfuro de hidrógeno podría jugar también un papel en el proceso artrósico, de la misma manera que anteriormente se descubrió que sucedía con el NO (40,113). Para ello nos planteamos caracterizar su biosíntesis en los tejidos de la articulación y cuantificar su concentración en el suero de pacientes con OA, comparando estas medidas con las de controles sin artrosis.

Existe cierta controversia en la literatura respecto a los diferentes métodos para medir la concentración de H<sub>2</sub>S en muestras biológicas. La mayor parte de los estudios que han evaluado los niveles de H<sub>2</sub>S en plasma o suero han utilizado un método espectrofotométrico basado en el azul de metileno. Este ensayo implica la “fijación” o “atrapamiento” del sulfuro acuoso en las muestras biológicas con acetato de zinc para prevenir pérdidas innecesarias de H<sub>2</sub>S. Con una acidificación posterior, el H<sub>2</sub>S se libera y, en presencia de *N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine (DMPD) y de pequeñas cantidades de óxido férrico, se produce el colorante heterocíclico azul de metileno que se puede

detectar fácilmente con un espectrofotómetro estándar a 670 nm. Es posible que este ensayo espectrofotométrico mida la suma de las especies derivadas de  $\text{H}_2\text{S}$ , tales como  $\text{HS}^-$  o  $\text{S}^{2-}$ , que co-existen a pH fisiológico y no de  $\text{H}_2\text{S}$  *per se*. Sin embargo, los estudios que han utilizado este método han sido útiles para generar una cantidad considerable de datos de partida y destacan la importancia emergente del  $\text{H}_2\text{S}$  y sus especies asociadas. Utilizando este método, la mayoría de los laboratorios han publicado niveles de  $\text{H}_2\text{S}$  en plasma de 121  $\mu\text{M}$  de media (65,114), sin embargo es prudente mencionar que algunos laboratorios han publicado resultados marcadamente diferentes utilizando las mismas técnicas analíticas. Por ejemplo, dos estudios en ratas han sugerido que la concentración de  $\text{H}_2\text{S}$  en plasma estaba por debajo del límite de detección del ensayo del azul de metileno (115) o no detectaron liberación de  $\text{H}_2\text{S}$  a partir de homogeneizados de tejido suplementados con L-cisteína (116). Estos estudios no contradicen necesariamente a la mayoría, sino que sugieren que  $\text{H}_2\text{S}$  está secuestrado o transportado en el plasma o en los tejidos, en lugar de liberarse como  $\text{H}_2\text{S}$  libre. Adicionalmente existen otros métodos de medición de sulfuro de hidrógeno en sangre y muestras biológicas, como la cromatografía de gases, el sensor amperométrico y la cromatografía líquida de alta eficacia (*HPLC*) (65,117,118) que es posible que hagan una estimación más exacta de las concentraciones de  $\text{H}_2\text{S}$  endógeno, pero son bastante más laboriosos y necesitan equipos costosos. De hecho, un estudio publicado recientemente (118) valora las diferentes formas de análisis del  $\text{H}_2\text{S}$  exponiendo que en la mayoría de los estudios publicados las concentraciones están sobreestimadas. Esto es debido, según dicen, a que estos propios métodos alteran las concentraciones de  $\text{H}_2\text{S}$  al requerir soluciones para acidificar o alcalinizar el pH, o bien son poco sensibles a bajas concentraciones. De hecho, resulta intrigante que las soluciones de  $\text{H}_2\text{S}$  que se preparan en el laboratorio con sales tales como  $\text{Na}_2\text{S}$  o  $\text{NaSH}$ , en concentraciones similares a las que se han publicado para plasma o suero, son característicamente olorosas, mientras que la sangre, el plasma o el suero, que contienen  $\text{H}_2\text{S}$  en esas concentraciones no huelen. Esto es otra evidencia que sugiere que los métodos utilizados habitualmente podrían medir una forma de  $\text{H}_2\text{S}$  unido o secuestrado, en lugar de  $\text{H}_2\text{S}$  libre.

Nuestro método de elección fue un microelectrodo iónico específico (ISE) debido a su fácil manejo, su coste asequible y la capacidad de medir en tiempo real. No descartamos que los valores absolutos que hemos obtenido en cartílago y suero puedan estar ligeramente sobreestimados, ya que el tampón antioxidante utilizado podría aumentar

las mediciones al liberar compuestos de sulfuro unidos a proteínas. En nuestro caso, hemos realizado una comparación entre los valores en tejido y suero de pacientes artrósicos y las mediciones en pacientes sanos, con el mismo método, con lo que lo más relevante son las diferencias observadas entre los dos grupos.

Nuestras mediciones en los sueros dieron como resultado unos niveles de H<sub>2</sub>S (mediana [cuartil 25-cuartil 75]) de 45,02 [20,9, 79.3] μM en los pacientes con OA frente a 68,9 [16,4, 95,1] μM en los pacientes N. Aunque la diferencia no es significativa ( $p=0,68$ ). Estos resultados difieren ligeramente de los encontrados por Whiteman *et al.* en plasma de pacientes OA y normales, quienes encontraron niveles sensiblemente más bajos (36,2 [17,1-66,3] μM frente a 37,6 [27,4-41,3] μM, respectivamente, aunque tampoco observaron ninguna diferencia entre ambos grupos. Sin embargo, sus estudios difieren notablemente en la metodología ya que por una parte utilizaron plasma en vez de suero, congelaron la sangre previamente a su centrifugación, y analizaron el H<sub>2</sub>S mediante espectrofotometría. Aunque nuestros grupos OA y sano no están pareados por edad, ya que las medias de edad son bastante diferentes, el análisis de varianza univariante descartó que tanto la edad como el sexo tuvieran influencias significativas en los resultados obtenidos.

Whiteman *et al.* sí encontraron diferencias significativas en la estimación de H<sub>2</sub>S en líquido sinovial entre pacientes OA (25,1 [18,8-34,8] μM) y pacientes RA (62,41 [46,6-95,5] μM). Por motivos obvios no se pudieron comparar estos valores con los de controles sanos (86). Nuestros resultados sí mostraron diferencias significativas en la biosíntesis de H<sub>2</sub>S en cartílago articular, con valores de  $0,42 \pm 0,09$  μmoles/g para los controles sanos frente a  $0,10 \pm 0,04$  μmoles/mg para los cartílagos OA. Teniendo en cuenta nuestros resultados en cartílago y los publicados en líquido sinovial, y el hecho de que estas diferencias no se ven claramente reflejadas en las concentraciones de H<sub>2</sub>S en sangre periférica, parece lógico pensar que son el resultado de alteraciones en la producción de H<sub>2</sub>S local, en los tejidos articulares, y posiblemente alteraciones en la expresión o la actividad de las enzimas de síntesis CBS, CSE o MPST dentro de la articulación.

En nuestros estudios, al analizar la expresión génica de las enzimas de producción de H<sub>2</sub>S en cartílago, membrana sinovial y hueso subcondral observamos que no hay diferencias significativas en las dos enzimas citoplasmáticas, CTH y CBS, aunque

parece haber una tendencia en cartílago *OA* a que CBS esté disminuida. La única publicación que, hasta la fecha, ha estudiado estas enzimas en la articulación utilizó células tipo condrocito (células madre diferenciadas a un fenotipo condrocítico) y condrocitos primarios (87). En ella demostraron la expresión de ambas enzimas en estas células y la inducción de la expresión de CTH al estimular las células con IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 o LPS. La expresión de CTH también se ha visto inducida en el hígado, riñones y pulmón por LPS (77). Esto parece indicar que al igual que el *NO*, el H<sub>2</sub>S podría tener una enzima fisiológica y otra inducible. Sin embargo, no se hace ningún análisis de MPST.

Teniendo esto en cuenta y a la vista de nuestros resultados, se observa que, aunque las diferencias no son significativas, existe una tendencia, similar en los tres tejidos analizados a que la enzima fisiológica, CBS, se encuentre ligeramente disminuida en las muestras *OA* y principalmente en el cartílago. Este resultado podría sugerir que la expresión de la enzima responsable de la síntesis de H<sub>2</sub>S en tejido sano estaría parcialmente inhibida con el desarrollo de la *OA*, pudiendo contribuir así al desarrollo del proceso degenerativo, sin embargo harían falta más estudios en esta dirección. En cuanto a la CTH no encontramos diferencias en ninguno de los casos.

Sí encontramos diferencias significativas en la expresión de MPST, que es la única responsable de producir H<sub>2</sub>S en la mitocondria (119), lo que concuerda con la teoría emergente de que la disfunción mitocondrial es un factor contribuyente a la *OA* (120-125). Diversos estudios *in vitro* han demostrado que en condrocitos *OA* los complejos II y III de la cadena respiratoria mitocondrial (CRM) tienen una menor actividad que en los condrocitos normales (120) y que la disfunción mitocondrial podría potenciar la inflamación inducida por citoquinas en sinoviocitos y condrocitos articulares (123,126).

No es posible saber por el momento si la disfunción mitocondrial podría ser la causa de esta disminución en la expresión de MPST y, consecuentemente, de la bajada en los niveles de H<sub>2</sub>S en cartílago o si, por el contrario es la consecuencia.

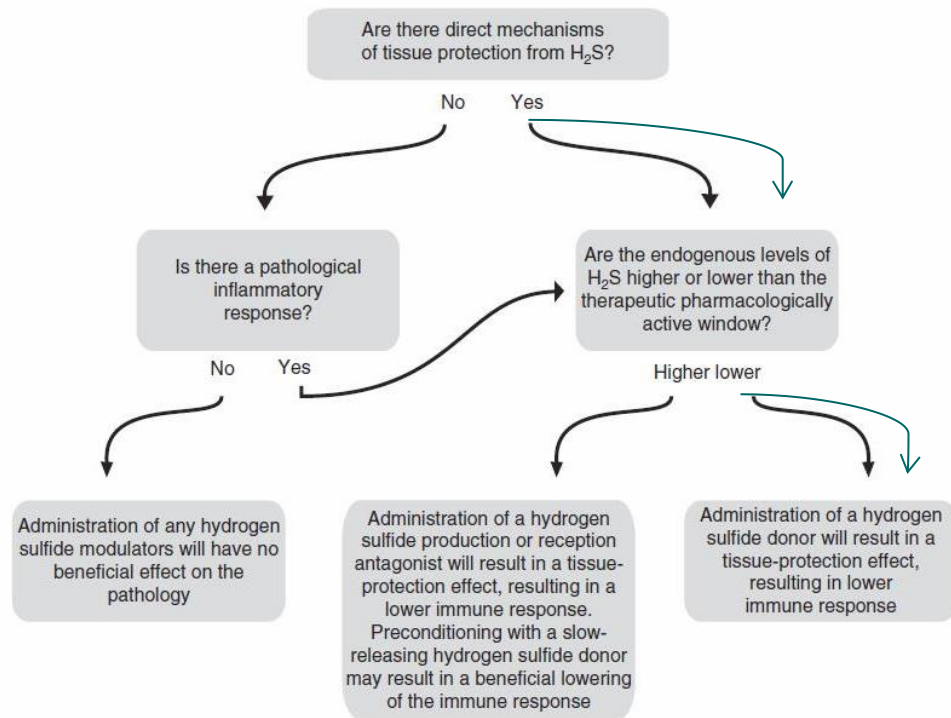
En resumen, al estudiar la producción endógena de H<sub>2</sub>S comparando sujetos con *OA* y sujetos normales encontramos que, efectivamente, en la *OA* la producción de H<sub>2</sub>S en cartílago está disminuida, lo que parece ser una consecuencia, como mínimo, de la reducción de la expresión de la enzima MPST en el cartílago afectado por esta patología.

De hecho, son numerosos los ejemplos de otras patologías en las que se ha visto que la biosíntesis de H<sub>2</sub>S está reducida. Por ejemplo, en modelos de animales con fallo renal crónico (127), hipertensión (128), diabetes (130) y enfermedades neurodegenerativas (*Alzheimer* (131) y *Parkinson* (132)) se han encontrado concentraciones y/o la biosíntesis de H<sub>2</sub>S reducidas en el suero/plasma de los animales o en los tejidos implicados. Y lo que es más relevante, muchos de estos resultados se corresponden con los obtenidos en estudios en humanos. En niños hipertensos, los niveles de H<sub>2</sub>S en plasma ( $51,9 \pm 6,0 \mu\text{M}$ ; edad  $10,48 \pm 3,2$  años) fueron inferiores a los del grupo control ( $65,7 \pm 5,5 \mu\text{M}$ ; edad  $10,5 \pm 0,73$  años) (133). En pacientes con diabetes tipo II, los niveles de H<sub>2</sub>S eran significativamente menores comparados con controles pareados de edad e índice de masa corporal, tanto en controles delgados como con sobrepeso, y los niveles de H<sub>2</sub>S en el plasma de los controles con sobrepeso eran significativamente inferiores a los de controles delgados, correlacionándose con la adiposidad (134). En personas con *Alzheimer*, los niveles de H<sub>2</sub>S en plasma se correlacionaban con un deterioro de la función cognitiva (135). También se ha encontrado una relación significativa entre los niveles de H<sub>2</sub>S en suero y el estadio de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (136).

Por otro lado, también hay algunos casos, generalmente de modelos de inflamación aguda, en los que los niveles y/o la biosíntesis de H<sub>2</sub>S se encuentra aumentada. Por ejemplo, en modelos de sepsis, los niveles de H<sub>2</sub>S en el plasma de los ratones tratados con *LPS* estaban marcadamente aumentados (77) y en ratas, *LPS* indujo un aumento significativo de la expresión y la actividad de CTH y CBS (108). También, al utilizar ceruleína para provocar pancreatitis en ratones, se indujo la síntesis de H<sub>2</sub>S en el páncreas (137). En estos casos, el uso del inhibidor farmacológico PAG mejoró los síntomas y/o redujo las concentraciones de H<sub>2</sub>S. Incluso en pacientes humanos con sepsis también se encontraron concentraciones de H<sub>2</sub>S hasta 4 veces superiores a las de los sujetos sanos (77). Sin embargo, recientemente se ha propuesto la teoría de que en estos casos, el H<sub>2</sub>S tiene un papel anti-inflamatorio y es el intento de las células de detener o contrarrestar la respuesta inflamatoria (53,86). Esta teoría está por confirmar.

Dado que nuestros resultados sugieren que la biosíntesis del H<sub>2</sub>S endógeno está disminuida, nos planteamos entonces, siguiendo el esquema publicado por Rivers (76) ([Fig. 64](#)), si podría haber una ventana terapéutica para el H<sub>2</sub>S, es decir, si podríamos

encontrar dosis de H<sub>2</sub>S exógenas que tuvieran efectos positivos sobre las células procedentes de tejido OA.



**Fig. 64: Diagrama de flujo sobre los posibles efectos citoprotectores y/o anti-inflamatorios de la suplementación de H<sub>2</sub>S en diferentes situaciones patológicas.**

Tomada de la referencia y modificada de la referencia (76). Las flechas en azul resaltan nuestra hipótesis.

## 2. H<sub>2</sub>S EXÓGENO COMO AGENTE TERAPÉUTICO EN LA OA

Esta segunda parte, por lo tanto, se centró en el estudio de los efectos de la suplementación con H<sub>2</sub>S exógeno. Para ello, se realizaron estudios *in vitro* utilizando condrocitos (o cartílago) de articulaciones OA estimulados con una citoquina pro-inflamatoria, la IL-1 $\beta$ , para simular el proceso inflamatorio crónico y reproducir lo que sucede en los condrocitos (o tejido) OA *in vivo*. La IL-1 $\beta$  es el prototipo de citoquina pro-inflamatoria en la articulación OA, responsable de activar la síntesis de eicosanoides y catalizar la producción de las prostaglandinas, aumentar los niveles de NO, potenciar la degradación del cartílago e inclusive inducir la apoptosis celular (20,28,29,138-141). Con este modelo, como era de esperar, la estimulación con 5 ng/ml de esta citoquina indujo en las células un aumento de los marcadores de estrés oxidativo, inflamación y catabolismo que se estudiaron, tales como NO, iNOS, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, IL-6, PGE<sub>2</sub> y sus enzimas de síntesis COX-2 y PTGES, y las metaloproteasas MMP1, 3 y 13.

Para administrar el H<sub>2</sub>S exógeno se seleccionaron dos compuestos, NaSH y el GYY4137, que liberan H<sub>2</sub>S al entrar en contacto con un fluido acuoso. El NaSH es un compuesto que produce una liberación de H<sub>2</sub>S rápida y puntual (142,143). Se ha utilizado en numerosos diseños experimentales para valorar los efectos del H<sub>2</sub>S en diversas patologías (53). El GYY4137 es un compuesto relativamente nuevo, cuyas primeras referencias aparecen en 2008 (142). Tiene una farmacocinética totalmente diferente a la del NaSH, ya que el H<sub>2</sub>S se libera de forma lenta y prolongada, de forma más similar a la síntesis endógena de H<sub>2</sub>S a partir de sus enzimas de producción (143).

Al estudiar la bibliografía sobre la utilización de estos compuestos en diferentes modelos de órganos y patologías se comprobó que no existe un consenso en cuanto a la dosis apropiada para que estos compuestos no sólo dejen de ser tóxicos, si no que resulten beneficiosos para el organismo (53). Es decir, no existe de momento una ventana terapéutica conocida. Por ejemplo, se han propuesto ventanas terapéuticas entre 25-200  $\mu$ M en cardiomiocitos isquémicos (144), o entre 50-100  $\mu$ M y 50-500  $\mu$ M en macrófagos, en función del compuesto que se utilice (143). Sin embargo, se comprobó que el NaSH resultaba citotóxico para células endoteliales cerebrales a partir de 250  $\mu$ M (145), mientras que en astrocitos no sólo no era citotóxico, sino que presentaba efectos citoprotectores incluso a una concentración de 1000  $\mu$ M (68). También en células madre



mesenquimales (87) se encontraron indicios de toxicidad con NaSH a concentraciones iguales o superiores a 25  $\mu\text{M}$ , en comparación con el GYY4137, que ni siquiera a la concentración más alta, 250  $\mu\text{M}$ , produjo daño. En una línea de fibroblastos pulmonares sanos se observó que dosis de 10 a 75  $\mu\text{M}$  de NaSH resultaban citotóxicas (146). En resumen, se deduce que el que se produzcan efectos citotóxicos o no depende del tipo celular estudiado y del compuesto y la dosis administrados (142,147-149), aunque en general, la mayoría de los estudios eligen como dosis citoprotectoras aquellas por debajo de 500  $\mu\text{M}$ , siendo 1000  $\mu\text{M}$  un límite relativo entre los efectos citoprotectores y citotóxicos.

En nuestros estudios elegimos un rango de 50 a 1000  $\mu\text{M}$  y comprobamos que, para ambos compuestos de  $\text{H}_2\text{S}$ , utilizados a estas concentraciones no produjeron muerte celular ni toxicidad en los condrocitos.

### **2.1. Efectos del $\text{H}_2\text{S}$ sobre el estrés oxidativo**

En los múltiples estudios realizados hasta el momento parece que los efectos del  $\text{H}_2\text{S}$  se producen mediante uno o varios de los siguientes mecanismos de acción, 1) la interacción con los sistemas redox del organismo, 2) la modulación de la actividad de los KATPc, 3) la alteración de la expresión génica mediante la modulación de factores de transcripción y 4) la inhibición de la p38-MAPK (*mitogen activated protein kinase*).

Entre estos mecanismos de acción del  $\text{H}_2\text{S}$ , el más directo sea probablemente su función como compuesto reductor y secuestrador de especies reactivas de nitrógeno (*reactive nitrogen species, RNS*) y ROS. De hecho, el  $\text{H}_2\text{S}$  reacciona con al menos cinco especies reactivas diferentes, el NO (150), el  $\text{O}_2^-$  (151), el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (152), el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (153) e hipocloritos (154), lo que supone la protección de proteínas y lípidos del daño inducido por estas moléculas (153,154).

#### Especies Reactivas de Nitrógeno

El NO es un radical gaseoso que interviene tanto en el proceso inflamatorio como en el catabólico de la OA. Actualmente está aumentado la evidencia de que los tres “gasotransmisores” NO, CO y  $\text{H}_2\text{S}$  interaccionan entre sí, afectando a su biodisponibilidad y reactividad, aunque la naturaleza exacta de esta interacción aún no está muy clara (114).



Nuestros resultados muestran una reducción dosis dependiente tanto del *NO* como de *iNOS*, y tanto con NaSH como con GYY4137. En el otro estudio del que tenemos conocimiento realizado con H<sub>2</sub>S y condrocitos (88) también se muestra una inhibición de su síntesis y de su enzima inducible de producción. A mayores, en un estudio similar con macrófagos, aunque concuerdan en cuanto a los resultados del GYY4137, encuentran un efecto bifásico para el NaSH que nosotros no encontramos. Tras una reducción a concentraciones bajas, los niveles de *NO* vuelven a aumentar a concentraciones mayores de 200 μM (143). Otro trabajo con macrófagos también encontró que el H<sub>2</sub>S es capaz de inhibir la producción de *NO* y la expresión de *iNOS in vitro* (74), y también en un modelo de inflamación pulmonar el H<sub>2</sub>S actúa inactivando *iNOS* (83). A su vez, también se ha visto que el *NO* reduce la síntesis de H<sub>2</sub>S *in vivo* (155) y que el *NO* inhibe la actividad de la CBS, uniéndose al grupo hemo de esta enzima (156). Esto podría explicar por qué esta enzima está ligeramente reducida en cartílago *OA* contribuyendo a que los niveles de H<sub>2</sub>S en cartílago *OA* están disminuidos. Sin embargo, también se ha observado que la interacción entre el *NO* y el H<sub>2</sub>S se corresponde con un incremento en su producción debido a un aumento de sus enzimas de síntesis (71,81,157). Todos estos estudios demuestran que el *NO* y el H<sub>2</sub>S parecen interactuar a varios niveles, por un lado pueden reaccionar directamente, cada uno de ellos afecta a la producción del otro y, además, alteran la expresión de sus respectivas enzimas de síntesis. Por otro lado también podrían actuar a otros niveles sobre sus respectivos metabolitos (156,158-160).

Además, algunos autores también señalan que al actuar directamente sobre las especies reactivas de oxígeno (ver más adelante), el H<sub>2</sub>S disminuye el *NO* de forma indirecta (59,150,153). En nuestro caso, la reducción de este gas está acompañada por la inhibición del gen *iNOS* y por una reducción también a nivel de proteína. Por lo tanto, aunque no descartamos una contribución a través de las reacciones redox que se puedan estar produciendo, nuestro modelo *in vitro* sugiere que el H<sub>2</sub>S regula los niveles de *NO* de forma directa mediante la inhibición de la expresión génica y proteica de su enzima inducible de síntesis.

Especies Reactivas de Oxígeno

Las ROS se producen en la CRM. Se estima que esta producción sólo representa un pequeño porcentaje del oxígeno que se consume en la CRM. Es más, la mitocondria está equipada con enzimas antioxidantes que eliminan las ROS. Sin embargo, en situaciones de estrés celular, se produce una acumulación de ROS.

El efecto citoprotector del H<sub>2</sub>S ha sido atribuido, en parte, a su efecto antioxidante (66,67,161). Gracias a esto, parece ser muy beneficioso en patologías con un alto contenido en ROS como ocurre en la lesión cardiaca isquémica. En los estudios en modelos animales adjudican al H<sub>2</sub>S el poder de retrasar la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, aumentar la expresión de genes que regulan el equilibrio redox y en consecuencia reducir la acumulación de productos de la oxidación de los lípidos de la que es responsable el HO<sub>2</sub><sup>-</sup> (152). En esta misma publicación también observan que el NaSH reduce los niveles del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y del O<sub>2</sub><sup>-</sup> de manera dosis dependiente en los cardiomiocitos. De hecho, algunos estudios sugieren que el anión superóxido es, dentro de las ROS, la diana más habitual del H<sub>2</sub>S. En nuestros resultados observamos que el GYY4137 inhibe su producción de manera dosis-dependiente, siendo el efecto significativo a las dosis más altas; mientras que con el NaSH, no encontramos los mismos resultados. Esto concuerda con varios estudios en los que también encuentran, tanto de forma directa como indirecta, una reducción en los niveles de ROS, y algunos también con NaSH (Tabla 16). Por ejemplo, en plaquetas (162) encuentran que a mayor dosis de NaSH mayor es la inhibición del O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

**Tabla 16: Estudios en los que NaSH exhibieron efectos antioxidantes.**

Ref	NaSH	Efectos
(144)	0 - 200µM	H <sub>2</sub> S activó SOD para disminuir los niveles de ROS en cardiomiocitos de rata <i>in vitro</i> en un proceso de isquemia/reperfusión.
(149)	100µM	H <sub>2</sub> S protegió a una línea celular de osteoblastos frente al daño oxidativo inducido por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .
(68)	0 – 100 µm	H <sub>2</sub> S revertió el daño oxidativo inducido por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en astrocitos corticales de rata.
(145)	0 – 500 µM	H <sub>2</sub> S protegió a una línea de células endoteliales cerebrales de daño oxidativo inducido por hiperhomocisteinemia.
(162)	0,01 µM – 10 mM	H <sub>2</sub> S inhibió la producción del anión superóxido en plaquetas de una manera dosis dependiente.

Sin embargo, en otro estudio publicado sobre la toxicidad del H<sub>2</sub>S realizado en hepatocitos los resultados son totalmente opuestos (163). Debido a su efecto inhibitor de la citocromo C oxidasa en la CRM, los autores asumen que la adición de H<sub>2</sub>S actuará inhibiendo la formación de ROS, sin embargo, lo que encuentran es un aumento dosis-dependiente de ROS medido con 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA).

Esto se debe a que la oxidación del H<sub>2</sub>S no es solamente una forma de ejercer su acción, si no que también es una de sus vías metabólicas. Esta oxidación del H<sub>2</sub>S ocurre en la mitocondria y conecta su metabolismo con la CRM y por tanto, con la formación de ATP y ROS (164). La producción de ROS se ve incrementada cuando se acumulan especies reducidas de los complejos I y III, lo que sucede cuando se inhibe la citocromo C oxidasa, por ejemplo, con concentraciones elevadas de H<sub>2</sub>S. Para evitar la acumulación de H<sub>2</sub>S dentro de las células y por tanto, su toxicidad, la vía de oxidación se activa a muy bajas concentraciones (10-20 nM), y se lleva a cabo mediante las enzimas sulfuro quinona oxidoreductasa, persulfuro dioxigenasa, rodanasa (Rhd) y sulfito oxidasa (Fig. 65) (164) cuyos productos de oxidación son persulfuros, sulfitos, tiosulfatos y sulfatos de los cuales el 90% se excretan por la orina (165). Sin embargo, en muchas ocasiones, esto no es suficiente y determinadas concentraciones de H<sub>2</sub>S provocan el efecto indeseado de aumentar los niveles de ROS. Este mecanismo podría explicar por qué en nuestros estudios GYY4137 puede reducir ROS, mientras que NaSH, que tiene una cinética de producción de H<sub>2</sub>S diferente, no.

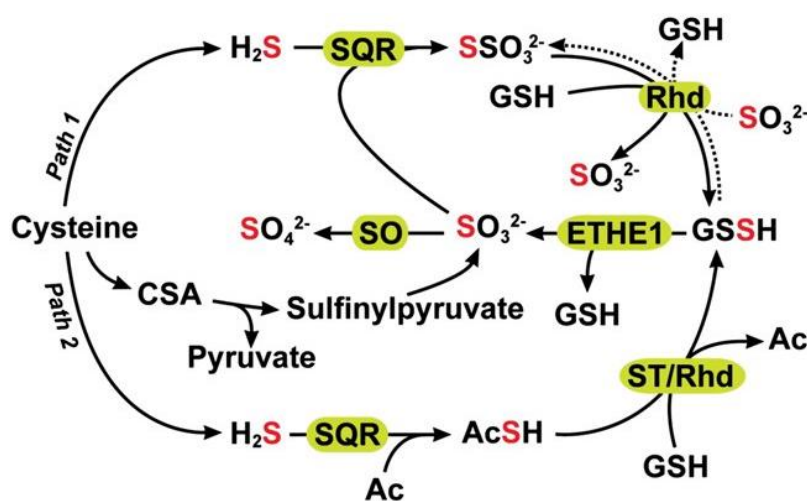


Fig. 65: Esquema de la oxidación del H<sub>2</sub>S en la mitocondria. SQR: sulfuro quinona oxidoreductasa, Rhd: rodanasa. ETHE1: persulfuro dioxigenasa

## 2.2. El sulfuro de hidrógeno y su efecto en el proceso inflamatorio

En general, el efecto del H<sub>2</sub>S en el proceso inflamatorio es controvertido. La administración exógena de H<sub>2</sub>S demostró ser pro-inflamatoria en varios casos (ver [Tabla 17](#)). Por ejemplo, la inyección de NaSH en un modelo de ratón de inflamación y edema periférico resultó en un aumento de la PGE<sub>2</sub> (79). También se observó un aumento de *TNF-α* y daño pulmonar al inyectar 14 μM/kg i.p (166) en otro modelo de septicemia en ratones y, en un modelo de pancreatitis aguda en el mismo animal la inhibición del H<sub>2</sub>S supuso una mejoría del proceso inflamatorio (78).

**Tabla 17: Estudios en los que NaSH o GYY4137 exhibieron efectos pro-inflamatorios.** Modificado de la tabla de Whiteman et al (53).

Ref	Compuestos	Efectos
(167)s	NaSH (0,1 – 1 mM)	H <sub>2</sub> S indujo la expresión de citoquinas pro-inflamatorias
(168)	NaSH (10 nm/ml) PAG (50 mg/kg)	La administración previa de PAG inhibió el daño y el edema en las patas producido por la formalina. NaSH agravó la respuesta producida por la formalina
(169)	NaSH (10 - 90 μM/kg)	Efecto pro-inflamatorio promoviendo la migración de neutrófilos y antiinflamatorio bloqueando los canales de ATP dependientes de potasio .
(78)	NaSH (100 μM) PAG (50 mg/kg)	Efecto pro-inflamatorio del NaSH mediado por citoquinas. Efecto protector del PAG
(77)	PAG (50 mg/kg) NaSH (14 μmol/kg)	H <sub>2</sub> S es pro-inflamatorios mediando en la inflamación inducida por LPS- PAG redujo la inflamación y el daño tisular

En contraste con esto, también hay muchos ejemplos en los que el H<sub>2</sub>S resultó anti-inflamatorio. Por ejemplo, el H<sub>2</sub>S parece ejercer efectos anti-inflamatorios cuando hablamos de inflamación gastrointestinal. Se ha observado que el NaSH actúa reduciendo la infiltración leucocitaria y disminuyendo la expresión de *TNF-α*, aunque sin alteraciones significantes en la PGE<sub>2</sub> (170). Pero este efecto no solamente se ha visto a nivel gastrointestinal. Otros ejemplos se discutirán junto con nuestros resultados.

En nuestros experimentos, en cuanto a los marcadores de la inflamación estudiados, observamos que, igual que con el estrés oxidativo, ambos compuestos de H<sub>2</sub>S tienen un efecto beneficioso en condrocitos OA en el rango de 50 a 1000 μM.

Comenzando con la citoquina pro-inflamatoria IL-6, observamos que la IL-1β estimuló su producción en los condrocitos y la co-estimulación con los compuestos de sulfuro resultó en una reducción tanto de su expresión génica como de los niveles producidos por las células. Por un lado, en el caso del GYY4137 la reducción de los niveles de IL-6 fue dosis-dependiente, pero con un ligero efecto techo a las dos dosis superiores, 500 y 1000 μM. En el caso del NaSH, el efecto sobre los niveles de IL-6 no fue tan claramente dosis-dependiente, aunque en cualquier caso la mayor inhibición la encontramos con 1000 μM. Acompañando estos resultados, la expresión génica también se vio inhibida para la IL-6 de forma progresiva y dosis dependiente sin que pareciese, en principio, alcanzar un efecto techo como con los niveles de proteína. El NaSH y el GYY4137 se utilizaron recientemente también en un modelo de macrófagos tratados con LPS en el cual se observó una disminución de los mediadores proinflamatorios IL-1β, IL-6 y *TNF-α* junto con un aumento de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 (143). La dosis máxima utilizada en este estudio fue de 500 μM, por lo que no es posible saber si, en el caso del GYY4137, también se hubiera presentado un efecto techo como el encontrado en nuestros estudios. En contraste, el NaSH mostró un efecto bifásico a concentraciones superiores a 200 μM, con las que se observó un aumento de esos mismos marcadores.

En general, la bibliografía consultada también encuentra un descenso en la IL-6 con la adición de H<sub>2</sub>S, cualquiera que sea el compuesto utilizado, tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, en la mayoría de los estudios utilizan una dosis única o bien encuentran que el efecto beneficioso se da a dosis μM bajas (171-177). Dos estudios han mostrado recientemente que el NaSH puede bloquear la expresión de IL-6 de manera transitoria, uno en sinoviocitos (177) y otro en la línea celular de condrocitos C-28/I2 (175). La IL-6 puede ejercer efectos tanto pro-inflamatorios como anti-inflamatorios (dado que por sí misma puede inducir la producción del inhibidor tisular de metaloproteasas) pero la inducción de IL-6 por IL-1β es necesaria para la inhibición de la síntesis de proteoglicanos provocada por la IL-1β en cartílago articular humano (178). Además la IL-6 es sinérgicamente responsable del aumento de *MMPs* inducido por IL-1 (179) y la IL-6 o su receptor son dianas terapéuticas en la OA (180). Por lo tanto, los compuestos

de H<sub>2</sub>S tal como se utilizaron en nuestro modelo pueden reducir la inflamación al regular la expresión génica de IL-6, resultando en menores concentraciones libres de la citoquina en las células.

Por otra parte, nuestros estudios sobre la ruta de la PGE<sub>2</sub> revelaron que el H<sub>2</sub>S es un potente inhibidor de su síntesis desde las dosis más bajas. La PGE<sub>2</sub> se ve fuertemente incrementada por la administración de IL-1 $\beta$  y, en el caso del GYY4137 todas las dosis son capaces de inhibir este aumento alcanzando un efecto techo con la concentración de 100  $\mu$ M. El caso del NaSH sigue exactamente el mismo patrón, con una excepción, y es que 1000  $\mu$ M parece ser la dosis donde empieza a ser menos efectiva, aunque, en cualquier caso, los niveles son inferiores a los inducidos por la IL-1 $\beta$ . También se vio una reducción en producción de PGE<sub>2</sub> en el estudio de macrófagos tratados con *LPS* (181), y también se dio en un estudio realizado con GYY4137 en sinoviocitos y condrocitos estimulados con *LPS* (88), donde además estaba acompañada de una disminución de COX-2, al igual que sucede en nuestros estudios. Concretamente nosotros observamos una reducción dosis-dependiente de COX-2 con ambos compuestos de sulfuro. COX-2 es la isoforma inducible de la ciclooxigenasa, activada por factores patológicos y la terapia actual para la OA utiliza fármacos inhibidores de esta enzima. Muchos de estos fármacos, sin embargo, presentan la desventaja de bloquear también la enzima fisiológica COX-1 (76), lo que no ocurre con el NaSH ni con el GYY4137, los cuales no sólo no inhiben esta enzima si no que parecen capaces de revertir parcialmente el efecto lesivo de la IL-1 $\beta$  sobre su expresión. Adicionalmente, nuestros resultados muestran una reducción en la expresión génica de *PTGES* al co-estimular los condrocitos con los compuestos de H<sub>2</sub>S. *PTGES* es considerada una enzima clave en la regulación de la PGE<sub>2</sub> en condrocitos OA estimulados por citoquinas proinflamatorias (182). Este estudio sugiere que la PG sintasa terminal que actúa después de COX-2 es importante para decidir qué PG se sintetiza y que la inducción de *PTGES* podría ser necesaria para que los condrocitos sintetizen una cantidad substancial de PGE<sub>2</sub> en respuesta a estímulos pro-inflamatorios. Por lo tanto, los compuestos de H<sub>2</sub>S pueden regular las dos enzimas más importantes implicadas en la producción de PGE<sub>2</sub> en condrocitos OA activados.

En resumen, a pesar de que son múltiples los estudios sobre el H<sub>2</sub>S en el proceso inflamatorio en diferentes patologías, tejidos y células, nuestros resultados sugieren que

concentraciones por debajo de 1000  $\mu\text{M}$  tienen un efecto anti-inflamatorio en condrocitos *OA* siendo capaces de inhibir la síntesis de IL-6 y de actuar sobre la cascada inflamatoria del ácido araquidónico inhibiendo la síntesis final de la  $\text{PGE}_2$ .

### 2.3. Visualización de la translocación de *NF $\kappa$ B* p65 por inmunofluorescencia

Como se mencionó anteriormente, el  $\text{H}_2\text{S}$  parece ejercer sus efectos a través de varios mecanismos de acción. Uno de estos mecanismos es la modulación o la activación de factores de transcripción. La ruta *NF $\kappa$ B* es uno de los candidatos más obvios para esta interacción. *NF $\kappa$ B* es un factor de transcripción de acción rápida, es decir, se encuentra en la célula en un estado inactivado y frente a un estímulo no necesita que se sintetice ninguna proteína nueva para provocar su activación. Por lo tanto, *NF $\kappa$ B* pertenece a la primera línea de acción frente a los estímulos perjudiciales para la célula. *NF $\kappa$ B* está directamente implicado en la activación de la cascada inflamatoria (183), la translocación de *NF $\kappa$ B* al núcleo celular activa la transcripción de genes tales como IL-6, COX-2 o *iNOS*, todos ellos, como hemos visto, implicados en la degradación del cartílago *OA*. Nuestros resultados al investigar la posible interacción de  $\text{H}_2\text{S}$  con la ruta *NF $\kappa$ B* se observó que los compuestos de sulfuro redujeron parcialmente la translocación de la subunidad p65 al núcleo celular tras su activación con IL-1 $\beta$ . Otros autores han encontrado resultados similares. Por ejemplo, GYY4137 también produjo una reducción de la activación de *NF $\kappa$ B* en sinoviocitos y condrocitos estimulados con *LPS* (88) pero también encontraron que GYY4137 no era eficaz para reducir la fosforilación o la degradación de *I $\kappa$ B $\alpha$*  inducida por citoquinas. Además, otros compuestos que también pueden liberar  $\text{H}_2\text{S}$ , como por ejemplo el sulfuro de dialilo (*diallyl sulfide*, *DAS*)

La inhibición de la unión de *NF $\kappa$ B* al ADN por GY4137 se ha observado en neutrófilos de rata aislados y en un modelo murino *in vivo* de shock endotóxico (184). También varios autores han encontrado una relación entre los efectos del  $\text{H}_2\text{S}$  y la ruta *NF $\kappa$ B* en macrófagos RAW264.7. Por ejemplo, GYY4137 inhibió la producción, inducida por *LPS*, de los marcadores pro-inflamatorios IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , NO y  $\text{PGE}_2$  a través de rutas dependientes de *NF $\kappa$ B*/*ATF-2*/*HSP-27* (*ATF*, *activating transcription factor*/ factor de transcripción activador; *HSP*, *heat-shock protein*/ proteína de choque térmico) (154) y en la referencia (74) se encontraron resultados similares.



Por lo tanto, aunque los resultados obtenidos son preliminares y haría falta completarlos con otros estudios, es probable que la interacción entre el H<sub>2</sub>S y la ruta *NFκB* esté implicada en los efectos anti-inflamatorios observados en nuestro modelo *in vitro*.

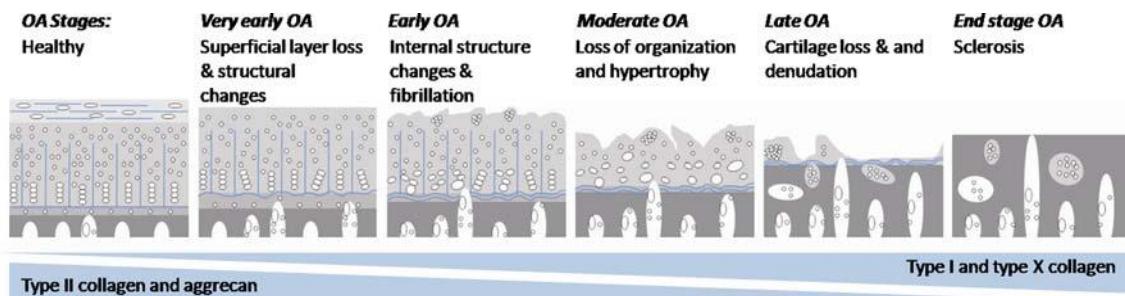
### **2.4. El sulfuro de hidrógeno y su efecto en el desequilibrio anabólico-catabólico en la artrosis.**

En el estudio del cartílago está bastante aceptada la teoría de que el fenotipo de los condrocitos puede cambiar según las condiciones fisiológicas o de estrés a las que estén sometidos (17). Esta teoría propone una serie de fenotipos:

- a. El fenotipo condroblástico, que expresa la forma fetal colágenos tipo II y III
- b. El fenotipo anabólico, que es capaz de sintetizar y regenerar la MEC sintetizando colágeno tipo II y proteoglicanos.
- c. El fenotipo catabólico, en el cual la expresión de enzimas proteolíticas está aumentada como respuesta a factores pro-inflamatorios como el *TNFα*, la IL-1β o el NO (185,186).
- d. El fenotipo hipertrófico, en el cual se expresa colágeno tipo X y que evoluciona hacia la apoptosis celular, concluyendo en la desestabilización del cartílago.
- e. El fenotipo desdiferenciado, en el cual expresan colágeno tipo I como forma de reparación y cicatrización del tejido dañado.

En condiciones normales, en los condrocitos articulares hay un equilibrio entre los fenotipos anabólico y catabólico, para conseguir el correcto mantenimiento del cartílago hialino. También hay evidencias de que el fenotipo individual de cada condrocito depende de la capa en la que se encuentre y de que existe una relación interdependiente entre la MEC y los condrocitos. Esto supone que los condrocitos necesitan de la MEC para ser “normales” y que la MEC no puede mantenerse si se pierden los condrocitos. Sin embargo, con el desarrollo de la OA, se produce una derivación hacia un predominio del fenotipo catabólico que puede terminar en presencia de hipertrofia y del fenotipo desdiferenciado, en un intento de reparar las lesiones en el tejido OA (187) ([Fig. 66](#)).





**Fig. 66: Desarrollo patológico de la OA. Cambios en la MEC y en el número y tipo de condrocitos (17).**

La patogénesis de la OA está causada, al menos en parte, por un desequilibrio entre la síntesis y la degradación en la matriz del cartílago. Las proteasas son las principales responsables de la degradación del cartílago y se ha demostrado que la predisposición catabólica comienza con un incremento de las agreganasas seguido de un aumento en las *MMPs* (188,189). En general, hay un consenso que apunta que, mientras que la degradación del agregano en la MEC es un proceso reversible, tras la inducción de las *MMPs* entramos en una fase irreversible en la que se produce la degradación del col II (190), y el único procedimiento de tratamiento sería aquel capaz de invertir el fenotipo catabólico del condrocito.

En nuestro estudio observamos una reducción dosis dependiente de la expresión génica de las *MMPs*, con ambos compuestos de sulfuro. Esto se correspondió también con una reducción en los niveles de proteína, evidenciado tanto en los resultados de las ICQ de las *MMPs* como, en el caso de la *MMP13*, del *ELISA*. Estos resultados se confirmaron también con los obtenidos en el estudio *in vitro* con cartílago. En él, las IHQ para *MMP13* y *MMP3* también mostraron un incremento importante con la estimulación con IL-1 $\beta$  y una reducción con la co-estimulación con los compuestos de sulfuro, sobre todo con la dosis mayor de GYY4137. Ésta consiguió preservar la matriz en un estado muy similar al basal. Y es más, para la *MMP3*, con 200  $\mu$ M GYY4137 fue suficiente.

La colagenasa 3 (*MMP13*) es la enzima más relevante en cuanto a la degradación de colágeno tipo II se refiere. Está regulada por el estrés en general – y la inflamación en particular – y por señales de la inducción a la diferenciación. Una revisión publicada recientemente (141) ha señalado a la *MMP13* como el gen clave en el que convergen algunos factores de las vías de señalización (quinasas c-Jun N-terminal (*JNK*) o p38 *MAPK*) y factores de transcripción (*NFkB*, factores inducidos por hipoxia, o el factor de transcripción 2 relacionado con runt (*Runx2*)) que participan en las diferentes etapas de

la OA. La mayoría de estos factores de regulación intervienen, directa o indirectamente, en la transcripción y activación de la *MMP13*. No hay, que tengamos conocimiento, ningún otro estudio que relacione el efecto del NaSH o el GYY4137 con la actividad de la *MMP13* en condrocitos OA humanos. Sin embargo, sí que hay varios estudios que observan un efecto parecido en condrocitos utilizando el *DAS*, un compuesto organosulfurado extraído del ajo (191-193). Por otro lado, un estudio sobre la remodelación del colágeno en la arteria pulmonar de ratas (194) y otro centrado en la remodelación cardiaca en el mismo modelo animal (195) también encontraron una estrecha relación entre el H<sub>2</sub>S y la *MMP13*. Por añadidura, en nuestros estudios también encontramos que este descenso de la *MMP13* se puede relacionar con un aumento en la síntesis de colágeno tipo II y agregano, comprobando que las mismas concentraciones que disminuyen la *MMP13* son las que hacen que estos aumenten en el tejido (IHQs). Además, en los estudios en células en los que se analizó la expresión de estos dos genes anabólicos, ACAN y COLII, también se observó una tendencia a mejorar la expresión génica de estas proteínas lo que podría ser un intento de revertir el fenotipo claramente catabólico de los condrocitos hacia un fenotipo más anabólico.

En cuanto a la *MMP3* está descrito que el NaSH (20 min, 1mM) es responsable de aumentar su expresión génica en sinoviocitos pero no así en condrocitos derivados de articulaciones con RA (196). La *MMP3*, o estromelina-1, es una enzima proteolítica que desempeña un papel importante como mediadora de la respuesta inflamatoria en la articulación. Degrada por sí misma las fibras de colágenos tipo III, IV, IX y X y participa en la activación de diferentes pro-*MMP*. Por otro lado, la *MMP1* (colagenasa 1) también es capaz de degradar el colágeno II, sin embargo, su actividad catalítica es cinco veces inferior a la de la *MMP13*. En nuestro estudio pudimos comprobar que solamente las dosis más altas de los compuestos de H<sub>2</sub>S fueron capaces de ejercer un efecto modesto en la inhibición de su expresión génica. También en el estudio realizado con *DAS* en condrocitos de conejo se encontraron resultados similares (191).

Por otro lado, también está descrito que el radical peroxinitrito es un activador de las *MMPs* y que el H<sub>2</sub>S actúa eliminándolo (153). El OONO<sup>-</sup> se da en situaciones *in vivo* por una combinación entre el radical O<sub>2</sub><sup>-</sup> y el NO, ambos aumentados en la OA (197-200). Como hemos visto en nuestros resultados, el H<sub>2</sub>S es capaz de reducir el exceso de NO y el GYY4137 reduce también de forma significativa la síntesis del O<sub>2</sub><sup>-</sup>, por lo que

además de ser un inhibidor directo de la *MMP13*, lo es también de forma indirecta de las *MMPs* en general.

De los experimentos realizados para cuantificar la pérdida de GAGs en los discos de cartílago se observó que para el tejido *OA*, y de manera menos pronunciada para el tejido *N*, la estimulación con *IL-1 $\beta$*  provocó un aumento de la concentración de GAGs en los sobrenadantes al cabo de 21 días. Se sabe que otro de los efectos de la *IL-1 $\beta$*  es la estimulación de la liberación de *ADAMTS* (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) 4 y 5 (201), a su vez responsables de la segmentación de proteoglicanos tales como el agregano o el versicano (202). Por lo que en nuestros discos además de la sobreproducción de *MMPs* que se observó en las *IHQs*, seguramente también hay un aumento de estas agrecanasas (*ADAMTS4* y *5*) que también contribuye al aumento de GAGs en los sobrenadantes. En las condiciones tratadas con  $H_2S$  vemos una menor pérdida de GAGs, por lo que estos compuestos parecen ser eficaces previniendo la degradación de la MEC y su liberación al sobrenadante. Por esto, aunque no tenemos evidencias directas, los resultados sugieren que los compuestos de sulfuro son capaces también de inhibir la liberación de las agrecanasas, o de proteger frente a sus efectos, resultando en la protección de los GAGs en el cartílago. Ambos compuestos parecen ser eficaces para esto.

Estos efectos también se observaron y se cuantificaron en las distintas tinciones de los componentes de la MEC realizadas en el tejido a los 21 días. Por ejemplo, las tinciones de S-O, junto con las *IHQ* de *KS* y *CH-S* por un lado, y la tinción de A-T por el otro, corroboran que los compuestos de sulfuro son eficaces para prevenir la pérdida de GAGs sulfatados y no sulfatados, respectivamente. También en la *IHQ* de agregano se observó como los compuestos de sulfuro preservan su presencia, frente a la depleción ocasionada por la *IL-1 $\beta$* . Estos efectos se observaron tanto en tejido *OA* como en tejido *N*, aunque las consecuencias de la estimulación con *IL-1 $\beta$*  fueron mucho más pronunciadas en el primer caso y por lo tanto los efectos beneficiosos del  $H_2S$  más apreciables y relevantes. Nos encontramos con una excepción, en el tejido *OA* en la tinción de S-O se observó que la co-estimulación con *IL-1 $\beta$*  y  $200 \mu M$  NaSH resultó perjudicial. En nuestra opinión, es un dato puntual que se rebate con el resto de resultados que apoyan la protección de los GAGs con  $200 \mu M$  NaSH y que lo contradicen.

Además de los efectos protectores del H<sub>2</sub>S frente a la inducción del fenotipo catabólico ocasionada por la IL-1 $\beta$  que acabamos de discutir, se observó también que este compuesto parecen inducir efectos pro-anabólicos. No hay hasta la fecha ninguna publicación de la que tengamos conocimiento que analice el efecto del H<sub>2</sub>S sobre el anabolismo celular en cartílago. Estrictamente hablando, en nuestro estudio no podemos diferenciar si el H<sub>2</sub>S está simplemente protegiendo la matriz de la degradación o bien está induciendo la síntesis de los GAGs por parte de los condrocitos. Sin embargo, el análisis de las tinciones y las IHQ de estos tejidos, centrado en las células y su región interterritorial, parecen sugerir que sucede lo segundo. Tanto al visualizar los GAGs mediante la tinción S-O, como los más representativos por separado (ácido hialurónico (AT), KS y CH-S), así como las IHQ de col II y agregano, podemos comprobar que, por norma general, en las condiciones con IL-1 $\beta$  se pierde la positividad en el interior de los condrocitos y en la región interterritorial. Mientras que cuando el tejido se estimuló también con NaSH o GYY4137, principalmente a las dosis más altas, se apreció una positividad intracondrocitaria e interterritorial. Estos resultados nos llevan a la conclusión de que los compuestos de H<sub>2</sub>S no sólo protegen al tejido frente a la acción catabólica potenciada por la IL-1 $\beta$ , si no que estimulan la síntesis de GAGs, agregano y colágeno tipo II en las células.

Otro dato destacable que nos aportan las tinciones histoquímicas es el aumento de la síntesis de hidratos de carbono en el tejido OA al cabo de 21 días de estimulación con IL-1 $\beta$ , algo que no se observa en el tejido N. Esto podría estar relacionado con un cambio de metabolismo de los condrocitos hacia un metabolismo lipídico, lo que se ha relacionado con el desarrollo de la OA (203,204). Este aumento de los hidratos de carbono desaparece totalmente en presencia de NaSH o GYY4137, por lo que estos compuestos podrían ayudar a prevenir este cambio fenotípico.

Otra cuestión en la que también habría que profundizar es el hecho de que en algunas de las tinciones e IHQs en el tejido N, se observó que la concentración de 1000  $\mu$ M de GYY4137 no resultó eficaz, e incluso en el caso de la IHQ de CH-S podría haber sido perjudicial. Esto se podría deber a que, dado que en el tejido N la concentración basal de H<sub>2</sub>S es más elevada, altas dosis exógenas podrían resultar, en algunos casos, perjudiciales. Sin embargo, de ser el caso, esto debería suceder con NaSH también, por

lo que de momento no tenemos una explicación clara de porqué ha sucedido esto en el tejido N.

En cuanto al contenido de colágeno, la tinción de tricrómico de Masson ha sido poco esclarecedora. En general, nuestros resultados a nivel histoquímico no reseñan apenas diferencias en el contenido de colágeno entre la condición basal, la estimulada con IL-1 $\beta$  o las condiciones con H<sub>2</sub>S. Sin embargo, en la IHQ de col II sí que se observó una pérdida importante de positividad debido a la IL-1 $\beta$  y una recuperación con ambos compuesto de sulfuro. Por lo tanto, en el peor de los casos estos compuestos son capaces de prevenir la pérdida de colágeno y preservar la síntesis en las células. En general, los estudios que relacionan el colágeno con el H<sub>2</sub>S son aquellos centrados en la fibrosis de los tejidos dañados, ya que el H<sub>2</sub>S es, aparentemente, un inhibidor de la fibrosis. Respecto a este aspecto, los datos publicados hasta la fecha sugieren que el H<sub>2</sub>S previene frente a la deposición de colágeno en los tejidos (205-207). Sin embargo, también sugieren que este efecto tiene más que ver con una inhibición general de las citoquinas pro-inflamatorias que provocan la fibrosis que con una acción directa sobre las fibras de colágeno ya formadas.

En general, por los datos que aportan nuestros estudios podemos afirmar que, como mínimo, el H<sub>2</sub>S es un buen protector frente a la degradación del cartílago y que además parece prevenir el cambio hacia el fenotipo catabólico en los condrocitos, mejorando su capacidad de síntesis de proteoglicanos y GAGs.



# CONCLUSIONES

---





- 1 El H<sub>2</sub>S está presente tanto en el suero como en el cartílago de todos los donantes, tanto sanos como con OA.
- 2 Existe una tendencia a que los niveles de H<sub>2</sub>S en suero de pacientes OA sean menores que los de donantes sanos. La concentración media de H<sub>2</sub>S en el suero de pacientes OA es de 56,48 μM y en donantes sanos de 72,18 μM.
- 3 La biosíntesis de H<sub>2</sub>S en el cartílago OA (0,10 μmoles/g) está reducida respecto a la del cartílago sano (0,42 μmoles/g).
- 4 Las enzimas CBS, CTH y MPST están presentes en cartílago, membrana sinovial y hueso subcondral. La enzima MPST está reducida en cartílago OA tanto a nivel de ARNm como de proteína, causando la reducción de H<sub>2</sub>S en la articulación OA.
- 5 El H<sub>2</sub>S exógeno tiene efectos antioxidantes sobre los condrocitos OA. Tanto NaSH como GYY4137 inhiben la expresión de *iNOS* y la síntesis de NO inducidas por IL-1β. En concentraciones superiores a 100 μM, GYY4137 es capaz de inhibir la producción del O<sub>2</sub><sup>-</sup> en condrocitos OA.
- 6 La administración exógena de H<sub>2</sub>S mediante NaSH y GYY4137 ejerce efectos anti-inflamatorios en condrocitos OA estimulados con IL-1β. El H<sub>2</sub>S inhibe la producción de ARNm y de proteína de IL-6, la síntesis de PGE<sub>2</sub> a través de la inhibición de la expresión génica de COX-2 y *PGTES*, no afectando a la expresión de COX-1.
- 7 Los efectos anti-inflamatorios del H<sub>2</sub>S exógeno parecen estar mediados por la ruta *NFκB*, aunque de momento las evidencias no son concluyentes.
- 8 El H<sub>2</sub>S administrado de forma exógena presenta un efecto anti-catabólico sobre condrocitos OA estimulados con IL-1β. Los compuestos de sulfuro son capaces de inhibir la expresión génica de *MMP13*, *MMP3* y *MMP1* el 75%, 40% y 20% respectivamente. La misma reducción se observa en los niveles de proteína de *MMP13*.
- 9 En el cartílago OA el H<sub>2</sub>S exógeno revierte el proceso de degradación de la matriz extracelular inducido por la IL-1β. NaSH y GYY4137 favorecen la síntesis de GAGS, de colágeno tipo II y de agregano, siendo más efectivos a las dosis más elevadas.
- 10 En el cartílago sano el H<sub>2</sub>S exógeno revierte el proceso de degradación de la MEC inducido por la IL-1β. Excepto la concentración más elevada de GYY4137 los compuestos de sulfuro tienen efectos beneficiosos sobre la MEC del cartílago N



# **BIBLIOGRAFÍA**

---



- (1) Woolf A, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ* 2003;81 (9):646-656.
- (2) López-Armada MJ, Blanco García FJ. Fisiopatología de la artrosis. In: E. Batlle-Gualda, P. Benito Ruiz, F.J. Blanco García, E. Martín Mola, editor. *Manual S.E.R de la artrosis*; 2002. p. 77.
- (3) H Kotlarz, CL Gunnarsson, H Fang, JA Rizzo. Insurer and out-of-pocket costs of osteoarthritis in the US: evidence from national survey data. *Arthritis Rheum* 2009;60 (12):3546.
- (4) Monfort Faure J, Benito-Ruiz P, Blanco garcia F, Tornero Molina J, Möller Parera I, Batlee-Gualda E. *Artrosis: Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento*. Madrid: Panamericana; 2010.
- (5) Espanha MM. Articular cartilage: structure and histochemical composition. *Acta Reumatologica Portuguesa* 2010;35 (4):424-433.
- (6) Sandell L, Heinegard D, Hering T. Cell biology, biochemistry, and molecular biology of articular cartilage in osteoarthritis. In: Moskowitz R, Altman R, Hochberg M, Buckwalter J, Goldberg V, editors. *Osteoarthritis - diagnosis and medical/surgical management* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 73.
- (7) Eyre DR, Weis MA, Wu J. Articular cartilage collagen: An irreplaceable framework? *European Cells & Materials* 2006;12:57-63.
- (8) Blanco García FJ, Fernández-Sueiro J. Artrosis: Concepto, clasificación y patogénesis. In: Pascual GR, Carbonell RV, editors. *Tratado de Reumatología* Madrid: Arán Ediciones S.A; 1998. p. 1609.
- (9) Julkunen P, Wilson W, Isaksson H, Jurvelin JS, Herzog W, Korhonen RK. A Review of the Combination of Experimental Measurements and Fibril-Reinforced Modeling for Investigation of Articular Cartilage and Chondrocyte Response to Loading. *Computational and Mathematical Methods in Medicine* 2013.
- (10) Mayan MD, Carpintero-Fernandez P, Gago-Fuentes R, Martinez-de-Irarduya O, Wang HZ, Valiunas V, Brink P, Blanco FJ. Human articular chondrocytes express multiple gap junction proteins: differential expression of connexins in normal and osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol*. 2013 Apr;182(4):1337-46.
- (11) Eyre D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Research* 2002;4 (1):30-35.
- (12) Wu JP, Kirk TB, Zheng MH. Study of the collagen structure in the superficial zone and physiological state of articular cartilage using a 3D confocal imaging technique. *Journal of orthopaedic surgery and research* 2008 Jul 17;3:29-29.
- (13) Drake RL, Vogl A, Mitchell AWM. *Gray Anatomía para estudiantes*. Madrid, España: Elsevier; 2010.

(14) Martel-Pelletier J, Pelletier JP. Is osteoarthritis a disease involving only cartilage or other articular tissues? *Eklemler Hastalik Cerrahisi* 2010 Apr;21 (1):2-14.

(15) Karsdal MA, Leeming DJ, Dam EB, Henriksen K, Alexandersen P, Pastoureau P, et al. Should subchondral bone turnover be targeted when treating osteoarthritis? *Osteoarthritis Cartilage* 2008 Jun;16 (6):638-646.

(16) Henrotin Y, Pesesse L, Sanchez C. Subchondral bone in osteoarthritis physiopathology: state-of-the art and perspectives. *Biomed Mater Eng* 2009;19 (4-5):311-316.

(17) Bay-Jensen AC, Hoegh-Madsen S, Dam E, Henriksen K, Sondergaard BC, Pastoureau P, et al. Which elements are involved in reversible and irreversible cartilage degradation in osteoarthritis? *Rheumatol Int* 2010 Feb;30 (4):435-442.

(18) Blanco FJ, Ruiz-Romero C. New targets for disease modifying osteoarthritis drugs: chondrogenesis and Runx1. *Ann Rheum Dis* 2013 May;72 (5):631-634.

(19) Attur M, Dave M, Akamatsu M, Katoh M, Amin A. Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine (vol 10, pg 1, 2002). *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:1.

(20) Lopez-Armada MJ, Vaamonde-Garcia C, Carames B, Lires-Dean M, Cillero-Pastor B, Blanco Garcia FJ. [Evidence of inflammatory mechanisms in osteoarthritis]. *Reumatologia clinica* 2007 Oct (Epub 2008 Nov 13);3 Suppl 3:S23-7.

(21) Glazer PA, Rosenwasser MP, Ratcliffe A. The effect of naproxen and interleukin-1 on proteoglycan catabolism and on neutral metalloproteinase activity in normal articular cartilage in vitro. *J Clin Pharmacol* 1993 Feb;33 (2):109-114.

(22) Verschure PJ, Van Noorden CJ. The effects of interleukin-1 on articular cartilage destruction as observed in arthritic diseases, and its therapeutic control. *Clin Exp Rheumatol* 1990 May-Jun;8 (3):303-313.

(23) Goldring MB, Birkhead J, Sandell LJ, Kimura T, Krane SM. Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes. *J Clin Invest* 1988 Dec;82 (6):2026-2037.

(24) Hubbard JR, Steinberg JJ, Bednar MS, Sledge CB. Effect of purified human interleukin-1 on cartilage degradation. *J Orthop Res* 1988;6 (2):180-187.

(25) Shinmei M, Kikuchi T, Masuda K, Shimomura Y. Effects of interleukin-1 and anti-inflammatory drugs on the degradation of human articular cartilage. *Drugs* 1988;35 Suppl 1:33-41.

(26) Inoue K, Masuko-Hongo K, Okamoto M, Nishioka K. Induction of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-3 (stromelysin) by interleukin-1 in human articular chondrocytes and synoviocytes. *Rheumatol Int* 2005 Dec;26 (2):93-98.

- (27) Stove J, Huch K, Gunther KP, Scharf HP. Interleukin-1beta induces different gene expression of stromelysin, aggrecan and tumor-necrosis-factor-stimulated gene 6 in human osteoarthritic chondrocytes in vitro. *Pathobiology* 2000 May-Jun;68 (3):144-149.
- (28) Zweers MC, de Boer TN, van Roon J, Bijlsma JWJ, Lafeber FPJG, Mastbergen SC. Celecoxib: considerations regarding its potential disease-modifying properties in osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2011 2011;13 (5):239.
- (29) Attur M, Dave M, Abramson SB, Amin A. Activation of diverse eicosanoid pathways in osteoarthritic cartilage: a lipidomic and genomic analysis. *Bulletin of the NYU hospital for joint diseases* 2012;70 (2):99-108.
- (30) Woessner JF,Jr, Gunja-Smith Z. Role of metalloproteinases in human osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl* 1991 Feb;27:99-101.
- (31) Monfort J, Tardif G, Reboul P, Mineau F, Roughley P, Pelletier J, et al. Degradation of small leucine-rich repeat proteoglycans by matrix metalloproteinase 13 - identification of a new biglycan cleavage site (vol 8, R26, 2012). *Arthritis Research & Therapy* 2013;15 (2):401.
- (32) Novo E, Parola M. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis & tissue repair* 2008 Oct 13;1 (1):5-5.
- (33) Costantino M. [Sulphur mud-bath treatment in osteoarthrosis: therapeutic activity and efficiency on the quality of life]. *Clin Ter* 2006 Nov-Dec;157 (6):525-9.
- (34) Cadenas E, Davies KJA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine* 2000;29 (3-4):222-230.
- (35) Mccord JM, Fridovic.i. Superoxide Dismutase an Enzymic Function for Erythrocuprein (Hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;244 (22):6049-&.
- (36) Cadenas E. Biochemistry of Oxygen-Toxicity. *Annu Rev Biochem* 1989;58:79-110.
- (37) Commoner B, Townsend J, Pake GE. Free Radicals in Biological Materials. *Nature* 1954 1954;174 (4432):689-691.
- (38) Harman D. The Aging Process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 1981;78 (11):7124-7128.
- (39) Cirino G, Distrutti E, Wallace JL. Nitric oxide and inflammation. *Inflammation & allergy drug targets* 2006-Apr;5 (2):115-9.
- (40) Blanco FJ, Lotz M. Il-1-Induced Nitric-Oxide Inhibits Chondrocyte Proliferation Via Pge2. *Exp Cell Res* 1995;218 (1):319-325.

- (41) Abramson SB, Attur M, Amin AR, Clancy R. Nitric oxide and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2001 Dec;3 (6):535-541.
- (42) Amin AR, Di Cesare PE, Vyas P, Attur M, Tzeng E, Billiar TR, et al. The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. *J Exp Med* 1995 Dec 1;182 (6):2097-2102.
- (43) Amin AR, Attur M, Patel RN, Thakker GD, Marshall PJ, Rediske J, et al. Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage. Influence of nitric oxide. *J Clin Invest* 1997 Mar 15;99 (6):1231-1237.
- (44) Fernandez-Moreno M, Rego I, Carreira-Garcia V, Blanco FJ. Genetics in Osteoarthritis. *Curr Genomics* 2008 Dec;9 (8):542-547.
- (45) Fan ZY, Yang HQ, Bau B, Soder S, Aigner T. Role of mitogen-activated protein kinases and NF kappa B on IL-1 beta-induced effects on collagen type II, MMP-1 and 13 mRNA expression in normal articular human chondrocytes. *Rheumatol Int* 2006;26 (10):900-903.
- (46) Senftleben U, Cao YX, Xiao GT, Greten FR, Krahn G, Bonizzi G, et al. Activation by IKK alpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 2001;293 (5534):1495-1499.
- (47) Hochberg MC. Osteoarthritis year 2012 in review: clinical. *Osteoarthritis Cartilage* 2012 Dec;20 (12):1465-1469.
- (48) Beauchamp R, Bus J, Popp J, Boreiko C, Jelkovich D. A Critical-Review of the Literature on Hydrogen-Sulfide Toxicity. *CRC Crit Rev Toxicol* 1984;13 (1):25-97.
- (49) Tansy MF, Kendall FM, Fantasia J, Landin WE, Oberly R, Sherman W. Acute and subchronic toxicity studies of rats exposed to vapors of methyl mercaptan and other reduced-sulfur compounds. *J Toxicol Environ Health* 1981 Jul-Aug;8 (1-2):71-88.
- (50) Poda GA. Hydrogen sulfide can be handled safely. *Arch Environ Health* 1966 Jun;12 (6):795-800.
- (51) Fiorucci S, Distrutti E, Cirino G, Wallace JL. The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. *Gastroenterology* 2006;131 (1):259-271.
- (52) Kamoun P. Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. *Amino Acids* 2004 Jun;26 (3):243-254.
- (53) Whiteman M, Winyard PG. Hydrogen sulfide and inflammation: the good, the bad, the ugly and the promising. *Expert review of clinical pharmacology* 2011-Jan;4 (1):13-32.
- (54) Kimura H, Shibuya N, Kimura Y. Hydrogen Sulfide Is a Signaling Molecule and a Cytoprotectant. *Antioxidants & Redox Signaling* 2012;17 (1):45-57.



(55) Wang R. Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *Faseb Journal* 2002;16 (13):1792-1798.

(56) Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *Journal of Neuroscience* 1996;16 (3):1066-1071.

(57) Olson KR. Hydrogen sulfide: both feet on the gas and none on the brake? *Front Physiol* 2013 Jan 25;4:2.

(58) Martelli A, Testai L, Breschi MC, Blandizzi C, Viridis A, Taddei S, et al. Hydrogen sulphide: novel opportunity for drug discovery. *Med Res Rev* 2012;32 (6):1093-1130.

(59) Szabo C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nature Reviews Drug Discovery* 2007;6 (11):917-935.

(60) Stipanuk MH, Beck PW. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J* 1982 Aug 15;206 (2):267-277.

(61) Kimura H. Hydrogen sulfide: its production and functions. *Exp Physiol* 2011 Sep 2011;96 (9):833-835.

(62) Zhao W, Ndisang JF, Wang R. Modulation of endogenous production of H<sub>2</sub>S in rat tissues. *Can J Physiol Pharmacol* 2003 Sep;81 (9):848-853.

(63) Iciek M, Wlodek L. Biosynthesis and biological properties of compounds containing highly reactive, reduced sulfane sulfur. *Pol J Pharmacol* 2001 May-Jun;53 (3):215-225.

(64) Zheng M, Zeng Q, Shi XQ, Zhao J, Tang CS, Sun NL, et al. Erythrocytic or serum hydrogen sulfide association with hypertension development in untreated essential hypertension. *Chin Med J (Engl)* 2011 Nov;124 (22):3693-3701.

(65) Olson KR. Is hydrogen sulfide a circulating "gasotransmitter" in vertebrate blood? *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 2009;1787 (7):856-863.

(66) Kimura Y, Kimura H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB J* 2004 Jul;18 (10):1165-1167.

(67) Kimura Y, Goto Y, Kimura H. Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxid Redox Signal* 2010 Jan;12 (1):1-13.

(68) Lu M, Hu LF, Hu G, Bian JS. Hydrogen sulfide protects astrocytes against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced neural injury via enhancing glutamate uptake. *Free Radic Biol Med* 2008 Dec 15;45 (12):1705-1713.

(69) Li G, Luo H, Li L, Zhang Q, Xie L, Jiang H, et al. Dual effects of hydrogen sulphide on focal cerebral ischaemic injury via modulation of oxidative stress-induced

apoptosis. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2012;39 (9):765-771.

(70) Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 Aug 28;237 (3):527-531.

(71) Zhao WM, Zhang J, Lu YJ, Wang R. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous K-ATP channel opener. *Embo J* 2001;20 (21):6008-6016.

(72) Mason J, Cardin CJ, Dennehy A. Role of Sulfide and Sulfide Oxidation in Copper Molybdenum Antagonism in Rats and Guinea-Pigs. *Res Vet Sci* 1978;24 (1):104-108.

(73) Mok YYP, Atan MSBM, Ping CY, Jing WZ, Bhatia M, Moochhala S, et al. Role of hydrogen sulphide in haemorrhagic shock in the rat: protective effect of inhibitors of hydrogen sulphide biosynthesis. *Br J Pharmacol* 2004;143 (7):881-889.

(74) Oh GS, Pae HO, Lee BS, Kim BN, Kim JM, Kim HR, et al. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappa B via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Free Radical Biology and Medicine* 2006;41 (1):106-119.

(75) C Szabó, L Kiss, E Pankotai. Cytoprotective and anti-inflammatory affects of hydrogen sulphide in macrophages and in mice. *Critical Care* 11 (Suppl. 2), 2007.

(76) Rivers JR, Badiei A, Bhatia M. Hydrogen sulfide as a therapeutic target for inflammation. *Expert Opin Ther Targets* 2012 Mar 27.

(77) Li L, Bhatia M, Zhu Y, Zhu, Y.C, Ramnath RD, et al. Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *Faseb Journal* 2005;Jul;19 ( 9)::1196.

(78) Tamizhselvi R, Moore PK, Bhatia M. Inhibition of hydrogen sulfide synthesis attenuates chemokine production and protects mice against acute pancreatitis and associated lung injury. *Pancreas* 2008 May;36 (4):e24-31.

(79) Bianca RddV, Coletta C, Mitidieri E, De Dominicis G, Rossi A, Sautebin L, et al. Hydrogen sulphide induces mouse paw oedema through activation of phospholipase A (2). *Br J Pharmacol* 2010;161 (8):1835-1842.

(80) Della Coletta Francescato H, Cunha FQ, Costa RS, Barbosa Junior F, Boim MA, Arnoni CP, et al. Inhibition of hydrogen sulphide formation reduces cisplatin-induced renal damage. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2011-Feb;26 (2):479-88.

(81) Jeong S, Pae H, Oh G, Jeong G, Lee B, Lee S, et al. Hydrogen sulfide potentiates interleukin-1 beta-induced nitric oxide production via enhancement of extracellular signal-regulated kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345 (3):938-944.

(82) Li T, Zhao B, Wang C, Wang H, Liu Z, Li W, et al. Regulatory effects of hydrogen sulfide on IL-6, IL-8 and IL-10 levels in the plasma and pulmonary tissue of rats with acute lung injury. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008 Sep;233 (9):1081-1087.

(83) Chen Y, Wu R, Geng B, Qi Y, Wang P, Yao W, et al. Endogenous hydrogen sulfide reduces airway inflammation and remodeling in a rat model of asthma. *Cytokine* 2009;45 (2):117-123.

(84) Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, Rizzo G, Mencarelli A, Orlandi S, et al. Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. *Gastroenterology* 2005;129 (4):1210-1224.

(85) Hirata I, Naito Y, Takagi T, Mizushima K, Suzuki T, Omatsu T, et al. Endogenous Hydrogen Sulfide Is an Anti-inflammatory Molecule in Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis in Mice. *Dig Dis Sci* 2011;56 (5):1379-1386.

(86) Whiteman M, Haigh R, Tarr JM, Gooding KM, Shore AC, Winyard PG. Detection of hydrogen sulfide in plasma and knee-joint synovial fluid from rheumatoid arthritis patients: relation to clinical and laboratory measures of inflammation. *Oxidative/nitrosative Stress and Disease* 2010;1203:146-150.

(87) Fox B, Schantz J, Haigh R, Wood ME, Moore PK, Viner N, et al. Inducible hydrogen sulfide synthesis in chondrocytes and mesenchymal progenitor cells: is H<sub>2</sub>S a novel cytoprotective mediator in the inflamed joint? *J Cell Mol Med* 2012;16 (4):896-910.

(88) Li L, Fox B, Keeble J, Salto-Tellez M, Winyard PG, Wood ME, et al. The complex effects of the slow-releasing hydrogen sulfide donor GYY4137 in a model of acute joint inflammation and in human cartilage cells. *J Cell Mol Med* 2013;17 (3):365-376.

(89) Gutenbrunner C, Bender T, Cantista P, Karagulle Z. A proposal for a worldwide definition of health resort medicine, balneology, medical hydrology and climatology. *Int J Biometeorol* 2010 Sep;54 (5):495-507.

(90) Benedetti S, Canino C, Tonti G, Medda V, Calcaterra P, Nappi G, et al. Biomarkers of oxidation, inflammation and cartilage degradation in osteoarthritis patients undergoing sulfur-based spa therapies. *Clin Biochem* 2010;43 (12):973-978.

(91) Kovacs C, Pecze M, Tihanyi A, Kovacs L, Balogh S, Bender T. The effect of sulphurous water in patients with osteoarthritis of hand. Double-blind, randomized, controlled follow-up study. *Clin Rheumatol* 2012;31 (10):1437-1442.

(92) Verhagen AP, Bierma-Zeinstra SMA, Boers M, Cardoso JR, Lambeck J, de Bie RA, et al. Balneoterapia para la osteoartritis. 2007.

(93) Karaguelle M, Karaguelle MZ, Karaguelle O, Doenmez A, Turan M. A 10-day course of SPA therapy is beneficial for people with severe knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol* 2007;26 (12):2063-2071.

- (94) Cantarini L, Leo G, Giannitti C, Cevenini G, Barberini P, Fioravanti A. Therapeutic effect of spa therapy and short wave therapy in knee osteoarthritis: a randomized, single blind, controlled trial. *Rheumatol Int* 2007;27 (6):523-529.
- (95) Sukenik S, Flusser D, Codish S, Abu-Shakra M. Balneotherapy at the Dead Sea area for knee osteoarthritis. *Israel Medical Association Journal* 1999;1 (2):83-85.
- (96) Mourelle M, Meijide R, Freire A, Maraver F, Carretero M. Técnicas hidrotermales y estética del bienestar. Paraninfo S.A ed. Madrid: Paraninfo; 2008.
- (97) Alp A, Yurtkuran M, IICol YO. Effects of balneotherapy on serum interleukin-2 receptors, inflammation markers and cortisol levels in knee osteoarthritis. *Physikalische Medizin Rehabilitationsmedizin Kurortmedizin* 2007;17 (4):215-219.
- (98) Bagnato G, De Filippis LG, Morgante S, Morgante ML, Farina G, Caliri A, et al. Clinical improvement and serum amino acid levels after mud-bath therapy. *Int J Clin Pharmacol Res* 2004;24 (2-3):39-47.
- (99) Balint GP, Buchanan WW, Adam A, Ratko I, Poor L, Balint PV, et al. The effect of the thermal mineral water of Nagybaracska on patients with knee joint osteoarthritis - a double blind study. *Clin Rheumatol* 2007 Jun;26 (6):890-894.
- (100) Bellometti S, Gallotti C, Pacileo G, Rota A, Tenconi MT. Evaluation of outcomes in SPA-treated osteoarthrotic patients. *Journal of preventive medicine and hygiene* 2007-Mar;48 (1):1-4.
- (101) Fioravanti A, Collodel G, Petraglia A, Nerucci F, Moretti E, Galeazzi M. Effect of hydrostatic pressure of various magnitudes on osteoarthrotic chondrocytes exposed to IL-1 beta. *Indian J Med Res* 2010;132 (2):209-217.
- (102) Verhagen A, Bierma-Zeinstra S, Lambeck J, Cardoso JR, de Bie R, Boers M, et al. Balneotherapy for osteoarthritis. A cochrane review. *J Rheumatol* 2008;35 (6):1118-1123.
- (103) Costantino M, Giuberti G, Caraglia M, Lombardi A, Misso G, Abbruzzese A, et al. Possible antioxidant role of SPA therapy with chlorine-sulphur-bicarbonate mineral water. *Amino Acids* 2009;36 (2):161-165.
- (104) Benedetti S, Benvenuti F, Nappi G, Fortunati NA, Marino L, Aureli T, et al. Antioxidative effects of sulfurous mineral water: protection against lipid and protein oxidation. *Eur J Clin Nutr* 2009;63 (1):106-112.
- (105) Nelson L, Fairclough J, Archer CW. Use of stem cells in the biological repair of articular cartilage. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2010;10 (1):43-55.
- (106) Caliendo G, Cirino G, Santagada V, Wallace JL. Synthesis and Biological Effects of Hydrogen Sulfide (H<sub>2</sub>S): Development of H<sub>2</sub>S-Releasing Drugs as Pharmaceuticals. *J Med Chem* 2010;53 (17):6275-6286.

- (107) Hegde A, Bhatia M. Hydrogen sulfide in inflammation: friend or foe? *Inflammation & allergy drug targets* 2011-Apr;10 (2):118-22.
- (108) Collin M, Thiernemann C. Hydrogen sulfide and sulfite: Novel mediators in the pathophysiology of shock and inflammation. *Shock* 2005;24 (6):595-596.
- (109) Wallace JL, Ferraz JGP, Muscara MN. Hydrogen Sulfide: An Endogenous Mediator of Resolution of Inflammation and Injury. *Antioxidants & Redox Signaling* 2012;17 (1):58-67.
- (110) Claassen H, Schicht M, Brandt J, Reuse K, Schadlich R, Goldring MB, et al. C-28/I2 and T/C-28a2 chondrocytes as well as human primary articular chondrocytes express sex hormone and insulin receptors--Useful cells in study of cartilage metabolism. *Ann Anat* 2011 Feb 20;193 (1):23-29.
- (111) Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002 Jun 18;3 (7).
- (112) Lee Predmore B, Joseph Lefer D, Gojon G. Hydrogen Sulfide in Biochemistry and Medicine. *Antioxidants & Redox Signaling* 2012;17 (1):119-140.
- (113) Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* 1995 Jan;146 (1):75-85.
- (114) Whiteman M, Moore PK. Hydrogen sulfide and the vasculature: a novel vasculoprotective entity and regulator of nitric oxide bioavailability? *J Cell Mol Med* 2009 Mar;13 (3):488-507.
- (115) Chunyu Z, Junbao D, Dingfang B, Hui Y, Xiuying T, Chaoshu T. The regulatory effect of hydrogen sulfide on hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 Mar 21;302 (4):810-816.
- (116) Furne J, Saeed A, Levitt MD. Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008 Nov;295 (5):R1479-85.
- (117) Ubuka T. Assay methods and biological roles of labile sulfur in animal tissues. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002 Dec 5;781 (1-2):227-249.
- (118) Olson KR, DeLeon ER, Liu F. Controversies and conundrums in hydrogen sulfide biology. *Nitric Oxide* 2014 Sep 15;41C:11-26.
- (119) Yadav PK, Yamada K, Chiku T, Koutmos M, Banerjee R. Structure and kinetic analysis of H<sub>2</sub>S production by human mercaptopyruvate sulfurtransferase. *J Biol Chem* 2013 Jul 5;288 (27):20002-20013.
- (120) Maneiro E, Martin MA, de Andres MC, Lopez-Armada MJ, Fernandez-Sueiro JL, del Hoyo P, et al. Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2003 Mar;48 (3):700-708.

(121) Rego-Perez I, Fernandez-Moreno M, Fernandez-Lopez C, Arenas J, Blanco FJ. Mitochondrial DNA haplogroups: role in the prevalence and severity of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2008 Aug;58 (8):2387-2396.

(122) Blanco FJ, Lopez-Armada MJ, Maneiro E. Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis. *Mitochondrion* 2004 Sep;4 (5-6):715-728.

(123) Vaamonde-Garcia C, Riveiro-Naveira RR, Valcarcel-Ares MN, Hermida-Carballo L, Blanco FJ, Lopez-Armada MJ. Mitochondrial dysfunction increases inflammatory responsiveness to cytokines in normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2012 Sep;64 (9):2927-2936.

(124) Cillero-Pastor B, Rego-Perez I, Oreiro N, Fernandez-Lopez C, Blanco FJ. Mitochondrial respiratory chain dysfunction modulates metalloproteases -1, -3 and -13 in human normal chondrocytes in culture. *BMC Musculoskelet Disord* 2013 Aug 9;14:235-2474-14-235.

(125) Blanco FJ, Rego I, Ruiz-Romero C. The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011 Mar;7 (3):161-169.

(126) Valcarcel-Ares MN, Riveiro-Naveira RR, Vaamonde-Garcia C, Loureiro J, Hermida-Carballo L, Blanco FJ, et al. Mitochondrial dysfunction promotes and aggravates the inflammatory response in normal human synoviocytes. *Rheumatology (Oxford)* 2014 Jul;53 (7):1332-1343.

(127) Sen U, Basu P, Abe OA, Givvimani S, Tyagi N, Metreveli N, et al. Hydrogen sulfide ameliorates hyperhomocysteinemia-associated chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009 Aug;297 (2):F410-9.

(128) Zhao X, Zhang LK, Zhang CY, Zeng XJ, Yan H, Jin HF, et al. Regulatory effect of hydrogen sulfide on vascular collagen content in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2008 Aug;31 (8):1619-1630.

(129) Yusuf M, Kwong Huat BT, Hsu A, Whiteman M, Bhatia M, Moore PK. Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with enhanced tissue hydrogen sulfide biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 Aug 12;333 (4):1146-1152.

(130) Brancaleone V, Roviezzo F, Vellecco V, De Gruttola L, Bucci M, Cirino G. Biosynthesis of H<sub>2</sub>S is impaired in non-obese diabetic (NOD) mice. *Br J Pharmacol* 2008 Nov;155 (5):673-680.

(131) Tang XQ, Yang CT, Chen J, Yin WL, Tian SW, Hu B, et al. Effect of hydrogen sulphide on beta-amyloid-induced damage in PC12 cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008 Feb;35 (2):180-186.

(132) Hu LF, Lu M, Tiong CX, Dawe GS, Hu G, Bian JS. Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on Parkinson's disease rat models. *Aging Cell* 2010 Apr;9 (2):135-146.



(133) Chen L, Ingrid S, Ding YG, Liu Y, Qi JG, Tang CS, et al. Imbalance of endogenous homocysteine and hydrogen sulfide metabolic pathway in essential hypertensive children. *Chin Med J (Engl)* 2007 Mar 5;120 (5):389-393.

(134) Whiteman M, Gooding KM, Whatmore JL, Ball CI, Mawson D, Skinner K, et al. Adiposity is a major determinant of plasma levels of the novel vasodilator hydrogen sulphide. *Diabetologia* 2010 Aug;53 (8):1722-1726.

(135) Liu XQ, Liu XQ, Jiang P, Huang H, Yan Y. Plasma levels of endogenous hydrogen sulfide and homocysteine in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia and the significance thereof. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2008 Aug 19;88 (32):2246-2249.

(136) Chen YH, Yao WZ, Geng B, Ding YL, Lu M, Zhao MW, et al. Endogenous hydrogen sulfide in patients with COPD. *Chest* 2005 Nov;128 (5):3205-3211.

(137) Tamizhselvi R, Moore PK, Bhatia M. Hydrogen sulfide acts as a mediator of inflammation in acute pancreatitis: in vitro studies using isolated mouse pancreatic acinar cells. *J Cell Mol Med* 2007 Mar-Apr;11 (2):315-326.

(138) Lopez-Armada MJ, Carames B, Lires-Dean M, Cillero-Pastor B, Ruiz-Romero C, Galdo F, et al. Cytokines, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta, differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* 2006;14 (7):660-669.

(139) Jeffrey JE, Aspden RM. Cyclooxygenase inhibition lowers prostaglandin E2 release from articular cartilage and reduces apoptosis but not proteoglycan degradation following an impact load in vitro. *Arthritis Res Ther* 2007;9 (6):R129.

(140) Kobayashi M, Squires GR, Mousa A, Tanzer M, Zukor DJ, Antoniou J, et al. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 2005 Jan;52 (1):128-135.

(141) Goldring MB, Otero M, Plumb DA, Dragomir C, Favero M, El Hachem K, et al. Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *Eur Cell Mater* 2011 Feb 24;21:202-220.

(142) Li L, Whiteman M, Guan YY, Neo KL, Cheng Y, Lee SW, et al. Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide - Releasing molecule (GYY4137): New insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation* 2008;117 (18):2351-2360.

(143) Whiteman M, Li L, Rose P, Tan C, Parkinson DB, Moore PK. The Effect of Hydrogen Sulfide Donors on Lipopolysaccharide-Induced Formation of Inflammatory Mediators in Macrophages. *Antioxidants & Redox Signaling* 2010;12 (10):1147-1154.

(144) Sun WH, Liu F, Chen Y, Zhu YC. Hydrogen sulfide decreases the levels of ROS by inhibiting mitochondrial complex IV and increasing SOD activities in

cardiomyocytes under ischemia/reperfusion. *Biochem Biophys Res Commun* 2012 May 4;421 (2):164-169.

(145) Tyagi N, Moshal KS, Sen U, Vacek TP, Kumar M, Hughes WM, Jr, et al. H<sub>2</sub>S protects against methionine-induced oxidative stress in brain endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* 2009 Jan;11 (1):25-33.

(146) Baskar R, Li L, Moore PK. Hydrogen sulfide-induces DNA damage and changes in apoptotic gene expression in human lung fibroblast cells. *Faseb J* 2007 Jan;21 (1):247-255.

(147) Sodha NR, Clements RT, Feng J, Liu Y, Bianchi C, Horvath EM, et al. The effects of therapeutic sulfide on myocardial apoptosis in response to ischemia-reperfusion injury. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008 May;33 (5):906-913.

(148) Rinaldi L, Gobbi G, Pambianco M, Micheloni C, Mirandola P, Vitale M. Hydrogen sulfide prevents apoptosis of human PMN via inhibition of p38 and caspase 3. *Lab Invest* 2006 Apr;86 (4):391-397.

(149) Xu ZS, Wang XY, Xiao DM, Hu LF, Lu M, Wu ZY, et al. Hydrogen sulfide protects MC3T3-E1 osteoblastic cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage-implications for the treatment of osteoporosis. *Free Radic Biol Med* 2011 May 15;50 (10):1314-1323.

(150) Whiteman M, Li L, Kostetski I, Chu SH, Siau JL, Bhatia M, et al. Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 Apr 28;343 (1):303-310.

(151) Mitsuhashi H, Yamashita S, Ikeuchi H, Kuroiwa T, Kaneko Y, Hiromura K, et al. Oxidative stress-dependent conversion of hydrogen sulfide to sulfite by activated neutrophils. *Shock* 2005 Dec 2005;24 (6):529-534.

(152) Geng B, Chang L, Pan C, Qi Y, Zhao J, Pang Y, et al. Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 Jun 4;318 (3):756-763.

(153) Whiteman M, Armstrong JS, Chu SH, Jia-Ling S, Wong BS, Cheung NS, et al. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'? *J Neurochem* 2004 Aug; 90 (3):765-768.

(154) Whiteman M, Cheung NS, Zhu YZ, Chu SH, Siau JL, Wong BS, et al. Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain? *Biochem Biophys Res Commun* 2005 Jan 28;326 (4):794-798.

(155) Anuar F, Whiteman M, Siau JL, Kwong SE, Bhatia M, Moore PK. Nitric oxide-releasing flurbiprofen reduces formation of proinflammatory hydrogen sulfide in lipopolysaccharide-treated rat. *Br J Pharmacol* 2006 Apr;147 (8):966-974.



- (156) Taoka S, Banerjee R. Characterization of NO binding to human cystathionine beta-synthase: possible implications of the effects of CO and NO binding to the human enzyme. *J Inorg Biochem* 2001 Dec 15; 87 (4):245-251.
- (157) Zhao WM, Wang R. H<sub>2</sub>S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2002; 283 (2):H474-H480.
- (158) Kubo S, Doe I, Kurokawa Y, Nishikawa H, Kawabata A. Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: contribution to dual modulation of vascular tension. *Toxicology* 2007 Mar 22; 232 (1-2):138-146.
- (159) Grossi L. Hydrogen sulfide induces nitric oxide release from nitrite. *Bioorg Med Chem Lett* 2009 Nov 1;19 (21):6092-6094.
- (160) Bertova A, Cacanyiova S, Kristek F, Krizanova O, Ondrias K, Tomaskova Z. The hypothesis of the main role of H<sub>2</sub>S in coupled sulphide-nitroso signalling pathway. *Gen Physiol Biophys* 2010 Dec;29 (4):402-410.
- (161) Yang C, Yang Z, Zhang M, Dong Q, Wang X, Lan A, et al. Hydrogen Sulfide Protects against Chemical Hypoxia-Induced Cytotoxicity and Inflammation in HaCaT Cells through Inhibition of ROS/NF-kappa B/COX-2 Pathway. *Plos One* 2011 Jul 14 2011;6 (7):e21971.
- (162) Morel A, Malinowska J, Olas B. Antioxidative properties of hydrogen sulfide may involve in its antiadhesive action on blood platelets. *Clin Biochem* 2012 Dec;45 (18):1678-1682.
- (163) Eghbal MA, Pennefather PS, O'Brien PJ. H<sub>2</sub>S cytotoxicity mechanism involves reactive oxygen species formation and mitochondrial depolarisation. *Toxicology* 2004 Oct 15; 203 (1-3):69-76.
- (164) Enzymology of hydrogen sulfide turnover. In: H. Kimura, editor. *Hydrogen Sulfide and its Therapeutic Applications*; 2013.
- (165) Kabil O, Motl N, Banerjee R. H<sub>2</sub>S and its role in redox signaling. *Biochim Biophys Acta* 2014 Aug;1844 (8):1355-1366.
- (166) Li L, Bhatia M, Zhu YZ, Zhu YC, Ramnath RD, Wang ZJ, et al. Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *Faseb Journal* 2005; 19 (6):1196-+.
- (167) Zhi L, Ang AD, Zhang H, Moore PK, Bhatia M. Hydrogen sulfide induces the synthesis of proinflammatory cytokines in human monocyte cell line U937 via the ERK-NF-kappaB pathway. *J Leukoc Biol* 2007 May; 81 (5):1322-1332.
- (168) Lee AT, Shah JJ, Li L, Cheng Y, Moore PK, Khanna S. A nociceptive-intensity-dependent role for hydrogen sulphide in the formalin model of persistent inflammatory pain. *Neuroscience* 2008 Mar 3; 152 (1):89-96.

(169) Cunha TM, Dal-Secco D, Verri WA, Jr, Guerrero AT, Souza GR, Vieira SM, et al. Dual role of hydrogen sulfide in mechanical inflammatory hypernociception. *Eur J Pharmacol* 2008 Aug 20; 590 (1-3):127-135.

(170) Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, Rizzo G, Mencarelli A, Orlandi S, et al. Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. *Gastroenterology* 2005; 129 (4):1210-1224.

(171) Sieghart D, Kiener H, Steiner G, Kloesch B. P46 Hydrogen sulfide inhibits IL-1beta stimulation of fibroblast-like synoviocytes from osteoarthritis patients in a 3-D model. *Nitric Oxide* 2013 Sep 1; 31 Suppl 2:S55.

(172) Cheng P, Wang F, Chen K, Shen M, Dai W, Xu L, et al. Hydrogen sulfide ameliorates ischemia/reperfusion-induced hepatitis by inhibiting apoptosis and autophagy pathways. *Mediators Inflamm* 2014:935251.

(173) Kloesch B, Liszt M, Broell J. H<sub>2</sub>S blocks activation of NF-kBp65 in the human chondrocyte cell line C28/I-2. *Inflammation Res* 2010;59: S23-S23.

(174) Kloesch B, Liszt M, Krehan D, Broell J, Kiener H, Steiner G. High concentrations of hydrogen sulphide elevate the expression of a series of pro-inflammatory genes in fibroblast-like synoviocytes derived from rheumatoid and osteoarthritis patients. *Immunol Lett* 2012; 141 (2):197-203.

(175) Kloesch B, Liszt M, Steiner G, Broell J. Inhibitors of p38 and ERK1/2 MAPkinase and hydrogen sulphide block constitutive and IL-1 beta-induced IL-6 and IL-8 expression in the human chondrocyte cell line C-28/I2. *Rheumatol Int* 2012;32 (3):729-736.

(176) Loebisch S, Becker T, Steiner G, Kloesch B. P29 Bivalent effects of hydrogen sulfide on IL-6 and IL-1beta expression in the human monocyte cell line U937. *Nitric Oxide* 2013 Sep 1; 31 Suppl 2:S47-8.

(177) Kloesch B, Liszt M, Broell J. H<sub>2</sub>S transiently blocks IL-6 expression in rheumatoid arthritic fibroblast-like synoviocytes and deactivates p44/42 mitogen-activated protein kinase. *Cell Biol Int* 2010; 34 (5):477-484.

(178) Nietfeld JJ, Wilbrink B, Helle M, van Roy JL, den Otter W, Swaak AJ, et al. Interleukin-1-induced interleukin-6 is required for the inhibition of proteoglycan synthesis by interleukin-1 in human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 1990 Nov; 33 (11):1695-1701.

(179) Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 2002; 39 (1-2):237-246.

(180) Nakahara H, Nishimoto N. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy in rheumatic diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2006 Dec; 6 (4):373-381.

- (181) Li L, Bhatia M, Zhu YZ, Zhu YC, Ramnath RD, Wang ZJ, et al. Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *Faseb Journal* 2005; 19 (6):1196-+.
- (182) Kojima F, Naraba H, Miyamoto S, Beppu M, Aoki H, Kawai S. Membrane-associated prostaglandin E synthase-1 is upregulated by proinflammatory cytokines in chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2004;6 (4):R355-65.
- (183) Simmonds RE, Foxwell BM. Signalling, inflammation and arthritis: NF-kappaB and its relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)* 2008 May;47 (5):584-590.
- (184) Li L, Salto-Tellez M, Tan C, Whiteman M, Moore PK. GYY4137, a novel hydrogen sulfide-releasing molecule, protects against endotoxic shock in the rat. *Free Radical Biology and Medicine* 2009;47 (1):103-113.
- (185) Aigner T, Kurz B, Fukui N, Sandell L. Roles of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2002 Sep;14 (5):578-584.
- (186) Goldring MB. Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006 Oct;20 (5):1003-1025.
- (187) Reimann I, Mankin HJ, Trahan C. Quantitative histologic analyses of articular cartilage and subchondral bone from osteoarthritic and normal human hips. *Acta Orthop Scand* 1977 May;48 (1):63-73.
- (188) Sondergaard BC, Henriksen K, Wulf H, Oestergaard S, Schurigt U, Brauer R, et al. Relative contribution of matrix metalloprotease and cysteine protease activities to cytokine-stimulated articular cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 2006 Aug; 14 (8):738-748.
- (189) Karsdal MA, Sumer EU, Wulf H, Madsen SH, Christiansen C, Fosang AJ, et al. Induction of increased cAMP levels in articular chondrocytes blocks matrix metalloproteinase-mediated cartilage degradation, but not aggrecanase-mediated cartilage degradation. *Arthritis Rheum* 2007 May; 56 (5):1549-1558.
- (190) van Meurs JB, van Lent PL, Holthuysen AE, Singer II, Bayne EK, van den Berg WB. Kinetics of aggrecanase- and metalloproteinase-induced neopeptides in various stages of cartilage destruction in murine arthritis. *Arthritis Rheum* 1999 Jun; 42 (6):1128-1139.
- (191) Chen WP, Tang JL, Bao JP, Hu PF, Yu C, Shi ZL, et al. Effects of diallyl sulphide in chondrocyte and cartilage in experimental osteoarthritis in rabbit. *Phytother Res* 2011 Mar;25 (3):351-356.
- (192) Lee H-, Lee C-, Tsai H-, Salter DM. Inhibition of cyclooxygenase 2 expression by diallyl sulfide on joint inflammation induced by urate crystal and IL-1 beta. *Osteoarthritis and Cartilage* 2009;17 (1):91-99.

- (193) Williams FM, Skinner J, Spector TD, Cassidy A, Clark IM, Davidson RM, et al. Dietary garlic and hip osteoarthritis: evidence of a protective effect and putative mechanism of action. *BMC Musculoskelet Disord* 2010 Dec 8;11:280-2474-11-280.
- (194) Li X, Jin H, Bin G, Wang L, Tang C, Du J. Endogenous hydrogen sulfide regulates pulmonary artery collagen remodeling in rats with high pulmonary blood flow. *Exp Biol Med (Maywood)* 2009 May;234 (5):504-512.
- (195) Zhang CY, Li XH, Zhang T, Fu J, Cui XD. Hydrogen sulfide suppresses the expression of MMP-8, MMP-13, and TIMP-1 in left ventricles of rats with cardiac volume overload. *Acta Pharmacol Sin* 2013 Oct; 34 (10):1301-1309.
- (196) Kloesch B, Liszt M, Krehan D, Broell J, Kiener H, Steiner G. High concentrations of hydrogen sulphide elevate the expression of a series of pro-inflammatory genes in fibroblast-like synoviocytes derived from rheumatoid and osteoarthritis patients. *Immunol Lett* 2012 Jan 30;141 (2):197-203.
- (197) Gavriilidis C, Miwa S, von Zglinicki T, Taylor RW, Young DA. Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis is associated with down-regulation of superoxide dismutase 2. *Arthritis Rheum* 2013 Feb; 65 (2):378-387.
- (198) Tanaka S, Hamanishi C, Kikuchi H, Fukuda K. Factors related to degradation of articular cartilage in osteoarthritis: a review. *Semin Arthritis Rheum* 1998 Jun;27 (6):392-399.
- (199) Feelisch M. The chemical biology of nitric oxide--an outsider's reflections about its role in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2008; 16 Suppl 2:S3-S13.
- (200) Scher JU, Pillinger MH, Abramson SB. Nitric oxide synthases and osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2007 Apr; 9 (1):9-15.
- (201) Tortorella MD, Malfait AM, Deccico C, Arner E. The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 2001 Aug; 9 (6):539-552.
- (202) Arner EC. Aggrecanase-mediated cartilage degradation. *Curr Opin Pharmacol* 2002 Jun; 2 (3):322-329.
- (203) Gkretsi V, Simopoulou T, Tsezou A. Lipid metabolism and osteoarthritis: lessons from atherosclerosis. *Prog Lipid Res* 2011 Apr; 50 (2):133-140.
- (204) Zhuo Q, Yang W, Chen J, Wang Y. Metabolic syndrome meets osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2012 Dec; 8 (12):729-737.
- (205) Huang J, Wang D, Zheng J, Huang X, Jin H. Hydrogen sulfide attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis induced by abdominal aortic coarctation in rats. *Mol Med Rep* 2012 Apr; 5 (4):923-928.

(206) Tan G, Pan S, Li J, Dong X, Kang K, Zhao M, et al. Hydrogen sulfide attenuates carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity, liver cirrhosis and portal hypertension in rats. PLoS One 2011;6 (10):e25943.

(207) Sen U, Munjal C, Qipshidze N, Abe O, Gargoum R, Tyagi SC. Hydrogen sulfide regulates homocysteine-mediated glomerulosclerosis. Am J Nephrol 2010; 31 (5):442-455.



# **PRODUCCIÓN CIENTÍFICA**

---





## **1. ARTÍCULOS**

---

1. E.F. Burguera, A. Vela-Anero, R. Mejjide-Faílde, F.J. Blanco. Effect of hydrogen sulfide sources on inflammation and catabolic markers on interleukin 1 $\beta$ -stimulated human articular chondrocytes. *Osteoarthritis & Cartilage* 22(7), 1026-35, 2014.

### ***En preparación:***

1. E.F. Burguera, A. Vela-Anero, C. Ruiz Romero, R Mejjide-Faílde, F.J. Blanco. Hydrogen sulfide and inflammatory joint diseases.

2. E.F. Burguera, A. Vela-Anero, L. Gato-Calvo, R. Mejjide-Faílde<sup>3</sup>, F.J. Blanco. Hydrogen sulfide biosynthesis is impaired in the osteoarthritic joint.

## **2. CAPÍTULOS DE LIBRO**

---

1. Aplicación a pacientes: peloterapia en enfermedades reumáticas. Mejjide-Faílde R, Vela Anero Á, Muñños E, Burguera EF en Hernández Torres A. et al. “Peloterapia: Aplicaciones médicas y cosméticas de fangos termales”. Fundación para la investigación e Innovación en Hidrología Médica y Balneoterapia “Bilbilis”. Mayo 2014, cap 12, pp: 155-168. ISBN: 978-84-616-8551-6.

2. Aplicación a pacientes: Peloterapia en patologías dermatológicas. Mejjide-Faílde R, Mourelle Mosqueira ML, Vela Anero Á, Muñños López E, Burguera EF, Gómez Pérez CP en Hernández Torres A. et al. “Peloterapia: Aplicaciones médicas y cosméticas de fangos termales”. Fundación para la investigación e Innovación en Hidrología Médica y Balneoterapia “Bilbilis”. Mayo 2014, cap 13, pp: 169-183. ISBN: 978-84-616-8551-6.

## **3. PROCEEDINGS DE CONFERENCIAS:**

---

1. A.Vela-Anero, E.F. Burguera, L. Gato-Calvo, R. Mejjide-Faílde, F.J. Blanco. Hydrogen sulfide donors reduce IL1 $\beta$  induced catabolism in human articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 22, S634-635, 2014.

2. E.F. Burguera, A.Vela Anero, R. Mejjide Faílde, F.J. Blanco. Exogenous Hydrogen Sulfide Donors Show Anti-catabolic and Anti-inflammatory Properties but

Limited Anti-oxidant Capability on Human Articular Osteoarthritic Chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism*, Vol. 65(10), Supp., 2013.

3. E.F. Burguera, A.Vela-Anero, R. Mejjide-Failde, F.J. Blanco. Hydrogen sulfide donors alleviate IL-1 $\beta$  induced inflammation-like effects in human articular osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, Vol. 21, Supp., S241, 2013. ISSN 1063-4584

4. Vela Anero, E.F. Burguera, R. Mejjide Failde, F.J. Blanco. Efecto del sulfuro de hidrógeno sobre la síntesis de radicales libres en el condrocito articular artrósico humano. *Reumatología Clínica*, Vol. 8, Especial Congreso, 151-152, 2012.

5. E.F. Burguera, A. Vela Anero, F.J. Blanco. Modulación de la expresión génica en osteoblastos de hueso subcondral: efecto del co-cultivo con condrocitos articulares humanos artrósicos. *Reumatología Clínica Volumen 8, especial congreso*, 124, 2012.

6. E.F. Burguera, A. Vela Anero, R. Mejjide Failde, F.J. Blanco. The Effect of Hydrogen Sulfide Donors on Inflammatory Mediators in Human Articular Osteoarthritic Chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism* Vol. 64(10) Suppl. S2-S3, 2012.

7. E.F. Burguera, A.Vela Anero, F.J. Blanco. Modulation of gene expression in human subchondral bone cells co-cultured with human articular chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, Vol. 20, Supp. 1, S113-S114, 2012. ISSN 1063-4584.

#### **4. COMUNICACIONES ORALES**

---

1. Hydrogen sulfide as an inflammatory mediator in osteoarthritis. Ángela Vela-Anero, Elena F. Burguera, Rosa Mejjide Failde, Francisco J. Blanco. Congreso Internacional de la ISMH. Granada, 20-23 de Junio 2012.

#### **5. COMUNICACIONES A CONGRESOS**

---

1. Hydrogen sulfide donors reduce il1 $\beta$  induced catabolism in human articular cartilage. Ángela Vela-Anero, Elena F. Burguera, Lucia Gato-Calvo, Rosa Mejjide Failde, Francisco J. Blanco. Congreso internacional de la OARSI. Paris, 24-27 Abril 2014. Poster.

2. Efectos anti-catabolicos y anti-inflamatorios del sulfuro hidrógeno en condrocitos procedentes de tejido artrósico. Ángela Vela-Anero, Elena Fernandez Burguera, Francisco J. Blanco, Rosa Mejjide-failde. III iberoamerican congress of peloids. Portugal, 1-6 Octubre 2013. Poster

3. Hydrogen sulfide donors alleviate IL-1 $\beta$  induced inflammation-like effects in human articular osteoarthritic chondrocytes. Elena F. Burguera, Ángela Vela-Anero, Rosa Mejjide Failde, Francisco J. Blanco. Congreso internacional de la OARSI. Philadelphia, 18-21 Abril 2013. Poster.
4. El sulfuro de Hidrogeno: Un antiinflamatorio con perspectivas. Ángela Vela-Anero, Elena F. Burguera, Rosa Mejjide Failde, Francisco J. Blanco. Congreso Nacional de la Sociedad Española de reumatología. Tenerife, 21-24 Mayo 2013. Poster.
5. The effect of Hydrogen Sulfide Donors on inflammatory mediators in human articular osteoarthritic chondrocytes. Elena F. Burguera Ángela Vela-Anero, Rosa Mejjide Failde, Francisco J. Blanco. Congreso internacional del American college of Rheumatology (ACR). Washington DC, 09-14 Noviembre 2012. Poster
7. Efecto del sulfuro de hidrogeno sobre la síntesis de radicales libres en el condrocito articular artrosico humano. Ángela Vela-Anero, Elena F. Burguera, Rosa Mejjide Failde, Francisco J. Blanco, Congreso Nacional de la Sociedad Española de reumatología. Zaragoza, 16-18 mayo 2012. Poster.
8. Modulación de la expresión génica en osteoblastos de hueso subcondral: Efecto del cocultivo con condrocitos articulares humanos artrosicos. Elena F. Burguera, Ángela Vela-Anero, Francisco J. Congreso Nacional de la Sociedad Española de reumatología. Zaragoza, 16-18 mayo 2012. Poster.