



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

# **Nuevas adipoquinas y contaminantes ambientales en enfermedades reumáticas**

TESIS DOCTORAL

**Vanessa Abella Cajigal**

2016



# **Nuevas adipoquinas y contaminantes ambientales en enfermedades reumáticas**

**Vanessa Abella Cajigal**

---

---

**TESIS DOCTORAL**

**2016**

Director: **Dr. Oreste Gualillo**

Tutora: **Dra. María Jesús Manso Revilla**

**Programa Oficial de Doctorado en Biología Celular y Molecular**



**UNIVERSIDADE DA CORUÑA**



Dr. **ORESTE GUALILLO**, investigador estatutario nivel A del SERGAS, director del Laboratorio de Investigación en Interacciones Neuroendocrinas en Enfermedades Reumáticas e Inflamatorias (NEIRID Lab), Laboratorio 9 del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS),

**CERTIFICA:**

Como director de la Tesis Doctoral que lleva por título “**Nuevas adipoquinas y contaminantes ambientales en enfermedades reumáticas**”, realizado por la Licenciada en Biología, D<sup>a</sup>. **Vanessa Abella Cajigal**, que dicho trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en el Laboratorio de Investigación 9 del IDIS. El presente trabajo reúne las condiciones necesarias de originalidad y rigor científico para ser presentado y defendido ante el tribunal correspondiente para optar al grado de Doctora por la Universidad de A Coruña (UDC).

Y para que así conste firmo el presente informe en Santiago de Compostela, a 18 de enero de 2016.

Vº Bº Director del trabajo

Fdo. Dr. Oreste Gualillo





UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Dra. **MARÍA JESÚS MANSO REVILLA**, catedrática de universidad y directora del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de A Coruña (UDC),

**CERTIFICA:**

Como tutora de la Tesis Doctoral que lleva por título “**Nuevas adipoquinas y contaminantes ambientales en enfermedades reumáticas**”, realizado por la Licenciada en Biología, D<sup>a</sup>. **Vanessa Abella Cajigal**, que dicho trabajo ha sido realizado bajo mi tutela. El presente trabajo reúne las condiciones necesarias de originalidad y rigor científico para ser presentado y defendido ante el tribunal correspondiente para optar al grado de Doctora por la Universidad de A Coruña (UDC).

Y para que así conste firmo el presente informe en A Coruña, a 18 de enero de 2016.

Vº Bº Tutora del trabajo

Fdo. Dra. María Jesús Manso Revilla





Para la realización de la presente tesis doctoral, Vanessa Abella Cajigal fue financiada con una ayuda de apoyo a la etapa predoctoral (PRE/2012/163) del Plan Galego de Investigación, Innovación e Crecemento 2011-2015 (Plan I2C) de la Xunta de Galicia, cofinanciado por el Fondo Social Europeo (FSE), P.O.FSE Galicia 2007-2013, en un porcentaje del 80%.



*A mi familia*



## **AGRADECIMIENTOS**

La etapa de formación pre-doctoral es un viaje que te lleva muy lejos. Sabes dónde quieres que te lleve, pero no sabes dónde acabarás. No importa, porque el viaje será muy enriquecedor. A todos aquellos que me han acompañado en este viaje quiero agradecerlos vuestra colaboración.

Al Dr. **Oreste Gualillo** por haberme enseñado a “saber, a saber hacer y a saber ser”. Como director de tesis me ha hecho crecer profesional y personalmente.

A la Profa. Dra. **María Jesús Manso Revilla** por la tutoría de esta tesis.

A la Universidade da Coruña por haberme apoyado en mis estudios doctorales, en especial al Vicerrectorado de Investigación y Transferencia.

Al Instituto de Salud Carlos III por la financiación durante este trabajo.

Al Fondo Social Europeo y a la Xunta de Galicia, por contribuir a la financiación de los investigadores en formación.

Al Servicio de Reumatología y al Servicio de Traumatología del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela por su colaboración.

Al angelical berrear que me abrió los ojos y me forzó a tomar la decisión de la que estoy más orgullosa. Posiblemente esta tesis no existiría si no me hubiera tropezado con ello.

A **More, Vero, Javi, Ruddy**. ¡Qué orgullo trabajar con vosotros! Gracias por las enseñanzas, los consejos, por ser como sois y por contribuir a crear este “monstruo”.

A los que estáis y habéis estado en los laboratorios de investigación por los que he pasado. Me habéis enseñado lo mejor y lo peor de la profesión investigadora.

A **mis padres**, a **Miguelito**, mi hermano con ojo clínico, y a la última incorporación en la familia, **Álex**. Gracias por la paciencia, el apoyo, los consejos.



**“Cuanto puedas”**

Y si no puedes hacer tu vida como la quieres  
por lo menos intenta esto  
cuanto puedas: no la degrades  
al contacto excesivo con la gente,  
con los muchos trajines y conversaciones.  
No la degrades con llevarla,  
dándole vueltas y exponiéndola  
a la estupidez cotidiana  
de tantas relaciones y compañías,  
hasta que se vuelva en una extraña intrusa.

*Konstantinos Kavafis*





## **RESUMEN**

Las adipoquinas son proteínas producidas principalmente por los adipocitos del tejido adiposo blanco (TAB). En las enfermedades reumáticas, las adipoquinas están entre los factores más importantes relacionados con la obesidad que promueven la inflamación o la autoinmunidad. Muchas de ellas son producidas por los propios condrocitos del cartílago articular y actúan localmente en la homeostasis del cartílago. El conocimiento de las acciones de las adipoquinas es todavía incompleto. Por ello, el objetivo principal de las dos primeras partes de esta tesis fue estudiar el papel de dos nuevas adipoquinas, la progranulina (PGRN) y WISP-2, en el metabolismo del cartílago articular.

Los bifenilos policlorados no similares a dioxina (NDL-PCBs) son contaminantes orgánicos persistentes que se acumulan en el tejido adiposo causando supresión de la inmunidad y disrupción endocrina. Diversos estudios sugieren que los PCBs pueden estar implicados en la patogénesis de la artrosis. Las alteraciones en los mecanismos de muerte celular programada (apoptosis) están estrechamente relacionadas con la degradación de la matriz extracelular del cartílago articular. La identificación de inductores de la apoptosis es de suma relevancia para entender la patogénesis y/o progresión de la artrosis. Así, el objetivo de la tercera parte del presente trabajo fue evaluar el efecto de tres NDL-PCBs sobre la viabilidad celular y la inducción de la apoptosis en los condrocitos.

## RESUMO

As adipoquinas son proteínas producidas principalmente polos adipocitos do tecido adiposo branco (TAB). Nas enfermidades reumáticas, as adipoquinas están entre os factores máis importantes relacionados coa obesidade que promoven a inflamación ou a autoinmunidade. Moitas delas son producidas polos propios condrocitos da cartilaxe articular e actúan localmente na homeostase da cartilaxe. O coñecemento das accións das adipoquinas é aínda incompleto. Por iso, o obxectivo principal das dúas primeiras partes desta tesis foi estudar o papel de dúas novas adipoquinas, a progranulina (PGRN) e WISP-2, no metabolismo da cartilaxe articular.

Os bifenilos policlorados non similares a dioxina (NDL-PCBs) son contaminantes orgánicos persistentes que acumúlanse no tecido adiposo causando supresión da inmunidade e disrupción endocrina. Diversos estudos suxiren que os PCBs poden estar implicados na patoxénese da artrose. As alteracións nos mecanismos de morte celular programada (apoptose) están estreitamente relacionadas coa degradación da matriz extracelular da cartilaxe articular. A identificación de inductores da apoptose é de suma relevancia para entender a patoxénese e/ou progresión da artrose. Así, o obxectivo da terceira parte do presente traballo foi avaliar o efecto de tres NDL-PCBs sobre a viabilidade celular e a inducción da apoptose nos condrocitos.

## **ABSTRACT**

Adipokines are proteins produced mainly by adipocytes of white adipose tissue (WAT). In rheumatic diseases, adipokines are among the most important factors related to obesity that promote inflammation or autoimmunity. Many of them are produced by articular cartilage chondrocytes themselves and act locally in cartilage homeostasis. The knowledge of adipokines actions is still incomplete. Therefore, the main objective of the first two parts of this thesis was to study the role of two novel adipokines, progranulin (PGRN) and WISP-2, in articular cartilage metabolism.

Non-dioxin-like polychlorinated biphenyls (NDL PCBs) are persistent organic pollutants that accumulate in fatty tissues causing immune suppression and endocrine disruption. Several studies suggest that PCBs may be involved in pathogenesis of osteoarthritis (OA). Alterations in the mechanisms of programmed cell death (apoptosis) are strongly related to the degradation of extracellular matrix (ECM) in the cartilage of OA subjects. Identification of apoptosis inducers is of paramount relevance to understand the pathogenesis and/or progression of OA. Thus, the aim of the present study was to assess the effect of several NDL PCBs on chondrocytes viability and apoptosis induction.



# ÍNDICE



ÍNDICE DE FIGURAS .....	V
ÍNDICE DE TABLAS .....	VII
ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....	VIII
INTRODUCCIÓN .....	14
1. La articulación.....	15
1.1. Estructura de las articulaciones sinoviales .....	15
2. El cartílago articular .....	17
2.1. Componentes del cartílago articular .....	17
2.1.1. La matriz extracelular (MEC).....	17
2.1.2. El condrocito .....	19
2.2. Estructura del cartílago articular.....	20
2.3. Propiedades y función del cartílago articular .....	22
3. El cartílago articular en las enfermedades reumáticas .....	23
3.1. Mecanismos de destrucción del cartílago .....	26
3.2. Procesos inflamatorios en el cartílago .....	27
4. Las adipoquinas. Mediadores de la degradación y de la inflamación del cartílago articular .....	30
4.1. La leptina. La precursora de la superfamilia de las adipoquinas .....	31
4.2. La adiponectina. Una adipoquina con propiedades metabólicas únicas .....	33
5. Nuevas adipoquinas implicadas en el metabolismo del cartílago articular: Progranulina.....	34
5.1. Estructura de la progranulina.....	35
5.2. La progranulina como nuevo ligando de los receptores de TNF- $\alpha$ .....	36
5.3. La progranulina en las enfermedades reumáticas .....	38
6. Nuevas adipoquinas implicadas en el metabolismo del cartílago articular: WISP-2.....	40
6.1. Estructura de WISP-2 .....	41
6.2. La ruta canónica de Wnt .....	42
6.3. WISP-2 en las enfermedades reumáticas .....	45
7. Muerte celular en el cartílago articular .....	45
7.1. Tipos de muerte celular: necrosis y apoptosis.....	46
7.2. Estímulos pro-apoptóticos de los condrocitos.....	48
8. Exposición a contaminantes ambientales y enfermedades reumáticas. Los PCBs .....	50
8.1. NDL-PCBs .....	52
8.1.1. Estructura y propiedades físico-químicas de los NDL-PCBs.....	52

8.1.2. Mecanismo de acción de los NDL-PCBs.....	54
8.2. Exposición a PCBs y disrupción endocrina .....	55
8.3. Exposición a PCBs y enfermedades reumáticas .....	56
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	59
Sección A: Nuevas adipoquinas. La progranulina .....	61
Sección B: Nuevas adipoquinas. WISP-2.....	63
Sección C: Contaminantes ambientales. NDL-PCBs.....	64
MATERIALES Y MÉTODOS.....	67
1. Cultivos celulares .....	69
1.1. Línea celular murina ATDC5 .....	69
1.1.1. Diferenciación de las células ATDC5.....	70
1.2. Línea celular humana T/C-28a .....	70
1.3. Cultivo primario de condrocitos humanos .....	71
1.3.1. Obtención de muestras de cartílago articular humano .....	71
1.3.2. Aislamiento y cultivo primario de condrocitos humanos .....	71
1.4. Mantenimiento y subcultivo celular.....	72
1.5. Condiciones experimentales: tratamientos.....	73
2. Determinación de nitritos: ensayo colorimétrico de Griess .....	74
3. Ensayo colorimétrico de actividad metabólica: MTT .....	76
4. Ensayo de citotoxicidad: actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) .....	77
5. Determinación de la concentración de malondialdehído (MDA).....	78
6. Determinación del Estado Antioxidante Total, Estado Oxidante Total e Índice de Extrés Oxidativo.....	79
7. Ensayo de apoptosis con FITC-Anexin V e ioduro de propidio .....	80
8. Análisis de la expresión génica.....	82
8.1. Extracción de ARNm.....	82
8.2. Retro-Transcripción (RT) del ARNm .....	83
8.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real .....	84
8.3.1. Cuantificación relativa. Método $\Delta\Delta Ct$ .....	85
8.3.2. Controles de calidad .....	86
9. Análisis de la expresión proteica .....	87
9.1. Extracción de proteínas .....	87
9.2. Cuantificación de proteínas. Método Bradford .....	88
9.3. Western blot .....	88



9.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) .....	88
9.3.2. Transferencia a membrana.....	89
9.3.3. Inmunodetección .....	90
9.3.4. Densitometría .....	92
10. Silenciamiento génico mediante ARN de interferencia .....	93
11. Análisis estadístico .....	94
12. Reactivos y aparatos .....	94
RESULTADOS.....	99
Sección A: Nuevas adipoquinas. La progranulina .....	101
1. Efecto de la PGRN sobre la vitalidad de los condrocitos.....	101
2. Modulación de la PGRN durante la diferenciación de los condrocitos .....	101
3. Expresión de la PGRN en tejidos procedentes de pacientes sanos y artrósicos.....	102
4. Efecto de citoquinas pro-inflamatorias y agonistas de TLR4 sobre la expresión génica de PGRN en células ATDC5 diferenciadas.....	103
5. Efecto de la PGRN sobre la inducción del catabolismo en condrocitos humanos tratados con IL1 $\beta$ .....	105
6. PGRN reduce la expresión de NOS2 inducida por la IL1 $\beta$ y el LPS, en parte a través de receptor TNFR1 .....	106
Sección B: Nuevas adipoquinas. WISP-2.....	109
1. Modulación de la expresión de WISP-2 durante la diferenciación de los condrocitos.....	109
2. Efecto de citoquinas y adipoquinas pro-inflamatorias sobre la expresión génica de WISP-2 en condrocitos humanos .....	110
3. El silenciamiento génico de WISP-2 estimula el catabolismo de los condrocitos.....	111
4. Efecto del silenciamiento génico de WISP-2 sobre condrocitos T/C28a2 estimulados con IL1 $\beta$ .....	113
5. Efecto de la ruta canónica de Wnt sobre el catabolismo inducido por el silenciamiento de WISP-2 sobre condrocitos T/C28a2.....	114
Sección C: Contaminantes ambientales. NDL-PCBs.....	116
1. Efecto de los NDL-PCBs sobre la vitalidad de los condrocitos .....	116
2. Caracterización molecular del efecto citotóxico de los NDL-PCBs en las células murinas ATDC5 .....	117
2.1. Determinación de los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) tras la exposición a los NDL-PCBs.....	117
2.2. Inducción de necrosis en las células ATDC5 expuestas a NDL-PCBs .....	118
2.3. Activación y procesamiento de caspasas por parte de los NDL-PCBs.....	120

2.4. Efecto de los NDL-PCBs sobre la expresión de proteínas pro- y anti-apoptóticas .....	121
3. Principales rutas implicadas en la apoptosis inducida por NDL-PCBs .....	122
4. Estudio del estrés oxidativo en las células ATDC5 expuestas a NDL-PCBs .....	123
DISCUSIÓN .....	125
Sección A: Nuevas adipoquinas. La progranulina .....	127
Sección B: Nuevas adipoquinas. WISP-2.....	132
Sección C: Contaminantes ambientales. NDL-PCBs.....	136
CONCLUSIONES .....	141
Sección A: Nuevas adipoquinas. La progranulina .....	143
Sección B: Nuevas adipoquinas. WISP-2.....	143
Sección C: Contaminantes ambientales. NDL-PCBs.....	144
BIBLIOGRAFÍA .....	145
ANEXOS .....	163

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la articulación sinovial..	16
Figura 2. La matriz extracelular.	19
Figura 3. Estructura del cartílago articular maduro..	22
Figura 4. Características de la patología de la artrosis.	24
Figura 5. Estructura y procesado de la PGRN.	36
Figura 6. Modelo propuesto para el papel de la PGRN en el desarrollo de la artrosis.	39
Figura 7. Representación esquemática de la familia de proteínas CCN.	42
Figura 8. La ruta canónica de señalización Wnt.	43
Figura 9. Representación esquemática de la necrosis y la apoptosis.	46
Figura 10. Representación esquemática de las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis.	48
Figura 11. Estructura general de los PCBs.	53
Figura 12. Estructura química de los PCBs 101, 153 y 180.	53
Figura 13. Mecanismo de acción de los NDL-PCBs.	54
Figura 14. Reacción de Griess.	75
Figura 15. Reacción de formación de cristales de formazán a partir de MTT.	76
Figura 16. Reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).	78
Figura 17. Esquema interpretativo del ensayo de Anexina V e Ioduro de Propidio mediante citofluorimetría de flujo.	81
Figura 18. Efecto de la PGRN sobre la vitalidad celular.	101
Figura 19. Expresión del ARNm y de la proteína de PGRN durante la diferenciación de células ATDC5 después de 7, 14 y 21 días.	102
Figura 20. Determinación de los niveles de ARN mensajero y proteína en tejidos articulares de individuos sanos y pacientes con OA.	103
Figura 21. Expresión relativa del ARNm de PGRN en células ATDC5 diferenciadas tratadas con TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 y LPS.	104
Figura 22. PGRN suprime el catabolismo inducido por IL1 $\beta$ en condrocitos humanos.	105
Figura 23. PGRN reduce la producción de nitrito y la expresión de NOS2 inducida por la IL1 $\beta$ y el LPS en células ATDC-5 maduras, al menos en parte, a través de receptor TNFR1.	108
Figura 24. Expresión del ARNm y de la proteína de WISP-2 durante la diferenciación de células ATDC5 después de 7, 14 y 21 días.	109
Figura 25. Expresión del ARNm de WISP-2 tras la estimulación con citoquinas y adipoquinas pro-inflamatorias de condrocitos humanos.	111

Figura 26. Efecto del silenciamiento génico de WISP-2 sobre marcadores catabólicos en condrocitos.....	112
Figura 27. Efecto del silenciamiento de de WISP-2 sobre condrocitos T/C28a2 estimulados con IL1 $\beta$ . .....	113
Figura 28. Efecto de la ruta canónica de Wnt sobre el catabolismo mediado por el silenciamiento de WISP-2 en condrocitos T/C28a2. ....	115
Figura 29. Efecto de los PCBs 101, 153 y 180 sobre la viabilidad celular de condrocitos. ....	116
Figura 30. Efecto de los PCBs 101, 153 y 180 sobre los niveles de LDH. ....	118
Figura 31. Efecto necrótico inducido por NDL-PCBs. ....	119
Figura 32. Activación de la caspasa-3 por la exposición a NDL-PCBs. ....	120
Figura 33. Efecto de los PCBs 101, 153 y 180 sobre la expresión de Bcl-2 y Bax. ....	121
Figura 34. Efecto de los PCBs 101, 153 y 180 sobre la activación de la quinasa p38. ....	122
Figura 35. Efecto de los PCBs 101, 153 y 180 sobre los niveles de MDA. ....	123
Figura 36. Evaluación del estrés oxidativo en células ATDC5 expuestas a los PCBs 101, 153 y 180. ....	124

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Componentes de la matriz extracelular (MEC). .....	18
Tabla II. Principales mediadores de la inflamación. Factores proinflamatorios producidos por los condrocitos y los sinoviocitos durante la progresión de la OA. ....	27
Tabla III. Características distintivas entre necrosis y apoptosis.....	47
Tabla IV. POPs incluidos en el Convenio de Estocolmo 2001 como la “docena sucia”. .....	50
Tabla V. Lista de cebadores empleados. ....	84
Tabla VI. Composición de los geles de poliacrilamida.....	89
Tabla VII. Composición de los tampones empleados en Western blot. ....	90
Tabla VIII. Lista de anticuerpos empleados. ....	91

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ABTS	2,2'- <u>azino</u> bis-3-etilbenzo <u>tiazolin</u> -6- <u>sulfonato</u>
ADAMTS	Desintegrina y metaloproteinasa con motivos trombospondina ( <u>A</u> <u>Disintegrin</u> <u>And</u> <u>Metalloproteinase</u> with <u>Thrombospondin</u> <u>Motifs</u> )
ADN	<u>Á</u> cido <u>d</u> esoxirribo <u>n</u> ucleico
ADNc	<u>Á</u> cido <u>d</u> esoxirribo <u>n</u> ucleico <u>c</u> omplementario
AhR	Receptor de hidrocarburos aromáticos ( <u>A</u> ryl <u>h</u> ydrocarbon <u>r</u> eceptor)
APC	<u>A</u> denomatous <u>P</u> olyposis <u>c</u> oli
AR	<u>A</u> rtritis <u>r</u> eumatoide
ARN	<u>Á</u> cido <u>r</u> ibo <u>n</u> ucleico
ARNi	<u>Á</u> cido <u>r</u> ibo <u>n</u> ucleico de <u>i</u> nterferencia
ARNm	<u>Á</u> cido <u>r</u> ibo <u>n</u> ucleico <u>m</u> ensajero
Bax	Proteína X asociada a Bcl-2 ( <u>B</u> cl2- <u>A</u> ssociated <u>X</u> <u>P</u> rotein)
Bcl-2	Célula-B CLL/linfoma 2 ( <u>B</u> - <u>c</u> ell <u>l</u> ymphoma <u>2</u> )
BSA	Seroalbúmina bovina ( <u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin)
CAR	Receptor constitutivo de androstano ( <u>c</u> onstitutive <u>a</u> ndostane <u>r</u> eceptor)
CCN	<u>C</u> onnective <u>t</u> issue <u>g</u> rowth <u>f</u> actor ( <u>CTGF</u> ), <u>C</u> ystein <u>r</u> ich <u>p</u> rotein ( <u>Cyr61</u> ), <u>and</u> <u>N</u> ephroblastoma <u>o</u> verexpressed <u>g</u> ene ( <u>nov</u> )
COMP	Proteína oligomérica de la matriz cartilaginosa ( <u>c</u> artilage <u>o</u> ligomeric <u>m</u> atrix <u>p</u> rotein)
COX2	<u>C</u> iclooxigenasa <u>2</u>
CTFG-L	Proteína similar al factor de crecimiento de tejido conectivo ( <u>c</u> onnective <u>t</u> issue <u>g</u> rowth <u>f</u> actor- <u>l</u> ike)

CYP3A4	Citocromo <u>P</u> 450 <u>3</u> A4
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño ( <i><u>d</u>amage <u>a</u>ssociated <u>m</u>olecular <u>p</u>atterns</i> )
DDT	<u>D</u> icloro <u>d</u> ifenil <u>t</u> ricloroetano
DL-PCBs	PCBs similares a dioxina ( <i><u>d</u>ioxin <u>l</u>ike-<u>P</u>CBs</i> )
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco ( <i><u>D</u>ulbecco's <u>M</u>odified <u>E</u>agle <u>M</u>edium</i> )
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético ( <i><u>e</u>thylene<u>d</u>iamine<u>t</u>etraacetic <u>a</u>cid</i> )
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas ( <i><u>F</u>as-<u>A</u>ssociated protein with <u>d</u>eath <u>d</u>omain</i> )
FasL	Ligando de Fas ( <i><u>F</u>as <u>l</u>igand</i> )
FBS	Suero bovino fetal ( <i><u>f</u>etal <u>b</u>ovine <u>s</u>erum</i> )
FITC	Isotiocianato de fluoresceína ( <i><u>f</u>luorescein <u>i</u>sothiocyana<u>t</u>e</i> )
GAG	<u>G</u> lucos <u>a</u> minoglicanos
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa ( <i><u>g</u>lyceral<u>d</u>ehyde-3-<u>p</u>hospha<u>t</u>e <u>d</u>ehydrogenase</i> )
GEP	Precursor de granulina-epitelina ( <i><u>g</u>ranulin-<u>e</u>pithe<u>l</u>in <u>p</u>recursor</i> )
GRN	<u>G</u> ranulina
GSK3β	Glucógeno sintasa quinasa 3 beta ( <i><u>g</u>lycogen <u>s</u>ynthase <u>k</u>inase <u>3</u> <u>b</u>eta</i> )
HCB	<u>H</u> exa <u>c</u> loro <u>b</u> enceno
HDL	Lipoproteína de alta densidad ( <i><u>h</u>igh <u>d</u>ensity <u>l</u>ipoprotein</i> )
IGFBP	Proteína de unión al factor de crecimiento similar a insulina ( <i><u>i</u>nsulin-<u>l</u>ike <u>g</u>rowth <u>f</u>actor <u>b</u>inding <u>p</u>rotein</i> )
IL1	<u>I</u> nterleu <u>q</u> uina <u>1</u>

IL1RI	Receptor tipo I de la interleuquina 1 ( <i>Interleukin 1 receptor type I</i> )
IL6	Interleuquina <u>6</u>
IL8	Interleuquina <u>8</u>
INF $\gamma$	Interferón gamma
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible ( <i>inducible nitric oxide synthase 2</i> )
IP	Ioduro de propidio
LDH	Lactato <u>deshidrogenasa</u>
LPS	Lipopolisacárido
LRPs	Proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad ( <i>low-density lipoprotein receptor-related proteins</i> )
LTB4	Leucotrieno <u>B4</u>
LTC4	Leucotrieno <u>C4</u>
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1 ( <i>monocyte chemoattractant protein-1</i> )
MDA	Malondialdehído
MEC	Matriz <u>extracelular</u>
MMPs	Metaloproteasas de matriz ( <i>matrix metalloproteases</i> )
MTT	Bromuro de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NADH	Dinucleótido reducido de nicotinamida adenina ( <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i> )
NDL-PCBs	PCBs no similares a dioxina ( <i>non dioxin like-PCBs</i> )
NE	Elastasa de neutrófilos ( <i>neutrophil elastase</i> )
NF-kB	Factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de células B activas ( <i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> )



NO	Óxido nítrico ( <i><u>n</u>itric <u>o</u>xide</i> )
NOS2	Óxido nítrico sintasa 2 ( <i><u>n</u>itric <u>o</u>xide <u>s</u>ynthase <u>2</u></i> )
OA	Artrosis ( <i><u>o</u>steo<u>a</u>rthritis</i> )
OARSI	<i><u>O</u>A <u>R</u>esearch <u>S</u>ociety <u>I</u>nternational</i>
OSI	Índice de estrés oxidativo ( <i><u>O</u>xidative <u>S</u>tress <u>I</u>ndex</i> )
PBS	Tampón fosfato salino ( <i><u>p</u>hosphate <u>b</u>uffered <u>s</u>aline</i> )
PCBs	Bifenilos policlorados ( <i><u>p</u>oly<u>c</u>hlorinated <u>b</u>iphenyls</i> )
PCDDs	<u>P</u> ol <u>i</u> clorod <u>i</u> benzod <u>i</u> oxinas
PCDFs	<u>P</u> ol <u>i</u> clorod <u>i</u> benzofuranos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i><u>p</u>olymerase <u>c</u>hain <u>r</u>eaction</i> )
PGE2	<u>P</u> rostaglandina <u>E</u> 2
PGRN	<u>P</u> rogranulina
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo ( <i><u>p</u>henyl<u>m</u>ethyl<u>s</u>ulfonyl <u>f</u>luoride</i> )
POPs	Compuestos orgánicos persistentes ( <i><u>p</u>ersistent <u>o</u>rganic <u>p</u>ollutants</i> )
PR3	<u>P</u> roteinasa <u>3</u>
PSA	<u>P</u> ersulfato amónico
PVDF	Polifluoruro de vinilideno ( <i><u>p</u>olyv<u>i</u>nyli<u>d</u>ene <u>f</u>luoride</i> )
PXR	Receptor X de pregnano ( <i><u>P</u>regnane <u>X</u> <u>R</u>eceptor</i> )
RAGE	Receptores de productos finales de glicosilaciones ( <i><u>r</u>eceptor for <u>a</u>dvanced <u>g</u>lycation <u>e</u>nd products</i> )
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN ( <i><u>R</u>NA-<u>i</u>nduced <u>s</u>ilencing <u>c</u>omplex</i> )
ROS	Especies reactivas de oxígeno ( <i><u>R</u>eactive <u>O</u>xygen <u>S</u>pecies</i> )
RT	<u>R</u> etro- <u>t</u> ranscripción

RXR	Receptor X del ácido retinoico ( <i>Retinoid X Receptor</i> )
SDS	Sodio dodecil sulfato ( <i>sodium dodecylsulfate</i> )
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico ( <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
SEM	Error estándar de la media ( <i>standard error mean</i> )
SLPI	Inhibidor de proteasas secretadas por leucocitos ( <i>Secretory Leukocyte Protease Inhibitor</i> )
SOD2	Superóxido dismutasa 2
TAB	Tejido adiposo blanco
TAS	Estado Antioxidante Total ( <i>Total Antioxidant Status</i> )
TBA	Ácido 2-tiobarbitúrico ( <i>thiobarbituric acid</i> )
TCF/LEF	Factor de células T/factor de potenciación limfoide ( <i>T-cell factor/lymphoid enhancer factor</i> )
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina
TIMPs	Inhibidores tisulares de metaloproteasas ( <i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i> )
TIR	Receptor de Toll/ IL1 ( <i>Toll/IL1 receptor</i> )
TLRs	Receptores tipo Toll ( <i>Toll-like receptors</i> )
TMOP	1,1,3,3-tetrametoxipropano
TNF	Factor de necrosis tumoral ( <i>tumor necrosis factor</i> )
TNFR	Receptor de factor de necrosis tumoral ( <i>tumor necrosis factor receptor</i> )
TOS	Estado Oxidante Total ( <i>Total Oxidant Status</i> )
TRAIL	Ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF ( <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i> )

TRAILR	Receptor de TRAIL ( <i>TRAIL receptor</i> )
TSR	Dominio similar a trombospondina tipo 1 ( <i>thrombospondin type I repeat</i> )
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular 1 ( <i>vascular cell adhesion molecule 1</i> )
VWC	Dominio similar al factor von Willebrand tipo C ( <i>von Willebrand factor type C repeat</i> )
WISP-2	Proteína inducida por Wnt-1 2 ( <i>Wnt-1 inducible signaling pathway protein 2</i> )
XREs	Elementos de respuesta a xenobióticos ( <i>Xenobiotic Response Elements</i> )



# **INTRODUCCIÓN**



## **1. LA ARTICULACIÓN**

El aparato locomotor es el sistema encargado de facilitar el movimiento y está formado por los huesos, las articulaciones, los músculos, los tendones y los ligamentos. La articulación se define anatómicamente como la unión entre dos o más huesos por sus superficies de contacto. Las estructuras articulares están dispuestas de tal modo que distribuyen el estrés mecánico de forma óptima, minimizando así los procesos de fricción y desgaste.

El grado de libertad de movimiento de una articulación está determinado por la naturaleza de la unión entre los huesos y la forma de las superficies articulares que los componen. De acuerdo con la naturaleza del material que separa los huesos, las articulaciones se clasifican en fibrosas (huesos unidos directamente por tejido conjuntivo fibroso, no poseen cavidad articular), cartilagosas (huesos unidos por cartílago, sin cavidad articular) y sinoviales (poseen cavidad articular, y por tanto, tejido sinovial). En función del grado de movilidad se distinguen articulaciones con movilidad nula o escasa (sinartrosis), poco móviles o semimóviles (anfiartrosis) y de gran movilidad (diartrosis).

Las articulaciones sinoviales son las más numerosas en el cuerpo humano (ej. el codo, el hombro, la rodilla, la cadera). Se caracterizan por la presencia de una cavidad articular que les confiere gran libertad de movimientos (1). Los elementos que las conforman se describen a continuación (Figura 1).

### **1.1. Estructura de las articulaciones sinoviales**

- a. Cavidad articular:** limitada por los cartílagos articulares y la cápsula articular.

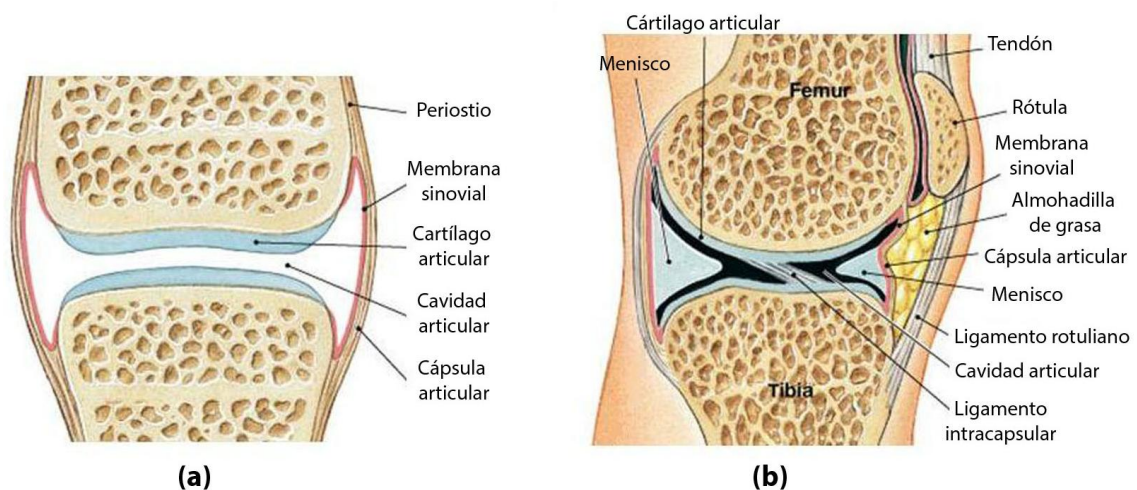
**b. La cápsula articular:** es el elemento de protección que reviste toda la cavidad articular uniendo los huesos de la articulación. Presenta una capa externa fibrosa y una capa interna sinovial. La membrana fibrosa es muy resistente y poco elástica. La membrana sinovial es una membrana delgada, transparente y vascularizada adherida a la cara profunda de la membrana fibrosa. Presenta los sinoviocitos y es la encargada de secretar el líquido sinovial.

**c. El líquido sinovial:** es un líquido transparente y viscoso formado por un filtrado del plasma y muy rico en mucina encargado de lubricar la articulación, además de nutrir y oxigenar al cartílago.

**d. Elementos de contacto y deslizamiento:** son el cartílago articular y el menisco.

**e. Elementos de estabilidad articular:** son los ligamentos y tendones.

**f. Almohadilla de grasa infrarrotuliana:** también denominada almohadilla de Hoffa, es una región de tejido graso situada por debajo del tendón rotuliano con funciones lubricantes y de absorción de impactos.



**Figura 1. Estructura de la articulación sinovial.** (a) Representación esquemática de una articulación simple. (b) Vista en sección simplificada de la articulación de la rodilla. Modificado de (2).



## **2. EL CARTÍLAGO ARTICULAR**

En el cuerpo humano se encuentran tres tipos de cartílago: el cartílago hialino, el cartílago elástico y el cartílago fibroso o fibrocartílago. El cartílago hialino se localiza fundamentalmente en las superficies de los huesos en las articulaciones sinoviales, de ahí, que también se le conozca con el nombre de cartílago articular. Es un tejido conectivo especializado, avascular, aneural y alinfático constituido por dos elementos, un componente celular (los condrocitos) y otro extracelular (la matriz). Presenta un aspecto blanquecino brillante y, con un grosor de entre 1 y 5 mm, es capaz de resistir a fuerzas de compresión. Sus propiedades físicas de resistencia y elasticidad se deben a la integridad y la estructura de la matriz. Es un tejido con un nivel bajo de tasa metabólica comparado con otros, como puede ser el músculo. Sin embargo, se revela como un tejido con una estructura elaborada y altamente organizada, con complejas interacciones entre los condrocitos y la matriz, responsables del mantenimiento del tejido (3).

### **2.1. Componentes del cartílago articular**

El cartílago articular contiene únicamente un 2-5% de componente celular (condrocitos), mientras que el restante 95-98% del volumen del tejido es matriz extracelular (MEC).

#### **2.1.1. La matriz extracelular (MEC)**

La MEC está constituida por una fracción líquida (70-80%) y un armazón sólido (20-30%) de macromoléculas que proporcionan al cartílago sus características biomecánicas específicas.

El agua constituye la fracción líquida de la matriz. Su distribución es desigual dentro del tejido, en la capa superficial representa el 80%, mientras que en la profunda solamente el 60%. Su presencia es crucial para mantener las características de elasticidad, flexibilidad y capacidad para reducir el rozamiento y distribución de las presiones del cartílago al interactuar con las macromoléculas de la MEC.

El almacén de macromoléculas estructurales se compone de colágenos (50%), proteoglicanos (30-35%) y otras proteínas de matriz que representan el 15-20% restante (Tabla I).

**Tabla I. Componentes de la matriz extracelular (MEC).**

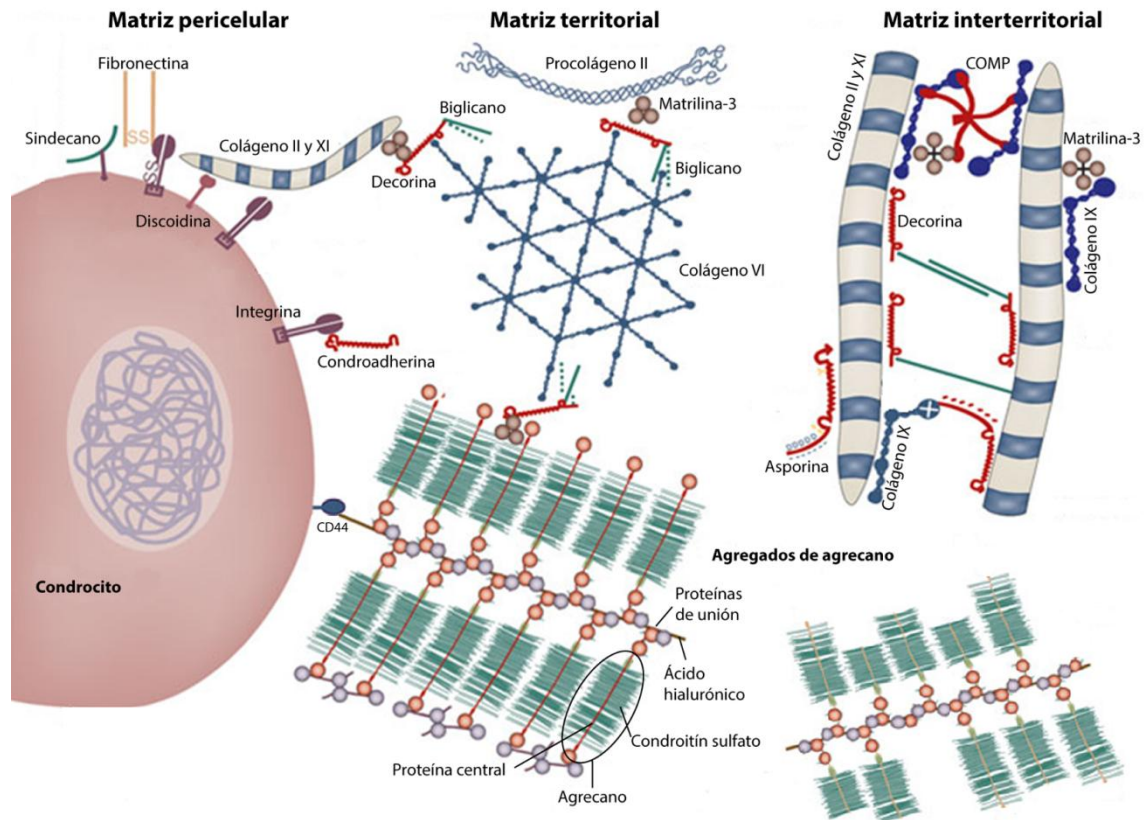
COLÁGENOS	PROTEOGLICANOS	PROTEÍNAS DE MEMBRANA	OTRAS MOLÉCULAS
Tipo II	Agrecano	CD44	Ácido hialurónico
Tipo VI	Versicano	Sindecano-3	Fibronectina
Tipo IX	Fibromodulina	Anexina V	YKL-40
Tipo XI	Biglicano	Integrinas	Matrilina-3
Tipo XII	Decorina	Discoïdina	COMP
Tipo XIV	Condroadherina		Asporin

COMP (*Cartilage oligomeric matrix protein*, proteína oligomérica de la matriz cartilaginosa).

En el cartílago coexisten diferentes tipos de colágeno (II, VI, IX, XI, XII, XIV); sin embargo, el 90-95% es de tipo II. Este tipo de colágeno se organiza según un entramado tridimensional a modo de malla, orientado para descargar las fuerzas de tracción y proporcionar así la resistencia a la tensión (3).

Los proteoglicanos son macromoléculas constituidas por un eje central proteico al cual se unen cadenas de glucosaminoglicanos (GAG). El agrecano, compuesto en su mayoría por el GAG condroitín sulfato, es el proteoglicano más común. Otro GAG, el ácido hialurónico, enlaza a través de un enlace proteico diversas moléculas de agrecano, formando así agregados (Figura 2).

La MEC también varía en relación con el condrocito, distinguiéndose tres regiones (Figura 2): la pericelular, rica en proteoglicanos y proteínas no colágenas que facilita la adhesión del condrocito a la matriz; la territorial, dispuesta a modo de cápsula alrededor del condrón; y la interterritorial, formada por fibras de colágeno, siendo la capa que ocupa un mayor volumen (4).



**Figura 2. La matriz extracelular.** Representación esquemática de la organización de la matriz en el cartílago articular. Modificado de (4).

### 2.1.2. El condrocito

El condrocito es el único tipo celular presente en el cartílago articular. La unidad funcional del cartílago es el condrón, formado por el condrocito, la laguna (lugar ocupado por el condrocito en la MEC) y la matriz pericelular (5). Cada condrocito se encuentra aislado dentro de la matriz pericelular, donde crea un microambiente

especializado al ser responsable de la síntesis y mantenimiento de la MEC (6). Sin embargo, recientemente se ha descrito la presencia de proyecciones citoplasmáticas en el cartílago articular que comunican físicamente condrocitos localizados en lagunas distantes (7).

Los condrocitos varían en tamaño, forma y número dependiendo de la región del cartílago. Los condrocitos en la zona superficial son de menor tamaño, aplanados y se encuentran en mayor densidad que en las zonas más profundas del cartílago.

Desde un punto de vista ontogénico, los condrocitos proceden de una célula precursora de origen mesenquimal. A medida que la célula se diferencia, varía su fenotipo y expresa distintos tipos de genes marcadores de formación de matriz. Así, las células condroprogenitoras, inmediatamente posteriores a la precursora mesenquimal, expresan colágeno tipo II; los condrocitos proliferativos, colágenos tipo II, IX y XI además de agrecano, y los condrocitos hipertróficos, colágeno tipo X, osteocalcina, fosfatasa alcalina y MMP-13 (8).

En relación a su actividad metabólica, los condrocitos presentan una elevada actividad anabólica en las fases de crecimiento, sintetizando distintas enzimas, factores de crecimiento, citoquinas y componentes de la MEC. Sin embargo, esta actividad es limitada en el cartílago maduro, al igual que la capacidad de división celular (3).

### **2.2. Estructura del cartílago articular**

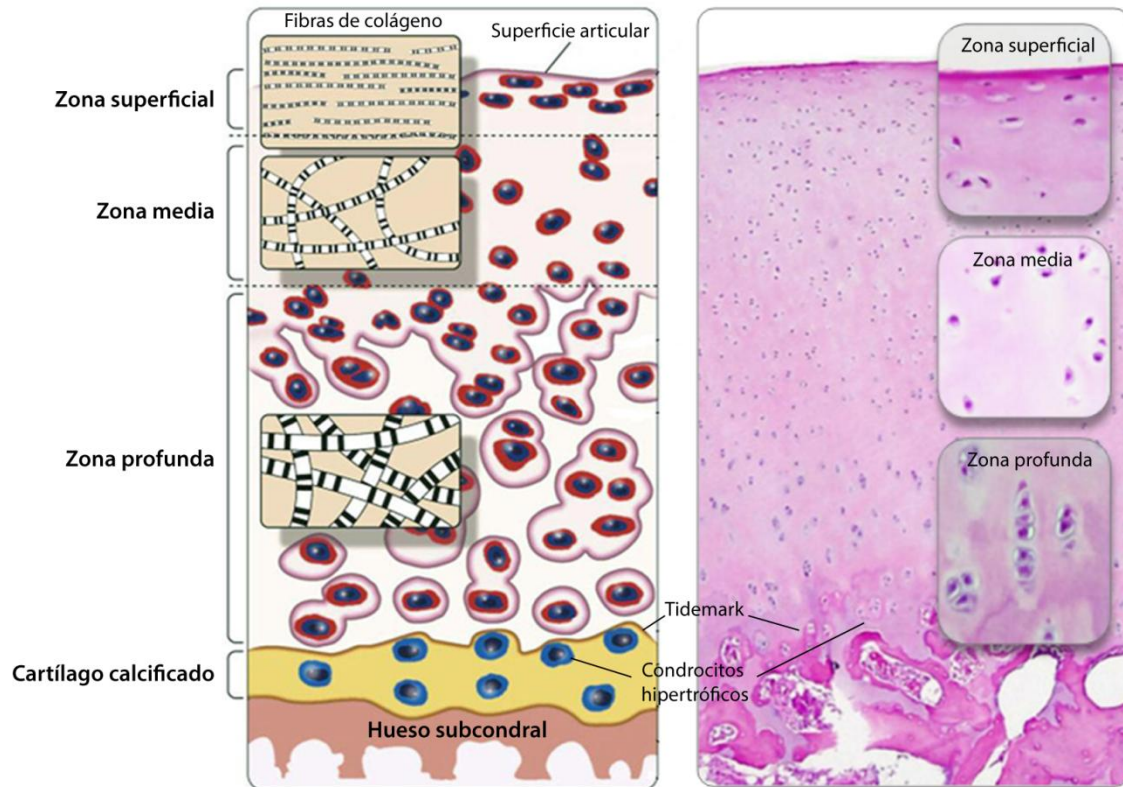
El cartílago articular maduro es un tejido altamente heterogéneo. Se distinguen cuatro zonas, desde la superficie hasta la profundidad, en función del tamaño, forma y número de los condrocitos; así como del contenido de la MEC, lo que le confiere diferentes propiedades mecánicas (9,10) (Figura 3):

**a. Zona I (superficial o tangencial):** constituye el 10-20% de grosor del cartílago. En ella, los condrocitos son más pequeños, aplanados y están situados de forma paralela a la superficie articular. Presenta una elevada concentración de fibras de colágeno dispuestas en paralelo a la superficie, lo que le proporciona una gran resistencia a la erosión.

**b. Zona II (media o de transición):** representa entre el 40 a 60% del grosor total. La morfología de los condrocitos y la composición de la matriz es intermedia entre la zona superficial y la profunda. Existe una mayor presencia de proteoglicanos, y un descenso en el número de fibras de colágeno, que en esta capa se disponen de forma oblicua a la superficie, lo cual facilita soportar las fuerzas de compresión.

**c. Zona III (profunda o radial):** ocupa el 30% del grosor, donde los condrocitos son menos numerosos, más elípticos, formando columnas perpendiculares a la superficie articular. Es rica en proteoglicanos y en fibras de colágeno de mayor diámetro que siguen la orientación de las columnas de condrocitos. Presenta menor proporción de agua que la zona superficial.

**d. Zona IV (cartílago calcificado):** El límite entre esta zona y la anterior viene delimitado por el frente de calcificación o *tidemark*. Con presencia de condrocitos hipertróficos y colágeno tipo X, esta zona sirve de protección mecánica entre el cartílago articular no calcificado y el hueso subcondral.



**Figura 3. Estructura del cartílago articular maduro.** Representación esquemática de las diferentes zonas del cartílago, donde los recuadros muestran el diámetro y la orientación relativa de las fibras de colágeno (panel izquierdo). Corte histológico de cartílago articular humano teñido con hemoxilina-eosina, donde los recuadros muestran a mayor aumento la zonación (panel derecho). Modificado de (9).

### 2.3. Propiedades y función del cartílago articular

La función principal del cartílago articular es proporcionar una superficie lisa y de bajo coeficiente de fricción que permita el movimiento de la articulación sin que se produzca dolor. Para facilitar el movimiento, las superficies del cartílago se protegen con una capa de lubricina y ácido hialurónico, producidos ambos por los condrocitos y los sinoviocitos, lo que permite que el movimiento se consiga gracias al deslizamiento de las superficies articulares (11).

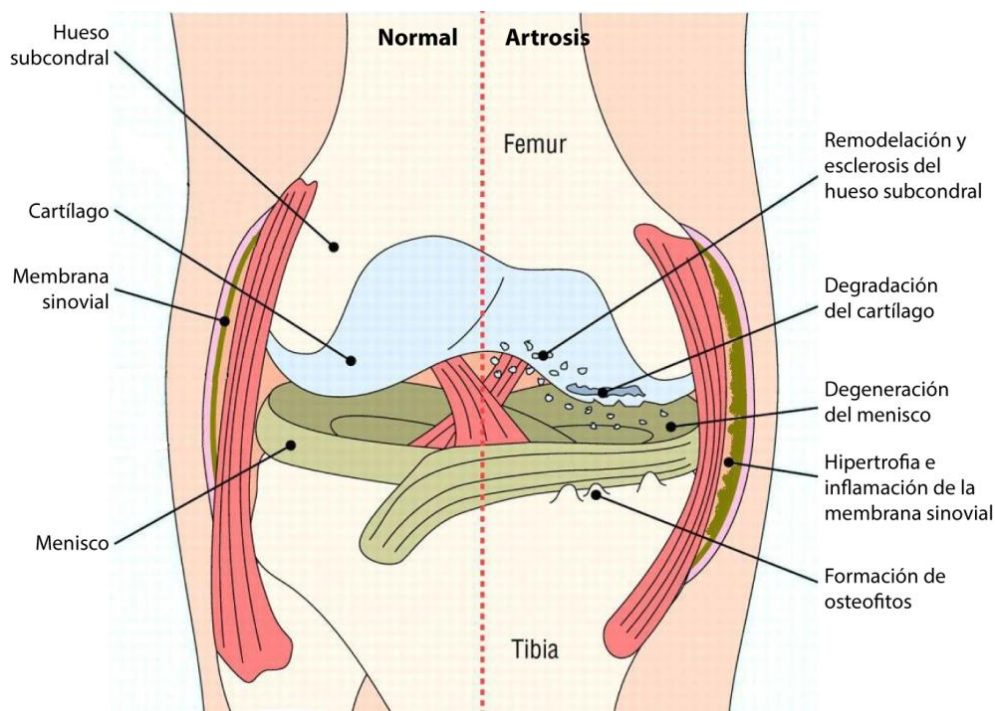
La interacción entre el colágeno, el agua y los distintos proteoglicanos que forman la MEC confiere al cartílago articular sus funciones y propiedades físicas y mecánicas, siendo un tejido altamente resistente a la deformación por fuerzas compresivas (12). Esta resistencia a la deformación se asocia principalmente con su capacidad de eliminar el agua que hidrata a los proteoglicanos mientras está sometido a presiones para, posteriormente, recaptarla por ósmosis y recuperar sus dimensiones y forma originales (13). Los agregados de agregano poseen la capacidad de secuestrar agua. Las cargas electronegativas de los azúcares sulfatados hacen que las cadenas laterales del monómero se repelen unas a otras y atraigan agua. La asociación de moléculas de colágeno confiere a estos sistemas fuerza tensional, restringe el movimiento de los agregados de agregano y limita la absorción máxima de agua.

### **3. EL CARTÍLAGO ARTICULAR EN LAS ENFERMEDADES REUMÁTICAS**

Las articulaciones sufren alteraciones con elevada frecuencia. Una de las causas puede ser el propio estrés mecánico al que está sometida la articulación, como resultado de su función, lo que derivaría en alguna forma de artrosis. Por otro lado, los daños también se pueden deber a patologías inflamatorias articulares autoinmunes como la artritis reumatoide. En este tipo de enfermedades reumáticas, el cartílago articular sufre un gran número de alteraciones que tienen como proceso final la degradación irreversible del cartílago (12).

La artrosis (OA, del inglés *osteoarthritis*) es una de las enfermedades reumáticas asociada con la destrucción del cartílago. Se define por la OARSI (*OA Research Society International*) como un trastorno que afecta a articulaciones móviles caracterizado por

estrés celular y degradación de la matriz extracelular iniciado por micro- y macro-lesiones que activan respuestas de reparación que incluyen vías pro-inflamatorias de la inmunidad innata. La enfermedad se manifiesta primero como una alteración molecular (metabolismo anormal en el tejido articular), seguida de alteraciones anatómicas y/o fisiológicas (caracterizada por la degradación del cartílago, la remodelación del hueso subcondral, la formación de osteofitos, inflamación articular y pérdida de la función normal de las articulaciones), que pueden culminar en la aparición de los síntomas de la enfermedad (14) (Figura 4).



**Figura 4. Características de la patología de la artrosis.** Imagen modificada de (15).

La artrosis es la enfermedad reumática más frecuente en los países desarrollados. Afecta a alrededor del 12% de la población occidental. Estudios de prevalencia publicados en 2014, reflejaron que la mayoría de los individuos mayores de 65 años presentan evidencias de esta patología (16). En España, la artrosis de rodilla afecta al 10,2% de la población adulta (5,7% en hombres y 14% en mujeres) (17). Los síntomas



de la enfermedad generalmente se acompañan de dolor mecánico, rigidez articular y pérdida de función de la articulación en las fases más avanzadas.

Todavía hoy no están claras las causas que originan esta enfermedad. Se sabe que existe un componente mecánico, de desgaste del cartílago articular, al perderse en los condrocitos el equilibrio entre los procesos anabólicos (síntesis de matriz extracelular) y catabólicos (degradación de matriz extracelular) que mantiene la integridad de la MEC (18). Además, diferentes estudios han señalado una reducción en el número de condrocitos, debida en parte a procesos apoptóticos (6,19).

Como resultado de la degradación de la matriz del cartílago, se generan fragmentos de moléculas de la MEC que son liberados al fluido sinovial. Estos mismos son capaces de inducir, tanto en el condrocito como en la membrana sinovial, la producción de citoquinas y óxido nítrico (NO, *nitric oxide*), además de la síntesis de metaloproteasas (20). También, se ha descrito que el condrocito puede reaccionar a la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, *damage associated molecular patterns*), las cuales han sido descritos como ligandos de receptores tipo Toll (TLRs, *Toll-like receptors*) y receptores de productos finales de glicosilaciones (RAGE, *receptor for advanced glycation end products*) (20,21). De este modo, se produce una intercomunicación entre los distintos tejidos que componen la articulación que provoca y perpetúa una respuesta inflamatoria, a través de un gran número de mediadores, que acaban dañando de forma irreversible a la estructura articular en su conjunto (22). A continuación se detallan los cambios más importantes que tienen lugar en la articulación durante el proceso artrósico.

### **3.1. Mecanismos de destrucción del cartílago**

Entre los mecanismos implicados en la destrucción del cartílago articular destacan los factores mecánicos y los factores bioquímicos.

**a. Factores mecánicos:** el estrés mecánico en un rango fisiológico induce la actividad anabólica, produciéndose la renovación de la matriz; mientras que un rango superior al fisiológico aumenta la actividad catabólica, generándose una pérdida progresiva de la MEC. Cómo el factor mecánico regula la actividad metabólica del condrocito no es del todo conocida; sin embargo, se han descrito mecanismos de mecano-transducción en el cartílago (23,24).

**b. Factores bioquímicos:** el elemento más importante en la degradación del cartílago es la síntesis y actividad de diferentes tipos de proteasas. Las proteasas más estudiadas y relacionadas con el desarrollo de la OA son las metaloproteasas de matriz (MMPs) y las proteasas ADAMTS (6).

Las MMPs más importantes en el proceso artrósico son las colagenasas (MMP-1, MMP-8 y MMP-13) y las estromelisinias (MMP-3 y MMP-10). La expresión de la MMP-13 en el cartílago artrósico y su capacidad para degradar colágeno tipo II, la convierten en una de las enzimas más importantes en la degradación del cartílago en pacientes con OA. La actividad proteolítica de las MMPs se regula a tres niveles: a nivel de regulación de la transcripción génica, activación del proenzima e inactivación por TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*), también capaces de inhibir a ADAMTS-5 (25).

Las ADAMTS (*a desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) contienen a las principales agrecanasas (ADAMTS-1, ADAMTS-4, ADAMTS-5 y

ADAMTS-9) responsables de la degradación del agregado de la MEC. ADAMTS-5 es la predominante en el desarrollo de OA (26).

### 3.2. Procesos inflamatorios en el cartílago

Aunque la OA se ha considerado durante décadas como una artropatía no inflamatoria, cabe destacar que mediadores pro-inflamatorios son producidos por sinoviocitos y condrocitos durante el desarrollo de la enfermedad (Tabla II). De hecho, factores inflamatorios han sido detectados en el líquido sinovial de pacientes con OA, aunque los niveles son más bajos de los que se han encontrado en pacientes AR (27).

**Tabla II. Principales mediadores de la inflamación.**  
Factores proinflamatorios producidos por los condrocitos y los sinoviocitos durante la progresión de la OA.

Citoquinas	Catabólicas: IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-18 Anabólicas: TGF- $\beta$ Moduladoras: IL-6, IL-8 Inhibidoras: IL-10, INF- $\gamma$
Quimioquinas	IL-8 MCP-1
Eicosanoides	Prostaglandinas: PGE <sub>2</sub> Tromboxanos: Tromboxano A <sub>2</sub> Leucotrienos: LTB <sub>4</sub> , LTC <sub>4</sub>
Óxido nítrico (NO)	
Ligandos de TLRs	DAMPs Alarminas: S100A4, A8, A9, y A11
Adipoquinas	Leptina Adiponectina Lipocalina 2

Actualmente se cree que el desarrollo y la progresión de la OA involucran también la inflamación incluso en las primeras fases de la enfermedad. Estudios

epidemiológicos muestran un claro enlace entre la progresión del daño del cartílago tibio-femoral y la presencia de una membrana sinovial inflamada (la denominada sinovitis) (28,29). Los cambios histológicos observados en la membrana sinovial, tanto en la fase temprana como en la fase tardía de la OA, incluyen indicios de sinovitis, como la hiperplasia de la membrana, infiltración de macrófagos y fibrosis. Aunque se desconocen las causas de la inflamación sinovial en OA, la hipótesis más acreditada es que los fragmentos de cartílago precipiten en la articulación y entren en contacto con la membrana sinovial, que los reconoce como agentes extraños al cuerpo. Como consecuencia, las células sinoviales reaccionan produciendo mediadores inflamatorios, que se acumulan en el fluido sinovial. Estos mediadores pueden activar los condrocitos presentes en la capa superficial del cartílago, induciendo la producción de MMPs y perpetuando la destrucción del cartílago. La sinovitis se asocia con el empeoramiento de los síntomas de la OA, como el dolor, la rigidez y el hinchazón a nivel articular, así como una mayor rapidez en la degeneración del cartílago (30).

Los procesos degenerativos de las articulaciones están, en gran medida, modulados por la actividad de citoquinas pro-inflamatorias y otros factores que inducen modificaciones profundas en la fisiología del condrocito, que tienen como consecuencia procesos de desdiferenciación, procesos apoptóticos y un aumento en la producción de MMPs.

En el tejido articular, las citoquinas se han clasificado según su función en catabólicas (pro-inflamatorias), anabólicas, moduladoras e inhibidoras. El balance entre citoquinas catabólicas y anabólicas determinará la integridad del cartílago (6).

Las citoquinas pro-inflamatorias más importantes en la patología artrósica son la interleuquina 1 (IL1) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). La IL1 parece estar

asociada con la destrucción del cartílago y el TNF $\alpha$  con la activación de la cascada inflamatoria. Ambas son capaces de estimular su propia producción y la de otros mediadores inflamatorios (IL8, IL6), además de incrementar la síntesis de enzimas catabólicas (MMPs), inhibir la síntesis de los inhibidores de estas mismas (TIMPs) e impedir la síntesis de componentes de la MEC, como proteoglicanos y colágeno II. También se ha descrito que estimulan la síntesis de las isoformas inducibles de las enzimas óxido nítrico sintasa (iNOS) y ciclooxigenasa (COX2), aumentando así la síntesis y liberación de óxido nítrico (NO) y prostaglandinas catabólicas, respectivamente (20,31).

La IL1 lleva a cabo sus funciones mediante su unión específica con un receptor transmembrana tipo I (IL1RI) (32,33). Este receptor pertenece a la superfamilia de receptores de IL1, también conocida como receptores similares a Toll (*Toll Like Receptors*, TLR), entre los que están los receptores para el LPS (32,34). Todos ellos comparten un dominio Toll-IL1 receptor (TIR) y activan el mismo tipo de quinasas que participan en la cascada de señalización empleada por la unión de IL1 al IL1RI (32). El TNF $\alpha$  se une a dos receptores distintos, receptor de TNF tipo I (TNFRI) y receptor de TNF tipo II (TNFRII). La expresión de TNFRI está aumentada en condrocitos y fibroblastos sinoviales de pacientes con artrosis comparándolos con controles sanos (35). Debido a esto, parece que TNFRI es el principal mediador de la actividad del TNF $\alpha$  en tejidos articulares (36).

Además de las citoquinas pro-inflamatorias, otros mediadores biológicos desempeñan también un papel fundamental en el proceso inflamatorio, entre ellos, el más importante es el NO. El NO es un radical libre que promueve procesos inflamatorios y catabólicos, ya que induce apoptosis en condrocitos (37) y sinoviocitos

(38), activa MMPs en el condrocito (39), induce la expresión de COX2 y la síntesis de PGE<sub>2</sub> (40), e inhibe la síntesis de colágeno y proteoglicanos. La cantidad de NO producida por el tejido artrósico está en relación directa con el grado de lesión del cartílago (18).

#### **4. LAS ADIPOQUINAS. MEDIADORES DE LA DEGRADACIÓN Y DE LA INFLAMACIÓN DEL CARTÍLAGO ARTICULAR**

Hasta la década de los 90, el tejido adiposo blanco (TAB) se consideraba únicamente como un tejido de almacenamiento de energía. Aunque era conocida la secreción de distintos tipos de moléculas por parte de los adipocitos, como el colesterol, hormonas esteroideas o ácidos grasos, la consideración de este tejido como un órgano endocrino se forjó tras el descubrimiento de la leptina en 1994, una proteína sintetizada por el TAB (41). En los últimos años, se ha reconocido al TAB ser un verdadero órgano endocrino, capaz de secretar una amplia variedad de moléculas pleiotrópicas, las denominados adipoquinas (42). El término adipoquina se aplica a moléculas biológicamente activas producidas por los adipocitos del TAB que comparten unas propiedades estructurales y funcionales con las citoquinas que participan mediante mecanismos de acción endocrinos, paracrinos, autocrinos y yuxtacrinos en una amplia variedad de procesos fisiológicos y patológicos, incluidas la inmunidad y la inflamación (43). Sin embargo, estos factores pueden ser sintetizados por otros tejidos y participar en funciones no relacionadas con las funciones típicas del TAB (42).

Las adipoquinas contribuyen al “estado de inflamación subclínico” que presentan los individuos obesos y promueven una serie de aberraciones metabólicas que

incluyen complicaciones cardiovasculares y enfermedades inflamatorias autoinmunes que afectan a las articulaciones y a los huesos (43,44). Actualmente, se consideran a las adipocinas como representantes de una nueva familia de compuestos que actúan como elementos clave en la compleja red de mediadores solubles implicados en la fisiopatología de las enfermedades reumáticas. La obesidad, la condición que ha estimulado la investigación sobre las adipocinas en los últimos años, ha sido considerada un factor de riesgo para la OA. Se ha descrito que la obesidad aumenta la incidencia de OA, en particular en las articulaciones que soportan peso, como las rodillas. Una hipótesis que prevalece es que la obesidad aumenta la carga mecánica sobre el cartílago articular, llevando a su degeneración. Sin embargo, la obesidad también se asocia con OA en las articulaciones que no soportan peso, tales como las de los dedos, las manos y las muñecas, lo que sugiere que factores metabólicos contribuyen a la alta prevalencia de OA en individuos obesos (45). Por ello se cree que las adipocinas pueden ser el nexo de unión entre la obesidad y OA.

#### **4.1. La leptina. La precursora de la superfamilia de las adipocinas**

La leptina una hormona de 16 kDa que pertenece a la superfamilia de las citoquinas de clase I. Es sintetizada principalmente por los adipocitos, aunque también se sintetiza en otros tejidos, como en el hueso (46) o el cartílago articular, donde es producida por los condrocitos (47). Los niveles circulantes de leptina dependen fundamentalmente de la cantidad de masa grasa y el índice de masa corporal. Sin embargo, su expresión también está regulada por el estado nutricional (48,49) o mediadores inflamatorios (50). Actúa a nivel central induciendo una disminución de la

ingesta y un aumento del gasto energético a través de la activación de factores anorexigénicos y la supresión de los péptidos orexigénicos (51).

Sin embargo, se ha demostrado que la leptina ejerce distintas funciones en numerosos tejidos periféricos. Diversos estudios han evidenciado el papel catabólico y pro-inflamatorio de la leptina a nivel de la articulación (52–57), sugiriendo un posible papel como biomarcador de enfermedades reumáticas como la artrosis o la artritis reumatoide. El grupo NEIRID describió por primera vez el efecto pro-inflamatorio de la leptina en los condrocitos. Demostró que la leptina en combinación con interferón- $\gamma$  y con IL1 era capaz de aumentar sinérgicamente la producción de NO en condrocitos (52,53). De la misma manera, la leptina, sola o en sinergia con IL1, aumentaba la expresión de iNOS y COX2 y la producción de NO, PGE<sub>2</sub>, IL6 y IL8 en el cartílago de pacientes OA, sugiriendo que esta adipoquina era un factor capaz de aumentar la producción de moléculas pro-inflamatorias en el cartílago (40). Además, la leptina aumenta la producción de MMP-1, MMP-3 y MMP-13 en el cartílago de pacientes OA, sugiriendo un papel catabólico (57). Asimismo, la leptina puede perpetuar los procesos de degradación del cartílago al inducir la expresión de la molécula de adhesión vascular VCAM-1, implicada en el reclutamiento de leucocitos en la articulación inflamada (56). Recientemente se observó que la leptina está altamente expresada en la grasa infrarrotuliana y en la sinovia de pacientes artrósicos en comparación con individuos sanos (58). Por otro lado, la falta de señalización de la leptina asociada a obesidad extrema no implica un incremento en la degradación del cartílago. Esto sugiere que la obesidad *per se* no representa un factor de riesgo para la degeneración de la articulación, es necesaria la acción de la leptina en el desarrollo de OA asociada a la obesidad (59).



#### **4.2. La adiponectina. Una adipoquina con propiedades metabólicas únicas**

La adiponectina, también llamada GBP28 (*gelatin-binding protein 28*), apM1 (*adipose most abundant gene*), Acrp30 (*adipocyte complement related protein 30*) o AdipoQ, es una proteína de 30 kDa sintetizada mayoritariamente en el tejido adiposo (60). Sus características duales la convierten en una adipoquina singular. A nivel sistémico presenta actividad anabólica; sin embargo, a nivel local actúa como un factor catabólico, contribuyendo a la degradación del cartílago y a su estado inflamatorio (54–56,61,62).

Al contrario de la mayoría de las adipoquinas, los niveles de adiponectina están disminuidos en la obesidad y en el síndrome metabólico, y se incrementan con la pérdida de peso (63). Es más, la adiponectina participa en el balance de la homeostasis energética interrelacionando el metabolismo de carbohidratos y de lípidos (64). Se ha demostrado que la adiponectina posee función anti-aterogénica (65), mejora la sensibilidad a insulina y reduce la concentración de ácidos grasos circulantes al incrementar la oxidación de ácidos grasos y la captación de glucosa en el músculo y reduce la síntesis de glucosa en el hígado (66). Además, la adiponectina está implicada en la modulación de la respuesta inflamatoria, dado que atenúa la respuesta inflamatoria mediada por TNF $\alpha$  e inhibe la actividad fagocítica de los macrófagos (42).

Por otro lado, a nivel del cartílago articular, la adiponectina es capaz de aumentar la secreción de mediadores pro-inflamatorios como el NO, IL6, la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) y las metaloproteasas MMP-3 y MMP-9 por parte de los condrocitos (61,67,68). Además, recientemente se ha observado que, así como la leptina, la adiponectina también induce la expresión de VCAM-1 (56) y la secreción de IL8 (55) en los condrocitos, contribuyendo, respectivamente, a la

infiltración de leucocitos y al gradiente quimiotáctico presente en las articulaciones inflamadas. Estos resultados sugieren que la adiponectina, de la misma manera que la leptina, podría perpetuar el proceso de degradación del cartílago.

## **5. NUEVAS ADIPOQUINAS IMPLICADAS EN EL METABOLISMO DEL CARTÍLAGO ARTICULAR: PROGRANULINA.**

Todo lo anterior hace pensar que las células del tejido adiposo en condiciones fisiológicas y patológicas secretan moléculas, que probablemente funcionen como potentes moduladores de la respuesta inflamatoria en el cartílago y podrían contribuir, en parte, a la degradación del cartílago a través de la circulación sistémica o local. Por ello, en los últimos años, se ha venido estudiando nuevas moléculas producidas por los adipocitos como potenciales adipoquinas. Así, en el año 2012, mediante análisis proteómicos para buscar nuevas adipoquinas, se identificó a la progranulina como potencial candidata (69).

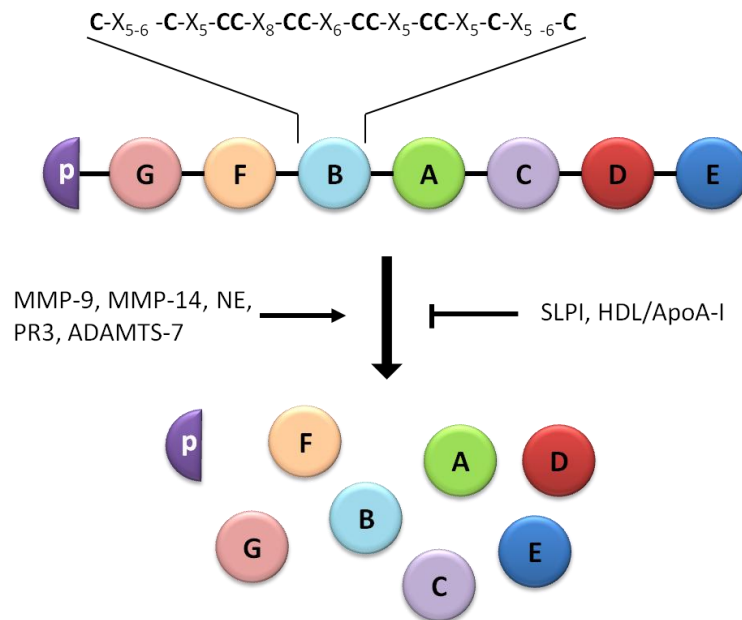
La progranulina (PGRN) fue descubierta en 1990 como una glicoproteína acrosomal, llamada entonces acrogranina, sintetizada durante la espermatogénesis (70). La PGRN también es denominada como PCDGF (*PC-cell derived growth factor*) (71), proepitelina (72), GP88 (73) o GEP (*granulin-epithelin precursor*) (74). Debido a su naturaleza pleiotrópica, es secretada por múltiples tejidos y se expresa en una gran variedad de tipos celulares, entre las que se incluyen células epiteliales, neuronas, células hematopoyéticas, células del músculo esquelético (75), macrófagos (76), condrocitos (77,78), tejido adiposo (69), o células endoteliales (79).

Se ha descrito la implicación de la PGRN en una amplia variedad de procesos biológicos, como cicatrización de heridas y reparación de tejidos (80,81), desarrollo embrionario (82), cáncer (83) y en diversas enfermedades de etiología inflamatoria (84). De hecho, el papel de la PGRN ha sido ampliamente estudiado en inflamación, con propiedades anti-inflamatorias en la artritis reumatoide (AR). Asimismo, sus características de protección y promoción del crecimiento son de particular interés en enfermedades articulares como la OA (85). Recientemente, se ha identificado como un factor estimulante de la condrogénesis, y es considerado un importante regulador de la formación y función de cartílago (86).

### **5.1. Estructura de la progranulina**

La PGRN humana está codificada por el gen *GRN*, localizado en el cromosoma 17q21, que codifica para una proteína de 593 aminoácidos y 68,5 kDa (87,88), aunque puede aparecer en Western blot con un peso molecular de 88 kDa debido a ser altamente glicosilada. El ortólogo murino (*Grn*) se localiza en el cromosoma 11 y codifica para una proteína de 589 aminoácidos, con una homología del 79% con la proteína humana (88). La PGRN consiste en un péptido señal para la secreción N-terminal de 17 aminoácidos y de siete repeticiones y media de dominios granulina (71). Estos dominios están compuestos por repeticiones en tándem de un motivo con 12 cisteínas (89). Cuando la PGRN es secretada, ésta puede ser procesada proteolíticamente en las regiones de unión entre los dominios granulina por proteasas de serina y treonina, como las metaloproteasas de matriz MMP-9 (90) y MMP-14 (91), ADAMTS-7 (92), elastasa y proteinasa 3 (93). Como consecuencia, se liberan péptidos

individuales de granulina de aproximadamente 6 kDa (Figura 5). El inhibidor de proteasas secretadas por leucocitos (SLPI, *secretory leukocyte protease inhibitor*) se une a la PGRN y previene su escisión en granulinas pro-inflamatorias por la acción de la elastasa de neutrófilos (81). Además del SLPI, la HDL/apolipoproteína A-I también se une a la PGRN formando un complejo que suprime la conversión en granulinas (76).



**Figura 5. Estructura y procesamiento de la PGRN.** Cada círculo representa un dominio granulina que contiene el motivo de consenso de 12 residuos de cisteína, así como el medio dominio de granulina (medio círculo, p). La PGRN se puede escindir en los dominios individuales por MMP-9, MMP-14, NE (*Neutrophil elastase*) y PR3 (*Proteinase 3*) y ADAMTS-7. Tanto SLPI como HDL/Apo AI se pueden unir e inhibir la escisión de PGRN. Modificado de (94).

## 5.2. La progranulina como nuevo ligando de los receptores de TNF- $\alpha$

Tanto la proteína precursora, la PGRN, como las granulinas tienen actividad biológica, pero queda por dilucidar si los efectos sobre los diferentes tipos celulares están mediados por un único receptor o más bien por la interacción con diferentes proteínas de unión. Para abordar esta cuestión, el grupo de Chuan-Ju Liu, empleando el sistema de doble híbrido, realizó una búsqueda para la detección de proteínas de unión a

PGRN, que condujo a la identificación del receptor de TNF $\alpha$  (TNFR) como receptor asociado a PGRN. La interacción entre PGRN y TNFR fue confirmada por co-immunoprecipitación en condrocitos humanos (95).

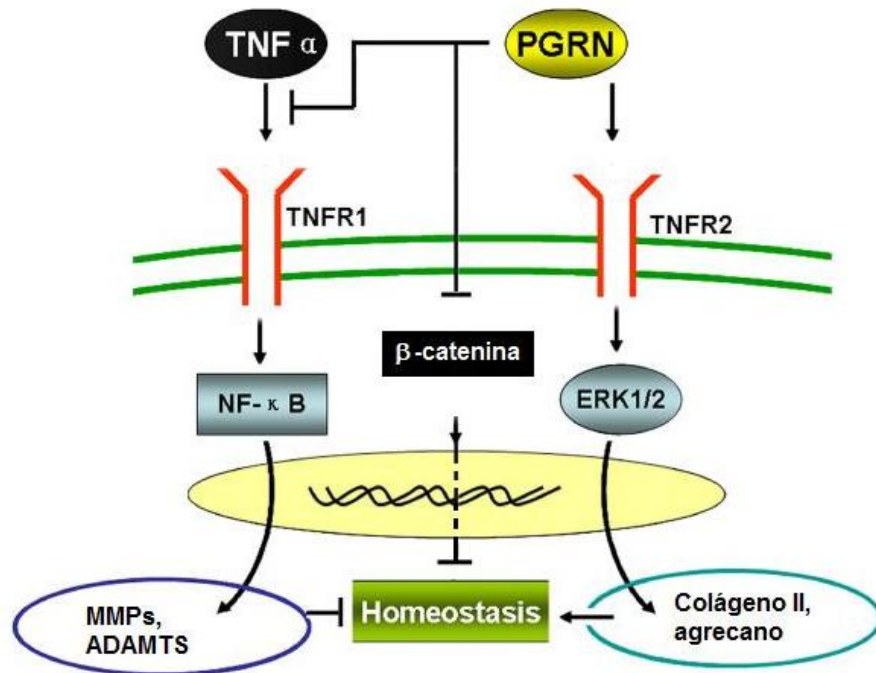
La importancia de la señalización de TNF $\alpha$ /TNFR reside en su papel clave en la cascada de citoquinas pro-inflamatorias y en su dominio en la patogénesis de diversas enfermedades, y en particular, de trastornos autoinmunes (96). Los fármacos biológicos, como el etanercept, infliximab y adalimumab, son eficaces anti-inflamatorios empleados en la terapia contra AR, ya que bloquean la acción del TNF $\alpha$  (97). El TNF $\alpha$  actúa a través de dos receptores distintos, TNFR1 y TNFR2. TNFR1 se expresa de forma ubicua y media la cascada de señales pro-inflamatorias. En cambio, TNFR2, cuya señalización ha sido menos estudiada, se encuentra predominantemente en las células hematopoyéticas, y varios estudios han demostrado su papel en una respuesta anti-inflamatoria (98).

Estudios de la cinética de unión mostraron que la PGRN exhibe una afinidad de unión por el TNFR1 comparable con la del TNF $\alpha$ ; en contraste, la PGRN se une al TNFR2 con una afinidad 600 veces mayor que el TNF $\alpha$  (95,99). Notablemente, la PGRN mostró efectos anti-inflamatorios en varios modelos de artritis inflamatoria mediada por TNF $\alpha$ , incluyendo artritis inducida por colágeno y artritis espontánea en modelos transgénicos de TNF $\alpha$  (86,100). Para identificar los dominios de unión de la PGRN al TNFR se realizaron una serie de moléculas de PGRN con deleciones y se analizaron las interacciones con TNFR. Las unidades de granulina (A, B, C, D, E, F o G) o las regiones de unión no eran capaces de unirse a TNFR por sí solas. Finalmente, se identificaron tres fragmentos de granulina F, A, C y sus regiones de unión adyacentes como responsables de la unión a TNFR. Probablemente, estos tres fragmentos imitan la

estructura trimérica del TNF $\alpha$  cuando se une al TNFR (84). Basándose en estos resultados, Tang *et al.* combinaron esos fragmentos para diseñar una proteína, llamada Atsttrin (*Antagonist of TNF/TNFR Signaling via Targeting to TNF Receptors*), que sólo contenía media unidad de las granulinas F, A y C más las tres regiones de unión, y que se une selectivamente al TNFR. Atsttrin presenta mayor efectividad en el tratamiento de la artritis inflamatoria que la PGRN (95). En resumen, el hallazgo de la interacción PGRN-TNFR proporciona información molecular sobre el mecanismo subyacente de las actividades anti-inflamatorias mediadas por PGRN, y presentan a la PGRN, y a su derivado de Atsttrin, como la próxima generación de fármacos para varios tipos de enfermedades inflamatorias (85,86,101,102).

### 5.3. La progranulina en las enfermedades reumáticas

La PGRN juega un papel clave en la regulación del equilibrio de la MEC mediante la protección y la prevención de la degradación de los componentes integrales del cartílago (12,103). La deficiencia de PGRN conduce a la aparición de un fenotipo similar a la OA en ratones envejecidos y en modelos de artritis inducida (103). Los niveles de PGRN se han encontrado elevados en muestras de cartílago de pacientes con OA o AR (78). Además, en pacientes con AR, los niveles de PGRN, tanto séricos como del fluido sinovial, son significativamente superiores a los controles sanos de la misma edad (104). Recientemente, se ha demostrado que los niveles de PGRN se incrementan en el lugar de la inflamación y están asociados a la actividad de la enfermedad en pacientes con AR (105).



**Figura 6. Modelo propuesto para el papel de la PGRN en el desarrollo de la artrosis.**

Modificado de (103).

El grupo de Chuan-ju Liu ha demostrado cómo la PGRN antagoniza al TNF $\alpha$ , mediante la unión a sus receptores, en modelos murinos de artritis inflamatoria (95). Ratonos deficientes en PGRN mostraron pérdida de la estructura del cartílago y un fenotipo artrósico en aquellos de mayor edad, mientras que la administración local de la proteína recombinante PGRN atenuaba la degradación de la matriz del cartílago en modelos de OA inducida quirúrgicamente. En base a sus estudios, la PGRN juega un papel protector en la progresión de la OA a través de múltiples vías (Figura 6). En primer lugar, la PGRN promueve el anabolismo de los condrocitos, ya que activa la señalización de ERK1/2 y eleva los niveles de marcadores anabólicos como colágeno II y agregcano, principalmente a través de receptores de TNFR2. En segundo lugar, la unión de la PGRN al TNFR1 impide la activación de la vía NF- $\kappa$ B por parte del TNF $\alpha$ , el cual induce MMPs y ADAMTS, inhibiendo así la degradación del cartílago. Y en tercer lugar, la PGRN interactúa con la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina, cuya activación promueve

la degeneración del cartílago en OA. Se ha observado que ratones deficientes en PGRN presentaban una activación de la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina (103). Adicionalmente, la PGRN se define como condroprotectora en base a las evidencias que muestran la estimulación de la proliferación y diferenciación de los condrocitos cuando se sobre-expresa esta proteína (106). La PGRN también actúa en la osificación endocondral de la placa de crecimiento durante el desarrollo a través de TNFR2 (77,92).

## **6. NUEVAS ADIPOQUINAS IMPLICADAS EN EL METABOLISMO DEL CARTÍLAGO ARTICULAR: WISP-2.**

En el año 2012, Dahlman y colaboradores describieron la regulación del gen de WISP-2 en obesidad y según la región del tejido adiposo a estudio. Además, el análisis *in silico* aportaba una alta puntuación como potencial adipoquina. Así, tras el análisis del secretoma de adipocitos, identificaron a WISP-2 como una potencial adipoquina (107).

WISP-2 fue descubierta como una proteína regulada al alza en la línea celular epitelial murina C57NG tras la transformación con Wnt-1 (108). De este hecho procede su nombre, *Wnt-1 inducible signaling pathway protein 2*, aunque también es denominada CCN5, ya que pertenece a la familia de proteínas CCN (109), o CTGF-L (*connective tissue growth factor-like protein*) (110). Se trata de una proteína matricelular de secreción, altamente expresada en células madre mesenquimales y preadipocitos (111). Además, se encuentra en células del músculo liso (112), osteoblastos y condrocitos (113). Diversos estudios han descrito la implicación de WISP-2 en una amplia variedad de procesos fisiopatológicos, como el desarrollo

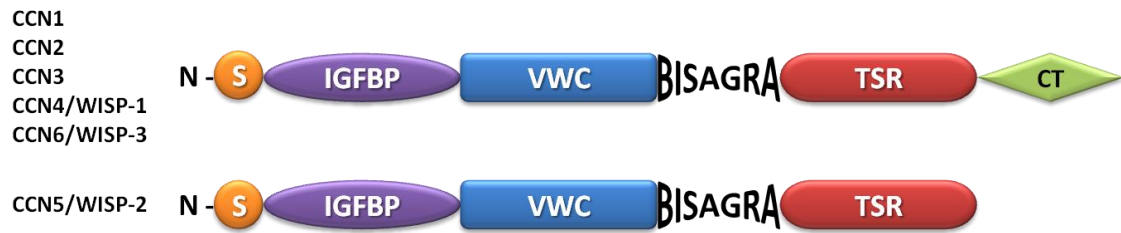


embrionario, la diferenciación y proliferación celular, reparación de tejidos, motilidad y cáncer (114). De hecho, Grünberg y colaboradores han descrito el papel de WISP-2 como un mediador clave en la activación canónica de la ruta Wnt en preadipocitos, manteniendo los adipocitos en estado indiferenciado, sugiriendo la implicación de esta adipocina en el desarrollo de complicaciones metabólicas relacionadas con la obesidad (115).

### **6.1. Estructura de WISP-2**

El gen humano *WISP2*, se encuentra localizado en el cromosoma 20q12-20q13, y codifica para la proteína WISP-2 de 250 aminoácidos y 27kDa. El ortólogo murino (*Wisp2*) se localiza en el cromosoma 2 y codifica para una proteína de 251 aminoácidos, con una homología del 73% con la proteína humana (108).

Como miembro de la familia de proteínas CCN, WISP-2 comparte la estructura modular característica de esta familia (Figura 7). La mayoría de las proteínas CCN presentan una señal de secreción N-terminal, o péptido señal, seguido de 4 dominios. Las seis proteínas CCN tiene dominios conservados con homología de secuencia a proteínas de unión a factores de crecimiento similares a insulina (IGFBP, *insulin-like growth factor binding protein*), factor de von Willebrand tipo C (VWC, *von Willebrand factor type C repeat*), y trombospondina tipo 1 (TSR, *thrombospondin type I repeat*). Sin embargo, WISP-2 carece del dominio carboxi-terminal (CT). Entre los dominios VWC y TSR se encuentra una región altamente variable entre los diferentes miembros de la familia CCN, la región bisagra, susceptible de degradación proteolítica por MMPs (116).



**Figura 7. Representación esquemática de la familia de proteínas CCN.** Se muestra la estructura multimodular, con una señal de secreción N-terminal seguida de 4 dominios con homología a proteínas de unión a factores de crecimiento similares a insulina (IGFBP), el factor de von Willebrand tipo C (VWC), trombospondina tipo 1 (TSR) y el dominio carboxi-terminal (CT, ausente en WISP-2). Entre los dominios VWC y TSR se encuentra la región bisagra. Modificado de (117).

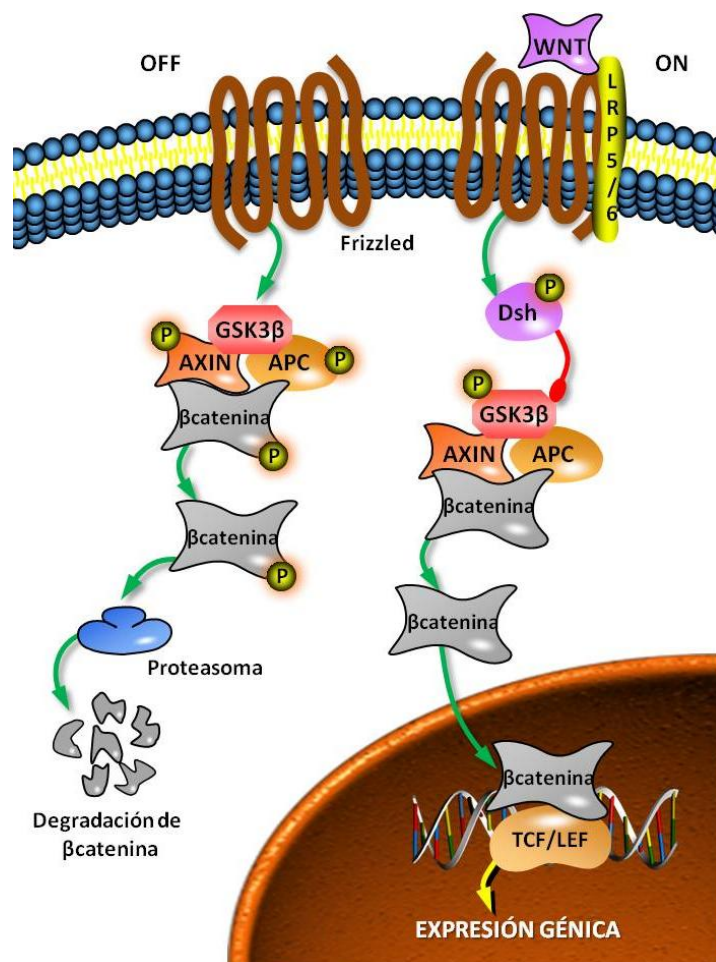
Aunque el receptor de WISP-2 se desconoce, como proteína de secreción y miembro de la familia CCN, cabría esperar que su actividad fuera mediada a través de receptores de membrana. De hecho, las proteínas CCN se unen a receptores de superficie, como intergrinas o los co-receptores LRP6 (*low-density lipoprotein receptor-related proteins*). Las proteínas CCN puede modular la ruta Wnt, en parte, mediante la unión al co-receptor LRP6 (118), y, a pesar de la falta del dominio CT, recientemente se ha demostrado la fosforilación de LRP6 por WISP-2 en adipocitos murinos (115).

## 6.2. La ruta canónica de Wnt

Dado que WISP-2 fue descrita inicialmente como una proteína inducida por Wnt-1, múltiples han sido los estudios para describir la relación entre la ruta Wnt y la función de WISP-2. A menudo, se emplea como marcador de la activación canónica de Wnt (119). Y es que los datos actuales están a favor de una clara participación de la ruta Wnt en las enfermedades reumáticas.

La ruta canónica de señalización Wnt se activa por la unión de proteínas Wnt, como Wnt-1, Wnt-3a o Wnt-7b, a los receptores Frizzled y los co-receptores LRP5/6,

causando que Dsh (*dishevelled*) fosforile e inactive a GSK3 $\beta$  (glucógeno sintasa quinasa 3 beta, *glycogen synthase kinase 3 beta*). La inactivación de GSK3 $\beta$  conlleva la acumulación intracelular de  $\beta$ -catenina, ya que ésta ya no está marcada para su degradación en el proteasoma por fosforilación de GSK3 $\beta$ . El exceso de  $\beta$ -catenina en el citoplasma se trasloca al núcleo donde se une a factores de transcripción TCF/LEF (*T-cell factor/lymphoid enhancer factor*), activando la transcripción de los genes diana (Figura 8). La fosforilación de GSK3 $\beta$  es un paso clave, y la inhibición de esta enzima conduce a la estabilización de  $\beta$ -catenina y al inicio de la expresión de los genes diana independientemente de la unión de proteínas Wnt los receptores.



**Figura 8. La ruta canónica de señalización Wnt.** En estado apagado (*Off*),  $\beta$ -catenina se asocia al complejo multiproteico formado por APC (*Adenomatous Polyposis coli*), axina y GSK3 $\beta$  y es

fosforilada por éste último. Posteriormente es degradada vía proteasoma. En estado activado (*On*), las proteínas Wnt actúan a través de receptores Frizzled asociados al co-receptor LRP5/6 activando a Dsh, que conduce a la inactivación de GSK3 $\beta$ , que ya no puede fosforilar a  $\beta$ -catenina. El exceso de  $\beta$ -catenina en el citoplasma se trasloca al núcleo donde se une a factores de transcripción TCF/LEF, activando la transcripción de los genes diana.

Recientes estudios en animales de experimentación y en muestras clínicas señalan la implicación de la ruta Wnt en la patología de la OA (120). En muestras de cartílago procedente de pacientes OA se encontraron elevados niveles de ligandos Wnt, como Wnt-7b, y de genes diana de Wnt, como WISP-1 (120), y también del co-receptor LRP5 y de  $\beta$ -catenina nuclear (121). Además, factores pro-catabólicos como la IL1 $\beta$  inducen la expresión de varias proteínas Wnt, resultando en la activación de  $\beta$ -catenina (122), y la activación de la ruta Wnt estimula la expresión de enzimas de degradación de la matriz del cartílago, como las MMPs (121, 122). Curiosamente, la inhibición de la señalización de  $\beta$ -catenina en condrocitos articulares causa un incremento de la apoptosis celular y degradación del cartílago en ratones transgénicos Col2a1-ICAT (125). Todo ello hace pensar que la activación de la ruta canónica de Wnt conduce a un exceso del catabolismo y, por tanto, a la degradación del cartílago. Sin embargo, la ruta Wnt es necesaria para el mantenimiento del cartílago articular, pero activada en exceso es deletérea.

Además, en el desarrollo de la AR también se ha visto implicada la ruta Wnt, en particular, en procesos de resorción ósea y destrucción del cartílago. Proteínas como Wnt-1 se encuentran constitutivamente activas en AR (126). La activación de Wnt produce inflamación, proliferación de la membrana sinovial y degradación de la matriz del cartílago similar a la observada en OA (127).

### **6.3. WISP-2 en las enfermedades reumáticas**

Hasta la fecha, poco se sabe sobre el posible papel de esta adipoquina en la fisiopatología del cartílago. Se ha demostrado que la expresión de WISP-2 se regula a la baja en condrocitos de pacientes OA tras someterlos a estrés mecánico (128). En un estudio del patrón de expresión de las proteínas CCN se encontró que WISP-2 se expresa en altos niveles en la membrana sinovial de pacientes OA y AR (129), y también se incrementa su expresión en muestras de grasa infrarrotuliana OA (130).

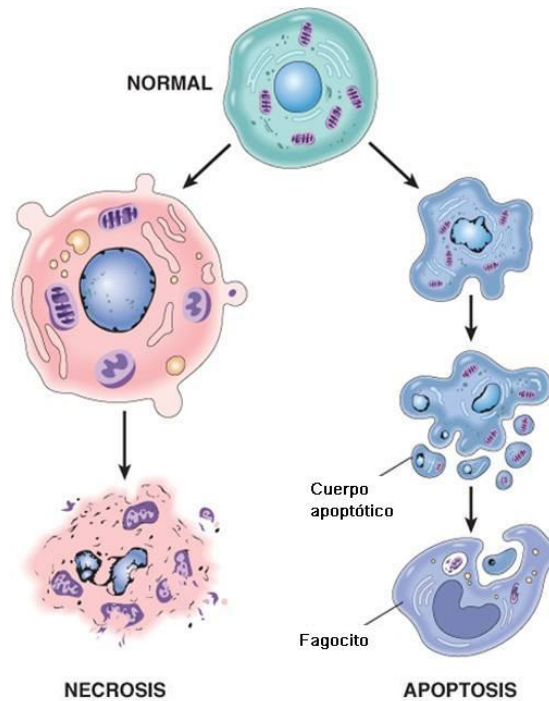
Por otro lado, WISP-2 se ha encontrado estrechamente relacionado con la patogénesis de la artritis inflamatoria (131) y la modulación del recambio óseo (110).

## **7. MUERTE CELULAR EN EL CARTÍLAGO ARTICULAR**

Los condrocitos, como único tipo celular presente en el cartílago articular, se enfrenta a un ambiente avascular, donde el oxígeno y los nutrientes los obtienen por difusión a través de una amplia matriz extracelular. En las últimas dos décadas, diversos autores han sugerido que la muerte y supervivencia de los condrocitos está estrechamente ligada a la integridad de la matriz del cartílago articular (132). La homeostasis del cartílago está mediada por los condrocitos residentes, y la pérdida de estas células debido a procesos de muerte celular conlleva la degeneración del cartílago (132,133). Por consiguiente, la muerte celular de los condrocitos se ha postulado como un evento crucial en la patogénesis de enfermedades degenerativas articulares, como la OA. Inicialmente, se sugirió la necrosis como principal mecanismo de muerte de los condrocitos. Sin embargo, los últimos estudios señalan a mecanismos de muerte celular programada, como la apoptosis (134–136).

### 7.1. Tipos de muerte celular: necrosis y apoptosis

Se han descrito varios tipos de muerte celular, principalmente dos: necrosis y apoptosis (Figura 9). Aunque difieren en aspectos mecánicos y morfológicos, ambas comprenden un espectro de eventos celulares que se superponen parcialmente.



**Figura 9. Representación esquemática de la necrosis y la apoptosis.** Adaptado de (137).

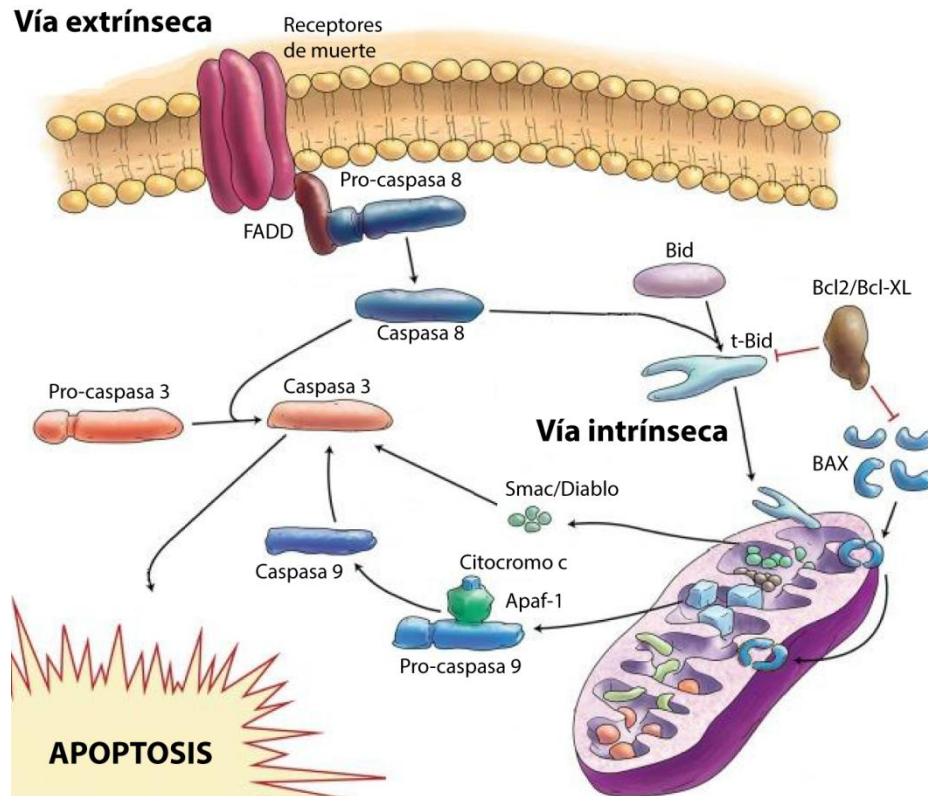
La necrosis es consecuencia de un incidente patológico. En contrapartida, la apoptosis es una forma de muerte celular programada y puede ser tanto fisiológica (por ejemplo, durante el desarrollo) como patológica. Los principales criterios que distinguen entre estos dos tipos de muerte celular se resumen en la Tabla III.

**Tabla III. Características distintivas entre necrosis y apoptosis.**

Necrosis	Apoptosis
<i>Características morfológicas</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pérdida de la integridad de la membrana</li> <li>• Hinchazón del citoplasma y mitocondrias</li> <li>• Ligera condensación de la cromatina</li> <li>• No cariolisis específica</li> <li>• Lisis total de la célula sin formación de vesículas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Membrana intacta</li> <li>• Encogimiento celular</li> <li>• Condensación de la cromatina</li> <li>• Fragmentación del núcleo</li> <li>• Formación de cuerpos apoptóticos</li> </ul>
<i>Características bioquímicas y rutas moleculares</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desintegración de los orgánulos por hinchazón</li> <li>• Pérdida de la homeostasis iónica</li> <li>• Activación de calpainas y cathepsinas</li> <li>• No requiere energía</li> <li>• Degradación aleatoria del ADN posterior al lisado celular</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permeabilización de la membrana mitocondrial</li> <li>• Liberación de diversos factores al citoplasma (citocromo c)</li> <li>• Alteraciones de la membrana (exposición de la fosfatidilserina hacia el exterior)</li> <li>• Activación de caspasas</li> <li>• ATP dependiente</li> <li>• Fragmentación del ADN no aleatoria anterior a la fragmentación del citoplasma</li> </ul>
<i>Consecuencias</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Afecta a grupos de células contiguas</li> <li>• Las células desintegradas son fagocitadas por macrófagos</li> <li>• Asociada a respuesta inflamatoria</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Afecta a células individuales</li> <li>• Fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por macrófagos o células adyacentes</li> <li>• No induce respuesta inflamatoria</li> </ul>

La apoptosis puede ser activada por señales mitocondriales (vía intrínseca) o ligandos de muerte (vía extrínseca) que convergen en la activación de caspasas (Figura 10). La vía intrínseca está regulada por moléculas anti-apoptóticas (Bcl2, Bcl-XL) y proteínas pro-apoptóticas (Bax, Smac/Diablo) que conducen a la permeabilización de la membrana mitocondrial. Se produce entonces la liberación del citocromo c para formar, junto con Apaf-1 y la caspasa 9, el apoptosoma. La caspasa 9 se activa y activa a su vez a las caspasas efectoras. Por otro lado, la vía extrínseca implica la unión de ligandos extracelulares (como TNF $\alpha$ , FasL o TRAIL) a los receptores de muerte (TNFR, Fas o

TRAILR). Consecuentemente a la activación del receptor de muerte, éste recluta moléculas adaptadoras (como FADD) que unen a su vez a la caspasa 8. La caspasa 8 se activa y activa a su vez a las caspasas efectoras, como la caspasa 3. En determinadas ocasiones, la vía extrínseca puede involucrar a la mitocondria, amplificando así la señal original (138,139).



**Figura 10. Representación esquemática de las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis.** La inducción de la apoptosis a través de receptores de muerte puede resultar en la activación de las vías extrínseca e intrínseca.

## 7.2. Estímulos pro-apoptóticos de los condrocitos

**a. Lesiones mecánicas:** Se ha demostrado que el estrés mecánico induce muerte celular en condrocitos y degradación de la matriz del cartílago (140–142). Los



estímulos mecánicos liberan proteoglicanos de la matriz y éstos inducen la producción de moléculas inflamatorias o catabólicas como MMPs, IL1 (143) o NO (141).

**b. El óxido nítrico (NO):** Los condrocitos artrósicos producen NO espontáneamente, y el cartílago normal libera altos niveles de NO en respuesta a estímulos pro-inflamatorios (como IL1 o LPS). El NO induce apoptosis y, recientemente, se ha descrito que lo hace a través de un mecanismo dependiente de mitocondria, reduciendo la actividad del Complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial y reduciendo el potencial de membrana mitocondrial (144–146). Sin embargo, ninguno de los principales inductores de NO, como la IL1, inducen apoptosis (147,148).

**c. Estrés oxidativo:** Además de inhibir la respiración mitocondria, NO tiene efectos adicionales en la mitocondria induciendo ROS (*Reactive Oxygen Species*, especies reactivas de oxígeno) (149). Se ha propuesto que el balance entre NO y ROS puede determinar el tipo de muerte del condrocito. Una baja concentración de ROS promovería la apoptosis en presencia de NO, y altos niveles de ROS fomentaría la necrosis. Los condrocitos OA presentan incrementada la producción de ROS (150). Un importante factor reductor del estrés oxidativo es la enzima superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2). La expresión de SOD2 está disminuida en los condrocitos artrósicos, lo que implica una menor capacidad anti-oxidante (151).

**d. La mitocondria:** Como ya se ha indicado en los anteriores epígrafes, la mitocondria juega un papel clave en el desarrollo de la apoptosis. Se ha demostrado que los condrocitos OA presentan una disfunción mitocondrial. Este estado en el que la actividad metabólica está reducida puede sensibilizar a los condrocitos frente a estímulos apoptóticos (151,152).

## 8. EXPOSICIÓN A CONTAMINANTES AMBIENTALES Y ENFERMEDADES REUMÁTICAS.

### Los PCBs

Los compuestos orgánicos persistentes (POPs, *persistent organic pollutants*) son contaminantes químicos orgánicos altamente tóxicos para los seres humanos. Los POPs se caracterizan por ser persistentes en el ambiente, ya que no sufren degradación; pueden sufrir transporte de largo rango a través del aire y el agua, puesto que muchos son semivolátiles; se bioacumulan en el tejido adiposo de organismos vivos, debido a su alta lipofilia; y pueden presentar biomagnificación, se acumulan en los niveles altos de la cadena trófica (153). Aunque existen POPs de origen natural, la gran mayoría son compuestos xenobióticos. Existen muchos tipos de POPs, pero en la Convención de Estocolmo de 2001 se decidió incluir doce de estos compuestos en una lista, conocida como “la docena sucia”, como los más importantes debido a su gran toxicidad y uso. La mayoría son pesticidas e insecticidas, pero también se incluyen compuestos derivados de procesos industriales (Tabla IV).

**Tabla IV. POPs incluidos en el Convenio de Estocolmo 2001 como la “docena sucia”.**

POP	Uso o fuente
Aldrín	Pesticida en cultivos de maíz y algodón
Clordano	Pesticida de uso agrícola
DDT	Pesticida en el control de la malaria
Dieldrín	Pesticida en cultivos de maíz y algodón
Endrín	Pesticida en control de plagas de insectos y roedores
Heptacloro	Insecticida de uso agrícola y doméstico
Hexaclorobenceno (HCB)	Pesticida y fungida empleado en semillas
Mirex	Insecticida y retardante de fuego
Toxafeno	Insecticida empleado en cultivos de algodón
PCBs	Empleados en la industria eléctrica y generado como subproducto industrial y de la incineración
Dioxinas policloradas (PCDDs)	Subproducto de la incineración y procesos industriales
Furanos policlorados (PCDFs)	Subproducto de la incineración y procesos industriales

Los bifenilos policlorados (PCBs, *Polychlorinated Biphenyls*) son internacionalmente reconocidos como compuestos químicos sintéticos pertenecientes al grupo de POPs. Los PCBs han sido empleados a gran escala durante las primeras décadas del siglo XX, y su producción en el sector industrial alcanzó el máximo en la década de los 60, resultando en un estado de emergencia ambiental. En estudios de humanos expuestos a PCBs, se han observado efectos nocivos sobre las funciones neurológicas, en el sistema inmune, el sistema reproductivo o la función endocrina (estos contaminantes, como las dioxinas, son conocidos también como "disruptores endocrinos") (154,155).

Hasta la fecha, a pesar de la adopción de restrictivas normas, la exposición continúa principalmente a través de: la dieta y, en particular, a través del consumo de pescado contaminado y otros alimentos de origen animal o vegetal, donde estos compuestos tienden a bioacumularse; la inhalación de PCBs volátiles derivados de la actividad industriales; y, por último, aguas subterráneas o suelos contaminados, ya que se encuentra niveles altos de PCBs en estas matrices abióticas debido a su larga vida media (156). Sin embargo, no se conocen fuentes naturales de PCBs en el medio ambiente. Así, la principal fuente de exposición a los PCB para los seres humanos es la ingesta de alimentos contaminados, particularmente aquellos de origen animal. De hecho, la exposición humana diaria es, en el 90% de los casos, debido a alimentos contaminados (90% de origen animal, especialmente pescado y productos lácteos) (157,158).

Los PCBs agrupan a una familia de 209 congéneres que se divide en dos grupos mayoritarios en función de su estructura química, los llamados similares a dioxinas (DL-PCBs, *dioxin like-PCBs*) y los no similares a dioxinas (NDL-PCBs, *non dioxin*

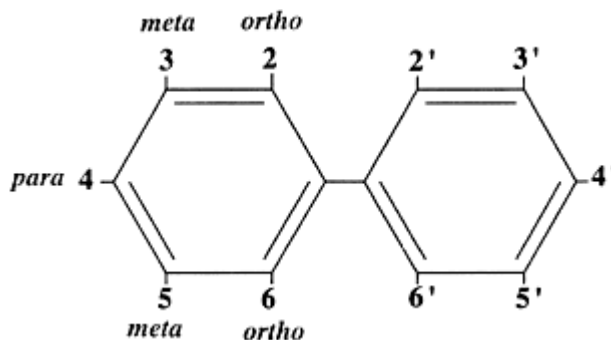
*like-PCBs*). Las mezclas de diferentes PCBs que se presentan en el medio ambiente son evaluadas en base al análisis químico de seis PCBs, los llamados PCBs indicadores (números IUPAC 28, 52, 101, 138, 153 y 180). Estos compuestos se consideran marcadores de la contaminación causada por todos los congéneres de PCBs, ya que son los compuestos predominantes en el ambiente y se biomagnifican en la dieta humana. La suma de cinco de los PCBs indicadores (excluyendo el PCB 138 que es un compuesto DL), representa el 50% del total de los congéneres NDL presentes en los alimentos (159).

### 8.1. NDL-PCBs

Aunque los NDL-PCBs presentar menor toxicidad que los DL-PCBs, estos compuestos son igualmente perjudiciales, ya que se encuentran en concentraciones mucho más altas que los congéneres DL en muestras sanguíneas de humanos y animales expuestos a través de la cadena alimentaria a los PCBs ambientales (160).

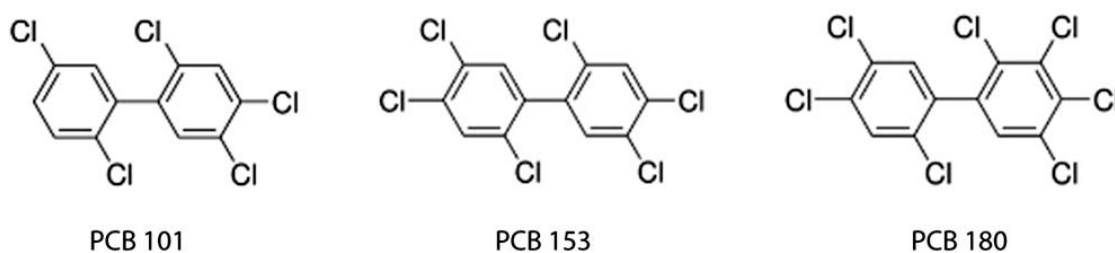
#### 8.1.1. Estructura y propiedades físico-químicas de los NDL-PCBs

Las propiedades físico-químicas y los efectos tóxicos de los NDL-PCBs dependen de la estructura química. Los compuestos químicos de la familia de los PCBs comparten una estructura en común, dos anillos de benceno unidos por un enlace C-C, que varía en el grado de cloración (Figura 11). Los NDL-PCBs presentan al menos una de las posiciones *orto* (2, 2', 6, 6') con un átomo de cloro unido. Esto provoca que los dos anillos se dispongan en planos diferentes y perpendiculares entre sí. Por ello también se denominan compuestos *orto*-sustituidos o compuestos no coplanares (161).



**Figura 11. Estructura general de los PCBs.** Se indican las posiciones de sustitución de los átomos de cloro.

En general, tanto los congéneres DL- como los NDL-, presentan baja solubilidad en agua y alta lipofilidad, son solubles en solventes orgánicos, muy estables frente a cambios de pH, son poco volátiles y no inflamables, y sufren oxidación y fotodegradación (162). Además presentan mayor densidad que el agua y su constante dieléctrica es baja. Por sus propiedades físico-químicas, los PCBs han sido empleados en equipamiento industrial (equipamientos eléctricos, hidráulicos, etc.) y en productos de consumo (plastificantes de pinturas, plásticos, productos de caucho, etc.) (163). Sin embargo, estas mismas propiedades hacen que su degradación enzimática sea extremadamente difícil. Asimismo, su carácter altamente lipofílico incrementa el riesgo de bioacumulación en la cadena trófica. Por ello, la manufacturación de PCBs se prohibió en la Convención de Estocolmo de 2001 (164).

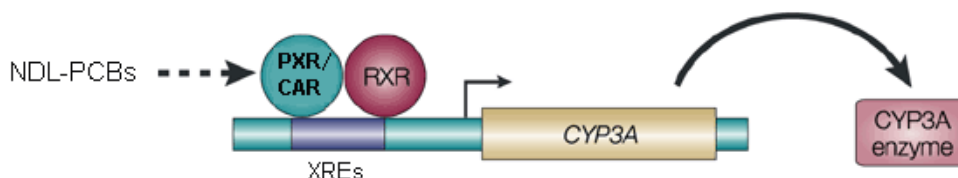


**Figura 12. Estructura química de los PCBs 101, 153 y 180.** El grado de cloración se incrementa desde del PCB 101 hasta el PCB 180.

En el presente trabajo se ha analizado el efecto de los NDL-PCBs 101, 153 y 180 (Figura 12), los cuales son tres de los seis PCBs indicadores. Desde el PCB 101 hasta el PCB 180 el número de átomos de cloro se incrementa progresivamente y, al mismo tiempo, también se incrementa su lipofilicidad y, como consecuencia, su capacidad de persistir en el ambiente.

### 8.1.2. Mecanismo de acción de los NDL-PCBs

La toxicidad de los PCBs depende de la posición de los átomos de cloro. Como consecuencia, los PCBs con sustituciones en las posiciones meta y para son coplanares (son los congéneres DL-), con una estructura muy similar a la dioxina, lo que favorece la unión al receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR, *Aryl hydrocarbon receptor*), a través del cual ejercen el efecto tóxico. Por otro lado, los PCBs orto-sustituidos presentan una baja afinidad para el AhR, ya que la configuración no coplanar impide la interacción con el receptor. De hecho, a mayor número de sustituyentes de cloro, menor es la afinidad por el AhR, por lo que estos compuestos pueden actuar como inhibidores del AhR (165). Pese a no ser ligandos del AhR, cada vez hay más evidencias del posible mecanismo de acción de los NDL-PCBs como ligandos de receptores nucleares como el receptor X de pregnano (PXR, *pregnane X receptor*) y el receptor constitutivo de androstano (CAR, *constitutive androstane receptor*) (166,167).



**Figura 13. Mecanismo de acción de los NDL-PCBs.** El PXR es un factor de transcripción que regula la expresión del gen CYP3A. Cuando los NDL-PCBs se unen al PXR, éste forma un heterodímero con el RXR e induce la expresión de la enzima CYP3A4. Modificado de (168).

El CAR puede actuar en consonancia con el PXR. Ambos receptores, tras la unión de NDL-PCBs, forman un heterodímero con el receptor X del ácido retinoico (RXR, *retinoid X receptor*), que se une a elementos de respuesta a xenobióticos (XREs, *xenobiotic response elements*) localizados en las regiones promotoras de los genes diana (Figura 13). Estos genes codifican para enzimas que metabolizan compuestos xenobióticos mediante procesos de oxidación, como la enzima CYP3A4 (Citocromo P450 3A4) (168,169). Además, la activación de estos dos receptores, PXR y CAR, puede modular la obesidad y el síndrome metabólico (170).

Asimismo, los PCBs orto-substituidos producen otros efectos como el descenso de los niveles de dopamina, alteraciones en los niveles de hormonas tiroideas y la unión al receptor de estrógenos (171). Por ello, en contraste con los DL, los congéneres NDL están implicados principalmente en alteraciones de los sistemas de transducción de señales, neurotoxicidad, supresión inmunológica y disrupción endocrina (172).

## **8.2. Exposición a PCBs y disrupción endocrina**

Los disruptores endocrinos son sustancias químicas capaces de alterar el sistema endocrino y la homeostasis interna. Tienen la capacidad de unirse a receptores específicos con efectos agonistas o antagonistas, e incluso de interferir en las rutas de síntesis y metabolismo de hormonas (173).

Los PCBs se acumulan en el tejido adiposo, el cual se reconoce actualmente como un tejido endocrino. En los últimos años se han incrementado los datos sobre la relación entre la exposición a PCBs y el aumento de la obesidad, así como de enfermedades relacionadas con la obesidad, tales la como diabetes tipo 2 (174–176). Estas evidencias sugieren un papel clave de estos químicos en el control del

metabolismo adiposo. En particular, la hipótesis de los obesógenos ambientales postula que los PCBs pueden interferir con el proceso de lipólisis, la síntesis de triglicéridos y la diferenciación de los adipocitos, así como el incremento de la expresión de enzimas implicadas en el metabolismo lipídico (177).

Sobre la base de estos estudios, La Merrill y colaboradores proponen que el tejido adiposo, además de sus funciones metabólicas y endocrinas, tiene diversas funciones toxicológicas: puede almacenar una gran variedad de productos químicos xenobióticos, como los PCBs; constituye una fuente interna de los contaminantes almacenados, que conduce a la exposición continua de otros tejidos; y, por último, puede ser objeto de la acción de contaminantes que afectan a las funciones del tejido adiposo, aumenta la inflamación del mismo, y/o modula la diferenciación de las células precursoras de los adipocitos (178). Como consecuencia, los PCBs pueden ejercer un efecto obesogénico si actúa sobre el tejido adiposo.

### **8.3. Exposición a PCBs y enfermedades reumáticas**

Los NDL-PCBs se acumulan preferentemente en el tejido adiposo causando inflamación de bajo grado y disrupción endocrina y metabólica. Por otro lado, los cambios metabólicos debidos a la disfunción del tejido adiposo han sido propuestos como un mecanismo subyacente a la aparición y progresión de enfermedades reumáticas, como la OA. La obesidad es un factor de riesgo claro para la OA, ya que los adipocitos producen adipoquinas, además de los efectos mecánicos (179,180). En particular, se ha descrito la participación de la leptina en la degradación del cartílago articular (40,52,53).



Varios estudios han demostrado que los PCB, en su mayoría los congéneres NDL, pueden regular positivamente los niveles de leptina, conduciendo a un efecto obesogénico final (181,182). Muy recientemente, se demostró que los PCBs 101, 153 y 180 son capaces de inducir disrupción metabólica a través de la reducción de la respuesta del receptor de leptina. Además, estos NDL-PCB son capaces de inducir significativamente IL-6 y TNF- $\alpha$  (183). Estas dos citoquinas participan como mediadores de la respuesta inflamatoria en varias enfermedades reumáticas, tales como la OA y AR. Los disruptores endocrinos, como los NDL-PCBs, también ejercen efectos inmuno-supresores (184), que podrían aumentar el riesgo de enfermedades autoinmunes, tales como la AR.

Aunque existen evidencias de una posible participación de los PCBs en la fisiopatología del cartílago, sólo unos pocos estudios han analizado la relación entre la exposición a estos contaminantes y patogénesis de las enfermedades reumáticas.

En 1968, un episodio de intoxicación en el oeste del Japón (llamado “Yusho”, o “enfermedad del aceite”), fue atribuido al consumo de aceite de arroz contaminado con PCBs y PCDF. Los denominados “pacientes Yusho” mostraron inflamación de las articulaciones y artralgias (185,186). Otro episodio de intoxicación similar ocurrió en Taiwán en 1978. En la cohorte taiwanesa “Yucheng” hubo una incidencia de artritis cuatro veces mayor que la observada en sujetos no expuestos (187). Recientemente, se ha descrito una correlación positiva entre los niveles de exposición a los PCBs y la incidencia de AR en mujeres (188). Estos estudios indican claramente que los PCBs pueden jugar un papel importante en los procesos patogénicos de las enfermedades reumáticas.

Los condrocitos, como únicas células presentes en el cartílago articular, son las encargadas de preservar la integridad del propio cartílago. Por lo tanto, la muerte celular de los condrocitos conduce a la degradación del cartílago, característica más destacada de la OA. Dado que la apoptosis es un evento crítico en la patogénesis de la OA, la identificación de los inductores de este proceso se considera un elemento clave en la comprensión de la patogénesis y/o progresión de la OA.

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



Actualmente, se considera al tejido adiposo blanco como un órgano multifactorial capaz de producir una gran variedad de moléculas pleiotrópicas, las denominadas “adipoquinas”. Además del tejido adiposo, las adipoquinas también están presentes en otros tejidos, como el cartílago articular y la grasa infrarrotuliana, exclusivamente asociada a la articulación. Son conocidas las diversas funciones que desempeñan las adipoquinas, como la leptina o la adiponectina, sobre el cartílago articular. Entre ellas destacan la producción de mediadores inflamatorios, como el óxido nítrico, y la síntesis de enzimas destructoras del cartílago, como las metaloproteasas de matriz. Además, las adipoquinas se muestran implicadas en el estado inflamatorio del individuo obeso, contribuyendo al desarrollo de alteraciones metabólicas, inclusive enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Todo lo anterior hace que, hoy en día, las adipoquinas se consideren como posibles factores de unión entre los mecanismos inflamatorios, la obesidad y las enfermedades musculoesqueléticas, tales como la artrosis, la osteoporosis o la artritis reumatoide.

Debido a la relevancia de las adipoquinas en el desarrollo de enfermedades degenerativas articulares, como la artrosis, centramos nuestra atención en el estudio de nuevas adipoquinas para tratar de elucidar el papel que desempeña en la fisiología del único tipo celular que compone el cartílago articular, el condrocito.

#### **SECCIÓN A: NUEVAS ADIPOQUINAS. LA PROGRANULINA**

Recientemente se ha descrito a la PGRN como una nueva adipoquina con propiedades anti-inflamatorias y condroprotectoras. Su acción la realiza a través de interacción con los receptores del TNF $\alpha$ , TNFR1 y TNFR2, suprimiendo la inflamación inducida por el TNF $\alpha$  y promoviendo el anabolismo en los condrocitos.

La secreción de citoquinas pro-inflamatorias, tales como IL1 $\beta$ , son mediadores críticos en la fisiopatología de la artrosis. La IL1 $\beta$  es liberada por sinoviocitos, condrocitos y macrófagos que invaden las articulaciones inflamadas. La IL1 $\beta$  desencadena una cascada de eventos que dañan del cartílago, como la producción de más citoquinas pro-inflamatorias, la síntesis de factores catabólicos y la liberación de mediadores inflamatorios. Por otra parte, se ha sugerido que la IL1 $\beta$  induce la expresión de TNF $\alpha$  en condrocitos (189) y de sus receptores (190).

Dado que la respuesta inmune innata es importante en el desarrollo de la artrosis, el papel de los receptores TLR, en concreto del TLR4, ha sido recientemente estudiada (191). La activación del TLR4 por el lipopolisacárido bacteriano (LPS) implica la producción de varias citoquinas pro-inflamatorias y adipoquinas que pueden trabajar en conjunto en la degradación del cartílago. Macrófagos deficientes en PGRN y estimulados con LPS aumentan su producción de citoquinas pro-inflamatorias. Además, la PGRN inhibe de manera eficiente la señalización pro-inflamatoria inducida por LPS en células endoteliales a través de la atenuación de la ruta de NF-kB.

Sin embargo, hasta el momento no existen datos sobre el efecto de la PGRN en la inflamación inducida por IL1 $\beta$  o LPS en condrocitos.

Por lo tanto, los objetivos de esta sección han sido:

1. Estudiar el efecto de la PGRN sobre la vitalidad de los condrocitos.
2. Estudiar la modulación de PGRN durante el proceso de diferenciación de los condrocitos.
3. Estudiar la expresión basal de la PGRN en muestras de cartílago, grasa infrarotuliana y membrana sinovial de pacientes con artrosis.

4. Estudiar la expresión de PGRN en condrocitos tratados con citoquinas pro-inflamatorias.
5. Estudiar el efecto de la PGRN en la inflamación inducida por IL1 $\beta$  o LPS en condrocitos.

#### **SECCIÓN B: NUEVAS ADIPOQUINAS. WISP-2**

Hasta la fecha, poco se sabe sobre el posible papel de WISP-2 en la fisiopatología del cartílago. Únicamente se ha demostrado que la expresión de esta adipoquina se regula a la baja en condrocitos de pacientes OA tras someterlos a estrés mecánico (128), y que se expresa en altos niveles en la membrana sinovial de pacientes OA y AR (129) y en muestras de grasa infrarrotuliana OA (130).

Sin embargo, no hay estudios en la literatura que evalúen el papel de WISP-2 en el metabolismo del cartílago. Por ello, nos propusimos estudiar el efecto de esta nueva adipoquina sobre la fisiopatología del condrocitos y el posible efecto en los procesos de degradación de la matriz extracelular mediante experimentos de pérdida de función.

Así, los objetivos de esta segunda sección fueron:

1. Estudiar la modulación de WISP-2 durante el proceso de diferenciación de los condrocitos.
2. Estudiar la expresión de WISP-2 en condrocitos tratados con citoquinas y adipoquinas pro-inflamatorias.
3. Comprobar el efecto del silenciamiento génico de WISP-2 en la respuesta inflamatoria de condrocitos.

4. Investigar el papel de WISP-2 en los procesos de degradación de la matriz extracelular que forman el cartílago.

### **SECCIÓN C: CONTAMINANTES AMBIENTALES. NDL-PCBS**

Los condrocitos, como únicas células presentes en el cartílago articular, son las encargadas de preservar la integridad del propio cartílago. Por lo tanto, la muerte celular de los condrocitos conduce a la degradación del cartílago, característica más destacada de las enfermedades reumáticas, tales como la artrosis. Dado que la apoptosis es un evento crítico en la patogénesis de la artrosis, la identificación de los inductores de este proceso se considera un elemento clave en la comprensión de la patogénesis y/o progresión de dicha enfermedad.

Los NDL-PCBs son un tipo de contaminantes ambientales que se acumulan preferentemente en el tejido adiposo, causando inflamación de bajo grado y disrupción endocrina y metabólica. Si bien muchos de los efectos sobre la salud humana causados por la exposición a los NDL-PCBs están bien documentados, la posible relación con enfermedades reumáticas sólo se recoge en un número limitado de estudios en humanos.

En base a lo mencionado anteriormente, en la presente sección se pretende describir los mecanismos celulares y moleculares que pueden alterar la viabilidad de los condrocitos en respuesta a la exposición de los compuestos contaminantes NDL-PCBs.

Los objetivos concretos de la tercera parte han sido:

1. Estudiar el efecto de la exposición a NDL-PCBs sobre la vitalidad de los condrocitos.
2. Estudiar el efecto de la exposición a NDL-PCBs en la inducción de apoptosis en condrocitos.



3. Estudiar los mecanismos moleculares implicados en la respuesta a la exposición a NDL-PCBs.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## **1. CULTIVOS CELULARES**

### **1.1. Línea celular murina ATDC5**

La línea celular condrogénica murina ATDC5 fue adquirida del RIKEN Cell Bank (Tsukuba, Japan). Esta línea celular se aisló en el año 1990 a partir de un cultivo de terato-carcinoma con características fenotípicas fibroblásticas durante su fase de crecimiento (192). Posteriormente, se observó que la insulina (a una concentración 10 µg/ml), sin alterar la velocidad de división de las células, permitía el crecimiento celular aún después de la fase de confluencia e inducía la formación de agregados similares a los nódulos que se forman en el cartílago. Al teñir esta línea celular con azul alcian se comprobó que sintetizaba proteoglicano y colágeno tipo II, ambos marcadores de condrogénesis (193).

Además, se observó que las células ATDC5 se convertían en hipertróficas cuando el crecimiento celular se detenía (193). La hipertrofia de los condrocitos se caracteriza por la expresión de colágeno tipo X, el aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina y la expresión de osteopontina, un marcador de diferenciación condrocítica terminal (194). Nuestro grupo de investigación ha realizado diversos trabajos donde se pone de manifiesto que la línea celular ATDC5 muestra un comportamiento similar, tanto en estado desdiferenciado como en estado diferenciado, al menos en términos de activación de NOS2 (52,53).

Por tanto, la línea celular ATDC5 se considera un modelo óptimo para el estudio de los procesos de diferenciación del cartílago ya que permite estudiar de forma controlada y, de ser necesario, regulada, el estado de diferenciación celular.

El mantenimiento de dicha línea celular se realizó en medio de cultivo DMEM/Hams' F12 suplementado con suero fetal bovino (*fetal bovine serum, FBS*) al 5%, L-glutamina, antibióticos (50 U/ml penicilina y 50 µg/ml estreptomicina), apo-transferrina (10 µg/ml) y selenito sódico ( $3 \cdot 10^{-8}$  M).

### **1.1.1. Diferenciación de las células ATDC5**

Para los ensayos de diferenciación, las células se sembraron a una densidad de  $1 \cdot 10^4$  células por placa Petri de 100 mm y se mantuvieron en cultivo durante 21 días. Se empleó medio de cultivo (DMEM/Hams' F12 al 5% de FBS, L-glutamina, antibióticos, apo-transferrina y selenito sódico) suplementado con insulina (10µg/ml), reemplazándolo cada 2/3 días durante los primeros 14 días. Una vez pasado este tiempo, las células se diferencian a condrocitos maduros (a partir del día 15 expresan los distintos marcadores que las distinguen como tales). En ese momento se sustituyó el medio anterior por DMEM  $\alpha$ -modificado suplementado con 5% de FBS, insulina, L-glutamina, antibióticos, apo-transferrina y selenito sódico durante 7 días más para obtener condrocitos maduros hipertróficos.

### **1.2. Línea celular humana T/C-28a**

La línea celular de condrocitos humanos T/C-28a2 ha sido cedida amablemente por la Dra. Mary B. Goldring (Laboratorio de Biología del Cartílago, Hospital for Special Surgery, Nueva York, EE.UU.). Esta línea celular ha sido aislada a partir de condrocitos juveniles de costilla e inmortalizados mediante transfección retroviral de condrocitos humanos con el antígeno T grande del virus Simian 40 (SV40-TAg, *Simian virus 40 large T-antigen*). El cultivo de estas células T/C-28a2 se realizó en medio

DMEM/Hams' F12 suplementado con FBS al 10%, L-glutamina y antibióticos (50 U/ml penicilina y 50 µg/ml estreptomicina).

### **1.3. Cultivo primario de condrocitos humanos**

#### **1.3.1. Obtención de muestras de cartílago articular humano**

Todas las muestras humanas han sido obtenidas previa firma del preceptivo consentimiento informado por parte de los pacientes. Dicho consentimiento informado se realizó según la declaración de Helsinki y el procedimiento de obtención de las muestras fue aprobado por el Comité Ético de Galicia de Investigación Clínica. Se necesitó, además, conocer parte del historial clínico de los pacientes de tal forma que se descartaron las muestras de pacientes tratados con glucocorticoides u otros fármacos que pudieran afectar a los experimentos llevados a cabo con los condrocitos primarios, además de pacientes con alguna otra patología que pueda alterar el cartílago.

El cartílago articular se obtuvo de pacientes que, a causa del alto grado de degeneración del cartílago de alguna de sus articulaciones, fueron sometidos a recambio articular, tanto de cabezas femorales como de platillos tibiales.

#### **1.3.2. Aislamiento y cultivo primario de condrocitos humanos**

El cartílago se separó del hueso subcondral con ayuda de un bisturí, obteniéndose láminas finas de cartílago. Posteriormente, las secciones de cartílago se lavaron, siempre en condiciones estériles, en medio sin suero, DMEM/Hams' F12 suplementado con antibióticos (50U/ml penicilina y 50µg/ml estreptomicina). Se troceó el cartílago y se incubó con una solución de pronasa 1 mg/ml (Roche, Penzberg, Alemania) en DMEM/Hams' F12 con antibióticos durante 30 minutos a 37°C en agitación. Pasado ese tiempo, se retiró la solución de pronasa y se lavó el cartílago dos

veces con PBS 1X. Posteriormente, se incubó el cartílago ya lavado con una solución de colagenasa P 1 mg/ml (Roche) en DMEM/Hams' F12 con antibióticos y enriquecido con 10% de FBS entre 12 y 16 horas a 37°C en agitación constante. El producto de la digestión se filtró a través de un colador de nylon de 40 µm de tamaño de malla (Corning, NY, EE.UU.). A continuación, se centrifugó la suspensión 10 minutos a 200 g. Después de la centrifugación, se realizaron dos lavados en tampón fosfato salino 1X (*phosphate buffered saline, PBS*: NaCl 8 g/l, KCl 2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g/l), se centrifugó nuevamente 10 minutos a 200 g después de cada lavado, y se resuspendió en medio de cultivo completo (DMEM/Hams' F12 suplementado con antibióticos, L-glutamina y 10% de FBS) para su siembra en placas Petri de 10 mm de diámetro. Al día siguiente de la siembra, se cambió el medio de cultivo para la eliminación de las células circulantes que puedan crecer en suspensión.

Para el mantenimiento en cultivo de los condrocitos primarios, se renovó el medio de cultivo cada dos días. En caso de ser necesario realizar pases a los condrocitos, se procedió como en el apartado 1.4. Todos los experimentos se llevaron a cabo con condrocitos primarios con menos de dos pases para evitar la desdiferenciación de los mismos.

#### **1.4. Mantenimiento y subcultivo celular**

El mantenimiento de los cultivos celulares empleados, tanto de las líneas celulares como del los cultivos primarios, se realizó en placas Petri de 10 mm de diámetro, reemplazando los medios de cultivo específicos para cada tipo celular cada 2-3 días, en una estufa de cultivo celular (incubador de CO<sub>2</sub> NuAire, MN, EE.UU.) humidificada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Cuando las células alcanzaron el 80% de



confluencia, aproximadamente cada 2-3 días, se procedió al subcultivo celular. Para ello se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con 3 ml de PBS 1X y se despegaron usando 1 ml de tripsina 500 mg/l - ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 200 mg/l (Lonza, Verviers, Belgium) por cada placa Petri. Las células se dejaron 5 minutos a 37°C en la estufa de cultivo celular, después de lo cual se inactivó la acción de la tripsina con 6 ml de medio de cultivo. La suspensión celular se recogió en un tubo estéril de 50 ml, se homogenizó y se procedió al recuento celular haciendo uso de una cámara Neubauer, distinguiendo células vivas de células muertas mediante el colorante azul tripán. Finalmente, se sembraron a una densidad de  $3 \cdot 10^5$  células por placa Petri.

### **1.5. Condiciones experimentales: tratamientos**

En función del tipo de estudio a realizar, las se sembraron en placas de diferente tamaño (Corning): placas de 6 pocillos para los análisis de ARNm, western blot o citometría de flujo; placas de 24 pocillos para la obtención de los sobrenadantes; placas de 96 pocillos para el ensayo de viabilidad por MTT. Cuando las células estuvieron adheridas de forma estable (aproximadamente 6 horas después de sembradas) y alcanzaron una confluencia de 80-90%, se cambió el medio de cultivo a un medio sin FBS durante 12-16 h. La serodeprivación (eliminación de suero del medio de cultivo) sincroniza el ciclo de crecimiento y la actividad metabólica de las células, libera a los receptores de membrana de sus respectivos ligandos y se evita las posibles interferencias que puedan ocasionar los diferentes componentes del suero con los tratamientos empleados. Transcurrido este tiempo, se incubaron las células en condiciones basales o en presencia de los diferentes estímulos en medio sin FBS.

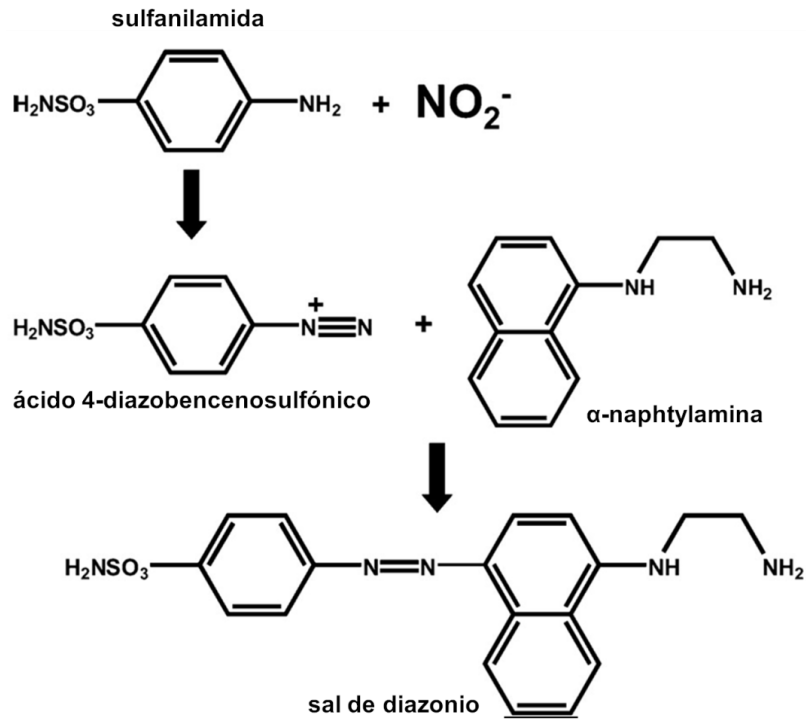
## **2. DETERMINACIÓN DE NITRITOS: ENSAYO COLORIMÉTRICO DE GRIESS**

Para los experimentos en los que se realizó la determinación de la producción de óxido nítrico por parte de la línea celular ATDC5 o de los condrocitos primarios, se sembraron las células en placas de 24 pocillos, 80.000 células por pocillo en 1 ml de medio de cultivo. Posteriormente se realizaron los distintos tratamientos a las dosis previamente fijadas. También se recuperaron los sobrenadantes de los distintos experimentos cuya finalidad era la obtención de ARNm y/o proteína.

Una vez pasado el tiempo de tratamiento (24 o 48 horas) se retiró el medio de cultivo, se centrifugó para eliminar la presencia de células en él y se procedió a la determinación de la producción de óxido nítrico por parte de las células. Dicha determinación se realizó de forma indirecta, a través de la presencia de nitritos en el medio de cultivo mediante el ensayo colorimétrico de Griess.

Para ello se emplearon dos reactivos [Sulfanilamida 1% en ácido fosfórico al 5% en agua (P/V) y  $\alpha$ -naftilamina al 0.1% en agua (P/V)] mezclados en una relación 1:1, resultando el reactivo de Griess. Posteriormente se mezclaron volúmenes iguales del reactivo de Griess (50 $\mu$ l) y el medio de cultivo (50 $\mu$ l) donde se determina la cantidad de nitritos por cada uno de los distintos tratamientos. Se hicieron mediciones en duplicado por cada uno de los puntos. El medio sin FBS se utilizó como blanco.

Los nitritos, el ácido nitroso, reaccionan con la sulfanilamida formando ácido 4-diazobencenosulfónico, el cual reacciona con la  $\alpha$ -naftilamina dando lugar a un colorante rojo-violeta, sal de diazonio (Figura 14). La intensidad de color es mayor cuanto mayor es la cantidad de nitrito en el medio de cultivo. Una vez pasados 5-10 minutos, se determinó la cantidad de nitrito midiendo la absorbancia a 520-550 nm en



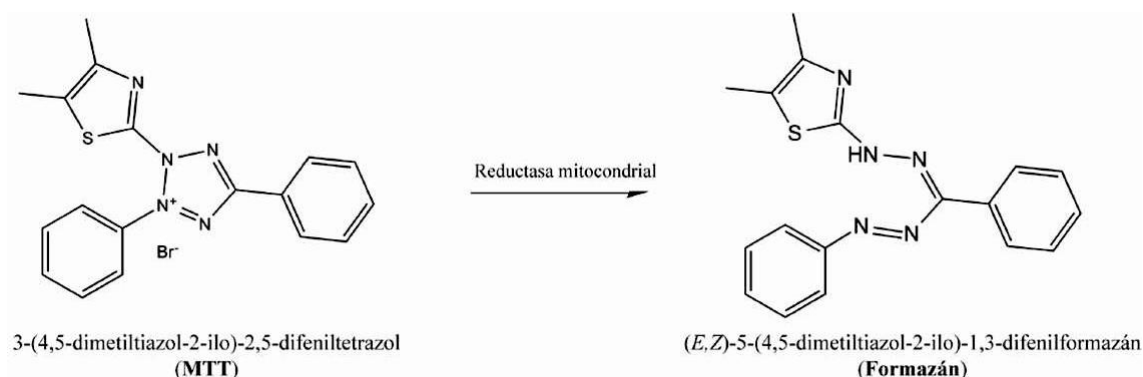
**Figura 14. Reacción de Griess.** En la determinación colorimétrica de nitritos según Griess, los nitritos (ácido nitroso) reaccionan con la sulfanilamida dando ácido 4-diazobencenosulfónico. Este reactivo intermediario se condensa con la  $\alpha$ -naphtylamina formando un colorante rojo-violeta, ácido diazoico.

un lector de ELISA evitando la formación de burbujas que alterasen las lecturas de absorbancia dentro de los pocillos.

A partir de las absorbancias obtenidas y, debido a la relación lineal existente entre la absorbancia y la concentración descrita por Lambert-Beer, es posible extrapolar la concentración de nitritos presente en el medio de cultivo interpolando las absorbancias obtenidas en una curva estándar, previamente realizada a partir de distintas diluciones de nitrito sódico (0 - 0.0625 - 0.125 - 0.25 - 0.5 - 1 - 2 - 4 - 6  $\mu\text{g/ml}$ ).

### 3. ENSAYO COLORIMÉTRICO DE ACTIVIDAD METÁBOLICA: MTT

La viabilidad celular se cuantificó empleando el ensayo colorimétrico MTT (bromuro de 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) (Sigma Aldrich, MO, EE.UU.). El fundamento de este método se basa en que las células metabólicamente activas, por acción de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales, tienen la capacidad de escindir las sales de tetrazolio (soluble y de color amarillo) para formar sales insolubles de formazán (de color púrpura) (Figura 15). La sal de formazán absorbe luz a una longitud de onda de 550 nm, detectable mediante un lector, lo que permite su cuantificación



**Figura 15. Reacción de formación de cristales de formazán a partir de MTT.** La formación de formazán es indicativa de la viabilidad celular ya que se trata de una enzima mitocondrial.

La reducción del compuesto MTT depende de la actividad red-ox de la célula y es reflejo de la función mitocondrial, por lo que se utiliza como indicador del estado metabólico de la célula, además de como medida indirecta de la viabilidad o proliferación celular.

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos a razón de  $8 \cdot 10^3$  células/pocillo. Las células se privaron de suero durante 14-16 horas para posteriormente ser estimuladas con los tratamientos adecuados. Cuatro horas antes de que finalizase el tiempo de tratamiento, se añadieron 10 ml de MTT (5 mg/ml) en pocillos que contenían

100 ml de medio, resultando una concentración final de 0.5 mg/ml. Tras 4 h de incubación a 37°C, se añadieron 100 ml de agente solubilizante [SDS (Sodio dodecil sulfato) al 10% en HCl 0.01M] para disolver las sales de formazán. Finalmente, transcurridas 18 h de incubación en el incubador a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, se cuantificó la reacción colorimétrica en un lector de placas (Multiskan Plus; Thermo Labsystems, Helsinki, Finlandia) a la longitud de onda de 550 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de MTT metabolizado, considerando los valores de absorbancia obtenidos en la condición basal como el 100%.

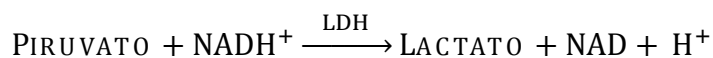
#### **4. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD: ACTIVIDAD DE LA LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)**

Los niveles de LDH se utilizan como un indicador del estado celular, ya que solo se libera LDH al medio cuando la integridad de la membrana celular ha sido comprometida por procesos de muerte no programada. Con el fin de discernir entre muerte celular programada (apoptosis) y muerte celular no programada (necrosis) se utilizó este tipo de ensayo.

Para la determinación cuantitativa de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo se sembraron las células en placas de 24 pocillos,  $8 \cdot 10^4$  células por pocillo en 1 ml de medio de cultivo. Posteriormente se realizaron los distintos tratamientos a las dosis previamente fijadas. También se recuperaron los medios de cultivo de los distintos experimentos cuya finalidad era la obtención de ARNm y/o proteína. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se retiró y almacenó el medio de cultivo a -20°C para el posterior procesado.

Para realizar el ensayo, los sobrenadantes se descongelaron y se centrifugaron 1 minuto a 13000 rpm para eliminar posibles restos celulares del medio. A continuación se introdujeron 200  $\mu$ l en tubos específicos para el sistema ADVIA<sup>®</sup> 1650.

El método para la determinación cuantitativa de la actividad enzimática de la LDH se basa en que la LDH cataliza la conversión de piruvato en lactato en una reacción dependiente del dinucleótido reducido de nicotinamida adenina (NADH), originando la oxidación de NADH a NAD (Figura 16). La velocidad de la oxidación, que es directamente proporcional a la actividad de la LDH, se controla midiendo la reducción de la absorbancia a 340 nm.



**Figura 16. Reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).**

## **5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO (MDA)**

Se evaluó la concentración de malondialdehído (MDA) como sensor del daño metabólico producido durante la exposición a NDL-PCBs. El malondialdehído se forma por la peroxidación lipídica de ácidos grasos insaturados como resultado de daño oxidativo, siendo empleado como marcador de estrés oxidativo. Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos, con  $2.5 \cdot 10^5$  células por pocillo en 1 ml de medio de cultivo. Posteriormente se realizaron los distintos tratamientos a las dosis previamente fijadas. Como control positivo, se trataron las células con  $\text{H}_2\text{O}_2$  1  $\mu$ M. Transcurrido el tiempo de tratamiento, el MDA fue evaluado en los lisados celulares según el método descrito por Draper and Hadley (195).

Para realizar el ensayo, se preparó una recta patrón empleando concentraciones conocidas de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMOP) en PBS. De cada muestra, 900 µL se mezclaron con 2 mL de TCA (*trichloroacetic acid*, ácido tricloroacético) 10%, se centrifugaron 10 min a 1260 g, y seguidamente se añadieron 1.3 mL de TBA (*thiobarbituric acid*, ácido 2-tiobarbitúrico) 0.5%. Después de incubar las muestras durante 20 min a 100 °C, se midió la fluorescencia de la mezcla con un espectrofluorímetro (modelo LS-55; Perkin Elmer, MA, EE.UU.) a las longitudes de onda de 530 y 550 nm para excitación y emisión, respectivamente. La concentración de MDA se calculó mediante análisis de regresión lineal de la recta patrón. Los valores se expresaron como µM MDA/mg proteína.

## **6. DETERMINACIÓN DEL ESTADO ANTIOXIDANTE TOTAL, ESTADO OXIDANTE TOTAL E ÍNDICE DE EXTRÉS OXIDATIVO**

El estado oxidativo se determinó con el fin de evaluar un posible desequilibrio del sistema de defensa antioxidante. Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos, con  $2.5 \cdot 10^5$  células por pocillo en 1 ml de medio de cultivo. Después de 24 h de exposición a NDL-PCBs, se evaluaron tres parámetros: el estado antioxidante total (TAS, *Total Antioxidant Status*), el estado oxidante total (TOS, *Total Oxidant Status*) y el índice de estrés oxidativo (OSI, *Oxidative Stress Index*). El TAS y el TOS se evaluaron en los lisados celulares empleando los kits apropiados (TAS assay kit y TOS assay kit, Rel Assay Diagnostics®, Turquía) de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

La determinación del TAS se basa en que capacidad de los antioxidantes presentes en la muestra de reducir el radical de color azul oscuro ABTS (2,2'-azinobis-

3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) a la forma incolora reducida. La supresión de color producida por los antioxidantes se mide a 600 nm, y es proporcional a su concentración. El ensayo fue calibrado con una solución estándar de un antioxidante estable, Trolox Equivalent, que es un análogo de la vitamina E. El TAS, determinado según el método desarrollado por Erel (196), se expresó como  $\mu\text{mol Trolox Equiv./L}$ .

Por otro lado, la determinación del TOS se basa en la capacidad de los oxidantes presentes en la muestra de oxidar el complejo de ión-quelante de ion ferroso a férrico. El ion férrico forma un complejo coloreado con el cromógeno del kit en un medio ácido. La intensidad del color, que se puede medir espectrofotométricamente a 530 nm, se relaciona con la cantidad total de moléculas oxidantes presentes en la muestra. El ensayo fue calibrado con una solución estándar de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El TOS (197), se expresó como  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}$ .

Finalmente, el OSI se calculó a partir de los valores de TAS y TOS obtenidos siguiendo la siguiente fórmula (198,199):

$$OSI = \frac{TOS (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L})}{TAS (\mu\text{mol Trolox Equiv./L})} \times 100$$

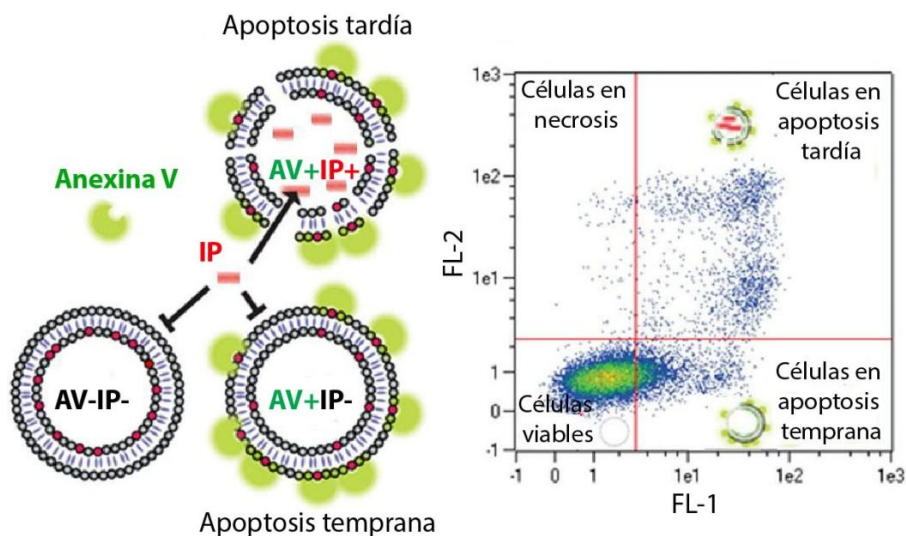
## **7. ENSAYO DE APOPTOSIS CON FITC-ANEXIN V E IODURO DE PROPIDIO**

El ensayo de apoptosis mediante doble marcaje FITC-Anexina V e yoduro de propidio se utilizó para identificar la viabilidad de las células ATDC5 después del tratamiento con NDL-PCBs y para evaluar procesos apoptóticos o necróticos inducidos por parte de estos compuestos. Las células fueron sembradas ( $2.5 \cdot 10^5$  células por cada pocillo) en placas de 6 pocillos y tratadas con los contaminantes ambientales durante diferentes tiempos de exposición. Transcurrido dichos tiempos, las células fueron



procesadas según las instrucciones del fabricante del kit empleado (Kit de detección de apoptosis Anexina V-IP, BD Pharmingen™). Brevemente, las células fueron centrifugadas, resuspendidas en PBS, marcadas con FITC-Anexina V e yoduro de propidio y analizadas por citometría de flujo utilizando el canal 1 para Anexina V (FL-1) y el canal 2 para yoduro de propidio (FL-2).

Durante la apoptosis temprana, la membrana plasmática pierde asimetría provocando que la fosfatidilserina se transloque desde la cara citoplasmática de la membrana a la cara externa, pudiendo ser detectado este cambio mediante la unión específica de Anexina V a la fosfatidilserina. El yoduro de propidio (IP) se utiliza como un marcador adicional de apoptosis, ya que sólo penetra en células con la membrana plasmática dañada en procesos de necrosis y apoptosis tardía. Se consideraron necróticas las células positivas para FL-2 y negativas para FL-1. Las células positivas tanto para FL-2 como para FL-1 se describen como células en apoptosis tardía. Y por último, aquellas negativas para FL-2 y positivas para FL-1 se consideraron en apoptosis temprana.



**Figura 17. Esquema interpretativo del ensayo de Anexina V e Ioduro de Propidio mediante citofluorimetría de flujo.**

## **8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA**

### **8.1. Extracción de ARNm**

Para los experimentos en los que se analizó la expresión génica, la extracción de ARN de cultivos celulares se llevó a cabo utilizando el reactivo TRIzol® y el kit de extracción de ARN NucleoSpin®.

Se sembraron las células en placas de 6 pocillos,  $2,5 \cdot 10^5$  células en cada pocillo. Una vez adheridas de forma estable a la superficie de la placa, las células fueron privadas de suero durante 12 horas. Transcurrido el tiempo pertinente de los tratamientos se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron 2 veces con PBS 1X. Las células fueron lisadas directamente en la placa de cultivo añadiendo 700  $\mu$ l de reactivo TRIzol® en cada pocillo y pasando el lisado celular varias veces a través de una pipeta. El lisado obtenido se transfirió a tubos de microcentrífuga de 1.5 ml y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se añadieron 100  $\mu$ l de cloroformo a cada muestra, se agitaron los tubos y se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, las muestras fueron centrifugadas a 12000xg durante 15 minutos a 4°C. A continuación, se recogió la fase acuosa (fase superior transparente) que contiene al ARN y se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 ml. Esta fase acuosa se procesó con el kit de extracción de ARN de NucleoSpin®, siguiendo las instrucciones del proveedor. De este modo, se procedió a la adición de un volumen igual de etanol al 70%, se agitaron los tubos para garantizar una completa homogeneización y se introdujo la mezcla resultante en la minicolumna del kit de extracción de NucleoSpin®. A continuación se centrifugaron las minicolumnas a 11000xg durante 30 segundos a temperatura ambiente, consiguiendo de este modo que

el ARN se adsorba en la membrana de sílica que contiene la columna. Después se incubó este ARN adsorbido en la columna con ADNasa que digirió cualquier posible resto de ADN genómico que pudiera quedar después del paso del TRIzol®. Finalmente se eliminaron los restos de ADNasa alternando la adición de solventes y centrifugaciones. Posteriormente se procedió a la elución del ARN en el volumen deseado de agua libre de ARNasas.

Para comprobar la calidad del ARN extraído y determinar su concentración se tomó 1.5 µl de la solución de ARN y se analizó con el espectrofotómetro NanoDrop™ ND-1000. Solo se consideraron válidos los ARNs que presentaron unos ratios de absorbancia a 260/280 y 260/230 superiores a 2 y 1.7 respectivamente.

## **8.2. Retro-Transcripción (RT) del ARNm**

Después de la extracción de ARN, la reacción de retro-transcripción (RT) sólo se realizó a partir de ARNs que cumplieron los criterios de calidad mencionados en la sección anterior.

La RT se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se tomaron entre 0.5 y 1 µg de ARN total. A continuación se realizó una digestión del ADN genómico mediante incubación con una ADNasa a 37°C durante 10 minutos. A la mezcla obtenida de la digestión se le adicionó la mezcla de reactivos para la realización de la RT siguiendo las instrucciones del kit de síntesis de ADN complementario Verso™ (Thermo Scientific). La RT se realizó a 42°C durante 30 minutos. Después, se aumentó la temperatura a 95°C durante 2 minutos para inactivar la enzima retrotranscriptasa y para degradar el ARN. Una vez finalizada la RT el ADNc obtenido fue conservado a -20 °C hasta su uso.

### 8.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real

La reacción de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las reacciones de PCR; las del gen de interés, las del gen normalizador así como los controles negativos, se realizaron en duplicado. El volumen final por cada reacción de PCR fue de 25  $\mu$ l. De estos 12.5  $\mu$ l correspondieron con la mezcla maestra, que contiene la enzima y los componentes necesarios para que tenga lugar la reacción (RT<sup>2</sup> SYBR® Green qPCR Mastermix, SABioscience), 10.5  $\mu$ l al agua destilada, 1  $\mu$ l de la RT y 1  $\mu$ l de la mezcla de cebadores (Tabla V).

**Tabla V. Lista de cebadores empleados.**

Catálogo	Descripción	Símbolo	Unigene	RefSeq accession	Tamaño de banda	Posición
PPH09588A	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 5	ADAMTS5	Hs.58324	NM_007038	170	7506-7527
PPM02946E	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	Mm.343110	NM_008084.2	140	309
PPH00150E	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	Hs.544577	NM_002046.3	175	1287-1310
PPH00171C	Interleukin 1 beta	IL1 $\beta$	Hs.126256	NM_000576	126	574
PPH00560C	Interleukin 6	IL6	Hs.654458	NM_000600.3	98	816
PPH00568A	Interleukin 8	IL8	Hs.624	NM_000584.3	126	326
PPM03675A	Matrix metalloproteinase 13	Mmp13	Mm.5022	NM_008607.1	88	1114
PPH00121B	Matrix metalloproteinase 13	MMP13	Hs.2936	NM_002427	61	1380
PPM02928B	Nitric Oxide Synthase 2, inducible	Nos2	Mm.2893	NM_010927	122	2728-2748
PPM24687A	Progranulin	grn	Mm.1568	NM_008175.4	121	1704
PPH02482B	Progranulin	GRN	Hs.514220	NM_002087.2	130	1975
PPM03113G	Tumor Necrosis Factor alpha	Tnf	Mm.1293	NM_013693	110	749

**Tabla V. Lista de cebadores empleados.**

Catálogo	Descripción	Símbolo	Unigene	RefSeq accession	Tamaño de banda	Posición
PPM03087D	Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 1A	Tnfrsf1A	Mm.474976	NM_011609.4	156	1461
PPM02952F	WNT1 inducible signaling pathway protein 2	Wisp2	Mm.13828	NM_016873	135	1044
PPH00981B	WNT1 inducible signaling pathway protein 2	WISP2	Hs.592145	NM_003881	123	1257

Todas las reacciones de PCR, independientemente del tipo de cebador usado, se realizaron con el mismo programa de PCR. El programa utilizado consistió en 1 ciclo de 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

### **8.3.1. Cuantificación relativa. Método $\Delta\Delta C_t$**

Las amplificaciones fueron realizadas en el sistema de PCR en tiempo real Mx30005P® (Stratagene), el cual permite la realización de cuantificaciones relativas. En dicho análisis, se asignó al ADNc control el papel de “calibrador” (al cual se le asignó valor 1). Todos los resultados obtenidos en las distintas muestras fueron comparados con el control de forma que la cuantificación fuese relativa respecto al valor del calibrador. Por cada ADNc se realizaron 2 amplificaciones diferentes, una para el gen de interés y otra para el gen normalizador (gen que no varía su expresión en función de los tratamientos y que se utiliza como control de carga). Además por cada reacción de PCR, también se realizó un control de fluorescencia inicial monitorizando la fluorescencia emitida por el colorante ROX. Considerando la fluorescencia inicial y asociando cada amplificación del gen de interés con su correspondiente gen normalizador, el software pudo corregir los resultados. De este modo se garantizó que

las variaciones de expresión observadas eran debidas a los tratamientos y no a diferencias de carga.

El método utilizado por el software para la cuantificación relativa es conocido como el método  $\Delta\Delta C_t$ , donde  $C_t$  es el ciclo a partir del cual la amplificación empieza a ser estadísticamente significativa por encima del ruido de fondo. Debido a la inversa relación entre el  $C_t$  y la cantidad inicial de ADNc y teniendo en cuenta que en cada ciclo de PCR se duplican las copias se puede representar el nivel de expresión de un gen (L) como:

$$L = 2^{-C_t}$$

Para compensar las diferencias de carga se normalizan el nivel de expresión del gen de interés (GI) dividiendo entre la expresión de un gen normalizador (NOR). Esto se puede representar como:

$$\frac{2^{-C_t(GI)}}{2^{-C_t(NOR)}} = 2^{-[C_t(GI)-C_t(NOR)]} = 2^{-\Delta C_t}$$

Una vez normalizada la expresión del gen de interés se hace la cuantificación relativa con respecto al calibrador. De esta forma se determina el número de veces que varía la expresión del gen de interés de una muestra respecto al control (calibrador). Para ello, se divide la expresión normalizada del gen de interés en la muestra (GI) entre la expresión del gen de interés en el control (CAL). Esto se puede representar como:

$$\frac{2^{-\Delta C_t(GI)}}{2^{-\Delta C_t(CAL)}} = 2^{-\Delta\Delta C_t}; \text{ donde } \Delta\Delta C_t = \Delta C_t(GI) - \Delta C_t(CAL)$$

### **8.3.2. Controles de calidad**

Junto con las reacciones de PCR convencionales se realizaron 2 controles negativos de amplificación. El primero es una reacción en la que no se introduce ADNc.

El segundo control negativo consiste en una reacción de PCR que se realiza a partir de una retrotranscripción en la que no se añadió la enzima retro-transcriptasa. Estos controles negativos informan de la posible contaminación de los reactivos y del ARN.

Después de la PCR se realizaron 2 comprobaciones ulteriores. La primera implica la realización de una curva de disociación, que informa de la especificidad de los cebadores, de la temperatura de disociación del amplicón (relacionada con el tamaño) y de la formación de subproductos. El programa de disociación consiste en un 1 ciclo de 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 55°C y un ascenso de temperatura hasta 95°C, monitorizando a cada grado la fluorescencia. La segunda implica la electroforesis en un gel de agarosa de los productos de PCR, que informa sobre el tamaño del amplicón, de la presencia de subproductos y de la especificidad de los cebadores.

## **9. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA**

### **9.1. Extracción de proteínas**

Para los experimentos en los que se analizó la expresión proteica, se realizó la extracción de proteínas totales. Para ello, las células se sembraron en placas de 6 pocillos,  $2,5 \cdot 10^5$  células en cada pocillo. Se permitió la adherencia estable y se privaron de suero durante 12 horas, después de las cuales se aplicaron los diferentes tratamientos. Pasado el tiempo de tratamiento, se lisaron las células para la extracción de proteína total. Se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con PBS 1X a 4-8°C. Una vez lavadas, las células se despegaron raspando la superficie de la placa con 30-50µl de tampón de lisis (Tris-HCl 50mM pH 7.5, NaCl 250mM, pirofosfato sódico 30mM, EDTA 0.5 M, Triton X-100 1%,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1mM, NaF 1M, PMSF 100mM, coctel

inhibidor de proteasas 1X). Los lisados se transfirieron a tubos 1.5ml y se incubaron durante 20 minutos en hielo, mezclando cada 5 minutos para favorecer la lisis. Los lisados se centrifugaron a 20000xg durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante, que contiene el lisado celular total, se transfirió a tubos de 1.5 ml y se guardó a -20°C.

## **9.2. Cuantificación de proteínas. Método Bradford**

Una vez obtenido el lisado celular, se cuantificó la cantidad total de proteína mediante el método colorimétrico de Bradford que, enfrentando la absorbancia de una muestra desconocida con la de una muestra con una cantidad de proteína conocida, nos permitió extrapolar la cantidad de proteína en nuestras muestras. La recta estándar se preparó partiendo de albúmina bovina sérica (BSA) a una concentración de 1mg/ml y reactivo de Bradford 1X (obtenido diluyendo el reactivo comercial, 5X, en agua destilada). A partir de esa concentración de BSA, mediante diluciones seriadas, se obtuvo la recta estándar (1, 2.5, 5, 10, 15 y 20 µg/ml de BSA). Se midieron las absorbancias, de la recta estándar y de las muestras, a 595nm y se extrapoló la concentración de proteína de las muestras.

## **9.3. Western blot**

### **9.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)**

La separación por electroforesis de las proteínas, previamente desnaturalizadas (30µg de proteína en tampón de carga 1X [Tabla VII] calentadas 5 min a 100°C), se realizó en un gel de poliacrilamida de 1.5 mm de grosor. El gel tuvo dos fases, una fase superior (gel concentrador), que facilitó la concentración de las proteínas antes de entrar



en la fase inferior (gel separador), que separó las proteínas en función de sus pesos moleculares.

Primero se preparó el gel separador al 10% o 15% de acrilamida/bisacrilamida 30% (BioRad) en función del tamaño de las proteínas a detectar (Tabla VI). Una vez polimerizado el gel separador, preparamos el gel concentrador (Tabla VI). Mientras polimerizaba éste, las proteínas fueron atemperadas para evitar la formación de precipitados de SDS.

**Tabla VI. Composición de los geles de poliacrilamida.**

	Gel separador		Gel concentrador
	10%	15%	
H <sub>2</sub> O	4 ml	2.3 ml	2.7 ml
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	3.3 ml	5 ml	670 µl
Tris-HCl 1.5M pH8.8	2.5 ml	2.5 ml	-
Tris-HCl 1M pH6.8	-	-	500 µl
SDS 10%	100 µl	100 µl	40 µl
PSA 10%	100 µl	100 µl	40 µl
TEMED	4 µl	4 µl	4 µl
Volumen total	10 ml	10 ml	5 ml

SDS (*sodium dodecylsulfate*), PSA (persulfato amónico), TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina)

La electroforesis se realizó a voltaje constante (100V) durante 1-2 h, en función del porcentaje del gel, en una cubeta de electroforesis (BioRad) empleando un tampón de migración (Tabla VII).

### **9.3.2. Transferencia a membrana**

Una vez separadas las proteínas, éstas se transfirieron a una membrana de PVDF. Para ello la membrana había sido hidratada usando metanol (30 segundos) y posteriormente agua (5 minutos), reservándola en tampón de transferencia (Tabla VII)

hasta su uso. Asimismo, el gel se dejó en tampón de transferencia durante aproximadamente 5 minutos.

La transferencia se realizó empleando un aparato de transferencia semi-seca *Trans-blot® Semi-Dry Transfer Cell* (BioRad). En la base de dicho aparato se colocó papel Whatman hidratado en tampón de transferencia. A continuación se colocó la membrana de PVDF ya hidratada. Encima de la membrana se colocó el gel, al cual se le había retirado el concentrador. Finalmente, sobre el gel de electroforesis, se colocó otro papel Whatman, también hidratado en tampón de transferencia. Se evitó la formación de burbujas entre ellos. Se procedió a la transferencia a amperaje constante (250 mA) durante 1 hora.

**Tabla VII. Composición de los tampones empleados en Western blot.**

Tampón de carga 4x	SDS 10%, Tris-HCl 200 mM pH 6.8, Glicerol 50%, Azul de bromofenol 0,1% y $\beta$ -mercaptoetanol 10%
Tampón de migración 10x	Tris-Base 25 mM, Glicina 192 mM y SDS 0.1% pH 8.3, y posterior dilución con agua al 1x
Tampón de transferencia	Tampón de migración 1x y metanol 20%
Tampón de lavado	Tris-Base 20mM, NaCl 150mM y Tween-20 0.1% (pH7.6)
Tampón de bloqueo	5% de leche en tampón de lavado
Tampón de estripado	SDS 10%, Tris-HCl 2M pH6.8, $\beta$ -mercaptoetanol y agua destilada

### **9.3.3. Inmunodetección**

Una vez completada la transferencia, la membrana fue bloqueada usando como tampón de bloqueo (Tabla VII). La membrana se dejó en el tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación continua. Una vez bloqueada se incubó con el anticuerpo primario (Tabla VIII) pertinente diluido en tampón de bloqueo durante 1

hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4 °C en agitación continua. Pasado el tiempo de incubación, la membrana se lavó (3 lavados, 10 minutos cada uno) con tampón de lavado (Tabla VII) a temperatura ambiente y en agitación. Después de los lavados se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.

**Tabla VIII. Lista de anticuerpos empleados.**

Anticuerpo 1º	Peso molecular (kDa)	Casa comercial	Dilución	Anticuerpo 2º	Casa comercial	Dilución
Bax	20	Cell Signaling	1:1000	Anti-conejo	GE Healthcare	1:5000
Bcl-2	28	Cell Signaling	1:1000	Anti-conejo	GE Healthcare	1:5000
Caspasa 3	35	Cell Signaling	1:1000	Anti-conejo	GE Healthcare	1:5000
Caspasa 3 procesada	17, 19	Cell Signaling	1:1000	Anti-conejo	GE Healthcare	1:5000
COX2	75	Dako	1:200	Anti-ratón	GE Healthcare	1:5000
GAPDH	36	Sigma	1:30000	Anti-conejo	GE Healthcare	1:5000
MMP-13	48	Santa Cruz	1:500	Anti-conejo	GE Healthcare	1:5000
NOS2	130	Cell Signaling	1:1000	Anti-conejo	GE Healthcare	1:5000
P38	38	Cell Signaling	1:1000	Anti-ratón	GE Healthcare	1:5000
p-P38	38	Cell Signaling	1:1000	Anti-conejo	GE Healthcare	1:5000
PGRN	65	Santa Cruz	1:1000	Anti-conejo	GE Healthcare	1:2000
VCAM-1	110	Cell Signaling	1:1000	Anti-conejo	GE Healthcare	1:2000
WISP-2	27	Abnova	1:1000	Anti-conejo	GE Healthcare	1:2000

Transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo secundario, la membrana se lavó de nuevo y, posteriormente, se reveló con *Immobilion™ Western Chemiluminescent HRP Substrate* (Millipore). Se preparó una mezcla 1:1 de los reactivos y la membrana se incubó durante 5 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente con dicha mezcla. Pasado el tiempo de incubación, la membrana se secó y se

introdujo en el sistema de adquisición de imágenes *EC3 imaging system* (UVP®), que está formado por una cámara oscura, una cámara CCD refrigerada y un software para analizar los resultados. La quimioluminiscencia fue detectada utilizando un protocolo de integración dinámica que permitió acortar el tiempo de exposición de la membrana. Una vez revelada la membrana, se retiró el anticuerpo liberando nuevamente las proteínas fijadas en la membrana para posteriores hibridaciones con otro anticuerpo, anti-GAPDH, que fue empleado como control de carga. De esta forma confirmamos que las diferencias de expresión de la proteína deseada en función de los distintos tratamientos no eran debidas a diferencias en la cantidad inicial de proteína cargada en el gel. Para retirar los anticuerpos se empleó un tampón de estriado (Tabla VII). El tampón se precalentó a 55 °C y, posteriormente, la membrana se incubó en ese tampón durante 10-30 minutos a 55 °C. Después de esa incubación, se lavó la membrana. Posteriormente se incubó de nuevo en tampón de bloqueo. A partir de este momento la membrana estuvo preparada para un nuevo proceso de hibridación. Una vez usada, la membrana se liberó de anticuerpo y se guardó en seco y a 4 °C para posteriores usos. En caso de ser re-hibridada, la membrana tuvo que ser previamente hidratada (con etanol, agua y tampón de transferencia).

#### **9.3.4. Densitometría**

Para cuantificar la cantidad de proteína detectada mediante Western blot, se calculó la intensidad de la señal obtenida por cada banda mediante el programa informático ImageJ 1.45s (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU.). Este programa asigna un valor arbitrario de señal de quimioluminiscencia a una región de la imagen seleccionada por el usuario, en la que reside la banda de la proteína de interés. Posteriormente, se corrigen los valores obtenidos dividiendo este dato por el adquirido

para su control de carga en el mismo experimento. Finalmente, los datos se expresaron como número de veces de la expresión proteica respecto de la condición basal, designada como 1.

## **10. SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE ARN DE INTERFERENCIA**

Para silenciar la expresión de diferentes genes, se empleó la técnica del ARN de interferencia (ARNi). Los ARNi son moléculas pequeñas de ARN bicatenario específicas para un ARNm diana. La hebra 'antisentido' del ARNi se ensambla en un complejo proteico denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*, complejo de silenciamiento inducido por ARN), que utiliza la hebra de ARNi como guía para identificar el ARNm diana complementario. El complejo RISC media la degradación del ARNm complementario, bloqueando así la expresión del gen. Los ARNi se introdujeron de forma exógena en las células empleando un lípido catiónico como método de transfección.

Para ello, las células se sembraron en placas de 6 pocillos,  $2,5 \cdot 10^5$  células en cada pocillo. Transcurridas 24 horas, se procedió a la transfección con el ARNi correspondiente (siTNFR y siWISP2, ambos de Integrated DNA Technologies) y el lípido catiónico siLentFect (BioRad). Brevemente, 1 hora antes de la transfección, se cambió el medio de los pocillos por Opti-MEM (Invitrogen), un medio básico sin antibióticos. Empleando este mismo medio, se realizaron las diluciones correspondientes de ARNi (concentración final de 10nM) y siLentFect. Posteriormente, a la dilución de siLentFect se le añadió la dilución de ARNi y se incubó durante 20 minutos. Pasado este tiempo, se añadió la mezcla a las células. Después de 48 horas, se

comprobó que la inhibición génica se hacía efectiva (mediante PCR a tiempo real) y se procedió a los tratamientos correspondientes.

## **11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados obtenidos en este trabajo se expresaron como medias  $\pm$  el error estándar de la media (SEM, *standard error of the mean*) de al menos tres experimentos independientes. Los resultados fueron analizados mediante el programa de análisis estadístico GraphPad Prism<sup>®</sup>5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE.UU.) en el que se usó análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un test de comparación múltiple Student-Newman-Keuls o, en su lugar, Bonferroni. Un valor de p menor de 0.05 ( $p < 0.05$ ) se consideró significativo.

## **12. REACTIVOS Y APARATOS**

- 1,1,3,3-Tetrametoxipropano (TMOP) - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- 6-bromoindirubin-3'-oxima (BIO) - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- Ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- Ácido tricloroacético (TCA) - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- Acrilamida/bisacrilamida 30% - Bio-Rad Laboratories (CA, EE.UU.)
- Adiponectina recombinante humana - Biovendor (Alemania)
- Anticuerpo anti-COX2 - Dako (CA, EE.UU.)
- Anticuerpo anti-GAPDH - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- Anticuerpo anti-WISP2 - Abnova (Taiwan)
- Anticuerpo secundario anti-conejo y anti-ratón - GE Healthcare (Reino Unido)

- Anticuerpos anti-Bax, anti-Bcl2, anti-caspasa-3, anti-caspasa-3 procesada, anti-NOS2, anti-P38, anti-p-P38 y antiVCAM1 - Cell Signalling (MA, EE.UU.)
- Anticuerpos anti-MMP13 y anti-PGRN - Santa Cruz Biotechnology (CA, EE.UU.)
- Aparato de transferencia semi-seca (Trans-blot® Semi-Dry Transfer Cell) - Bio-Rad Laboratories (CA, EE.UU.)
- Apo-Transferrina - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- ARN de interferencia - Integrated DNA Technologies (IO, EE.UU.)
- Azul de bromofenol - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- Azul tripán - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- Cebadores para PCR - SABiosciences (MD, EE.UU.)
- Cell Quest Pro: programa de análisis de citometría de flujo - BD (NJ, EE.UU.)
- Citómetro de flujo FACScan - BD (NJ, EE.UU.)
- Cloruro sódico - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- Coladores de nylon de 40 µm de malla - Corning (NY, EE.UU.)
- Colagenasa P - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- Dexametasona - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- Diclorhidrato de naftilendiamina - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- Espectrofotómetro NanoDrop 1000 - Thermo Scientific (MA, EE.UU.)
- Glicerol - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- Glicina - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- GraphPad Prism 5: programa de análisis estadístico - GraphPad Software (CA, EE.UU.)
- IL1β recombinante humana - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)

- IL1 $\beta$  recombinante murina - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- IL6 recombinante murina - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- Image J 1,45s: programa para densitometría de imágenes - National Institutes of Health (MD, EE.UU.)
- Insulina - Novo Nordisk (Bagsvaerd, Dinamarca)
- Kit de detección de apoptosis Anexina V-IP - BD Pharmingen, BD Bioscience (NJ, EE.UU.)
- Kit de detección quimioluminiscente para Western blot (Immobilion™ Western Chemiluminescent HRP Substrate) - Merck Millipore (Alemania)
- Kit de extracción de ARN y proteína NucleoSpin - Macherey-Nagel (Alemania)
- Kit de retro-transcripción (Verso cDNA Kit) - Thermo Scientific (MA, EE.UU.)
- Kit para la determinación de Estado Antioxidante Total (TAS) - Rel Assay Diagnostics (Turquía)
- Kit para la determinación de Estado Oxidante Total (TOS) - Rel Assay Diagnostics (Turquía)
- Lector de ELISA Multiscan Plus - Thermo Labsystems (Helsinki, Finlandia)
- Leptina recombinante humana - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- L-glutamina - Lonza (Verviers, Bélgica)
- Línea celular condrogénica murina ATDC5 - RIKEN Cell Bank (Tsukuba, Japón)
- Línea celular de condrocitos humanos T/C-28a2 - cedida por Dra. Mary B. Goldring (Hospital for Special Surgery, NY, EE.UU.)
- Lípido catiónico siLentFect - Bio-Rad Laboratories (CA, EE.UU.)
- LPS - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)



- Medio DMEM  $\alpha$ -modificado - Lonza (Verviers, Bélgica)
- Medio DMEM/Hams'F12 - Lonza (Verviers, Bélgica)
- Membrana de PVDF para transferencia - Merck Millipore (Alemania)
- Mezcla maestra para PCR: RT<sup>2</sup> SYBR® Green/ROX qPCR Mastermix - SABiosciences (MD, EE.UU.)
- MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- Nitrito sódico - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- OptiMEM - Invitrogen (CA, EE.UU.)
- Penicilina/estreptomicina -Lonza (Verviers, Bélgica)
- Persulfato amónico (PSA) - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- PGRN recombinante humana - Enzo Life Sciences (NY, EE.UU.)
- PGRN recombinante murina - AdipoGen (Suiza)
- Pronasa - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- Reactivo de Bradford - BioRad Laboratories (CA, EE.UU.)
- Reactivo TRIzol - Invitrogen (CA, EE.UU.)
- SDS - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- Selenito sódico - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- Seroalbúmina bovina - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- Sistema de adquisición de imágenes EC3 imaging system - UVP (CA, EE.UU.)
- Sistema de electroforesis de geles de acrilamida - Bio-Rad Laboratories (CA, EE.UU.)
- Sistema de PCR en Tiempo Real Mx30005P - Stratagene (CA, EE.UU.)
- Suero Fetal Bovino - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)

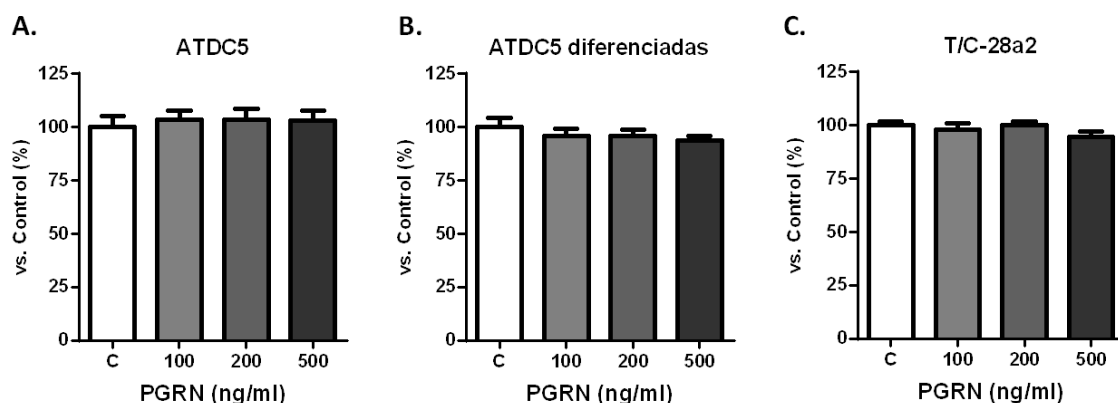
- Sulfanilamida - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina) - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- TNF $\alpha$  recombinante humano - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- TNF $\alpha$  recombinante murino - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- Tris Base - Sigma-Aldrich (MO, EE.UU.)
- Triton X-100 - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- Tween 20 - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- Visfatina recombinante humana - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)
- $\beta$ -Mercaptoetanol - Sigma Aldrich (MO, EE.UU.)

# **RESULTADOS**



**SECCIÓN A: NUEVAS ADIPOQUINAS. LA PROGRANULINA****1. Efecto de la PGRN sobre la vitalidad de los condrocitos**

En primer lugar, para estudiar cómo afectaba el tratamiento con la hormona PGRN a la vitalidad de los condrocitos, empleamos el ensayo colorimétrico MTT en células de ratón ATDC5 en estado no diferenciado y en estado maduro, además de en condrocitos humanos de la línea celular T/C-28a2. Así pues, tal como se muestra en la Figura 18, el tratamiento con concentraciones crecientes de PGRN durante 48 horas no tenía efecto sobre la vitalidad celular.

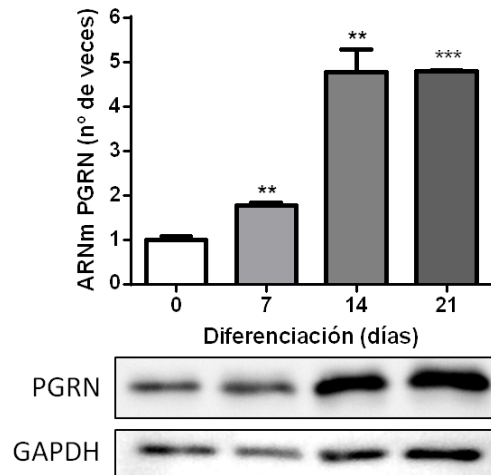


**Figura 18. Efecto de la PGRN sobre la vitalidad celular.** Células murinas ATDC5 (panel A), ATDC5 diferenciadas (panel B) y condrocitos humanos T/C-28a2 (panel C) fueron tratados con PGRN (100, 200, 500 ng/ml) durante 48 horas. La vitalidad fue analizada mediante el ensayo MTT, como se ha descrito en el apartado de materiales y métodos. Los resultados representan, en porcentaje respecto al control, la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes con 8 observaciones individuales por cada tratamiento y experimento.

**2. Modulación de la PGRN durante la diferenciación de los condrocitos**

Para determinar las variaciones en la expresión génica y proteica de PGRN durante la diferenciación de los condrocitos, las células ATDC5 se diferenciaron durante 21 días siguiendo el protocolo descrito en el apartado de materiales y métodos.

Como se puede apreciar en la Figura 19, la expresión del ARN mensajero de PGRN se veía significativamente aumentada a lo largo de la diferenciación de las células ATDC5 a 7, 14 y 21 días, alcanzando el máximo nivel de expresión en las células maduras (14 días) e hipertróficas (21 días). Este efecto también se observó a nivel de proteína.

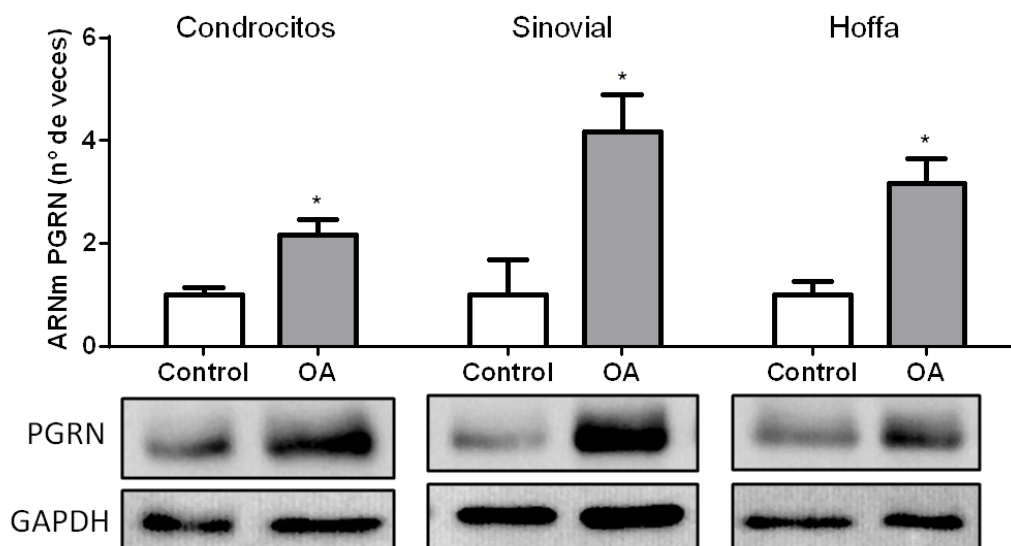


**Figura 19. Expresión del ARNm y de la proteína de PGRN durante la diferenciación de células ATDC5 después de 7, 14 y 21 días.** (Panel superior) Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de al menos 4 experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control 0 días (\*\*  $p < 0.01$  vs. Control, \*\*\*  $p < 0.001$  vs. Control). (Panel inferior) Mediante Western blot se determinó la expresión proteica de PGRN. El anticuerpo para GAPDH fue usado como control de carga. Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos independientes.

### 3. Expresión de la PGRN en tejidos procedentes de pacientes sanos y artrósicos

Dado que la producción local de adipocinas puede tener importantes implicaciones patológicas en la homeostasis del cartílago articular, también se evaluó la expresión del ARN mensajero y los niveles de proteína de PGRN en condrocitos primarios humanos, almohadilla de grasa infrarrotuliana o cuerpo de Hoffa y membrana sinovial de pacientes con OA, y se comparó esta expresión con la de donantes sanos. Como se muestra en la Figura 20, tanto los condrocitos primarios, como la membrana

sinovial y el cuerpo de Hoffa expresaron PGRN. Además, la expresión de PGRN fue significativamente mayor en los condrocitos, tejidos sinoviales y Hoffa obtenidos de pacientes con OA en comparación con los obtenidos de donantes sanos.

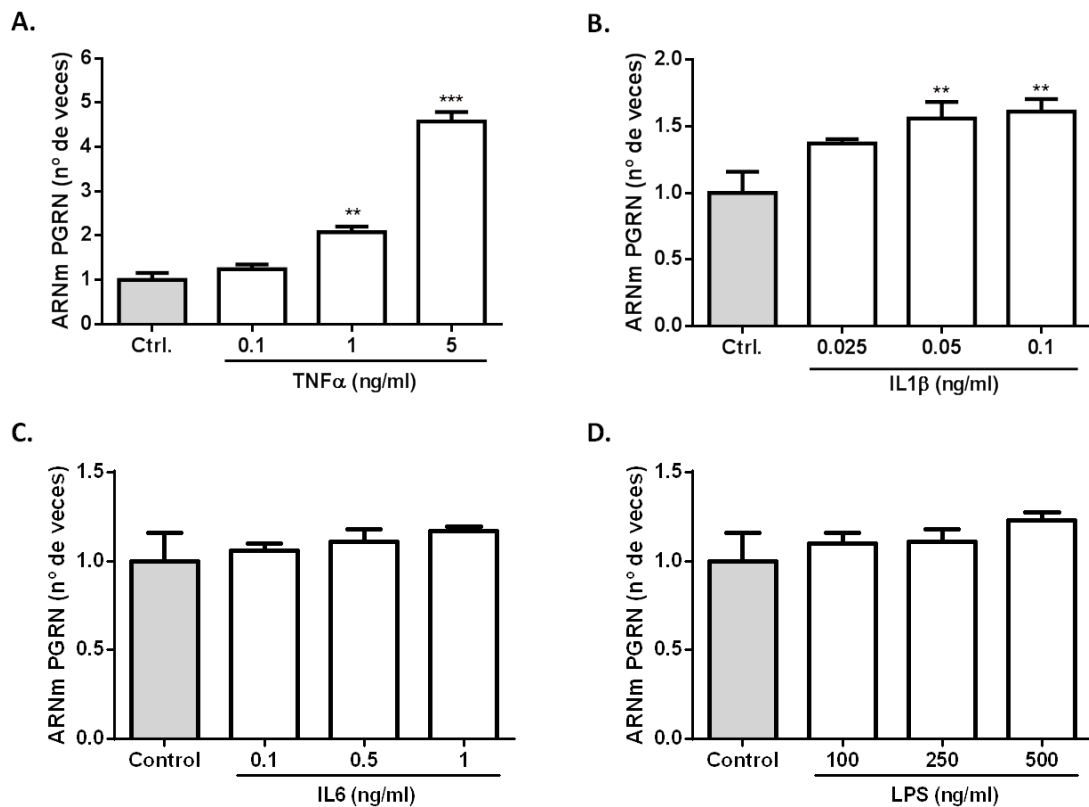


**Figura 20. Determinación de los niveles de ARN mensajero y proteína en tejidos articulares de individuos sanos y pacientes con OA.** (Panel superior) Las barras grises representan la media  $\pm$  SEM de los resultados de expresión génica de condrocitos, membrana sinovial y cuerpo de Hoffa obtenidos de pacientes OA. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control sano (\* $p < 0.05$  vs. Control). (Panel inferior) La expresión proteica de PGRN se determinó mediante Western blot de 18 pacientes OA (edad 52-73, IMC medio de 28.4) y 6 donante sanos (edad 23-50, IMC medio de 23.4). El anticuerpo para GAPDH fue usado como control de carga. Las imágenes son representativas de las muestras empleadas.

#### 4. Efecto de citoquinas pro-inflamatorias y agonistas de TLR4 sobre la expresión génica de PGRN en células ATDC5 diferenciadas

Para dilucidar el patrón de expresión de PGRN en condiciones pro-inflamatorias, se trataron células ATDC5 (diferenciadas durante 14 días) con diferentes dosis de  $TNF\alpha$ ,  $IL1\beta$ ,  $IL6$  y LPS, como un agonista de TLR4, durante 24 horas. Estas células diferenciadas tienen fenotipo de condrocitos adultos maduros y, a pesar de su

origen murino, tienen un comportamiento idéntico a las células humanas, al menos en términos de expresión de mediadores inflamatorios (200). Como se muestra en la Figura 21, las células estimuladas con TNF $\alpha$  mostraron un marcado incremento en la expresión del ARNm de PGRN a las dosis de 1 y 5 ng/ml (panel A). Se observó un efecto similar cuando las células fueron estimuladas con IL1 $\beta$  (0,05 y 0,1 ng / ml; panel B). No obstante, ni el tratamiento con IL6 ni con LPS tenían efectos significativos en la expresión de PGRN (paneles C y D).

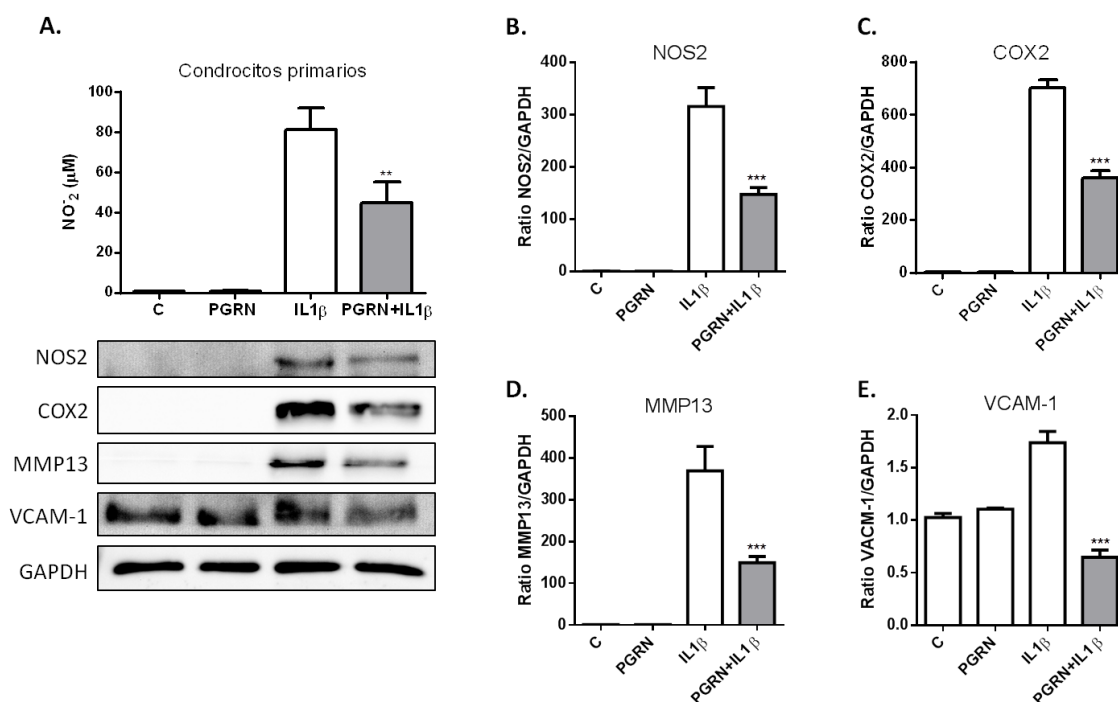


**Figura 21. Expresión relativa del ARNm de PGRN en células ATDC5 diferenciadas tratadas con TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 y LPS.** Las células fueron tratadas durante 24 horas con diferentes dosis de TNF $\alpha$  (panel A), IL1 $\beta$  (panel B), IL6 (panel C) y LPS (panel D). Las barras representan la media  $\pm$  SEM como el número de veces que se modifica la expresión de PGRN respecto al control. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (\*\* p<0.01 vs. Control).



## 5. Efecto de la PGRN sobre la inducción del catabolismo en condrocitos humanos tratados con IL1 $\beta$

Con el fin de obtener más conocimientos sobre la potencial actividad farmacológica de PGRN, se trataron condrocitos primarios humanos con IL1 $\beta$  (10 ng/ml) en presencia o no de PGRN 200 ng/ml durante 48 horas. Como se muestra en la Figura 22, los condrocitos primarios estimulados con IL1 $\beta$  mostraron una fuerte acumulación de nitrito en comparación con el control de células no estimuladas (Figura 22, panel A superior).



**Figura 22. PGRN suprime el catabolismo inducido por IL1 $\beta$  en condrocitos humanos.** Las células fueron tratadas durante 48 horas con 10 ng/ml de IL1 $\beta$ , en presencia o no de 200 ng/ml de PGRN. (Panel A superior) El sobrenadante del cultivo fue empleado para analizar la concentración de nitrito. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes (\*\*  $p < 0.01$  PGRN+IL1 $\beta$  vs. IL1 $\beta$ ). (Panel A superior) Los lisados celulares se analizaron mediante Western blot empleando los anticuerpos para NOS2, COX-2, MMP13 y VCAM-1. GAPDH fue empleado como control de carga. Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos

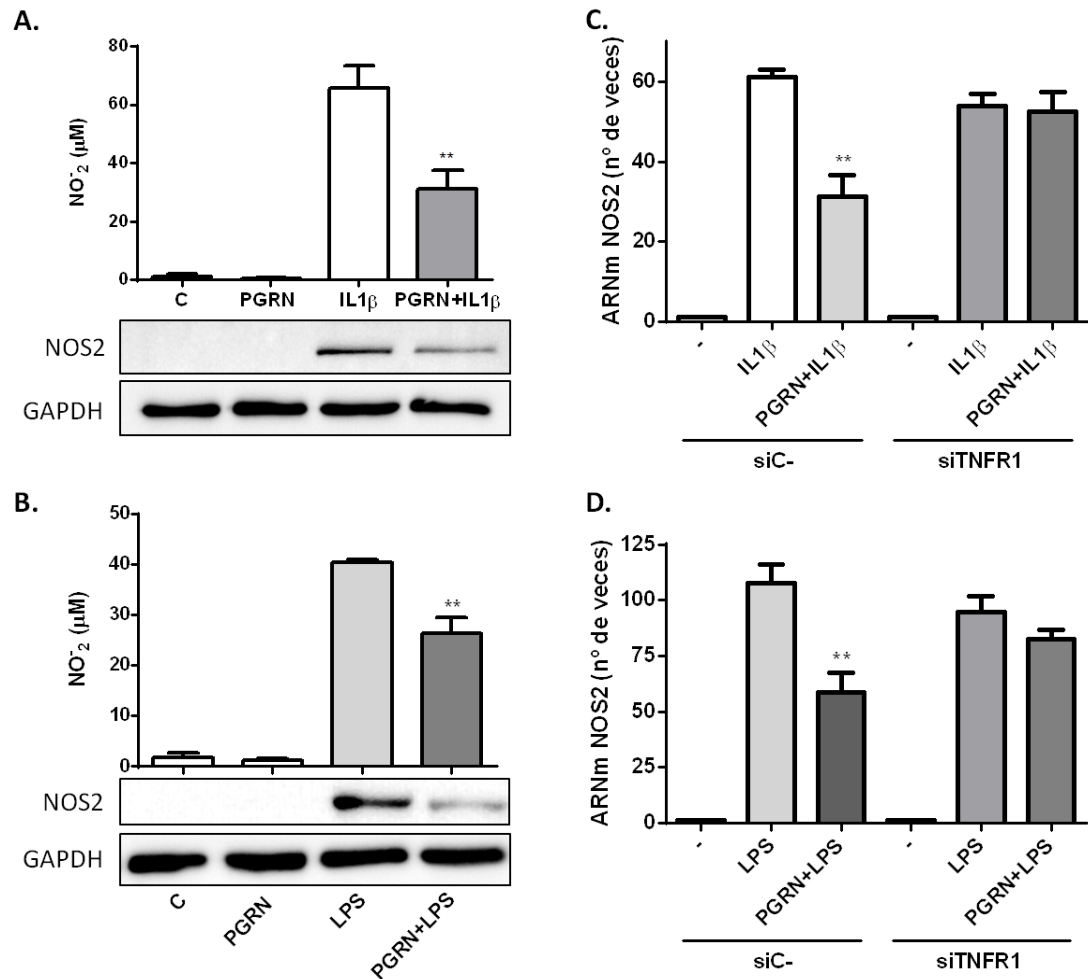
independientes. (Paneles B-E) Las gráficas muestran el análisis densitométrico del Western blot (n=3; \*\*\* P<0.001 PGRN+IL1 $\beta$  vs. IL1 $\beta$ ).

Sin embargo, el tratamiento con la proteína recombinante PGRN disminuía significativamente la acumulación de nitrito producida por el tratamiento con IL1 $\beta$ , mientras que la PGRN *per se* no afectó a la producción de nitrito basal. La inhibición de la acumulación de nitrito fue confirmada por Western blot de la NOS tipo 2 (NOS2). La PGRN fue capaz de inhibir la expresión de la proteína NOS2 (Figura 22, panel A inferior y panel B). Además, dado que la PGRN ha sido propuesta como una molécula que previene la destrucción del cartílago en la artritis inflamatoria mediada por TNF $\alpha$ , se examinaron los niveles de los biomarcadores catabólicos COX-2 y MMP13 en condrocitos primarios estimulados con IL1 $\beta$ . Los niveles de proteína de COX-2 y MMP13 se incrementaron significativamente después del tratamiento IL1 $\beta$ . Sin embargo, PGRN disminuyó significativamente la inducción de COX-2 y MMP13 por la IL1 $\beta$  (Figura 22, paneles C y D). Por otro lado, dado que las citoquinas pro-inflamatorias como IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$  son capaces de regular la expresión de VCAM-1 en cultivos primarios de condrocitos articulares humanos, se examinaron los niveles de proteína VCAM-1 después del tratamiento con PGRN. Así, el tratamiento con PGRN producía una disminución significativa de la expresión de VCAM-1 inducida por IL1 $\beta$  (Figura 22, paneles A y E).

## **6. PGRN reduce la expresión de NOS2 inducida por la IL1 $\beta$ y el LPS, al menos en parte, a través del receptor TNFR1**

Se ha descrito como la PGRN se une competitivamente a los receptores TNFR1 y TNFR2, bloqueando la acción inflamatoria del TNF $\alpha$  cuando interactúa con el TNFR1

y promoviendo el anabolismo del condrocito cuando se une al TNFR2 (95). En base a los resultados anteriores donde la PGRN reducía la respuesta inflamatoria inducida por la IL1 $\beta$ , quisimos investigar si este efecto anti-inflamatorio estaba mediado por TNFR1. Primero, corroboramos que la PGRN era capaz de modular los niveles de nitrito y la expresión de NOS2 también en células ATDC-5 diferenciadas (Figura 23, paneles A y B). A continuación, para determinar si el efecto anti-inflamatorio de la PGRN estaba mediado por TNFR1, silenciamos el gen de TNFR1 empleando la técnica del ARN de interferencia. Las células ATDC-5 maduras fueron transfectadas con el ARNi para TNFR1 (siTNFR1) y luego se estimularon con IL1 $\beta$  y LPS en presencia o no de PGRN (Figura 23, paneles C y D). Como se observa en la figura, la ausencia de TNFR1 suprimía el efecto anti-inflamatorio de la PGRN.

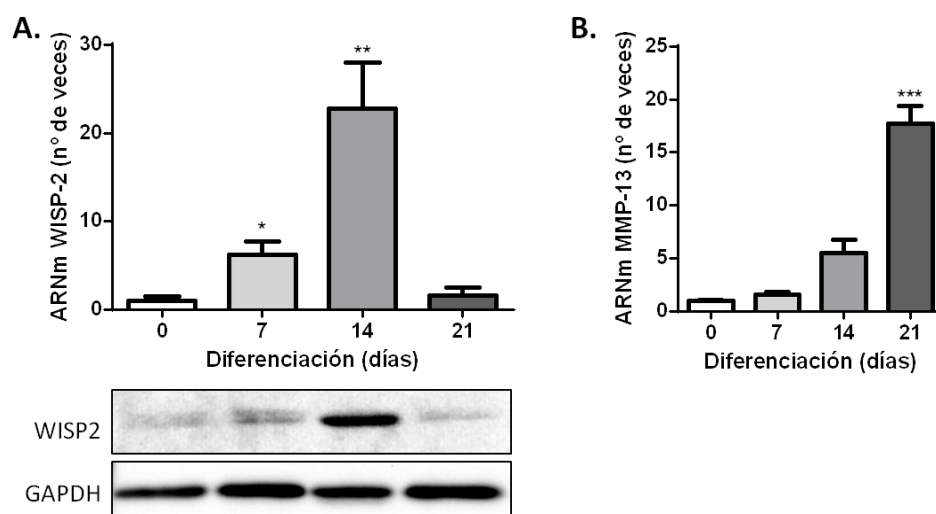


**Figura 23. PGRN reduce la producción de nitrito y la expresión de NOS2 inducida por la IL1β y el LPS en células ATDC-5 maduras, al menos en parte, a través de receptor TNFR1.** (Paneles A y B) Las células fueron tratadas durante 48 horas con 0.1 ng/ml de IL1β (A) y 250 ng/ml de LPS (B) en presencia o no de PGRN (200 ng/ml). El sobrenadante del cultivo fue empleado para analizar la concentración de nitrito. Las barras representan la media ± SEM de al menos 3 experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (\*\* p<0.01 vs. PGRN+IL1β vs. IL1β). Los lisados celulares se analizaron mediante Western blot empleando el anticuerpo para NOS2. GAPDH fue empleado como control de carga. Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos independientes. (Paneles C y D) Las células fueron transfectadas con un ARNi de control negativo (siC-) o el ARNi para el TNFR1 (siTNFR1), y estimuladas con 0.1 ng/ml de IL1β (C) y 250 ng/ml de LPS (D) en presencia o no de PGRN (200 ng/ml). Los niveles relativos de ARNm de NOS2 fueron analizados mediante RT-PCR. Las barras representan la media ± SEM de al menos 3 experimentos independientes (\*\* p<0.01 PGRN+IL1β vs. IL1β; PGRN+LPS vs. LPS).

## SECCIÓN B: NUEVAS ADIPOQUINAS. WISP-2

## 1. Modulación de la expresión de WISP-2 durante la diferenciación de los condrocitos

Para evaluar si los niveles de ARNm y proteína de WISP-2 variaban durante la diferenciación de los condrocitos, sometimos a la línea celular murina ATDC5 al proceso de diferenciación desde pre-condrocitos hasta condrocitos maduros e hipertróficos, como se expuso en el apartado de materiales y métodos. Como se muestra en la Figura 24 (panel A), la expresión del ARNm de WISP-2 se incrementaba durante el proceso de diferenciación. Este aumento era significativamente estadístico después de 7 y 14 días de diferenciación en comparación con las células no diferenciadas (día 0). Sin embargo, la expresión de WISP-2 decaía a los 21 días, cuando los condrocitos son hipertróficos. Esta disminución coincidía con el incremento de la expresión de MMP-13 en el mismo tiempo (21 días) (Figura 24, panel B). Este efecto también fue evaluado en términos de la expresión proteica, como se muestra en la Figura 24 (panel A inferior).

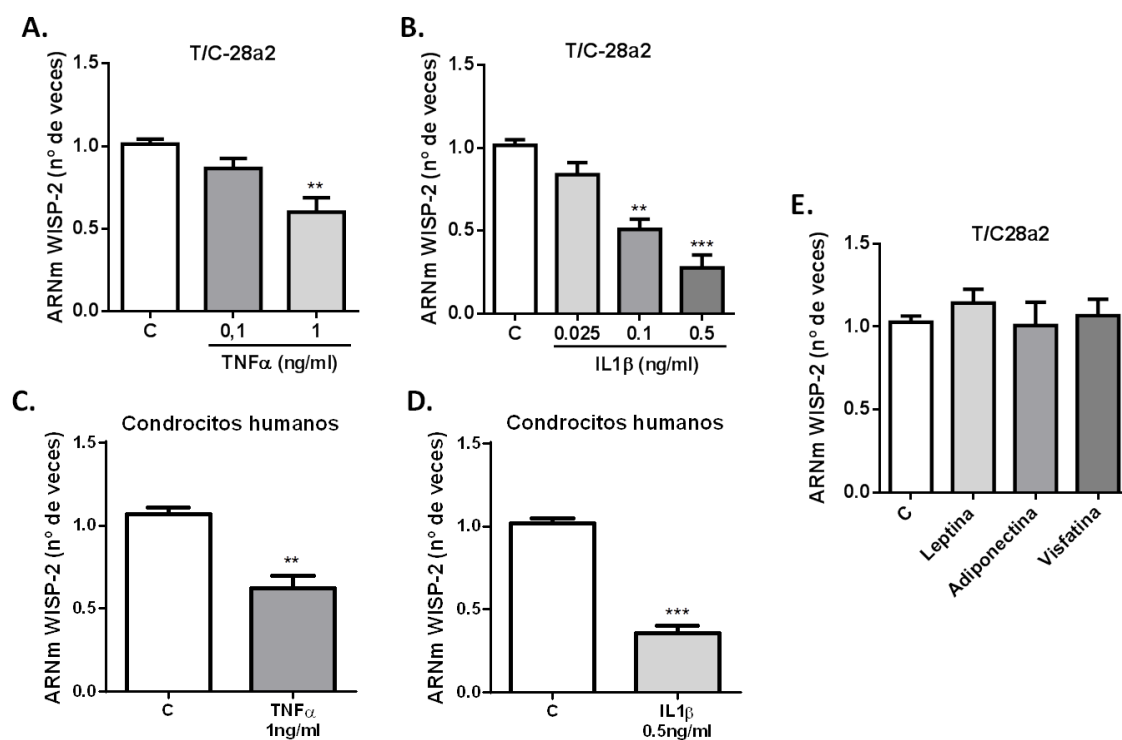


**Figura 24.** Expresión del ARNm y de la proteína de WISP-2 durante la diferenciación de células ATDC5 después de 7, 14 y 21 días. (Panel A superior) Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de al menos 4 experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas

respecto al control 0 días (\*  $p < 0.05$  vs. Control, \*\*  $p < 0.01$  vs. Control). (Panel A inferior) Mediante Western blot se determinó la expresión proteica de WISP-2. El anticuerpo para GAPDH fue usado como control de carga. Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos independientes. (Panel B) Expresión génica de MMP-13. Los valores son la media  $\pm$  SEM de al menos 4 experimentos independientes (\*\*\*)  $p < 0.001$  vs. Control).

## **2. Efecto de citoquinas y adipoquinas pro-inflamatorias sobre la expresión génica de WISP-2 en condrocitos humanos**

Para dilucidar el patrón de expresión de WISP-2 en condiciones pro-inflamatorias, se trataron con las citoquinas TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  células de la línea humana T/C28a2 y condrocitos primarios humanos. Además, se trataron las células T/C28a2 con las adipoquinas leptina, adiponectina y visfatina. Como se muestra en la Figura 25, las células estimuladas con TNF $\alpha$  1 ng/ml durante 24 horas mostraron una reducción significativa de la expresión génica de WISP-2 (panel A y C). Un efecto más pronunciado se observó cuando las células se trataron con IL1 $\beta$  0.5 ng/ml durante 24 horas (panel B y D). Sin embargo, ni la leptina (800 nM), ni la adiponectina (10  $\mu$ g/ml) o la visfatina (500 ng/ml) tuvieron efecto sobre la expresión de WISP-2 (panel E).

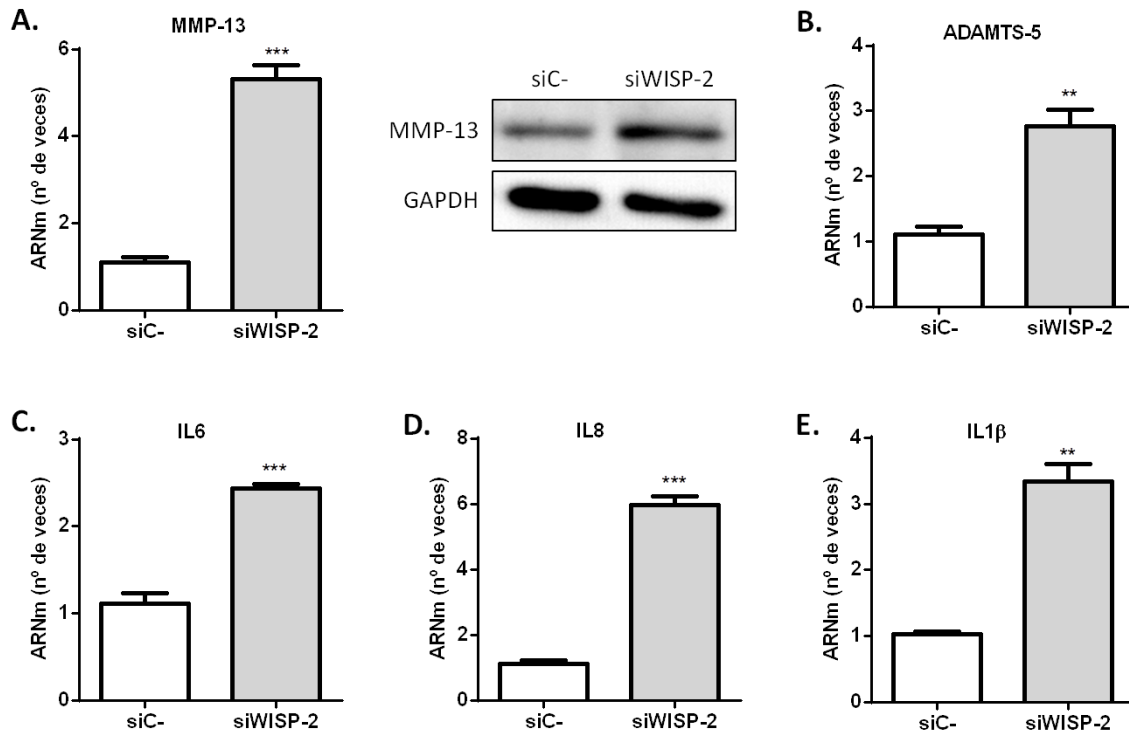


**Figura 25. Expresión del ARNm de WISP-2 tras la estimulación con citoquinas y adipocinas pro-inflamatorias de condrocitos humanos.** Se trataron las células de la línea humana T/C28a2 con TNF $\alpha$  (panel A, 0,1 y 1 ng/ml) y con IL1 $\beta$  (panel B, 0,025, 0,1 y 0,5 ng/ml), y condrocitos primarios humanos con TNF $\alpha$  1 ng/ml (panel C) e IL1 $\beta$  0,5 ng/ml (panel D). Además, la línea T/C28a2 fue tratada con leptina (800 nM), adiponectina (10  $\mu$ g/ml) y visfatina (500 ng/ml) (panel E). Todos los tratamientos se realizaron durante 24 horas. Los valores son las medias  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes (\*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 vs. Ctrl.).

### 3. El silenciamiento génico de WISP-2 estimula el catabolismo de los condrocitos

En base a los resultados anteriores en los que se muestra la regulación a la baja de WISP-2 bajo condiciones pro-inflamatorias, se investigó el efecto del silenciamiento del gen WISP2 sobre la expresión de mediadores de la degradación de la matriz del cartílago articular. Como se muestra en la Figura 26, la supresión de WISP-2 conllevaba el incremento en la expresión de MMP-13 (panel A), ADAMTS-5 (panel B) en comparación con las células T/C28a2 transfectadas con un ARNi control. Además de

las enzimas degradativas del cartílago, los efectos catabólicos de los condrocitos están mediados por diversas citoquinas y quimioquinas. Así, el silenciamiento de WISP-2 regula al alza los niveles de ARNm de las citoquinas IL6 (panel C) e IL1 $\beta$  (panel E), así como de la quimioquina IL8 (panel D).

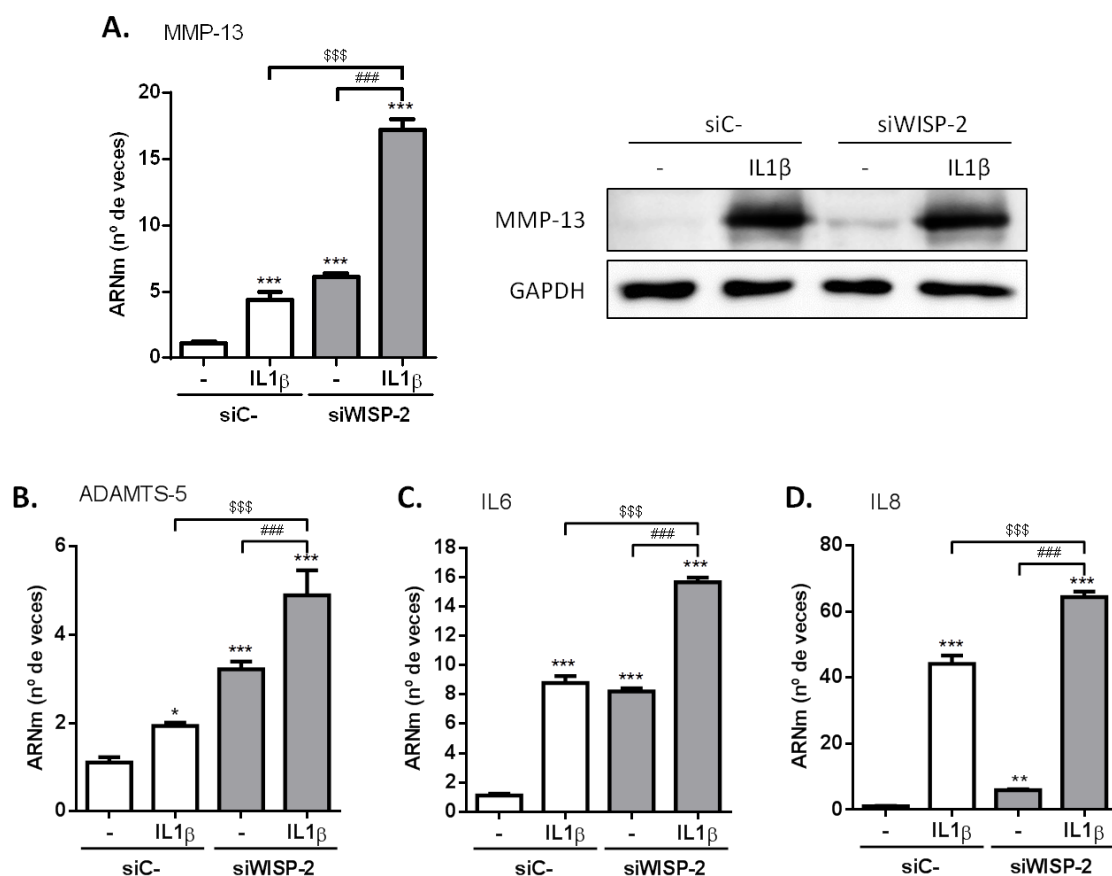


**Figura 26. Efecto del silenciamiento génico de WISP-2 sobre marcadores catabólicos en condrocitos.** Condrocitos de la línea celular humana T/C28a2 fueron transfectadas con ARNi de control negativo (siC-, 10 nM) o con ARNi contra WISP-2 (siWISP-2, 10 nM) durante 48 horas. Se determinó tanto la expresión génica (panel A izquierdo) como la expresión proteica de MMP-13 (panel A derecho). GAPDH fue empleado como control de carga. Los niveles relativos de ARNm para los marcadores catabólicos ADAMTS-5 (panel B), IL6 (panel C), IL8 (panel D) e IL1 $\beta$  (panel E) fueron determinados mediante RT-PCR. Los valores son la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes (\*\*\*P<0.001 vs. siC-).



#### 4. Efecto del silenciamiento génico de WISP-2 sobre condrocitos T/C28a2 estimulados con IL1 $\beta$

Dado que la IL1 $\beta$  ha sido implicada en la degradación del cartílago (201), se determinó el efecto del silenciamiento de WISP-2 sobre condrocitos T/C28a2 estimulados con IL1 $\beta$ . Como cabría esperar, el tratamiento durante 24 horas con IL1 $\beta$  regulaba al alza los niveles de ARNm de MMP-13, ADAMTS-5, IL6 e IL8, mientras que el silenciamiento de WISP-2 incrementaba aún más la expresión inducida por IL1 $\beta$  de estos mismos genes.

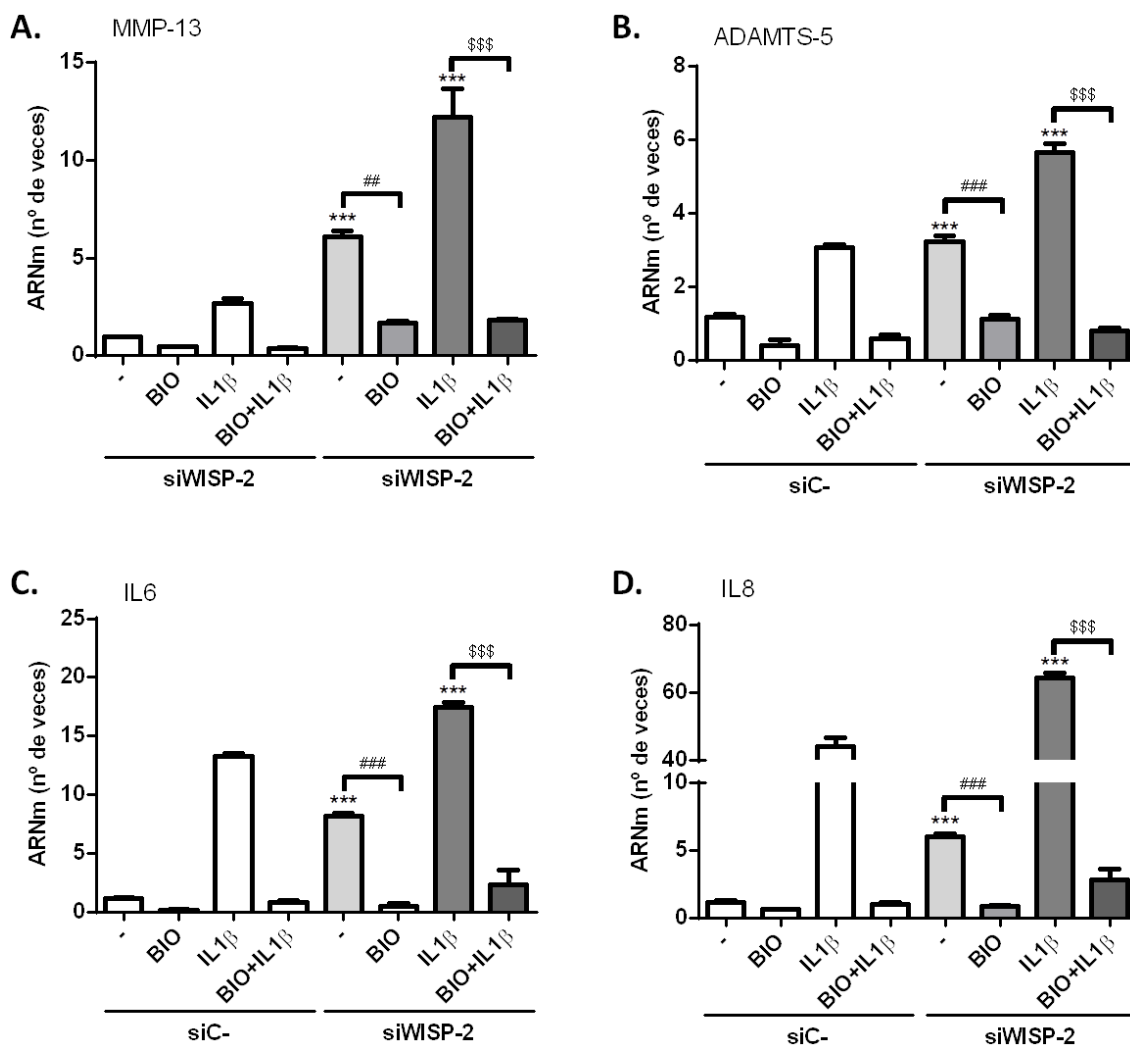


**Figura 27. Efecto del silenciamiento de de WISP-2 sobre condrocitos T/C28a2 estimulados con IL1 $\beta$ .** Los condrocitos humanos T/C28a2 fueron transfectados con ARNi de control negativo (siC-, 10 nM) o con ARNi contra WISP-2 (siWISP-2, 10 nM) durante 48 horas, tras las cuales se estimuló con IL1 $\beta$  (0.5 ng/ml) durante 24 horas. Se determinó tanto la expresión génica (panel A izquierdo) como la expresión proteica de MMP-13 (panel A derecho). GAPDH fue empleado como control de

carga. Los niveles relativos de ARNm para los marcadores catabólicos ADAMTS-5 (panel B), IL6 (panel C) e IL8 (panel D) fueron determinados mediante RT-PCR. Los valores son la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes (\*\*P<0.001 vs. siC-; ###P<0.001 siWISP-2 vs. siWISP-2+ IL1 $\beta$ ; \$\$\$P<0.001 IL1 $\beta$  vs. siWISP-2+ IL1 $\beta$ ).

## **5. Efecto de la ruta canónica de Wnt sobre el catabolismo inducido por el silenciamiento de WISP-2 sobre condrocitos T/C28a2**

WISP-2 es un gen diana de la ruta Wnt y ha sido descrito como un activador de la ruta canónica de Wnt en adipocitos (115). Para investigar la implicación de la ruta canónica de Wnt, se transfectaron condrocitos T/C28a2 con siWISP-2 y posteriormente se trataron con IL1 $\beta$  en presencia o no del inhibidor selectivo de GSK3 $\beta$  BIO. Como se muestra en la Figura 28, la activación de la ruta canónica de Wnt mediante el empleo del inhibidor BIO reducía significativamente la expresión de MMP-13 (panel A), así como la de ADAMTS-5 (panel B), IL6 (panel C) e IL8 (panel D). Además, el tratamiento con BIO bloqueaba la inducción de la expresión génica de estos marcadores catabólicos por la IL1 $\beta$ . Cabe señalar que la inhibición de GSK3 $\beta$  con BIO casi suprimía por completo la inducción mediada por IL1 $\beta$  en células transfectadas con siWISP-2 de MMP-13, ADAMTS-5, IL6 e IL8.



**Figura 28.** Efecto de la ruta canónica de Wnt sobre el catabolismo mediado por el silenciamiento de WISP-2 en condrocitos T/C28a2. Los condrocitos humanos T/C28a2 fueron transfectados con ARNi de control negativo (siC-, 10 nM) o con ARNi contra WISP-2 (siWISP-2, 10 nM) durante 48 horas, tras las cuales se estimuló con IL1 $\beta$  (0.5 ng/ml) durante 24 horas en combinación con BIO 1  $\mu$ M. Se determinó tanto la expresión génica de MMP-13 (panel A), ADAMTS-5 (panel B), IL6 (panel C) e IL8 (panel D) mediante RT-PCR. Los valores son la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes (\*\*\*) $P$ <0.001 vs. siC-; ## $P$ <0.01, ### $P$ <0.001 siWISP-2 vs. siWISP-2 + BIO; \$\$\$ $P$ <0.001 IL1 $\beta$  vs. siWISP-2 + IL1 $\beta$  + BIO).

SECCIÓN C: CONTAMINANTES AMBIENTALES. NDL-PCBs

1. Efecto de los NDL-PCBs sobre la vitalidad de los condrocitos

Inicialmente, decidimos estudiar cómo afectaba la exposición de los NDL-PCBs a la vitalidad de los condrocitos. Para ello empleamos el ensayo colorimétrico MTT que permite analizar el estado reductor celular, el cual es reflejo de la función mitocondrial. Así pues, como se muestra en la Figura 29, observamos que la actividad metabólica de las células de ratón ATDC5 y las células humanas T/C-28a2 disminuía de manera dosis dependiente tras el tratamiento con NDL-PCBs 101, 153 y 180 durante 24 horas (panel A y B). Además, el efecto era tiempo dependiente, ya que la reducción de la vitalidad era más evidente después de 48 horas de exposición a los químicos (panel C y D).

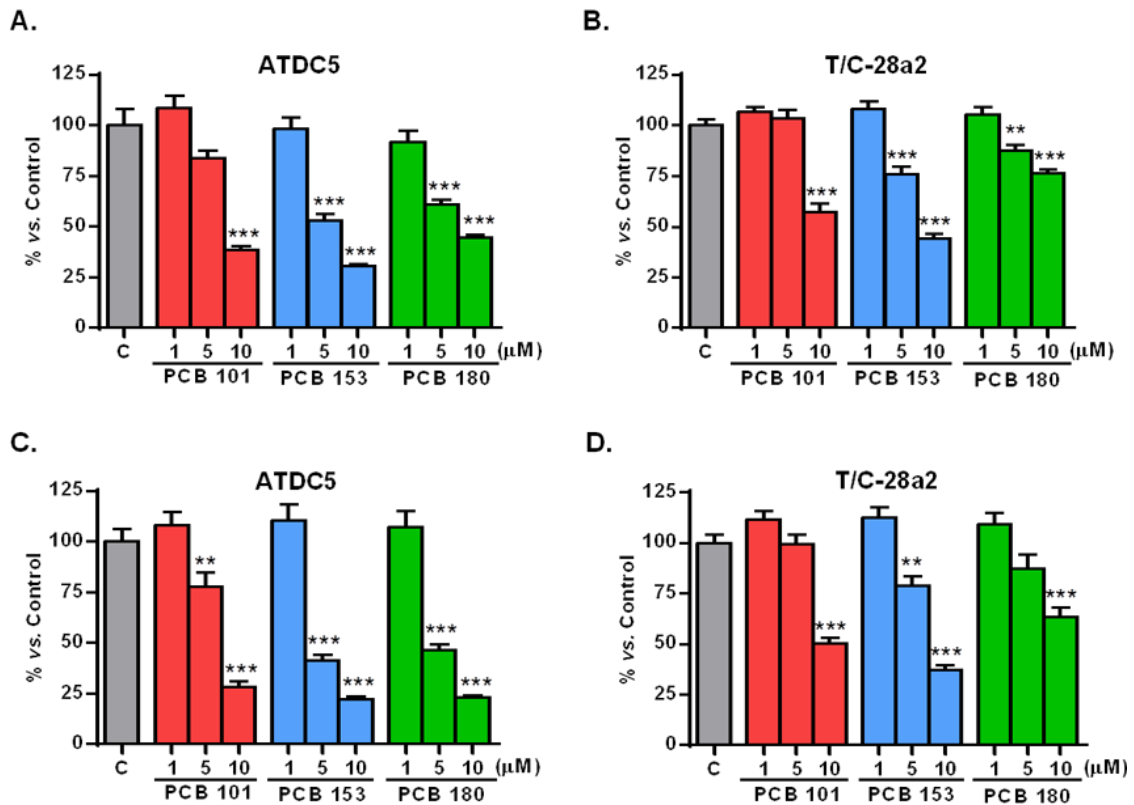


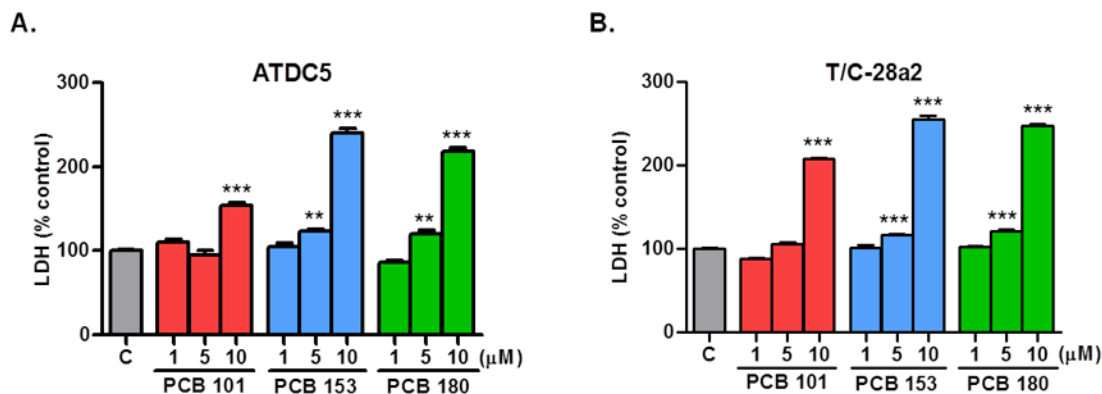
Figura 29. Efecto de los PCBs 101, 153 y 180 sobre la viabilidad celular de condrocitos. Las células de ratón ATDC5 fueron tratadas con PCBs (1, 5 y 10 μM) durante 24 horas (A) y 48 horas

(C). Las células humanas T/C28a2 fueron tratadas con PCBs (1, 5 y 10  $\mu$ M) durante 24 horas (B) y 48 horas (D). La vitalidad fue analizada mediante el ensayo MTT, como se ha descrito en el apartado de materiales y métodos. Los resultados representan, en porcentaje respecto al control, la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes con 8 observaciones individuales por cada tratamiento y experimento. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control con DMSO 0.1% (\*\*  $p < 0.01$  vs. Control, \*\*\*  $p < 0.001$  vs. Control).

## **2. Caracterización molecular del efecto citotóxico de los NDL-PCBs en las células murinas ATDC5**

### **2.1. Determinación de los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) tras la exposición a los NDL-PCBs**

La alteración del metabolismo celular es considerada como una fase previa a los procesos de muerte celular. Por ello, los datos mostrados hasta el momento sugieren una alteración de la función mitocondrial. Para determinar si el efecto citotóxico observado era debido a uno de los dos tipos principales de muerte celular, apoptótica o necrótica, se realizó un ensayo para evaluar la acumulación de LDH en el medio de cultivo de los condrocitos tratados con NDL-PCBs. Las células liberan LDH como consecuencia de alteraciones en la integridad de la membrana celular. Por ello, la liberación de la enzima LDH se considera un marcador de necrosis, proceso de muerte celular que termina con la lisis total de la célula. Como se puede observar en la Figura 30, y de acuerdo con los datos previos de viabilidad celular, los niveles de LDH se incrementaban significativamente de forma dosis dependiente tras una exposición de 24 horas. Esto indica que el proceso de necrosis está presente tanto en los condrocitos murinos como humanos.

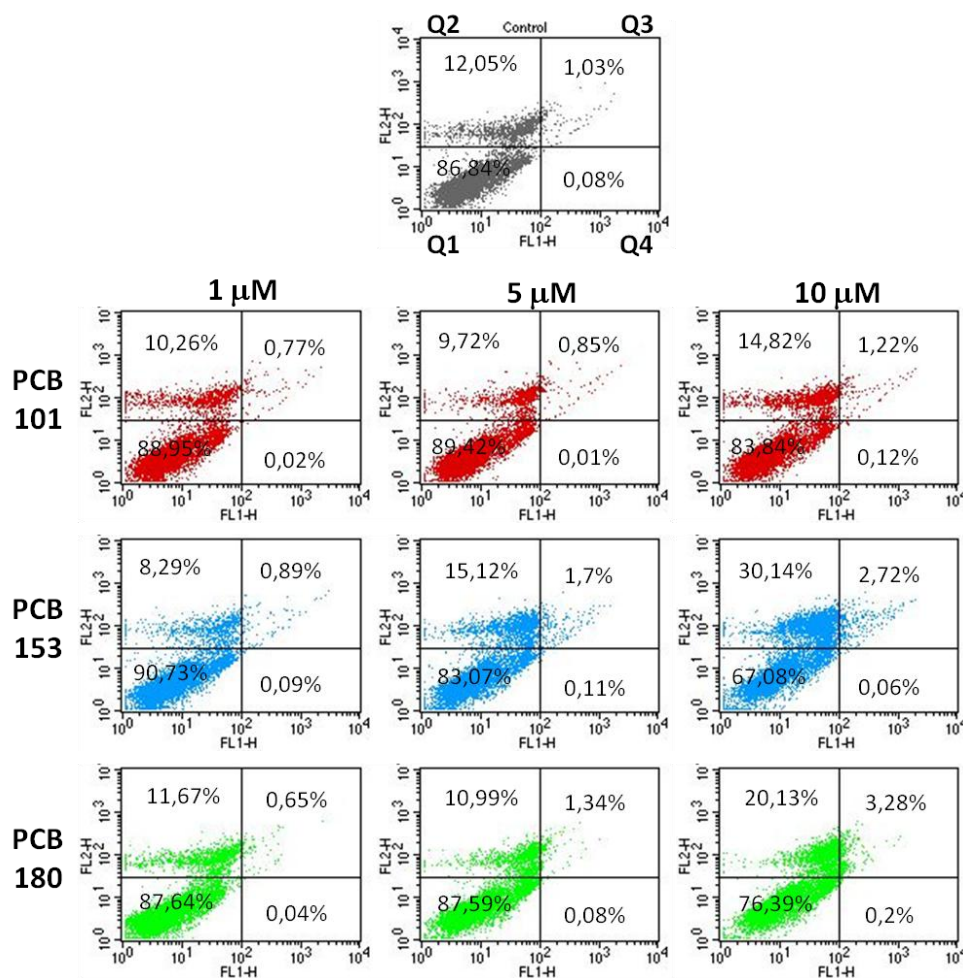


**Figura 30. Efecto de los PCBs 101, 153 y 180 sobre los niveles de LDH.** Las células ATDC5 (panel A) y las células T/C28a2 (panel B) fueron tratadas con los tres PCBs (1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Tras el tiempo de exposición, los sobrenadantes se recogieron y analizaron mediante el ensayo LDH, como se ha descrito en el apartado de materiales y métodos. Los resultados representan, en porcentaje respecto al control, la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control con DMSO 0.1% (\*\*  $p < 0.01$  vs. Control, \*\*\*  $p < 0.001$  vs. Control).

## 2.2. Inducción de necrosis en las células ATDC5 expuestas a NDL-PCBs

Continuando con el estudio de caracterización de la muerte celular, analizamos el efecto de los NDL-PCBs sobre la apoptosis y la necrosis empleando el doble marcaje FITC-Anexina V e ioduro de propidio (IP). Este ensayo nos permite discriminar entre células apoptóticas (negativas para IP y positivas para Anexina V) y células necróticas (positivas para IP y negativas para Anexina V). Con este doble marcaje también se puede diferenciar entre apoptosis tardía y apoptosis temprana. Las células ATDC5 se incubaron con los NDL-PCBs (1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. A continuación se marcaron con Anexina V e IP y se analizaron mediante citometría de flujo. Como se muestra en los histogramas de la Figura 31, los NDL-PCBs inducían necrosis y muerte apoptótica tardía de manera dosis dependiente, indicado por el incremento del

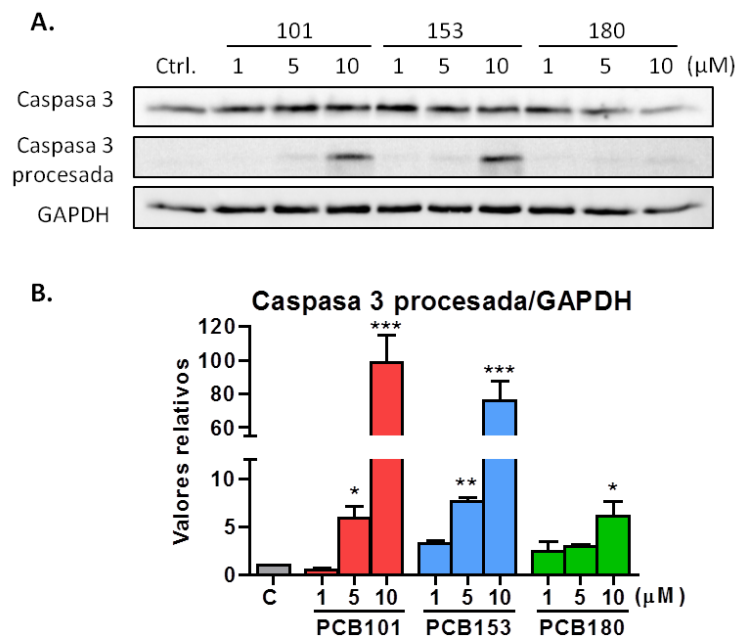
porcentaje de células. El efecto necrótico mostrado por este método, confirma el efecto necrótico observado con el ensayo del LDH.



**Figura 31. Efecto necrótico inducido por NDL-PCBs.** Las células ATDC5 se trataron con los PCBs 101, 153 y 180 (1, 5 y 10  $\mu$ M) durante 24 horas, luego se marcaron con Anexina V (FL1) e yoduro de propidio (FL2) y se analizaron mediante citometría de flujo, como se describe en el apartado de material y métodos. El primer cuadrante (Q1, Anexina V<sup>-</sup>, IP<sup>-</sup>) representa las células viables; el segundo cuadrante (Q2, Anexina V<sup>-</sup>, IP<sup>+</sup>) las células necróticas; el tercer cuadrante (Q3, Anexina V<sup>+</sup>, IP<sup>+</sup>) las células en apoptosis tardía; y el cuarto cuadrante (Q4, Anexina V<sup>+</sup>, IP<sup>-</sup>) las células en apoptosis temprana. Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

### 2.3. Activación y procesado de caspasas por parte de los NDL-PCBs

Siguiendo con el estudio de la apoptosis, se procedió al análisis del procesado y activación de la caspasa 3. Esta enzima es clave en la transducción y ejecución de la señal apoptótica inducida por diferentes estímulos. Se encuentra en las células como precursores inactivos (pro-caspasa-3) que necesitan ser cortados para iniciar su actividad. Mediante la técnica Western blot, se estudió el efecto de los NDL-PCBs sobre el procesado de la caspasa-3. Como se puede observar en la Figura 32, los NDL-PCBs provocaban el procesado de la caspasa-3 de manera dosis dependiente tras 3 horas de exposición, confirmando de esta manera la activación de rutas apoptóticas por parte de estos compuestos.

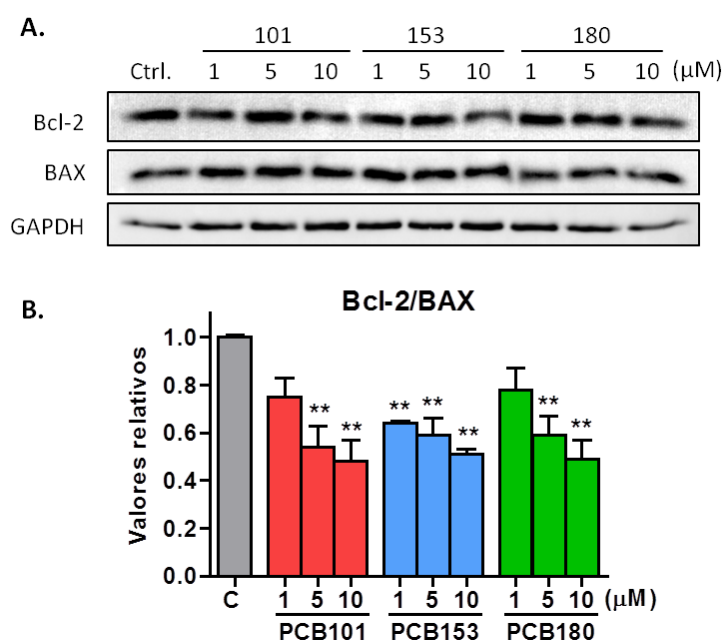


**Figura 32. Activación de la caspasa-3 por la exposición a NDL-PCBs.** Las células ATDC5 fueron tratadas con los PCBs 101, 153 y 180 (1, 5 y 10 μM) durante 3 horas. Mediante Western blot se determinó la expresión y procesado de la caspasa-3. El anticuerpo para GAPDH fue usado como control de carga. (A) Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos independientes. (B) La gráfica muestra el análisis de densitometría de las imágenes (n=3; diferencias significativas respecto al control con DMSO 0.1% , \*p<0.05 vs. Control, \*\* p<0.01 vs. Control, \*\*\* p<0.001 vs. Control).



## 2.4. Efecto de los NDL-PCBs sobre la expresión de proteínas pro- y anti-apoptóticas

Para ahondar más en la ruta apoptótica, y guiados por los resultados previos obtenidos por el grupo de Rosaria Meli, donde los NDL-PCBs inducían apoptosis a través de la activación de la vía intrínseca (172), decidimos estudiar esta ruta de la apoptosis. Con este fin, analizamos la expresión de dos proteínas de la familia Bcl-2, la anti-apoptótica Bcl-2 y la pro-apoptótica Bax. Como se muestra en la Figura 33, después de 3 horas de exposición a los NDL-PCBs, observamos una alteración de la expresión proteica de Bcl-2 y Bax, la proteína Bcl-2 disminuía sus niveles y la proteína Bax aumentaba de manera dosis dependiente. Además, el análisis densitométrico mostraba un descenso significativo del ratio Bcl-2/Bax. Todo ello sugiere que la vía intrínseca juega un papel en la inducción de la apoptosis por parte de los NDL-PCBs también en los condrocitos.

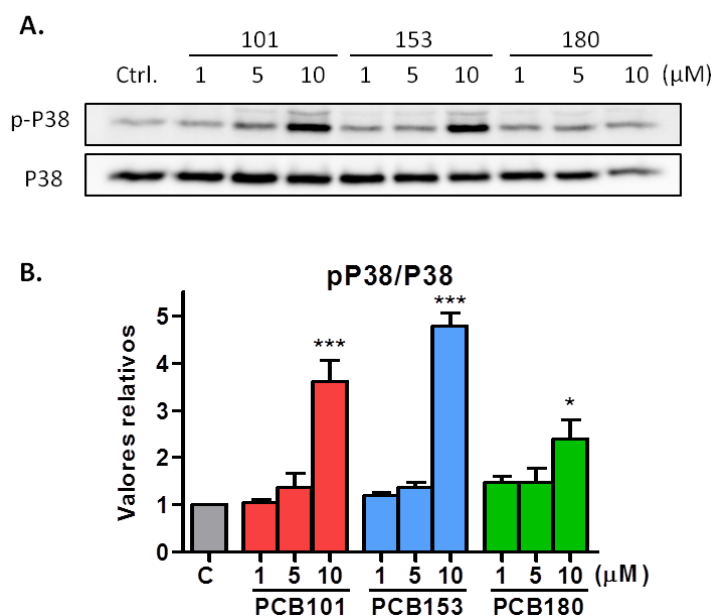


**Figura 33. Efecto de los PCBs 101, 153 y 180 sobre la expresión de Bcl-2 y Bax.** Las células ATDC5 fueron tratadas con los NDL-PCBs (1, 5 y 10 μM) durante 3 horas. Mediante Western blot se determinó la expresión de las proteínas Bcl-2 y Bax. El anticuerpo para GAPDH fue usado como

control de carga. (A) Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos independientes. (B) La gráfica muestra el análisis de densitometría de las imágenes (n=3; diferencias significativas respecto al control con DMSO 0.1%, \*\* p<0.01 vs. Control).

### 3. Principales rutas implicadas en la apoptosis inducida por NDL-PCBs

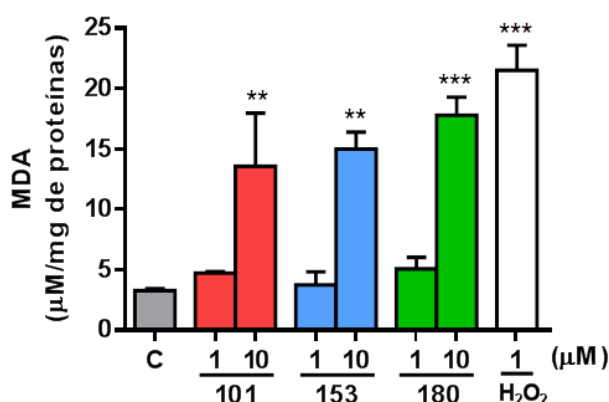
Dado que la activación de la MAP quinasa p38 puede conducir al incremento de la expresión de Bax, así como de la reducción de Bcl-2, decidimos estudiar la fosforilación de esta quinasa en las células ATDC5 expuestas a NDL-PCBs durante 3 horas. Como muestra la Figura 34, los tres PCBs testados incrementaban la fosforilación de la quinasa p38 de manera dosis dependiente. Este efecto era estadísticamente significativo a la dosis más alta (10 µM).



**Figura 34. Efecto de los PCBs 101, 153 y 180 sobre la activación de la quinasa p38.** Las células ATDC5 fueron tratadas con los NDL-PCBs (1, 5 y 10 µM) durante 3 horas. Mediante Western blot se determinó la expresión y activación de la quinasa p38 (P-p38, p38 fosforilada). El anticuerpo para la proteína total p38 fue usado como control de carga. (A) Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos independientes. (B) La gráfica muestra el análisis de densitometría de las imágenes (n=3; diferencias significativas respecto al control con DMSO 0.1% , \*p<0.05 vs. Control, \*\*\* p<0.001 vs. Control).

#### 4. Estudio del estrés oxidativo en las células ATDC5 expuestas a NDL-PCBs

Dado que el método empleado para determinar la viabilidad, el ensayo MTT, es una medida de la función mitocondrial, y que la vía apoptótica implicada era la ruta mediada por la mitocondria (la vía intrínseca), quisimos determinar si los mecanismos de muerte celular inducidos por los NDL-PCBs también estaban asociados con la inducción de estrés oxidativo. Para ello, evaluamos el contenido de malondialdehído (MDA) en los lisados de las células ATDC5 expuestas a estos químicos. Como se muestra en la Figura 35, todos los PCBs empleados inducían un incremento en los niveles de MDA, siendo estadísticamente significativo a la dosis de 10  $\mu\text{M}$ .

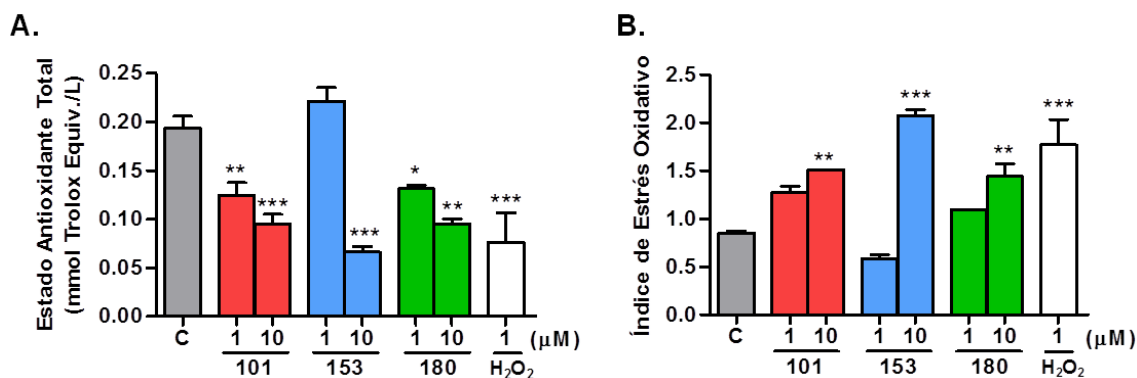


**Figura 35. Efecto de los PCBs 101, 153 y 180 sobre los niveles de MDA.** Las células ATDC5 fueron tratadas con los NDL-PCBs (1-10  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas, tras las cuales se determinaron los niveles de MDA en los lisados celulares según se describe en el apartado de material y métodos. Las células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1  $\mu\text{M}$  se emplearon como control positivo del ensayo. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control con DMSO 0.1% (\*\*  $p < 0.01$  vs. Control, \*\*\*  $p < 0.001$  vs. Control).

Además, para establecer si el incremento de MDA por los NDL-PCBs estaba asociado con un desequilibrio en el sistema antioxidante, también evaluamos el Estado Antioxidante Total (TAS). Se observó una fuerte reducción del TAS de manera dosis dependiente en las células expuestas a los contaminantes. Por el contrario, pero en

concordancia con los resultados anteriores, el Índice de Estrés Oxidativo se incrementó después del tratamiento con los NDL-PCBs también de manera dosis dependiente (Figura 36).

Todo lo anterior corrobora la hipótesis de que la exposición de las células ATDC5 a estos contaminantes ambientales conduce a los condrocitos hacia el estrés oxidativo, a través de la reducción de su capacidad antioxidante.



**Figura 36. Evaluación del estrés oxidativo en células ATDC5 expuestas a los PCBs 101, 153 y 180.** Las células ATDC5 fueron tratadas con los NDL-PCBs (1-10 μM) durante 24 horas. Las células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1μM se emplearon como control positivo del ensayo. El Estado Antioxidante Total (panel A) y el Índice de Estrés Oxidativo (panel B) se determinaron en los lisados celulares según se describe en el apartado de material y métodos. Los resultados representan la media ± SEM de al menos 3 experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control con DMSO 0.1% (\* p<0.05 vs. Control, \*\* p<0.01 vs. Control, \*\*\* p<0.001 vs. Control).

# **DISCUSIÓN**



**SECCIÓN A: NUEVAS ADIPOQUINAS. LA PROGRANULINA**

Los procesos inflamatorios juegan un papel clave en el desarrollo de las enfermedades reumáticas como la artrosis (OA) y la artritis reumatoide (RA). Muchos estudios han demostrado que las células del tejido articular, como los sinovicitos y los condrocitos, producen citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas y otros factores que determinan la creación de un entorno inflamatorio que contribuye a la degradación articular (20). Hasta la actualidad no existen medicamentos capaces de modificar los procesos de degradación del cartílago articular. El tratamiento de la OA es paliativo, reduciendo el dolor y la inflamación. Sin embargo, ningún fármaco es capaz de frenar la progresión de la enfermedad o regenerar el cartílago dañado. Y como consecuencia, la progresión del daño de este tejido lleva frecuentemente a la intervención quirúrgica protésica. Por ello, la identificación de moléculas capaces de modular tanto la respuesta inflamatoria como los procesos que contribuyen al daño articular ayudará al desarrollo de nuevas terapias eficaces tanto en la prevención como para el tratamiento de la enfermedad.

La PGRN, recientemente descrita como adipoquina, ha sido sujeto de extensos estudios en los últimos años. El papel de la PGRN en inflamación sólo ha sido parcialmente definido (202). Aunque la PGRN es una de las principales moléculas anti-inflamatorias, es posible que la PGRN tenga un doble papel en la inflamación, ya que podría ejercer funciones pro- o anti-inflamatoria dependiendo del tejido diana. Por ejemplo, la PGRN inhibe la liberación mediada por LPS de las citoquinas IL6, TNF $\alpha$  y MCP-1 por parte de macrófagos (203), pero la PGRN es también la principal adipoquina involucrada en la resistencia a la insulina inducida por dietas altas en grasas mediante el aumento de la expresión de IL6, una citoquina pro-inflamatoria (69).

Recientemente, la PGRN ha sido reconocida como un nuevo ligando de TNFR1/2. En realidad, PGRN bloquea las rutas de señalización activadas por el TNF $\alpha$  mediante la competición con el propio TNF $\alpha$  por la unión a los receptores. Dado que la inflamación crónica en AR está mediada principalmente por el TNF $\alpha$  (204), y se ha demostrado la eficacia de la PGRN como agente bloqueante de los TNFR en modelos murinos de artritis inflamatoria (95,205), se ha postulado a la PGRN como un novedoso posible agente terapéutico en AR.

Sin embargo, en estos momentos no hay trabajos en la literatura que evalúen la acción de la PGRN sobre otros mediadores de la inflamación presentes en la degradación del cartílago articular, como la IL1 $\beta$  o la activación de TLR4 en condrocitos. Anteriormente, Yin et al. demostraron que los macrófagos deficientes en PGRN tratados con LPS aumentaban la producción de citoquinas inflamatorias (203), y Hwang et al. mostraron que la PGRN inhibía eficientemente la respuesta pro-inflamatoria inducida por LPS en células endoteliales a través de la atenuación de la ruta de NF-kB, lo que sugiere sus beneficiosos efectos anti-inflamatorios (206). Por lo tanto, hemos decidido estudiar el efecto de la PGRN sobre la expresión de mediadores inflamatorios y factores catabólicos en condrocitos estimulados con IL1 $\beta$  o LPS. Esta es la primera evidencia experimental de que la PGRN es capaz de reducir mediadores de la inflamación inducidos por IL1 $\beta$  o LPS en condrocitos humanos.

El grupo de Chuan-ju Liu publicó que la PGRN era una molécula clave cascada abajo de la ruta de señalización de BMP2, y que es requerida para la diferenciación de condrocitos mediada por BMP2 a través de la fosforilación de Erk1/2 (77). En este sentido, nuestro trabajo hace otra observación novedosa, la expresión de PGRN aumentaba durante el proceso de diferenciación de las células ATDC-5 en condrocitos



maduros. Estos datos sugirieron que esta adipoquina podría desempeñar un papel en los complejos mecanismos del desarrollo y la diferenciación de condrocitos, como bien sugiere el trabajo de Chuan-ju Liu. La PGRN podría ser un marcador de la fase tardía de diferenciación condrogénica.

Por otra parte, la PGRN es necesaria para la inducción de osteoblastogénesis y la formación de hueso ectópico mediada por BMP-2 (207). Además, en ratones carentes de PGRN se observa la formación de osteofitos y esclerosis ectópica subcondral, indicando alteración del metabolismo óseo en el cartílago y el hueso subcondral de éstos ratones, lo que sugiere un papel para la PGRN en la regulación del metabolismo del hueso subcondral (103). En el estudio de la diferenciación, también hemos observado niveles elevados de PGRN en condrocitos hipertróficos, aquellos localizados por encima del hueso subcondral. Esto está en consonancia con los trabajos de Zhao *et al.* (103,207), donde la PGRN se muestra necesaria para un correcto metabolismo óseo.

Aunque en la OA el principal tejido afectado es el cartílago y, por tanto, los condrocitos, se ha demostrado que la OA afecta también a la integridad de más tejidos articulares como la sinovia, las almodillas de grasa o el hueso subcondral. Hoy en día podemos sin duda definir la OA como una patología que afecta a toda la articulación. Por ello, decimos estudiar la regulación de la expresión de la PGRN en diversos tejidos articulares. Así, mostramos por primera vez, la detección de ARNm y proteína de PGRN en la grasa infrarrotuliana y en los tejidos sinoviales articulares. Además, la expresión de PGRN fue significativamente mayor en los condrocitos, grasa y tejidos sinoviales obtenidos de pacientes OA en comparación con los obtenidos de donantes sanos. Nuestros resultados están en acuerdo con los datos anteriormente publicados por Guo *et al.* donde muestran el aumento de PGRN, tanto a nivel de ARNm como de

expresión proteica, en cartílago procedente de pacientes OA y AR en comparación con los controles sanos (78). Recientemente, se ha descrito la expresión de PGRN en otra enfermedad degenerativa del cartílago, como la degeneración del disco intervertebral. Los niveles de PGRN también fueron elevados en los discos intervertebrales durante el envejecimiento, y ratones que no expresaban PGRN desarrollaron un inicio temprano de la degeneración del cartílago intervertebral (208).

Aunque varias suposiciones postulaban que la PGRN podría estar fuertemente influenciada por un "medio" inflamatorio, aquí mostramos una clara evidencia experimental de que las citoquinas clásicas TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  son capaces de influir fuertemente en los niveles PGRN en los condrocitos. Estos hallazgos sugieren que la liberación desde los tejidos articulares de TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  podrían inducir la expresión de PGRN como una respuesta adaptativa al estado inflamatorio. Estos datos se acompañan de los resultados obtenidos en el análisis de la expresión de PGRN en los diferentes tejidos articulares antes mencionados. Tanto la grasa infrarrotuliana como la membrana sinovial o los condrocitos son fuente de citoquinas en el estado artrósico (20). El aumento de la expresión de PGRN en los tejidos procedentes de pacientes OA podría ser debida al aumento de citoquinas consecuencia del estado inflamatorio de dichos tejidos respecto a los controles sanos.

Dado que la IL1 $\beta$  juega un papel fundamental en la patogénesis de la OA (209), contrarrestar sus efectos pro-inflamatorios con PGRN podría ser una estrategia terapéutica interesante. Así pues, evaluamos si la PGRN era capaz de inhibir la respuesta pro-inflamatoria mediada por IL1 $\beta$ . Nuestros datos muestran claramente que la PGRN atenúa marcadores inflamatorios inducidos por la IL1 $\beta$ , tales como la producción de NO, y la expresión de NOS2, COX2 y VCAM-1, así como marcadores

catabólicos de la degradación del cartílago, como la MMP13. Por otra parte, los resultados mostraron una clara evidencia de que el efecto de la PGRN sobre la inducción de NOS2 por IL1 $\beta$  era mediada, al menos en parte, a través de TNFR1. Mediante la reducción de la expresión de TNFR1 a través del método del ARN de interferencia, el papel anti-inflamatorio de la PGRN fue totalmente bloqueado, lo que sugiere que la PGRN está actuando en la vía de señalización del TNF $\alpha$  a través de la unión al TNFR1. El trabajo de Tang *et al.* ya demuestra que el efecto anti-inflamatorio de la PGRN se debe a la unión competitiva de los TNFR y no al propio TNF $\alpha$  (95). Nuestros datos confirman una vez más este mecanismo de acción centrado en la señalización del TNF $\alpha$ .

Recientes estudios sugieren la implicación del receptor de tipo Toll-4 (TLR4), el principal receptor para el lipopolisaccharido bacteriano (LPS) en la patogénesis de la artrosis (21). La expresión de TLR4 en el cartílago aumenta durante el proceso de desarrollo de la OA (210), y su activación, mediante el tratamiento con LPS, induce respuestas inflamatorias y catabólicas en los condrocitos, aumentando los niveles de IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , NOS2 y MMPs (211). En el trabajo reciente de Hwang *et al.* se muestra como la PGRN es capaz de inhibir la señalización pro-inflamatoria mediada por LPS mediante la atenuación de la señalización de NF $\kappa$ B en células endoteliales (206). Aquí también mostramos evidencias de la capacidad de la PGRN para inhibir la señalización pro-inflamatoria mediada por LPS. Este efecto es probable que sea mediado, al menos en parte, también a través de TNFR1. Bloqueando la expresión de TNFR1 mediante ARN de interferencia, el papel anti-inflamatorio de la PGRN fue totalmente bloqueado. Nuestros resultados están en línea con los publicados por Hwang *et al.* en cuanto a la inhibición por parte de la PGRN del efecto inflamatorio del LPS; sin embargo, el

mecanismo de acción en condrocitos difiere del estudiado en las células endoteliales, ya que en condrocitos el efecto anti-inflamatorio depende, al menos en parte, de la señalización del TNF $\alpha$ .

Por lo tanto, en el aspecto funcional, la actividad de la PGRN, y el incremento en su expresión observado tras el tratamiento con IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$  podría mediar y sostener las vías pro-anabólicos y anti-inflamatorias. Sin embargo, la relevancia de estos datos en la fisiopatología de la OA u otras enfermedades reumáticas crónicas debe ser apoyada por datos clínicos que en la actualidad son inexistentes.

#### **SECCIÓN B: NUEVAS ADIPOQUINAS. WISP-2**

La recientemente descrita como adipoquina, WISP-2, fue identificada como una proteína inducible por Wnt-1 (108). A raíz de este hecho, varios trabajos han descrito la relación entre la ruta Wnt y la función de WISP-2.

En la última década, se han acumulado datos que sugieren un papel clave de la ruta Wnt en la fisiopatología de las enfermedades reumáticas. La hiper-activación de ruta canónica de Wnt conduce al catabolismo y degradación del cartílago y a la diferenciación a condrocitos hipertróficos. Sin embargo, la ruta Wnt es necesaria para el mantenimiento del cartílago articular, pero en exceso es perjudicial. Además, factores pro-inflamatorios, como la IL1 $\beta$  inducen la expresión de proteínas Wnt, resultado en la activación de la ruta (122).

Recientemente, se está investigando el papel de la familia de proteínas CCN en el desarrollo de la OA. Se ha encontrado una mayor expresión del ARNm de WISP-1/CCN4 y WISP-2/CCN5 en cartílago de rodilla de pacientes OA y RA comparado con

individuos sanos, y de todos los genes CCN en muestras sinoviales OA y RA (129). Además, nuestro grupo observó un incremento en la expresión de WISP-2 en grasa infrarrotuliana OA en comparación con controles sanos (130). WISP-1 es capaz de regular la expresión de MMPs y agrecanasas en condrocitos y de inducir daño en el cartílago articular en modelos de OA (120). Sorprendentemente, WISP-3/CCN6 reduce la expresión de ADAMTS-5 pero regula al alza MMP-10 en condrocitos humanos (212). En cuanto a la participación de WISP-2 en la OA, actualmente no existen enfoques en la literatura que evalúen su acción sobre los condrocitos. Por tanto, hemos analizado el efecto de WISP-2 en el catabolismo del cartílago a través del uso de experimentos de pérdida de función.

En base al trabajo de Schutze *et al.*, donde se estudia la expresión de WISP-2 en el proceso de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica a partir de células madre mesenquimales (113), decidimos analizar la regulación de la expresión de WISP-2 durante la diferenciación de los condrocitos ATDC5. Así pues, hemos observado un aumento de WISP-2 en las primeras etapas de la condrogénesis, y en concreto, un aumento muy marcado en los condrocitos maduros, seguido por una fuerte disminución en la etapa hipertrófica. Contrariamente, en la diferenciación de células madre mesenquimales en condrocitos maduros e hipertróficos realizada por Schutze *et al.* no se observa regulación de la expresión génica de WISP-2 en los diferentes estadios. Esta diferencia en la respuesta a la diferenciación puede ser debida al hecho de emplear diferentes tipos celulares (cultivo primario de células madre mesenquimales humanas, empleadas por Schutze *et al.*, frente a la línea de condrocitos murinos ATDC5 del presente trabajo), lo que conlleva diferentes tratamientos de diferenciación condrogénica. Cabe resaltar que la disminución brusca de los niveles de WISP-2 en la

última etapa de condrocito hipertrófico, respecto a la anterior fase, coincide con el aumento significativo de la expresión de MMP-13, considerado un marcador claro de esta última etapa. Este hecho sugiere una relación entre estos dos factores.

Múltiples estudios describen la implicación de las citoquinas en la destrucción del cartílago; así, IL1 $\beta$  es un bien conocido inductor de la expresión de MMP-13 (209). A continuación, hemos estudiado el efecto de dos citoquinas pro-inflamatorias clásicas implicadas en las enfermedades reumáticas, TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$ , sobre la expresión de WISP-2 en condrocitos humanos y en la línea T/C28a2. WISP-2 es regulada por factores de transcripción que se inducen por inflamación, activación de la ruta Wnt e hipoxia, procesos aumentados en la obesidad (111). Además, la IL1 $\beta$  induce la expresión de proteínas Wnt, resultando en la activación de la ruta (122), con lo que cabría esperar una regulación en la expresión de WISP-2 por IL1 $\beta$ , ya que es una proteína inducida por Wnt-1. Por otro lado, con una activación endógena de Wnt/ $\beta$ -catenina alta, como ocurre en determinadas líneas celulares tumorales, la expresión de WISP-2 es muy baja (115). En preadipocitos, la activación canónica de Wnt mediante inhibición de GSK3 $\beta$  no produce variaciones en el ARNm de WISP-2 a 24 horas (111). En contraste con otros miembros de la familia CCN, como WISP3, que aumenta sus niveles en condiciones inflamatorias (213), observamos que, tanto el TNF $\alpha$  como la IL1 $\beta$ , reducían la expresión de WISP-2 en condrocitos humanos. Sin embargo, las clásicas adipoquinas pro-inflamatorias, leptina y adiponectina, no modificaban la expresión de WISP-2.

A la vista de la disminución de WISP-2 en condiciones inflamatorias, decidimos investigar la capacidad de WISP-2 para modular la respuesta catabólica e inflamatoria a través de experimentos de pérdida de la función. Así, encontramos que el silenciamiento

génico de WISP-2 aumentaba la expresión de enzimas degradativas del cartílago (MMP-13, ADAMTS-5), citoquinas inflamatorias (IL6 e IL1 $\beta$ ) y quimioquinas (IL8).

Dado que el silenciamiento de WISP-2 aumenta la expresión de MMP-13 e IL1 $\beta$ , nos decidimos a estudiar si la pérdida de WISP-2 incrementaba sinérgicamente la expresión de MMP-13 inducida por IL1 $\beta$ . Nuestros resultados mostraron un efecto sinérgico de IL1 $\beta$  y el silenciamiento génico de WISP-2 tanto en la expresión de las enzimas MMP-13 y ADAMTS-5 como en las citoquinas IL6 e IL8. Teniendo en cuenta el aumento de estos factores catabólicos e inflamatorios cuando se disminuye la expresión de WISP-2 mediante silenciamiento y el aumento de la expresión de WISP-2 en cartílago OA en comparación con cartílago sano (129), la regulación al alza de esta adipocina en OA podría implicar un intento de los condrocitos por compensar el catabolismo con el fin de frenar la degradación del cartílago.

WISP-2 es una proteína inducida por Wnt-1, por tanto, la activación de la ruta canónica de Wnt incrementa su expresión. Además, WISP-2 activa Wnt en células mesenquimales, impidiendo el proceso de diferenciación a adipocitos (115). Por ello, hemos estudiado si la ruta de Wnt/ $\beta$ -catenina estaba implicada en el catabolismo inducido por el silenciamiento de WISP-2. Trabajos publicados recientemente demuestran la relación entre la ruta Wnt y la regulación de la expresión de MMP-13 (124,214). En contraste con el papel de la ruta de Wnt/ $\beta$ -catenina en condrocitos murinos, Ma *et al.* ha proporcionado pruebas de la función anti-catabólica de esta vía mediante la inhibición de la expresión de MMP-13 en condrocitos humanos. La activación de la vía canónica de Wnt por BIO (un inhibidor de GSK3 $\beta$ ) disminuye significativamente la expresión de MMP-13 (124). Nuestros datos mostraron cómo el tratamiento con BIO disminuía significativamente la expresión de marcadores

catabólicos, en concordancia con los resultados de Ma *et al* (124). Además, la activación de Wnt/ $\beta$ -catenina disminuye hasta niveles basales la expresión de las enzimas degradativas y las citoquinas inducidas por IL1 $\beta$  y/o el silenciamiento de WISP-2.

Por tanto, tomando todos estos datos en conjunto se puede deducir que la falta de WISP-2 podría afectar al estado de activación de la ruta canónica de Wnt y resultar en un incremento del catabolismo del cartílago (119).

#### **SECCIÓN C: CONTAMINANTES AMBIENTALES. NDL-PCBs**

Los contaminantes orgánicos persistentes, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos y los PCB, interactúan con las células del sistema esquelético y afectan negativamente a su desarrollo (215). Sin embargo, la relación entre la exposición a contaminantes ambientales y la incidencia de enfermedades reumáticas ha sido escasamente estudiada. Estudios sobre la contaminación del aire y la artritis reumatoide no logran esclarecer dicha asociación (216). Solamente los PCBs están asociados con la artritis reumatoide y la artrosis (188).

Las alteraciones en los mecanismos de apoptosis de los condrocitos están fuertemente relacionadas con la degradación de la matriz extracelular en el cartílago en la patogénesis de la artrosis (19). Diferentes trabajos describen la inducción de muerte celular por parte de los NDL-PCBs en distintas líneas celulares, como macrófagos (172), células de hígado, células de riñón (217) o células neuronales (218,219). Hasta la actualidad no existen estudios en la literatura que evalúen los efectos de los NDL-PCBs sobre los condrocitos, y sólo recientemente, Lee y Yang han demostrado que el DL-



PCB 126 ejerce un efecto pro-apoptótico en los condrocitos mediada por la generación de ROS (220). Por lo tanto, en el presente trabajo se ha estudiado el impacto de los NDL-PCBs 101, 153 y 180 sobre la viabilidad celular de los condrocitos. Este es el primer estudio que muestra una reducción dosis dependiente de la viabilidad de los condrocitos de ratón ATDC5 y de los condrocitos humanos T/C-28a2 tras la exposición a tres NDL-PCBs diferentes (PCB 101, PCB 153, y PCB 180) a través de la participación de múltiples procesos que controlan la muerte celular: la apoptosis, la necrosis y el estrés oxidativo.

Todos estos procesos de muerte incluyen un espectro de eventos celulares que se superponen parcialmente (150). Por tanto, se tuvo especial cuidado para obtener información sobre los mecanismos de muerte celular provocados por NDL-PCBs, utilizando diferentes enfoques.

A fin de evaluar si los NDL-PCBs inducen apoptosis en los condrocitos, se evaluó la activación de la caspasa-3. De hecho, la activación de la vía apoptótica, por la escisión proteolítica de la pro-caspasa-3, se considera un punto clave en la apoptosis y un marcador de su inducción. Nuestros datos demuestran claramente que la exposición a NDL-PCBs aumentaba la expresión de caspasa-3 procesada, lo que sugiere que la apoptosis también contribuía a la muerte celular de los condrocitos expuestos a NDL-PCBs. La muerte celular programada está mediada por las vías intrínseca y extrínsecas; la vía intrínseca, también denominada apoptosis mediada por la mitocondria, se regula a través de miembros de la familia Bcl-2 (221). En particular, dos proteínas contrapuestas, la anti-apoptótica Bcl-2 y la pro-apoptótica Bax, desempeñan un papel clave en la activación de la vía intrínseca (222). En nuestro estudio, se observó una disminución del

ratio Bcl-2/Bax, lo que sugiere que los NDL-PCBs activaban la vía intrínseca de la apoptosis.

Nuestros resultados están en concordancia con los trabajos publicados por An *et al.* y Santiago *et al.*, donde se describe la inducción de la apoptosis a través de la vía Bcl-2/Bax por exposición a PCBs (223,224). En particular, en el estudio de Ferrante *et al.*, se demuestra la participación de la vía intrínseca de la apoptosis inducida por NDL-PCBs en J774A.1 macrófagos murinos (172).

Estudios anteriores han demostrado que la activación de la MAP quinasa p38 puede conducir al incremento de la expresión de Bax, así como de la reducción de Bcl-2 y la liberación del citocromo c al citoplasma (225–227). En nuestras condiciones experimentales, se observó un aumento dosis dependiente en la fosforilación de p38, acompañado de una disminución del ratio Bcl-2/Bax, ante la exposición a NDL-PCBs.

Múltiples estudios sugieren que el estrés oxidativo podría ser otro componente relevante en la patogénesis de la artrosis (228). En realidad, el estrés oxidativo produce daños en el ADN mitocondrial, lo que resulta en apoptosis y senescencia. Por lo tanto, decidimos evaluar la potencial participación del daño oxidativo en la apoptosis inducida por NDL-PCB. Nuestros resultados mostraron que la exposición de los condrocitos a los NDL-PCB produce un aumento del estrés oxidativo, a través de la reducción de su capacidad antioxidante.

Aunque los datos mostrados en este trabajo necesitan ser validados en experimentos *in vivo*, nuestros resultados sugieren un potencial papel de los contaminantes policlorados en la patogénesis de la artrosis a través de la inducción de la apoptosis de los condrocitos. Este hecho puede ayudar a definir las bases a través de las

cuales los contaminantes ambientales pueden contribuir a la patogénesis y/o progresión de enfermedades reumáticas.



# **CONCLUSIONES**



**SECCIÓN A: NUEVAS ADIPOQUINAS. LA PROGRANULINA**

1. La expresión de PGRN aumenta durante el proceso de diferenciación de las células ATDC-5 en condrocitos maduros.
2. La expresión de PGRN en grasa infrarrotuliana y membrana sinovial procedentes de pacientes OA está elevada en comparación con los respectivos tejidos de individuos sanos.
3. Las citoquinas TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  inducen la expresión de PGRN como respuesta adaptativa al estado inflamatorio.
4. La PGRN limita la expresión de mediadores inflamatorios, moléculas de adhesión y enzimas implicadas en la degradación del cartílago en condrocitos tratados con IL1 $\beta$  y LPS.
5. El efecto anti-inflamatorio de la PGRN está mediado, al menos en parte, por TNFR1.

**SECCIÓN B: NUEVAS ADIPOQUINAS. WISP-2**

1. La expresión de WISP-2 varía durante el proceso de diferenciación de las células ATDC-5.
2. Las citoquinas TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  reducen la expresión de WISP-2 en la línea de condrocitos humanos T/C28a2.
3. El silenciamiento génico de WISP-2 estimula el catabolismo de los condrocitos.
4. El efecto pro-catabólico de la falta de WISP-2 esta mediado, al menos en parte, por la vía canónica de Wnt.

**SECCIÓN C: CONTAMINANTES AMBIENTALES. NDL-PCBs**

1. La exposición a NDL-PCBs reduce la viabilidad celular de los condrocitos.
2. La muerte celular inducida por NDL-PCBs implica mecanismos de apoptosis, necrosis y estrés oxidativo.
3. La inducción de la vía intrínseca de la apoptosis está mediada por la fosforilación de p38.



# **BIBLIOGRAFÍA**



1. de Toro Santos FJ. Anatomía y fisiología articular. In: Battle-Gualda E, Benito P, Blanco FJ, Martín E, editors. Manual SER de las enfermedades reumáticas. 4<sup>o</sup> ed. Editorial Panamericana; 2004. p. 17–9.
2. Martini F. Fundamentals of Anatomy & Physiology. 7<sup>a</sup> ed. Pearson; 2006.
3. Trujillo Martín E. Composición y fisiología del tejido conjuntivo. El cartílago. In: Battle-Gualda E, Benito P, Blanco FJ, Martín E, editors. Manual SER de las enfermedades reumáticas. 4<sup>o</sup> ed. Editorial Panamericana; 2004. p. 13–6.
4. Heinegård D, Saxne T. The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(1):50–6.
5. Wilusz RE, Sanchez-adams J, Guilak F. The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix Biol*. 2014;39:25–32.
6. Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2000;43(9):1916–26.
7. Mayan MD, Gago-Fuentes R, Carpintero-Fernandez P, Fernandez-Puente P, Filgueira-Fernandez P, Goyanes N, et al. Articular chondrocyte network mediated by gap junctions: role in metabolic cartilage homeostasis. *Ann Rheum Dis*. 2013;74(1):275–84.
8. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2006. p. 33–44.
9. Goldring MB. Cartilage and Chondrocytes. In: Firestein GS, editor. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. 9<sup>o</sup> ed. Elsevier; 2012. p. 33–60.
10. Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: Structure, injuries and review of management. *Br Med Bull*. 2008;87(1):77–95.
11. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum*. 2012;64(6):1697–707.
12. Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(3):224–40.
13. Schmidt MB, Mow VC, Chun LE, Eyre DR. Effects of proteoglycan extraction on the tensile behavior of articular cartilage. *J Orthop Res*. 1990;8(3):353–63.
14. Kraus VB, Blanco FJ, Englund M, Karsdal MA, Lohmander LS. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthr Cartil*. 2015;23(8):1233–41.
15. Hunter DJ, Felson DT. Osteoarthritis. *BMJ*. 2006;332(7542):639–42.
16. Blanco FJ. Osteoarthritis: Something is moving. *Reumatol Clínica*. 2014 Jan;10(1):4–5.
17. Carmona L, Ballina J, Gabriel R, Laffon A, EPISER Study Group. The burden of musculoskeletal diseases in the general population of Spain: results from a national survey. *Ann Rheum Dis*. 2001;60(11):1040–5.
18. Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP, Roughley PJ. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2008;22(2):351–84.
19. Kim HA, Blanco FJ. Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage. *Curr Drug Targets*. 2007;8(2):333–45.

20. Goldring MB, Otero M. Inflammation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2011;23(5):471–8.
21. Gómez R, Villalvilla A, Largo R, Gualillo O, Herrero-Beaumont G. TLR4 signalling in osteoarthritis—finding targets for candidate DMOADs. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11(3):159–70.
22. Abramson SB. Osteoarthritis and nitric oxide. *Osteoarthr Cartil*. 2008;16(SUPPL. 2):S15–20.
23. Wann AKT, Zuo N, Haycraft CJ, Jensen CG, Poole CA, McGlashan SR, et al. Primary cilia mediate mechanotransduction through control of ATP-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in compressed chondrocytes. *The FASEB Journal*. 2012. p. 1663–71.
24. Houard X, Goldring MB, Berenbaum F. Homeostatic mechanisms in articular cartilage and role of inflammation in osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep*. 2013;15(375):1–10.
25. Murphy G, Nagase H. Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair? *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008;4(3):128–35.
26. Plaas A, Osborn B, Yoshihara Y, Bai Y, Bloom T, Nelson F, et al. Aggrecanolytic in human osteoarthritis: confocal localization and biochemical characterization of ADAMTS5-hyaluronan complexes in articular cartilages. *Osteoarthr Cartil*. 2007;15(7):719–34.
27. Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthr Cartil*. 2013;21:16–21.
28. Ayral X, Pickering EH, Woodworth TG, Mackillop N, Dougados M. Synovitis: A potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis - Results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients. *Osteoarthr Cartil*. 2005;13(5):361–7.
29. Požgan U, Caglič D, Rozman B, Nagase H, Turk V, Turk B. Expression and activity profiling of selected cysteine cathepsins and matrix metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Biol Chem*. 2010;391(5):571–9.
30. Scanzello CR, Goldring SR. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone*. 2012;51(2):249–57.
31. Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier J-P, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(1):33–42.
32. Dunne A, O'Neill LAJ. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE*. 2003;2003(171):re3.
33. Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol*. 1998;16(5-6):457–99.
34. Muzio M, Mantovani A. The Toll receptor family. *Allergy*. 2001;56(2):103–8.
35. Alaaeddine N, DiBattista JA, Pelletier JP, Cloutier JM, Kiansa K, Dupuis M, et

- al. Osteoarthritic synovial fibroblasts possess an increased level of tumor necrosis factor-receptor 55 (TNF-R55) that mediates biological activation by TNF-alpha. *J Rheumatol.* 1997;24(10):1985–94.
36. Westacott CI, Atkins RM, Dieppe PA, Elson CJ. Tumor necrosis factor-alpha receptor expression on chondrocytes isolated from human articular cartilage. *J Rheumatol.* 1994;21(9):1710–5.
  37. Blanco FJ, Geng Y, Lotz M. Differentiation-dependent effects of IL-1 and TGF-beta on human articular chondrocyte proliferation are related to inducible nitric oxide synthase expression. *J Immunol.* 1995;154(8):4018–26.
  38. Cillero-Pastor B, Martin MA, Arenas J, López-Armada MJ, Blanco FJ. Effect of nitric oxide on mitochondrial activity of human synovial cells. *BMC Musculoskelet Disord.* 2011;12:42.
  39. Murrell GA, Jang D, Williams RJ. Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;206(1):15–21.
  40. Vuolteenaho K, Koskinen A, Kukkonen M, Nieminen R, Pivrinta U, Moilanen T, et al. Leptin enhances synthesis of proinflammatory mediators in human osteoarthritic cartilage-Mediator role of NO in leptin-induced PGE 2, IL-6, and IL-8 Production. *Mediators Inflamm.* 2009;2006(345838):1–10.
  41. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994;372(6505):425–32.
  42. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2005. p. 911–20.
  43. Lago F, Dieguez C, Gómez-Reino J, Gualillo O. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat Clin Pr Rheum.* 2007;3(12):716–24.
  44. Gomez R, Lago F, Gomez-Reino J, Dieguez C, Gualillo O. Adipokines in the skeleton: influence on cartilage function and joint degenerative diseases. *J Mol Endocrinol.* 2009;43(1):11–8.
  45. Gómez R, Conde J, Scotece M, Gómez-Reino JJ, Lago F, Gualillo O. What's new in our understanding of the role of adipokines in rheumatic diseases? *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7(9):528–36.
  46. Reseland JE, Syversen U, Bakke I, Qvigstad G, Eide LG, Hjertner O, et al. Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization. *J Bone Miner Res.* 2001;16(8):1426–33.
  47. Dumond H, Presle N, Terlain B, Mainard D, Loeuille D, Netter P, et al. Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48(11):3118–29.
  48. Kolaczynski JW, Ohannesian JP, Considine R V., Marco CC, Caro JF. Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(11):4162–5.
  49. Barr VA, Malide D, Zarnowski MJ, Taylor SI, Cushman SW. Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue. *Endocrinology.*

- 1997;138(10):4463–72.
50. Gualillo O, Eiras S, Lago F, Diéguez C, Casanueva FF. Elevated serum leptin concentrations induced by experimental acute inflammation. *Life Sci.* 2000;67(20):2433–41.
  51. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature.* 1996;382(6588):250–2.
  52. Otero M, Lago R, Lago F, Reino JJG, Gualillo O. Signalling pathway involved in nitric oxide synthase type II activation in chondrocytes: synergistic effect of leptin with interleukin-1. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(3):581–91.
  53. Otero M, Gomez Reino JJ, Gualillo O. Synergistic induction of nitric oxide synthase type II: in vitro effect of leptin and interferon-gamma in human chondrocytes and ATDC5 chondrogenic cells. *Arthritis Rheum.* 2003;48(2):404–9.
  54. Otero M, Lago R, Gomez R, Lago F, Dieguez C, Gómez-Reino JJ, et al. Changes in plasma levels of fat-derived hormones adiponectin, leptin, resistin and visfatin in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2006;65(9):1198–201.
  55. Gómez R, Scotece M, Conde J, Gómez-Reino JJ, Lago F, Gualillo O. Adiponectin and leptin increase IL-8 production in human chondrocytes. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(11):2052–4.
  56. Conde J, Scotece M, López V, Gómez R, Lago F, Pino J, et al. Adiponectin and leptin induce VCAM-1 expression in human and murine chondrocytes. *PLoS One.* 2012;7(12):e52533.
  57. Koskinen A, Vuolteenaho K, Nieminen R, Moilanen T, Moilanen E. Leptin enhances MMP-1, MMP-3 and MMP-13 production in human osteoarthritic cartilage and correlates with MMP-1 and MMP-3 in synovial fluid from OA patients. *Clin Exp Rheumatol.* 2011;29(1):57–64.
  58. Conde J, Scotece M, López V, Abella V, Hermida M, Pino J, et al. Differential expression of adipokines in infrapatellar fat pad (IPFP) and synovium of osteoarthritis patients and healthy individuals. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(3):631–3.
  59. Griffin TM, Huebner JL, Kraus VB, Guilak F. Extreme obesity due to impaired leptin signaling in mice does not cause knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2009;60(10):2935–44.
  60. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem.* 1996;271(18):10697–703.
  61. Lago R, Gomez R, Otero M, Lago F, Gallego R, Dieguez C, et al. A new player in cartilage homeostasis: adiponectin induces nitric oxide synthase type II and pro-inflammatory cytokines in chondrocytes. *Osteoarthr Cartil.* 2008;16(9):1101–9.
  62. Ebina K, Fukuhara A, Ando W, Hirao M, Koga T, Oshima K, et al. Serum adiponectin concentrations correlate with severity of rheumatoid arthritis evaluated by extent of joint destruction. *Clin Rheumatol.* 2009;28(4):445–51.

63. Okamoto Y, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Libby P. Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome. *Clin Sci*. 2006;110(3):267–78.
64. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*. 2005;26(3):439–51.
65. Ouchi N, Shibata R, Walsh K. Cardioprotection by Adiponectin. *Trends Cardiovasc Med*. 2006. p. 141–6.
66. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*. 2002;8(11):1288–95.
67. Kang EH, Lee YJ, Kim TK, Chang CB, Chung J-H, Shin K, et al. Adiponectin is a potential catabolic mediator in osteoarthritis cartilage. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(6):1–11.
68. Tong K-M, Chen C-P, Huang K-C, Shieh D-C, Cheng H-C, Tzeng C-Y, et al. Adiponectin increases MMP-3 expression in human chondrocytes through AdipoR1 signaling pathway. *J Cell Biochem*. 2011;112(5):1431–40.
69. Matsubara T, Mita A, Minami K, Hosooka T, Kitazawa S, Takahashi K, et al. PGRN is a key adipokine mediating high fat diet-induced insulin resistance and obesity through IL-6 in adipose tissue. *Cell Metab*. 2012;15:38–50.
70. Anakwe OO, Gerton GL. Acrosome biogenesis begins during meiosis: evidence from the synthesis and distribution of an acrosomal glycoprotein, acrogranin, during guinea pig spermatogenesis. *Biol Reprod*. 1990;42(2):317–28.
71. Zhou J, Gao G, Crabb JW, Serrero G. Purification of an autocrine growth factor homologous with mouse epithelin precursor from a highly tumorigenic cell line. *J Biol Chem*. 1993;268(15):10863–9.
72. Shoyab M, McDonald VL, Byles C, Todaro GJ, Plowman GD. Epithelins 1 and 2: isolation and characterization of two cysteine-rich growth-modulating proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(20):7912–6.
73. Tangkeangsirisin W, Serrero G. PC cell-derived growth factor (PCDGF/GP88, progranulin) stimulates migration, invasiveness and VEGF expression in breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 2004;25(9):1587–92.
74. Zanocco-Marani T, Bateman A, Romano G, Valentini B, He ZH, Baserga R. Biological activities and signaling pathways of the granulin/epithelin precursor. *Cancer Res*. 1999;59(20):5331–40.
75. Daniel R, He Z, Carmichael KP, Halper J, Bateman A. Cellular localization of gene expression for progranulin. *J Histochem Cytochem*. 2000;48(7):999–1009.
76. Okura H, Yamashita S, Ohama T, Saga A, Yamamoto-Kakuta A, Hamada Y, et al. HDL/apolipoprotein A-I binds to macrophage-derived progranulin and suppresses its conversion into proinflammatory granulins. *J Atheroscler Thromb*. 2010;17(6):568–77.
77. Feng JQ, Guo F-J, Jiang B-C, Zhang Y, Frenkel S, Wang D-W, et al. Granulin epithelin precursor: a bone morphogenic protein 2-inducible growth factor that activates Erk1/2 signaling and JunB transcription factor in chondrogenesis. *FASEB J*. 2010;24:1879–92.

78. Guo F, Lai Y, Tian Q, Lin E a., Kong L, Liu C. Granulin-epithelin precursor binds directly to ADAMTS-7 and ADAMTS-12 and inhibits their degradation of cartilage oligomeric matrix protein. *Arthritis Rheum.* 2010;62(7):2023–36.
79. Toh H, Cao M, Daniels E, Bateman A. Expression of the growth factor progranulin in endothelial cells influences growth and development of blood vessels: a novel mouse model. *PLoS One.* 2013;8(5):e64989.
80. He Z, Ong CHP, Halper J, Bateman A. Progranulin is a mediator of the wound response. *Nat Med.* 2003;9(2):225–9.
81. Zhu J, Nathan C, Jin W, Sim D, Ashcroft GS, Wahl SM, et al. Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. *Cell.* 2002;111(6):867–78.
82. Desmarais J a, Cao M, Bateman A, Murphy BD. Spatiotemporal expression pattern of progranulin in embryo implantation and placenta formation suggests a role in cell proliferation, remodeling, and angiogenesis. *Reproduction.* 2008;136(2):247–57.
83. Ong CH, Bateman A. Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell derived growth factor, acrogranin) in proliferation and tumorigenesis. *Histology Histopathol.* 2003;18(4):1275–88.
84. Wu H, Siegel RM. *Medicine.* Progranulin resolves inflammation. *Science (80- ).* 2011;332(6028):427–8.
85. Liu C. Progranulin: a promising therapeutic target for rheumatoid arthritis. *FEBS Lett.* 2011;585(23):3675–80.
86. Liu CJ, Bosch X. Progranulin: A growth factor, a novel TNFR ligand and a drug target. *Pharmacol Ther.* 2012;133(1):124–32.
87. Baba T, Hoff HB 3rd, Nemoto H, Lee H, Orth J, Arai Y, et al. Acrogranin, an acrosomal cysteine-rich glycoprotein, is the precursor of the growth-modulating peptides, granulins, and epithelins, and is expressed in somatic as well as male germ cells. *Mol Reprod Dev.* 1993;34(3):233–43.
88. Bucan M, Gatalica B, Baba T, Gerton GL. Mapping of Grn, the gene encoding the granulin/epithelin precursor (acrogranin), to mouse chromosome 11. *Mamm Genome.* 1996;7(9):704–5.
89. Bhandari V, Palfree RG, Bateman A. Isolation and sequence of the granulin precursor cDNA from human bone marrow reveals tandem cysteine-rich granulin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(5):1715–9.
90. Xu D, Suenaga N, Edelmann MJ, Fridman R, Muschel RJ, Kessler BM. Novel MMP-9 substrates in cancer cells revealed by a label-free quantitative proteomics approach. *Mol Cell Proteomics.* 2008;7(11):2215–28.
91. Butler GS, Dean R a, Tam EM, Overall CM. Pharmacoproteomics of a Metalloproteinase Hydroxamate Inhibitor in Breast Cancer Cells: Dynamics of Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase-Mediated Membrane Protein Shedding. *Mol Cell Biol.* 2008;28(15):4896–914.
92. Bai X-H, Wang D-W, Kong L, Zhang Y, Luan Y, Kobayashi T, et al. ADAMTS-7, a direct target of PTHrP, adversely regulates endochondral bone growth by



- associating with and inactivating GEP growth factor. *Mol Cell Biol.* 2009;29:4201–19.
93. Kessenbrock K, Fröhlich L, Sixt M, Lämmermann T, Pfister H, Bateman A, et al. Proteinase 3 and neutrophil elastase enhance inflammation in mice by inactivating antiinflammatory progranulin. *J Clin Invest.* 2008;118(7):2438–47.
  94. De Muynck L, Van Damme P. Cellular effects of progranulin in health and disease. *J Mol Neurosci.* 2011;45(3):549–60.
  95. Tang W, Lu Y, Tian Q, Zhang Y, Guo F, Liu G, et al. The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. *Science (80- ).* 2011;332(6028):478–84.
  96. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(9):745–56.
  97. Karampetsou MP, Liossis SNC, Sfrikakis PP. TNF-alpha antagonists beyond approved indications: Stories of success and prospects for the future. *QJM.* 2010;103(12):917–28.
  98. Blüml S, Scheinecker C, Smolen JS, Redlich K. Targeting TNF receptors in rheumatoid arthritis. *Int Immunol.* 2012;24:275–81.
  99. Jian J, Zhao S, Tian Q, Gonzalez-Gugel E, Mundra JJ, Uddin SMZ, et al. Progranulin directly binds to the CRD2 and CRD3 of TNFR extracellular domains. *FEBS Lett.* 2013;587(21):3428–36.
  100. Uddin SMZ, Mundra JJ, Jian J, Tian Q, Gonzalez-Gugel E, Richbrough B, et al. Progranulin inhibition of TNF $\alpha$ . *Immunol Cell Biol.* 2014;92(4):299–300.
  101. Sfrikakis PP, Tsokos GC. Towards the next generation of anti-TNF drugs. *Clin Immunol.* 2011;141(3):231–5.
  102. Wang BC, Liu H, Talwar A, Jian J. New discovery rarely runs smooth: an update on progranulin/TNFR interactions. *Protein Cell.* 2015;6(11):792–803.
  103. Zhao Y -p., Liu B, Tian Q -y., Wei J -l., Richbrough B, Liu C -j. Progranulin protects against osteoarthritis through interacting with TNF- and -Catenin signalling. *Ann Rheum Dis.* 2014;74(12):2244–53.
  104. Yamamoto Y, Takemura M, Serrero G, Hayashi J, Yue B, Tsuboi A, et al. Increased Serum GP88 (Progranulin) Concentrations in Rheumatoid Arthritis. *Inflammation.* 2014;88.
  105. Cerezo LA, Kuklová M, Hulejová H, Vernerová Z, Kaspříková N, Veigl D, et al. Progranulin Is Associated with Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Mediators Inflamm.* 2015;2015(740357):1–6.
  106. Xu K, Zhang Y, Ilalov K, Carlson CS, Feng JQ, Di Cesare PE, et al. Cartilage oligomeric matrix protein associates with Granulin-Epithelin Precursor (GEP) and potentiates GEP-stimulated chondrocyte proliferation. *J Biol Chem.* 2007;282:11347–55.
  107. Dahlman I, Elsen M, Tennagels N, Korn M, Brockmann B, Sell H, et al. Functional annotation of the human fat cell secretome. *Arch Physiol Biochem.* 2012;118(3):84–91.

108. Pennica D, Swanson TA, Welsh JW, Roy MA, Lawrence DA, Lee J, et al. WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(25):14717–22.
109. Brigstock DR, Goldschmeding R, Katsube K, Lam SC-T, Lau LF, Lyons K, et al. Proposal for a unified CCN nomenclature. *Mol Pathol*. 2003;56(2):127–8.
110. Kumar S, Hand AT, Connor JR, Dodds RA, Ryan PJ, Trill JJ, et al. Identification and cloning of a connective tissue growth factor-like cDNA from human osteoblasts encoding a novel regulator of osteoblast functions. *J Biol Chem*. 1999;274(24):17123–31.
111. Hammarstedt A, Hedjazifar S, Jenndahl L, Gogg S, Grünberg J, Gustafson B, et al. WISP2 regulates preadipocyte commitment and PPAR $\gamma$  activation by BMP4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(7):2563–8.
112. Wiesman KC, Wei L, Baughman C, Russo J, Gray MR, Castellot JJ. CCN5, a secreted protein, localizes to the nucleus. *J Cell Commun Signal*. 2010;4(2):91–8.
113. Schutze N, Noth U, Schneidereit J, Hendrich C, Jakob F. Differential expression of CCN-family members in primary human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation. *Cell Commun Signal*. 2005;3(1):1–12.
114. Russo JW, Castellot JJ. CCN5: biology and pathophysiology. *J Cell Commun Signal*. 2010;4(3):119–30.
115. Grünberg JR, Hammarstedt A, Hedjazifar S, Smith U. The Novel Secreted Adipokine WNT1-inducible Signaling Pathway Protein 2 (WISP2) Is a Mesenchymal Cell Activator of Canonical WNT. *J Biol Chem*. 2014;289(10):6899–907.
116. Bork P. The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett*. 1993;327(2):125–30.
117. Kular L, Pakradouni J, Kitabgi P, Laurent M, Martinerie C. The CCN family: A new class of inflammation modulators? *Biochimie*. 2011;93(3):377–88.
118. Mercurio S, Latinkic B, Itasaki N, Krumlauf R, Smith JC. Connective-tissue growth factor modulates WNT signalling and interacts with the WNT receptor complex. *Development*. 2004;131(9):2137–47.
119. Robinson JA, Chatterjee-Kishore M, Yaworsky PJ, Cullen DM, Zhao W, Li C, et al. Wnt/beta-catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. *J Biol Chem*. 2006;281(42):31720–8.
120. Blom AB, Brockbank SM, van Lent PL, van Beuningen HM, Geurts J, Takahashi N, et al. Involvement of the Wnt signaling pathway in experimental and human osteoarthritis: prominent role of Wnt-induced signaling protein 1. *Arthritis Rheum*. 2009;60(2):501–12.
121. Zhu M, Tang D, Wu Q, Hao S, Chen M, Xie C, et al. Activation of beta-catenin signaling in articular chondrocytes leads to osteoarthritis-like phenotype in adult beta-catenin conditional activation mice. *J Orthop Res*. 2009;24(1):12–21.
122. Yasuhara R, Yuasa T, Williams JA, Byers SW, Shah S, Pacifici M, et al.

- Wnt/beta-catenin and retinoic acid receptor signaling pathways interact to regulate chondrocyte function and matrix turnover. *J Biol Chem.* 2010;285(1):317–27.
123. Yuasa T, Otani T, Koike T, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M. Wnt/beta-catenin signaling stimulates matrix catabolic genes and activity in articular chondrocytes: its possible role in joint degeneration. *Lab Investig.* 2008;88(3):264–74.
  124. Ma B, van Blitterswijk CA, Karperien M. A Wnt/ $\beta$ -catenin negative feedback loop inhibits interleukin-1-induced matrix metalloproteinase expression in human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2012;64(8):2589–600.
  125. Zhu M, Chen M, Zuscik M, Wu Q, Wang Y-J, Rosier RN, et al. Inhibition of beta-catenin signaling in articular chondrocytes results in articular cartilage destruction. *Arthritis Rheum.* 2008;58(7):2053–64.
  126. Miao C, Yang Y, He X, Li X, Huang C, Huang Y, et al. Wnt signaling pathway in rheumatoid arthritis, with special emphasis on the different roles in synovial inflammation and bone remodeling. *Cell Signal.* 2013;25(10):2069–78.
  127. Sen M. Wnt signalling in rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2005;44(6):708–13.
  128. Lee MS, Sun M-T, Pang S-T, Ueng SW, Chen S-C, Hwang T-L, et al. Evaluation of differentially expressed genes by shear stress in human osteoarthritic chondrocytes in vitro. *Chang Gung Med J.* 2008;32(1):42–50.
  129. Komatsu M, Nakamura Y, Maruyama M, Abe K, Watanapokasin R, Kato H. Expression profiles of human CCN genes in patients with osteoarthritis or rheumatoid arthritis. *J Orthop Res.* 2015;20(4):708–16.
  130. Conde J, Scotece M, Abella V, Gómez R, López V, Villar R, et al. Identification of novel adipokines in the joint. Differential expression in healthy and osteoarthritis tissues. *PLoS One.* 2015;10(4):e0123601.
  131. Tanaka I, Morikawa M, Okuse T, Shirakawa M, Imai K. Expression and regulation of WISP2 in rheumatoid arthritic synovium. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;334(4):973–8.
  132. Grogan SP, D’Lima DD. Joint aging and chondrocyte cell death. *Int J Clin Rheumtol.* 2010;5(2):199–214.
  133. Del Carlo M, Loeser RF. Cell death in osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2008;10(1):37–42.
  134. Hashimoto S, Ochs RL, Rosen F, Quach J, McCabe G, Solan J, et al. Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(6):3094–9.
  135. Thomas CM, Fuller CJ, Whittles CE, Sharif M. Chondrocyte death by apoptosis is associated with cartilage matrix degradation. *Osteoarthr Cartil.* 2007;15(1):27–34.
  136. Blanco FJ, Guitian R, Vázquez-Martul E, De Toro FJ, Galdo F. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis: A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum.* 1998;41(2):284–9.
  137. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell R. Cell Injury, Cell Death, and

- Adaptations. Robbins Basic Pathology. 8<sup>a</sup> ed. Elsevier GmbH.; 2007. p. 1–30.
138. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2015;16(6):2129–44.
  139. Fiandalo M V., Kyprianou N. Caspase control: Protagonists of cancer cell apoptosis. *Experimental Oncology.* 2012. p. 165–75.
  140. Sui Y, Lee JH, DiMicco MA, Vanderploeg EJ, Blake SM, Hung HH, et al. Mechanical injury potentiates proteoglycan catabolism induced by interleukin-6 with soluble interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha in immature bovine and adult human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 2009;60(10):2985–96.
  141. Green DM, Noble PC, Ahuero JS, Birdsall HH. Cellular events leading to chondrocyte death after cartilage impact injury. *Arthritis Rheum.* 2006;54(5):1509–17.
  142. D’Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, Colwell C.W. J, Lotz MK. Human chondrocyte apoptosis in response to mechanical injury. *Osteoarthr Cartil.* 2001;9(8):712–9.
  143. Patwari P, Cook MN, DiMicco MA, Blake SM, James IE, Kumar S, et al. Proteoglycan degradation after injurious compression of bovine and human articular cartilage in vitro: Interaction with exogenous cytokines. *Arthritis Rheum.* 2003;48(5):1292–301.
  144. Maneiro E, López-Armada MJ, de Andres MC, Caramés B, Martín MA, Bonilla A, et al. Effect of nitric oxide on mitochondrial respiratory activity of human articular chondrocytes. *Ann Rheum Dis.* 2005;64(3):388–95.
  145. Cherng YG, Chang HC, Lin YL, Kuo ML, Chiu WT, Chen RM. Apoptotic insults to human chondrocytes induced by sodium nitroprusside are involved in sequential events, including cytoskeletal remodeling, phosphorylation of mitogen-activated protein kinase kinase kinase-1/c-jun N-terminal kinase, and Bax-mitochondria. *J Orthop Res.* 2008;26(7):1018–26.
  146. Wu GJ, Chen TG, Chang HC, Chiu WT, Chang CC, Chen RM. Nitric oxide from both exogenous and endogenous sources activates mitochondria-dependent events and induces insults to human chondrocytes. *J Cell Biochem.* 2007;101(6):1520–31.
  147. Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol.* 1995;146(1):75–85.
  148. Kühn K, Hashimoto S, Lotz M. IL-1 beta protects human chondrocytes from CD95-induced apoptosis. *J Immunol.* 2000;164(4):2233–9.
  149. Rachek LI, Grishko VI, LeDoux SP, Wilson GL. Role of nitric oxide-induced mtDNA damage in mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2006;40(5):754–62.
  150. Kühn K, D’Lima DD, Hashimoto S, Lotz M. Cell death in cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004. p. 1–16.
  151. Ruiz-Romero C, Calamia V, Mateos J, Carreira V, Martínez-Gomariz M,

- Fernández M, et al. Mitochondrial dysregulation of osteoarthritic human articular chondrocytes analyzed by proteomics: a decrease in mitochondrial superoxide dismutase points to a redox imbalance. *Mol Cell Proteomics*. 2009;8(1):172–89.
152. Blanco FJ, Rego I, Ruiz-Romero C. The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(3):161–9.
153. Abelsohn A, Gibson BL, Sanborn MD, Weir E. Identifying and managing adverse environmental health effects: 5. Persistent organic pollutants. *CMAJ*. 2002. p. 1549–54.
154. El-Shahawi MS, Hamza A, Bashammakh AS, Al-Saggaf WT. An overview on the accumulation, distribution, transformations, toxicity and analytical methods for the monitoring of persistent organic pollutants. *Talanta*. 2010. p. 1587–97.
155. Kimbrough RD, Krouskas CA. Human exposure to polychlorinated biphenyls and health effects: a critical synopsis. *Toxicol Rev*. 2003;22(4):217–33.
156. Pirard C, Eppe G, Massart A-C, Fierens S, De Pauw E, Focant J-F. Environmental and human impact of an old-timer incinerator in terms of dioxin and PCB level: a case study. *Environ Sci Technol*. 2005;39(13):4721–8.
157. Fattore E, Fanelli R, Dellatte E, Turrini A, Domenico A di. Assessment of the dietary exposure to non-dioxin-like PCBs of the Italian general population. *Chemosphere*. 2008;73(1):278–83.
158. Ferrante MC, Clausi MT, Meli R, Fusco G, Naccari C, Lucisano A. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in European eel (*Anguilla anguilla*) from the Garigliano River (Campania region, Italy). *Chemosphere*. 2010;78(6):709–16.
159. European Food Safety Authority (EFSA). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the presence of non-dioxin like polychlorinated biphenyls (PCB) in feed and food. *EFSA J*. 2005;3(11):1–137.
160. Storelli MM, Perrone VG. Detection and quantitative analysis of organochlorine compounds (PCBs and DDTs) in deep sea fish liver from Mediterranean Sea. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2010;17(4):968–76.
161. Faroon O, Syracuse Research Corporation, Olson JN. Toxicological profile for polychlorinated biphenyls (PCBs). Atlanta, GA, EE.UU.: Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2000. 765 p.
162. Matykiewiczová N, Klánová J, Klán P. Photochemical degradation of PCBs in snow. *Environ Sci Technol*. 2007;41(24):8308–14.
163. Erickson MD, Kaley RG. Applications of polychlorinated biphenyls. *Environ Sci Pollut Res*. 2011;18(2):135–51.
164. Xu W, Wang X, Cai Z. Analytical chemistry of the persistent organic pollutants identified in the Stockholm Convention: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2013. p. 1–13.
165. Suh J, Kang JS, Yang KH, Kaminski NE. Antagonism of aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of CYP1A1 and inhibition of IgM expression by di-ortho-substituted polychlorinated biphenyls. *Toxicol Appl Pharmacol*.

- 2003;187(1):11–21.
166. Wu B, Zhang Y, Kong J, Zhang X, Cheng S. In silico predication of nuclear hormone receptors for organic pollutants by homology modeling and molecular docking. *Toxicol Lett.* 2009;191(1):69–73.
  167. Al-Salman F, Plant N. Non-coplanar polychlorinated biphenyls (PCBs) are direct agonists for the human pregnane-X receptor and constitutive androstane receptor, and activate target gene expression in a tissue-specific manner. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012;263(1):7–13.
  168. Willson TM, Kliewer SA. PXR, CAR and drug metabolism. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1(4):259–66.
  169. Gährs M, Roos R, Andersson PL, Schrenk D. Role of the nuclear xenobiotic receptors CAR and PXR in induction of cytochromes P450 by non-dioxinlike polychlorinated biphenyls in cultured rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;272(1):77–85.
  170. Gao J, Xie W. Targeting xenobiotic receptors PXR and CAR for metabolic diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2012. p. 552–8.
  171. Khan MA, Lichtensteiger CA, Faroon O, Mumtaz M, Schaeffer DJ, Hansen LG. The hypothalamo-pituitary-thyroid (HPT) axis: A target of nonpersistent ortho-substituted PCB congeners. *Toxicol Sci.* 2002;65(1):52–61.
  172. Ferrante MC, Mattace Raso G, Esposito E, Bianco G, Iacono A, Clausi MT, et al. Effects of non-dioxin-like polychlorinated biphenyl congeners (PCB 101, PCB 153 and PCB 180) alone or mixed on J774A.1 macrophage cell line: modification of apoptotic pathway. *Toxicol Lett.* 2011;202(1):61–8.
  173. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J-P, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews.* 2009. p. 293–342.
  174. Everett CJ, Frithsen I, Player M. Relationship of polychlorinated biphenyls with type 2 diabetes and hypertension. *J Environ Monit.* 2011;13(2):241–51.
  175. Lee DH, Steffes MW, Sjodin A, Jones RS, Needham LL, Jacobs Jr. DR. Low dose organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls predict obesity, dyslipidemia, and insulin resistance among people free of diabetes. *PLoS One.* 2011;6(1):e15977.
  176. Baker NA, Karounos M, English V, Fang J, Wei Y, Stromberg A, et al. Coplanar polychlorinated biphenyls impair glucose homeostasis in lean C57BL/6 mice and mitigate beneficial effects of weight loss on glucose homeostasis in obese mice. *Environ Health Perspect.* 2013;121(1):105–10.
  177. Dirinck E, Jorens PG, Covaci A, Geens T, Roosens L, Neels H, et al. Obesity and persistent organic pollutants: possible obesogenic effect of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls. *Obesity.* 2011;19(4):709–14.
  178. La Merrill M, Emond C, Kim MJ, Antignac J-P, Le Bizec B, Clément K, et al. Toxicological function of adipose tissue: focus on persistent organic pollutants. *Environ Health Perspect.* 2013;121(2):162–9.
  179. Conde J, Scotece M, Gómez R, Lopez V, Gómez-Reino JJ, Gualillo O.

- Adipokines and osteoarthritis: novel molecules involved in the pathogenesis and progression of disease. *Arthritis*. 2011;2011(203901):1–8.
180. Scotece M, Conde J, Vuolteenaho K, Koskinen A, López V, Gómez-Reino J, et al. Adipokines as drug targets in joint and bone disease. *Drug Discov Today*. 2013;19(3):241–58.
  181. Wahlang B, Falkner KC, Gregory B, Ansert D, Young D, Conklin DJ, et al. Polychlorinated biphenyl 153 is a diet-dependent obesogen that worsens nonalcoholic fatty liver disease in male C57BL/6/J mice. *J Nutr Biochem*. 2013;24(9):1587–95.
  182. Taxvig C, Dreisig K, Boberg J, Nellemann C, Schelde AB, Pedersen D, et al. Differential effects of environmental chemicals and food contaminants on adipogenesis, biomarker release and PPAR $\gamma$  activation. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;361(1-2):106–15.
  183. Ferrante MC, Amero P, Santoro A, Monnolo A, Simeoli R, Di Guida F, et al. Polychlorinated biphenyls (PCB 101, PCB 153 and PCB 180) alter leptin signaling and lipid metabolism in differentiated 3T3-L1 adipocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014;279(3):401–8.
  184. Ahmed SA. The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disruptors): a new emerging field. *Toxicology*. 2000;150(1-3):191–206.
  185. Okumura M. Past and current medical states of yusho patients. *Prog Clin Biol Res*. 1984;137:13–8.
  186. Kanagawa Y, Matsumoto S, Koike S, Tajima B, Fukiwake N, Shibata S, et al. Association of clinical findings in Yusho patients with serum concentrations of polychlorinated biphenyls, polychlorinated quarterphenyls and 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran more than 30 years after the poisoning event. *Environ Heal*. 2008;7:47.
  187. Guo YL, Yu ML, Hsu CC, Rogan WJ. Chloracne, goiter, arthritis, and anemia after polychlorinated biphenyl poisoning: 14-year follow-Up of the Taiwan Yucheng cohort. *Environ Health Perspect*. 1999;107(9):715–9.
  188. Lee D-H, Steffes M, Jacobs DR. Positive associations of serum concentration of polychlorinated biphenyls or organochlorine pesticides with self-reported arthritis, especially rheumatoid type, in women. *Environ Health Perspect*. 2007;115(6):883–8.
  189. Campo GM, Avenoso A, D'Ascola A, Scuruchi M, Prestipino V, Calatroni A, et al. Hyaluronan in part mediates IL-1 $\beta$ -induced inflammation in mouse chondrocytes by up-regulating CD44 receptors. *Gene*. 2012;494(1):24–35.
  190. Saperstein S, Chen L, Oakes D, Pryhuber G, Finkelstein J. IL-1 $\beta$  augments TNF- $\alpha$ -mediated inflammatory responses from lung epithelial cells. *J Interferon Cytokine Res*. 2009;29(5):273–84.
  191. Gómez R, Villalvilla A, Largo R, Gualillo O, Herrero-Beaumont G. TLR4 signalling in osteoarthritis—finding targets for candidate DMOADs. *Nat Rev Rheumatol*. 2014; 11(3):159-70

192. Atsumi T, Miwa Y, Kimata K, Ikawa Y. A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of ATDC5 teratocarcinoma cells. *Cell Differ Dev.* 1990;30:109–16.
193. Shukunami C, Ishizeki K, Atsumi T, Ohta Y, Suzuki F, Hiraki Y. Cellular hypertrophy and calcification of embryonal carcinoma-derived chondrogenic cell line ATDC5 in vitro. *J Bone Miner Res.* 1997;12(8):1174–88.
194. Shukunami C, Shigeno C, Atsumi T, Ishizeki K, Suzuki F, Hiraki Y. Chondrogenic differentiation of clonal mouse embryonic cell line ATDC5 in vitro: Differentiation-dependent gene expression of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. *J Cell Biol.* 1996;133:457–68.
195. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990;186:421–31.
196. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem.* 2004;37(2):112–9.
197. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005;38(12):1103–1111.
198. Cekic B, Geze S, Ozkan G, Besir A, Sonmez M, Karahan SC, et al. The effect of dexmedetomidine on oxidative stress during pneumoperitoneum. *Biomed Res Int.* 2014;2014(760323):1–5.
199. Aycicek A, Erel O, Kocyigit A. Decreased total antioxidant capacity and increased oxidative stress in passive smoker infants and their mothers. *Pediatr Int.* 2005;47(6):635–9.
200. Santoro A, Conde J, Scotece M, Abella V, López V, Pino J, et al. Choosing the right chondrocyte cell line: Focus on nitric oxide. *J Orthop Res.* 2015; 33(12):1784-8
201. 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;52(1):128–35.
202. D'Acquisto F, Rattazzi L, Piras G, Galuppo ML. Novel immunological targets in rheumatic diseases: clues from current therapies. *Drug Discov Today.* 2014 Aug;19(8):1155–60.
203. Yin F, Banerjee R, Thomas B, Zhou P, Qian L, Jia T, et al. Exaggerated inflammation, impaired host defense, and neuropathology in progranulin-deficient mice. *J Exp Med.* 2010;207:117–28.
204. Matsuno H, Yudoh K, Katayama R, Nakazawa F, Uzuki M, Sawai T, et al. The role of TNF-alpha in the pathogenesis of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis (RA): a study using a human RA/SCID mouse chimera. *Rheumatology.* 2002;41:329–37.
205. Tian Q, Zhao Y, Mundra JJ, Gonzalez-Gugel E, Jian J, Uddin SM, et al. Three TNFR-binding domains of PGRN act independently in inhibition of TNF-alpha binding and activity. *Front Biosci.* 2014;19(June 1):1176–85.
206. Hwang HJ, Jung TW, Hong HC, Choi HY, Seo JA, Kim SG, et al. Progranulin Protects Vascular Endothelium against Atherosclerotic Inflammatory Reaction



- via Akt/eNOS and Nuclear Factor- $\kappa$ B Pathways. *PLoS One*. 2013;8.
207. Zhao YP, Tian QY, Frenkel S, Liu CJ. The promotion of bone healing by progranulin, a downstream molecule of BMP-2, through interacting with TNF/TNFR signaling. *Biomaterials*. 2013;34(27):6412–21.
208. Zhao Y, Tian Q, Liu B, Cuellar J, Richbourgh B, Jia T, et al. Progranulin knockout accelerates intervertebral disc degeneration in aging mice. *Sci Rep*. 2015;5:9102.
209. Goldring SR, Goldring MB. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*. 2004;S27–36.
210. Sillat T, Barreto G, Clarijs P, Soininen A, Ainola M, Pajarinen J, et al. Toll-like receptors in human chondrocytes and osteoarthritic cartilage. *Acta Orthop*. 2013;84(6):585–92.
211. Kim HA, Cho M-L, Choi HY, Yoon CS, Jhun JY, Oh HJ, et al. The catabolic pathway mediated by Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2006;54(7):2152–63.
212. Baker N, Sharpe P, Culley K, Otero M, Bevan D, Newham P, et al. Dual regulation of metalloproteinase expression in chondrocytes by Wnt-1-inducible signaling pathway protein 3/CCN6. *Arthritis Rheum*. 2012;64(7):2289–99.
213. Cheon H, Boyle DL, Firestein GS. Wnt1 inducible signaling pathway protein-3 regulation and microsatellite structure in arthritis. *J Rheumatol*. 2004 Nov;31(11):2106–14.
214. Bougault C, Priam S, Houard X, Pigenet A, Sudre L, Lories RJ, et al. Protective role of frizzled-related protein B on matrix metalloproteinase induction in mouse chondrocytes. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(4):R137.
215. Holz JD, Sheu T, Drissi H, Matsuzawa M, Zuscik MJ, Puzas JE. Environmental agents affect skeletal growth and development. *Birth Defects Res Part C, Embryo today*. 2007;81(1):41–50.
216. Hart JE, Källberg H, Laden F, Bellander T, Costenbader KH, Holmqvist M, et al. Ambient air pollution exposures and risk of rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA case-control study. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(6):888–94.
217. Ghosh S, De S, Chen Y, Sutton DC, Ayorinde FO, Dutta SK. Polychlorinated biphenyls (PCB-153) and (PCB-77) absorption in human liver (HepG2) and kidney (HK2) cells in vitro: PCB levels and cell death. *Environ Int*. 2010;36(8):893–900.
218. Tofighi R, Johansson C, Goldoni M, Ibrahim WNW, Gogvadze V, Mutti A, et al. Hippocampal neurons exposed to the environmental contaminants methylmercury and polychlorinated biphenyls undergo cell death via parallel activation of calpains and lysosomal proteases. *Neurotox Res*. 2011;19(1):183–94.
219. Sánchez-Alonso JA, López-Aparicio P, Recio MN, Pérez-Albarsanz MA. Apoptosis-mediated neurotoxic potential of a planar (PCB 77) and a nonplanar (PCB 153) polychlorinated biphenyl congeners in neuronal cell cultures. *Toxicol Lett*. 2003;144(3):337–49.

220. Lee HG, Yang JH. PCB126 induces apoptosis of chondrocytes via ROS-dependent pathways. *Osteoarthr Cartil.* 2012;20(10):1179–85.
221. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(9):647–56.
222. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993;74(4):609–19.
223. An J, Zou W, Zhong Y, Zhang X, Wu M, Yu Z, et al. The toxic effects of Aroclor 1254 exposure on the osteoblastic cell line MC3T3-E1 and its molecular mechanism. *Toxicology.* 2012;295(1-3):8–14.
224. Santiago MF, Pérez-Reyes PL, López-Aparicio P, Recio MN, Pérez-Albarsanz MA. Differential effects of PCBs on the induction of apoptosis machinery and PKC $\alpha$  translocation in rat renal tubular cell cultures. *Toxicol Lett.* 2006;163(2):91–100.
225. Kong D, Zheng T, Zhang M, Wang D, Du S, Li X, et al. Static mechanical stress induces apoptosis in rat endplate chondrocytes through MAPK and mitochondria-dependent caspase activation signaling pathways. *PLoS One.* 2013;8(7):e69403.
226. Zhuang S, Demirs JT, Kochevar IE. p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 2000;275(34):25939–48.
227. Wang H, Wang Z, Chen J, Wu J. Apoptosis induced by NO via phosphorylation of p38 MAPK that stimulates NF- $\kappa$ B, p53 and caspase-3 activation in rabbit articular chondrocytes. *Cell Biol Int.* 2007;31(9):1027–35.
228. Suantawee T, Tantavisut S, Adisakwattana S, Tanavalee A, Yuktanandana P, Anomasiri W, et al. Oxidative stress, vitamin e, and antioxidant capacity in knee osteoarthritis. *J Clin Diagnostic Res.* 2013;7(9):1855–9.

**ANEXOS**



El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido parcialmente publicado en los siguientes artículos científicos y comunicaciones a congresos:

- **Abella V**, Scotece M, Conde J, López V, Lazzaro V, Pino J, Gómez-Reino JJ, Meli R, Gualillo O. *Environmental pollutants and osteoarthritis: Effects of Non-dioxin-like polychlorinated byphenyls on cultured*. Comunicación tipo poster presentada en el 2014 World Congress on Osteoarthritis (OARSI) - París, Francia (24-27 de Abril de 2014).
- **Abella V**, Santoro A, Scotece M, Conde J, López-López V, Lazzaro V, Gómez-Reino JJ, Meli R, Gualillo O. *Non-dioxin-like polychlorinated byphenyls (PCB 101, PCB 153 and PCB 180) induce chondrocyte cell death through multiple pathways*. *Toxicol Lett.* 2015;234:13–19.
- **Abella V**, Scotece M, Conde J, López V, Pirozzi C, Pino J, Gómez R, Lago F, González-Gay MA, Gualillo O. *The novel adipokine progranulin counteracts IL-1 and TLR4-driven inflammatory response in human and murine chondrocytes via TNFR1*. *Sci Rep.* 2016; 6, 20356; doi: 10.1038/srep20356.