

Caracterización molecular de la osteoartritis de origen metabólico: Efecto de los ácidos grasos palmítico y oleico en un modelo *in vitro* de condrocitos humanos.

María Eugenia Vázquez Mosquera

Tesis doctoral UDC / 2017

Directores: Dr. Francisco J. Blanco García y Dr. Ignacio Rego Pérez

Tutora: Silvia María Díaz Prado

Programa de doctorado en Ciencias de la Salud



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Dr. Francisco J. Blanco García y el Dr. Ignacio Rego Pérez, directores de esta tesis doctoral

CERTIFICAN:

Que la presente memoria de tesis titulada **“Caracterización molecular de la osteoartritis de origen metabólico: Efecto de los ácidos grasos palmítico y oleico en un modelo *in vitro* de condrocitos humanos”**, presentada por Doña **María Eugenia Vázquez Mosquera**, para optar al Grado de Doctor, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el INIBIC, dentro del grupo de Reumatología. La tesis ha sido revisada y está en disposición de ser presentada para optar al grado de Doctor

Para que así conste, firman el presente certificado

A Coruña, a 5 de Abril de 2017

Fdo. Dr. Francisco J. Blanco García

Fdo. Dr. Ignacio Rego Pérez

Dra. Silvia María Díaz Prado

CERTIFICA:

Que el presente trabajo que lleva por título **“Caracterización molecular de la osteoartritis de origen metabólico: efecto de los ácidos grasos palmítico y oleico en un modelo *in vitro* de condrocitos humanos”** fue realizado por **María Eugenia Vázquez Mosquera**, bajo mi tutela desde el Departamento de Medicina de la Universidad de A Coruña, y reúne las condiciones de originalidad y rigor científico para optar al grado de doctor en Ciencias de la Salud.

A Coruña, a 5 de Abril de 2017

Fdo. Dra. Silvia María Díaz Prado

A mi madre

AGRADECIMIENTOS

Llegó ese momento en el que no hay que recurrir a las libretas, a los datos, a los papers...y solo hay que acordarse de las personas que te han acompañado en cada etapa de este camino. Esta parte es fácil. En el camino hasta aquí, he pasado cíclicamente por momentos muy buenos llenos de optimismo, confianza en uno mismo, credulidad absoluta en lo que hacía...y por momentos muy bajos en los que tirar la toalla parecía la opción más acertada. Si estoy escribiendo esto ahora es porque no la tiré, y esto ya es motivo suficiente para agradecer hasta el infinito a todos los que, de una u otra manera me ayudaron a no hacerlo.

En primer lugar, por supuesto, agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Francisco J. Blanco García y el Dr. Ignacio Rego Pérez la confianza depositada en mí y la oportunidad de trabajar en su grupo y hacer esta tesis. Y también a mi tutora, la Dra. Silvia Díaz Prado, por ser siempre de gran ayuda con las gestiones que conlleva la presentación de una tesis.

A mi grupo de Genómica. A Merce, mi GRACIAS más grande, por ser la culpable de que no tirase la toalla. Sin tu ayuda, tus consejos y tu perseverancia, esta tesis no estaría escrita. Con eso ya lo digo todo. Gracias, no sólo por todo lo que me has enseñado, sino por tu disponibilidad constante y tu paciencia ante mi negatividad en la última etapa. Ojalá podamos seguir aprendiendo y trabajando juntas y compartiendo “imposibles” mucho tiempo, creo sinceramente que formamos un gran equipo. A Sara, por guiarme y enseñarme en mis comienzos en el INIBIC y hacer que mi integración en el grupo fuese mucho más fácil. A Estefa, porque no se puede tener mejor compañera de poyata. Gracias por adaptarte a mi desorden, creo que no es fácil (eso dicen...), y tener la paciencia de recordarme siempre todo y salvarme en mis despistes. Por estar siempre para lo bueno y lo malo. No fallas nunca. Con el tiempo has pasado de ser mi compi de poyata a ser una amiga para toda la vida.

A los grupos vecinos “Inflamación” y “Onco”: Laurita, Oly, Isa. Gracias por vuestro apoyo y compañerismo. A Raquel, por animarme, apoyarme y por esas meriendas “imposibles” que tanto ayudan al desahogo...

Al grupo de Proteómica. En especial a Patri, por tu alegría y ánimo; Y a Valentina, por aportarme tanto en todos los sentidos. Te has convertido en una amiga con la que quiero seguir compartiendo cosas dentro y fuera del laboratorio.

Al resto de compañeros del INIBIC, que de una u otra manera me habéis facilitado y amenizado el trabajo siempre: Noa, Pury, Dolo, Mariajo, Paula, Raquel, Adrián, Marta, Clara, Rocío, Silvia,

Susana, Elena, Ángela, Lucía, Charlie...Un agradecimiento especial a Tamara, por su ayuda incondicional dentro y fuera del trabajo y por aportar tanta alegría al laboratorio.

Quiero agradecer también a los que ya no están en el INIBIC pero que han sido tan importantes durante el tiempo de esta tesis. A Noa y a Emma. A Mar, por enseñarme tantas cosas. A Ángel, agradecerle infinito esos momentazos de poyata, tu sentido del humor nos ha salvado muchas tardes. No tenerte detrás en la poyata lo hemos echado muchísimo de menos; A Carol, a Lu y Beña, por haberme hecho pasar tan buenos momentos. Un placer haberos tenido de compañeras, pero más placer aún teneros todavía de amigas; A Romi, por tantos momentos de “contacto visual”, por ser la mejor vecina de enfrente que pude tener y por tu apoyo fundamental en esta última etapa; A Jesús por tu compañerismo y tu sentido del humor que tanto se echa de menos. Y como no a mi Juanillo...por enseñarme tanto y por estar siempre. Eres el mejor ejemplo de compañero y amigo perfecto. Gracias por darme siempre tanto a cambio de tan poco.

A mis compañeros en mi etapa anterior al INIBIC, del Hospital Puerta de Hierro de Madrid. Con vosotros aprendí mucho y sobre todo crecí como persona. En especial a Encarna. Vaya donde vaya, esté donde esté todo lo que aprendí contigo me acompaña y siempre serás un ejemplo para mí.

A mis amigas/hermanas: Ledi, Ana, Noe, María, Rebe, Lucía B, Lucía L, y como no a Dalia y a Sandra, a las que agradezco estar a mi lado siempre incondicionales en esta etapa y en todas las de mi vida, en lo bueno y en lo malo.

A Manolo, por llegar a mi vida en el mejor momento y darme todo tu apoyo para que tirar la toalla no haya sido la primera opción. Gracias por estar a mi lado, por tu paciencia, por creer en mí, cuidarme y quererme tanto. Y gracias de antemano por todo lo que nos queda por vivir juntos.

A mi familia. A mi madre y a mi hermano porque sois lo más importante de mi vida, mis salvadores y el mejor ejemplo de superación que existe. Cualquier paso que dé en mi vida es obra vuestra. Gracias por no dejar nunca que me rinda, por soportarme y por ser mi guía para poder ser mejor persona cada día.

GRACIAS

RESUMEN

La estrecha relación entre obesidad y enfermedades metabólicas con la Osteoartritis (OA), independientemente de la sobrecarga mecánica de la articulación, incitan a pensar que son las alteraciones sistémicas derivadas de estas patologías, tales como el aumento de los niveles circulantes de ácidos grasos (AG), las causantes del proceso artrósico. En este trabajo se analizaron los efectos del ácido palmítico (PA) y Oleico (OL), como AG mayoritarios en dieta y plasma, en un modelo “in vitro” de condrocitos humanos. Los resultados de este estudio muestran que el PA produce en los condrocitos efectos altamente relacionados con el proceso artrósico tales como una elevada expresión de marcadores de degradación del cartílago, de la inflamación, así como un aumento de la apoptosis y del estrés oxidativo celular. El estudio sobre el metabolismo celular indica que el PA produce una importante disfunción mitocondrial y una menor capacidad glucolítica, así como un descenso en los niveles de ATP. El OL es capaz de revertir estos efectos, mostrando una mayor capacidad de formación de gotas lipídicas y favoreciendo la incorporación del PA a estas estructuras de reserva. Estos resultados pueden ayudar a explicar uno de los mecanismos moleculares que estrechan la relación entre las enfermedades metabólicas y la OA.

RESUMO

A estreita relación entre obesidade e enfermidades metabólicas coa Osteoartritis (OA), independentemente da sobrecarga mecánica da articulación, incitan a pensar que son as alteracións sistémicas derivadas destas patoloxías, tales como o aumento dos niveis circulantes de ácidos graxos (AG), as causantes do proceso artrósico. Neste traballo analizáronse os efectos do ácido palmítico (PA) e Oleico (OL) como AG maioritarios en dieta e plasma, nun modelo “*in vitro*” de condrocitos humanos. Os resultados deste estudo mostran que o PA produce nos condrocitos efectos altamente relacionados co proceso artrósico tales como unha elevada expresión de marcadores de degradación da cartilaxe, da inflamación, así como un aumento da apoptosis e a tensión oxidativa celular. O estudo sobre o metabolismo celular, indica que o PA produce unha importante disfunción mitocondrial e unha menor capacidade glucolítica, ademáis dun descenso nos niveis de ATP. O OL é capaz de reverter estes efectos, mostrando unha maior capacidade de formación de gotas lipídicas e favorecendo a incorporación do PA a estas estruturas de reserva. Estes resultados poden axudar a explicar un dos mecanismos moleculares que estreitan a relación entre as enfermidades metabólicas e a OA.

ABSTRACT

The relationship between obesity and metabolic disorders with osteoarthritis (OA), regardless of mechanical overloading of the joint, suggests that systemic alterations derived from these pathologies, such as the increase in circulating levels of fatty acids (FA), could contribute to the development of OA. This thesis analysed the effects of Palmitic (PA) and Oleic (OL) acids, as major FA in diet and plasma, in an "*in vitro*" model of human chondrocytes. The results show that the PA produces effects highly related with OA such as an elevated expression of markers of degradation of cartilage, inflammation, as well as an increase of apoptosis and cellular oxidative stress. The study of cell metabolism indicates that PA generates an important mitochondrial dysfunction, as well as a lower glycolytic capacity, and a decrease of ATP levels. The OL is able to reverse these effects, showing a greater capacity of lipid droplets formation and facilitating the incorporation of the PA to these structures of reserve. These results may help explain one of the molecular mechanisms that strengthen the relationship between metabolic diseases and OA.

INDICE

INDICE DE FIGURAS.....	I
INDICE DE TABLAS.....	V
ABREVIATURAS.....	VII
INTRODUCCIÓN.....	1
1. EL CARTÍLAGO ARTICULAR.....	3
1.1. Componentes	3
1.2. Estructura.....	7
1.3. Mecanismos de destrucción y reparación	8
1.4. Metabolismo.....	10
2. ARTROSIS	12
2.1. Definición	12
2.2. Fisiopatología.....	13
2.3. Epidemiología e impacto socioeconómico.....	15
2.4. Factores de riesgo	16
2.5. Fenotipos clínicos	20
2.6. Diagnóstico	21
2.7. Tratamiento	22
3. ÁCIDOS GRASOS, LIPOTOXICIDAD Y ENFERMEDAD METABÓLICA	25
3.1. Química de los ácidos grasos	25
3.2. Mecanismo y regulación de la lipólisis	26
3.3. Lipotoxicidad.....	27
3.4. Niveles plasmáticos de ácidos grasos y Enfermedad Metabólica	29
4. ENFERMEDADES METABÓLICAS Y ARTROSIS.....	31
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS	39
1. Cultivo Celular	41
1.1. Preparación de las soluciones de ácidos grasos	41
2. Ensayo de Viabilidad	42
3. Análisis de la expresión génica	43
3.1. Extracción de ácido ribonucleico (ARN) celular	43
3.2. Retrotranscripción de ARN mensajero (ARNm) a ADN complementario (ADNc)	
44	

3.3. PCR a tiempo real	44
4. Estudio de la muerte celular.....	48
4.1. Cuantificación de Apoptosis temprana y tardía.....	48
4.2. Actividad de Caspasas	49
5. Estudio del estrés oxidativo.....	50
5.1. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)	50
5.2. Producción de óxido nítrico (NO)	52
6. Análisis de la función mitocondrial	53
6.1. Medida de la función mitocondrial mediante la tasa de consumo de oxígeno celular (OCR).....	53
6.2. Cuantificación del número de copias de ADN mitocondrial (ADNmt).	55
7. Medida de la función glucolítica a través de la tasa de acidificación extracelular (ECAR)	56
8. Evaluación del balance energético.....	59
8.1. Estudio de la contribución de la OXPHOS y la Glucólisis a la producción de ATP	59
8.2. Cuantificación de ATP total y mitocondrial por luminiscencia	59
9. Evaluación de la formación acúmulos lipídicos (<i>Lipid Droplets</i> , LD).....	61
10. Cuantificación del contenido intracelular de triglicéridos (TG).....	63
11. Análisis Estadístico	65
RESULTADOS	67
1. Ensayo de Viabilidad celular	69
2. Expresión de genes implicados en la patología artrósica	69
3. Estudio de la muerte celular mediada por AG.	71
3.1. Cuantificación de la Apoptosis por citometría de flujo.	72
3.2. Cuantificación del efecto de los AG sobre la actividad de Caspasas.	73
4. Evaluación de los efectos de los AG sobre el estrés oxidativo celular.	74
4.1. Producción de especies reactivas de oxígeno y expresión de genes relacionados con la detoxificación.	74
4.2. Cuantificación de la producción de Óxido Nítrico	77
1. Análisis de la función mitocondrial	78
2. Análisis de la función glucolítica a través de la medida de la tasa de acidificación extracelular (ECAR).....	83
3. Evaluación del balance energético.....	87
3.1. Estudio de la contribución de la OXPHOS y la glucólisis a la producción de ATP	87

3.2. Cuantificación directa de ATP total y mitocondrial.	89
4. Evaluación de la formación de gotas lipídicas (<i>Lipid Droplets</i> , LD).....	90
4.1. Tinción y cuantificación de LD	90
4.2. Cuantificación del contenido intracelular de Triglicéridos...	93
DISCUSIÓN	95
CONCLUSIONES	107
BIBLIOGRAFÍA	111

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de una articulación sinovial.	3
Figura 2. Cartílago articular humano.	4
Figura 3. Estructura de una molécula de proteoglicano.....	6
Figura 4. Estructura del cartílago articular hialino	8
Figura 5. Principales mecanismos biológicos que participan en la homeostasis de la matriz extracelular	9
Figura 6. Imagen representativa de un tejido sinovial.....	11
Figura 7. Representación de los principales componentes de la articulación de rodilla	13
Figura 8. Ejemplo de algoritmo para el manejo de pacientes con artrosis	23
Figura 9. Representación de la estructura de los tipos de ácidos grasos en función de presencia o no de dobles enlaces	26
Figura 10. Representación esquemática del mecanismo de detección de apoptosis utilizando la Anexina V/FITC	49
Figura 11: Representación gráfica de los parámetros bioenergéticos calculados a partir de los valores de consumo de oxígeno (OCR)	55
Figura 12: Representación gráfica de los parámetros bioenergéticos calculados a partir de los valores de acidificación extracelular (ECAR)	58
Figura 13: Reacciones acopladas utilizadas en el método enzimático colorimétrico de cuantificación de triglicérido.	64
Figura 14: Cuantificación de los efectos de concentraciones de ácidos grasos sobre la viabilidad celular	69
Figura 15. Expresión génica de Metaloproteasas	70
Figura 16. Expresión génica de moléculas relacionadas con el proceso inflamatorio	71
Figura 17. Cuantificación de la Apoptosis por citometría de flujo	72
Figura 18. Cuantificación del nivel de apoptosis tras la eliminación del ácido palmítico (PA) del medio de cultivo y la incubación en condiciones habituales durante 24 horas.	73
Figura 19. Cuantificación de la actividad de Caspasas.....	74

Figura 20. Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) citoplasmáticas.....	75
Figura 21. Evaluación de la producción de anión superóxido mitocondrial.....	76
Figura 22. Comparación de niveles de Apoptosis de los condrocitos pretratados o no con N-Acetilcisteína (NAC) 1mM.....	77
Figura 23. Niveles de producción de Óxido Nítrico.....	77
Figura 24. Representación de los datos de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) frente al tiempo.....	78
Figura 25. Tasa de consumo de oxígeno (OCR) correspondiente a la Respiración mitocondrial basal.....	79
Figura 26. Tasa de consumo de oxígeno (OCR) correspondiente a la producción de ATP mitocondrial	80
Figura 27. Tasa de consumo de oxígeno (OCR) correspondiente a la Respiración mitocondrial máxima y Capacidad de reserva.....	81
Figura 28. Tasa de consumo de oxígeno (OCR) no mitocondrial y OCR correspondiente a la Fuga de protones.....	82
Figura 29. Número de copias de ADN mitocondrial	82
Figura 30. Representación de los datos de la tasa de acidificación extracelular (ECAR) frente al tiempo.....	83
Figura 31. Tasa de acidificación del medio extracelular (ECAR) correspondiente a la acidificación no glucolítica, es decir, la acidificación debida a procesos distintos a la glucólisis.....	84
Figura 32. Tasa de acidificación del medio extracelular (ECAR) correspondiente a la Glucólisis	85
Figura 33. Tasa de acidificación del medio extracelular (ECAR) correspondiente a la Capacidad Glucolítica	86
Figura 34: Expresión génica de (A) GLUT3 y (B) HK2.....	87
Figura 35. Tasas de producción de ATP en la glucólisis y en la OXPHOS estimados a partir de los valores de consumo de oxígeno (OCR) y tasa de producción de protones (PPR).....	88
Figura 36. Tasa de producción de ATP total estimados a partir de los valores de consumo de oxígeno (OCR) y tasa de producción de protones (PPR).....	88

Figura 37. Cuantificación del ATP total y ATP mitocondrial por luminiscencia	89
Figura 38. Imágenes representativas de los cambios estructurales detectados en los condrocitos por microscopía óptica de contraste de fases (20x).....	90
Figura 39. Imágenes obtenidas por microscopía óptica de la tinción con Oil Red O y su cuantificación	91
Figura 40. Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia de la tinción con LD540 y su cuantificación	92
Figura 41. Cuantificación del contenido intracelular de triglicéridos	93

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios del <i>American Colleague of Rheumatology</i> para la clasificación de la artrosis de mano, cadera y rodilla.	21
Tabla 2. Escala radiográfica Kellgren-Lawrence para la clasificación de la artrosis	22
Tabla 3. Componentes de la mezcla de reacción para la PCR a tiempo real.	45
Tabla 4. Protocolo de amplificación utilizado para la realización de la PCR a tiempo real, en el Lightcycler®480, para la amplificación de los genes analizados.	46
Tabla 5. Cebadores y sondas UPL de los genes analizados agrupados por su función	47

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
ABS	Albúmina bovina sérica
ACR	<i>American Colleague of Reumathology</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	Ácidos grasos
PGA	Productos de glicosilación avanzada
AGL	Ácidos grasos libres
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
AMPc	Adenosinmonofosfato cíclico
AR	Artritis reumatoide
ATP	Adenosín trifosfato
BMP	Proteínas morfogenéticas del hueso (<i>Bone morphogenetic proteins</i>)
BSA	Condición basal
COMP	Proteína oligomérica de la matriz del cartílago (<i>Cartilage oligomeric matrix protein</i>)
COX	Ciclooxigenasa
CS	Coindritín Sulfato
DCFH-DA	Diacetato de diclorohidrofluoresceína
DE	Desviación estándar
DM	Diabetes Mellitus
DMEM	<i>Dubelcco's modified Eagle's Medium</i>
DMO	Densidad mineral ósea
ECAR	Tasa de acidificación extracelular (<i>Extracellular acidification rate</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPISER	Estudio de Prevalencia de enfermedades reumáticas
CTE	Cadena de transporte de electrones
FATP	Proteína transportadora de ácidos grasos
FCCP	Carbonilo cianuro-4 (trifluorometoxi) fenilhidrazona
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico (<i>Fibroblast growth factor</i>)
FITC	Isocianato de fluoresceína

FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
GAG	Glucosaminoglicano
GWAS	Estudio de asociación del genoma completo (<i>Genome-wide association study</i>)
h	Horas
HBSS	<i>Hank's buffered salt solution</i>
HDL	Lipoproteína de alta densidad (<i>High density lipoprotein</i>)
IFN	Interferón
IGF	Factor de crecimiento insulínico (<i>Insulin-like growth factor</i>)
IL	Interleuquina
IL-R1A	Antagonista del receptor de interleuquina 1
IMC	Índice de masa corporal
IP	Ioduro de Propidio
LD540	4,4-Difluoro-2,3,5,6-bis-tetrametilen-4-bora-3a,4a-diaza-indaceno
LOX-1	<i>Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor</i>
LSH	Lipasa sensible a hormonas
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
MEC	Matriz extracelular
min	minutos
MMP	Metaloproteasa
ADNmt	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximeoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
MW6	Placa multipocillo de 6 pocillos
MW96	Placa multipocillo de 96 pocillos
NO	Óxido nítrico
nt	Nucleótidos
O ₂	Oxígeno molecular
OA	Osteoartritis o Artrosis
OARSI	<i>Osteoarthritis Research Society International</i>
OCR	Tasa de onsumo de oxígeno (<i>Oxygen consumption rate</i>)
OL	Ácido Oleico
OLG	Oligomicina
OMS	Organización Mundial de la Salud

ox-LDL	Lipoproteínas de baja densidad oxidadas (<i>Oxidized low density lipoprotein</i>)
PA	Ácido Palmítico
PA/OL	Medio de cultivo sin suero bovino fetal, suplementado con ácido palmítico y ácido oleico en proporción molar 1:2
PBS	Tampón fosfato salino
PG	Proteoglicano
PGE	Prostaglandina E
pmFABP	Proteína fijadora de ácidos grasos
PMS	Fenazina metosulfato
PMSF	Fluoruro de bencilsulfonil
FS	Fosfatidilserina
RAGE	Receptor de productos de glicosilación avanzada
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive oxygen species</i>)
Rot/AntA	Mezcla de Rotenona y Antimicina A
RPL13a	Proteína ribosómica L13a (<i>Ribosomal protein L13a</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEMERGEN	Sociedad Española de Medicina General
SER	Sociedad española de Reumatología
SG	Sulfato de Glucosamina
SM	Síndrome Metabólico
SNPs	Polimorfismos un único nucleótido (<i>Single nucleotide polymorphism</i>)
SYSADOA	Fármacos sintomáticos de acción lenta
TAG	Triacilglicerol
TG	Triglicéridos
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteasas
TNF	Factor de necrosis tumoral (<i>Tumoral necrosis factor</i>)

INTRODUCCIÓN



1. EL CARTÍLAGO ARTICULAR

1.1. Componentes

Las articulaciones sinoviales o diartrosis son aquellas que facilitan la movilidad permitiendo que los huesos se articulen entre sí (Figura 1). El cartílago articular hialino es el tejido conectivo que recubre los huesos en este tipo de articulaciones, amortiguando y minimizando así las fuerzas a las que se somete a los huesos no deformables durante la carga. Este tejido es avascular, aneural y alinfático y está constituido por un único tipo celular, los condrocitos, y por una matriz extracelular (MEC) que le confiere sus propiedades mecánicas características (1,2).

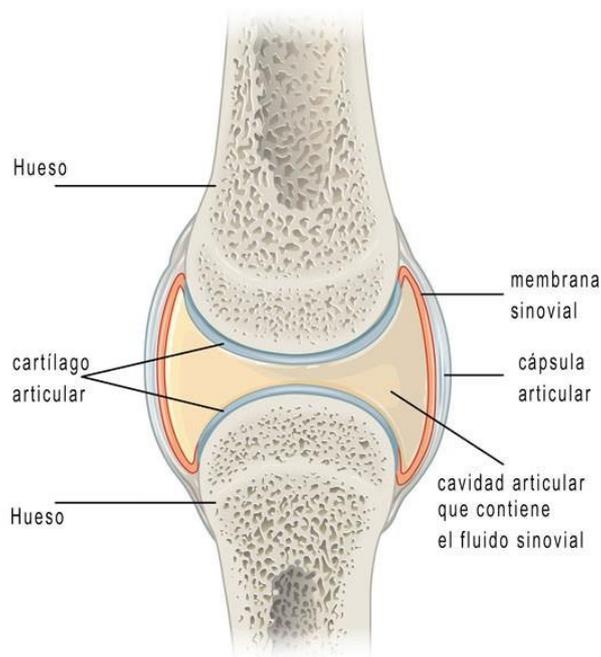


Figura 1. Estructura de una articulación sinovial. La cápsula articular, formada por tejido conectivo denso, protege la articulación. Su capa interna es la membrana sinovial, que secreta el líquido sinovial, responsable de nutrir al cartílago articular que recubre el hueso, y de mantener la lubricación normal de la articulación.

1.1.1. Células: condrocito.

El condrocito es el único tipo celular presente en el cartílago articular adulto. Su número es reducido, únicamente representa el 2-3% del volumen total del cartílago,

disminuyendo además esta cantidad con la edad (3). Estas células se encuentran ubicadas en la unidad funcional del cartílago, el condrón, el cual está formado por el condrocito, la laguna (espacio que ocupa dentro de la matriz) y la matriz, cuyos componentes son sintetizados por la propia célula. A su vez, el conjunto de condrones situados en una proximidad directa dentro de una gran laguna se denomina cluster (Figura 2). Son células altamente especializadas en la biosíntesis y mantenimiento de los componentes de la MEC (4). En el cartílago adulto, en condiciones normales, son capaces de mantener un equilibrio entre los procesos anabólicos y catabólicos (5). Los condrocitos varían en tamaño, forma, número y probablemente en su actividad metabólica en cada uno de los estratos del cartílago, si bien todos contienen los orgánulos necesarios para sintetizar cada uno de los componentes de la MEC (4,6).



Figura 2. Cartílago articular humano. Pueden observarse los condrocitos embebidos en la matriz del cartílago, y su disposición en condrones dentro de un espacio denominado laguna. Así como la unión de varios condrones constituyendo un *cluster*.

1.1.2. Matriz extracelular.

Toda la masa del cartílago articular, a excepción de los condrocitos, constituye la MEC. Su composición varía de unas personas a otras, entre las diferentes articulaciones de un mismo individuo y entre los estratos y zonas del cartílago articular de una misma

articulación. Además, sufre un proceso de remodelación constante por la acción de diferentes factores anabólicos y catabólicos.

La MEC está compuesta principalmente por agua, que constituye el 70-80% de la matriz. El 20-30% restante está formado por distintos tipos de colágeno (50%), proteoglicanos (PG) (30-35%) y otras proteínas de matriz (15-20%) (7). La MEC presenta variaciones de composición en los estratos de cartílago articular: en el superficial hay escasos PG (debido a que sufren una degradación más rápida y se sintetizan en menor cantidad), poco colágeno y la mayor concentración de fibronectina y agua; en el de transición hay una concentración superior de PG y menor de agua; en el medio o radial se encuentran las fibras de colágeno de mayor diámetro, la concentración de PG es la más elevada y la de agua la menor; finalmente, en el estrato de cartílago más profundo la MEC se encuentra calcificada (1,6).

Se distinguen, por tanto, dos macromoléculas estructurales fundamentales en la composición de la MEC:

- Colágeno: Forma una red de fibrillas que representa el 50% del peso seco y constituye el componente fibrilar principal del cartílago, proporcionando una estructura de organización para los PG y condrocitos. En el cartílago articular adulto, el 90% de colágeno es de tipo II, correspondiendo el resto a distintas contribuciones de los tipos de colágeno III, VI, IX, X, XI, XII, XIII y XIV. En el desarrollo del cartílago, la red fibrilar central es un co-polímero reticulado de colágenos II, IX y XI. Las funciones de los colágenos IX y XI son relativamente específicos de cartílago donde interactúan con las fibras de colágeno II, y se consideran de gran importancia ya que mutaciones en los genes que codifican para estas proteínas dan lugar a fenotipos con artrosis (OA) precoz. Se cree que los colágenos XII y XIV están unidos a las superficies de las fibrillas pero no están unidos covalentemente. El colágeno VI se polimeriza en su propio tipo de red filamentosa que tiene múltiples dominios de adhesión para las células y otros componentes de la matriz. El colágeno X se restringe normalmente a la delgada capa de cartílago calcificado que interconecta el cartílago articular con el hueso (8).

- Proteoglicanos: Constituyen el componente no fibrilar o amorfo de la matriz. Consisten en cadenas de polisacáridos (glicosaminoglicanos) tales como queratín-sulfato y condroitín-sulfato, que están unidos covalentemente a una proteína central. Estas cadenas, a su vez, están unidas no covalentemente a un largo filamento de ácido hialurónico para formar grandes agregados de proteoglicanos (Figura 3). Esta arquitectura representa el 75% del volumen total de la matriz y su función principal es la de retener agua, la cual se une a los glicosaminoglicanos cargados negativamente (GAGs) (9).

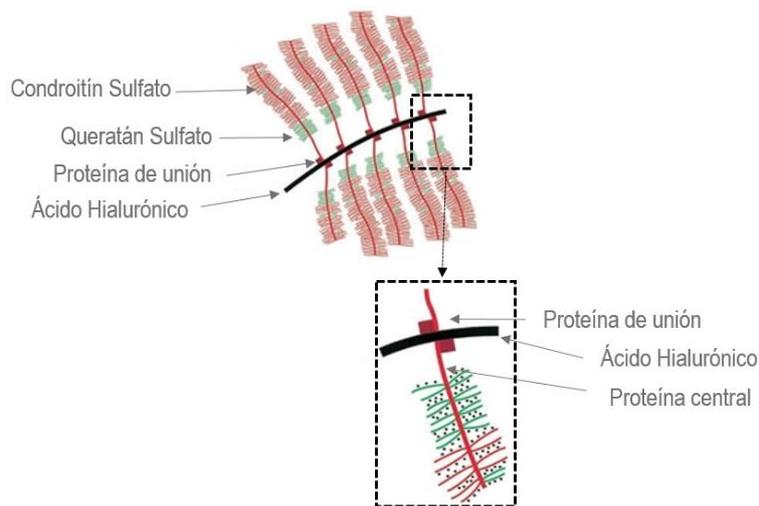


Figura 3. Estructura de una molécula de proteoglicano. Representación esquemática de la organización molecular de una molécula de proteoglicano agregada. Imagen modificada de Jeffrey DR et al, 2003.

El colágeno forma una red fibrosa que engloba a los PG, los cuales se caracterizan por una enorme apetencia hídrica, de forma que tienden continuamente a captar agua y aumentar de volumen. Así, la red de colágeno pretensada hace frente a las presiones que experimentan las superficies articulares. Los ciclos de compresión/descompresión del cartílago articular provocan el flujo hídrico bidireccional entre la MEC del cartílago y la cavidad articular permitiendo el transporte de nutrientes y de productos de desecho.

- Otras proteínas de la MEC: Además de los PG y el colágeno, el cartílago articular posee pequeñas cantidades de otras proteínas en su MEC. La Ancorina es una proteína situada en la superficie de los condrocitos actuando como

mecanorreceptor, transmitiendo fuerzas desde las fibras de colágeno hasta las células (10). La Fibronectina, que en ciertos tejidos participa en procesos de reparación, podría contribuir al mantenimiento de la estructura del cartílago a través de la interacción con la superficie celular y con determinados componentes de la matriz, como el colágeno tipo II y la trombospondina (10). La COMP (en inglés, *cartilage oligomeric matrix protein*), tiene un papel principalmente estructural, (uniéndose a las fibras de colágeno tipo II y estabilizando la red de fibras de colágeno del cartílago articular) (11), e interviene también en la fibrilogénesis de colágeno tipo II. Además, la liberación de COMP al líquido sinovial y a la sangre durante el desarrollo de enfermedades reumatológicas como la OA y la artritis reumatoide (AR), permite utilizarla como biomarcador de estas patologías articulares (12,13).

1.2. Estructura

Desde la superficie hasta el hueso en el que se implanta el cartílago articular, se distinguen cuatro capas (superficial, intermedia, profunda y calcificada) (Figura 4) que difieren en la estructura, la composición, la orientación y el diámetro de las fibras de colágeno, así como en el volumen y en la forma de los condrocitos (1,2).

- Capa superficial: contiene condrocitos pequeños y aplanados, situados de forma paralela a la superficie articular. Posee pocos PG y las fibras de colágeno de esta capa se disponen preferentemente paralelas a la superficie (8). La zona más superficial de esta capa está desprovista de células y las fibras de colágeno, de menor grosor, forman una cubierta proteica compacta y semitransparente (lámina *splendens*) (14) que protege al cartílago de la abrasión a la vez que transmite las fuerzas de compresión desde la superficie hacia los márgenes del cartílago.
- Capa intermedia: Los condrocitos son algo más grandes, esféricos y se encuentran solos o en condrones, distribuidos al azar. Existe una mayor presencia de PG, con menor densidad de fibras de colágeno dispuestas oblicuamente a la superficie, facilitando así el soporte de las fuerzas de compresión.

- Capa profunda: En ella, los condrocitos son más elípticos, formando columnas perpendiculares a la superficie articular. Es rica en proteoglicanos y en unas fibras de colágeno de mayor diámetro que se distribuyen radialmente formando arcos.
- Capa calcificada: se encuentra adyacente al hueso subcondral y contiene cristales de hidroxapatita, que sirven de anclaje entre el cartílago y el hueso. Los condrocitos hipertróficos están diseminados y en menor número. No presenta PG y la concentración de colágeno es menor y dispuesta radialmente. Esta capa actúa como un importante amortiguador entre el cartílago articular no calcificado y el hueso subcondral (15).

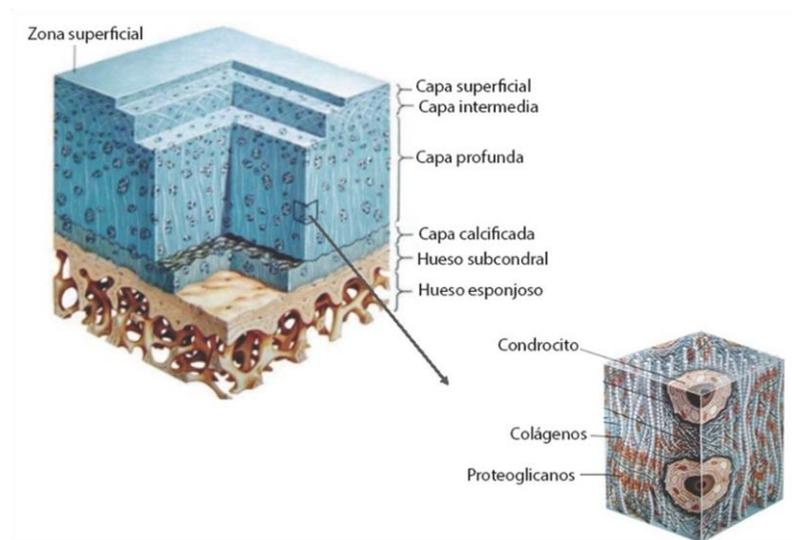


Figura 4. Estructura del cartílago articular hialino, que muestra las capas que lo componen: la capa superficial, la capa intermedia, la capa profunda y la capa calcificada. Imagen modificada de Elsevier.Inc.Netterimagenes.com.

1.3. Mecanismos de destrucción y reparación

La homeostasis del cartílago articular normal en adultos representa un delicado equilibrio entre la degradación y la síntesis de componentes de MEC para mantener la integridad funcional de la articulación (Figura 5). Bajo la influencia del estrés mecánico o de la inflamación de las articulaciones, este equilibrio dinámico se rompe y los mecanismos catabólicos progresivamente se vuelven predominantes, conduciendo a la destrucción del cartílago (16). Son los condrocitos, como único componente celular del

cartílago articular, los que disponen de la maquinaria enzimática necesaria tanto para la biosíntesis como para la degradación de las moléculas que forman la MEC.

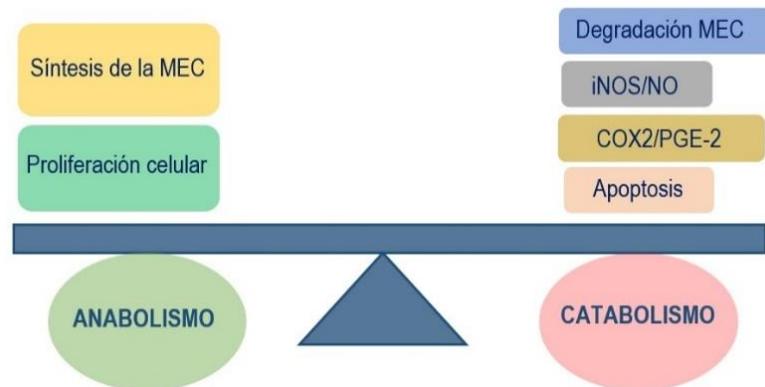


Figura 5. Principales mecanismos biológicos que participan en la homeostasis de la matriz extracelular, es decir, el equilibrio dinámico entre degradación (catabolismo) y síntesis (anabolismo) de los componentes de la matriz, manteniendo así la integridad funcional del cartílago articular.

El programa catabólico es inducido por estímulos pro-inflamatorios y se caracteriza fundamentalmente por la secreción de proteasas, la supresión de la síntesis de la matriz y la reducción del número de condrocitos (17). Las principales metaloproteasas (MMP) implicadas en este proceso son colagenasas (MMP-1, -8 y -13, que degradan fundamentalmente colágeno tipo I, II y III), gelatinasas (MMP-2 y -9, capaces de degradar además fibronectina) y estromelisimas (MMP-3, -10, cuya presencia no se ha descrito en tejido sano y son capaces de degradar prácticamente cualquier componente de la MEC) (18). A la acción de estas proteasas en el proceso catabólico se suma la supresión de la síntesis de la MEC, producto de un déficit relativo del inhibidor tisular de MMPs (TIMP), el aumento de la actividad de plasmina, una mayor producción de óxido nítrico (NO), sobreexpresión de ciclooxigenasa (COX)-2 y/o prostaglandina E (PGE)-2; así como un progresivo aumento de la tasa apoptótica de los condrocitos y una disminución de la autofagia, mecanismo regulador clave de la muerte celular (17,19). Las citoquinas, proteínas de bajo peso molecular que actúan como mediadores solubles de comunicación intracelular, juegan un papel muy importante en la degradación del cartílago ya que son el principal estímulo pro-inflamatorio que induce este mecanismo. Destacan como citoquinas sintetizadas por el condrocito, la interleuquina (IL)-1 β y el

factor de necrosis tumoral α (TNF- α), además de las IL-6, IL-8, IL-15, IL-17 y el interferón γ (IFN- γ) (17,20,21).

Para mantener la homeostasis del cartílago, tal y como referimos anteriormente, es necesario un programa de reparación del tejido, representado fundamentalmente por factores de crecimiento, citoquinas antiinflamatorias e inhibidores de las proteasas, el cual va a estar encargado de favorecer la proliferación celular y la síntesis de MEC (17). Los factores de crecimiento más estudiados son el factor de crecimiento insulínico (IGF)-I (estimula la síntesis de PG y contrarresta la actividad de las citoquinas catabólicas), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y miembros de la familia de las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) y del factor transformador del crecimiento (TGF)- β (induce la expresión de TIMP) (22,23). Las principales citoquinas antiinflamatorias involucradas en este mecanismo son la IL-4, -10, -13 y el antagonista del receptor de IL-1 (IL-R1A), que actúan inhibiendo las proteasas que degradan el cartílago y revierten algunos efectos de las citoquinas catabólicas (24).

Sin embargo, las características histológicas, bioquímicas y biomecánicas del tejido de reparación son diferentes a las del cartílago normal. La reparación de los defectos condrales ocurre de forma temprana después de la lesión del cartílago. El tejido de reparación se caracteriza por el agrupamiento de condrocitos (mitosis y / o migración), así como por una hipertrofia del cartílago, un aumento y mejora de la síntesis de GAG, fibronectina y contenido acuoso del cartílago y de colágeno (tipos II y III pero no de tipo I) por parte de los condrocitos (25).

1.4. Metabolismo

Como se ha mencionado con anterioridad, el cartílago articular es un tejido avascular, aneural y alinfático, con lo que se asume que los condrocitos consumen mucho menos oxígeno molecular (O_2) que otros tejidos vascularizados (26). Los condrocitos consiguen la energía principalmente a través de la glucólisis (vía de Embden Meyerhof), la cual no requiere O_2 (27–29). Aunque los condrocitos pueden sobrevivir muchos días sin O_2 (30), a tensiones bajas de dicho gas (<5%) los niveles de síntesis de MEC y producción energética caen bruscamente (29,30). La tensión de O_2 cae con la distancia a la superficie articular, y el gradiente depende del balance entre la tasa de transporte de este gas a

través del cartílago y el índice de consumo por las células. Los niveles de O_2 disminuyen bruscamente desde la superficie articular hacia las capas más profundas, donde la tensión de O_2 es de ~1%, manteniéndose entre el 1 y 2.5% en la zona media (30).

Tanto los nutrientes como el O_2 , esenciales para el mantenimiento del cartílago, llegan al cartílago a través del líquido sinovial, producido por el tejido sinovial. Este tejido está compuesto por una capa interna o íntima (compuesta por 2 o 3 capas de células sinoviales superpuestas) y una capa profunda o subíntima (compuesta por grasa, fibras y tejido areolar) (31) (Figura 6).

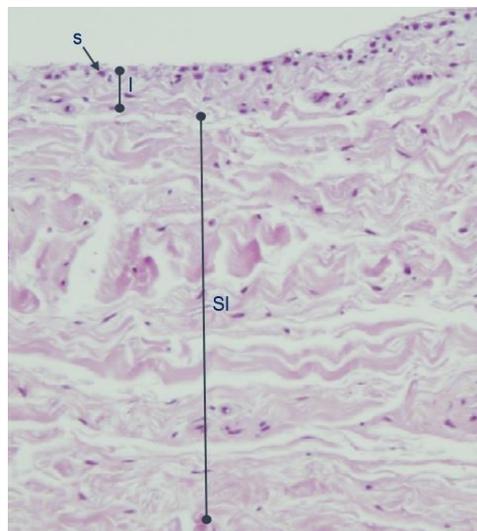


Figura 6. Imagen representativa de un tejido sinovial. Tinción histológica de un tejido sinovial sano teñido con Hematoxilina-Eosina, en la que se puede apreciar la capa intermedia o íntima (I) formada por capa de sinoviocitos (s), y la subíntima (SI). Aumento a 200X.

La capa de células sinoviales que cubre la articulación típicamente es de dos células de grosor y carece de membrana basal. Sus funciones son: prevenir la formación de adhesiones con la superficie articular mediante la formación de vellosidades, producir el líquido sinovial esencial para la lubricación de las superficies articulares, proporcionar los nutrientes necesarios para el metabolismo de los condrocitos, ser parte del sistema inmunitario que responde ante moléculas extrañas y despejar partículas indeseables con un intrincado sistema de capilares y vasos linfáticos (32). El líquido sinovial, un líquido claro y viscoso, es un ultrafiltrado de plasma producido por los fibroblastos en el tejido

sinovial. En las articulaciones humanas normales hay entre 0,2 y 0,3 ml de líquido sinovial, incluyéndose tanto el líquido como los componentes celulares. En condiciones normales, existe un equilibrio entre el líquido sinovial y el suero, aunque la concentración de solutos en el líquido sinovial es diferente a la encontrada en el plasma. Respecto al aporte de O₂ y otros nutrientes al cartílago, no hay dudas de que éstos difunden desde el líquido sinovial, como ha sido demostrado hace tiempo tanto *in vitro* como *in vivo* (33–35).

Los condrocitos están bien adaptados para mantener su función de síntesis con un mínimo aporte de nutrientes y un bajo consumo de O₂, dadas las condiciones del cartílago. Aunque para su actividad, la energía necesaria proviene de la glucólisis anaerobia, estas células contienen mitocondrias y enzimas oxidativas mitocondriales activas (36,37), por lo que el metabolismo aerobio también tiene lugar (38). Así, cuando la vía principal, la anaerobia, queda desbordada, los condrocitos utilizan la vía oxidativa (aerobia), utilizando la MEC adyacente para la combustión. Por tanto, la fosforilación oxidativa (OXPHOS) puede hacer una importante contribución a la generación de adenosín trifosfato (ATP) en este tejido (hasta un 25% del ATP) (39). Las capas superficial y media del cartílago articular no son anóxicas (40), y en este contexto la OXPHOS es 18 veces más eficiente en la generación de ATP que la glucólisis (41). La OXPHOS justifica más de un cuarto de la producción total de ATP en el cartílago, y posiblemente más en situaciones de estrés en las que la demanda energética sea mayor (29). Además, el ATP resultante de la respiración mitocondrial contribuye de forma significativa a la síntesis de colágeno y PG de la MEC del cartílago articular (42,43).

2. ARTROSIS

2.1. Definición

Clásicamente la OA se definía como una enfermedad degenerativa caracterizada por la degradación del cartílago articular y del hueso subcondral ya en estados avanzados (44). Con el tiempo, la OA se empezó a considerar ya una patología que no sólo afecta al cartílago, sino a toda la estructura articular, incluyendo el hueso subcondral, el tejido sinovial, la cápsula articular y los tejidos blandos periarticulares. Así, en la actualidad este trastorno heterogéneo es definido por la *Osteoarthritis Research Society International*

(OARSI) como una enfermedad que puede afectar a cualquier articulación y que está caracterizada por el estrés celular y la degradación de la matriz extracelular que se inicia por micro o macro lesiones en la articulación que el tejido no es capaz de revertir activando las vías de reparación y la respuesta del sistema inmune. La enfermedad se manifiesta primero como un desequilibrio metabólico del tejido articular, seguido por cambios fisiológicos y anatómicos (Figura 7) como son la degradación del cartílago, la remodelación del hueso, la formación de osteofitos, la inflamación de la articulación y la pérdida de la función articular normal (45).

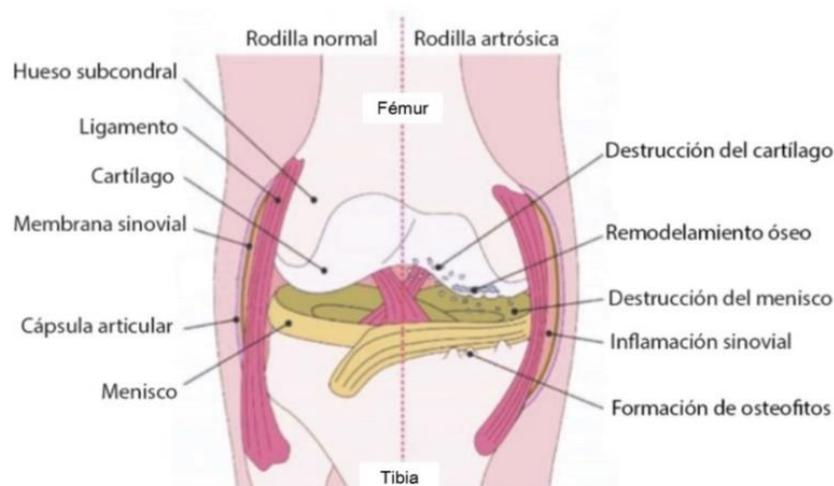


Figura 7. Representación de los principales componentes de la articulación de rodilla y los cambios más importantes que se producen durante la artrosis.

2.2. Fisiopatología

Entendiendo que la OA representa un fracaso de la articulación como órgano, cobra especial importancia la interacción entre el cartílago articular, el hueso subcondral y la membrana sinovial (46,47).

Como se ha dicho anteriormente, en un cartílago articular sano existe un equilibrio entre los mecanismos de degradación y de reparación. Aunque la capacidad de renovación del cartílago es limitada, los condrocitos, como único componente celular de este tejido, son los encargados de mantener este equilibrio entre la biosíntesis y la degradación de las moléculas que forman parte de su MEC. La disfunción de esta homeostasis normal del cartílago es la que se produce en el proceso artrósico, donde los

mecanismos catabólicos de degradación predominan sobre los anabólicos de reparación (48). Esta alteración de la homeostasis produce un aumento del contenido de agua y una disminución del contenido de proteoglicanos de la matriz extracelular, un debilitamiento de la red de colágeno debido a una disminución de la síntesis de colágeno tipo II y una mayor degradación del colágeno preexistente (49), además de un aumento de la apoptosis de los condrocitos. Los cambios degenerativos iniciales en el cartílago articular conducen al ablandamiento del cartílago, a la zona de fibrilación de las capas superficiales, a la fisuración y a la disminución del grosor del cartílago, haciéndose estos cambios más profundos con el tiempo, cuando el cartílago articular se adelgaza hasta la destrucción total (50).

El cambio fundamental que se produce en el hueso subcondral artrósico es la hipomineralización debida, en parte, al aumento del TGF β 1 en los osteoblastos artrósicos (51,52). Este suceso produce una alteración de las propiedades del hueso subcondral que conduce a una pérdida en la capacidad de absorber y disipar la energía, produciendo un aumento de las fuerzas transmitidas a través de la articulación y predisponiendo a la superficie articular a la deformación. Los estudios de resonancia magnética han demostrado que estas lesiones óseas están asociadas con el deterioro del cartílago (53,54).

Entre los cambios histológicos que sufre la membrana sinovial de las articulaciones artrósicas se encuentra la hiperplasia de la capa celular de revestimiento acompañada de la infiltración focal de linfocitos y macrófagos (55). Se cree que la sinovitis es inducida en primer lugar por los productos de degradación proteolítica de la matriz del cartílago ya que producen partículas de degradación así como neo-antígenos solubles específicos de cartílago y otros factores como microcristales y estrés mecánico anormal. Estos componentes, que se liberan al líquido sinovial, son fagocitados por macrófagos sinoviales y perpetúan así la inflamación de la membrana sinovial mediante la síntesis de mediadores que a su vez difunden a través del líquido sinovial hacia el cartílago y crean un círculo vicioso con aumento de la degradación del cartílago y de la inflamación (56). Los pacientes con OA experimentan un engrosamiento de la capa celular sinovial, así como un aumento de la vascularidad e infiltración de células inflamatorias de las membranas sinoviales. Los estudios de los cambios en la sinovial que se producen en

diversas etapas de la OA han encontrado que la cantidad de fibrina depositada en la membrana sinovial y el grado de infiltración de leucocitos están correlacionados con la gravedad de la enfermedad (57).

2.3. Epidemiología e impacto socioeconómico

La prevalencia de la OA difiere según la articulación afectada y según se utilice una definición radiológica o sintomática de la enfermedad. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), cerca del 28% de la población mundial mayor de 60 años presenta OA y el 80% de ésta tiene limitaciones en sus movimientos. Además, el aumento de esperanza de vida y el envejecimiento de la población, según esta organización, convertirá a la OA en la cuarta causa de discapacidad en el año 2020. El último Estudio de Prevalencia de Enfermedades Reumáticas en España (EPISER) auspiciado por la Sociedad Española de Reumatología (SER), concluye que aproximadamente siete millones de individuos mayores de 20 años padecen OA, siendo las articulaciones más susceptibles la rodilla (10,35%), las manos (6,19%) y la cadera (4%) (58).

Para el cálculo de los costes de una enfermedad como la OA, se deben incluir como costes tangibles, (i) los directos: visitas médicas, antiinflamatorios, analgésicos, coste de efectos adversos, gastroprotectores, tratamientos rehabilitadores, etc.; y (ii) los indirectos: incapacidades o alteración de la productividad laboral. A estos costes se suman los costes intangibles (calidad de vida y costes sociales), ya que las enfermedades que más impacto producen sobre la calidad de vida física son las músculo-esqueléticas, siendo la OA de rodilla la segunda después de la AR. El estudio ArtRoCad, realizado por la SER y la Sociedad Española de Medicina General (SEMERGEN), sobre la evaluación de los recursos sanitarios y de la repercusión socioeconómica en la OA de rodilla y cadera, pone de manifiesto que, en promedio, cada paciente realizó una visita al mes al médico general. La mitad de los enfermos consultó con algún especialista del aparato locomotor en los últimos 6 meses. En cuanto al tratamiento farmacológico, el 70% de los enfermos recibía analgésicos y también un 70% antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). El 10% ingería algún fármaco sintomático de acción lenta, y el 5% de los pacientes con OA de rodilla recibía ácido hialurónico intraarticular. Algo más del 60% tomaba algún fármaco gastroprotector. El 12% de los enfermos con OA de rodilla y el 20% de cadera llevaban

una prótesis. En cuanto a la calidad de vida, el 65% se declara insatisfecho en cuanto a su dolor y discapacidad actual, pensando en sus expectativas futuras. Algo más de la tercera parte muestra síntomas de ansiedad (35%), y casi la cuarta parte (23%) depresión (59).

2.4. Factores de riesgo

La OA es considerada una enfermedad multifactorial en la que existen distintos factores de riesgo que normalmente ocurren de forma simultánea. Se han identificado una serie de factores de riesgo específicos que incluyen edad, sexo, origen étnico y raza, genética, obesidad y enfermedad metabólica, densidad ósea y función muscular. Aunque se han identificado varios factores de riesgo para el desarrollo de la OA, muy pocos han sido asociados con su progresión. Se podría esperar que los factores que promueven la aparición de una enfermedad también podrían acelerar su progresión, sin embargo la evidencia de estas relaciones en la mayoría de los casos no está clara (60).

2.4.1. Edad

Con la edad, existe una mayor incidencia y prevalencia tanto de la OA radiográfica como sintomática. La relación entre la edad y el riesgo de OA es probablemente multifactorial, como consecuencia de numerosos factores individuales; estos incluyen daño oxidativo, adelgazamiento del cartílago, debilitamiento muscular y una reducción de la propiocepción. Además, los mecanismos celulares básicos que mantienen la homeostasis tisular disminuyen con el envejecimiento, dando lugar a una respuesta inadecuada al estrés o a la lesión articular y la resultante destrucción y pérdida de tejido articular (61,62).

2.4.2. Sexo

La incidencia de OA de rodilla, cadera y mano es mayor en las mujeres que en los hombres y en las mujeres aumenta drásticamente con la llegada de la menopausia (63). Esto ha llevado a la hipótesis de que los factores hormonales pueden desempeñar un papel en el desarrollo de la OA (64–66). Algunos de los estudios realizados al respecto, han demostrado un efecto protector de los estrógenos o la terapia de reemplazo hormonal en la OA radiográfica de rodilla y cadera (64) o en la progresión al reemplazo

de la articulación (66). Sin embargo otros trabajos no revelaron una asociación clara entre las hormonas sexuales y la OA radiográfica de manos, rodillas o caderas en mujeres (65). Además, también se ha visto que las mujeres presentan un menor grosor de cartílago que los hombres, de forma independiente al peso y a la altura de los individuos, así como al tamaño del hueso (67).

2.4.3. Raza

La raza o procedencia étnica puede relacionarse con la predisposición a padecer OA, ya que se han observado variaciones en los porcentajes de riesgo de la enfermedad en diferentes poblaciones mundiales (68). Tanto la OA radiográfica de cadera como la de mano fueron mucho menos frecuentes entre chinos en el estudio de Beijing que en la raza blanca del estudio de Framingham, sin embargo se encontró una mayor prevalencia de OA de rodilla tanto radiográfica como sintomática en mujeres chinas (69–71). Los resultados del Proyecto de Osteoartritis del Condado de Johnston han demostrado que la prevalencia de OA radiográfica de cadera en mujeres afroamericanas era similar a la de mujeres blancas, pero se encontró una prevalencia ligeramente mayor en hombres afroamericanos que en hombres blancos (72).

2.4.4. Genética

El componente hereditario de la OA se estima en un 40-60%, variando estos porcentajes en función de la articulación afectada. Los avances en el estudio genético de la OA están orientados a la búsqueda de marcadores diagnóstico y pronóstico, que permitan una detección temprana de la enfermedad así como la predicción de su evolución en el tiempo (73–75).

Dentro de los estudios orientados a descubrir los factores genéticos de susceptibilidad a OA, se incluyen los estudios de ligamiento, que evalúan la cosegregación de marcadores genéticos con la enfermedad en familias con múltiples casos de OA. Así, se han realizado diferentes estudios con los que se identificaron diversas regiones de ligamiento en las que se seleccionaron posteriormente genes candidatos más probables para realizar posteriores estudios de asociación caso-control e identificar polimorfismos asociados. Entre estos genes se encuentran: *MATN3*, *IL4-R* y *cluster de IL-1* (76–78). Los

estudios de genes candidatos toman como base de partida los conocimientos sobre la patogenia de la OA y seleccionan genes que por su papel funcional podrían ser relevantes en la susceptibilidad a la enfermedad, es decir, genes que codifican para componentes de la matriz extracelular, para proteínas reguladoras del anabolismo o catabolismo de la MEC y para mediadores inflamatorios. Estos estudios detectaron mayoritariamente asociaciones que no se confirmaron posteriormente en los estudios de asociación del genoma completo (GWAS), como: *PTGS-2*, *DIO-2* o *FRZB* (79–81). Solo uno de los hallazgos de estos estudios, *GDF-5*, ha sido replicado posteriormente alcanzando el umbral de significación requerido en los GWAS ($p= 5 \times 10^{-8}$) (82,83). En el GWAS más potente realizado en OA, el estudio arcOGEN, se utilizó un array que cubre 610.000 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). Gracias a los GWAS y a los metaanálisis de GWAS se han ido descubriendo genes de susceptibilidad a OA, aunque el número de *loci* es relativamente bajo en comparación con otras enfermedades complejas. Los primeros hallazgos sólidos fueron el gen *GDF-5*, el locus 7q22 y *MCF2L* (83–85). Más recientemente se han incorporado los *loci* descubiertos en el estudio arcOGEN (*GNL3*, *GLT8D1*, *ASTN2*, *FILIP1-SEN6*, *KLHDC-5-PTHLH*, *CHST11*, *TP63* y *SUPT3H-CDC5L*) y otros *loci* como *DOT1L*, *NCOA3* y *ALDH1A* (86–89).

Los haplogrupos del ácido desoxirribonucleico mitocondrial (ADNmt), emergen como nuevas variantes genéticas implicadas en la patología artrósica. Estudios recientes demostraron que los individuos portadores del haplogrupo mitocondrial J no sólo tienen un menor riesgo de desarrollar artrosis de rodilla y cadera, sino que los que padecen la enfermedad presentan también un menor daño radiológico. Además, este haplogrupo también se asoció de forma significativa con otros marcadores relacionados con la artrosis, como la disminución de biomarcadores de degradación de cartílago, menor índice de masa corporal (IMC), menor producción de NO, así como una mayor longitud de los telómeros. Por otro lado, los portadores del haplogrupo mitocondrial H presentan niveles más elevados de biomarcadores de degradación del cartílago y tienen una mayor probabilidad de sufrir un reemplazo de la articulación (90,91).

2.4.5. Obesidad

Existen numerosos estudios que establecen una fuerte asociación entre la obesidad y la OA, que afianzan esta condición como uno de los predictores más fuertes del desarrollo de la enfermedad (92–94). En los estudios de esta asociación se establecen varias hipótesis; una de ellas es que el sobrepeso aumentaría la presión sobre una articulación de carga; otra teoría es que la obesidad actúa indirectamente induciendo cambios metabólicos tales como intolerancia a la glucosa, hiperlipidemia o cambios en la densidad ósea; y por último, que determinados elementos de la dieta que favorecen la obesidad producen daño en el cartílago, el hueso y otras estructuras articulares. Por tanto, la aportación de la obesidad en la OA debe considerarse, tanto por factores locales como sistémicos (95).

2.4.6. Densidad mineral ósea

Se ha descrito que individuos con una mayor densidad mineral ósea (DMO) tienen mayor riesgo de padecer OA. Una revisión sistemática y metaanálisis de los factores de riesgo para el inicio de la OA de rodilla, han demostrado que en mujeres adultas existe una fuerte asociación entre el aumento de la DMO y el inicio de OA (96,97). Aunque no se ha identificado una base molecular definida y una fisiopatología común que explique la relación inversa entre la OA y la osteoporosis.

2.4.7. Factores de riesgo mecánicos locales

Una lesión traumática de la articulación es uno de los factores de riesgo más comúnmente asociados al desarrollo de la OA. El daño directo de los tejidos locales por el trauma, la interrupción de la biomecánica normal y la distribución alterada de la carga dentro de la articulación, contribuyen al consiguiente aumento del riesgo de OA. Este riesgo es aún mayor si el individuo tiene también afectada otra articulación. La carga articular repetitiva y excesiva, que acompaña a actividades físicas específicas, aumenta el riesgo de desarrollar OA en las articulaciones involucradas. Los trabajadores cuyos trabajos requirieron esfuerzos repetidos y constantes de la articulación, ven aumentado su riesgo de desarrollar OA (98,99). Los resultados en relación a los efectos de las actividades deportivas son contradictorios. La actividad física puede ser beneficiosa, ya

que fortalece la musculatura periarticular y ayuda a estabilizar la articulación. Sin embargo, actividades físicas o deporte de alta intensidad, en donde las articulaciones se exponen a importantes traumas repetitivos, aumentan el riesgo de sufrir OA (100,101).

2.5. Fenotipos clínicos

Como se ha detallado anteriormente, la OA puede ser iniciada por diversos mecanismos o condiciones, que pueden comenzar en cualquier tejido que forme parte de la articulación y, en última instancia, dar como resultado un punto final común. Una de las estratificaciones más comunes de la OA se realiza en función del mecanismo de inicio, distinguiendo así entre primaria y secundaria (102). La OA secundaria es inducida por traumatismos, enfermedades congénitas o de desarrollo, anomalías metabólicas u otras patologías (102,103). Por el contrario la OA primaria se considera idiopática, aunque es probable que esté relacionada con mecanismos secundarios pero con una mayor causalidad genética y ambiental (103). Los estudios que evalúan las diferencias bioquímicas y genéticas de estos dos grupos de OA son limitados, siendo por tanto muy cuestionada esta estratificación ya que la OA es multifactorial, y en su desarrollo están involucrados tanto factores intrínsecos como extrínsecos (102,104).

La OA ha demostrado ser, por tanto, una patología ampliamente compleja y difícil de estratificar. Recientemente se ha propuesto la división de esta patología en varios subtipos clínicos: post-traumática, relacionada con el envejecimiento, con la genética, y/o con el metabolismo (105). Cada uno de estos fenotipos clínicos puede caracterizarse por la edad en la que se presenta la enfermedad y los agentes causales y por tanto permite hacer una intervención clínica más específica en cada caso. Así, el fenotipo post-traumático (agudo o repetitivo) se asocia a adultos jóvenes menores de 45 años y es causado por estrés mecánico, afectando más típicamente a articulaciones como la rodilla, la mano, el tobillo y el hombro. El fenotipo asociado a la edad, se presenta generalmente en individuos mayores de 65 años, mayoritariamente en rodilla, mano y cadera y está asociado a la senescencia de los condrocitos así como al acúmulo de los productos de la glicosilación avanzada (PGA) característicos del envejecimiento, que estimulan la actividad catalítica de los condrocitos (106,107). El fenotipo metabólico, tal y como se describirá más adelante, se manifiesta por distintas causas entre las que se incluye el

estrés mecánico (asociado al exceso de peso corporal), hiperglucemia, desequilibrio hormonal estrógeno/progesterona y, aunque puede presentarse de una forma más generalizada, predomina la afección en rodilla y mano. En este caso la intervención clínica está dirigida, en función del agente causal, a la pérdida de peso, el control de la glucemia, el control lipídico así como la posibilidad de establecer una terapia hormonal sustitutiva. No hay una edad característica para la aparición de los síntomas de la enfermedad en el caso del fenotipo genético, sino que son, en este caso, los genes relacionados con la patología, como los descritos en el apartado 2.4.4, los potenciales agentes causales.

2.6. Diagnóstico

El *American College of Rheumatology* (ACR) establece los criterios actuales para el diagnóstico de la artrosis de mano, cadera y rodilla. Éstos incluyen manifestaciones clínicas, signos radiológicos y varios parámetros biológicos (108) (Tabla 1).

Tabla 1. Criterios del *American College of Rheumatology* para la clasificación de la artrosis de mano, cadera y rodilla.

MANO	Dolor de mano junto al menos 3 de los siguientes criterios:
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Engrosamiento de estructuras óseas de más de 2 de 10 articulaciones interfalángicas seleccionadas de ambas manos. ▪ Engrosamiento de 2 o más articulaciones interfalángicas distales. ▪ Inflamación en más de 2 articulaciones interfalángicas. ▪ Deformación de al menos 1 de 10 articulaciones seleccionadas de ambas manos.
CADERA	Dolor de cadera junto al menos 2 de los siguientes criterios:
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Velocidad de sedimentación globular <20mm/h. ▪ Radiografía con osteofitos. ▪ Radiografía con estrechamiento del espacio articular.
RODILLA	Dolor de rodilla junto alguno de los siguientes criterios:
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Edad >50 años. ▪ Rigidez matutina inferior a 30 minutos. ▪ Crepitación en la movilización activa de la rodilla. ▪ Engrosamiento de estructuras óseas en la exploración. ▪ No aumento de temperatura cutánea en la rodilla.

La radiología es la técnica más comúnmente utilizada para el diagnóstico de la OA, aunque posee ciertas limitaciones entre las que se encuentran el efecto dañino de la radiación sobre el paciente, su baja sensibilidad en la detección de cambios incipientes y la dificultad de evaluar la progresión de la enfermedad, ya que no es posible visualizar

tejidos blandos como el cartílago. El parámetro utilizado para valorar la destrucción del cartílago es la disminución del espacio articular. Se establecen distintas escalas radiológicas para valorar el daño estructural de la articulación, siendo la más empleada la de Kellgren y Lawrence (K/L), que incluye 5 categorías (Tabla 2) midiendo: la disminución del espacio articular debido a la pérdida de volumen del cartílago, la esclerosis del hueso subcondral y la presencia de osteofitos en los márgenes articulares (109,110).

Tabla 2. Escala radiográfica Kellgren-Lawrence para la clasificación de la artrosis

GRADO	DIAGNÓSTICO	CRITERIOS DE EVALUACIÓN
0	Sano	Ausencia de signos radiológicos
I	Dudoso	Posible presencia de osteofitos Reducción dudosa del espacio articular
II	Leve	Presencia de osteofitos definidos Reducción leve del espacio articular
III	Moderado	Osteofitos definidos de tamaño medio Reducción del espacio articular en más del 50% Esclerosis leve
IV	Severo	Reducción severa del espacio articular Numerosos osteofitos Esclerosis grave

La otra técnica de imagen utilizada para evaluar el grado de enfermedad es la resonancia magnética. Pese a su mayor sensibilidad y especificidad, que permite detectar mínimos cambios en la estructura del cartílago, su uso es menos frecuente que la radiología de forma rutinaria por tratarse de una tecnología más costosa y de mayor dificultad para aplicar en la clínica.

2.7. Tratamiento

Los objetivos principales en el tratamiento de la OA incluyen la educación de los pacientes sobre la enfermedad y su manejo, controlar el dolor, mejorar la función de la articulación y alterar el proceso de la enfermedad y sus consecuencias. Por esto la OA debe ser manejada de forma individualizada incluyendo las opciones de tratamiento tanto farmacológico como no farmacológico, modificándose en función de la respuesta

obtenida, para así poder evitar los casos más severos que derivarán en cirugía, es decir, el reemplazo de la articulación. En función de la severidad de la OA, el manejo debería consistir en tratamiento no farmacológico al comienzo, y establecer posteriormente los tratamientos farmacológicos a nivel individual según el agravamiento, y ya por último los procedimientos quirúrgicos (Figura 8).



Figura 8. Ejemplo de algoritmo para el manejo de pacientes con artrosis, donde destaca la necesidad de incluir la gestión no farmacológica como primera línea para todos los pacientes. Imagen obtenida y adaptada de *Hunter, D.J et al. Osteoarthritis 2006.*

2.7.1. Tratamiento farmacológico

El tratamiento analgésico de la OA consiste fundamentalmente en Paracetamol y AINEs. A pesar de que los AINEs tienen un mayor efecto analgésico, es recomendable probar primero la respuesta al paracetamol, dado que para un número considerable de enfermos la eficacia de éste será suficiente y ofrece ventajas en cuanto a seguridad y relación coste-beneficio (111,112). Otra alternativa en este sentido corre a cargo de los inhibidores selectivos de COX-2 (Celecoxib y Rofecoxib), los cuales son más eficaces que el paracetamol, no mostrando diferencias significativas con los AINEs (113). El uso tópico de los analgésicos, tanto de los AINEs (114) como de la Capsaicina (115), resultan eficaces tanto para reducir el dolor como para mejorar la funcionalidad en pacientes con OA. Los analgésicos opiáceos, como el Tramadol, solos o en combinación con paracetamol y/o AINEs, han demostrado también su eficacia en el tratamiento del brote doloroso de pacientes con OA de rodilla cuando no responden al tratamiento analgésico de base (116).

El tratamiento con fármacos sintomáticos de acción lenta (SYSADOA), como el Sulfato de Glucosamina (SG) y el Condroitín Sulfato (CS), ha resultado eficaz tanto para el control del dolor como para la mejora de la funcionalidad de los pacientes con OA, pudiendo retardar la pérdida del espacio articular femorotibial en la OA de rodilla (117). En el caso del CS además, ha demostrado reducir las necesidades de analgésicos o AINEs.

Otra alternativa farmacológica la ofrece la inyección intra-articular de corticoides o de Ácido Hialurónico. En ambos casos se consigue un alivio sintomático de la OA y, en el caso de los corticoides, parecen ser específicamente eficaces para conseguir un efecto a corto plazo en un brote agudo de la enfermedad.

2.7.2. Tratamiento no farmacológico

La educación del paciente en relación a su patología y al manejo de la misma puede ser muy útil, así como la pérdida de peso en aquellos pacientes obesos. El ejercicio físico es otra de las estrategias no farmacológicas ya que favorece la capacidad aeróbica, la fuerza y la resistencia, facilitando además la pérdida de peso en los pacientes que lo necesitan. Este debe consistir en ejercicios aeróbicos de bajo impacto (caminar, andar en bicicleta, nadar u otro ejercicio acuático), que fortalezcan los músculos de la articulación, disminuyendo el dolor y mejorando la función de la misma. Además, la fisioterapia puede conseguir mejorar los síntomas, así como los déficits funcionales tales como la amplitud de movimiento, fortalecimiento y estiramiento muscular, y la movilización de tejidos blandos (118,119).

2.7.3. Cirugía

La cirugía queda siempre relegada para aquellos casos en los que los síntomas no pueden manejarse por las otras modalidades de tratamiento expuestas anteriormente. Las indicaciones típicas para la cirugía son el dolor debilitante y la limitación importante de funciones tales como caminar y actividades diarias, o disminución de la capacidad de dormir o trabajar. Entre los tratamientos quirúrgicos se incluyen: (i) la artroscopia, que se usa en pacientes con síntomas mecánicos, pero no ha sido demostrado que esta operación reduzca significativamente el dolor en la articulación cuando es comparada con otro tipo de tratamientos (120), (ii) la osteotomía, que puede retrasar el

reemplazamiento de la articulación dañada por una prótesis entre 5 - 10 años. En esta intervención se lleva a cabo el corte de un hueso para acortarlo, alargarlo o cambiar su alineación (121). Y por último (iii) el reemplazamiento de la articulación dañada por una prótesis; este tipo de tratamiento se lleva a cabo en pacientes en los que los síntomas de la enfermedad son muy severos. Además, la enfermedad debe ser limitante para el paciente disminuyendo su calidad de vida e impidiendo que realice determinadas actividades. El objetivo de esta intervención es el reemplazamiento de la articulación total por una prótesis sintética (122).

3. ÁCIDOS GRASOS, LIPOTOXICIDAD Y ENFERMEDAD METABÓLICA

3.1. Química de los ácidos grasos

Los ácidos grasos (AG) son los lípidos más abundantes, ya que son los principales componentes de los lípidos complejos. Son moléculas anfipáticas que están formadas por cadenas hidrocarbonadas de longitudes diversas, en las que uno de los extremos es un grupo metilo y en el extremo opuesto se encuentra un grupo carboxilo, lo cual le confiere polaridad a la molécula. La cadena hidrocarbonada puede contener dobles enlaces (insaturaciones) entre sus átomos de carbono, que le confieren características especiales al AG, como pueden ser la de modificar su punto de fusión y ser precursor de moléculas bioactivas. Cuando el AG no tiene dobles enlaces, se dice que es un AG saturado. La existencia de dobles enlaces en la cadena del AG lo denomina como un AG insaturado, si contienen una doble enlace se trata de un AG monoinsaturado, 2 o más dobles ligaduras se conocen como poliinsaturados (123) (Figura 9). Casi todos los AG se encuentran esterificados y forman parte de los triacilgliceroles (TAG), fosfolípidos, glucolípidos, colesterol esterificado y ceras. Entre sus funciones destaca el participar como componentes de la membrana y formar las bicapas lipídicas; asimismo, algunos forman parte de la generación de cascadas de señalización citosólicas, los TAG funcionan como almacén de energía en el tejido adiposo, las ceras se comportan como lípidos protectores, mientras que el colesterol esterificado interviene activamente en el transporte de colesterol; sólo una parte pequeña se encuentran en forma libre o unidos a la albúmina para ser transportados.

Las propiedades físicas, fisicoquímicas y biológicas de los AG dependen de la longitud de la cadena hidrocarbonada y del número, posición y configuración de los dobles enlaces (Figura 9). En los AG saturados, los enlaces sencillos permiten la rotación libre, con la formación de cristales, presentan un mayor punto de ebullición, un mayor punto de fusión y tienden a formar sólidos a temperatura ambiente; en cambio, los dobles enlaces impiden la rotación en 3 dimensiones, con formación de semisólidos, menor punto de fusión y de ebullición.

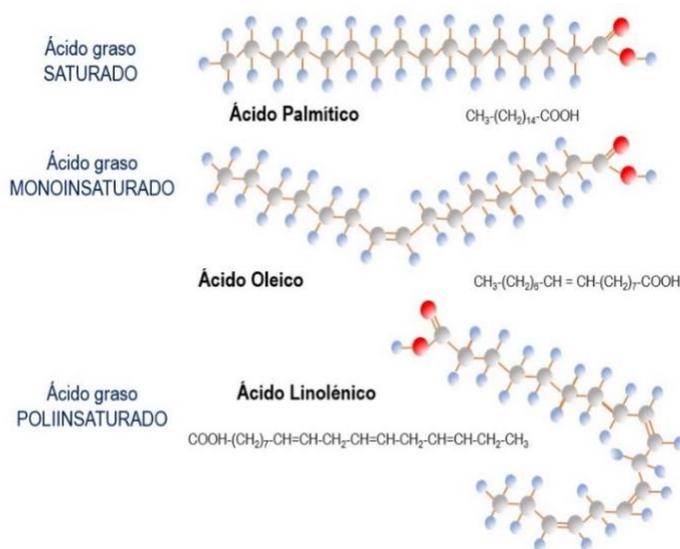


Figura 9. Representación de la estructura de los tipos de ácidos grasos en función de presencia o no de dobles enlaces: saturados, monoinsaturados y poliinsaturados.

3.2. Mecanismo y regulación de la lipólisis

El adipocito, como componente del tejido adiposo del organismo, es una célula altamente especializada y adaptada para almacenar grandes cantidades de AG en forma de TAG y liberarlos cuando son necesarios en un proceso denominado lipólisis. Durante este proceso, los TAG son hidrolizados a diacilgliceroles más 1 AG, monoacilgliceroles más 2 AG, o bien para formar 3 moles de AG y 1 mol de glicerol. El paso limitante de la lipólisis está controlado por la lipasa sensible a hormonas (LSH), la cual es llamada así debido a su respuesta a estímulos hormonales que aumentan el adenosinmonofosfato cíclico (AMPC) intracelular (como el glucagón y las catecolaminas) y sujeta a una regulación muy fina a través de fosforilación reversible (124) . Para los AG de cadena corta (hasta de 12

carbonos) involucra el paso directo a través de la membrana plasmática del adipocito; en el caso de los AG de cadena larga, éstos requieren de un transportador específico que se encuentra en la membrana plasmática y permite el transporte hacia el espacio extracelular. Posteriormente, cuando éstos abandonan el adipocito se unen a proteínas para ser transportados al espacio intersticial y a la circulación (ya que los AG son insolubles en agua). Varias proteínas funcionan como transportadoras de AG, quizá la más importante, por su abundancia, es la albúmina (124). Una vez que los AG están unidos a la albúmina, estos son captados por los tejidos, ya sea por difusión o mediado por transportador. Se han descrito transportadores como la proteína CD36, la proteína transportadora de AG (FATP, *fatty acid transport protein*) y la proteína fijadora de AG de la membrana plasmática (pmFABP, *plasmatic membrane fatty acid binding protein*). Una vez captados, los AG pueden entrar a distintas vías, tales como la síntesis de TAG, esterificación para formar lípidos complejos, entrar al ciclo de la β -oxidación, la acilación de proteínas o la transducción de señales (125).

La regulación de la lipólisis es esencial para asegurar el aporte adecuado de AG a los tejidos. Varias hormonas, factores paracrinos y extra-hormonales participan en la regulación de la lipólisis. Las catecolaminas, ya sea por circulación sistémica (adrenalina) o por inervación simpática (noradrenalina), ejercen sus efectos a través de receptores β -adrenérgicos, induciendo la activación de la proteína G estimuladora. Otras hormonas como las estimulantes del tiroides, el glucagón y la colecistoquinina participan en este proceso. Por otro lado, está la insulina, así como los factores de crecimiento tipo insulina, las prostaglandinas E1 y E2, cuyo papel va a ser inhibitorio sobre la lipólisis. La que tiene la acción más potente en este sentido es la Insulina, cuya acción es especialmente importante a nivel de los adipocitos, favoreciendo la captación de glucosa e inhibiendo la lipólisis mediante la activación de la fosfodiesterasa tipo 3, que da lugar a la hidrólisis del AMPc (124,126).

3.3. Lipotoxicidad

El término lipotoxicidad hace referencia a los efectos deletéreos del exceso de los AG, y la acumulación de la grasa ectópica que provocan muerte celular o disfunción orgánica. En la obesidad, el consumo excesivo de alimentos ricos en hidratos de carbono,

combinado con el aumento de la liberación excesiva de AG por parte del tejido adiposo, sobrepasa el límite de almacenamiento y la capacidad de oxidación en tejidos periféricos, como músculo esquelético, hígado y células β -pancreáticas. Los AG son redirigidos a vías metabólicas dañinas no oxidativas, con acumulación intracelular de metabolitos tóxicos, como las especies reactivas de oxígeno (ROS) (127). Al existir una gran cantidad de AG disponibles, y si los requerimientos celulares no precisan de ellos, entonces se produce una β -oxidación compensatoria, para mantener el equilibrio dentro de la célula. Al final cuando la oxidación compensatoria de los AG falla, éstos entran a vías metabólicas alternativas para ser degradados o incorporados a otras moléculas, una de ellas es la formación de TAG, aunque subsecuentemente la hidrólisis generaría nuevos sustratos para las vías alternativas. En células pancreáticas, en hepatocitos y en músculo cardíaco y esquelético se han propuesto mecanismos tales como la vía de las ceramidas (128), la vía lisosomal (129), el estrés oxidativo(129) o el estrés del retículo endoplásmico (130), que desencadenarían el fenómeno de la lipotoxicidad, conduciendo en cada caso a la apoptosis inducida por AG o lipoapoptosis.

Las respuestas al exceso de AG, encaminadas a contener el estrés metabólico, son distintas en cada tipo celular. Las células β del páncreas responden de forma bifásica produciéndose en una primera fase una proliferación de células β y un aumento de la secreción de insulina, suficiente para mantener los niveles normales de glucosa. En una segunda fase, estas células desarrollan alteraciones mitocondriales graves con daño en el ácido desoxirribonucleico (ADN) que exceden los mecanismos de reparación iniciales conduciendo así a la apoptosis y al declive en la producción de insulina (128). En el corazón, los mecanismos son similares a los descritos, con la pérdida de la contractilidad miocárdica secundaria a la disminución de la población de los cardiomiocitos y deposición de tejido fibroso entre las células. En el fenómeno de la lipotoxicidad cardiaca se encuentra sobreexpresada la acilcoenzima A sintasa, que causa un aumento en la cantidad de TAG y ceramida, resultando en cardiomiopatía lipídica (131). En el hígado, se produce en primer lugar la esteatosis hepática, cuando la sobrecarga lipídica aumenta y los mecanismos compensatorios se sobrepasan, se produce apoptosis de los hepatocitos, inflamación y el desarrollo de esteatohepatitis no alcohólica. La inflamación crónica lleva

a la degeneración de fibrosis hepática con un mayor riesgo de carcinoma hepatocelular (132).

3.4. Niveles plasmáticos de ácidos grasos y Enfermedad Metabólica

Se ha establecido en los últimos años una estrecha relación entre los niveles elevados de ácidos grasos libres (AGL) en plasma con varias de las condiciones que definen el síndrome metabólico (SM), fuertemente relacionadas entre sí por causas metabólicas subyacentes que tienen como característica la resistencia a la insulina en los tejidos.

Los niveles plasmáticos de AGL suelen estar elevados en condiciones de obesidad debido a que el tejido adiposo aumenta y libera más AGL, a que el aclaramiento normal de los mismos puede verse reducido, además de que su elevación inhibe la acción antilipolítica de la insulina, lo que agrava aún más la velocidad de liberación de AGL a la circulación (133). Se ha visto en estudios en distintos tejidos que esta elevación de los AGL incrementa la resistencia a insulina. En el músculo esquelético, la elevación aguda en plasma de AGL reduce la absorción de glucosa estimulada por la insulina de una forma dosis-dependiente e independiente del sexo y la edad, desarrollándose la resistencia a insulina de 2-4 horas (h) tras el incremento de los niveles plasmáticos de AGL (134,135). A nivel hepático, aunque estos efectos son menos llamativos por ser este órgano más sensible a la insulina, existe evidencia de que las elevaciones fisiológicas de AGL, como las observadas tras una ingesta de alimento rico en grasa, produce un aumento de los niveles de glucosa hepática de forma aguda por supresión de la inhibición de la glucogenolisis y de forma más crónica probablemente por el aumento además de la gluconeogénesis (136,137). La normalización de los niveles de AGL durante sólo 12 h, normaliza la captación de glucosa estimulada por insulina en obesos no diabéticos y mejora un 25-50% la sensibilidad a insulina en el caso de los obesos diabéticos (138). Esto se apoya con el hecho de que en sujetos pre-diabéticos, con predisposición genética a desarrollar diabetes mellitus (DM)-2, la posible compensación de la resistencia a insulina por aumento de la secreción de insulina (observada en obesos sanos) falla, produciéndose el desarrollo de DM-2 como consecuencia de la resistencia a insulina inducida por los AGL, (139).

La hipertensión, otro factor en la definición del SM, se asocia con niveles elevados de AGL ya que se ha descrito que la resistencia a insulina mediada por AGL reduce, a nivel endotelial, la producción de NO por activación de la NAPH oxidasa, lo que va a generar el aumento de ROS. Esta disminución de NO endotelial, disminuye la vasodilatación favoreciendo el desarrollo de la hipertensión (140).

El incremento agudo de los niveles de AGL plasmáticos además de producir resistencia a la insulina periférica y hepática, también activa la vía NFκB proinflamatoria, aumentando la expresión de varias citoquinas proinflamatorias como el TNF-α, la IL1-β o la IL6, así como la *Monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1), importante por su función reguladora del reclutamiento de los macrófagos a los sitios de inflamación. Esto fortalece la idea de que los AGL son un vínculo primario entre la obesidad o la alimentación rica en grasa y el desarrollo de cambios inflamatorios (141–143).

Los niveles de AGL combinados con hiperinsulinemia, aumentan además las actividades de ciertas MMPs (enzimas con actividad proteolítica sobre proteínas estructurales del tejido conectivo como el colágeno, proteoglicanos y elastina) en la aorta. Esto, en combinación con el aumento de las citoquinas pro-inflamatorias, conocidas además también por su papel inductor en la síntesis y liberación de MMPs, se piensa que puede contribuir al aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular en individuos obesos resistentes a la insulina.

Los AGL más abundantes presentes en la dieta y en el suero son el ácido palmítico (PA), como AGL saturado de cadena larga, y el ácido oleico (OL) como AGL monoinsaturado de la serie omega-9 (144). Se ha comprobado que los efectos de los AGL anteriormente descritos en este apartado difieren según el tipo de AGL. Así, se ha descrito que los AG saturados como el PA tienen efectos altamente lipotóxicos, produciendo apoptosis en distintos tipos celulares como células β del páncreas (145), cardiomiocitos (146), células endoteliales (147) y hepatocitos (148). Estos efectos también han sido estudiados en el caso de AG monoinsaturados como el OL, observando en la mayoría de los casos cómo este AG revertía los efectos lipotóxicos producidos por el PA (149–151). Los mecanismos por los cuales existen estos efectos tan diferentes de los dos tipos de AG en los tejidos, es algo que se está estudiando intensamente en los últimos años. Uno de estos mecanismos observados en varios tipos celulares se basa en

el hecho de que en el caso del OL se promueve la formación de triglicéridos (TG) formando gotas lipídicas (en inglés, *lipid droplets*, LD) y desviando al AG de las vías conducentes a la muerte celular. El PA, en ausencia de señales adicionales, se incorpora débilmente al *pool* de TG celulares (152,153).

4. ENFERMEDADES METABÓLICAS Y ARTROSIS

El fenotipo metabólico de la OA, como se ha descrito anteriormente, es característico de individuos de mediana edad y está asociado al estrés mecánico debido a la obesidad, así como a otros desórdenes metabólicos que implican cambios moleculares que pueden llevar a la degeneración del cartílago articular directa o indirectamente.

El factor de riesgo más conocido en este sentido y altamente relacionado con la OA, es la obesidad, generalmente definida con un IMC mayor de 30 kg/m² (154–160). El efecto de sobrecarga en el cartílago articular podría, en parte, explicar el mayor riesgo de OA en personas con sobrepeso. Se ha comprobado en varios estudios que esta sobrecarga sobre la articulación inhibe la síntesis de la matriz del cartílago e induce la expresión de factores pro-inflamatorios (COX-2, NO, IL-1 β y PGE2) (161,162) y enzimas degradativas como MMP3, MMP13 y la agregasa ADAMTS-5 (163,164) en los condrocitos. En este sentido, la carga mecánica sobre la articulación afecta también al hueso subcondral, estimulando la producción de IL-6, PGE2 y MMPs en osteoblastos, a través de las mismas vías de señalización celular detectadas en condrocitos (165–167).

Si se establecen dos fenotipos distintos del IMC en función de la coexistencia de patología metabólica, podemos hablar de individuos obesos pero metabólicamente sanos, es decir, no asociado con factores de riesgo metabólicos tradicionales como hipertensión, resistencia a la insulina y la dislipidemia; e individuos sin obesidad pero asociado con un alto riesgo de enfermedad metabólica. Y se ha visto que existe una asociación muy estrecha entre la OA y el fenotipo metabólicamente anormal aunque sin obesidad, no encontrándose asociación en el caso del fenotipo obeso metabólicamente sano, lo que sugiere que el riesgo de OA puede ser más heterogéneo que el estimado solo con el IMC (168). De hecho, se ha observado una asociación positiva entre la

obesidad y la OA en las articulaciones no portadoras de peso, como las de las manos y no sólo en articulaciones portadoras de la sobrecarga mecánica, como la rodilla (169).

Los avances en la fisiología del tejido adiposo proporcionan información adicional sobre la relación entre la obesidad y la OA (170). Esto sugiere que el daño articular podría estar causado no sólo por factores locales asociados al estrés mecánico, sino también a factores sistémicos, relacionados en este caso con el tejido adiposo, que podrían proporcionar un vínculo metabólico entre obesidad y OA. Se han propuesto algunos posibles vínculos entre el sobrepeso y la OA, como la alteración metabólica, la aterosclerosis y la DM. Los tejidos grasos segregan adipoquinas pro y anti-inflamatorias, como la leptina, cuya concentración en el cartílago artrósico avanzado está significativamente correlacionada con el IMC de los pacientes, mostrando además un patrón de expresión relacionado con el grado de destrucción del cartílago. La aterosclerosis asociada a la obesidad también puede acelerar el proceso de OA por patología vascular en el hueso subcondral (171,172).

Además de la obesidad, otras alteraciones metabólicas tales como la resistencia a insulina, dislipidemia aterogénica e hipertensión, que forman parte del llamado SM (173,174), se relacionan también en conjunto o de forma independiente con la prevalencia de OA (175–178). Algunos estudios han encontrado que las personas con SM desarrollan OA a una edad más temprana y tienen más patología general, aumento de la inflamación y aumento del dolor en las articulaciones, en comparación con los pacientes con OA en ausencia de SM (179,180).

En el caso de la hipertensión, existen varios trabajos que establecen una relación entre la presencia de esta condición con la OA (179–182). Los posibles mecanismos por los que se establece la relación entre estas dos patologías se centran en un punto común, la isquemia subcondral (183–185), que podría comprometer, por un lado, el intercambio de nutrientes y gases entre el cartílago articular y el hueso; y por otro lado la supervivencia de los osteocitos en las regiones isquémicas del hueso subcondral, que desencadenaría la resorción osteoclástica disminuyendo el soporte óseo del cartílago adyacente (186,187).

La asociación entre la dislipidemia y el riesgo de OA se observó en varios estudios epidemiológicos en los que se constató el nivel elevado de colesterol sérico como factor

de riesgo de OA, de forma independiente a la presencia o ausencia de obesidad (188,189). Aunque los mecanismos por los que se establece esta relación no se conocen de forma precisa, existen varias teorías que fortalecen la importancia del metabolismo lipídico en el proceso artrósico. La expresión de *Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1* (LOX-1) tanto en zonas que soportan peso como en las que no, de cartílagos artrósicos, y su ausencia en cartílagos sanos (190), indica que los condrocitos son capaces de internalizar las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (ox-LDL), lo que sugiere que puedan tener un importante papel en la degradación del cartílago ya que se asocian con un aumento de la producción de ROS (191) y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias como MCP-1 en condrocitos humanos (192). Los niveles de Apolipoproteína A1, proteína transportadora de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), se encuentran más elevados en el líquido sinovial de pacientes artrósicos. Además, la influencia del metabolismo lipídico en la patología artrósica se apoya con estudios en los que se ha demostrado una mayor presencia de AG y ácido araquidónico en el cartílago de pacientes artrósicos en relación al cartílago de sujetos sin patología artrósica (193,194). Por lo tanto, las reservas sustanciales de depósitos de lípidos en el cartílago artrósico, especialmente en los condrocitos, en las primeras etapas de la enfermedad antes de que se hagan evidentes los cambios histológicos (195), indican que la deposición lipídica en la articulación podría desencadenar el proceso fisiopatológico de la OA.

Otra de los puntos que definen el SM es la resistencia a insulina, valorada, dependiendo de los criterios utilizados para definir el SM, por los niveles séricos basales de glucosa, niveles séricos de insulina, test de intolerancia a la glucosa o directamente por el diagnóstico de DM. La relación de esta patología con la OA ha sido muy estudiada tanto *in vivo* como *in vitro*, ligando ambas patologías por las toxicidades (locales o sistémicas) relevantes en la OA, debidas a los elevados niveles de glucosa circulante. La hiperglucemia disminuye el transporte del dehidroascorbato en condrocitos, comprometiendo la síntesis del colágeno tipo II, los niveles crecientes de ROS y mediadores inflamatorios que favorecen la destrucción del cartílago. Otro de los factores importantes relacionados con esta situación de hiperglucemia sostenida es el acúmulo de PGA (196–198), que unidos a su receptor (RAGE) en la membrana de los condrocitos, desencadena la sobreexpresión de mediadores pro-inflamatorios y pro-catabólicos del

cartílago articular. Sin embargo, la relación de la hiperglucemia con la OA no sólo se establece por los daños directos sobre el cartílago, sino que pueden afectar al resto de tejidos que forman la articulación, que como hemos dicho anteriormente, también están involucrados en el proceso artrósico. Así, en un modelo de ratón con diabetes inducida, una peor curación de una fractura ósea se relacionó con la resorción prematura del cartílago en el callo óseo y esto era debido a los elevados niveles de TNF- α en los ratones con DM (199,200). Por otro lado, se sabe que las anomalías, tanto bioquímicas como histológicas, en tendones y ligamentos pueden promover la aparición de OA (201), y este tipo de anomalías se han visto también en modelos animales de DM, escenario que a su vez condiciona la recuperación normal de estos tejidos tras una lesión (202–205). Los cambios inflamatorios tempranos de la membrana sinovial es otro de los factores que pueden contribuir de forma importante en la OA (206), ya que el daño causado en este tejido puede mediar la producción a largo plazo de mediadores catabólicos. En DM se ha visto, también en modelo animal, que la membrana sinovial es anormal, conteniendo tejido fibrótico con un mayor contenido en colágeno tipo I y menor contenido de colágeno tipo III y V (207).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



La OA es una enfermedad crónica y multifactorial caracterizada por la pérdida gradual del cartílago articular. Es considerada la artropatía más prevalente en la población con un fuerte impacto socioeconómico, que hacen que la OA se empiece a considerar desde hace unos años como un problema importante de salud pública.

Los nuevos descubrimientos sobre la fisiopatología de la OA incitan a la división de la enfermedad en distintos fenotipos clínicos y estructurales, cuya definición permite el tratamiento específico. El subtipo de origen metabólico se caracteriza por la presencia de obesidad, inflamación sistémica de bajo grado, así como un comienzo temprano y una progresión más severa. Los mecanismos moleculares de la OA de origen metabólico todavía son bastante desconocidos. En aquellas articulaciones que soportan peso corporal y sobrecarga por determinadas actividades, los mecanismos biomecánicos juegan un papel importante. Pero en los últimos años varios estudios epidemiológicos han revelado una asociación clara entre obesidad y artrosis de manos y en este caso no puede explicarse por la sobrecarga en la articulación. Por otro lado existen numerosas publicaciones que relacionan la OA con el SM, observándose un mayor riesgo de OA de rodilla en pacientes obesos con SM que en aquellos pacientes que siendo obesos no tienen SM. Con esto se sugiere que existen factores sistémicos relacionados con desórdenes metabólicos que están envueltos en este subgrupo de OA.

En este sentido los AG tienen especial interés ya que sus niveles circulantes están aumentados en obesidad así como en otras enfermedades crónicas relacionadas con el SM. Los AG más abundantes presentes en la dieta y en el suero son el PA, como AG saturado de cadena larga, y el OL como AG monoinsaturado. Diversos estudios que analizan los efectos de estos AG en distintos tejidos periféricos revelan efectos distintos según el tipo de AG, asociando la exposición a niveles elevados de PA con inflamación, resistencia a insulina y apoptosis, revirtiéndose cuando la exposición está asociada al OL.

Debido a la fuerte asociación existente entre la OA y las enfermedades metabólicas en las que se detectan niveles elevados de AGL, en esta tesis se plantean los siguientes objetivos:

OBJETIVO 1: Estudiar el efecto de los ácidos grasos palmítico y oleico en el proceso artrósico:

- Análisis de la expresión de genes implicados en la patología artrósica.
- Estudio de la muerte celular mediada por ácidos grasos.
- Evaluación de los efectos de los ácidos grasos sobre el estrés oxidativo.

OBJETIVO 2: Estudiar el efecto de los ácidos grasos palmítico y oleico sobre el metabolismo celular del condrocito:

- Análisis de la función mitocondrial.
- Análisis de la función glucolítica.
- Evaluación del balance energético celular.
- Evaluación de la formación de acúmulos lipídicos o *lipid droplets* (LD) y contenido en triglicéridos.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. Cultivo Celular

Los estudios se hicieron en la línea celular de condrocitos T/C-28a2, cedida a nuestro laboratorio por la Dra. Mary Goldring (HSS Reseach Institute, USA). Esta línea celular fue establecida mediante transfección de cultivos primarios (día 5) de condrocitos obtenidos a partir de cartílago costal de una mujer de 15 años, con un vector retroviral que expresa el antígeno *viral SV4 large T* (1). Estas células se incubaron en medio de cultivo *Dubelcco's modified Eagle's Medium* (DMEM, Thermo Fisher scientific, USA) suplementado al 10% con suero bovino fetal (SBF; Gibco, España) y 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco life technologies, España), a 37°C, 5% CO₂ y humedad a saturación. Una vez obtenida una confluencia aproximada del 75%, se sub-cultivaron en número y superficie adecuadas para cada uno de los experimentos para su posterior estímulo con los medios de cultivo enriquecidos en AG.

1.1. Preparación de las soluciones de ácidos grasos

En primer lugar se disolvieron el PA (Sigma Aldrich, USA) y el OL (Sigma Aldrich, USA) en etanol a 200mM y 700mM, respectivamente. A partir de estas soluciones se prepararon las soluciones madre de PA, OL, y Palmítico/Oleico en proporción molar 1:2 (PA/OL) a 5mM, acoplado los AG con Albúmina Bovina Sérica libre de AG (ABS) (Sigma Aldrich, USA) al 10%, atemperada a 37°C. Para asegurar la completa disolución se incubaron estas disoluciones a 55°C durante 30 minutos (min) (209). Los medios a las concentraciones de 0.4mM, 0.7mM y 1mM se prepararon tras la correspondiente dilución de la solución madre (5mM) en cada caso, en DMEM sin suplementar con SBF, previamente atemperado. Como condición basal (BSA), se utilizó el DMEM sin suplementar con SBF al que se añadió el porcentaje de ABS correspondiente a la concentración de ácido graso en cada caso.

2. Ensayo de Viabilidad

El ensayo de viabilidad se realizó utilizando el kit *CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega, USA) el cual permite realizar una medida colorimétrica del número de células viables en proliferación. Está basado en la capacidad de las células viables en reducir el compuesto tetrazólico, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS), junto con un reactivo de acoplamiento de electrones, fenazina metosulfato (PMS), en un producto denominado formazán, soluble en el medio de cultivo y cuya absorbancia (Abs) a 490 nanómetros (nm) puede ser medida por espectrofotometría. La conversión de MTS en formazán es llevada a cabo por las enzimas deshidrogenasas que se encuentran en las células metabólicamente activas. Es por tanto, la lectura del formazán a 490 nm, la que va a indicar la medida proporcional del número de células viables en cultivo.

Para realizar el ensayo con este kit, se sembraron 10^4 células por pocillo en una placa de 96 pocillos (MW96; Corning, USA) en DMEM suplementado al 10% con SBF y se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y humedad a saturación. Pasadas 24 h se cambió el medio de cultivo por otro con las distintas concentraciones (BSA, 0.4mM, 0.7mM y 1mM) de PA, OL y PA/OL, concentraciones escogidas teniendo en cuenta los niveles normales de AGL en plasma/suero (0.3-0.6 mM) reflejados en la literatura (210,211). Tras 12 h de incubación, se realizó el ensayo de viabilidad siguiendo las indicaciones del fabricante. Se pipetearon 20 µl de la mezcla de MTS/PMS en cada pocillo por cada 100 µl de medio de cultivo en dicho pocillo. Tras 4 h de incubación, se procedió a la lectura de la Abs a 490 nm en el lector de placas *Infinite® 200 NanoQuant* (Tecan, Suíza).

Para poder establecer la relación entre el valor de la Abs y el número de células viables, se hizo una recta de calibrado sembrando en la misma placa de cultivo distinta cantidad de células (0, 2×10^3 , 5×10^3 , 8×10^3 , 10×10^3 , 12×10^3 , 15×10^3 y 20×10^3) las cuales se mantuvieron en DMEM suplementado al 10% SBF durante el tiempo de ensayo.

Cada condición, así como la medida en cada caso, se realizó por triplicado, incluida la recta de calibrado. Los resultados se expresaron en porcentaje de viabilidad relativa a la condición basal (BSA) \pm desviación estándar (DE).

3. Análisis de la expresión génica

Para poner de manifiesto los efectos de los diferentes AG estudiados sobre la línea celular de condrocitos, se analizó la expresión de aquellos genes relacionados con su metabolismo, la degradación de la MEC, el proceso inflamatorio y la detoxificación celular.

Se sembraron las células en placas de 6 pocillos (MW6; Corning, USA), 5×10^4 células/pocillo, en DMEM suplementado al 10% SBF y se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y humedad a saturación. A las 24 h se cambió el medio a DMEM sin suplementar, BSA y 0.7mM de PA, OL o PA/OL, y se incubaron durante 12 h.

3.1. Extracción de ácido ribonucleico (ARN) celular

Para llevar a cabo la obtención del ARN celular se utilizó el reactivo *TRIzol® Reagent* (Thermo Fisher Scientific, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este reactivo es una solución monofásica de fenol e isocianato de guanidina que provoca la lisis celular mientras protege la integridad del ARN. Cuando se añade cloroformo al lisado celular se provoca la separación de una fase acuosa, en la que se encuentra el ARN, de una fase orgánica. La fase acuosa se recupera y se provoca la precipitación del ARN mediante una incubación con isopropanol. Por último, el precipitado de ARN se lava con etanol al 75% y se deja secar para resuspenderlo posteriormente en agua libre de ARNasa.

Una vez obtenido el ARN se cuantificó por espectrofotometría en el Nanodrop ND 1000 (Thermo Fisher scientific, USA) a 260 nm. La pureza del ARN se determinó a partir del ratio entre la Abs a 260 nm y 280 nm ($A_{260/280}$), que debe de ser próximo a 2. Ratios menores son indicativos de contaminación del ARN con proteínas, compuestos fenólicos u otros contaminantes que absorben a 280 nm. Un segundo indicador de pureza del ARN lo constituye el ratio $A_{260/230}$, que debe de ser ligeramente superior al anterior (2.0-2.2), considerándose los ratios por debajo de estos valores indicativos de contaminación por compuestos que absorben a 230 nm, típicamente fenoles u otros compuestos orgánicos provenientes de la extracción.

Tras la obtención del ARN con los ratios de pureza adecuados, se procedió a la eliminación de la posible contaminación por ADN tratándolo con ADNasa I libre de ARNasa (Thermo Fisher Scientific, USA). La ADNasa I es una endonucleasa no específica que degrada el ADN mono y bicatenario y la cromatina. Hidroliza los enlaces de fosfodiéster, lo que produce mono y oligonucleótidos con un grupo 5'-fosfato y 3'-hidroxilo. Así, se incubó a 37°C durante 15 min, 1 µg de ARN con 2U de ADNasa I en el tampón de reacción (20mM Tris-HCL pH 8.4, 2mM MgCl₂, 50mM KCl), completando la reacción con agua libre de ARNasas hasta un volumen final de 10µl. Finalmente, para detener la reacción se incubó la mezcla durante 10 min a 65°C con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2.5mM pH 8.

3.2. Retrotranscripción de ARN mensajero (ARNm) a ADN complementario (ADNc)

La síntesis y amplificación de ADNc a partir de las muestras de ARN se realizó utilizando el kit *SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis* (Thermo Fisher Scientific, USA), cuya mezcla de enzimas 10X SuperScript® incluye: RT SuperScript® III (versión diseñada de RT M-MLV con una reducción de la actividad de ARNasa H y un aumento de la estabilidad térmica, que permite su uso en un intervalo de temperatura de 42 a 60°C), el inhibidor de ribonucleasa recombinante RNaseOUT™ (ofrece protección contra la degradación del ARN objetivo debido a la contaminación de la ribonucleasa), y un tampón optimizado 5X VILO™ (que incluye cebadores aleatorios, MgCl₂ y dNTP en una formulación tamponada).

Siguiendo las recomendaciones del fabricante se hizo la mezcla de *5X Vilo™ Reaction Mix*, *10X SuperScript® Enzyme mix*, el volumen correspondiente a 1 µg de ARN, completando la mezcla hasta un volumen final de 20 µl con agua libre de ARNasas. Esta mezcla se sometió a 25°C 10 min, 42°C 60 min y 85°C 5 min. La muestra de ADNc obtenida fue diluida en una proporción 1/10 con agua libre de ARNasas y posteriormente congelada a -20°C hasta su uso para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real.

3.3. PCR a tiempo real

Para el estudio de la expresión génica se realizó la PCR a tiempo real a partir del ADNc obtenido de cada muestra. Esta técnica combina la amplificación y la detección en un

mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. La reacción se llevó a cabo con sondas *Taqman*[®] *UPL Probe* (Roche Diagnostics, Suiza). Estas sondas están constituidas por un oligonucleótido específico (~20 bases) para la secuencia del gen de interés marcado con dos fluoróforos, un reportero (*reporter*) unido al extremo 5' y un apagador (*quencher*) en el extremo 3'. La longitud de la sonda es la distancia entre los dos fluoróforos, de manera que la fluorescencia del reportero está apagada por el quencher debido al fenómeno FRET (*Flourescence Resonance Energy Transfer*). La actividad 5' exonucleasa de la ADN polimerasa "rompe" los nucleótidos de la sonda durante la amplificación, de modo que los fluoróforos se separan y se observa la señal de fluorescencia, ya que el *reporter* no es inhibido por el *quencher*. Es decir, la hidrólisis de la sonda provoca un incremento en la señal del reportero y ésta aumenta proporcionalmente al incremento del amplicón.

La amplificación y la detección de la fluorescencia se llevó a cabo en el *LightCycler*[®]480 II (Roche Diagnostics, Suiza), en placas opacas específicas de 96 pocillos. Para la reacción fue necesario añadir a la muestra de ADNc (5 µl), la mezcla de reacción indicada en la Tabla 3, completando con agua para un volumen final de 20µl.

Tabla 3. Componentes de la mezcla de reacción para la PCR a tiempo real.

	Concentración final
LightCycler[®]480 Probes Master 2x (ADN polimerasa FastStart Taq. + solución tampón de reacción + dNTPs + MgCl ₂)	1x
Cebador sentido 20 µM	700 nM
Cebador antisentido 20 µM	700 nM
Sonda Taqman[®] UPL 10 µM	100 nM

Una vez preparada la placa con la mezcla de reacción y los ADNc, se realizó la PCR a tiempo real siguiendo el siguiente protocolo de amplificación, común para todos los genes analizados (Tabla 4):

Tabla 4. Protocolo de amplificación utilizado para la realización de la PCR a tiempo real, en el Lightcycler®480, para la amplificación de los genes analizados.

	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Pre-incubación	1	95°C	10 minutos
Amplificación	45	95°C (desnaturalización)	10 segundos
		60°C (anillamiento)	30 segundos
		72°C (extensión)	1 segundo
Enfriamiento	1	40°C	30 segundos

El diseño de los cebadores, así como la sonda Taqman® UPL correspondiente en cada caso, se hizo utilizando la herramienta “Universal Probe Library, Design Center” (<http://www.universalprobelibrary.com>, Roche Diagnostics, USA) y fueron manufacturados por la misma casa. El diseño fue optimizado para longitudes comprendidas entre los 18 y 22 nucleótidos (nt) y unas temperaturas de anillamiento de 59-60°C, con un contenido en guanina/citosina de aproximadamente 50% y una longitud de amplicón no superior a 120 nt.

La relación de genes analizados se expone en la Tabla 5, así como los cebadores y las sondas UPL utilizados. La expresión génica de cada uno de ellos se normalizó utilizando un gen de referencia, la proteína ribosómica L13a (RPL13A), elegido de entre una batería de genes candidatos por no verse modulados en ninguna de las condiciones estudiadas, utilizando el programa *GeNorm*, incluido en paquete *qbase+* (Biogazelle, Bélgica). Cada muestra se amplificó por duplicado y cada condición se realizó por triplicado expresando los resultados finales como ratio de incremento respecto a la condición basal, BSA (normalizado a 1).

Tabla 5. Cebadores y sondas UPL de los genes analizados agrupados por su función

FUNCIÓN	GEN	PROTEÍNA	C. SENTIDO (5'-3')	C.ANTISENTIDO (5'-3')	SONDA UPL
Metabolismo	GLUT3	Transportador de Glucosa 3	gggtgtggtaataactatcttcaactg	cccagtctctccacgttcac	# 31
			agaagctcccactgggtttt		
	HK2	Hexoquinasa 2	catgagaccaggaaactctcg	gatgacagtgggcagaagc	# 87
			ataaatcacacggcgctctt		
Degradación de MEC	MMP 1	Metaloproteasa de matriz 1	gctaacctttgatgctataactacga	tttgtgcgatgtagaatctg	# 7
			caaaacatatttctttgtagaggaaa		
	MMP 3	Metaloproteasa de matriz 3	ttcagctatttgcttgggaaa	ccagtctccgaggagaaaca	# 36
			aaaaacagctccgcatcaac		
	MMP 13	Metaloproteasa de matriz 13	cttcacgcatcagttttcaag	tcaccgtaaataatgatttaagccac	# 23
			gatgagtacaaaagtctgatcca		
IL 6	Interleuquina 6	ctgcagccactggttctgt	ctggacaaacctcagcccta	# 22	
		tcatcaggatcccatattgtt			
Detoxificación	SOD 2	Superóxido dismutasa 2	tcatcaggatcccatattgtt	tgatggcttccagcaactc	# 76
			tcagatgtgtctgaggatttctct		
	CAT	Catalasa	cggcgaactctttgatctct	cagagctggaacctgaggag	
Gen de referencia	RPL13A	Proteína ribosómica L13a	caagcggatgaacaccaac	tgtggggcagcatactc	# 28

4. Estudio de la muerte celular

4.1. Cuantificación de Apoptosis temprana y tardía.

Para estudiar los posibles efectos tóxicos de los AG sobre los condrocitos se realizó un ensayo de apoptosis por citometría de flujo. Esta técnica permite, mediante la utilización de un láser, cuantificar y clasificar las células según su morfología y complejidad, además de detectar biomarcadores por fluorescencia. De esta manera, utilizando simultáneamente dos fluoróforos con picos de excitación a distinta longitud de onda, pudimos cuantificar la apoptosis temprana y la apoptosis tardía que se producía tras la exposición de cada una de las condiciones. Para ello se utilizó el kit de detección de Apoptosis Anexina V FITC/IP (Immunostep, España).

La apoptosis programada se caracteriza por las características morfológicas que incluyen la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática, condensación del citoplasma y el núcleo, y la compactación y fragmentación de la cromatina nuclear. Un fosfolípido normalmente presente sólo en la cara interna de la bicapa lipídica, la fosfatidilserina (FS), se transloca a la cara externa. La FS en la superficie celular actúa como señal para que la célula apoptótica sea reconocida y eliminada por los fagocitos. El anticoagulante vascular humano, anexina V, es un fosfolípido dependiente de calcio que tiene una alta afinidad por FS, y muestra una mínima unión a la fosfatidilcolina y esfingomielina. Los cambios en la asimetría de FS, que se analiza mediante la medición de la unión de la anexina V a la membrana de la célula, se detectaron antes de los cambios morfológicos asociados con la apoptosis y antes de la que integridad de la membrana se haya perdido. La Anexina V marcada con Isocianato de fluoresceína (FITC; fluorescencia verde, FL1), permite identificar y cuantificar las células apoptóticas en una base de una sola célula mediante citometría de flujo (Figura 10). Al marcar las células de forma simultánea con Ioduro de Propidio (IP; fluorescencia roja, FL2), molécula fluorescente que se intercala entre las bases del ADN cuando la membrana celular está ya dañada, permite la discriminación de las células intactas (Anexina V-FITC negativo, IP negativo), a principios de apoptosis (anexina V-FITC positivo, IP negativo) y la apoptosis tardía (anexina V-FITC positivo, IP positivo), o células necróticas (anexina V-FITC negativo, IP positivo).

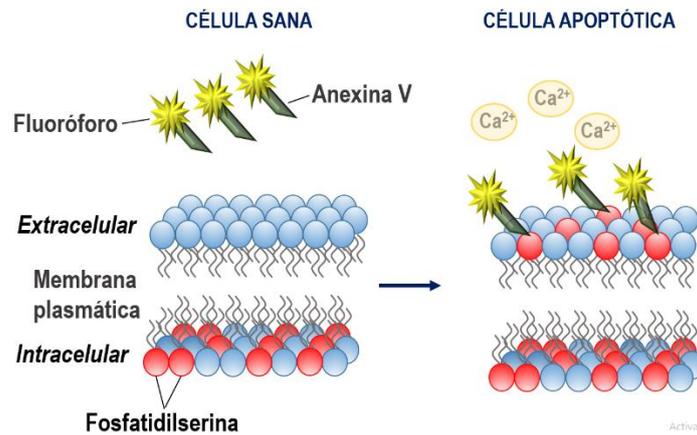


Figura 10. Representación esquemática del mecanismo de detección de apoptosis utilizando la Anexina V/FITC. La fosfatidilserina, normalmente presente en la cara interna de la membrana plasmática, se trasloca en las células apoptóticas a la cara externa, momento en el cual puede unirse la Anexina V unida a la fluoresceína, pudiendo ser así detectada por citometría de flujo.

Para este experimento se sembraron 8×10^4 células en placas MW6 en DMEM suplementado con 10% SBF y se incubaron a 37°C , 5% de CO_2 y humedad a saturación. A las 24 h se cambió el medio a DMEM sin suplementar y 0.7mM de PA, OL o PA/OL y se incubaron durante 12 h, tiempo tras el cual se retiró el medio, se lavó 3 veces con solución salina isotónica (0.9% NaCl) para eliminar los restos de medio de cultivo y tratar posteriormente con Tripsina (Sigma Aldrich, USA) 2x en solución salina, 2 min a 37°C , parando la reacción con DMEM suplementado al 10% de SBF. Se recogieron así las células en tubos de citometría. Se centrifugaron a 1500 revoluciones por min (rpm), 5 min. Tras la eliminación del sobrenadante, las células se resuspendieron en una solución tampón para Anexina al 5X (Immunostep, España) y se añadieron los fluoróforos (Anexina V-FITC y IP) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Tras la incubación de 15 min a temperatura ambiente, se procedió a la cuantificación en el citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, USA), analizando 104 células por condición.

Cada condición se realizó por triplicado y los resultados, analizados con la herramienta informática *BD CellQuest™ Pro Analysis* (Becton Dickinson), se expresaron en ratios de incremento en relación a la condición basal (BSA), normalizado a 1.

4.2. Actividad de Caspasas

Por su importancia en el proceso de muerte celular, se midió la actividad de caspasas efectoras (Caspasas 3/7) y de caspasa inductora por la vía mitocondrial (Caspasa 9). Para

ello se utilizó el kit *Caspase-Glo*[®] 3/7 Assay y *Caspase-Glo*[®] 9 Assay (Promega, USA). Estos ensayos proporcionan un sustrato proluminescente específico de cada caspasa que, por acción de las mismas, se escinde liberando aminoluciferina, sustrato de la luciferasa usada como reactivo para la producción de luz. La actividad de caspasa será directamente proporcional, por tanto, a la cantidad de luz producida, medida por el sistema en Unidades relativas de luz (URL).

Para realizar este ensayo se utilizaron 2 placas MW96 (una para la determinación de cada caspasa) donde se sembraron 10⁴ células en DMEM suplementado al 10% SBF y se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y humedad a saturación. A las 24 h se cambió el medio a DMEM sin suplementar con SBF y 0.7mM de PA y PA/OL, 12 h, tiempo tras el cual se procedió al ensayo de luminiscencia siguiendo las indicaciones del fabricante. Se retiraron las placas del incubador para atemperarlas y se añadió el reactivo *Caspase-Glo*[®] específico para cada ensayo (compuesto por la mezcla del sustrato específico de la caspasa y una solución tampón de la luciferasa). Se favoreció la mezcla en un agitador de placas a 300-500 rpm, 30 segundos y, tras 1 h de incubación a temperatura ambiente, se procedió a la lectura de URL en el *Luminómetro Infinite*[®] 200 NanoQuant (Tecan, Suíza).

Cada condición se realizó por triplicado y los resultados se expresaron en ratios de incremento en relación a la condición basal (BSA), normalizado a 1.

5. Estudio del estrés oxidativo

5.1. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para estudiar los efectos de los AG sobre el estrés oxidativo celular y su posible citotoxicidad, se midió por citometría de flujo la producción de ROS utilizando dos fluoróforos: Diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) (Sigma Aldrich, USA) y MitoSox™ (Thermo Fisher scientific, USA).

El DCFH-DA es una molécula permeable a las células que se hidroliza intracelularmente al carboxilato DCFH. Su oxidación resulta en la producción de un producto fluorescente, la fluoresceína, que puede ser medido por citometría de flujo y otras técnicas basadas en la fluorescencia. Es ampliamente utilizado para medir la

producción de agua oxigenada (H_2O_2) y otros oxidantes producidos a nivel intracelular o monitorizar los cambios de señalización redox producidos en las células en respuesta a la activación intra o extracelular con estímulo oxidativo.

El MitoSox™ es un colorante fluorogénico que penetra en las células vivas dirigiéndose específicamente a las mitocondrias. Este colorante se oxida rápidamente por acción de los superóxidos, no por otros sistemas de generación de ROS ni por especies reactivas de nitrógeno. El producto oxidado es altamente fluorescente al unirse al ácido nucleico, produciendo así una fluorescencia roja detectable y cuantificable por citometría de flujo.

En algunos casos se realizaron análisis que consistieron en la inhibición de la producción de ROS; para ello se utilizó la N-acetilcisteína (Sigma Aldrich, USA), un inhibidor de estas especies reactivas, realizando tratamiento previo con NAC 1mM durante 30 min antes de la adición de los estímulos con los AG.

Para realizar la cuantificación de ROS, se sembraron en cada caso las células (5×10^4 células/pocillo) en placas MW6 en DMEM 10% SBF y se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 y humedad a saturación. A las 24 h se cambió el medio a DMEM 0% SBF 0.7mM de PA o PA/OL, 12 h en las mismas condiciones, tiempo tras el cual en el caso de análisis con MitoSox™ se retiró el medio, se hicieron dos lavados con solución salina, se añadió *Hank's Buffered Salt Solution* (HBSS) (Thermo Fisher scientific, USA) y MitoSox™ para una concentración final de 4 $\mu g/\mu l$, y se incubaron 15 min a 37°C y 5% de CO_2 y humedad a saturación, en oscuridad. A continuación se recogieron las células por tripsinización y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min. Se resuspendieron en solución salina para su posterior medida por citometría de flujo, manteniéndose en hielo hasta el momento de la medición.

En el caso del DCFH-DA, tras el tiempo de estímulo con las diferentes condiciones de AG, se añadió dicho fluoróforo a una concentración final de 10 μM , y se incubaron las células durante 30 min a 37°C y 5% de CO_2 y humedad a saturación, en oscuridad. A continuación se procedió a la obtención de la suspensión de células para su medida por citometría de flujo de la manera anteriormente descrita.

Cada condición se realizó por triplicado y los datos fueron analizados con la herramienta informática *BD CellQuest™ Pro Analysis* y los resultados se expresaron en ratios de incremento en relación a la condición basal (BSA), normalizado a 1.

5.2. Producción de óxido nítrico (NO)

Se determinó la producción de NO midiendo la concentración de nitritos en el medio de tras el estímulo con los AG. Para ello se utilizó el reactivo de Griess (Enzo Life Sciences, USA) que contiene 1 parte al 0.1% de dihidrocloruro de naftiletilendiamina en agua destilada y una parte de sulfanilamida al 1% en ácido acético al 25-50%. Así, los nitritos presentes en el medio forman una sal de diazonio que al reaccionar con la naftilamina dan lugar a un color rosado, cuya Abs se mide a 570 nm y es directamente proporcional a la concentración de nitritos en el medio (212). Para establecer la correlación entre la Abs y la concentración de nitritos en el medio se realizó una curva de calibrado con diluciones seriadas en el medio de cultivo de una solución de Nitrito Sódico (Sigma Aldrich, USA) 10 mM, usando como blanco de la medida el medio de cultivo sin nitrito sódico.

Así, se sembraron para el experimento 10^4 células/pocillo en una placa MW96, en DMEM suplementado con 10% SBF y se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y humedad a saturación. A las 8 h se cambió el medio a DMEM sin suplementar con SBF y 0.7mM de PA, PA/OL, y se incubaron durante 12 h. Tiempo tras el cual se recogieron 50 µl de medio de cada pocillo y se pasaron a una placa de 96 pocillos transparente de fondo plano (Sigma Aldrich, USA), donde se pipetearon también 50 µl de cada uno de los puntos de la recta de calibración (50, 25, 12.5, 6, 3, 1 y 0 µM). A continuación se añadió a cada pocillo 50 µl del reactivo de Griess, y tras una agitación fuerte de la placa durante 10 min a temperatura ambiente, se procedió a la lectura de la Abs a 570 nm en el lector de placas Infinite® 200 NanoQuant.

Cada condición de cultivo se realizó por triplicado, así como la medida de NO del medio. Los resultados se expresaron en ratios de incremento en relación a la condición basal (BSA), normalizado a 1.

6. Análisis de la función mitocondrial

6.1. Medida de la función mitocondrial mediante la tasa de consumo de oxígeno celular (OCR).

Para estudiar los principales parámetros de la función mitocondrial se midió la tasa de consumo de oxígeno (OCR) de las células utilizando moduladores de la respiración que se dirigen a los componentes de la cadena de transporte de electrones (CTE) de la mitocondria, revelando así parámetros clave de la función metabólica. Esto se hizo en el *SeaHorse XFp Extracellular Flux Analyzer* (Seahorse Bioscience, Agilent Technologies, USA) que mide simultáneamente, y en células vivas, las dos vías energéticas principales de la célula - la respiración mitocondrial y la glucólisis. Para ello, hace uso de sensores sensibles que permiten una medida rápida, a tiempo real, tanto de la concentración de oxígeno como de la concentración de protones en el medio.

Lo que se analizó en este caso fue la función mitocondrial de las células con el *kit Seahorse XF Mito Stress test* (Agilent Technologies, USA), que utiliza moduladores de la respiración, inyectados en serie, que se dirigen a los componentes de la CTE en la mitocondria para revelar los parámetros clave de la función metabólica. Los moduladores (en orden de inyección) utilizados para el ensayo son los siguientes (Figura 11):

- Oligomicina (OLG) 2 μ M: inhibe la ATP sintasa (complejo V); la disminución de OCR después de la inyección de OLG se correlaciona con la respiración mitocondrial asociada con la producción de ATP celular.
- Carbonilo cianuro-4 (trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP) 2 μ M: agente desacoplante que colapsa el gradiente de protones y altera el potencial de membrana mitocondrial. Como resultado, se inhibe el flujo de electrones a través de la CTE y se produce un consumo máximo del oxígeno por el complejo IV.
- Mezcla de Rotenona y Antimicina A (Rot/AntA) 0.5 μ M: inhibidores del complejo I y del complejo III, respectivamente, de la CTE. Esto consigue apagar la respiración mitocondrial y permite el cálculo de la respiración no mitocondrial debido a procesos que tienen lugar fuera de la mitocondria.

Se sembraron 2x10⁴ células en las placas multipocillo aptas para su uso en el instrumento, en DMEM suplementado con 10% SBF y se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y

humedad a saturación. A las 8 h se cambió el medio a DMEM sin suplementar con SBF y 0.7mM de PA, OL o PA/OL, y se incubaron durante 12 h, tiempo tras el cual se realizó el ensayo siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Cada condición se realizó por triplicado y los datos obtenidos en el ensayo se analizaron con la *herramienta Seahorse XF Stress Test Report Generators* (Agilent Technologies, USA), donde se ofrece una relación de los valores de OCR obtenidos en cada tiempo de medida y calculando con estos valores los siguientes parámetros bioenergéticos, expuestos gráficamente en la Figura 11:

- Respiración no mitocondrial: Tasa mínima de OCR después de la inyección de Rot/AntA. Este parámetro es importante para conseguir una medida precisa de la respiración mitocondrial ya que informa del consumo de oxígeno que persiste después de la inyección de la mezcla de Rot/AntA, debida a un subconjunto de enzimas celulares que siguen consumiendo oxígeno.
- Respiración basal: Calculada por la diferencia entre la última medida antes de la inyección de OLG y la tasa de respiración no mitocondrial. Informa del consumo de oxígeno utilizado para satisfacer la demanda de ATP celular y como resultado de la fuga de protones mitocondrial. Muestra la demanda energética de la célula en condición basal.
- Producción de ATP: Resulta de la diferencia entre la última medida antes de la inyección de OLG y la tasa más baja obtenida tras dicha inyección. Mide por tanto, la disminución del consumo de oxígeno tras la inyección de OLG y representa la porción basal de la respiración que estaba siendo utilizada para producir ATP. Muestra, por tanto, el ATP producido por las mitocondrias.
- Fuga de Protones (Proton Leak): Se calcula por la diferencia entre el OCR tras la inyección de OLIG y el OCR no mitocondrial. Representa la respiración basal restante no acoplada a la producción de ATP. Puede ser un signo de daño mitocondrial o puede usarse como un mecanismo para regular la producción de ATP mitocondrial.
- Respiración máxima: Valor obtenido por la diferencia entre el valor máximo obtenido tras la inyección de FCCP y la respiración no mitocondrial. Muestra por tanto la capacidad máxima de la respiración que la célula pueda lograr, ya que el

FCCP imita una “demanda de energía” fisiológica estimulando la cadena respiratoria hasta su máxima capacidad y provocando así una rápida oxidación de sustratos para cumplir con este desafío metabólico.

- Capacidad respiratoria de reserva: Expresada como la diferencia entre la respiración máxima obtenida tras la adición de FCCP y la respiración basal. Indica la capacidad de la célula para responder a una demanda energética, así como la célula está respirando en su máximo teórico. Esto puede ser un indicador de la aptitud de las células o de flexibilidad.
- Eficiencia de acoplamiento: Calculado como el porcentaje de OCR destinado a la síntesis de ATP en relación al OCR basal. Es un indicador de la calidad del acoplamiento de OXPHOS y la CTE.

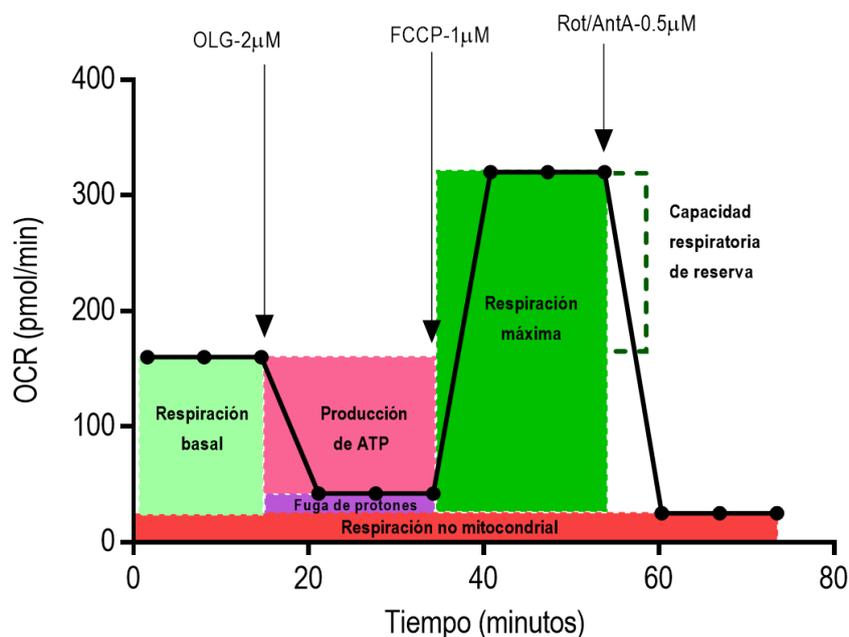


Figura 11: Representación gráfica de los parámetros bioenergéticos calculados a partir de los valores de consumo de oxígeno (OCR) obtenidos tras los diferentes estímulos utilizados: Oligomicina (OLG), FCCP y Rotenona/Antimicina A (Rot/AntA).

6.2. Cuantificación del número de copias de ADN mitocondrial (ADNmt).

Se sembraron las células en placas MW6, 5×10^4 células/pocillo, en DMEM suplementado al 10% SBF y se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y humedad a saturación. A las 24 h se cambió el medio a DMEM sin suplementar, BSA y 0.7mM de PA, OL o PA/OL,

y se incubaron durante 12 h. Tiempo tras el cual se procedió a la extracción del ADN total en cada caso, utilizando un equipo comercial (Qiagen, Reino Unido), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El contenido de ADNmt se midió mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real, utilizando el LightCycler® 480 II, calculando la relación entre el número de copias del gen ribosomal mitocondrial 12S (12S-rRNA) y el gen nuclear RNAsaP (12S-rRNA/RNAsaP). Para ello, las muestras de ADN duplicadas se amplificaron en paralelo en un volumen final de 20 µL que contenía 50 ng de ADN, 10 µl de LightCycler® 480 Sybr Green I Master (Roche Diagnostics, Suíza), 0.3 µM de cebadores para 12S-rRNA (sentido: 5'-CCA CGG GAA ACA GCA GTG AT-3'; antisentido 5'-CTA TTG ACT TGG GTT AAT CGT GTG A-3') y 0,3 µM de cebadores de RNAsaP (sentido: 5'-GCA CTG AGC ACG TTG AGA GA-3'; antisentido: 5'-CCA GTC GAA GAG CTC CAG A-3') con H₂O para alcanzar el volumen final. La mezcla se amplificó 50 ciclos a 95° C durante 10 segundos, 60°C durante 15 segundos y 72 ° C durante 10 segundos; con una extensión final de 72 ° C durante 1 min. La especificidad de todas las reacciones se determinó mediante un análisis de la curva de punto de fusión usando un ciclo a 95°C durante 5 segundos y 65°C durante 1 min seguido de un paso de calentamiento a 97°C con adquisición continua de fluorescencia.

Para determinar el número de copias de ADNmt, se generó una curva estándar independiente para cada gen (12S-rRNA y RNAsaP), de modo que el número de copias se determinó a partir de los valores de Ct (*Cycle Threshold*), los cuales se extrapolaron en la curva estándar externa, obteniendo así el número de copias para cada gen en las muestras analizadas.. Para normalizar los valores entre todos los experimentos, se estableció el número de copias de ADNmt utilizando las células de control (BSA) como 100%.

7. Medida de la función glucolítica a través de la tasa de acidificación extracelular (ECAR).

La glucosa en la célula se convierte en piruvato (vía glucólisis), y luego se convierte en lactato en el citoplasma, o CO₂ y agua en las mitocondrias. La conversión de glucosa en

piruvato, y posteriormente en lactato, da como resultado una producción neta y extrusión de protones en el medio extracelular. La extrusión de protones da lugar a una acidificación del medio que rodea a la célula. El instrumento *SeaHorse XF Extracellular Flux Analyzer* mide directamente la tasa de acidificación y lo informa como ratio de acidificación extracelular (ECAR).

Lo que se analizó, por tanto, en este caso fue la función glucolítica de las células con el *Seahorse XF Glycolysis Stress test kit* (Agilent Technologies, USA) usando el *SeaHorse XF Extracellular Flux Analyzer*, utilizando moduladores del metabolismo, inyectados en serie, para revelar los parámetros clave de la función metabólica.

En primer lugar, las células se incubaron en el medio sin glucosa ni piruvato y se midió el ECAR. A partir de ahí se inyectaron los distintos moduladores, que son, por orden de inyección, los siguientes (Figura 12):

- Glucosa 10mM: Las células utilizan así la glucosa, catabolizándola a través de la vía glucolítica a piruvato, produciendo ATP, NADH, agua y protones. La salida de éstos al medio provoca un rápido aumento del ECAR.
- OLG 2 μ M: que inhibe la producción de ATP mitocondrial, dejando así la producción de energía sólo a la vía glucolítica, produciendo un aumento del ECAR.
- 2-deoxi-glucosa (2-DG) 50 μ M: un análogo de la glucosa, que uniéndose a la hexoquinasa (primera enzima de la vía glucolítica), inhibe de forma competitiva la glucólisis, produciéndose una disminución de ECAR. Ayuda a confirmar que el ECAR producido en el experimento se debe a la glucólisis.

Para llevar a cabo el ensayo se sembraron 2×10^4 células en las placas multipocillo aptas para su uso en el instrumento, en DMEM suplementado al 10% con SBF y se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y humedad a saturación. A las 8 h se cambió el medio a DMEM sin suplementar con SBF y 0.7mM de PA, OL o PA/OL, y se incubaron durante 12 h, tiempo tras el cual se realizó el ensayo siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Cada condición se realizó por triplicado y los datos obtenidos en el ensayo se analizaron con la herramienta *Seahorse XF Stress Test Report Generators*, donde se ofrece una relación de los valores de ECAR obtenidos en cada tiempo de medida y se calcula con

estos valores los siguientes parámetros bioenergéticos, expuestos gráficamente en la Figura 12:

- Glucólisis: Representa el proceso de convertir la glucosa en piruvato. Se mide como la tasa de ECAR alcanzada por las células tras la adición de cantidades saturantes de glucosa
- Capacidad glucolítica: Es la máxima tasa de ECAR alcanzada tras la adición de OLG, que inhibe la OXPPOS, haciendo que la célula utilice la glucólisis a su máxima capacidad
- Reserva glucolítica: Es la diferencia entre la capacidad glucolítica máxima y la glucólisis, e indica la capacidad de una célula para responder a una demanda energética, así como la proximidad de la función glucolítica al máximo teórico de la célula.
- Acidificación no glucolítica: Es la tasa de ECAR alcanzada tras la adición de 2-DG, que inhibe la vía glucolítica normal. Se mide así el ECAR producido por otras fuentes de acidificación extracelular distintas a la glucólisis.

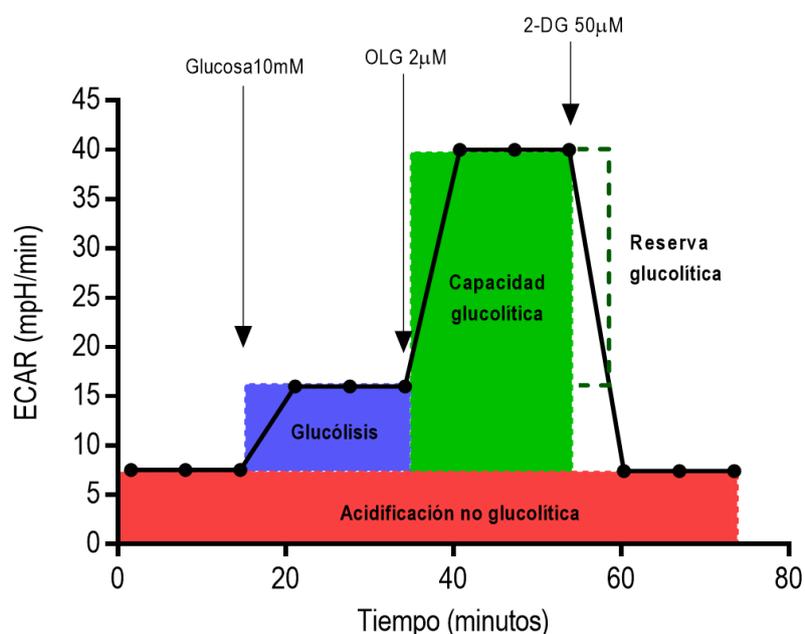


Figura 12: Representación gráfica de los parámetros bioenergéticos calculados a partir de los valores de acidificación extracelular (ECAR), obtenidos tras los diferentes estímulos utilizados: Glucosa, Oligomicina (OLG) y 2-deoxiglucosa (2-DG).

8. Evaluación del balance energético

Para analizar si la exposición a los distintos AG afectaba metabólicamente a la producción de ATP, se estimó dicha producción, por un lado, a partir de los datos obtenidos de OCR y ECAR de los experimentos descritos en el apartado anterior con el *SeaHorse XFp Extracellular Flux Analyzer* y, por otro lado, se hizo una cuantificación por luminiscencia.

8.1. Estudio de la contribución de la OXPHOS y la Glucólisis a la producción de ATP.

Para estimar la producción de ATP como producto de la fosforilación oxidativa, se transformó el OCR (pmol/min) correspondiente a la producción de ATP (parámetro calculado en a partir de los datos obtenidos en el experimento detallado en el apartado anterior) en tasa de producción de ATP, expresada en pmol/min, teniendo en cuenta que la estequiometría, en condiciones normales de fosforilación oxidativa, entre el OCR y la tasa de producción de ATP es 5, es decir, por cada molécula de oxígeno consumido en la respiración, se generan 5 moléculas de ATP (213).

Por otro lado, para estimar la producción de ATP como producto de la glucólisis, ésta se calcula a partir del ECAR (mpH/min), la tasa de producción de protones (PPR), el cual es un parámetro que también se obtiene para cada punto de medida en el *SeaHorse XFp Extracellular Flux Analyzer*. Se calculó el PPR debido a la glucólisis por la diferencia entre el PPR tras la administración de glucosa y el PPR basal. Así se obtienen los pmol/min de H⁺ generados durante este proceso, que guarda una relación estequiométrica con la producción de ATP de 1.

Para estimar la producción de ATP total, se sumaron ambos parámetros, la tasa de producción de ATP de la fosforilación oxidativa y la tasa de producción de ATP de la glucólisis.

8.2. Cuantificación de ATP total y mitocondrial por luminiscencia

En este caso se utilizó el kit *ATP Bioluminescence Assay kit HS II* (Roche Diagnostics, Suiza). La medida por este método se basa en que la emisión de luz por oxidación de la

luciferina por acción de la luciferasa es dependiente del ATP. A partir de una recta de calibrado obtenida tras la reacción con sucesivas diluciones del estándar de ATP proporcionado por el kit, se puede hacer una medida altamente sensible de la producción de esta molécula energética en cada caso.

Para poder cuantificar individualmente la producción de ATP total y ATP mitocondrial, previa a la obtención de los extractos celulares para el análisis, han de incubarse en soluciones distintas para cada caso. Ambas tienen la misma composición de sales (NaCl 156mM, KCl 3mM, MgSO₄ 2mM, KH₂PO₄ 1.25mM, CaCl₂ dihidratado 2mM y HEPES 20mM), pero cada una de ellas tiene aditivos diferentes, así:

- Para la determinación de ATP total, se incubarán las células en Solución A, cuyo aditivo será Glucosa (Sigma Aldrich, USA) a una concentración final de 10nM
- Para la determinación de ATP mitocondrial, se incubarán las células en Solución B, cuyos aditivos serán 2-deoxi-D-Glucosa (2-DG) y Piruvato sódico (Sigma Aldrich, USA) a una concentración final de 5mM en cada caso. De esta manera se consigue bloquear la producción de ATP por la vía anaerobia, al ser la 2-DG capaz de entrar en la célula pero no de hacerlo en la vía glucolítica. Sin embargo sí lo hace el piruvato en la mitocondria, pudiendo de este modo obtenerse ATP de origen únicamente mitocondrial.

Para realizar el ensayo se sembraron 8×10^4 células por pocillo en placas MW6 en DMEM suplementado con 10% SBF y se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y humedad a saturación. A las 24 h se cambió el medio a DMEM sin suplementar con SBF 0.7mM de PA o PA/OL, y se incubaron durante 12 h. Pasado el tiempo de estímulo, se procedió a retirar el medio de cada pocillo y hacer 2 lavados con solución salina isotónica, añadiendo a continuación las distintas soluciones (A ó B) según el tipo de ATP que se quiera medir (ATP total o ATP mitocondrial, respectivamente). Así permanecieron 2 h en el incubador en las condiciones habituales de cultivo, tiempo tras el cual se procedió a la obtención de los extractos celulares. Para ello, se eliminó la Solución A o B y de inmediato se colocó la placa en una bandeja de hielo seco-Etanol durante 30 segundos hasta que se congelaron las células. Se retiró entonces la placa y se añadió 1 ml del tampón de lisis proporcionado en el kit previamente calentado a 100°C. Se raspó con un *scraper* recogiendo toda la superficie del pocillo a un tubo de 1.5 ml que se puso a 100°C durante 2 min, para

posteriormente centrifugar 5 min a 14000 g. Se recogió el sobrenadante manteniéndolo en hielo hasta la medida en el luminómetro. Se pipetearon cada una de las muestras en una placa MW96 transparente de fondo plano y se añadió, en proporción 1:1, la mezcla de luciferina-luciferasa, y se hizo la lectura en el luminómetro. Para establecer la relación entre el valor URL obtenido con la concentración de ATP, se midió en la misma placa la lectura de la dilución seriada del estándar de concentración conocida proporcionado por la casa comercial, pudiendo así hacer una recta de calibrado a la que se extrapolaron las lecturas URL obtenidas a partir de cada una de las muestras.

Como los valores obtenidos en cada caso se normalizan al contenido de proteína total, se sembró en paralelo un pocillo por cada condición con las células tratadas exactamente igual que las del ensayo a partir de las cuales se extrajo y cuantificó la proteína. Para la extracción de proteína se utilizó un tampón de lisis celular añadido tras la eliminación del medio y dos lavados con solución salina isotónica. Dicho tampón es una solución compuesta por Tris-HCl (Sigma Aldrich, USA) pH 8,0.2 M, Dodecilsulfato sódico (SDS) (Sigma Aldrich, USA) 2%, Glicerol (Sigma Aldrich, USA) 20%, al que se le añade un 10% de Fluoruro de Bencilsulfonil (PMSF) 0.1M (Sigma Aldrich, USA) y un 10% de mezcla de Inhibidores de Proteasas (Sigma Aldrich, USA). Se raspó la superficie de cultivo con un *scraper* y se recogió el contenido celular de la placa disuelto en el tampón de lisis. Se incubó a 100°C, 5 min y posteriormente se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 5 min. Finalmente se midió la cantidad de proteína en cada muestra utilizando el espectrofotómetro Nanodrop ND 1000 a 280 nm.

Por cada condición de AG, la medida de ATP total y mitocondrial se realizó por triplicado, y los resultados se expresaron en ratios de incremento en relación a la condición basal (BSA), normalizado a 1.

9. Evaluación de la formación acúmulos lipídicos (*Lipid Droplets*, LD)

Para observar el grado de formación de LD, se utilizaron dos tipos de tinciones: el colorante Oil-Red y el colorante LD540.

- a) Oil-Red O (1-[2,5-dimetil-4-(2,5-dimetilfenilazo)fenilazo]-2-naftol) (Sigma Aldrich, USA): es un colorante lisocromo (soluble en grasa) que se utiliza para la tinción de los TG y lípidos. Usado en combinación con la tinción nuclear, permite observar y cuantificar las gotas lipídicas intracelulares así como su localización.

Se sembraron 10^4 células por pocillo en una *chamber slide* (Thermo Fisher scientific, USA) de 8 pocillos en DMEM suplementado al 10% con SBF y se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y humedad a saturación. A las 8 h se cambió el medio a DMEM sin suplementar con SBF y 0.7mM de PA, OL o PA/OL a 37°C y 5% de CO₂. Una vez transcurrido el tiempo de estimulación, se lavaron las células con suero salino y, a continuación, se fijaron durante 10 min con paraformaldehído al 10% en tampón fosfato salino (PBS). Posteriormente, se cubrieron los pocillos con alcohol isopropílico al 60% y se retiró de forma inmediata. Seguidamente se introdujo la *chamber slide* en una solución Oil-RedO (previamente filtrada) durante 20 min. Después se realizaron unos lavados en un baño de alcohol isopropílico al 60%, tras lo cual se retiró la *chamber slide* y se lavó en agua destilada. Las células se tiñeron durante 5 min en hematoxilina de Mayer (Sigma Aldrich, USA), previamente filtrada. A continuación se lavaron durante 5 min en agua destilada y, por último, se montó la preparación con Glicergel (Agilent Technologies, USA). Las muestras se guardaron a 4°C y se observaron a partir del día siguiente en el microscopio óptico (Olympus, BX-61) a 20x, 40x y 100x. Los lípidos aparecen teñidos con un intenso color rojo.

Para el análisis de las imágenes obtenidas y su cuantificación se utilizó la herramienta *Image J*, "*Image processing and Analysis in Java*". Cada condición se realizó por triplicado y se analizaron 4 campos microscópicos distintos en cada caso. Los resultados se expresaron en ratios de incremento en relación a la condición basal (BSA), normalizado a 1.

- b) 4,4-Difluoro-2,3,5,6-bis-tetrametilen-4-bora-3a,4a-diaza-indaceno (LD540), amablemente proporcionado por el Dr Thiele (Life and Medical Sciences Institute, Alemania) (214). Es un colorante lipófilo basado en el fluoróforo Bodipy, desarrollado para imágenes microscópicas de gotas lipídicas. En contraste con anteriores tintes, permite visualizar imágenes multicolor tanto en células fijadas como vivas.

Se sembraron 10^4 células por pocillo en una *chamber slide* de 8 pocillos en DMEM suplementado al 10% con SBF y se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y humedad a saturación. A las 8 h se cambió el medio a DMEM sin suplementar con SBF y 0.7mM de PA, OL o PA/OL a 37°C y 5% de CO₂. Tras 12 h de incubación, se retiró el medio y se realizaron tres lavados con PBS, y las células fueron fijadas en paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, y tras lavar de nuevo con PBS, se trataron con una dilución 1:10000 de LD540 durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente se realizó la contra-tinción nuclear con dilución 1:10000 de 20-(4-metoxifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-2,5'-bi-1H-bencimidazol diclorhidrato (Hoechst 33258. Sigma Aldrich, USA) durante 10 min a temperatura ambiente. Se hicieron 3 lavados con PBS y se realizó el montaje con Glicergel (Agilent Technologies, USA). Se observaron en el microcopio de fluorescencia (Olympus, BX-61) al 20x y 40x.

La cuantificación del LD450 se realizó por citometría de flujo. Para lo cual se sembraron las células (2×10^4) en placas MW6 siguiendo el procedimiento anteriormente descrito. Tras 12 h de incubación con las distintas condiciones de AG, se lavaron con solución salina y se incubaron durante 30 min a 37°C, 5% de CO₂ y humedad a saturación. Se recogieron por tripsinización, se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min y se resuspendieron en solución salina antes de su análisis en el citómetro de flujo, FACScalibus (Becton Dickinson, USA). Los datos fueron analizados con la herramienta informática *BD CellQuest™ Pro Analysis* (Becton Dickinson, USA). Los resultados se expresaron en ratios de incremento en relación a la condición basal (BSA), normalizado a 1.

10. Cuantificación del contenido intracelular de triglicéridos (TG)

Para cuantificar el contenido intracelular de TG tras la incubación con las diferentes condiciones de AG, se sembraron las células (5×10^5) en placas de 100 mm de diámetro (Corning, USA) en DMEM 10% SBF y se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y humedad a saturación. A las 8 h se cambió el medio a DMEM sin suplementar con SBF y 0.7mM de PA, OL o PA/OL. A las 12 h de incubación, se lavaron con solución salina y se incubaron durante 30 min a 37°C y 5% de CO₂. Se recogieron por tripsinización, se centrifugaron a

1500 rpm durante 10 min y se resuspendieron en PBS. Para romper las membranas celulares y obtener en la suspensión el contenido intracelular se recurrió a la lisis ultrasónica o sonicación con el dispositivo ultrasónico Up200s Ultrashallprozessor (Hielcher, USA), con la muestra en hielo y haciendo 3 ciclos de 30 segundos al 60% de amplitud, manteniendo la muestra en hielo otros 30 segundos entre ciclos. Posteriormente se centrifugaron a 10000g, 10 min en frío. Con el sobrenadante obtenido se procedió a la cuantificación de la proteína total por espectrofotometría (anteriormente descrita) y de TG.

Para la cuantificación de TG se utilizó el método de Glicerol Fosfato Oxidasa/Peridasa (Biosystems, España), siguiendo las indicaciones del fabricante. Este es un método enzimático colorimétrico en el que los TG presentes en la muestra originan, según las reacciones acopladas descritas en la Figura 13, un complejo coloreado (quinoaimina) cuantificable por espectrofotometría a 500 nm. Para obtener la concentración de TG de la muestra a partir de los datos de Abs se mide en paralelo una muestra patrón con concentración (C) conocida y aplicando la siguiente fórmula: $(\text{Abs Muestra}/\text{Abs Patrón}) \times C \text{ patrón (mg/dl)} = C \text{ muestra (mg/dl)}$.

Cada condición de cultivo se realizó por triplicado, así como la medida de Abs en cada caso. Los valores obtenidos se normalizaron con el contenido en proteína total (mg TG/mg proteína) y los resultados se expresaron en ratios de incremento en relación a la condición basal (BSA), normalizado a 1.



Figura 13: Reacciones acopladas utilizadas en el método enzimático colorimétrico de cuantificación de triglicérido.

11. Análisis Estadístico

El análisis de los datos se llevó a cabo con el software GraphPad Prism v6. Los resultados se expresan como la media \pm DE y los p valores considerados estadísticamente significativos fueron aquellos con un nivel de significación de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS



1. Ensayo de Viabilidad celular

Los efectos de distintas concentraciones de AG sobre la línea celular de condrocitos T/C-28a2 se evaluaron con el kit *CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay*. Los valores obtenidos (n=3) se normalizaron con respecto a la condición basal (BSA) a la que se le adjudicó un valor del 100%. No se observa ninguna diferencia significativa entre la viabilidad de las células en la condición basal y la de las células expuestas a las diferentes concentraciones de PA, OL y PA/OL: 0.4mM, 0.7mM y 1mM (Figura 14). Por los resultados obtenidos en este ensayo y teniendo en cuenta los rangos fisiológicos de los AG en plasma/suero (211,215), se escogió la concentración de 0.7mM para realizar el resto de los estudios planteados en este trabajo.

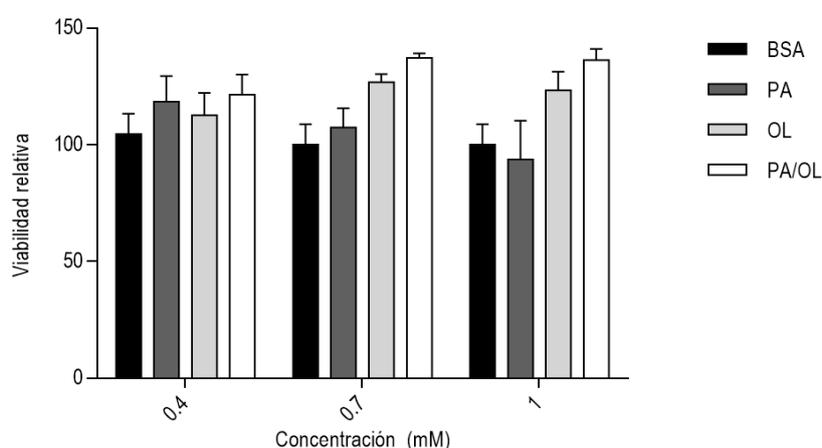


Figura 14: Cuantificación de los efectos de concentraciones de ácidos grasos sobre la viabilidad celular. Los valores, expresados en relación a la condición basal (BSA) a la que se adjudica el 100%, corresponden al valor medio \pm desviación estándar.

2. Expresión de genes implicados en la patología artrósica

Para poner de manifiesto el papel de los AG en la degradación de la MEC del cartílago analizamos la expresión de diversos genes altamente relacionadas con este proceso. Tras

la incubación durante 12 h con 0.7mM de PA, OL y PA/OL, se recogieron las células para la extracción de ARN, y posterior obtención y amplificación del ADNc por PCR cuantitativa.

Se analizó la expresión de las MMPs (MMP-1, -3, y -13), proteasas altamente relacionadas con el proceso catabólico del cartílago. En los resultados, expresados como ratio frente a la condición basal (BSA) normalizado a 1, se observa un aumento de la expresión de forma significativa tras la incubación con PA, de MMP-1 (4.05 ± 0.14), MMP-3 (6.69 ± 0.29) y MMP-13 (2.34 ± 0.11). Al incubar con OL o al combinar en proporción 1:2 el PA y el OL (PA/OL), no se observa ninguna variación significativa de la expresión de estas MMPs en relación al BSA. Asimismo, los niveles de incremento en la expresión de MMPs en la condición de PA siguen siendo estadísticamente significativos al compararlos con los obtenidos tras la estimulación de las células con OL o con PA/OL (Figura 15).

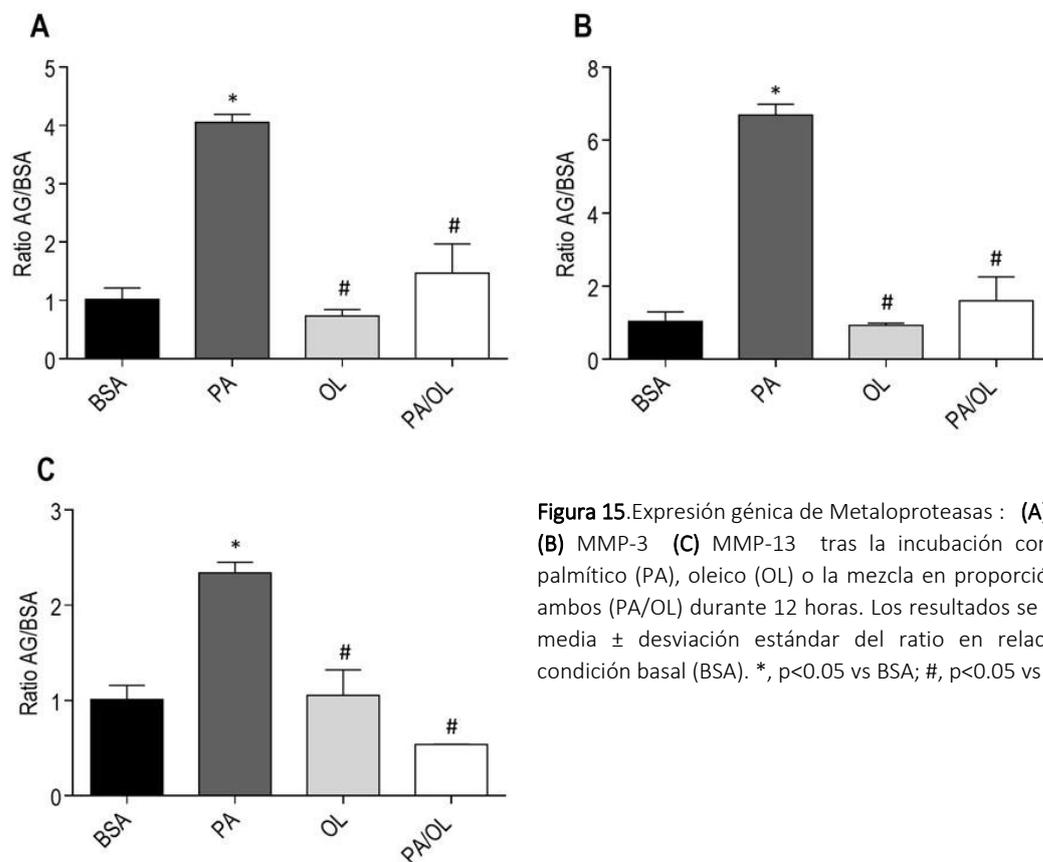


Figura 15. Expresión génica de Metaloproteasas : **(A)** MMP-1, **(B)** MMP-3 **(C)** MMP-13 tras la incubación con 0.7mM palmítico (PA), oleico (OL) o la mezcla en proporción 1:2 de ambos (PA/OL) durante 12 horas. Los resultados se expresan media \pm desviación estándar del ratio en relación a la condición basal (BSA). *, $p < 0.05$ vs BSA; #, $p < 0.05$ vs PA.

Dado que la inflamación juega un papel importante en el proceso artrósico, y que se ha visto en otros tejidos periféricos que el exceso de AG produce un aumento de la inflamación, analizamos la expresión de IL6 y COX2, dos genes involucrados en el proceso inflamatorio que tiene lugar en la OA. Tras la incubación con PA, la expresión de ambos genes se ve aumentada de forma significativa en relación a BSA (COX2: 3.04 ± 0.1 ; IL6: 2.64 ± 0.47). Sin embargo, estas diferencias no son significativas, con respecto a BSA, en el caso de la incubación con OL ni con PA/O. En el caso de COX2, al comparar su expresión tras la exposición a PA con la obtenida tras la incubación con OL o PA/O, se encuentran diferencias estadísticamente significativas, acercándose la expresión en estos dos casos a la obtenida con la condición basal (BSA) (Figura 16).

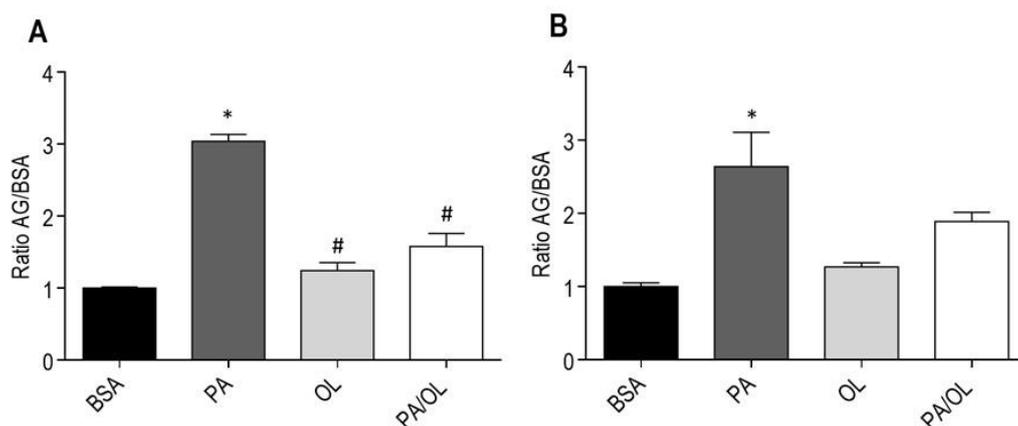


Figura 16. Expresión génica de moléculas relacionadas con el proceso inflamatorio: Ciclooxygenasa (COX)-2 **(A)** e Interleuquina 6 (IL6) **(B)** tras la incubación con 0.7mM palmítico (PA, oleico (OL) o la mezcla en proporción 1:2 de ambos (PA/OL) durante 12 horas. Los resultados se expresan en ratio en relación a la condición basal (BSA). Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar. *, $p < 0.05$ vs BSA; #, $p < 0.05$ vs PA.

3. Estudio de la muerte celular mediada por AG.

Para estudiar el grado de toxicidad de los AG sobre los condrocitos, se evaluó la muerte celular tras la incubación durante 12 h con cada una de las condiciones (BSA, PA, OL y PA/OL) a concentración de 0.7mM. Primero se cuantificó la Apoptosis por citometría de flujo y en base a los resultados obtenidos por este método, se realizó posteriormente una cuantificación de la actividad de las caspasas.

3.1. Cuantificación de la Apoptosis por citometría de flujo.

Para realizar esta técnica se utilizaron como fluoróforos la Anexina V/FITC y el IP con el fin de detectar tanto la apoptosis temprana (positivo para Anexina V/FITC, negativo para IP) como la apoptosis tardía (positivo para ambos fluoróforos). Los resultados, expresados en ratio en relación al BSA, muestran un aumento significativo tanto de la apoptosis temprana (2.74 ± 0.15) (Figura 17A) como de la apoptosis tardía (3.33 ± 0.36) (Figura 17B) tras la incubación con PA. No se observan diferencias significativas respecto a la condición basal en el caso de la incubación con OL para ninguno de los dos fluoróforos; mientras que para la condición PA/OL, se observa un aumento estadísticamente significativo de la apoptosis temprana (1.77 ± 0.04) en relación a BSA (Figura 17A), sin observarse un aumento de la apoptosis tardía (1.17 ± 0.05) (Figura 17B). Al realizar el análisis de apoptosis comparando las diferencias con la condición de PA, se observa un descenso estadísticamente significativo tanto en la apoptosis temprana (1.16 ± 0.05) (Figura 17A) como en la apoptosis tardía (1.20 ± 0.03) (Figura 17B), cuando las células se incuban con OL. Este mismo comportamiento también se observa, de forma estadísticamente significativa, al comparar la condición de PA con PA/OL (Figura 17 A-B).

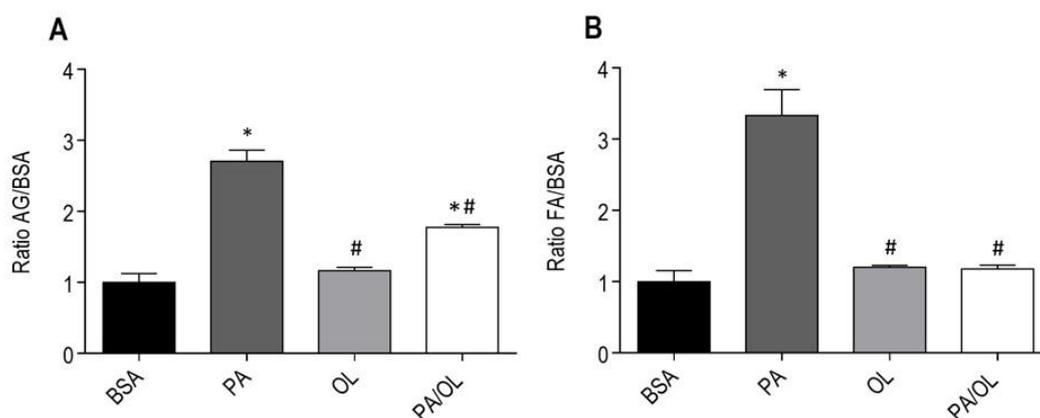


Figura 17. Cuantificación de la Apoptosis por citometría de flujo tras la incubación con los ácidos grasos (AG). Efecto de los AG, ácido palmítico (PA), ácido oleico (OL) y la mezcla en proporción 1:2 de ambos (PA/OL) durante 12 horas sobre la muerte celular de los condrocitos. En la figura se muestra (A) la Apoptosis temprana, cuantificada como la positividad de las células sólo a Anexina V/FITC, y (B) la Apoptosis tardía, cuantificada como la positividad a ambos fluoróforos (Anexina V/FITC e Ioduro de propidio). Los resultados son expresados como media \pm desviación estándar del ratio en relación a la condición basal (BSA). *, $p < 0.05$ vs BSA; #, $p < 0.05$ vs PA.

Tras observar que el PA incrementaba de forma significativa la apoptosis celular, se realizó un nuevo experimento consistente en comprobar si las células disminuían sus niveles de mortalidad al retirar el PA del medio. Para ello, tras las 12 h de incubación con PA, se cambió el medio de cultivo a las condiciones normales de cultivo de la línea celular (DMEM 10% SBF), y se cuantificó nuevamente la apoptosis tras 24 h. El análisis de los datos permite observar que las células, a las 24h de la retirada del PA, consiguen disminuir los niveles de muerte celular, recuperando los niveles obtenidos en la condición basal, BSA, mostrando, por tanto, una reducción significativa tanto de la apoptosis temprana (1.06 ± 0.03) (Figura 18A) como de la apoptosis tardía (1.21 ± 0.04) (Figura 18B).

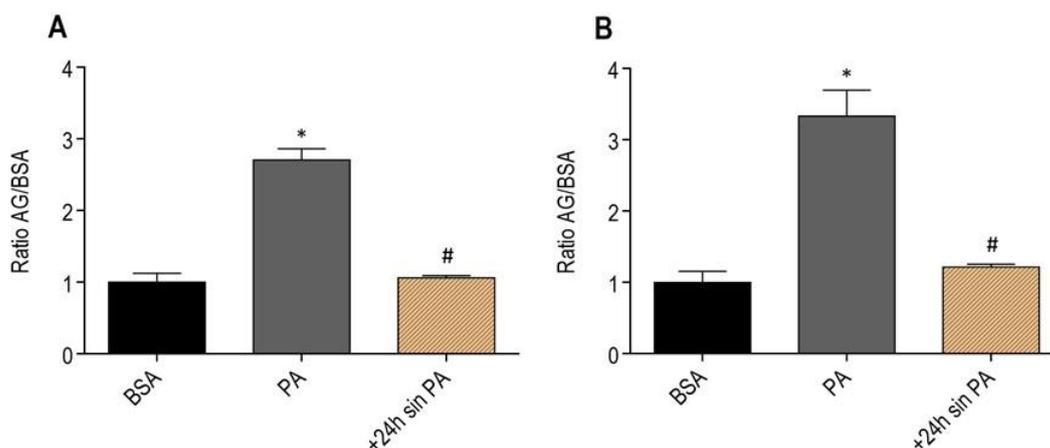


Figura 18. Cuantificación del nivel de apoptosis tras la eliminación del ácido palmítico (PA) del medio de cultivo y la incubación en condiciones habituales durante 24 horas. Tiempo tras el cual se realizó la citometría con Anexina V/FITC e Ioduro de propidio y se cuantificó (A) la apoptosis temprana y (B) la apoptosis tardía. Los resultados son expresados como media \pm desviación estándar del ratio en relación a la condición basal (BSA). *, $p < 0.05$ vs BSA; #, $p < 0.05$ vs PA.

3.2. Cuantificación del efecto de los AG sobre la actividad de Caspasas.

Tras observar el efecto del PA sobre la muerte celular y la recuperación parcial de este efecto cuando las células se incubaban de forma conjugada con OL (PA/OL en proporción 1:2), se procedió a la medida de la actividad de caspasas efectoras (Caspasa 3/7) y la caspasa inductora por la vía mitocondrial (Caspasa 9) mediante luminiscencia, tras la incubación de las células con PA y con la forma conjugada PA/OL (1:2).

Al analizar los resultados obtenidos tras 12h de incubación con PA 0.7mM se aprecia un aumento significativo de la actividad de las caspasas 3/7 (4.31 ± 0.54) (Figura 19A) y caspasa 9 (2.83 ± 0.25) (Figura 19B) en relación a BSA. En cambio, al incubarlas en presencia de PA/OL, la actividad de ambos tipos de caspasas no difiere de forma significativa en relación a BSA, mientras que sí se observa una reducción significativa de la actividad de estas proteasas cuando las células se incuban con PA/OL (Caspasa 3/7: 0.82 ± 0.11 ; Caspasa 9: 0.84 ± 0.10) en un análisis comparativo con la actividad obtenida para ambas tras la incubación de las células con PA (Figura 19).

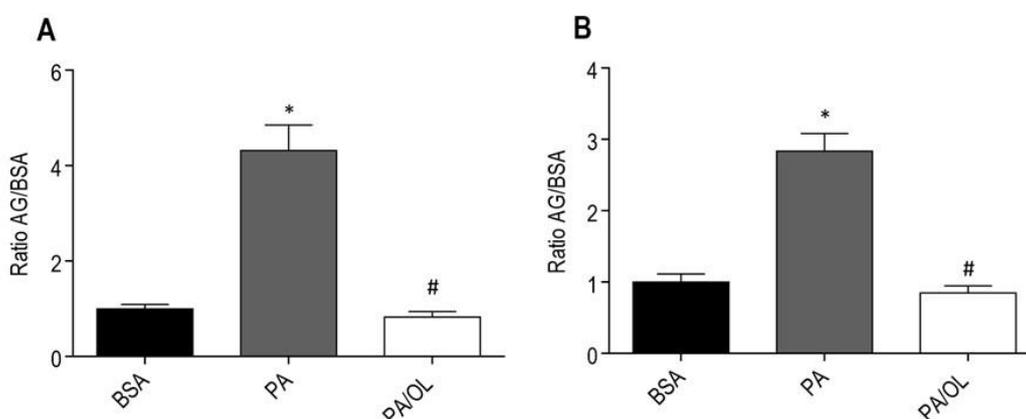


Figura 19. Cuantificación de la actividad de Caspasas. Se representa la actividad de (A) caspasas efectoras 3/7 y (B) de la caspasa 9, inductora de muerte celular por la vía mitocondrial tras la incubación durante 12 horas con 0.7mM de palmítico (PA) o la mezcla de palmítico y oleico en proporción 1:2 (PA/OL). Se expresan los resultados como la media \pm desviación estándar del ratio en relación a la condición basal (BSA). *, $p < 0.05$ vs BSA; #, $p < 0.05$ vs PA.

4. Evaluación de los efectos de los AG sobre el estrés oxidativo celular.

4.1. Producción de especies reactivas de oxígeno y expresión de genes relacionados con la detoxificación.

Se evaluó la producción de ROS por citometría de flujo utilizando dos fluoróforos distintos: DCFH-DA, normalmente utilizado para medir la producción de H_2O_2 y otros oxidantes producidos a nivel intracelular; y Mitosox™, colorante fluorogénico que se dirige a la mitocondria y se oxida rápidamente por acción específica de los superóxidos, y no por otras especies reactivas (Figura 20). Además se cuantificó la expresión génica de

CAT y SOD2 como agentes detoxificantes de H_2O_2 y anión superóxido (O_2^-) respectivamente.

El análisis de los niveles de producción de ROS citoplasmáticos, tras la incubación de los condrocitos con las distintas condiciones de AG, muestra que la tasa de producción de ROS medida por la oxidación de DCFH, es significativamente menor en el caso de los AG analizados, tanto PA (0.5 ± 0.08) como PA/OL (0.44 ± 0.04) en relación a la condición basal, BSA (Figura 20A). Al analizar los niveles de producción de ROS entre PA y PA/OL no se encuentran diferencias, produciendo ambas condiciones niveles muy similares. Para profundizar más en el estrés oxidativo se analizó la expresión génica de CAT, enzima detoxificadora de H_2O_2 y se observa un aumento significativo de su ratio de expresión en las células tratadas con PA (1.34 ± 0.02) y PA/OL (1.55 ± 0.03) en relación a la condición basal, BSA (Figura 20B).

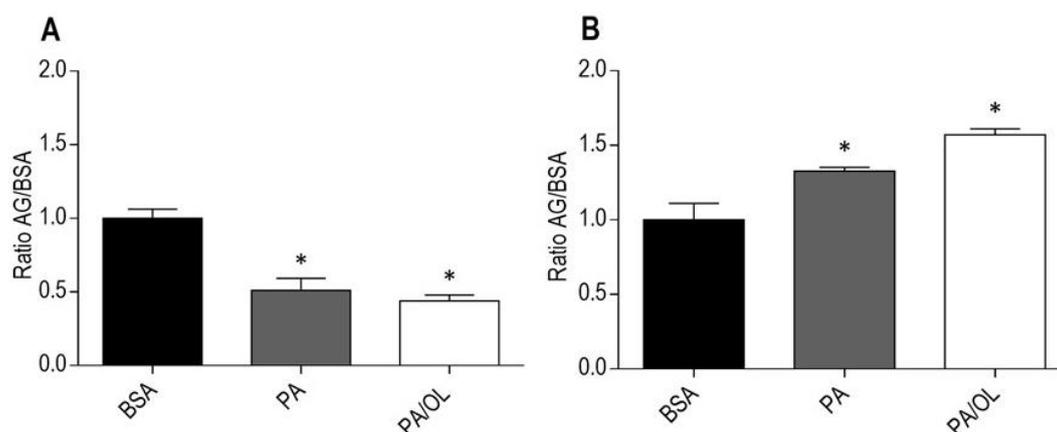


Figura 20. Evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) citoplasmáticas tras la incubación durante 12 horas con las diferentes condiciones: condición basal (BSA), 0.7mM de ácido palmítico (PA) y la mezcla de PA y ácido oleico en proporción 1:2 (PA/OL). **(A)** Producción de ROS citoplasmáticos cuantificados por DCFH-DA y **(B)** la expresión génica de Catalasa (CAT) como enzima responsable de su detoxificación. Se representa el valor medio \pm desviación estándar del ratio de cada condición en relación a BSA. *, $p < 0.05$ vs condición basal (BSA); #, $p < 0.05$ vs PA.

Al cuantificar la producción de anión superóxido mitocondrial con Mitosox™ (Figura 21A), se observa un aumento estadísticamente significativo en los niveles de producción de O_2^- tras la incubación con PA (6.46 ± 0.2) al compararlo con la condición BSA. Al realizar el análisis frente a la condición PA/OL (0.81 ± 0.10), este incremento de producción de O_2^- también es estadísticamente significativo, sin encontrar diferencias significativas entre

esta condición (PA/OL) y BSA. En el análisis de la expresión génica de la enzima encargada de la detoxificación de esta especie reactiva, SOD2, los niveles de expresión no muestran ninguna modulación significativa entre las distintas condiciones testadas (Figura 21B).

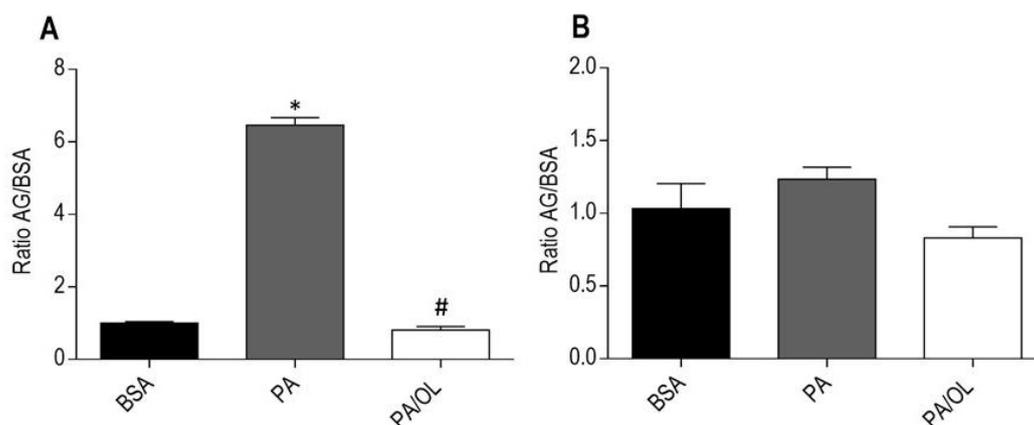


Figura 21. Evaluación de la producción de anión superóxido mitocondrial tras la incubación durante 12 horas con las diferentes condiciones: condición basal (BSA), 0.7mM de ácido palmítico (PA) y la mezcla de PA y ácido oleico en proporción 1:2 (PA/OL). **(A)** Tasa de producción de anión superóxido, cuantificado con MitoSox™ y **(B)** la expresión génica de la enzima de detoxificación correspondiente, superóxido dismutasa 2 (SOD2). Se representa el valor medio \pm desviación estándar del ratio de cada condición en relación a BSA. *, $p < 0.05$ vs condición basal (BSA); #, $p < 0.05$ vs PA.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, en los que se observa un aumento en la producción de O_2^- tras la incubación de los condrocitos con PA, se planteó la hipótesis de que podría ser este incremento del estrés oxidativo celular una de las posibles causas del aumento de la apoptosis descrito en el apartado anterior. Por esto, se crecieron las células en presencia de PA, pero se realizó un pre-tratamiento con NAC 1mM, como bloqueante de ROS, tras lo cual se volvió a cuantificar la apoptosis. Tras el análisis, se observa una reducción significativa de la apoptosis temprana (1.06 ± 0.03) y tardía (1.21 ± 0.04) al tratar a las células con NAC previamente a la incubación con PA (Figura 22).

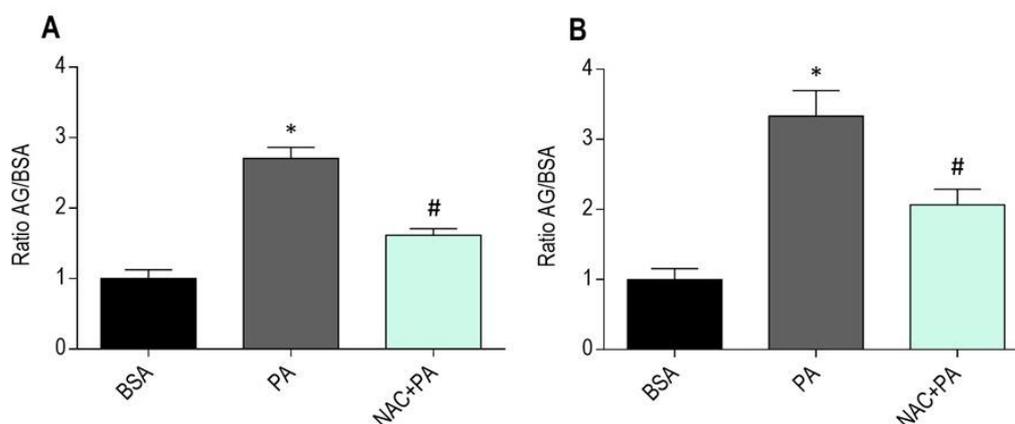


Figura 22. Comparación de niveles de Apoptosis de los condrocitos pretratados o no con N-Acetilcisteína (NAC) 1mM. **(A)** Apoptosis temprana; **(B)** Apoptosis tardía. Se representa el valor medio \pm desviación estándar del ratio de PA en relación a BSA. *, $p < 0.05$ vs condición basal (BSA); #, $p < 0.05$ vs PA. PA: ácido palmítico; BSA: condición basal; NAC: N-acetilcisteína.

4.2. Cuantificación de la producción de Óxido Nítrico

El NO es considerado otra de las especies reactivas, en este caso de nitrógeno, de gran importancia en el estrés oxidativo celular y su producción en exceso es otro de los acontecimientos que ocurren durante el proceso catabólico del cartílago. Por este motivo se evaluó el efecto de los AG en la producción de este metabolito, midiendo sus niveles en los sobrenadantes celulares tras la incubación con cada una de las condiciones estudiadas.

Los resultados muestran un incremento estadísticamente significativo de los niveles de NO en el medio tras la incubación con PA (14.95 ± 1.98) y PA/OL (10.55 ± 1.35) en relación a BSA. El análisis de los datos también permite observar que la co-incubación de PA con OL (PA/OL) produce niveles menores de NO en relación a la incubación individual con PA pese a que esta disminución no es estadísticamente significativa (Figura 23).

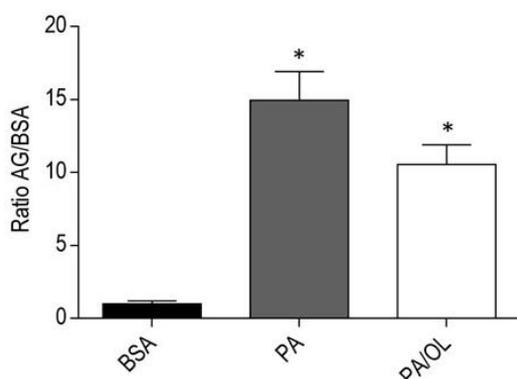


Figura 23. Niveles de producción de Óxido Nítrico tras la incubación durante 12 horas con las diferentes condiciones: condición basal (BSA), 0.7mM de ácido palmítico (PA) y de la mezcla de PA y ácido oleico en proporción 1:2 (PA/OL). Se representa el valor medio \pm desviación estándar del ratio de PA y PA/OL en relación a BSA. *, $p < 0.05$ vs condición basal (BSA).

5. Análisis de la función mitocondrial

Para evaluar los principales parámetros de la función mitocondrial tras la incubación con los diferentes AG, se analizaron los datos de OCR obtenidos con el *SeaHorse XFp Extracellular Flux Analyzer* tras el estímulo con OLG, FCCP y Rot/AntA, representados en la Figura 24. Tras la elaboración de un gráfico donde se representa el OCR frente al tiempo, puede observarse para cada condición, tanto la respiración basal como las respuestas a las inyecciones en serie de los moduladores de la respiración. El análisis de los valores de OCR obtenidos para los condrocitos crecidos en condición basal (BSA) y en presencia de los diferentes AG, permitió observar una menor tasa de consumo de oxígeno cuando las células se incubaban con PA frente a BSA, recuperándose este valor ligeramente en las condiciones OL y PA/OL, pero siendo siempre menor que en condición basal. En este gráfico también se puede observar una menor respuesta a los moduladores de la respiración mitocondrial en las células crecidas en presencia de PA que en el resto de condiciones. Para poder valorar de forma más precisa la función mitocondrial en cada condición, se calcularon distintos parámetros a partir de los datos de OCR mostrados en este gráfico, explicados y analizados detalladamente a continuación.

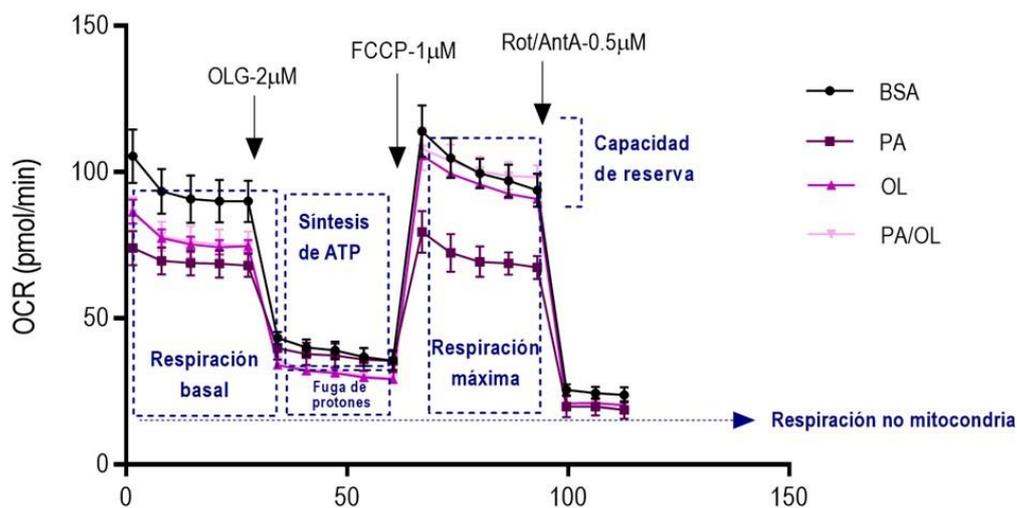


Figura 24. Representación de los datos de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) frente al tiempo obtenidos en el *SeaHorse XFp Extracellular Flux Analyzer* de los condrocitos tras la incubación con las diferentes condiciones: condición basal (BSA), 0.7mM de ácido palmítico (PA), oleico (OL), o la mezcla de ambos en proporción 1:2 (PA/OL). En el gráfico se muestra los momentos en los que se inyectan los distintos estímulos: 2µM Oligomicina (OLG), 1µM Carbonilo cianuro-4 (trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP) y 0.5µM Rotenona/AntimicinaA (Rot/AntA); y se representan los rangos de OCR que corresponden a los parámetros que permiten evaluar la función mitocondrial. Cada condición, se realiza por triplicado quedando representado en el gráfico, la media \pm desviación estándar.

El primer parámetro valorado es la **respiración basal**, indicada por el OCR inicial previo a la inyección de los moduladores a la que se le resta el valor de OCR no mitocondrial obtenido tras la inyección de Rot/AntA. Se observa que la respiración basal, expresada en pmol/min, tras la incubación con los AG es menor en relación a BSA (66.15 ± 3.15), siendo la incubación con PA (49.37 ± 0.64) la que tiene un valor significativamente más bajo en relación a BSA, sin ser esta diferencia significativa respecto a las condiciones OL (54.30 ± 1.49) y PA/OL (55.97 ± 2.50). Al hacer la comparación de este parámetro entre las células incubadas con PA y las otras dos condiciones de AG, OL y PA/OL, no se observan diferencias significativas pese a reflejarse un ligero aumento en las condiciones que presentan OL (Figura 25).

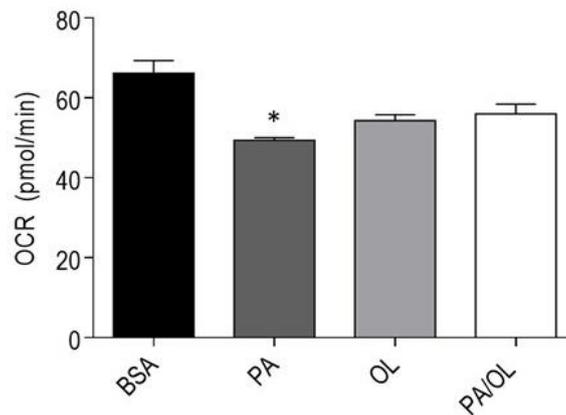


Figura 25. Tasa de consumo de oxígeno (OCR) correspondiente a la Respiración mitocondrial basal. Se expresa el valor medio de OCR \pm desviación estándar de los condrocitos tras la incubación de 12 horas con 0.7mM de ácido palmítico (PA), ácido oleico (OL) y la mezcla de ambos (PA/OL) en proporción 1:2; *, $p < 0.05$ vs condición basal (BSA).

Tras la inyección del primer modulador, $2 \mu\text{M}$ de OLG, se produce una disminución en la tasa de consumo de oxígeno (por inhibición de la ATP sintasa o complejo V de la CTE). La diferencia de este valor de OCR respecto al basal representa la porción de respiración basal que se estaba utilizando para la **producción de ATP** por parte de las mitocondrias. Se observa un descenso estadísticamente significativo de este parámetro en los condrocitos incubados con PA (32.67 ± 0.12) en relación a BSA (54.41 ± 2.74), mientras que tanto OL (45.39 ± 1.35) como PA/OL (45.25 ± 2.46) no muestran diferencias significativas con respecto a la condición basal. Sin embargo estas dos condiciones presentan de forma significativa un mayor OCR destinado a la producción de ATP que los incubados con PA (Figura 26A). Al valorar la **eficiencia de acoplamiento**, expresada como el porcentaje de

OCR destinado a la síntesis de ATP en relación al OCR basal, se observa que este era significativamente menor cuando los condrocitos se incuban con PA (66.18 ± 0.62), tanto en relación a BSA (82.26 ± 0.23) como en relación a OL (83.57 ± 0.18) o PA/OL (80.82 ± 0.79) (Figura 26B).

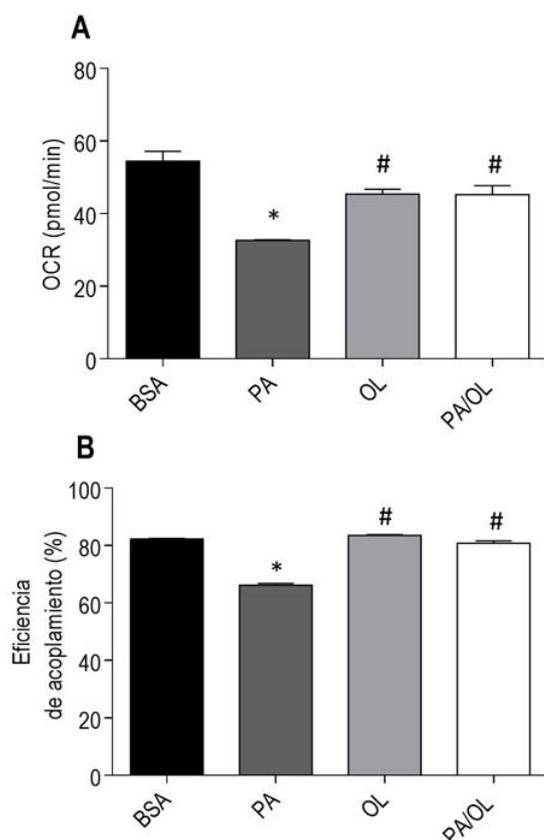


Figura 26. Tasa de consumo de oxígeno (OCR) correspondiente a la producción de ATP mitocondrial y porcentaje de eficiencia de acoplamiento. Tras la incubación durante 12 horas de los condrocitos con 0.7mM de ácido palmítico (PA), ácido oleico (OL) y la mezcla de ambos (PA/OL) en proporción 1:2; se midió: **(A)** OCR correspondiente a la producción de ATP en la mitocondria, calculado como la diferencia entre el OCR basal y el obtenido tras la inyección de 2 μ M de Oligomicina; y **(B)** Eficiencia de acoplamiento expresada como porcentaje de OCR para síntesis de ATP en relación al OCR basal. Todos los valores están expresados como el valor medio \pm desviación estándar. *, $p < 0.05$ vs condición basal (BSA); #, $p < 0.05$ vs PA.

Con la inyección del segundo modulador, 1 μ M de FCCP, al quedar inhibida la transferencia de electrones a través de la CTE, se produce un consumo máximo del oxígeno por parte del complejo IV. Este valor de OCR permite valorar la **respiración máxima** en cada caso y el análisis de los datos refleja un descenso significativo en la condición de PA (60.82 ± 2.90) tanto en relación a BSA (90.11 ± 4.42) como en relación a OL (85.36 ± 0.33) y PA/OL (89.25 ± 4.16). Sin observar diferencias significativas de OL y PA/OL en relación a BSA (Figura 27A). La diferencia entre el OCR máximo, obtenido tras la inyección de FCCP, y el OCR basal, permite valorar la **capacidad respiratoria de reserva**, que indica la capacidad de los condrocitos para responder a una demanda energética. Se

observa una disminución significativa de este parámetro en el caso de la incubación con PA (11.46 ± 2.27) en relación a BSA (23.97 ± 1.27) y un aumento significativo en las condiciones OL (31.06 ± 1.16) y PA/OL (33.28 ± 1.66) tanto en relación a la condición basal como al PA (Figura 27B).

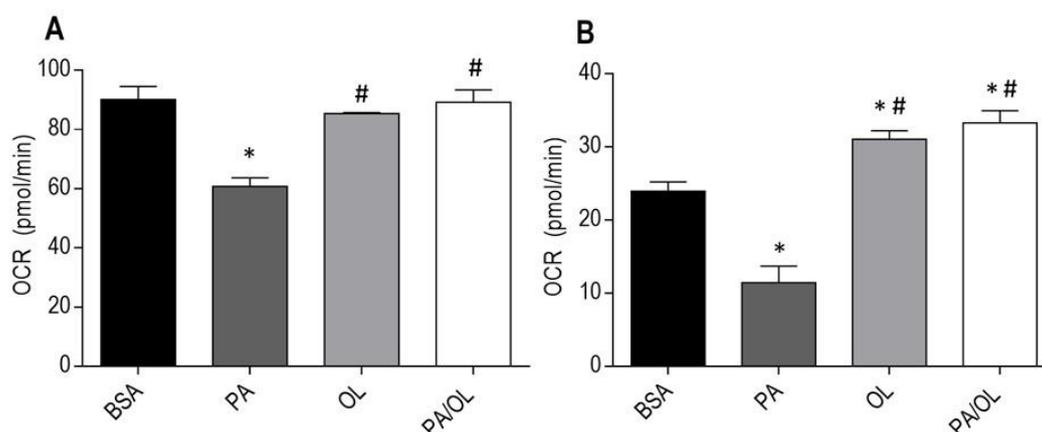


Figura 27. Tasa de consumo de oxígeno (OCR) correspondiente a la Respiración mitocondrial máxima y Capacidad de reserva. **(A)** Consumo de oxígeno desde el mínimo obtenido tras inyección de 2 μ M de oligomicina hasta el máximo tras la inyección de 1 μ M de FCCP, representando así la Respiración máxima de los condrocitos tras la incubación de 12 horas con 0.7mM de ácido palmítico (PA), ácido oleico (OL) y la mezcla de ambos (PA/OL) en proporción 1:2. **(B)** Capacidad respiratoria de reserva (%): porcentaje de OCR máximo tras la inyección de 1 μ M FCCP en relación al OCR basal tras la incubación de 12 horas con 0.7mM de PA, OL o PA/OL. Se representan en ambos casos el valor medio \pm desviación estándar; *, $p < 0.05$ vs condición basal (BSA); #, $p < 0.05$ vs PA.

Tras la última inyección moduladora, 0.5 μ M de Rot/AntA, se produce un descenso del OCR por inhibición de los complejos I y III de la CTE, anulando por tanto la respiración mitocondrial y permitiendo así conocer el OCR debido a procesos fuera de la mitocondria. La **respiración no mitocondrial** es ligeramente menor en los condrocitos incubados con los AG, sin encontrar diferencias significativas en ningún caso respecto a BSA (Figura 28A). La diferencia entre el mínimo de OCR obtenido tras la inyección de OLG y la respiración no mitocondrial, permite estimar la **fuga de protones**, parámetro que puede informar sobre un posible daño mitocondrial o sobre el mecanismo de regulación en la producción del ATP mitocondrial. Tras la incubación con los AG, y en relación a BSA (11.73 ± 0.41), se observa un aumento significativo de este parámetro en los condrocitos incubados con PA (16.70 ± 0.52). Por el contrario, en los condrocitos incubados con OL (8.92 ± 0.15) se produce una fuga de protones significativamente menor que en la condición de BSA; mientras que no se encontraron diferencias significativas en el caso de la incubación con

PA/OL (10.72 ± 0.04) en relación a BSA. Al comparar el aumento de la fuga de protones de las células crecidas en presencia de PA con los valores obtenidos con las otras condiciones de AG, se encuentra una reducción estadísticamente significativa en las condiciones de OL y PA/OL en relación a PA (Figura 28B).

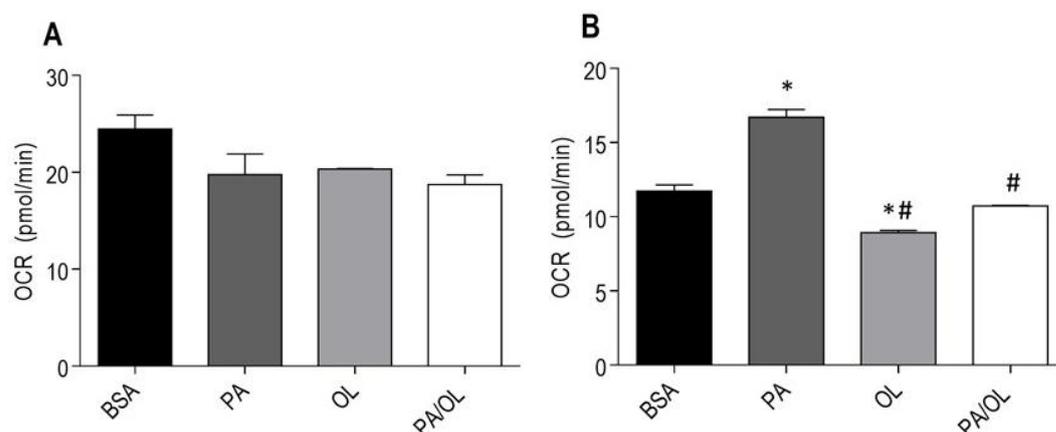


Figura 28. Tasa de consumo de oxígeno (OCR) no mitocondrial y OCR correspondiente a la Fuga de protones. **(A)** Consumo de oxígeno tras la inyección de la mezcla de Rotenona y Antimicina A a $0.5 \mu\text{M}$ (inhibidores de los complejos I y III, respectivamente) de los condrocitos tras la incubación de 12 horas con 0.7mM de ácido palmítico (PA), ácido oleico (OL) y la mezcla de ambos (PA/OL) en proporción 1:2; y que representa la tasa de consumo de oxígeno debida a procesos que ocurren fuera de la mitocondria. **(B)** Fuga de protones: diferencia del OCR tras la inyección de $2 \mu\text{M}$ de oligomicina y el OCR no mitocondrial que representa la Fuga de protones de los condrocitos tras la incubación de 12 horas con 0.7mM de ácido palmítico (PA), ácido oleico (OL) y la mezcla de ambos (PA/OL) en proporción 1:2. Se representan en ambos casos el valor medio \pm desviación estándar; *, $p < 0.05$ vs condición basal (BSA); #, $p < 0.05$ vs PA.

Para analizar si las diferencias encontradas podían deberse a diferencias en la cantidad de mitocondrias tras la incubación con cada una de las condiciones, se cuantificó el número de copias de ADNmt.

Tal y como se muestra en la Figura 29, no se observan diferencias significativas de este parámetro tras la incubación con AG en relación a la condición basal (BSA).

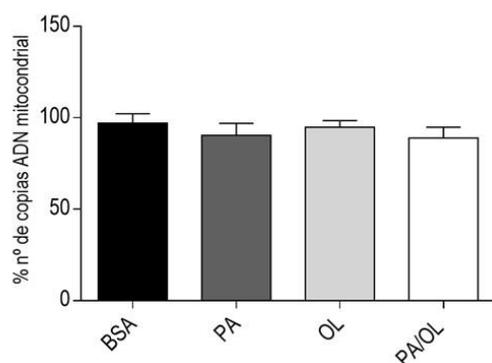


Figura 29. Número de copias de ADN mitocondrial tras la incubación durante 12 horas con las diferentes condiciones: condición basal (BSA), 0.7mM de ácido palmítico (PA), de ácido oleico (OL) de la mezcla de PA y ácido oleico en proporción 1:2 (PA/OL). Se determina calculando la relación entre el número de copias del gen ribosomal mitocondrial 12S (12S-rRNA) y el gen nuclear RNAsaP (12S-rRNA/RNAsaP). En la figura se representa el valor medio \pm desviación estándar del porcentaje para cada condición en relación a BSA (100%). *, $p < 0.05$ vs condición basal (BSA).

6. Análisis de la función glucolítica a través de la medida de la tasa de acidificación extracelular (ECAR)

Para evaluar los principales parámetros de la función glucolítica tras la incubación con los diferentes AG, se analizaron los datos de ECAR obtenidos en el *SeaHorse XFp Extracellular Flux Analyzer* tras el estímulo con Glucosa, OLG y 2-DG, representados en la Figura 30. El análisis de los valores de ECAR obtenidos para las células incubadas en BSA y en presencia de cada una de las condiciones de AG testadas, permitió observar diferencias importantes sobre todo tras la inyección de los distintos moduladores en cada condición respecto a BSA, siendo la más llamativa la diferencia tras el estímulo con OLG. Para definir y valorar el significado de los datos de ECAR obtenidos, se calcularon distintos parámetros que permiten valorar la función glucolítica en cada caso.

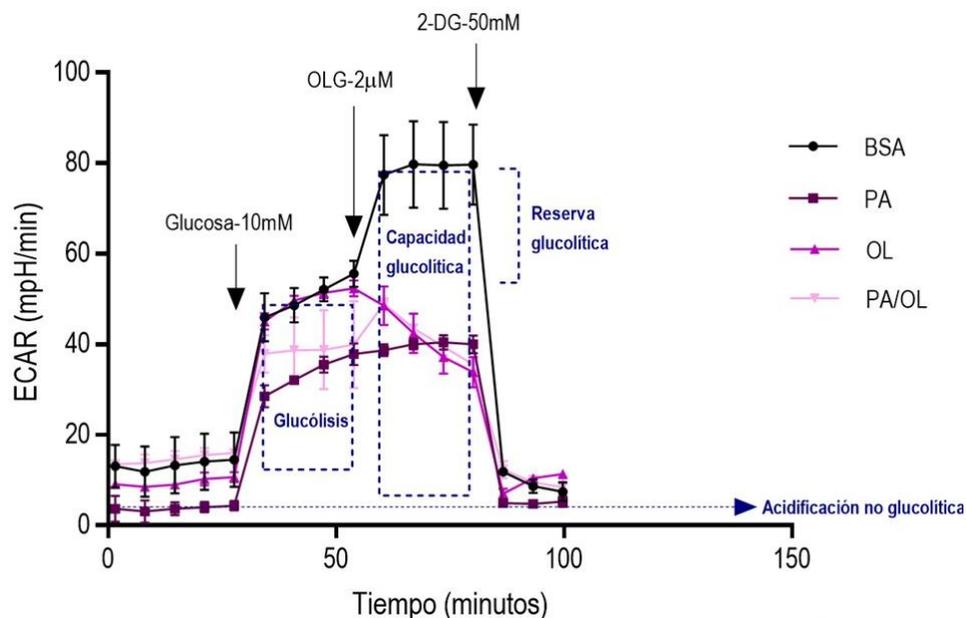


Figura 30. Representación de los datos de la tasa de acidificación extracelular (ECAR) frente al tiempo obtenidos en el SeaHorse XFp Extracellular Flux Analyzer de los condrocitos tras la incubación con las diferentes condiciones: condición basal (BSA), 0.7mM de ácido palmítico (PA), oleico (OL), o la mezcla de ambos en proporción 1:2 (PA/OL). En el gráfico se muestra los momentos en los que se inyectan los distintos estímulos: 10 mM Glucosa, 2µM Oligomicina (OLG) y 50 mM Deoxiglucosa (2-DG; y se representan los rangos de ECAR que corresponden a los parámetros que permiten evaluar la función glucolítica. Cada condición se realiza por triplicado quedando representado en el gráfico, la media \pm desviación estándar.

Antes de la primera inyección de los moduladores, se detecta un ECAR basal, que indica la **acidificación no glucolítica**, debida a procesos distintos a la glucólisis, ya que en

ese momento las células están en un medio que no contiene glucosa que pueda incorporar a la cascada glucolítica. Esta tasa es significativamente menor tras la incubación con PA (3.44 ± 1.80) tanto en relación a BSA (11.51 ± 6.74) como en relación a OL (12.12 ± 2.60) y PA/O (15.51 ± 1.13), sin encontrar diferencias significativas entre estas dos últimas condiciones y la condición basal (Figura 31).

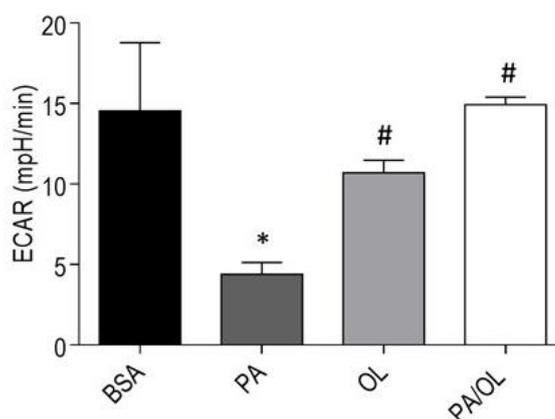


Figura 31. Tasa de acidificación del medio extracelular (ECAR) correspondiente a la acidificación no glucolítica, es decir, la acidificación debida a procesos distintos a la glucólisis. Se muestra el ECAR basal de los condrocitos tras la incubación durante 12 horas con las diferentes condiciones: condición basal (BSA), 0.7mM de ácido palmítico (PA), oleico (OL), o la mezcla de ambos en proporción 1:2 (PA/OL); Se representan en ambos casos el valor medio \pm desviación estándar; *, $p < 0.05$ vs condición basal (BSA); #, $p < 0.05$ vs PA.

Tras la inyección del primer modulador (Glucosa 10mM) se produce un aumento de ECAR como resultado de la actividad glucolítica de los condrocitos, donde la glucosa se transforma en el producto final, lactato, produciéndose la liberación de protones al medio y por tanto la acidificación del mismo. Esto permite valorar por tanto el parámetro **glucólisis**, por la diferencia entre el ECAR tras la administración de glucosa y la acidificación basal. Se observa una menor acidificación debida a glucólisis en las condiciones PA y PA/OL tanto en relación a BSA como en relación al OL, pero sin ser estas diferencias estadísticamente significativas (Figura 32).

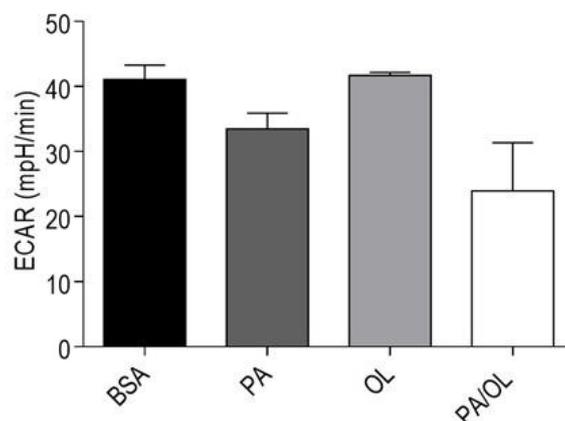


Figura 32. Tasa de acidificación del medio extracelular (ECAR) correspondiente a la Glucólisis. Se muestra el ECAR tras la inyección del primer modulador (Glucosa 10 mM) tras la incubación durante 12 horas con las diferentes condiciones: condición basal (BSA), 0.7mM de ácido palmítico (PA), oleico (OL), o la mezcla de ambos en proporción 1:2 (PA/OL); Se representan en ambos casos el valor medio \pm desviación estándar; *, $p < 0.05$ vs condición basal (BSA); #, $p < 0.05$ vs PA.

La segunda inyección corresponde a 2 μ M OLG, y produce un aumento del ECAR ya que al inhibir la OXPHOS se fuerza a los condrocitos a usar la glucólisis a su máxima capacidad. Se calculó así la **capacidad glucolítica**, tras la incubación con las distintas condiciones, como la diferencia entre este máximo de ECAR y la acidificación no glucolítica. En el caso de los condrocitos incubados con PA, OL y PA/OL, no se observa el aumento de ECAR esperado y observado en la condición basal (Figura 30). Esto se traduce por tanto, en una disminución significativa de la capacidad glucolítica tras la incubación con PA (35.69 ± 0.06), OL (31.76 ± 2.28) o PA/OL (27.51 ± 0.73) en relación a BSA (65.23 ± 2.53). Al comparar la capacidad glucolítica entre PA y las condiciones de OL y PA/OL, no se observan diferencias significativas entre las distintas condiciones de AG (Figura 33A).

Otro de los parámetros que se calcularon a partir de los valores de ECAR obtenidos con la inyección de glucosa y OLG, es la **reserva glucolítica**, expresada como el porcentaje de glucólisis que representa la capacidad glucolítica máxima. Este parámetro indica la capacidad de una célula para responder a una demanda energética, así como la proximidad de la función glucolítica al máximo teórico de la célula. Sólo las condiciones PA (107.1 ± 7.87) y OL (76.09 ± 4.63) muestran un menor porcentaje significativo de reserva glucolítica en relación a BSA (159.7 ± 14.77), y no se detectaron diferencias significativas entre las condiciones OL y PA/OL en relación a PA (Figura 33B).

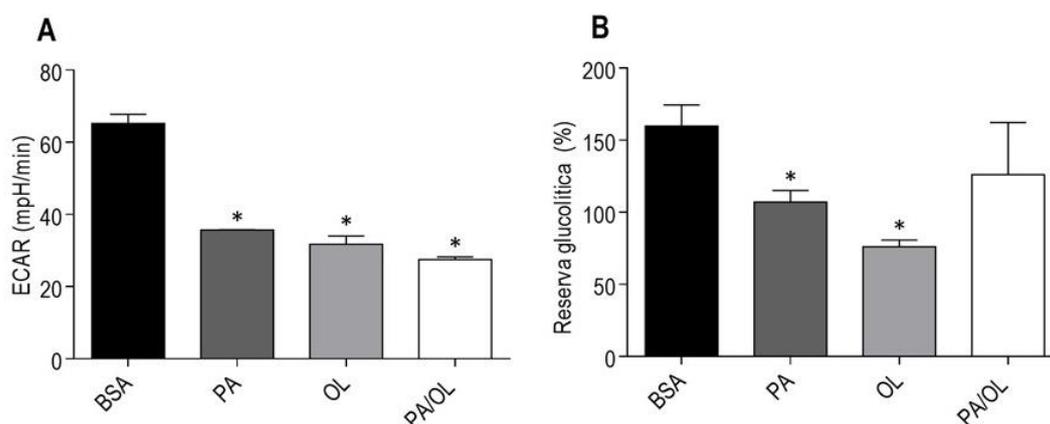


Figura 33. Tasa de acidificación del medio extracelular (ECAR) correspondiente a la Capacidad Glucolítica y % Reserva Glucolítica de los condrocitos tras la incubación durante 12 horas con las diferentes condiciones: condición basal (BSA), 0.7mM de ácido palmítico (PA), oleico (OL), o la mezcla de ambos en proporción 1:2 (PA/OL); **(A)** Capacidad glucolítica: ECAR máximo obtenido tras la inyección de 2 μ M OLG. **(B)** Reserva glucolítica: porcentaje de capacidad glucolítica en relación a la glucólisis. Se representan en ambos casos el valor medio \pm desviación estándar; *, $p < 0.05$ vs condición basal (BSA); #, $p < 0.05$ vs PA.

Por último, al inyectarse 2-DG 50 mM, se inhibe de forma competitiva la glucólisis dando lugar a una caída de ECAR. Esto permite comprobar que efectivamente el ECAR producido durante el experimento es debido a la glucólisis, alcanzando en cada una de las condiciones del experimento niveles acordes a los basales.

Como complemento al análisis de la función glucolítica se valoraron, además, los niveles de expresión de GLUT3, transportador de glucosa en la membrana celular del condrocito, así como de HK2, primer enzima de la vía glucolítica y responsable de la integración de glucosa en esta vía. Los resultados muestran que, en relación a BSA, la incubación con PA indujo un aumento significativo del ratio de expresión tanto de GLUT3 (3.28 ± 0.15) como de HK2 (1.76 ± 0.04); sin embargo, la expresión de estos genes no se modula tras la incubación con OL o PA/OL, mostrando niveles muy similares a la condición basal (Figura 34).

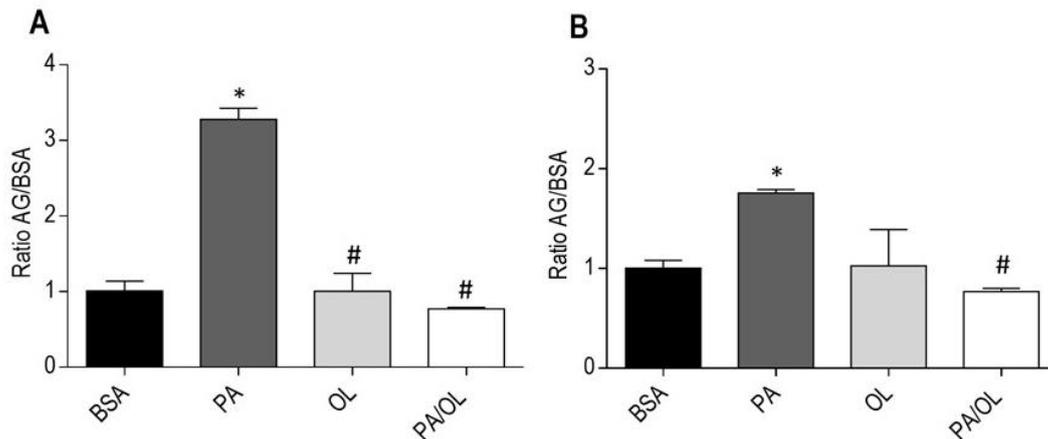


Figura 34: Expresión génica de **(A)** GLUT3 y **(B)** HK2 tras la incubación con 0.7mM palmítico (PA), oleico (OL) o la mezcla en proporción 1:2 de ambos (PA/OL) durante 12 horas. Los resultados se expresan media \pm desviación estándar del ratio en relación a la condición basal (BSA). *, $p < 0.05$ vs BSA; #, $p < 0.05$ vs PA.

7. Evaluación del balance energético.

Para evaluar el balance energético celular tras la incubación con las distintas condiciones de AG, se estudió en primer lugar la contribución de la OXPHOS y la glucólisis a la producción de ATP, a partir de los datos obtenidos en los experimentos de los apartados 5 (OCR) y 6 (ECAR). En base a estos resultados se cuantificó la producción de ATP por luminiscencia

7.1. Estudio de la contribución de la OXPHOS y la glucólisis a la producción de ATP

A partir de los datos obtenidos con el *SeaHorse XFp Extracellular Flux Analyzer* tanto de OCR como de ECAR, tras la incubación con las diferentes condiciones de AG, se estimó la producción de ATP tanto de OXPHOS como procedente de la glucólisis, respectivamente. De modo que, para realizar una estimación del ATP total se sumaron ambos parámetros.

En la Figura 35 se representan las tres tasas de producción de ATP calculadas para cada una de las condiciones. Se observan tasas de producción de ATP glucolítico, que son significativamente menores en los condrocitos incubados con PA (42.95 ± 1.71) y PA/OL (35.66 ± 3.07), en relación a BSA (55.96 ± 0.94). Sin embargo, en la condición OL (61.14 ± 3.66) la producción de ATP es estadísticamente mayor al compararlo con la condición PA (Figura 35). La tasa de producción de ATP procedente de OXPHOS tiene

valores inferiores en los condrocitos incubados con AG en relación a BSA, siendo significativamente menor en los condrocitos incubados con PA (32.67 ± 0.12) tanto en relación a BSA (54.41 ± 2.74) como en relación a OL (45.39 ± 1.35). Estos resultados se traducen por tanto en una reducción significativa del ATP total cuando los condrocitos se incuban con PA (211.22 ± 1.11) en comparación tanto con BSA (336.2 ± 13.18) como con las otras condiciones, OL (294.9 ± 3.27) y PA/OL (268.7 ± 15.77) (Figura 36).

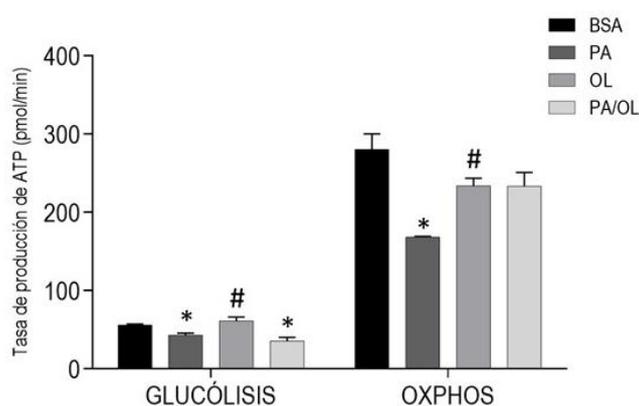


Figura 35. Tasas de producción de ATP en la glucólisis y en la OXPPOS estimados a partir de los valores de consumo de oxígeno (OCR) y tasa de producción de protones (PPR) Se representa la tasa de producción de ATP en pmol/min tras la incubación durante 12 horas con las diferentes condiciones: condición basal (BSA), 0.7mM de ácido palmítico (PA), oleico (OL), o la mezcla de ambos en proporción 1:2 (PA/OL); y calculadas a partir de los de OCR y PPR y la relación estequiométrica con la tasa de producción de ATP de 5 y 1, respectivamente. Se representan el valor medio \pm desviación estándar; *, $p < 0.05$ vs condición basal (BSA); #, $p < 0.05$ vs PA.

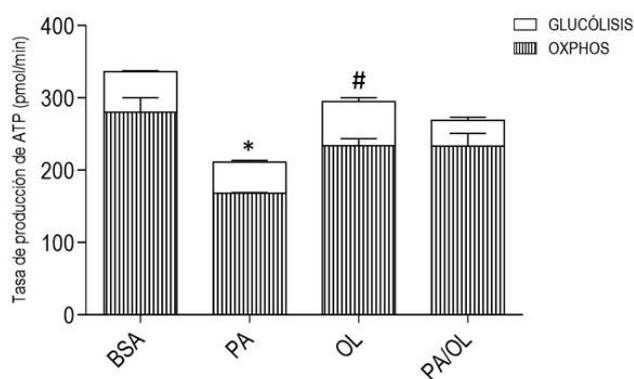


Figura 36. Tasa de producción de ATP total estimados a partir de los valores de consumo de oxígeno (OCR) y tasa de producción de protones (PPR) . Se representa la tasa de producción de ATP total en pmol/min y la distribución de la tasa correspondiente a la producción vía OXPPOS (rayas) y vía glucolítica (blanco) para cada una de las condiciones. Se representa el valor medio \pm desviación estándar; *, $p < 0.05$ vs condición basal (BSA); #, $p < 0.05$ vs PA.

7.2. Cuantificación directa de ATP total y mitocondrial.

Tras los resultados obtenidos en las estimaciones de producción de ATP con los datos de OCR y ECAR obtenidos con el *SeaHorse XFp Extracellular Flux Analyzer*, se cuantificó la producción de ATP total y mitocondrial por luminiscencia tras la incubación de los condrocitos con las diferentes condiciones de AG durante 12 h. Para ello, transcurridas las 12 h se incubaron los condrocitos durante otras 2 h con dos medios distintos: uno cuyo aditivo es la glucosa, condición a partir de la cual se cuantifica al ATP total, y otra cuyo aditivo es el piruvato y 2-DG, condición a partir de la cual se cuantifica el ATP mitocondrial, ya que con la 2-DG se inhibe la glucólisis anaerobia.

Los resultados obtenidos muestran una disminución significativa de la producción tanto de ATP total (0.24 ± 0.06) (Figura 37A) como de ATP mitocondrial (0.13 ± 0.04) (Figura 37B), expresados como ratio en relación a BSA, tras la incubación de los condrocitos con PA. En el caso de la incubación combinada PA/OL, en relación a la condición basal no se detectan diferencias significativas (0.85 ± 0.04) (Figura 37A). Tampoco se encuentran diferencias en la cuantificación de ATP mitocondrial (0.98 ± 0.04) (Figura 37B). Cuando se compara la condición PA frente a PA/OL, tanto en ATP total como en ATP mitocondrial, se observa un aumento de ambos parámetros, siendo estadísticamente significativo en ambos casos (Figura 37).

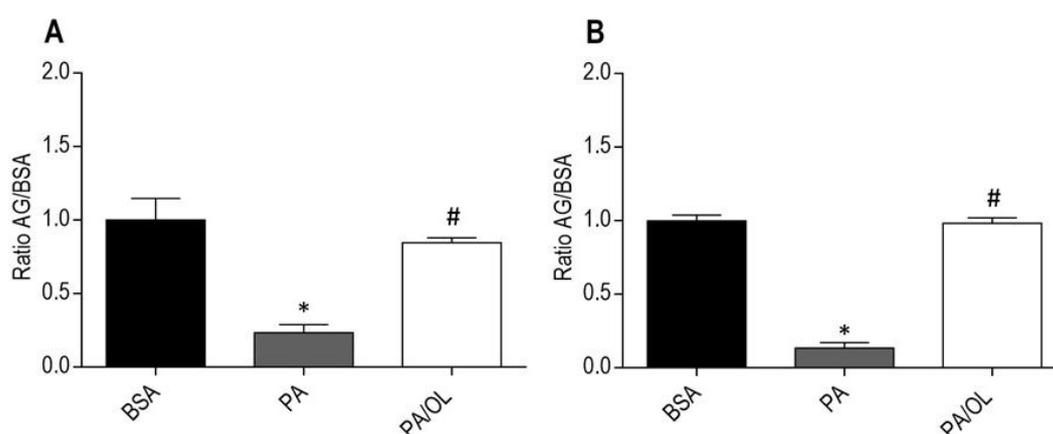


Figura 37. Cuantificación del ATP total y ATP mitocondrial por luminiscencia. Tras la incubación durante 12 horas con las diferentes condiciones: condición basal (BSA), 0.7mM de ácido palmítico (PA), y la mezcla de ambos en proporción 1:2 (PA/OL) se cuantificó, a partir de los extractos celulares, la concentración de **(A)** ATP total y **(B)** ATP mitocondrial normalizando este valor con la cuantificación de proteína total en cada caso. Se representan, para cada condición, el valor medio \pm desviación estándar del ratio en relación a BSA; *, $p < 0.05$ vs condición basal (BSA); #, $p < 0.05$ vs PA.

8. Evaluación de la formación de gotas lipídicas (*Lipid Droplets, LD*)

8.1. Tinción y cuantificación de LD

Al observar que los efectos citotóxicos y metabólicos estudiados en los condrocitos diferían tras la incubación con un AG u otro, se realizó una evaluación efecto sobre la morfología celular tras observar las imágenes obtenidas por microscopía óptica de contraste de fases, donde se reflejaron cambios estructurales en las células (Figura 38). Pueden observarse en las condiciones de PA, OL y PA/OL se observa un mayor contenido de acúmulos citoplasmáticos en relación a la condición BSA, siendo éstos más numerosos en las condiciones OL (Figura 38C) y PA/OL (Figura 38D). Por lo tanto, a la vista de estos resultados, se evaluó la posible formación de LD, ya que la formación de estas estructuras se relaciona con la citoprotección.

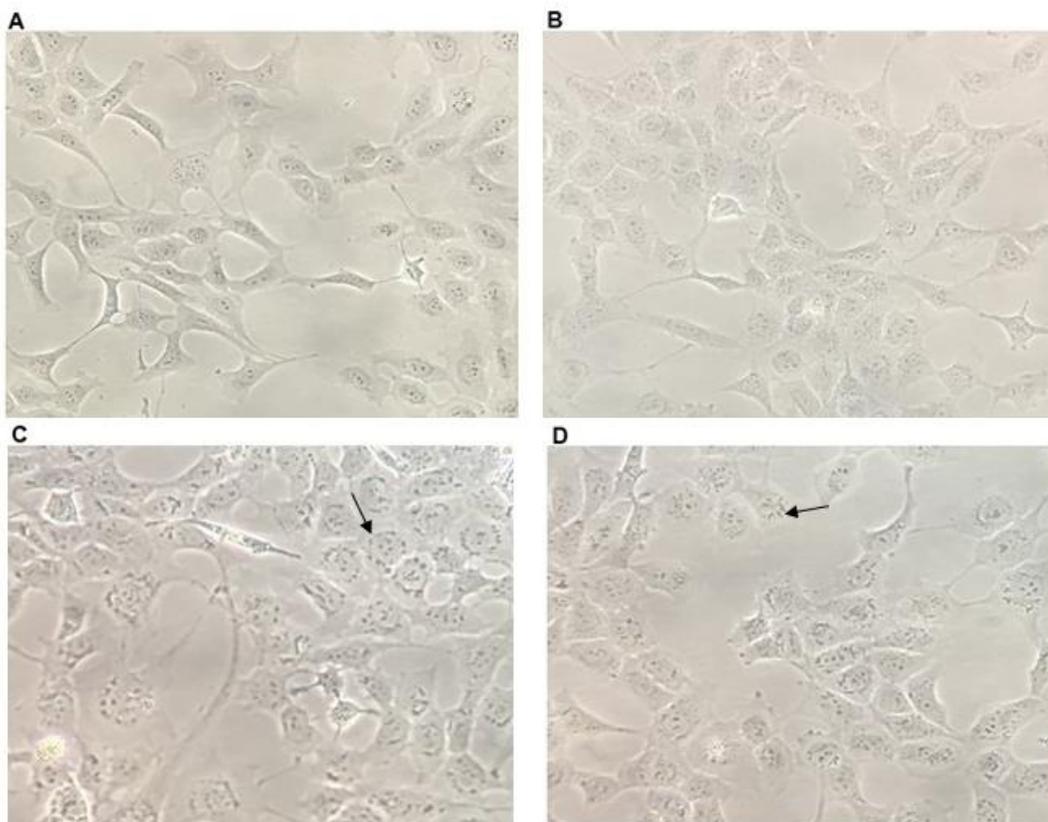


Figura 38. Imágenes representativas de los cambios estructurales detectados en los condrocitos por microscopía óptica de contraste de fases (200x) tras la incubación durante 12 horas con las diferentes condiciones: **(A)** condición basal (BSA), 0.7mM de **(B)** ácido palmítico (PA), **(C)** ácido oleico (OL), o **(D)** la mezcla de ambos en proporción 1:2 (PA/OL).

Una de las tinciones realizadas fue el Oil Red O, utilizado para la tinción de TG y lípidos neutros. Las imágenes obtenidas con este tipo de tinción tras la incubación con las diferentes condiciones de AG permiten observar los LD en un rojo intenso en las condiciones que contienen OL (OL y PA/OL) (Figura 39A). La cuantificación de las imágenes, expresada en ratio de señal positiva en relación a BSA, es significativamente mayor en las condiciones OL (105.4 ± 10.15) y PA/OL (82.44 ± 11.65), tanto en relación a BSA como en relación a la incubación con PA (38.05 ± 2.63) (Figura 39B).

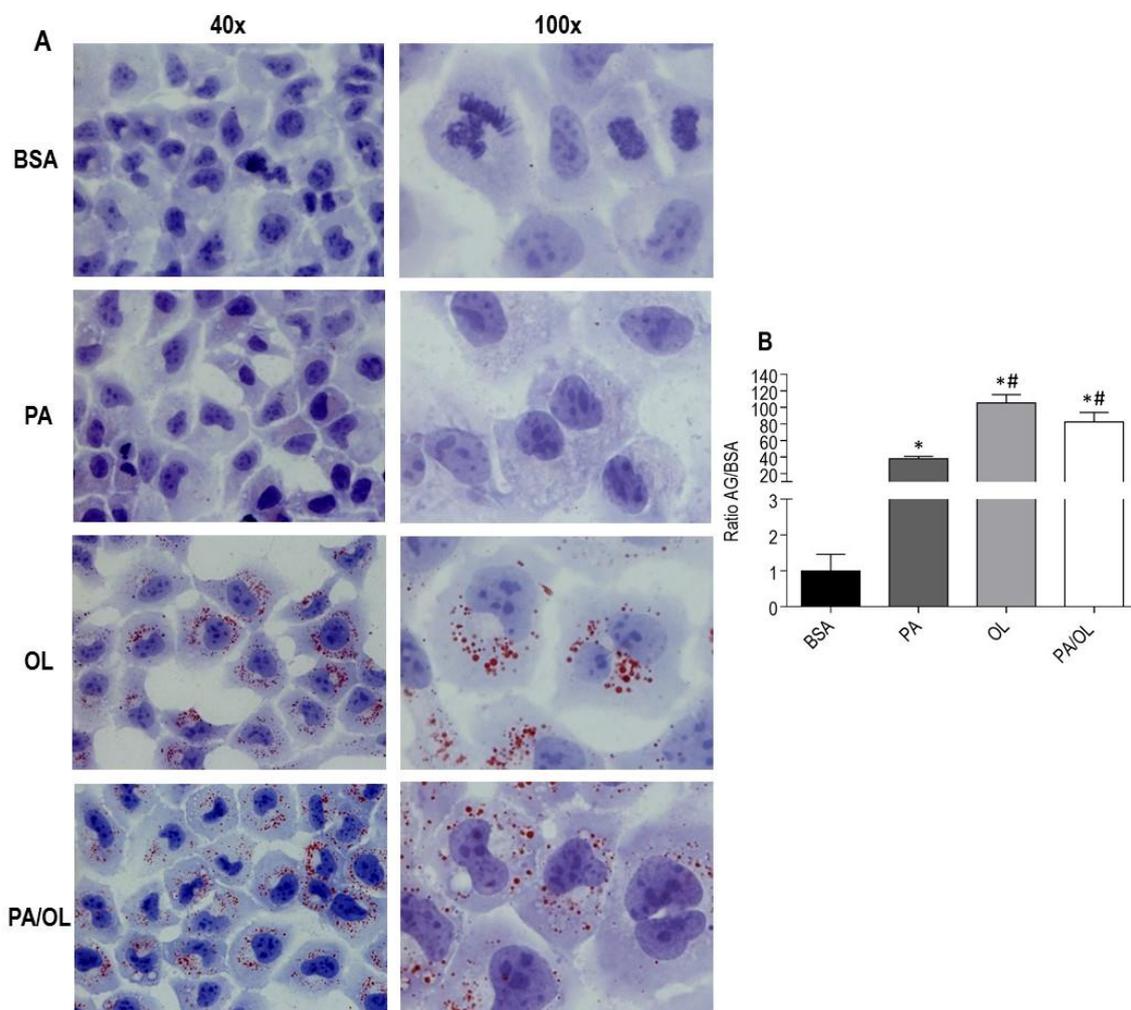


Figura 39. Imágenes obtenidas por microscopía óptica de la tinción con Oil Red O y su cuantificación tras la incubación durante 12 horas con las diferentes condiciones: condición basal (BSA), 0.7mM de ácido palmítico (PA), oleico (OL), o la mezcla de ambos en proporción 1:2 (PA/OL); **(A)** Se muestra el aumento 400x (izquierda) y 1000x (derecha), y en ambos casos puede observarse los LD en un rojo intenso y los núcleos en azul. **(B)** Cuantificación de la señal obtenida de Oil Red O con el software *Image J* a partir de las imágenes obtenidas a 40x; Se representa el valor medio \pm desviación estándar del ratio de señal positiva en cada condición en relación a BSA. *, $p < 0.05$ vs condición basal (BSA); #, $p < 0.05$ vs PA.

A continuación se realizó la tinción y cuantificación de LD en los condrocitos tratados con las mismas condiciones utilizando el colorante LD540. El LD540 es un colorante lipófilo que permite la observación microscópica por fluorescencia de este tipo de estructuras así como su cuantificación posterior por citometría de flujo. Al igual que tras el tratamiento con Oil Red O, el análisis de la intensidad de fluorescencia del LD450 reflejó que, en los casos de incubación con OL (3.48 ± 0.12) y PA/OL (2.59 ± 0.25), la presencia de LD era significativamente mayor en relación tanto a BSA como a la incubación con PA (1.53 ± 0.03) (Figura 40).

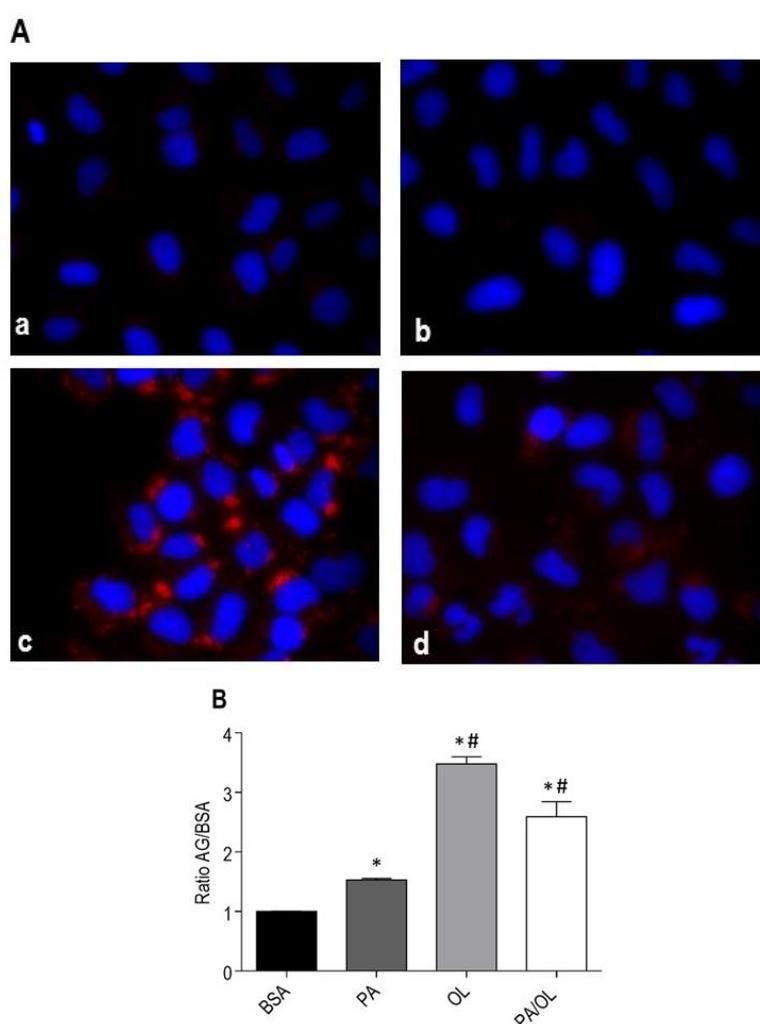


Figura 40. Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia de la tinción con LD540 y su cuantificación tras la incubación durante 12 horas con las diferentes condiciones; **(A)** Se muestra el aumento 400x donde pueden observarse las diferentes condiciones: a) condición basal (BSA), b) 0.7mM de ácido palmítico (PA), c) 0.7mM de ácido oleico (OL), o d) 0.7mM de la mezcla de ambos en proporción 1:2 (PA/OL), destacando el marcado aumento de LD en las condiciones c) OL y d) PA/OL en relación a a) BSA y b) PA. **(B)** Cuantificación de LD540 por citometría de flujo. Se representa el valor medio \pm desviación estándar del ratio de cada condición en relación a BSA. *, $p < 0.05$ vs condición basal (BSA); #, $p < 0.05$ vs PA.

8.2. Cuantificación del contenido intracelular de Triglicéridos

Para confirmar la formación de LD, por ser estructuras con un centro hidrofóbico de reserva de grasas formados fundamentalmente por TG, se cuantificó su presencia en los extractos celulares obtenidos tras la incubación con las condiciones BSA, PA, OL y PA/OL, determinando la concentración de TG para cada caso.

El análisis de los valores de Abs obtenidos permitió determinar que el contenido en TG, expresado como ratio en relación a BSA, es significativamente superior tras la incubación con PA (1.78 ± 0.01), OL (7.96 ± 1.02) y PA/OL (5.32 ± 1.07), correlacionándose este resultado con los obtenidos en las tinciones de LD. Asimismo, el contenido en TG a nivel de las células que fueron incubadas con OL (OL y PA/OL) también es significativamente mayor que en el caso de las células incubadas con PA (Figura 41).

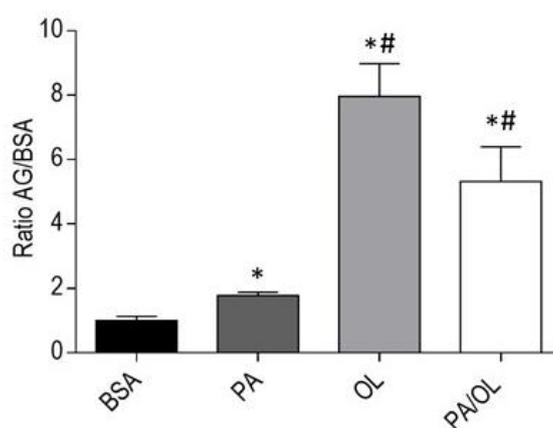


Figura 41. Cuantificación del contenido intracelular de triglicéridos tras la incubación durante 12 horas con las diferentes condiciones: condición basal (BSA), 0.7mM de ácido palmítico (PA), oleico (OL), o la mezcla de ambos en proporción 1:2 (PA/OL); Los resultados se expresan como valor medio \pm desviación estándar del ratio de cada condición en relación a BSA. *, $p < 0.05$ vs condición basal (BSA); #, $p < 0.05$ vs PA.

DISCUSIÓN



La OA es una enfermedad degenerativa con una alta prevalencia en la población (58), que puede afectar a cualquier tipo de articulación y que se caracteriza por el estrés celular y degradación de la matriz extracelular; manifestándose en primer lugar como un desequilibrio metabólico del tejido articular, seguido por cambios fisiológicos y anatómicos en la articulación. (45). Su etiología es multifactorial, lo que la convierte en una patología compleja y difícil de estratificar. Una de las divisiones propuestas define varios subtipos clínicos con características específicas, dentro de los que se encuentra el subtipo de OA de origen metabólico. Este fenotipo se caracteriza, además de por la presencia de obesidad e inflamación, por un comienzo más temprano y una progresión más severa de la enfermedad que otros fenotipos (105), lo que hace necesario el conocimiento de la etiología de este subgrupo para establecer la intervención temprana y mejorar así la calidad de vida de estos pacientes. Tanto el estrecho vínculo de la OA con el SM (179,180) de forma independiente a la obesidad, como su alta prevalencia en las articulaciones no sometidas a carga mecánica en individuos obesos (168,169), hacen pensar que existen marcadores sistémicos, hasta ahora no conocidos y relacionados con los desórdenes metabólicos, que actúan como factores etiológicos de la OA en este subgrupo clínico. Uno de los marcadores sistémicos característicos de enfermedades metabólicas crónicas relacionadas con el SM, es el aumento de los niveles circulantes de AGL, siendo el PA y el OL los mayoritarios en la dieta y en el suero. En este contexto, el estudio que da lugar a esta tesis doctoral, investiga los efectos que estos dos AG pueden tener sobre un modelo *in vitro* de condrocitos humanos.

Como primer objetivo de este trabajo, se estudiaron los efectos de PA y OL así como la mezcla de ambos (PA/OL en proporción 1:2) sobre fenómenos altamente relacionados con el proceso artrósico. La patogénesis de la OA incluye el desequilibrio en la homeostasis del cartílago articular con predominio de los fenómenos catabólicos frente a los anabólicos (17). En ese sentido juegan un papel muy importante las MMPs, enzimas responsables de la degradación de la MEC de este tejido, donde destacan las colagenasas, como la MMP-1 y la MMP-13, capaces de degradar colágeno tipo I, II y III, y las estromelisinases, como la MMP-3, no detectada en cartílagos sanos y capaz de degradar casi cualquier componente en la MEC del tejido articular (18). Los resultados de este estudio muestran un aumento significativo de la expresión de las MMP-1, -3 y -13 tras la

incubación de los condrocitos con PA, efecto no observado tras la incubación con las condiciones que contienen OL. El aumento de expresión de MMPs tras la incubación con PA se ha observado también en otros tipos celulares como las células monocíticas humanas (216). Nuestros resultados concuerdan con otro estudio realizado en condrocitos humanos, donde pese a no observar un aumento en la expresión de MMP-13 sin la coestimulación con IL-1 β , el tratamiento de los explantes de cartílago articular con PA, revela un claro deterioro de la MEC con y sin IL-1 β , sin observar cambios significativos ante la exposición al OL(217).

La inflamación es uno de los factores que forman parte de los cambios fisiológicos y anatómicos que ocurren en la articulación durante el proceso artrósico (45,218). Estudios realizados tanto en condrocitos como en otros tipos celulares evidencian efectos proinflamatorios de los AG saturados, como el PA, relacionándose con un aumento de la expresión de COX-2 con el consiguiente aumento de secreción de PGE2 (217,219–221), así como una elevada expresión y liberación de citoquinas proinflamatorias como la IL-6 (217,222,223). En este trabajo se reporta un aumento de la respuesta proinflamatoria tras la incubación de los condrocitos con PA evidenciada con el notable aumento de la expresión tanto de COX-2 como de IL-6, hecho no revelado cuando los condrocitos se incuban con las condiciones que contienen OL. Esto indica que el aumento de los niveles de PA puede participar en la patogenia de la OA, favoreciendo la expresión de proteínas proinflamatorias en la articulación potenciando el inicio o favoreciendo la progresión de la enfermedad.

Otro de los factores que favorecen el desequilibrio homeostático del cartílago articular es la muerte de los condrocitos. Los efectos de los AG estudiados en este trabajo sobre otros tipos celulares, muestran un aumento de la apoptosis tras la exposición a AG saturados con efectos reversos de los monoinsaturados (151,224,225). El análisis de la apoptosis celular en el presente estudio muestra un aumento de este fenómeno tras la incubación con PA, detectando un aumento tanto de la apoptosis temprana como tardía así como de la actividad de las caspasas 3/7 y 9. Este efecto no fue detectado en los condrocitos incubados con OL; sin embargo, en la incubación combinada PA/OL sí se observó un ligero aumento de apoptosis temprana, pero no de la apoptosis tardía ni en la actividad de las caspasas estudiadas. Los resultados de apoptosis obtenidos tras la

retirada del PA del medio de cultivo durante 24 h confirman que son los efectos del PA sobre las células lo que produce la muerte celular y que, al menos durante el tiempo de exposición en este estudio (12 h), los efectos son parcialmente reversibles. Por ser el único tipo celular que compone el cartílago articular, la supervivencia de los condrocitos es importante para el adecuado mantenimiento de la matriz del cartílago, y factores que comprometan la función y supervivencia de estas células desencadenarían una insuficiencia funcional del cartílago articular, provocando la aparición de la enfermedad. La degeneración del cartílago puede ser causada por la reducción del número de condrocitos en el cartílago articular humano envejecido, que no puede regenerar y remodelar el cartílago adecuadamente (226). En la fase crónica de la OA, el cartílago exhibe un elevado porcentaje de muerte de los condrocitos, con una disminución importante del número de células y lagunas vacías (4). El efecto del PA sobre la muerte celular observada en este estudio ha sido demostrada en otros tipos celulares (228–231), así como la atenuación de este efecto cuando las células son incubadas con OL (149,151,224,225).

El estrés oxidativo es la respuesta celular en la que la síntesis de especies reactivas a nivel intracelular va más allá de la capacidad de la célula para neutralizar dichas moléculas, lo que conduce al daño celular final y, en algunos casos, a la muerte celular. ROS y/o radicales nitrogenados como el NO, responsables de este fenómeno, son actores importantes en el proceso de destrucción del cartílago que ocurre en la OA (232,233). Los resultados encontrados en este estudio indican que la exposición a altas concentraciones de PA producen un incremento notable tanto del anión superóxido mitocondrial como del NO; sin embargo, el incremento de estas especies reactivas no se observó tras la exposición a elevadas concentraciones de OL. Esto concuerda con los efectos del PA sobre células de otros tejidos periféricos, en los que se observan los mismos efectos de incremento tanto de la producción de superóxido mitocondrial (234–236), como de NO (237–239). Tras pretratar los condrocitos con NAC, un bloqueante de ROS, la apoptosis inducida por el PA disminuye significativamente. Esto hace pensar que, al menos en parte, el estrés oxidativo a nivel mitocondrial puede ser una de las causas del proceso apoptótico producido por el PA. Sin embargo, la producción de ROS citoplasmáticos tras 12 horas de exposición a los AG no mostró el mismo

comportamiento que la producción de ROS mitocondriales, detectándose valores incluso significativamente más bajos que la condición basal; esta disminución estaba acompañada de un pequeño pero significativo aumento de la expresión génica de CAT, enzima detoxificadora de estas especies en las células; mientras que no se observó ningún tipo de modulación a nivel de la expresión génica de la enzima detoxificadora de anión superóxido mitocondrial (SOD2), responsable de la conversión del anión superóxido a H_2O_2 . La mayoría de los estudios muestran un aumento de ROS citoplasmáticos tras el tratamiento con PA (148,232,240). Una posible hipótesis que podría explicar esta discordancia sería que la producción de ROS citoplasmáticos inducida por PA en los condrocitos no sea lo suficientemente elevada como para que una actuación eficiente de CAT no sea capaz de revertirla. Por otro lado, pese al incremento de la producción de anión superóxido mitocondrial, no se detecta un aumento de la expresión de SOD2, enzima responsable de su detoxificación mediante la formación de H_2O_2 , por lo tanto, el anión superóxido no estaría produciendo un aumento de los ROS citoplasmáticos por difusión al citoplasma. Además, la producción de H_2O_2 por parte de SOD2 puede bloquear la activación de procesos fundamentales para el proceso de muerte celular programada (241), lo que apoya los resultados obtenidos en este trabajo en relación al anión superóxido como factor inductor de la muerte celular de los condrocitos tras la exposición a PA.

Por ser los condrocitos el único tipo celular del cartílago articular, el adecuado funcionamiento a nivel metabólico es fundamental para asegurar el correcto mantenimiento de la MEC, evitar la degeneración del tejido y favorecer los mecanismos de reparación. En este sentido, la glucólisis (27), como principal vía metabólica en estas células, y la vía mitocondrial (29,43) juegan un papel crucial. Tanto la disfunción mitocondrial como una menor capacidad glucolítica, que se traducen en una menor producción de ATP, son alteraciones que han sido documentadas en los condrocitos artrósicos (47,90,242–245). Los datos obtenidos en el análisis de la función mitocondrial en este estudio muestran una disminución de la respiración basal tras la incubación de los condrocitos con los AG, siendo sólo significativa en el caso de PA. La distribución de este consumo de oxígeno basal muestra claras diferencias según el AG con el que se incuben las células. Así, en el caso de la incubación con PA se genera un aumento de los

protones bombeados durante el transporte de electrones (fuga de protones), lo que resulta en un aumento del consumo de oxígeno pero no en la producción de ATP. Lo cual encaja con los resultados obtenidos, en el sentido de que el OCR destinado a la síntesis de esta molécula energética es significativamente menor en los condrocitos incubados con PA en relación tanto a la condición basal como a las condiciones con OL. La eficiencia de acoplamiento, expresada como el porcentaje de OCR destinado a la producción de ATP en relación al OCR basal, es un parámetro importante a valorar como índice de disfunción mitocondrial ya que es un índice muy sensible a los cambios bioenergéticos y se altera ante cualquier tipo de disfunción mitocondrial (246). Tras la exposición de los condrocitos a PA, se evidencia un menor porcentaje de este parámetro, es decir, una bajada en la calidad de acoplamiento entre OXPHOS y CTE. Por el contrario, al incubar con OL, el ligero descenso (no significativo) en el OCR destinado a la producción de ATP se acompaña de una menor tasa correspondiente a la fuga de protones, con una eficiencia de acoplamiento similar a la condición basal. Además, la estimulación de la cadena respiratoria hasta su máxima capacidad tras la administración de FCCP muestra una menor capacidad máxima de la respiración tras la incubación con PA, traduciéndose en una menor capacidad respiratoria de reserva. Esto indicaría una menor capacidad de los condrocitos incubados con PA de responder a una demanda energética o cuán cerca de su límite bioenergético está trabajando la célula (246). Además se ha descrito que, bajo condiciones de estrés oxidativo, la capacidad de reserva se agota pudiendo llegar a producir la muerte celular cuando se alcanza el umbral de la respiración basal (247,248). Todos los parámetros valorados indican, por tanto, que el PA produce en los condrocitos una disfunción mitocondrial. En cambio, cuando los condrocitos se incuban con la misma concentración de OL o PA/OL no se observan variaciones significativas en los parámetros de la respiración, mostrando que el OL parece proteger a los condrocitos de la disfunción inducida por el PA.

La disfunción mitocondrial producida por el PA ha sido reportada en otro estudio realizado con células musculares donde se analizan los parámetros de respiración mitocondrial con la misma metodología utilizada en este trabajo (249). En el mencionado trabajo, los autores observan diferencias en la función mitocondrial según el tipo de célula muscular incubada con PA, correlacionando las diferencias con la cantidad de

mitocondrias. En nuestro caso, las deficiencias observadas en el metabolismo mitocondrial tras la exposición de los condrocitos al PA es independiente del número de mitocondrias, ya que tras la cuantificación indirecta de este a través del cálculo del número de copias de ADNmt, no se encontraron diferencias entre las distintas condiciones, no pudiendo por tanto correlacionar la disfunción mitocondrial con el déficit de mitocondrias tras la incubación con PA. Otros estudios realizados en diferentes tipos celulares confirman la disfunción mitocondrial causada por el PA y el efecto protector del OL, analizando el daño producido en el ADNmt (148,151,250,251), así como por análisis genómico de expresión de ARNm y metilación del ADN, donde se relaciona la exposición a PA con una menor expresión de genes que codifican para proteínas que forman parte de la cadena respiratoria, y cuya represión implica una menor actividad del sistema OXPHOS y, por tanto, una menor producción de ATP (252). En este sentido, los resultados de nuestro estudio muestran también una reducción en la tasa de OCR destinado a la producción de ATP, corroborado con la cuantificación del ATP mitocondrial, en los condrocitos expuestos a PA, valores que se recuperan cuando se co-incubaban con OL.

El análisis de la función glucolítica tras la exposición a PA muestra una tasa de ECAR debida a la glucólisis menor en relación a la condición basal. Sin embargo sí se muestran notables diferencias cuando se valora tanto la capacidad como la reserva glucolítica tras la inhibición de OXPHOS por la oligomicina. Por tanto, estos resultados llevan a pensar que los condrocitos expuestos a AG no tienen capacidad para aumentar su actividad glucolítica en el caso de que tenga lugar la disfunción mitocondrial, como ocurre en el caso de la exposición al PA. Estos resultados concuerdan con otros estudios donde se describe como células expuestas a PA tienen una menor expresión de enzimas glucolíticos (253) y actividad glucolítica (251,254). En las condiciones de incubación en presencia de PA se describe una menor tasa de producción de ATP por la vía glucolítica. Esto, sumado a la baja tasa de producción de ATP por la vía OXPHOS, se traduce en una disminución en la producción de ATP total tras la incubación con PA, que se recupera parcialmente en la co-incubación con OL compensado por la recuperación de la producción de ATP por la vía OXPHOS en esta condición. Pese a haber observado una menor tasa de actividad glucolítica, los resultados de este trabajo muestran una mayor expresión de GLUT3 y HK2, tras la exposición de los condrocitos a PA. Una posible

explicación a esto es que, en un intento por compensar el déficit energético celular observado tanto por la menor aportación glucolítica como por la disfunción mitocondrial, se activa en los condrocitos mecanismos que favorezcan la captación de glucosa (GLUT3) y su integración en la vía glucolítica (HK2).

Los resultados descritos hasta el momento revelan efectos dañinos sobre el condrocito que pueden favorecer la degradación del cartílago articular ante la exposición a altos niveles de PA, los cuales revierten en parte cuando la incubación con este AG se acompaña de una mayor proporción de OL. Este efecto protector de AG monoinsaturados frente a los efectos de AG saturados se ha observado también en células de otros tejidos periféricos, revirtiendo los efectos del PA sobre la resistencia a insulina, la inflamación, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y la apoptosis (150,151,219,224,255). Una de las diferencias encontradas tras la incubación con estos AG y que pueden explicar los efectos opuestos sobre las células, es la formación de LD tras la exposición a OL. Los LD son considerados organelas celulares de reserva lipídica. Están formados por un revestimiento en forma de monocapa fosfolipídica con múltiples proteínas asociadas, y un centro hidrofóbico formado fundamentalmente por TG o ésteres de colesterol (256). La toxicidad diferencial entre AG saturados como el PA y su co-incubación con AG monoinsaturados como el OL parece estar relacionada con la capacidad de este último de promover la incorporación de PA en los TG (152,153). En este trabajo se observa un incremento llamativo de LD tras la incubación con las tres condiciones de AG estudiadas observado con dos tinciones diferentes, pero su presencia y tamaño es significativamente mayor cuando el OL está presente en el medio de cultivo. Estos resultados se apoyan con la aparición de un mayor contenido intracelular de TG tras la incubación con OL. La diferencia, tanto en cantidad de LD como de TG intracelular, observada tras la incubación con PA y la incorporación de OL en el medio de cultivo, pueden indicar que, al igual que lo observado en otros tejidos periféricos (224,257), los AG monoinsaturados como el OL pueden favorecer la incorporación de PA en los TG, disminuyendo así los efectos tóxicos descritos anteriormente en el presente trabajo. Aunque el acúmulo excesivo de LD en las células sí parece tener también efectos lipotóxicos a largo plazo, ante un exceso de AG, parece que los AG monoinsaturados como el OL, ofrecen un efecto citoprotector inicial sobre las células, ya que se ha

demostrado en células de ovario de hámster chino (células CHO) que cuando la capacidad sintética de TG falla, el OL pasa a tener los mismos efectos tóxicos que el PA (152), aunque este hecho no ha sido estudiado en este trabajo. Serían necesarios estudios que sometan a los condrocitos a una exposición a más largo plazo, para valorar el efecto lipotóxico de la acumulación de LD en estas células.

Como ya se ha explicado con anterioridad en este trabajo, por un lado conseguir estratificar adecuadamente la OA y, por otro lado, conocer los mecanismos moleculares que pueden llevar a la pérdida progresiva del cartílago articular en cada uno de los subgrupos, son estrategias necesarias para poder establecer pautas profilácticas y estrategias terapéuticas que permitan tratar la enfermedad en estadios tempranos para evitar la progresión al reemplazo articular. En este sentido, los mecanismos moleculares relacionados con la OA de origen metabólico son hasta ahora bastante desconocidos. Uno de los posibles mecanismos estudiados es el aumento de AGL, por una lado porque dicho aumento está asociado a patologías metabólicas altamente asociadas a su vez a la OA y, por otro lado, porque ya se ha descrito un mayor acúmulo de AG en la superficie del cartílago OA en comparación con el cartílago sano (193). Los efectos de los AG mayoritarios en suero observados en este estudio sobre los mecanismos relacionados con la patología artrósica como la degradación de la MEC, inflamación, muerte celular y estrés oxidativo apoyarían los resultados obtenidos en otros trabajos realizados en condrocitos (217,258). En este trabajo además se reportan los efectos de PA y OL sobre el metabolismo celular, observando una clara disfunción mitocondrial y un déficit glucolítico sobre los condrocitos tras la exposición a AG saturados como el PA, con claras diferencias sobre la exposición de estas células a OL. Así como las diferencias en la gestión celular al exceso de estos AG, con la formación de LD, que ayudaría a explicar el efecto citoprotector inicial que tiene el OL frente al PA.

En resumen, en base a los resultados obtenidos en este trabajo, los AG saturados, como el PA, producen en los condrocitos efectos nocivos, revertidos en parte por AG monoinsaturados como el OL, que pueden desencadenar la patología artrósica a través de la degradación de la MEC del cartílago articular, la inflamación, la muerte celular, el estrés oxidativo, así como alteraciones en el metabolismo glucolítico y de la función

mitocondrial de estas células. Estos resultados pueden ayudar a explicar, en parte, la estrecha relación de patologías metabólicas con la OA.

CONCLUSIONES



1. La exposición de los condrocitos a niveles elevados de ácidos grasos saturados, como el Ácido palmítico desencadena procesos involucrados en la degradación del cartílago articular que tiene lugar durante el desarrollo de la artrosis:

1.1. Aumenta los niveles de expresión génica de metaloproteasas (MMP-1, MMP-3 y MMP-13), principales enzimas responsables de la degradación del cartílago articular, así como de mediadores de la respuesta inflamatoria (COX-2 e IL-6)

1.2. Provoca el incremento del estrés oxidativo celular mostrando un incremento, tanto de la producción de anión superóxido mitocondrial, como de la liberación de Óxido nítrico al medio extracelular.

1.3. Activa el proceso de apoptosis celular con un incremento de la actividad de las caspasas 3/7 y 9 mediado, en parte, por la elevada producción de especies reactivas de oxígeno

2. La exposición a niveles elevados de ácidos grasos saturados como el ácido palmítico produce una disfunción de las dos vías metabólicas principales del condrocito:

2.1. Induce la disfunción mitocondrial de forma independiente al número de copias de ADN mitocondrial, con un aumento de la fuga de protones, una menor eficiencia de acoplamiento y una menor capacidad respiratoria de reserva.

2.2. Disminuye la tasa glucolítica celular y la capacidad de los condrocitos para responder a una demanda energética por activación de la glucólisis.

2.3. Reduce la tasa de producción de ATP total, incluyendo una disminución tanto de la tasa de producción de ATP por la vía glucolítica como por la vía de la fosforilación oxidativa mitocondrial.

3. La exposición de los condrocitos a niveles elevados de ácidos grasos insaturados, como el Ácido oleico, no produce los efectos descritos en el caso de los ácidos grasos saturados

4. La exposición conjunta de los condrocitos a ambos ácidos grasos muestra que los insaturados revierten, en parte, los efectos producidos por los ácidos grasos saturados.

5. Los ácidos grasos insaturados muestran un efecto citoprotector mediante el cual promueven la formación de gotas lipídicas ricas en triglicéridos, así como la incorporación de ácidos grasos saturados como el Ácido palmítico.

BIBLIOGRAFÍA



1. Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2001 Oct;(391 Suppl):S26-33.
2. Dijkgraaf LC, de Bont LG, Boering G, Liem RS. The structure, biochemistry, and metabolism of osteoarthritic cartilage: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995 Oct;53(10):1182–92.
3. Loeser R. Age-related changes in the musculoskeletal system and the development of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med.* 2010;26(3):371–86.
4. Buckwalter J, Rosemberg L. Articular cartilage: Composition, structure, response to injury, and methods of facilitation repair. In: Ewing JW, editor. *Articular Cartilage and Knee Joint Function: Basic Science and Arthroscopy.* New York; 1990. p. 19–56.
5. Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *BioEssays.* 1995 Dec;17(12):1039–48.
6. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect.* 1998;47:477–86.
7. Benito-Ruiz P M-FJ. Etiopatogenia, clasificación y epidemiología de la artrosis (3ª ed). In: Panamericana, editor. *Manual de la SER (Sociedad Española de Reumatología) de Enfermedades Reumáticas.* 3 Ed. Madrid; 2000. p. 463–75.
8. Eyre D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res.* 2002;4(1):30–5.
9. Jeffrey DR, Watt I. Imaging hyaline cartilage. *Br J Radiol.* 2003 Nov;76(911):777–87.
10. Thonar EJ, Masuda K, Manicourt DH KK. Structure and function of normal human articular cartilage. In: Reginster JY, Pelletier JP M-P, J HY, editors. *Osteoarthritis.* Berlín: Springer; 1999. p. 1–19.
11. Saxne T, Heinegård D. Cartilage oligomeric matrix protein: a novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood. *Br J Rheumatol.* 1992 Sep;31(9):583–91.
12. Morozzi G, Fabbroni M, Bellisai F, Pucci G, Galeazzi M. Cartilage oligomeric matrix protein level in rheumatic diseases: potential use as a marker for measuring articular cartilage damage and/or the therapeutic efficacy of treatments. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Jun;1108:398–407.
13. Williams FM, Spector TD. Biomarkers in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(1):101.
14. Clark JM. The organisation of collagen fibrils in the superficial zones of articular cartilage. *J Anat.* 1990 Aug;171:117–30.
15. Goldring SR GM. Biology of the normal joint. In: Firestein GS B, RC, Harris ED Jr., McInnes IB, Ruddy S SJK, editors. *Textbook of Rheumatology.* 8 Ed. Elsevier; 2008. p. 1–22.
16. Aigner T, Soeder S, Haag J. IL-1beta and BMPs--interactive players of cartilage

- matrix degradation and regeneration. *Eur Cell Mater.* 2006 Oct 26;12:49–56; discussion 56.
17. Blanco Garcia FJ. Catabolic events in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthr Cartil.* 1999 May;7(3):308–9.
 18. Murphy G, Knäuper V, Atkinson S, Butler G, English W, Hutton M, et al. Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Res.* 2002;4 Suppl 3:S39-49.
 19. Caramés B, Taniguchi N, Otsuki S, Blanco FJ, Lotz M. Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2010 Mar;62(3):791–801.
 20. Goldring MB. Degradation of articular cartilage in culture: regulatory factors. In: Howell W&, editor. *Joint cartilage degradation.* New York; 1993. p. 281–345.
 21. Pelletier JP, DiBattista JA, Roughley P, McCollum R, Martel-Pelletier J. Cytokines and inflammation in cartilage degradation. *Rheum Dis Clin North Am.* 1993 Aug;19(3):545–68.
 22. Studer RK, Decker K, Melhem S, Georgescu H. Nitric oxide inhibition of IGF-1 stimulated proteoglycan synthesis: Role of cGMP. *J Orthop Res.* 2003 Sep;21(5):914–21.
 23. Jenniskens YM, Koevoet W, de Bart ACW, Weinans H, Jahr H, Verhaar JAN, et al. Biochemical and functional modulation of the cartilage collagen network by IGF1, TGFβ2 and FGF2. *Osteoarthr Cartil.* 2006 Nov;14(11):1136–46.
 24. Goldring MB. Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Curr Rheumatol Rep.* 2000 Dec;2(6):459–65.
 25. Kouri JB, Jiménez SA, Quintero M, Chico A. Ultrastructural study of chondrocytes from fibrillated and non-fibrillated human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthr Cartil.* 1996 Jun;4(2):111–25.
 26. Stockwell R. Metabolism of cartilage. In: Hall BK, editor. *Cartilage: molecular aspects.* New York: Academic Press; 1983. p. 253–80.
 27. Otte P. Basic cell metabolism of articular cartilage. Manometric studies. *Z Rheumatol.* 50(5):304–12.
 28. Stockwell RA. The interrelationship of cell density and cartilage thickness in mammalian articular cartilage. *J Anat.* 1971 Sep;109(Pt 3):411–21.
 29. Lee RB, Urban JP. Evidence for a negative Pasteur effect in articular cartilage. *Biochem J.* 1997 Jan 1;95–102.
 30. Grimshaw MJ, Mason RM. Bovine articular chondrocyte function in vitro depends upon oxygen tension. *Osteoarthr Cartil.* 2000 Sep;8(5):386–92.
 31. Ge Z, Hu Y, Heng BC, Yang Z, Ouyang H, Lee EH, et al. Osteoarthritis and therapy. *Arthritis Rheum.* 2006 Jun 15;55(3):493–500.
 32. Dewire P ET. The joints as an organ. In: Moskowitz RW, Howell DS, Altman RD, Buckwalter JA GV, editor. *Osteoarthritis.* 3 Ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2001. p. 49–68.

33. Honner R, Thompson RC. The nutritional pathways of articular cartilage. An autoradiographic study in rabbits using ³⁵S injected intravenously. *J Bone Joint Surg Am.* 1971 Jun;53(4):742–8.
34. Ingelmark B. The nutritive supply and nutritional value of synovial fluid. *Acta Orthop Scand.* 1950;20(2):144–55.
35. McKibbin B, Holdsworth FW. The nutrition of immature joint cartilage in the lamb. *J Bone Joint Surg Br.* 1966 Nov;48(4):793–803.
36. Sampson HW, Cannon MS. Zonal analysis of metabolic profiles of articular-epiphyseal cartilage chondrocytes: a histochemical study. *Histochem J.* 1986 May;18(5):233–8.
37. Yamamoto T, Gay C V. Ultrastructural analysis of cytochrome oxidase in chick epiphyseal growth plate cartilage. *J Histochem Cytochem.* 1988 Sep;36(9):1161–6.
38. Spencer CA, Palmer TN, Mason RM. Intermediary metabolism in the Swarm rat chondrosarcoma chondrocyte. *Biochem J.* 1990 Feb 1;265(3):911–4.
39. Terkeltaub R, Johnson K, Murphy A, Ghosh S. Invited review: the mitochondrion in osteoarthritis. *Mitochondrion.* 2002 Feb;1(4):301–19.
40. Oegema TR TR. *Articular Cartilage Biochemistry.* Kuettner KE, Schleyerbach R HV, editor. New York: Raven Press; 1986. 256-271 p.
41. Murphy AN, Fiskum G, Beal MF. Mitochondria in neurodegeneration: bioenergetic function in cell life and death. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999 Mar;19(3):231–45.
42. Croucher LJ, Crawford A, Hatton P V, Russell RG, Buttle DJ. Extracellular ATP and UTP stimulate cartilage proteoglycan and collagen accumulation in bovine articular chondrocyte pellet cultures. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Oct 18;1502(2):297–306.
43. Johnson K, Svensson CI, Etten D Van, Ghosh SS, Murphy AN, Powell HC, et al. Mediation of spontaneous knee osteoarthritis by progressive chondrocyte ATP depletion in Hartley guinea pigs. *Arthritis Rheum.* 2004 Apr;50(4):1216–25.
44. Dieppe P, Kirwan J. The localization of osteoarthritis. *Br J Rheumatol.* 1994 Mar;33(3):201–3.
45. 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. Vol. 23, *Osteoarthritis and Cartilage.* 2015. p. 1233–41.
46. Man GS, Mologhianu G. Osteoarthritis pathogenesis - a complex process that involves the entire joint. *J Med Life.* 2014 Mar 15;7(1):37–41.
47. Malfait AM. Osteoarthritis year in review 2015: Biology. Vol. 24, *Osteoarthritis and Cartilage.* 2016. p. 21–6.
48. Aigner T, Söder S, Gebhard PM, McAlinden A, Haag J. Mechanisms of disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis--structure, chaos and senescence. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2007 Jul;3(7):391–9.
49. Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect.* 2005;54:465–80.

50. Goldring MB, Goldring SR. Osteoarthritis. *J Cell Physiol.* 2007 Dec;213(3):626–34.
51. Bailey AJ, Sims TJ, Knott L. Phenotypic expression of osteoblast collagen in osteoarthritic bone: production of type I homotrimer. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 Feb;34(2):176–82.
52. Couchourel D, Aubry I, Delalandre A, Lavigne M, Martel-Pelletier J, Pelletier J-P, et al. Altered mineralization of human osteoarthritic osteoblasts is attributable to abnormal type I collagen production. *Arthritis Rheum.* 2009 May;60(5):1438–50.
53. Neogi T. Clinical significance of bone changes in osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2012 Aug 1;4(4):259–67.
54. Neogi T, Felson D, Niu J, Lynch J, Nevitt M, Guermazi A, et al. Cartilage loss occurs in the same subregions as subchondral bone attrition: A within-knee subregion-matched approach from the multicenter osteoarthritis study. *Arthritis Rheum.* 2009 Nov 15;61(11):1539–44.
55. Brandt KD, Dieppe P, Radin E. Etiopathogenesis of Osteoarthritis. *Med Clin North Am.* 2009 Jan;93(1):1–24.
56. Martel-Pelletier J, Pelletier JP. Is osteoarthritis a disease involving only cartilage or other articular tissues? *Eklemler Hastalik Cerrahisi.* 2010 Apr;21(1):2–14.
57. Loeuille D, Chary-Valckenaere I, Champigneulle J, Rat A-C, Toussaint F, Pinzano-Watrin A, et al. Macroscopic and microscopic features of synovial membrane inflammation in the osteoarthritic knee: Correlating magnetic resonance imaging findings with disease severity. *Arthritis Rheum.* 2005 Nov;52(11):3492–501.
58. 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 Nov;60(11):1040–5.
59. Batlle-Gualda E, Carmona L, Gavrila D, García Criado EI, Ruiz Miravalles R, Carbonell Abelló J. Implementación y características de la población del estudio ArtRoCad, una aproximación al consumo de recursos y repercusión socioeconómica de la artrosis de rodilla y cadera en atención primaria. *Reumatol Clínica.* 2006 Sep;2(5):224–34.
60. Litwic A, Registrar S, Edwards M, Clinical M. Europe PMC Funders Group Epidemiology and Burden of Osteoarthritis. 2013;44(0):185–99.
61. Felson DT, Naimark A, Anderson J, Kazis L, Castelli W, Meenan RF. The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum.* 1987 Aug;30(8):914–8.
62. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Naimark A, Weissman BN, Aliabadi P, et al. The incidence and natural history of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum.* 1995 Oct;38(10):1500–5.
63. Srikanth VK, Fryer JL, Zhai G, Winzenberg TM, Hosmer D, Jones G. A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* 2005 Sep;13(9):769–81.
64. Spector TD, Nandra D, Hart DJ, Doyle D V. Is hormone replacement therapy protective for hand and knee osteoarthritis in women?: The Chingford Study. *Ann*

- Rheum Dis. 1997 Jul;56(7):432–4.
65. de Klerk BM, Schiphof D, Groeneveld FPMJ, Koes BW, van Osch GJVM, van Meurs JBJ, et al. No clear association between female hormonal aspects and osteoarthritis of the hand, hip and knee: a systematic review. *Rheumatology*. 2009 Sep 1;48(9):1160–5.
 66. Cirillo DJ, Wallace RB, Wu L, Yood RA. Effect of hormone therapy on risk of hip and knee joint replacement in the women's health initiative. *Arthritis Rheum*. 2006 Oct;54(10):3194–204.
 67. Maleki-Fischbach M, Jordan JM. New developments in osteoarthritis. Sex differences in magnetic resonance imaging-based biomarkers and in those of joint metabolism. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(4):212.
 68. Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of Osteoarthritis. *Clin Geriatr Med*. 2010 Aug;26(3):355–69.
 69. Nevitt MC, Xu L, Zhang Y, Lui L-Y, Yu W, Lane NE, et al. Very low prevalence of hip osteoarthritis among Chinese elderly in Beijing, China, compared with whites in the United States: The Beijing osteoarthritis study. *Arthritis Rheum*. 2002 Jul;46(7):1773–9.
 70. Zhang Y, Xu L, Nevitt MC, Aliabadi P, Yu W, Qin M, et al. Comparison of the prevalence of knee osteoarthritis between the elderly Chinese population in Beijing and whites in the United States: The Beijing osteoarthritis study. *Arthritis Rheum*. 2001 Sep;44(9):2065–71.
 71. Zhang Y, Xu L, Nevitt MC, Niu J, Goggins JP, Aliabadi P, et al. Lower prevalence of hand osteoarthritis among Chinese subjects in Beijing compared with white subjects in the United States: The Beijing Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum*. 2003 Apr;48(4):1034–40.
 72. Nelson AE, Braga L, Renner JB, Atashili J, Woodard J, Hochberg MC, et al. Characterization of individual radiographic features of hip osteoarthritis in African American and white women and men: The Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010;NA-NA.
 73. Spector TD, Cicuttini F, Baker J, Loughlin J, Hart D. Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ*. 1996 Apr 13;312(7036):940–3.
 74. Felson DT, Couropmitree NN, Chaisson CE, Hannan MT, Zhang Y, McAlindon TE, et al. Evidence for a Mendelian gene in a segregation analysis of generalized radiographic osteoarthritis: The Framingham study. *Arthritis Rheum*. 1998 Jun;41(6):1064–71.
 75. Cicuttini FM, Spector TD. Genetics of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 1996 Sep;55(9):665–7.
 76. Forster T, Chapman K, Loughlin J. Common variants within the interleukin 4 receptor ? gene (IL4R) are associated with susceptibility to osteoarthritis. *Hum Genet*. 2004 Mar 1;114(4):391–5.
 77. Leppävuori J, Kujala U, Kinnunen J, Kaprio J, Nissilä M, Heliövaara M, et al. Genome Scan for Predisposing Loci for Distal Interphalangeal Joint Osteoarthritis: Evidence

- for a Locus on 2q. *Am J Hum Genet.* 1999 Oct;65(4):1060–7.
78. Stefánsson SE, Jónsson H, Ingvarsson T, Manolescu I, Jónsson HH, Ólafsdóttir G, et al. Genomewide Scan for Hand Osteoarthritis: A Novel Mutation in Matrilin-3. *Am J Hum Genet.* 2003 Jun;72(6):1448–59.
79. Loughlin J, Dowling B, Chapman K, Marcelline L, Mustafa Z, Southam L, et al. Functional variants within the secreted frizzled-related protein 3 gene are associated with hip osteoarthritis in females. *Proc Natl Acad Sci.* 2004 Jun 29;101(26):9757–62.
80. Valdes AM, Loughlin J, Timms KM, van Meurs JJB, Southam L, Wilson SG, et al. Genome-wide Association Scan Identifies a Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 Variant Involved in Risk of Knee Osteoarthritis. *Am J Hum Genet.* 2008 Jun;82(6):1231–40.
81. Meulenbelt I, Min JL, Bos S, Riyazi N, Houwing-Duistermaat JJ, van der Wijk H-J, et al. Identification of DIO2 as a new susceptibility locus for symptomatic osteoarthritis. *Hum Mol Genet.* 2008 Mar 4;17(12):1867–75.
82. Miyamoto Y, Mabuchi A, Shi D, Kubo T, Takatori Y, Saito S, et al. A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis. *Nat Genet.* 2007 Apr 25;39(4):529–33.
83. Valdes AM, Evangelou E, Kerkhof HJM, Tamm A, Doherty SA, Kisand K, et al. The GDF5 rs143383 polymorphism is associated with osteoarthritis of the knee with genome-wide statistical significance. *Ann Rheum Dis.* 2011 May 1;70(5):873–5.
84. Day-Williams AG, Southam L, Panoutsopoulou K, Rayner NW, Esko T, Estrada K, et al. A Variant in MCF2L Is Associated with Osteoarthritis. *Am J Hum Genet.* 2011 Sep;89(3):446–50.
85. Evangelou E, Valdes AM, Kerkhof HJM, Styrkarsdottir U, Zhu Y, Meulenbelt I, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies confirms a susceptibility locus for knee osteoarthritis on chromosome 7q22. *Ann Rheum Dis.* 2011 Feb 1;70(2):349–55.
86. Zeggini E, Panoutsopoulou K, Southam L, Rayner NW, Day-Williams AG, Lopes MC, et al. Identification of new susceptibility loci for osteoarthritis (arcOGEN): A genome-wide association study. *Lancet.* 2012 Sep;380(9844):815–23.
87. Styrkarsdottir U, Thorleifsson G, Helgadottir HT, Bomer N, Metrustry S, Bierma-Zeinstra S, et al. Severe osteoarthritis of the hand associates with common variants within the ALDH1A2 gene and with rare variants at 1p31. *Nat Genet.* 2014 Apr 13;46(5):498–502.
88. Evangelou E, Kerkhof HJ, Styrkarsdottir U, Ntzani EE, Bos SD, Esko T, et al. A meta-analysis of genome-wide association studies identifies novel variants associated with osteoarthritis of the hip. *Ann Rheum Dis.* 2014 Dec;73(12):2130–6.
89. Castano Betancourt MC, Cailotto F, Kerkhof HJ, Cornelis FMF, Doherty SA, Hart DJ, et al. Genome-wide association and functional studies identify the DOT1L gene to be involved in cartilage thickness and hip osteoarthritis. *Proc Natl Acad Sci.* 2012 May 22;109(21):8218–23.

90. Rego-Perez I, Fernandez-Moreno M, Soto-Hermida A, Fenandez-Lopez C, Oreiro N, Blanco FJ. Mitochondrial genetics and osteoarthritis. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2013 Jan 1;5:360–8.
91. Fernández-Moreno M, Soto-Hermida A, Vázquez-Mosquera ME, Cortés-Pereira E, Relaño S, Hermida-Gómez T, et al. Mitochondrial DNA haplogroups influence the risk of incident knee osteoarthritis in OAI and CHECK cohorts. A meta-analysis and functional study. *Ann Rheum Dis*. 2016 Dec 5;annrheumdis-2016-210131.
92. Felson DT, Anderson JJ, Naimark A, Walker AM, Meenan RF. Obesity and knee osteoarthritis. The Framingham Study. *Ann Intern Med*. 1988 Jul 1;109(1):18–24.
93. Manninen P, Riihimäki H, Heliövaara M, Mäkelä P. Overweight, gender and knee osteoarthritis. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1996 Jun;20(6):595–7.
94. Johnson VL, Hunter DJ. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2014 Feb;28(1):5–15.
95. Thijssen E, van Caam A, van der Kraan PM. Obesity and osteoarthritis, more than just wear and tear: pivotal roles for inflamed adipose tissue and dyslipidaemia in obesity-induced osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2015 Apr;54(4):588–600.
96. Blagojevic M, Jinks C, Jeffery A, Jordan KP. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthr Cartil*. 2010 Jan;18(1):24–33.
97. Nevitt MC, Zhang Y, Javaid MK, Neogi T, Curtis JR, Niu J, et al. High systemic bone mineral density increases the risk of incident knee OA and joint space narrowing, but not radiographic progression of existing knee OA: the MOST study. *Ann Rheum Dis*. 2010 Jan 1;69(1):163–8.
98. Hadler NM, Gillings DB, Imbus HR, Levitin PM, Makuc D, Utsinger PD, et al. Hand structure and function in an industrial setting. *Arthritis Rheum*. 1978 Mar;21(2):210–20.
99. Muraki S, Akune T, Oka H, Mabuchi A, En-Yo Y, Yoshida M, et al. Association of occupational activity with radiographic knee osteoarthritis and lumbar spondylosis in elderly patients of population-based cohorts: a large-scale population-based study. *Arthritis Rheum*. 2009 Jun 15;61(6):779–86.
100. Spector TD, Harris PA, Hart DJ, Cicuttini FM, Nandra D, Etherington J, et al. Risk of osteoarthritis associated with long-term weight-bearing sports: a radiologic survey of the hips and knees in female ex-athletes and population controls. *Arthritis Rheum*. 1996 Jun;39(6):988–95.
101. Wang Y, Simpson JA, Wluka AE, Teichtahl AJ, English DR, Giles GG, et al. Is physical activity a risk factor for primary knee or hip replacement due to osteoarthritis? A prospective cohort study. *J Rheumatol*. 2011 Feb;38(2):350–7.
102. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum*. 1986 Aug;29(8):1039–49.
103. Roach HI, Aigner T, Soder S, Haag J, Welkerling H. Pathobiology of osteoarthritis:

- pathomechanisms and potential therapeutic targets. *Curr Drug Targets*. 2007 Feb;8(2):271–82.
104. Herrero-Beaumont G, Roman-Blas JA, Castañeda S, Jimenez SA. Primary osteoarthritis no longer primary: three subsets with distinct etiological, clinical, and therapeutic characteristics. *Semin Arthritis Rheum*. 2009 Oct;39(2):71–80.
 105. Bijlsma JWJ, Berenbaum F, Lafeber FPJG. Osteoarthritis: An update with relevance for clinical practice. *Lancet*. 2011;377(9783):2115–26.
 106. Loeser RF, Yammani RR, Carlson CS, Chen H, Cole A, Im H-J, et al. Articular chondrocytes express the receptor for advanced glycation end products: Potential role in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2005 Aug;52(8):2376–85.
 107. DeGroot J, Verzijl N, Wenting-Van Wijk MJG, Jacobs KMG, Van El B, Van Roermund PM, et al. Accumulation of advanced glycation end products as a molecular mechanism for aging as a risk factor in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2004 Apr;50(4):1207–15.
 108. Altman RD, Gold GE. Atlas of individual radiographic features in osteoarthritis, revised. *Osteoarthr Cartil*. 2007;15 Suppl A:A1-56.
 109. Guermazi A, Hayashi D, Roemer FW, Felson DT. Osteoarthritis: a review of strengths and weaknesses of different imaging options. *Rheum Dis Clin North Am*. 2013 Aug;39(3):567–91.
 110. KELLGREN JH, LAWRENCE JS. Radiological assessment of osteo-arthrosis. *Ann Rheum Dis*. 1957 Dec;16(4):494–502.
 111. Jordan KM, Arden NK, Doherty M, Bannwarth B, Bijlsma JWJ, Dieppe P, et al. EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Ann Rheum Dis*. 2003 Dec;62(12):1145–55.
 112. Pendleton A, Arden N, Dougados M, Doherty M, Bannwarth B, Bijlsma JW, et al. EULAR recommendations for the management of knee osteoarthritis: report of a task force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Ann Rheum Dis*. 2000 Dec;59(12):936–44.
 113. Geba GP, Weaver AL, Polis AB, Dixon ME, Schnitzer TJ, Vioxx, Acetaminophen, Celecoxib Trial (VACT) Group. Efficacy of rofecoxib, celecoxib, and acetaminophen in osteoarthritis of the knee: a randomized trial. *JAMA*. 2002 Jan 2;287(1):64–71.
 114. Bookman AAM. Effect of a topical diclofenac solution for relieving symptoms of primary osteoarthritis of the knee: a randomized controlled trial. *Can Med Assoc J*. 2004 Aug 17;171(4):333–8.
 115. Long L, Soeken K, Ernst E. Herbal medicines for the treatment of osteoarthritis: a systematic review. *Rheumatology (Oxford)*. 2001 Jul;40(7):779–93.
 116. Emkey R, Rosenthal N, Wu S-C, Jordan D, Kamin M, CAPSS-114 Study Group. Efficacy and safety of tramadol/acetaminophen tablets (Ultracet) as add-on therapy for osteoarthritis pain in subjects receiving a COX-2 nonsteroidal antiinflammatory drug: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-

- controlled trial. *J Rheumatol.* 2004 Jan;31(1):150–6.
117. Richy F, Bruyere O, Ethgen O, Cucherat M, Henrotin Y, Reginster J-Y. Structural and Symptomatic Efficacy of Glucosamine and Chondroitin in Knee Osteoarthritis. *Arch Intern Med.* 2003 Jul 14;163(13):1514.
 118. Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthr Cartil.* 2008 Feb;16(2):137–62.
 119. Messier SP, Loeser RF, Miller GD, Morgan TM, Rejeski WJ, Sevick MA, et al. Exercise and dietary weight loss in overweight and obese older adults with knee osteoarthritis: The arthritis, diet, and activity promotion trial. *Arthritis Rheum.* 2004 May;50(5):1501–10.
 120. Lubowitz JH. A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee. *Arthroscopy.* 2002 Oct;18(8):950–1.
 121. Naudie D, Bourne RB, Rorabeck CH, Bourne TJ. The Install Award. Survivorship of the high tibial valgus osteotomy. A 10- to -22-year followup study. *Clin Orthop Relat Res.* 1999 Oct;(367):18–27.
 122. Mancuso CA, Ranawat CS, Esdaile JM, Johanson NA, Charlson ME. Indications for total hip and total knee arthroplasties. Results of orthopaedic surveys. *J Arthroplasty.* 1996 Jan;11(1):34–46.
 123. Lehninger AL, Nelson DL CM. Principles of biochemistry. 5 Ed. Freeman WH, editor. New York; 2008.
 124. Large V, Peroni O, Letexier D, Ray H, Beylot M. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab.* 2004 Sep;30(4):294–309.
 125. McArthur MJ, Atshaves BP, Frolov A, Foxworth WD, Kier AB, Schroeder F. Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids. *J Lipid Res.* 1999 Aug;40(8):1371–83.
 126. Large V, Arner P. Regulation of lipolysis in humans. Pathophysiological modulation in obesity, diabetes, and hyperlipidaemia. *Diabetes Metab.* 1998 Nov;24(5):409–18.
 127. Cusi K. Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis.* 2009 Nov;13(4):545–63.
 128. Unger RH. Lipotoxic Diseases. *Annu Rev Med.* 2002 Feb;53(1):319–36.
 129. Madan K, Bhardwaj P, Thareja S, Gupta SD, Saraya A. Oxidant Stress and Antioxidant Status Among Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *J Clin Gastroenterol.* 2006 Nov;40(10):930–5.
 130. Puri P, Mirshahi F, Cheung O, Natarajan R, Maher JW, Kellum JM, et al. Activation and Dysregulation of the Unfolded Protein Response in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* 2008 Feb;134(2):568–76.
 131. Wende AR, Abel ED. Lipotoxicity in the heart. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2010 Mar;1801(3):311–9.

132. Trauner M, Arrese M, Wagner M. Fatty liver and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2010 Mar;1801(3):299–310.
133. Jensen MD, Haymond MW, Rizza RA, Cryer PE, Miles JM. Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity. *J Clin Invest*. 1989 Apr 1;83(4):1168–73.
134. Boden G, Chen X. Effects of fat on glucose uptake and utilization in patients with non-insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest*. 1995 Sep 1;96(3):1261–8.
135. Boden G, Chen X, Ruiz J, White J V, Rossetti L. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest*. 1994 Jun 1;93(6):2438–46.
136. Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*. 1997 Jan;46(1):3–10.
137. Boden G, Cheung P, Stein TP, Kresge K, Mozzoli M. FFA cause hepatic insulin resistance by inhibiting insulin suppression of glycogenolysis. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2002 Jul 1;283(1):E12–9.
138. Santomauro AT, Boden G, Silva ME, Rocha DM, Santos RF, Ursich MJ, et al. Overnight lowering of free fatty acids with Acipimox improves insulin resistance and glucose tolerance in obese diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes*. 1999 Sep;48(9):1836–41.
139. Cusi K, Kashyap S, Gastaldelli A, Bajaj M, Cersosimo E. Effects on insulin secretion and insulin action of a 48-h reduction of plasma free fatty acids with acipimox in nondiabetic subjects genetically predisposed to type 2 diabetes. *AJP Endocrinol Metab*. 2007 Jan 30;292(6):E1775–81.
140. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*. 2000 Nov;49(11):1939–45.
141. Rollins BJ, Walz A, Baggiolini M. Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood*. 1991 Aug 15;78(4):1112–6.
142. Boden G, She P, Mozzoli M, Cheung P, Gumireddy K, Reddy P, et al. Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. *Diabetes*. 2005 Dec;54(12):3458–65.
143. Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkkappaB-alpha. *Diabetes*. 2002 Jul;51(7):2005–11.
144. Baylin A, Kabagambe EK, Siles X, Campos H. Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake. *Am J Clin Nutr*. 2002;76(5):750–7.
145. Cunha DA, Hekerman P, Ladrière L, Bazarra-Castro A, Ortis F, Wakeham MC, et al. Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells. *J Cell Sci*. 2008 Jul 15;121(Pt 14):2308–18.
146. Leroy C, Tricot S, Lacour B, Grynberg A. Protective effect of eicosapentaenoic acid on palmitate-induced apoptosis in neonatal cardiomyocytes. *Biochim Biophys*

- Acta. 2008 Nov;1781(11–12):685–93.
147. Jiang H, Liang C, Liu X, Jiang Q, He Z, Wu J, et al. Palmitic acid promotes endothelial progenitor cells apoptosis via p38 and JNK mitogen-activated protein kinase pathways. *Atherosclerosis*. 2010 May;210(1):71–7.
 148. Egnatchik RA, Leamy AK, Noguchi Y, Shiota M, Young JD. Palmitate-induced Activation of Mitochondrial Metabolism Promotes Oxidative Stress and Apoptosis in H4IIEC3 Rat Hepatocytes. *Metabolism*. 2014 Feb;63(2):283–95.
 149. Mei S, Ni H-M, Manley S, Bockus A, Kassel KM, Luyendyk JP, et al. Differential roles of unsaturated and saturated fatty acids on autophagy and apoptosis in hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011 Nov;339(2):487–98.
 150. Gao D, Griffiths HR, Bailey CJ. Oleate protects against palmitate-induced insulin resistance in L6 myotubes. *Br J Nutr*. 2009 Dec 22;102(11):1557–63.
 151. Yuzefovych L, Wilson G, Rachek L. Different effects of oleate vs. palmitate on mitochondrial function, apoptosis, and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells: role of oxidative stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010 Dec;299(6):E1096-105.
 152. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese R V, Ory DS, et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity.
 153. Cnop M, Hannaert JC, Hoorens A, Cio D, Eizirik L, Pipeleers DG. Inverse Relationship Between Cytotoxicity of Free Fatty Acids in Pancreatic Islet Cells and Cellular Triglyceride Accumulation.
 154. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Naimark A, Weissman B, Aliabadi P, et al. Risk factors for incident radiographic knee osteoarthritis in the elderly: the Framingham Study. *Arthritis Rheum*. 1997 Apr;40(4):728–33.
 155. Spector TD, Hart DJ, Doyle D V. Incidence and progression of osteoarthritis in women with unilateral knee disease in the general population: the effect of obesity. *Ann Rheum Dis*. 1994 Sep;53(9):565–8.
 156. Hochberg MC, Lethbridge-Cejku M, Scott WW, Reichle R, Plato CC, Tobin JD. The association of body weight, body fatness and body fat distribution with osteoarthritis of the knee: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Rheumatol*. 1995 Mar;22(3):488–93.
 157. Gelber AC, Hochberg MC, Mead LA, Wang NY, Wigley FM, Klag MJ. Body mass index in young men and the risk of subsequent knee and hip osteoarthritis. *Am J Med*. 1999 Dec;107(6):542–8.
 158. Cooper C, Snow S, McAlindon TE, Kellingray S, Stuart B, Coggon D, et al. Risk factors for the incidence and progression of radiographic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2000 May;43(5):995.
 159. Reijman M, Pols HAP, Bergink AP, Hazes JMW, Belo JN, Lievense AM, et al. Body mass index associated with onset and progression of osteoarthritis of the knee but not of the hip: The Rotterdam Study. *Ann Rheum Dis*. 2006 Aug 11;66(2):158–62.
 160. Woolf AD, Breedveld F, Kvien TK. Controlling the obesity epidemic is important for maintaining musculoskeletal health. *Ann Rheum Dis*. 2006 Nov 1;65(11):1401–2.

161. Chowdhury TT, Arghandawi S, Brand J, Akanji OO, Bader DL, Salter DM, et al. Dynamic compression counteracts IL-1beta induced iNOS and COX-2 expression in chondrocyte / agarose constructs. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(2):R35.
162. Gosset M, Berenbaum F, Levy A, Pigenet A, Thirion S, Saffar J-L, et al. Prostaglandin E2 synthesis in cartilage explants under compression: mPGES-1 is a mechanosensitive gene. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(4):R135.
163. Gabay O, Gosset M, Levy A, Salvat C, Sanchez C, Pigenet A, et al. Stress-induced signaling pathways in hyalin chondrocytes: inhibition by Avocado–Soybean Unsaponifiables (ASU). *Osteoarthr Cartil*. 2008 Mar;16(3):373–84.
164. Fitzgerald JB, Jin M, Chai DH, Siparsky P, Fanning P, Grodzinsky AJ. Shear- and Compression-induced Chondrocyte Transcription Requires MAPK Activation in Cartilage Explants. *J Biol Chem*. 2008 Mar 14;283(11):6735–43.
165. Sanchez C, Pesesse L, Gabay O, Delcour J-P, Msika P, Baudouin C, et al. Regulation of subchondral bone osteoblast metabolism by cyclic compression. *Arthritis Rheum*. 2012 Apr;64(4):1193–203.
166. Liu J, Liu T, Zheng Y, Zhao Z, Liu Y, Cheng H, et al. Early responses of osteoblast-like cells to different mechanical signals through various signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Sep;348(3):1167–73.
167. Chen NX, Geist DJ, Genetos DC, Pavalko FM, Duncan RL. Fluid shear-induced NFkappaB translocation in osteoblasts is mediated by intracellular calcium release. *Bone*. 2003 Sep;33(3):399–410.
168. Lee S, Kim TN, Kim SH, Kim YG, Lee CK, Moon HB, et al. Obesity, metabolic abnormality, and knee osteoarthritis: a cross-sectional study in Korean women. *Mod Rheumatol*. 2015;25(2):292–7.
169. Yusuf E, Nelissen RG, Ioan-Facsinay A, Stojanovic-Susulic V, DeGroot J, van Osch G, et al. Association between weight or body mass index and hand osteoarthritis: a systematic review. *Ann Rheum Dis*. 2010 Apr 1;69(4):761–5.
170. Pottie P, Presle N, Terlain B, Netter P, Mainard D, Berenbaum F. Obesity and osteoarthritis: more complex than predicted! *Ann Rheum Dis*. 2006;65(11):1403–5.
171. 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 Nov;48(11):3118–29.
172. Conaghan PG, Vanharanta H, Dieppe PA. Is progressive osteoarthritis an atheromatous vascular disease? *Ann Rheum Dis*. 2005 Nov;64(11):1539–41.
173. Huang PL. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis Model Mech*. 2009 May 1;2(5–6):231–7.
174. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement: Executive Summary. *Crit Pathw Cardiol*. 2005 Dec;4(4):198–203.
175. Singh G, Miller JD, Lee FH, Pettitt D, Russell MW. Prevalence of cardiovascular disease risk factors among US adults with self-reported osteoarthritis: data from

- the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Manag Care*. 2002 Oct;8(15 Suppl):S383-91.
176. Sowers M, Karvonen-Gutierrez CA, Palmieri-Smith R, Jacobson JA, Jiang Y, Ashton-Miller JA. Knee osteoarthritis in obese women with cardiometabolic clustering. *Arthritis Rheum*. 2009 Oct 15;61(10):1328–36.
 177. Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T. Association of knee osteoarthritis with the accumulation of metabolic risk factors such as overweight, hypertension, dyslipidemia, and impaired glucose tolerance in Japanese men and women: The ROAD study. *J Rheumatol*. 2011 May 1;38(5):921–30.
 178. Korochina IE, Bagirova GG. [Metabolic syndrome and a course of osteoarthrosis]. *Ter Arkh*. 2007;79(10):13–20.
 179. Puenpatom RA, Victor TW. Increased Prevalence of Metabolic Syndrome in Individuals with Osteoarthritis: An Analysis of NHANES III Data. *Postgrad Med*. 2009 Nov 13;121(6):9–20.
 180. Engström G, Gerhardsson de Verdier M, Rollof J, Nilsson PM, Lohmander LS. C-reactive protein, metabolic syndrome and incidence of severe hip and knee osteoarthritis. A population-based cohort study. *Osteoarthr Cartil*. 2009 Feb;17(2):168–73.
 181. Wen CY, Chen Y, Tang HL, Yan CH, Lu WW, Chiu KY. Bone loss at subchondral plate in knee osteoarthritis patients with hypertension and type 2 diabetes mellitus. *Osteoarthr Cartil*. 2013 Nov;21(11):1716–23.
 182. Marks R, Allegrante JP. Comorbid disease profiles of adults with end-stage hip osteoarthritis. *Med Sci Monit*. 2002 Apr;8(4):CR305-9.
 183. Felmeden DC, Spencer CGC, Belgore FM, Blann AD, Beevers DG, Lip GYH. Endothelial damage and angiogenesis in hypertensive patients: relationship to cardiovascular risk factors and risk factor management. *Am J Hypertens*. 2003 Jan;16(1):11–20.
 184. Kiefer FN, Neysari S, Humar R, Li W, Munk VC, Battegay EJ. Hypertension and angiogenesis. *Curr Pharm Des*. 2003;9(21):1733–44.
 185. Karter Y, Aydın S, Curgunlu A, Uzun H, Ertürk N, Vehid S, et al. Endothelium and angiogenesis in white coat hypertension. *J Hum Hypertens*. 2004 Nov 24;18(11):809–14.
 186. Berger CE, Kröner AH, Minai-Pour MB, Ogris E, Engel A. Biochemical markers of bone metabolism in bone marrow edema syndrome of the hip. *Bone*. 2003 Sep;33(3):346–51.
 187. Imhof H, Sulzbacher I, Grampp S, Czerny C, Youssefzadeh S, Kainberger F. Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit. *Invest Radiol*. 2000 Oct;35(10):581–8.
 188. Stürmer T, Sun Y, Sauerland S, Zeissig I, Günther KP, Puhl W, et al. Serum cholesterol and osteoarthritis. The baseline examination of the Ulm Osteoarthritis Study. *J Rheumatol*. 1998 Sep;25(9):1827–32.

189. Hart DJ, Doyle D V, Spector TD. Association between metabolic factors and knee osteoarthritis in women: the Chingford Study. *J Rheumatol*. 1995 Jun;22(6):1118–23.
190. Simopoulou T, Malizos KN, Tsezou A. Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) expression in human articular chondrocytes. *Clin Exp Rheumatol*. 25(4):605–12.
191. Nishimura S, Akagi M, Yoshida K, Hayakawa S, Sawamura T, Munakata H, et al. Oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) binding to lectin-like ox-LDL receptor-1 (LOX-1) in cultured bovine articular chondrocytes increases production of intracellular reactive oxygen species (ROS) resulting in the activation of NF-κB. *Osteoarthr Cartil*. 2004 Jul;12(7):568–76.
192. Akagi M, Ueda A, Teramura T, Kanata S, Sawamura T, Hamanishi C. Oxidized LDL binding to LOX-1 enhances MCP-1 expression in cultured human articular chondrocytes. *Osteoarthr Cartil*. 2009 Feb;17(2):271–5.
193. Cillero-Pastor B, Eijkel G, Kiss A, Blanco FJ, Heeren RMA. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry-based molecular distribution distinguishing healthy and osteoarthritic human cartilage. *Anal Chem*. 2012 Oct 11;84(21):8909–16.
194. Lippiello L, Walsh T, Fienhold M. The association of lipid abnormalities with tissue pathology in human osteoarthritic articular cartilage. Vol. 40, *Metabolism*. 1991. p. 571–6.
195. Gkretsi V, Simopoulou T, Tsezou A. Lipid metabolism and osteoarthritis: Lessons from atherosclerosis. *Prog Lipid Res*. 2011 Apr;50(2):133–40.
196. McNulty AL, Stabler T V., Vail TP, McDaniel GE, Kraus VB. Dehydroascorbate transport in human chondrocytes is regulated by hypoxia and is a physiologically relevant source of ascorbic acid in the joint. *Arthritis Rheum*. 2005 Sep;52(9):2676–85.
197. Henrotin YE, Bruckner P, Pujol J-PL. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthr Cartil*. 2003 Oct;11(10):747–55.
198. Hiraiwa H, Sakai T, Mitsuyama H, Hamada T, Yamamoto R, Omachi T, et al. Inflammatory effect of advanced glycation end products on human meniscal cells from osteoarthritic knees. *Inflamm Res*. 2011 Nov 13;60(11):1039–48.
199. Kayal RA, Tsatsas D, Bauer MA, Allen B, Al-Sebaei MO, Kakar S, et al. Diminished Bone Formation During Diabetic Fracture Healing is Related to the Premature Resorption of Cartilage Associated With Increased Osteoclast Activity. *J Bone Miner Res*. 2007 Jan 22;22(4):560–8.
200. Alblowi J, Kayal RA, Siqueira M, Siqueria M, McKenzie E, Krothapalli N, et al. High levels of tumor necrosis factor-alpha contribute to accelerated loss of cartilage in diabetic fracture healing. *Am J Pathol*. 2009 Oct;175(4):1574–85.
201. Friel NA, Chu CR, Lohmander LS, Ostenberg A, Englund M, et al. et, et al. The role of ACL injury in the development of posttraumatic knee osteoarthritis. *Clin Sports Med*. 2013 Jan;32(1):1–12.

202. Fox AJS, Bedi A, Deng X-H, Ying L, Harris PE, Warren RF, et al. Diabetes mellitus alters the mechanical properties of the native tendon in an experimental rat model. *J Orthop Res*. 2011 Jun;29(6):880–5.
203. Odetti P, Aragno I, Rolandi R, Garibaldi S, Valentini S, Cosso L, et al. Scanning force microscopy reveals structural alterations in diabetic rat collagen fibrils: role of protein glycation. *Diabetes Metab Res Rev*. 2000 Mar;16(2):74–81.
204. Connizzo BK, Bhatt PR, Liechty KW, Soslowsky LJ. Diabetes Alters Mechanical Properties and Collagen Fiber Re-Alignment in Multiple Mouse Tendons. *Ann Biomed Eng*. 2014 Sep 15;42(9):1880–8.
205. David MA, Jones KH, Inzana JA, Zuscik MJ, Awad HA, Mooney RA, et al. Tendon Repair Is Compromised in a High Fat Diet-Induced Mouse Model of Obesity and Type 2 Diabetes. Reilly G, editor. *PLoS One*. 2014 Mar 21;9(3):e91234.
206. Pessler F, Dai L, Diaz-Torne C, Gomez-Vaquero C, Paessler ME, Zheng D-H, et al. The synovitis of “non-inflammatory” orthopaedic arthropathies: a quantitative histological and immunohistochemical analysis. *Ann Rheum Dis*. 2008 Aug;67(8):1184–7.
207. Atayde SA, Yoshinari NH, Nascimento DP, Catanozi S, Andrade PC, Velosa APP, et al. Experimental diabetes modulates collagen remodelling of joints in rats. *Histol Histopathol*. 2012 Nov;27(11):1471–9.
208. Goldring MB. immortalization of human articular chondrocytes for generation of stable, differentiated cell lines. *Methods Mol Med*. 2004;100(1):23–36.
209. Cousin SP, Hügl SR, Wrede CE, Kajio H, Myers MG, Rhodes CJ. Free fatty acid-induced inhibition of glucose and insulin-like growth factor I-induced deoxyribonucleic acid synthesis in the pancreatic beta-cell line INS-1. *Endocrinology*. 2001 Jan;142(1):229–40.
210. Joosten MM, Balvers MG, Verhoeckx KC, Hendriks HF, Witkamp RF. Plasma anandamide and other N-acyl ethanolamines are correlated with their corresponding free fatty acid levels under both fasting and non-fasting conditions in women. *Nutr Metab (Lond)*. 2010 Jun 14;7(1):49.
211. Zhang J, Zhao Y, Xu C, Hong Y, Lu H, Wu J, et al. Association between serum free fatty acid levels and nonalcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study. *Sci Rep*. 2014 Jul 25;4:5832.
212. Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JB. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. Vol. 268, *Methods in enzymology*. 1996. p. 142–51.
213. Wu H, Ying M, Hu X. Lactic acidosis switches cancer cells from aerobic glycolysis back to dominant oxidative phosphorylation. *Oncotarget*. 2014;7(26):36–8.
214. Spandl J, White DJ, Peychl J, Thiele C. Live cell multicolor imaging of lipid droplets with a new dye, LD540. *Traffic*. 2009;
215. Joosten MM, Balvers MG, Verhoeckx KC, Hendriks HF, Witkamp RF. Plasma anandamide and other N-acyl ethanolamines are correlated with their corresponding free fatty acid levels under both fasting and non-fasting conditions

- in women. *Nutr Metab (Lond)*. 2010 Jun 14;7:49.
216. Sindhu S, Al-Roub A, Koshy M, Thomas R, Ahmad R. Palmitate-Induced MMP-9 Expression in the Human Monocytic Cells is Mediated through the TLR4-MyD88 Dependent Mechanism. *Cell Physiol Biochem*. 2016;39(3):889–900.
217. Alvarez-Garcia O, Rogers NH, Smith RG, Lotz MK. Palmitate has proapoptotic and proinflammatory effects on articular cartilage and synergizes with interleukin-1. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(7):1779–88.
218. Abramson SB. Inflammation in osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl*. 2004 Apr;70:70–6.
219. Kadotani A, Tsuchiya Y, Hatakeyama H, Katagiri H, Kanzaki M. Different impacts of saturated and unsaturated free fatty acids on COX-2 expression in C2C12 myotubes. *AJP Endocrinol Metab*. 2009 Dec 1;297(6):E1291–303.
220. Oh E, Yun M, Kim SK, Seo G, Bae JS, Joo K, et al. Palmitate induces COX-2 expression via the sphingolipid pathway-mediated activation of NF- κ B, p38, and ERK in human dermal fibroblasts. *Arch Dermatol Res*. 2014 May 15;306(4):339–45.
221. Chen X, Xu S, Wei S, Deng Y, Li Y, Yang F, et al. Comparative Proteomic Study of Fatty Acid-treated Myoblasts Reveals Role of Cox-2 in Palmitate-induced Insulin Resistance. *Sci Rep*. 2016 Feb 22;6:21454.
222. Bunn RC, Cockrell GE, Ou Y, Thrailkill KM, Lumpkin CK, Fowlkes JL, et al. Palmitate and insulin synergistically induce IL-6 expression in human monocytes. *Cardiovasc Diabetol*. 2010 Nov 5;9:73.
223. Maloney E, Sweet IR, Hockenbery DM, Pham M, Rizzo NO, Tateya S, et al. Activation of NF- κ B by palmitate in endothelial cells: a key role for NADPH oxidase-derived superoxide in response to TLR4 activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Sep;29(9):1370–5.
224. Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S, Pinetti A, et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009 May;24(5):830–40.
225. Soumura M, Kume S, Isshiki K, Takeda N, Araki S, Tanaka Y, et al. Oleate and eicosapentaenoic acid attenuate palmitate-induced inflammation and apoptosis in renal proximal tubular cell. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Nov 12;402(2):265–71.
226. Adams CS, Horton WE. Chondrocyte apoptosis increases with age in the articular cartilage of adult animals. *Anat Rec*. 1998;250(4):418–25.
227. Kop'eva TN, Bel'skaia OB, Astapenko MG, Arutiunov AG. [Morphology of articular cartilage in osteoarthrosis]. *Arkh Patol*. 1986;48(12):40–6.
228. Shimabukuro M, Wang M-Y, Zhou Y-T, Newgard CB, Unger RH. Protection against lipoapoptosis of α cells through leptin-dependent maintenance of Bcl-2 expression. *Med Sci*. 1998;95:9558–61.
229. Dyntar D, Eppenberger-Eberhardt M, Maedler K, Pruschy M, Eppenberger HM, Spinass GA, et al. Glucose and Palmitic Acid Induce Degeneration of Myofibrils and

- Modulate Apoptosis in Rat Adult Cardiomyocytes. 2105;
230. Turpin SM, Lancaster GI, Darby I, Febbraio M a, Watt MJ. Apoptosis in skeletal muscle myotubes is induced by ceramides and is positively related to insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291:E1341–50.
 231. Fillmore N, Huqi A, Jaswal JS, Mori J, Paulin R, Haromy A, et al. Effect of fatty acids on human bone marrow mesenchymal stem cell energy metabolism and survival. *PLoS One.* 2015;10(3):1–17.
 232. Liu J, Chang F, Li F, Fu H, Wang J, Zhang S, et al. Palmitate promotes autophagy and apoptosis through ROS-dependent JNK and p38 MAPK. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Jul 31;463(3):262–7.
 233. Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JPL. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthr Cartil.* 2003;11(10):747–55.
 234. Kwon B, Lee H-K, Querfurth HW. Oleate prevents palmitate-induced mitochondrial dysfunction, insulin resistance and inflammatory signaling in neuronal cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2014 Jul;1843(7):1402–13.
 235. Lambertucci RH, Hirabara SM, Silveira L dos R, Levada-Pires AC, Curi R, Pithon-Curi TC. Palmitate increases superoxide production through mitochondrial electron transport chain and NADPH oxidase activity in skeletal muscle cells. *J Cell Physiol.* 2008 Sep;216(3):796–804.
 236. Lee E, Choi J, Lee HS. Palmitate Induces Mitochondrial Superoxide Generation and Activates AMPK in Podocytes. *J Cell Physiol.* 2017 Feb 18;
 237. Volpe CMO, Abreu LFM, Gomes PS, Gonzaga RM, Veloso CA, Nogueira-Machado JA. The production of nitric oxide, IL-6, and TNF-alpha in palmitate-stimulated pbmncs is enhanced through hyperglycemia in diabetes. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014.
 238. Rabkin SW, Klassen SS. Palmitate-induced NO production has a dual action to reduce cell death through NO and accentuate cell death through peroxynitrite formation. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids.* 2008 Feb;78(2):147–55.
 239. Tsang MYC, Cowie SE, Rabkin SW. Palmitate increases nitric oxide synthase activity that is involved in palmitate-induced cell death in cardiomyocytes. *Nitric Oxide.* 2004 Feb;10(1):11–9.
 240. Sato Y, Fujimoto S, Mukai E, Sato H, Tahara Y, Ogura K, et al. Palmitate induces reactive oxygen species production and b-cell dysfunction by activating nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase through Src signaling. *J Diabetes Invest.* 2014;5:19–26.
 241. Dasgupta J, Subbaram S, Connor KM, Rodriguez AM, Tirosh O, Beckman JS, et al. Manganese superoxide dismutase protects from TNF-alpha-induced apoptosis by increasing the steady-state production of H2O2. *Antioxid Redox Signal.* 2006 Jul;8(7–8):1295–305.
 242. Maneiro E, Martín MA, de Andres MC, López-Armada MJ, Fernández-Sueiro JL, del Hoyo P, et al. Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2003;

243. Ruiz-Romero C, Carreira V, Rego I, Remeseiro S, López-Armada MJ, Blanco FJ. Proteomic analysis of human osteoarthritic chondrocytes reveals protein changes in stress and glycolysis. *Proteomics*. 2008 Feb;8(3):495–507.
244. Nishida T, Kubota S, Aoyama E, Takigawa Y, M. Impaired glycolytic metabolism causes chondrocyte hypertrophy-like changes via promotion of phospho-Smad1/5/8 translocation into nucleus. 2013;
245. Guzman RE, Evans MG, Bove S, Morenko B, Kilgore K. Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicol Pathol*. 2003 Oct;31(6):619–24.
246. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J*. 2011;435:297–312.
247. Dranka BP, Hill BG, Darley-Usmar VM. Mitochondrial reserve capacity in endothelial cells: The impact of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 2010;
248. Dranka BP, Benavides GA, Diers AR, Giordano S, Zelickson BR, Reily C, et al. Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling.
249. Patková J, Anděl M, Trnka J. Palmitate-induced cell death and mitochondrial respiratory dysfunction in myoblasts are not prevented by mitochondria-targeted antioxidants. *Cell Physiol Biochem*. 2014 May 5;33(5):1439–51.
250. Rachek LI, Musiyenko SI, LeDoux SP, Wilson GL. Palmitate Induced Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid Damage and Apoptosis in L6 Rat Skeletal Muscle Cells. *Endocrinology*. 2007 Jan;148(1):293–9.
251. Hirabara SM, Curi R, Maechler P. Saturated fatty acid-induced insulin resistance is associated with mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells. *J Cell Physiol*. 2010 Jan;222(1):187–94.
252. Hall E, Volkov P, Dayeh T, Bacos K, Ronn T, Nitert MD, et al. Effects of palmitate on genome-wide mRNA expression and DNA methylation patterns in human pancreatic islets. *BMC Med*. 2014 Jun 23;12:103.
253. Hovsepian M, Sargsyan E, Bergsten P. Palmitate-induced changes in protein expression of insulin secreting INS-1E cells. *J Proteomics*. 2010 Apr 18;73(6):1148–55.
254. Bolon C, Gauthier C, Simonnet H. Glycolysis inhibition by palmitate in renal cells cultured in a two-chamber system. *Am J Physiol*. 1997 Nov;273(5 Pt 1):C1732-8.
255. Coll T, Eyre E, Rodríguez-Calvo R, Palomer X, Sánchez RM, Merlos M, et al. Oleate reverses palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*. 2008;
256. Walther TC, Farese R V, Jr. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:687–714.
257. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese R V, Ory DS, et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Mar 18;100(6):3077–82.

258. Fu D, Lu J, Yang S. Oleic/Palmitate Induces Apoptosis in Human Articular Chondrocytes via Upregulation of NOX4 Expression and ROS Production. *Ann Clin Lab Sci*. 2016 Jul;46(4):353–9.