

UNIVERSIDADE DA CORUÑA

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

ESTUDIO "IN VITRO"  
DEL EFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO  
SOBRE LOS CONDROCITOS  
ARTICULARES HUMANOS:  
proliferación, viabilidad  
y envejecimiento

Francisco Javier Blanco García  
Marzo, 1998



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**ESTUDIO “IN VITRO”  
DEL EFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO  
SOBRE LOS CONDROCITOS  
ARTICULARES HUMANOS:  
proliferación, viabilidad  
y envejecimiento**

**Francisco Javier Blanco García  
Marzo, 1998**



## UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
CENTRO UNIVERSITARIO DE OZA

15006 A Coruña

Benigno Fausto Galdo Fernández, jefe del Servicio de Reumatología del Hospital Juan Canalejo y Francisco Javier de Toro Santos, Profesor Titular de Ciencias Morfológicas de la Universidad de A Coruña,

### **CERTIFICAMOS:**

Que D. **Francisco Javier Blanco García** ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo **“Estudio in vitro del efecto del óxido nítrico sobre los condrocitos articulares humanos: proliferación, viabilidad y envejecimiento”**.

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

Fausto Galdo Fernández

F. Javier de Toro Santos

En A Coruña, a 9 de marzo de 1.998

Parte de este trabajo ha sido publicado y/o presentado en las siguientes revistas y reuniones científicas:

## **PUBLICACIONES**

Francisco J. Blanco and Martin Lotz. "IL-1 induced nitric oxide inhibits chondrocyte proliferation via PGE2". *Experimental Cell Research*, 218;1995.

Francisco J. Blanco, Robert Och, Herbert Schwarz and Martin Lotz. "Nitric oxide induces apoptosis in chondrocytes". *Am J Pathology*, 195:534-540, 1995.

Francisco J. Blanco, Yu Geng and Martin Lotz. "Differentiation-dependent effects of IL-1 and TGF $\beta$  on chondrocyte proliferation are related to iNOS expression". *J Immunology* 154:4018-4026, 1995.

## **CONGRESOS**

"Endogenous nitric oxide as a mediator of the antiproliferative effects of IL-1 in chondrocytes. A base for differential growth regulation by IL-1 in chondrocytes and fibroblasts" 57th Annual Meeting of American College of Rheumatology. San Antonio, Texas (USA), 1993.

"IL-1 induced nitric oxide inhibits chondrocytes proliferation via PGE2" FASEB 94. Anaheim, California (USA), 1994.

"Nitric oxide induces apoptosis in chondrocytes". 58th Annual Meeting of American College of Rheumatology. Minneapolis, Minnesota (USA), 1994.

"Differentiation-dependent effects of IL-1 and TGF $\beta$  on chondrocyte proliferation are related to iNOS expression". 59th Annual Meeting of American College of Rheumatology. San Francisco, California (USA), 1995.

"La síntesis de óxido nítrico por el cartílago articular sano aumenta durante el envejecimiento". XXIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Reumatología. Madrid, 1997.

## **BECAS**

FIS/94. Expediente 94/2138. *Óxido Nítrico: Un mediador de la destrucción del cartílago articular*. Universidad de California, San Diego.

BECA UNIVERSIDAD DE A CORUÑA 1996. *El óxido nítrico en la degeneración del cartílago articular humano: análisis de su papel en el envejecimiento y en la artrosis*.

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento a las siguientes personas y entidades que han hecho posible que este trabajo sea una realidad:

Al Dr. Juan J. Gómez-Reino Carnota, Jefe de Servicio Reumatología del Complejo Hospitalario Xeral de Galicia, por encender y estimular mi interés hacia la investigación, así como por su continua confianza en mí.

Al Dr. Martin Lotz, de la Universidad de California, por el tiempo y el esfuerzo dedicado a la enseñanza sobre la investigación básica en el campo del cartílago articular.

A los Dres. Fausto Galdo y Francisco J. de Toro, por su dirección y apoyo en la realización de esta tesis doctoral.

Al Dr. Franciso Arnal Monreal, subdirector de investigación del Hospital Juan Canalejo, por hacer posible la continuación del trabajo iniciado en la Universidad de California.

Al Servicio de Reumatología del Hospital Juan Canalejo (Dres. Antonio Atanes, Mercedes Freire y Jenaro Graña) por su colaboración.

Al Dr. Cándido Andión, Jefe del Banco de Tejidos del Hospital Juan Canalejo, por facilitarme gran parte de los medios necesarios para el correcto desarrollo de este trabajo.

Al Departamento de Traumatología del Hospital Juan Canalejo, por suministrar parte del cartílago articular utilizado en los estudios.

A los Dres. José L. Fernández Sueiro y José de La Mata Llord, por todas las aventuras que hemos pasado juntos, por los consejos y el aliento que siempre me han dado en los momentos más difíciles.

A Cristina (mi mujer), por soportarme y por el excelente trabajo de edición que ha hecho.

***A mis padres, hermanos,  
hijos y a mi mujer***

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>8</b>
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>11</b>
1. El condrocito articular humano .....	12
1.1. Las citoquinas y el condrocito articular humano .....	14
1.2. La celularidad del cartílago .....	15
1.3. El condrocito en el cartílago artrósico .....	16
1.4. La proliferación del condrocito y el envejecimiento del cartílago articular humano .....	17
2. El óxido nítrico .....	19
2.1. Genes del NO .....	19
2.2. Clonación de la iNOS de los condrocitos .....	21
2.3. Regulación de las isoformas de iNOS .....	21
2.4. Sustancias que regulan los niveles de NO .....	23
2.5. Efectos moleculares del NO .....	23
2.6. Efectos sobre el crecimiento celular y la diferenciación .....	25
2.7. Síntesis de No en las células articulares .....	25
3. La apoptosis .....	27
3.1. Definición .....	27
3.2. Revisión histórica .....	28
3.3. Características morfológicas .....	29
3.4. Mecanismos bioquímicos y moleculares .....	30
3.5. Incidencia de la apoptosis .....	31
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
<b>V. RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
1. El NO y la proliferación de los condrocitos .....	52
1.1. Los donantes de NO inhiben la proliferación .....	52
1.2. El NMA neutraliza parcialmente el efecto de la IL-1 .....	53
1.3. La interacción entre la PGE2 y NO es el efecto inhibitor de la proliferación de los condrocitos de la IL-1 .....	54
1.4. El NO induce la síntesis de la PGE2 .....	55

1.5. El efecto de la indometacina en la capacidad antiproliferativa del NO .....	56
2. El óxido nítrico y la viabilidad de los condrocitos .....	57
2.1. Los donantes de NO inducen apoptosis en condrocitos .....	57
2.2. La IL-1 y otros inductores de la síntesis endógena de NO no provocan la muerte de los condrocitos .....	60
2.3. La interacción del NO y los radicales de oxígeno sobre la inducción de apoptosis en los condrocitos .....	61
2.4. La apoptosis inducida por IL-1 en presencia de los bloqueantes de los radicales de oxígeno depende de la síntesis de NO endógena .....	62
2.5. Los radicales de oxígeno reducen la apoptosis inducida por NO .....	63
3. El óxido nítrico y el envejecimiento de los condrocitos .....	65
3.1. Variaciones en los efectos de regulación del crecimiento que tienen la IL-1 y el TGF $\beta$ .....	65
3.2. Interacción de la IL-1 y el TGF $\beta$ sobre la regulación de la expresión de iNOS .....	65
3.3. La regulación de la producción de NO por la IL-1 y el TGF $\beta$ muestra cambios similares a los efectos de estas citoquinas .....	67
3.4. Los efectos antiproliferativos del TGF $\beta$ en los pases tardíos son suprimidos por el inhibidor de NOS, NMA .....	68
3.5. Expresión del colágeno tipo I y II en los condrocitos primarios y subcultivados .....	68
3.6. Los niveles de NO sintetizado por los condrocitos aumentan con la edad del donante .....	69
3.7. La expresión de iNOS en los condrocitos de diferentes donantes .....	70
3.8. El número de condrocitos apoptóticos aumenta con la edad del donante .....	70

<b>VI. DISCUSIÓN</b> .....	<b>72</b>
----------------------------	-----------

<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	<b>80</b>
--------------------------------	-----------

<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>82</b>
---------------------------------	-----------



# **I. INTRODUCCIÓN**

**El condrocito** es el elemento celular del cartílago articular hialino, que carece de vascularización e inervación y está anclado en el hueso (hueso subcondral) [1]. Los condrocitos representan entre el 1% y 2% del volumen total del cartílago articular. El otro elemento del cartílago, la matriz extracelular, representa entre el 70%-80% del peso total y está formada por el colágeno, que constituye alrededor de un 50% del peso seco; los proteoglicanos, entre un 30-35%, y las proteínas-no-colágeno, que representan entre 15-20% [2].

Los cambios que ocurren durante el envejecimiento en el cartílago articular incluyen el deterioro de las propiedades mecánicas, el descenso de la celularidad, el descenso del grosor del cartílago, la alteración de la matriz extracelular y de la función del condrocito. Los condrocitos representan la única célula que está presente en el cartílago maduro y son los responsa-

bles del mantenimiento y reparación del tejido articular [2].

La reducción del número de células con el envejecimiento del cartílago articular y la producción alterada de la matriz extracelular por las células contribuyen a la patogénesis de la destrucción del cartílago y a la aparición de la artrosis [3, 4]. El cartílago procedente de los cóndilos femorales de donantes viejos muestra un descenso en la densidad celular de aproximadamente el 50%. Existe una relación entre el descenso en el número de células con la edad y la presencia de fibrilación en el cartílago. El número de lagunas libres en el cartílago también aumenta con la edad. El cartílago normal de las articulaciones artrósicas es igualmente hipocelular comparado con el cartílago no artrósico. La reducción de la celularidad no está limitada a zonas de carga, ya que se han hallado cambios similares en el cartílago hialino artenoideo [4].

**La apoptosis** es un tipo de muerte celular que ha sido definida como un proceso activo, regulado genéticamente y que origina la autodestrucción de la célula [5-7]. En la mayoría de los tejidos, la división celular se produce continuamente, sin un aumento del tamaño del órgano y sin que se desarrolle ningún tumor, lo cual sugiere que el grado de división está equilibrado por el grado de muerte celular. Este equilibrio se mantiene gracias a la apoptosis.

La apoptosis se produce en muy diversas situaciones fisiológicas, como la embriogénesis, y juega un papel importante en la homeostasia de los tejidos normales. En el envejecimiento aparece una eventual pérdida del control apoptótico y una acumulación de errores que deberían ser eliminados en los organismos más jóvenes [8, 9].

Se ha apuntado la ruptura en el equilibrio entre supervivencia y apoptosis celular como posible responsable de gran número de enfermedades: cáncer (como la hipertrofia prostática y el linfoma de células B), enfermedades neurodegenerativas (como la enfermedad de Alzheimer, enfermedades cardíacas), alteraciones del sistema inmunológico (como la diabetes mellitus tipo I o el SIDA), enfermedades reumatológicas (como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico y la artrosis) [10, 11].

**El Óxido Nítrico (NO)** es un radical gaseoso e inorgánico involucrado en distintas respuestas biológicas

incluyendo mecanismos de defensa no específicos, regulación del tono vascular y neurotransmisión [12,13]. Además, los estudios más recientes muestran que el NO es un inhibidor del crecimiento de muchos tipos celulares, y media el efecto antiproliferativo de otros factores, tales como IL-1 [14]. Así mismo, el NO inhibe la función secretora de algunas células.

La síntesis de NO forma parte del programa catabólico en los condrocitos. Esta afirmación está avalada por el hecho de que la expresión de la forma inducible de la enzima óxido nítrico sintetasa (iNOS) es estimulada por la IL-1 y el TNF- $\alpha$ , pero no por el factor de crecimiento TGF $\beta$ , el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) o el factor insulínico del crecimiento (IGF) [15,16]. En el condrocito se ha demostrado que el NO inhibe la síntesis y secreción de proteoglicanos [17]. Algunos fármacos capaces de liberar NO (NO exógeno), así como NO endógeno inducido por la IL-1, pueden también incrementar la síntesis de la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) [18] y causar apoptosis en los condrocitos [19].

En este trabajo estudiamos el efecto del NO sobre el condrocito articular humano, principalmente en su acción sobre la capacidad proliferativa de la células y en su efecto citotóxico. Así mismo, analizamos los mecanismos básicos de la regulación de la enzima iNOS en los condrocitos articulares humanos durante el envejecimiento del cartílago articular humano.

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## EL CONDROCITO ARTICULAR HUMANO

El condrocito es el elemento celular del cartílago articular hialino que carece de vascularización e inervación y está anclado en el hueso (hueso subcondral) [1]. Los condrocitos representan entre el 1% y 2% del volumen total del cartílago articular. El otro elemento del cartílago, la matriz extracelular, representa entre el 70%-80% del peso total y está formada por el colágeno, que constituye alrededor de un 50% del peso seco; los proteoglicanos, entre un 30-35%, y las proteínas-no-colágeno, que representan sobre un 15-20%.

El condrocito es el responsable de la síntesis y del mantenimiento de la matriz extracelular. Varía en tamaño, forma y número por volumen de tejido desde la superficie hasta las capas profundas. Ocupa un lugar dentro de la matriz cartilaginosa, al que llamamos "laguna". La unidad funcional del cartílago es el condrón, que está formado por el condrocito, la laguna y la matriz extracelular que rodea a la laguna [1].

Los estudios con microscopio electrónico muestran cómo las fibras de colágeno llegan desde la matriz hasta el borde de las lagunas, atraviesan estas y contactan con la membrana citoplasmática de la célula [20]. Los condrocitos poseen escasas mitocondrias, hecho que se explica por el reducido consumo de oxígeno de estas células. Las células de la capa profunda no calcificada poseen un desarrollado retículo endoplásmico y aparato de Golgi para la síntesis de proteínas y la sulfatación de los mucopolisacáridos [1]. Aunque no es frecuente la división celular, se puede observar en determinados cartílagos adultos como respuesta a ciertas agresiones.

La combinación de estos cuatro elementos (células, colágeno, proteoglicanos y proteínas-no-colágeno) proporciona al cartílago articular sus especiales características. El colágeno que posee este cartílago es de tipo II; estructuralmente está formado por tres

cadenas alfa-1 [ $\alpha$ -1 (II)<sup>3</sup>] en su molécula triple helicoidal [21]. Estas cadenas tienen más residuos de hidroxilisina que el colágeno tipo I, y muchos de esos residuos están glicosilados. El análisis con microscopio electrónico ha demostrado que en las capas superficiales del cartílago el colágeno adopta una orientación horizontal, las fibras están más compactas y su diámetro es menor. Esta orientación protege al cartílago de la abrasión, al tiempo que transmite las fuerzas de compresión desde la superficie hacia sus márgenes. El contenido de colágeno en el cartílago disminuye de manera progresiva desde las capas superficiales hasta las más profundas. En las capas profundas, las fibras de colágeno están más separadas, su diámetro es mayor y se encuentran alineadas de forma vertical. Las fibras se continúan con las fibras de cartílago calcificado, pero no con las del hueso subcondral. La disposición del colágeno permite la retención de los proteoglicanos, formando así un entramado en la matriz extracelular. Además del colágeno tipo II, el cartílago articular cuenta, aunque en menor cuantía, con otros colágenos, como el IX y el X.

Los proteoglicanos son moléculas formadas por proteínas y glucosaminoglicanos [22]. Se disponen entre las fibras de colágeno y la mayoría de ellos existen como grandes agregados de moléculas formadas por un núcleo central de ácido hialurónico, al que se unen, a través de las proteínas de unión, otras proteínas (agrecán, decorín, biglicán) que llevan pegadas diferentes cadenas lineales de mucopolisacáridos. Los principales mucopolisacáridos son el condroitín 4-sulfato (C4-S),

el condroitín-6 sulfato (C6-S) y el keratán sulfato. La proporción en la que aparecen estas diferentes moléculas varía a lo largo de la vida y de la localización. Así, por ejemplo, la proporción de C4-S es mayor en los niños, mientras que la de keratán sulfato es mayor en individuos ancianos y en las capas profundas del cartílago articular.

Además de las proteínas que constituyen la matriz extracelular, los condrocitos pueden sintetizar una serie de proteínas y enzimas cuya función es de especial relevancia en la homeostasia del cartílago articular. Entre las enzimas destacan los grupos de las metaloproteasas (MMP), las serinoproteasas y las tiolproteasas.

*Metaloproteasas.* Dos son los tipos básicos de MMP que intervienen en la destrucción del cartílago: las colagenasas y las proteoglicanasas. Las colagenasas son un grupo de enzimas con capacidad para degradar la triple hélice del colágeno [23]. En el ser humano se han identificado tres formas diferentes de colagenasas: la colagenasa tisular (MMP-1), la del neutrófilo (MMP-8) y la MMP-13. La colagenasa es la enzima responsable de la ruptura de la red de colágeno en la OA, lo que explica la detección *in situ* de elevados niveles de colagenasa (proteína y mRNA) en cartílago de pacientes con OA [24]. Así mismo, se estableció una relación entre los niveles de colagenasa y la severidad de las lesiones de OA en el cartílago [25]. En lo que se refiere a las proteoglicanasas, se han identificado dos formas: la neutra (estromelisina) y la ácida. En ambos casos se produce un incremento cuantitativo de estas enzimas en el cartílago con OA, así como una relación proporcional de su

nivel con la severidad de las lesiones [26]. La estromelina tiene una doble función en la patogénesis de la OA: por una parte, produce un perfil de fragmentación de los proteoglicanos semejante al que se encuentra en la OA; por otra, es también capaz de activar la procolagenasa. La actividad biológica de las metaloproteasas se ve controlada por inhibidores fisiológicos, llamados inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMP-1 y TIMP-2). El TIMP-1 aparece en el cartílago normal y es sintetizado por los condrocitos, mientras que en el cartílago artrósico se produce un desequilibrio entre la cantidad de TIMP-1 y las MMP, de lo que resulta un déficit relativo en la cantidad del inhibidor [27].

*Serinoproteasas.* Pertenecen al grupo de los activadores del plasminógeno (PA)/plasmina. Estas enzimas son capaces de activar la colagenasa, para lo cual requieren la presencia de la estromelina. En el cartílago artrósico, se detectaron niveles elevados de estas enzimas, así como un descenso de la proteína encargada de neutralizar su función, el inhibidor fisiológico del activador del plasminógeno (PAI-1) [26].

*Tiolproteasas.* Pertenecen al grupo de las catépsinas (D y B). La catépsina B es una enzima lisosomal que produce degradación del colágeno y de los proteoglicanos, al tiempo que activa las MMP. Actúa principalmente en el área pericelular. En el cartílago artrósico, los niveles de catépsina B son más elevados, y se puede observar una mayor actividad en las lesiones del cartílago, junto con un descenso de la actividad de la proteasa inhibidora de esta enzima [26]. El desequilibrio entre estas

dos proteínas (enzima e inhibidor de la enzima) puede asimismo influir de forma decisiva en la degradación del cartílago.

### **1.1 Las citoquinas y el condrocito articular humano.**

En el condrocito se pueden distinguir dos programas cualitativamente diferentes, el programa catabólico y el anabólico [2, 28]. El primero es inducido por estímulos proinflamatorios y se caracteriza por la secreción de proteasas, la supresión de la síntesis de la matriz extracelular y la inhibición de la proliferación de los condrocitos. El anabólico, por su parte, se asocia a la secreción de citoquinas antiinflamatorias, síntesis de inhibidores de las proteasas, producción de la matriz extracelular y proliferación celular [28, 29]. La activación de los condrocitos y la inducción de las respuestas anabólicas y/o catabólicas son funciones realizadas por las citoquinas y por los factores de crecimiento.

La interleuquina-1 (IL-1) es el prototipo de estímulo capaz de inducir respuestas catabólicas en el condrocito articular humano [30]. La IL-1 estimula la expresión de determinadas proteasas, como la estromelina, la colagenasa y el factor activador del plasminógeno [31]. La IL-1 suprime la expresión del ARNm del alfa-1(II) procolágeno y del colágeno tipo II, y la síntesis de proteoglicanos en el condrocito [32]. La IL-1 inhibe la hipertrofia del condrocito y el inicio de la calcificación durante la osificación del cartílago. La IL-1 es un potente inhibidor de la proliferación del condrocito inducida por el suero o por el factor transformador del creci-

miento- $\beta$  (TGF $\beta$ ). La suma de todos estos efectos (la inhibición de la síntesis de la MEC y la proliferación celular por un lado, y la inducción de proteasas por otro) da como resultado final la reabsorción del cartílago, resultado que se ha visto confirmado por los efectos de la inyección intra-articular de la citoquina [33]. La IL-1 es también un potente inductor de la síntesis de prostaglandinas, efecto que se explica por la inducción de la expresión del gen de la enzima ciclooxigenasa II (COX-II) [34].

La formación de la matriz extracelular (MEC) del cartílago es estimulada por factores de crecimiento tales como el TGF $\beta$ , el IGF y el FGF (factor fibroblástico del crecimiento). El TGF $\beta$  aumenta la síntesis del colágeno tipo II, IX y de los proteoglicanos. El TGF $\beta$  no estimula la producción de metaloproteasas, pero sí incrementa la expresión de la enzima inhibidora de las metaloproteinasas (TIMP) en los condrocitos [35]. Entre los factores conocidos del crecimiento, el TGF $\beta$  es el estímulo más potente capaz de inducir proliferación en los condrocitos. Además de inducir la proliferación de los condrocitos, la expresión del gen del TGF $\beta$  también favorece la calcificación de la matriz extracelular y la formación de hueso.

Como resumen, el mantenimiento de la homeostasia de la matriz en el cartílago del adulto sano requiere un normal *turnover* de los componentes de la matriz, principalmente colágeno y proteoglicanos. Los condrocitos y los sinoviocitos de estirpe fibroblástica son estimulados a través de sus receptores de membrana por las citoquinas, para producir proteasas de la matriz y

para suprimir la síntesis de colágeno y proteoglicanos. Así pues, las citoquinas no sólo favorecen la destrucción del cartílago, sino que también inhiben su reparación. Existe un grupo de proteínas capaces de contrarrestar los efectos de las citoquinas, bien bloqueando la unión entre la citoquina y el receptor, o bien inhibiendo la síntesis local de citoquinas o convirtiendo la citoquina en una forma inactiva. Además, diversos factores de crecimiento, tales como TGF $\beta$ , pueden contraponerse al efecto de las citoquinas, estimulando la síntesis de matriz o de los inhibidores naturales de la degradación del cartílago.

## 1.2. La celularidad del cartílago.

La principal diferencia en la celularidad del cartílago articular es vista entre el cartílago fetal y el del adulto. El cartílago de la epífisis fetal contiene alrededor de 24 millones de células por gramo de tejido, mientras que en el adulto es de alrededor de medio millón [36]. Quintero y col. analizaron los condilos femorales de 77 autopsias y observaron aproximadamente una reducción del 50% en la densidad celular en los cartílagos procedentes de donantes mayores de 40 años, en comparación con los donantes más jóvenes de 40 años [3]. Esta diferencia fue vista tanto en las capas superficiales como en las zonas calcificadas. El número de lagunas vacías también aumenta con la edad.

La OA es la enfermedad más frecuente del aparato locomotor en los humanos, y está asociada a cambios en la composición de la matriz extracelular y en la celularidad. Vignon y col.



observaron una correlación entre la reducida celularidad del cartílago y el incremento de las fibrilaciones [4]. Aparentemente el cartílago normal en las articulaciones artrósicas es también hipocelular comparándolo con muestras no artrósicas. La reducida celularidad no está limitada a las articulaciones que soportan carga, pues también se ha observado en el cartílago hialino del aritenoides [37]. El número de lagunas vacías también aumenta con la edad, y existe una correlación entre los cambios artrósicos, la celularidad y el envejecimiento.

Dichas observaciones parecen sugerir que, bajo condiciones de reducida celularidad, hay un menor número de células productoras de MEC. Esto puede ser uno de los factores que influyen en la escasa capacidad de reparación por parte de los condrocitos en los cartílagos de la gente anciana.

### 1.3 El condrocito en el cartílago artrósico.

Durante el desarrollo de la OA el principal evento que se produce a nivel de la articulación es el deterioro del cartílago articular. Histológicamente el cartílago artrósico se caracteriza por: reducción de los proteoglicanos, aumento de agua, y multiplicación y migración de los condrocitos formando clones. En fases avanzadas, el número de condrocitos se reduce y aumenta el número de laguna vacías. No suelen producirse alteraciones en la red de colágeno. Howell ha sugerido tres posibles explicaciones acerca de los mecanismos de destrucción del cartílago [38]. Una de ellas considera la OA como consecuencia de una insufi-

ciencia del cartílago articular debida al envejecimiento, a un traumatismo o a una alteración primaria de la matriz. Una segunda explicación atribuye la OA a una alteración del condrocito en el equilibrio entre la síntesis y la degradación de la matriz. Finalmente, la tercera hipótesis considera el remodelado óseo, la respuesta sinovial, microfracturas, cambios vasculares y otros factores exteriores al cartílago como iniciadores primarios de la enfermedad, afectándose el cartílago de forma secundaria.

Independientemente de cuál sea la verdadera hipótesis, lo que parece probado es que el condrocito intenta en un primer momento reparar las alteraciones que sufre el cartílago aumentando la síntesis de colágeno y proteoglicanos, pero este esfuerzo resulta fallido y se incrementa la síntesis de proteinasas, al tiempo que se reduce la síntesis de los inhibidores de las proteinasas. Se produce así la ruptura del cartílago, lo que da lugar a la liberación de pequeños fragmentos que alcanzan el líquido sinovial. Los sinoviocitos del tipo A fagocitan estos fragmentos de matriz extracelular y producen citoquinas, como la IL-1, u otros productos proinflamatorios que intensifican la degradación del cartílago. Estos mecanismos se pueden perpetuar, ya que los condrocitos responden a varias citoquinas aumentando la degradación de la matriz.

La función y el mecanismo de acción de las citoquinas en la progresión de la OA han recibido una especial atención, debido a la estrecha interacción existente entre el cartílago articular y el tejido sinovial en la patofisiología de la enfermedad. En el caso de la

artritis reumatoide es bien conocida la acción de las citoquinas en la patofisiología de la destrucción del cartílago [39]. Sin embargo, su función en la OA no ha sido todavía estudiada con tanta profundidad, por lo que aún no se ha establecido la asociación entre las citoquinas y los cambios *in vivo* en la articulación artrósica.

Ciertos estudios inmunohistoquímicos mostraron que, en un cartílago normal, la IL-1 se encontraba en un reducido número de condrocitos; en el cartílago artrósico, por el contrario, se obtuvieron tinciones significativamente positivas para ambas formas de la IL-1, en la mitad superior del cartílago de los condrocitos y en la matriz extracelular. Por otra parte, los condrocitos aislados de cartílagos normales y artrósicos liberan espontáneamente IL-6, y algunos análisis inmunohistoquímicos revelan la presencia de esta citoquina en el cartílago humano artrósico [40].

Dado que la IL-1 y el TNF- $\alpha$  inducen reabsorción del cartílago *in vitro* e *in vivo*, su función en la patogénesis de la OA es obvia. El problema reside en saber qué lugar ocupa en el proceso completo de la patogénesis de la OA. Los estudios inmunohistoquímicos del cartílago artrósico ponen en evidencia la presencia de estromelina y colagenasa, así como IL-1 y TNF- $\alpha$  en el citoplasma de los condrocitos. De este modo, el proceso de inhibición/activación de las metaloproteasas en la OA podría estar modulado por las citoquinas.

El desequilibrio entre la TIMP-1 y las metaloproteasas del cartílago artrósico puede ser inducido [27] por la IL-1, ya que esta citoquina produce *in vitro*

descenso de la síntesis de TIMP-1 e incremento de la síntesis de las metaloproteasas en los condrocitos articulares. De igual manera, también el sistema PA/plasmina parece estar regulado por la IL-1.

Además, la IL-1 puede intervenir en los fenómenos proliferativos de la OA, como los osteofitos, ya que estimula la proliferación de células osteoblásticas humanas, favoreciendo así la formación de hueso periarticular [31]. El TGF $\beta$  también puede contribuir a la formación de los osteofitos en las articulaciones artrósicas. El TGF $\beta$  es el único factor conocido capaz de estimular la liberación de pirofosfatos en los condrocitos humanos y de conejo, lo que apoya la hipótesis de que este factor interviene en la patogénesis de la enfermedad por depósito de CPPD.

#### **1.4. La proliferación del condrocito y el envejecimiento del cartílago articular humano.**

El cartílago articular humano es uno de los tejidos que muestra una mayor prevalencia de patología relacionada con la edad. El envejecimiento de las articulaciones está asociado a un descenso en el grosor del cartílago —en su celularidad—, así como a cambios en la composición de la matriz extracelular y en la función de los condrocitos.

Diversos autores han estudiado ya la reducida celularidad del cartílago envejecido y la producción alterada de los componentes de la MEC en las células de las personas de edades avanzadas, considerando estos factores posibles causas de la OA [41]. La disminución de condrocitos puede venir explicada por la muerte celular o por la

incapacidad de las células para multiplicarse y, en consecuencia, para mantener la celularidad del tejido, así como la homeostasia de la matriz extracelular. Conceptualmente, estos cambios podrían ser, al menos en parte, el resultado de una alteración en la proliferación del condrocito durante el envejecimiento.

Por otra parte, se ha analizado la relación entre la proliferación de los condrocitos y el envejecimiento en células de modelos animales con diferentes edades, y con mayor exhaustividad en subcultivos *in vitro* como un modelo para la senescencia de los condrocitos. Evans y Georgescu [42] mostraron que el potencial de proliferación *in vitro* de los condrocitos articulares disminuye con la edad y que, al igual que ocurre en otros tipos celulares, los condrocitos pueden realizar sólo un limitado número de divisiones celulares *in vitro*. Los condrocitos de conejo también mostraron con la edad un descenso en el grado de replicación y un incremento en el volumen celular [43]. El envejecimiento *in vitro* de los condrocitos procedentes de conejos jóvenes está asociado a un descenso en la capacidad de proliferación durante el subcultivo, alcanzando la senescencia de las células en el pase número 8 [44].

El grupo de Martin Lotz estudió *in vitro* los cambios en la respuesta proliferativa de los condrocitos humanos durante el envejecimiento, demostrando que el TGF $\beta$  es el principal factor de crecimiento en el cartílago articular humano normal. Las tres isoformas de TGF $\beta$  (-1, -2, -3) actúan igual y son más potentes que el PDGF, bFGF y IGF-1 [45].

En 1995, nosotros demostramos que la capacidad proliferativa de los condrocitos procedentes de donantes de edades comprendidas entre los 60 y los 70 años representa tan sólo el 20% de la proliferación detectada en los donantes de 30 años [46]. Esta idea se vio confirmada, tanto cuando utilizamos suero, como cuando empleamos los factores de crecimiento para estimular la proliferación de los condrocitos. Este descenso en la capacidad proliferativa superior a la observada en la mayor parte de los tipos celulares.

Todos los factores de crecimiento, para ser efectivos en la inducción de la proliferación de los condrocitos, requieren la presencia de suero. Sin embargo, la respuesta a este factor de crecimiento tiene algunas peculiaridades, ya que su efecto depende de la especie, del tejido y del tipo de cartílago. Por ejemplo, el efecto de TGF $\beta$  en los condrocitos fetales humanos tiene un efecto proliferativo sobre el cartílago articular, pero no sobre el cartílago costal [47].

Los diversos estudios llevados a cabo han sugerido diferentes mecanismos para explicar este descenso en la respuesta proliferativa. En algunos sistemas, el TGF $\beta$  puede estimular la proliferación celular, porque induce el PDGF como un factor de crecimiento autocrino. Probablemente otros mecanismos se encuentren también involucrados, como por ejemplo el hecho de que la expresión de los receptores de superficie celular pueda estar reducida. Una explicación más razonable es que existe un cambio en la señalización post-receptor [29].

## EL ÓXIDO NÍTRICO

El Óxido Nítrico (NO) es un radical libre gaseoso, sintetizado a partir de la oxidación del aminoácido L-Arginina por una familia de enzimas llamadas Sintetasas del Óxido Nítrico (NOS).

En 1987 dos grupos de investigadores, uno inglés y otro norteamericano [12, 13], llegaron, de forma independiente pero simultánea, a la conclusión de que el Factor Relajante Derivado del Endotelio (EDRF), descubierto en 1980 por Furchgott y Zawadski, era el NO.

Desde entonces esta molécula ha sido investigada en diversos estudios y se le han atribuido diferentes funciones: actúa como un mensajero neurológico en la erección del pene [48]; causa la relajación de músculo liso; inhibe la agregación de las plaquetas [49]; inhibe la adhesión de los leucocitos; interviene en la capacidad tumorocida y bactericida de los macrófagos [50]; interviene en los procesos de neurotoxicidad y neuroprotección [51]; inhibe la proliferación celular.

### 2.1 Genes de NO.

El NO es sintetizado en las células de los mamíferos por una familia de tres enzimas llamadas Sintetasas del Óxido Nítrico (NOS). Esta familia de enzimas ha recibido diversas nomenclaturas. La nomenclatura utilizada inicialmente se basaba en las primeras observaciones, según las cuales la síntesis del NO se producía principalmente en células no activadas, aunque se podría inducir su síntesis si se sometían a estímulos inductores. Así, se utilizó la clasificación de inducible (iNOS), localizada principalmente en los macrófagos, y constitutiva (cNOS), localizada en las neuronas (nNOS) y las células endoteliales (eNOS). Sin embargo, ahora sabemos que el grado de expresión genética de las dos formas constitutivas (nNOS y eNOS) puede ser también inducida por diferentes estímulos fisiológicos, y que la forma inducida (iNOS) funciona asimismo como una enzima constitutiva en determinadas condiciones fisiológicas en

algunas células [52]. Por este motivo actualmente no es totalmente aceptada la clasificación de inducible versus constitutiva, y algunos autores prefieren la clasificación que hace referencia a cada uno de los tejidos en los que originalmente se aislaron los cDNA y las proteínas de las isoformas de la enzima: nNOS (neuronas); iNOS (macrófagos); eNOS (endotelio) [53].

El nNOS fue originalmente purificado y clonado en el tejido neuronal. Sin embargo, hoy sabemos que la nNOS se localiza en otros tejidos, como el músculo esquelético, donde existe una gran expresión de este gen.

El iNOS fue originalmente purificado y clonado en una línea celular macrofágica de ratón inmunoactivada, pero actualmente se ha demostrado su presencia en múltiples tejidos y células (músculo cardíaco, hepatocitos, glía, condrocitos, etc). La enzima inducible de los macrófagos murinos muestra sólo un 50% de igualdad en la secuencia con respecto a la enzima neuronal. Como el NOS neuronal, el NOS macrofágico tiene lugares de reconocimiento para FAD, FMN y NADPH y posee igualmente un lugar de unión a la calmodulina. El mRNA del NOS macrofágico está ausente en los macrófagos no activados o en el bazo, pero se puede detectar entre 2 y 6 horas después del tratamiento con endotoxinas.

El eNOS, el último de las tres formas aisladas, fue originalmente purificado y clonado en el endotelio vascular. También se ha demostrado su presencia en el miocardio, las plaquetas y el hipocampo. Este gen codifica una proteína de 1205 aminoácidos con una masa molecular de 133 kDa. La secuen-

cia de aminoácidos de la eNOS difiere en numerosos residuos de la secuencia determinada para la proteína cerebral bovina purificada, muestra entre 50-60% de igualdad con la secuencia de las isoformas del macrófago murino y del cerebro de ratas.

Claramente, la misma isoforma puede tener diferentes funciones biológicas cuando se expresa en diferentes tejidos. Por ejemplo, el nNOS mRNA genera dos proteínas estructuralmente diferentes cuando la enzima está localizada en las neuronas o en el músculo esquelético [54]. Otro ejemplo de regulación específica del tejido es la que tiene lugar con la eNOS en las células endoteliales y en el miocardio [55]. Por otra parte, la complejidad de la catálisis de NOS, reflejada por la diversidad de cofactores y cosubstratos de NOS, confirma también la existencia de importantes diferencias entre los tejidos y sus mecanismos de regulación.

A pesar de estas diferencias, existen también datos relevantes desde el punto de vista bioquímico que son comunes a las tres isoformas. En ellas, aproximadamente el 55% de los aminoácidos que forman la secuencia son iguales, en particular aquellas regiones de las proteínas que intervienen en la reacción enzimática [56]. Las diferentes formas de la enzima tienen un esquema similar de la zona catalítica, lo que afecta a la oxidación de los cinco electrones del nitrógeno terminal guanídínico del aminoácido *L*-Arginina para formar NO y *L*-citrulina. En esta reacción compleja se necesitan oxígeno y NADPH como substratos, así como numerosos cofactores redox, entre los que se incluyen FAD, FMN, tioles reducidos y tetrahidropterinas.

En las tres formas de la enzima, la síntesis de NO depende de la capacidad de la enzima para unirse a la proteína reguladora del calcio, llamada calmodulina. Para que eNOS y nNOS se unan a la proteína calmodulina y que, en consecuencia, se activen, es necesario un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Por el contrario, la iNOS requiere bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular para unirse a la calmodulina con alta afinidad. De esto se deduce que la actividad de la eNOS y la nNOS está en gran parte modulada por los cambios intracitoplasmáticos de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que la actividad de la iNOS en células inmunoactivadas no depende de forma tan estricta de las concentraciones de calcio. Esto llevó a pensar que las primeras eran calcio-dependientes y la última era calcio-independiente. Hoy sabemos que esto no es cierto, y que lo que existe en realidad es una diferencia en la concentración del calcio necesario para unirse a la calmodulina [57, 58].

## 2.2 Clonación de la NOS inducible de los condrocitos.

El grupo de Salvador Moncada [59] y el de Martin Lotz [60] aislaron y clonaron el gen que sintetiza la enzima iNOS en los condrocitos articulares humanos. Todos los análisis sobre la NOS por los condrocitos articulares humanos dieron como resultados las características de una NOS inducible.

La iNOS de los condrocitos humanos es una proteína de 1.153 aminoácidos de longitud, tiene una homología del 78% con el cADN de la forma clonada de los macrófagos y un 88% con la proteína. Con respecto a la nNOS y la

eNOS existe una homología del 50% para el cADN y del 65% para la proteína. Esta forma de iNOS conserva también los lugares de unión para los cofactores FMN, FAD, FADH y  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina. La homología de la iNOS de los condrocitos articulares humanos con el iNOS de los hepatocitos es altísima, prácticamente el 100% [61]. Los condrocitos articulares humanos en reposo (sin estímulo) no expresan este gen. La expresión de iNOS puede ser inducida por la estimulación con un único estímulo (IL- $1\beta$ , TNF- $\alpha$ , LPS), lo que la diferencia claramente del hepatocito humano, en el que es necesario combinar varios estímulos.

## 2.3 Regulación de las isoformas de NOS.

La actividad de la enzima NOS puede ser manipulada actuando a distintos niveles de la reacción enzimática que ocasiona la síntesis de NO:

*Calcio y calmodulina.* La regulación de las tres isoformas de NOS varía de unas a otras. La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es uno de los factores que influye en la activación de la enzima NOS. Las isoformas eNOS y nNOS se vuelven totalmente activas con concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  mayores o iguales que 500 nM. Los inhibidores de la calmodulina limitan la actividad de la enzima constitutiva, pero no la inducible del eNOS en la aorta de las ratas [62]. Ambas enzimas son reguladas por el  $\text{Ca}^{2+}$  libre y, al menos en parte, por CaM [63]. Por otro lado, las enzimas localizadas en los macrófagos fueron identificadas en principio como independientes del calcio y calmoduli-

na. Posteriormente se comprobó que esto no es totalmente cierto. La calmodulina asociada a iNOS tiene una gran afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$ ; de esta forma son necesarios niveles muy bajos para poder activar la enzima, y las variaciones en las concentraciones no afectan a la unión de la iNOS con la calmodulina ni, por lo tanto, al proceso de activación y desactivación de la enzima [56].

*Cofactores de NOS.* Todas las isoformas de NOS requieren la presencia de L-arginina, tetrahidrobiopterina, NADPH, FAD y FMN para la plena actividad enzimática y la consiguiente síntesis de NO. Teniendo en cuenta estas necesidades, se han sintetizado una serie de fármacos capaces de inhibir la síntesis del NO.

En el caso de la NG-monometilo-L-arginina (L-NMMA), N-iminoetilo-L-orнитina (L-NIO) y NG-nitro-L-arginina metilo éster (L-NAME), la inhibición tiene lugar porque compiten por la enzima con el verdadero sustrato de la reacción (L-arginina). Por otra parte, considerando la necesidad de una flavoproteína dependiente de NADPH, se demostró que los inhibidores de las flavoproteínas, como la difenilenyodonium (DPI), di-2-tienilyodonium (DTI) e yodoniumdifencil (ID), inhibían las NOS de los macrófagos y del endotelio [64].

*Regulación transcripcional.* Esta forma de modulación ha sido estudiada con especial atención para la iNOS de los macrófagos murinos [65]. La expresión de iNOS es inducida por el IFN $\gamma$  y la LPS. La LPS activa la síntesis del NO en las células de Kupffer, síntesis que está determinada por la producción simultánea de PGE $_2$  [66]. En hepatocitos humanos se observó la inducción

de la biosíntesis de NO, después de su estimulación con IL-1, TNF, IFN $\gamma$  y endotoxinas [67].

La exposición de cultivos primarios de astrocitos corticales de ratas neonatales y de células gliales al LPS bacteriano dio lugar a la aparición de la actividad de la NOS. La inducción de NOS fue bloqueada por la actinomicina D. El TNF y la IL-1 activan una enzima NOS del tipo del macrófago en las células de músculo liso. Algunas citoquinas y los glucocorticoides inhiben la NOS inducible en los macrófagos murinos. Tanto la expresión de NOS, como la producción de NO fueron inhibidas por la IL-10.

Los condrocitos articulares de conejo producen niveles elevados de NO en respuesta a IL-1 [15, 68]. A diferencia de otros tipos de células, la síntesis de NO inducida por IL-1 no fue inhibida por glucocorticoides [68]. Sin embargo, en los condrocitos humanos, los glucocorticoides poseen la capacidad de inhibir la síntesis de NO. Los glucocorticoides y el TGF $\beta$  inhiben la expresión de una enzima inducible (pero no de la constitutiva) y la síntesis de NO en determinados tipos de células, como las del endotelio vascular, las glomerulares mensajales y las del músculo liso [69].

La actividad de la sintetasa del óxido nítrico cerebral puede ser regulada no sólo por el balance  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina y ciertos co-factores, sino también por la fosforilización. Estos puntos de reconocimiento de la NOS suministran múltiples mecanismos para la regulación de los niveles del NO y sirven de conexión entre los sistemas de segundos mensajeros [70]. La NOS

cerebral es fosforilizada por la proteína kinasa C dependiente del AMPc, y por la proteína kinasa II dependiente del calcio/calmodulina. La fosforilización por la proteína kinasa II dependiente del calcio/calmodulina produce una reducción de la actividad de la enzima sin variar los requisitos de los cofactores, mientras que en la actividad de las enzimas fosforilizadas por la proteína kinasa C se observa un incremento moderado.

Finalmente, el NO formado por la reacción de síntesis o añadido a la mezcla de las reacciones de las enzimas provoca una inhibición reversible de la actividad de la NOS. De esta manera, el NO puede funcionar como un modulador de retroalimentación de su propia síntesis [71].

#### 2.4 Sustancias que regulan los niveles de NO.

Se conocen desde hace tiempo sustancias que pueden modificar la síntesis de NO, tanto aumentándola como inhibiéndola.

*Donantes de NO.* Son compuestos que, bien de forma espontánea a través de una simple disociación, bien a través de una sencilla reacción enzimática, liberan NO. Se ha visto que los siguientes compuestos son capaces de liberar NO en cantidades suficientemente importantes como para actuar sobre tejidos biológicos [72]: Nitroprusiato Sódico (SNP), Hidroxilamina, 3-morpholine-sydnonimine (SIN-1) y S-nitroso-N-penicilamina (SNAP), entre otros.

*Quelantes del NO.* Los quelantes son sustancias que presentan una alta afini-

dad por el NO y lo captan antes de que pueda llevar a cabo su función. Ejemplos de quelantes son la hemoglobina, la metahemoglobina y los radicales libres de oxígeno [73].

*Inhibidores de la síntesis de NO.* Son compuestos capaces de interferir con la NOS y disminuir la síntesis de NO. Son, mayoritariamente, compuestos derivados de la L-Arg que ejercen una inhibición de tipo competitivo a nivel del lugar de unión a la enzima. Los más utilizados son: N-Nitro-L-Arginina (L-NO-Arg), L-N-nitro Arginina metilo éster (L-NAME), NG-Metilo-L-Arginina (L-MeArg). Estos compuestos presentan diferentes afinidades para las distintas isoformas de la NOS [74].

#### 2.5 Efectos moleculares del NO.

En condiciones aeróbicas, el NO se oxida espontáneamente y da lugar a su forma inactiva, estable y definitiva, los nitritos y los nitratos, con una vida media de 6-10 segundos. Esta propiedad explica la particularidad ya descrita de los mamíferos, que excretan más nitratos de los que ingieren, especialmente si existe inflamación. La breve vida media del NO limita su campo de acción a nivel de efectos autocrinos y paracrinos. La alta afinidad por la hemoglobina aumenta aún más sus límites de acción. Además, la longevidad y el rango de sus efectos fisiológicos pueden extenderse, debido a la formación de los productos estables biológicamente activos cuando reaccionan con proteínas y otras moléculas [73, 75].

El NO presenta una alta afinidad por los átomos de hierro, pertenecientes o no a un grupo hemo-asociado a una



proteína [76]. De esta forma, la unión del NO con el grupo hemo- de la enzima guanilato-ciclasa provoca su activación, aumentando los niveles intracelulares del GMPc en muchos tipos de células [77]. La unión del NO con el hierro unido a grupos sulfidrilo, como en el caso de la aconitasa y de los complejos I y II de la cadena mitocondrial respiratoria, inhibe la fosforilación oxidativa [78]. En los macrófagos, este fenómeno da lugar a un incremento compensador del grado de glicolisis, a pesar de la habilidad del NO para inhibir la gliceroaldehído-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH) en algunas células [79]. La inhibición de la GAPDH se produce por la activación de la enzima ADP-ribosil transferasa, la cual origina su ADP-ribosilación, o por la nitrosilación directa de la GAPDH, que produce el NO [80].

La enzima ribonucleótido reductasa es otra enzima que contiene hierro y es inhibida por el NO [81]. La inhibición produce la pérdida de un radical tirosil en el punto activo de la enzima. Al bloquearse esta enzima, el NO altera la síntesis del ADN y la división celular. El peroxinitrito, pero no el NO, nitrosila los residuos de la tirosina en la enzima superóxido dismutasa (SOD), así como en otras proteínas que contienen cobre [82]. El NO también es capaz de causar alteraciones genómicas. El NO puede inducir cambios en la secuencia del ADN mediante un mecanismo de deaminación de la citosina. El NO también daña el ADN a través de reacciones de nitrosilación, que producen la deaminación y causan la ruptura de las cadenas del ADN [83].

El NO posee importantes propiedades para combinarse ávidamente con

el anión superóxido  $O_2^-$  [73]. Aunque originalmente se creyó que este anión tenía propiedades protectoras, especialmente en respuesta a la isquemia y la reperfusión, las más recientes investigaciones sugieren que esta reacción puede generar también efectos destructivos, particularmente el anión peroxinitrito [84]. El peroxinitrito puede descomponerse para formar el radical hidroxil  $-OH$ . La producción de tales radicales está ligada a la destrucción del tejido durante la inflamación [85]. Durante la reacción que genera peroxinitritos, el radical libre de un anión de superóxido derivado del oxígeno ( $O_2^-$ ) inactiva el NO. Esto coincide con los efectos de la SOD, un bloqueante del superóxido ( $O_2^-$ ) que también prolonga los efectos vasorrelajantes del NO. Esta prolongación se ha atribuido a la prevención de la reacción entre  $O_2^-$  con el NO. De modo opuesto, el NO puede ser considerado como un bloqueante del anión de superóxido, lo cual sugiere que el NO puede suministrar una barrera química a los radicales libres de citotoxicidad ( $O_2^-$ ) [86].

El NO reacciona en presencia de grupos tioles específicos de las proteínas para formar derivados de S-nitrosoproteínas, que tienen propiedades parecidas a las del factor relajante derivado del endotelio. El plasma humano contiene aproximadamente 7  $\mu\text{M}$  S-nitrosotioles, de los cuales el 96% son S-nitrosoproteínas; el 82% de estos últimos se justifica como parte de la albúmina-S-nitrosa sérica [73, 75]. En contraste, los niveles de plasma del óxido nítrico libre son de aproximadamente 3 nM. Este abundante complejo sirve probablemente como una reserva, con

la cual los niveles de plasma del óxido nítrico libre —altamente reactivo y de corta duración— pueden ser regulados para el mantenimiento del tono vascular.

## 2.6. Efectos sobre el crecimiento celular y la diferenciación.

El NO inhibe la proliferación de los linfocitos, las células mesangiales, células del músculo liso, fibroblastos y queratinocitos [14]. Estos efectos anti-proliferativos se pueden observar cuando utilizamos reactivos donantes de NO. En varias de estas células, el NO es en parte responsable de la inhibición del crecimiento inducido por las citoquinas u otros agentes. De modo opuesto, los factores que estimulan la proliferación de un cierto tipo de células a menudo inhiben la formación del NO. El NO es un inhibidor potente de la función osteoclástica y de la reabsorción del hueso, con efectos que parecen ser independientes del GMPc [87]. El NO causa la diferenciación monocítica de células de la línea celular HL-60 humana en la leucemia mieloide.

El NO es responsable, al menos en parte, de la citotoxicidad inducida por los monocitos y por algunas citoquinas, tales como el IFNg, la IL-2, el TNF o el LPS [88, 89]. En el SNC, el NO media la estimulación de glutamato e interviene en la neurotoxicidad del glutamato [90]. La toxicidad de la IL-1 para las células beta de los islotes pancreáticos tiene lugar a través de la inducción de la síntesis y de la liberación del NO, que es altamente tóxico para estas células [91]. Los mecanismos que pueden explicar los efectos citotóxicos del NO son varios, como

por ejemplo el bloqueo de la respiración mitocondrial dependiente de la glicólisis [92]. Un objetivo molecular adicional para la acción citoestática del NO puede ser la enzima reductasa ribonucleótida (RR), una enzima que limita el ritmo de la síntesis del ADN [93].

El anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el NO pueden combinarse para formar un anión de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). El peroxinitrito inicia la peroxidación de lípidos, lo que explica un mecanismo potencial que contribuye a la citotoxicidad mediada por el NO. Un anión de peroxinitrito también puede ejercer un efecto citotóxico, en parte a través de la oxidación de los grupos sulfhidrilos de los tejidos.

## 2.7. Síntesis de NO en células articulares.

El líquido sinovial procedente de las articulaciones humanas sanas contienen muy bajos niveles de NO. Sin embargo, el líquido sinovial procedente de pacientes con artrosis y/o artritis reumatoide posee altas concentraciones de NO [94].

Los elementos celulares que forman parte de una articulación diartrodial humana son el condrocito del cartílago articular, el sinoviocito tipo fibroblasto, el sinoviocito tipo monocito/macrófago del tejido sinovial y las células del líquido sinovial, que son principalmente células procedentes del torrente sanguíneo (células mononucleadas sanguíneas).

Los estudios realizados *in vitro* han demostrado que, de todas las células que se pueden encontrar en una articu-

lación, los condrocitos son los que sintetizan y liberan los niveles más altos de NO, y también los que expresan los niveles más altos de RNAm y proteína de iNOS [13, 16]. Los cultivos primarios de los condrocitos articulares humanos liberan niveles bajos de NO. Sin embargo, la estimulación con la IL-1 $\beta$  provoca un incremento dependiente de la dosis, detectable después de 12 horas y que continúa aumentando durante las siguientes 72 horas. La ciclohexamida o la actinomicina D bloquean por completo la formación del NO inducida por la IL-1, lo que significa que depende del ADN y de la síntesis de proteínas. Por otra parte, la N-metil arginina, un inhibidor de la NOS, reduce la formación del NO inducido por la IL-1, y en un medio como el DMEM sin el aminoácido L-arginina no hay síntesis de NO.

El efecto de diferentes citoquinas sobre la síntesis del NO presenta unas

peculiaridades específicas. Todos los factores, incluidos el TNF, IL-1, LIF y LPS, cuya capacidad para inducir respuestas catabólicas y pro-inflamatorias en los condrocitos es bien conocida, estimulan la síntesis del NO. Por el contrario, el TGF $\beta$ , que es el factor de crecimiento más potente en los condrocitos y que estimula la formación de la matriz extracelular, no induce niveles detectables en la síntesis de NO [16, 28].

Los sinoviocitos y fibroblastos humanos no producen niveles importantes del NO en respuesta a la estimulación con la IL-1 o a cualquier otro agente capaz de activar la función de la enzima NOS en los condrocitos primarios. Algunos autores han podido estimular la síntesis de NO por los sinoviocitos, pero las cantidades que se liberan son muy inferiores a las que se consiguen cuando se estimulan los condrocitos [15, 17].

## LA APOPTOSIS

### 3.1. Definición.

La palabra "apoptosis" procede del griego (*apo*= "desde lo alto" + *ptosis* = "caída"; se aplicaba a la caída de las hojas de los árboles) y fue acuñada por primera vez en 1972 por Kerr, Wyllie y Currie como término opuesto a mitosis [6]. Ellos la utilizaron para describir un tipo de muerte celular con unas características morfológicas determinadas, diferentes a las que presentan las células muertas por necrosis, y que no sólo se producía durante procesos patológicos, sino que también tenía lugar como un proceso fisiológico. El interés por la apoptosis se incrementó en 1984, cuando se demostró que, para que se produjese este tipo de muerte, era necesaria la síntesis previa del RNA y de las proteínas, lo que ya había sido detectado en el caso de la muerte celular programada descrita en la biología del desarrollo [95-97]. El término de apoptosis ha sido y es actualmente tema de discusión desde el

punto de vista etimológico y filosófico. En muchos trabajos se utilizan indistintamente los términos "apoptosis" y "muerte celular programada", pero son muchos los autores que opinan que se trata de dos conceptos diferentes, e incluso hay estudios que no la distinguen totalmente de la necrosis, dado que durante la apoptosis pueden aparecer imágenes que se forman en la necrosis.

En este trabajo definimos la apoptosis como un proceso activo, regulado genéticamente que origina la autodestrucción de la célula (suicidio) [98]. En cambio, la necrosis es una muerte accidental y origina cambios importantes en el entorno que rodea a la célula que se muere. La muerte que nosotros referimos como apoptosis presenta unas características bien definidas:

- 1) Morfológicamente, la célula se encoge y llega a ser muy compacta, haciendo referencia al término original de "necrosis encogida". La cromatina es

picnótica y se empaqueta en pequeñas masas localizadas cerca de la membrana nuclear (marginación de la cromatina), formándose así figuras que denominamos, por su particular forma, "media luna". Los núcleos se pueden romper (*kariorrexis*) y las células emiten unos procesos (*budding phenomenon*) que a menudo contienen fragmentos nucleares picnóticos. Estos procesos tienden a romperse, dando lugar así a los llamados cuerpos apoptóticos, que pueden ser fagocitados por macrófagos o células próximas o, por el contrario, pueden permanecer libres.

2) Hay poca o ninguna hinchazón y tumefacción de las mitocondrias o de otras organelas citoplasmáticas.

3) Desde el punto de vista bioquímico, el ADN se rompe en segmentos que son múltiples aproximados de 185 bp, debido a la ruptura de la doble cadena por un punto situado entre los nucleosomas.

4) El proceso está bajo control genético y puede ser activado por un reloj interno o por agentes extracelulares, tales como hormonas, citoquinas, células asesinas y una gran variedad de agentes químicos, físicos y víricos.

5) La apoptosis puede producirse muy rápido (incluso en minutos), por lo que su observación en secciones de tejidos resulta muy difícil.

### 3.2. Revisión histórica de la muerte celular.

La existencia de al menos dos tipos de muerte celular se conoce ya desde 1965 [99]. Kerr describió cómo durante la isquemia hepática que se producía

con la ligadura de la vena porta, los hepatocitos presentaban una serie de cambios morfológicos e histoquímicos totalmente diferentes a la necrosis. También se observó que los hepatocitos se convertían en pequeñas y redondeadas masas citoplasmáticas y que, algunas de ellas, no todas, contenían pequeños fragmentos de cromatina picnótica. Estas estructuras eran una manifestación clara de muerte celular, pero su apariencia histológica era diferente de la de las células necróticas, y no estaba asociada a la inflamación, como ocurre en la necrosis. Las tinciones histológicas realizadas para la fosfatasa ácida indicaban que los lisosomas en las células necróticas estaban rotos y mostraban cómo las enzimas se dispersaban por el citoplasma. Sin embargo, en las pequeñas masas redondeadas, los lisosomas se teñían discretamente, sugiriendo que estaban intactos. Un pequeño número de masas citoplasmáticas redondeadas aparentemente idénticas se detectaron en los hígados de ratas sanas.

En 1971, Kerr usó el microscopio electrónico para describir estos cuerpos redondeados [5]. Estas estructuras estaban delimitadas por membranas citoplasmáticas y contenían fragmentos celulares bien conservados, principalmente organelas celulares y, en algunas ocasiones, fragmentos de cromatina compacta. Se observó que estos cuerpos surgen por un proceso de condensación y brotan a continuación de los hepatocitos. Originalmente, este fenómeno fue referido con el nombre de "necrosis encogida", empaquetada. El uso del término "necrosis" para un fenómeno que tiene lugar en condiciones fisiológicas no parecía lo más correcto,

y cuando se constató que la muerte celular con esta morfología jugaba un papel opuesto a la mitosis (en cuanto a la regulación de tamaño del tejido), se propuso el término de apoptosis para resaltar su significado de funcionalidad. La apoptosis también se ha observado en las plantas, lo que parece indicar que este fenómeno se ha originado en una fase muy temprana de la evolución biológica [100].

### 3.3. Características morfológicas de la apoptosis. Comparación con la necrosis.

Morfológicamente, la célula se encoge y se convierte en masa densa. Los cambios morfológicos característicos se producen principalmente a tres niveles: núcleo, citoplasma y membrana citoplásmica [98, 101].

1) *Cambios en el núcleo*: El cambio más precoz que tiene lugar durante la apoptosis, y detectado por el microscopio electrónico, es la condensación de la cromatina nuclear formando cuerpos uniformes que se colocan cerca de la membrana nuclear (marginación de la cromatina). Después de la condensación, se produce la fragmentación del núcleo (*kariorexesis*).

2) *Cambios en el citoplasma*: Se produce una condensación del citoplasma, pero las organelas permanecen íntegras durante todo el proceso. Las mitocondrias y las demás estructuras no se encuentran hinchadas.

3) *Cambios en la membrana citoplásmica*: La membrana permanece impermeable durante todo el proceso, y se forman unas invaginaciones que rodean a las estructuras citoplásmicas

y a los fragmentos nucleares. Estas protuberancias de la superficie celular progresan, hasta envolver totalmente a las organelas citoplásmicas y se acaban separando totalmente de la célula ("fenómeno *budding*"). El resultado final es que la célula se convierte en un número determinado de estructuras que, rodeadas por membrana citoplásmica de diferente tamaño, contienen fragmentos nucleares y organelas celulares que parecen intactas. Estas estructuras reciben también el nombre de "cuerpos apoptóticos". En los tejidos, estos cuerpos apoptóticos son rápidamente fagocitados por células con capacidad para fagocitar, de manera que no existen datos de inflamación alrededor del punto en que ha tenido lugar la apoptosis [102, 103].

Los cambios ultraestructurales de la necrosis son diferentes y se produce principalmente una hinchazón de las organelas y la posterior desintegración celular [104]. Generalmente, los cambios en la cromatina no son tan claros como en la apoptosis, existe una total desestructuración del núcleo. Otra importante diferencia se produce en la membrana citoplásmica: mientras que en la apoptosis esta permanece impermeable, en la necrosis la membrana es permeable y permite la liberación de las enzimas lisosomales, que aceleran la desintegración celular. En los estadios finales, la cromatina nuclear desaparece, produciéndose lo que se conoce como "*kariolisis*". Además, durante la necrosis *in vivo*, se observan cambios inflamatorios y, si se ven afectadas un gran número de células, por lo general se produce posteriormente una cicatriz.

### 3.4. Mecanismos bioquímicos y moleculares de la apoptosis.

El principal evento bioquímico estudiado en la apoptosis es el que afecta al ADN nuclear. Al mismo tiempo que con la condensación de la cromatina observada morfológicamente, se produce una ruptura de la doble cadena a la altura de aquellas regiones que sirven de unión entre los nucleosomas, y se originan fragmentos que son múltiples aproximados de 185 bp [105, 106]. Estos fragmentos pueden ser visualizados fácilmente por electroforesis en un gel de agarosa, presentando un característico patrón de *ladder*.

En la necrosis, por contra, la progresiva destrucción de la cromatina se acompaña de una ruptura al azar del ADN, de forma que se producen fragmentos de diferentes tamaños que, cuando se corren en un gel de agarosa, muestran un patrón difuso. Sin embargo, el fenómeno de fragmentación del ADN puede no estar siempre relacionado con la morfología de la apoptosis en algunas células de los vertebrados e invertebrados [107, 108]. No obstante, este patrón de fragmentación del ADN, aunque no es universal, está presente en la gran mayoría de las células que se mueren por apoptosis y constituye un marcador bioquímico muy útil para estudiar la biología y cinética de la apoptosis en los diferentes sistemas [97, 105, 106]. En el proceso de producción de apoptosis celular intervienen varios componentes:

1) *Estímulos inductores de la apoptosis*: Los estímulos capaces de inducir apoptosis en las células son variados y diversos según el tipo de célula al que nos refiramos. Sin embargo, algunos de

ellos son capaces de provocar este tipo de muerte en todas las células; por ejemplo, la radiación produce daño en el ADN de todas las células y estas pueden reaccionar de dos formas: bien reparando esa lesión y sobreviviendo, bien muriéndose si el daño es demasiado severo. Por el contrario, otros estímulos sólo producen la aparición de la apoptosis en determinados tipos celulares. La ventaja de la existencia de una amplia variedad de señales capaces de activar la muerte celular es clara: si únicamente hubiese una señal para la muerte celular, todas las células expuestas a esa señal morirían. Con múltiples y diferentes inductores de muerte celular, determinados grupos de células pueden ser eliminados sin afectar simultáneamente a otros tipos de células próximas a ella: estímulos físicos (radiación ionizante, hipertermia), tóxicos (azida, peróxido de hidrógeno), citoquinas (Fas-L; TNF- $\alpha$ ; TGF $\beta$ ), infecciones virales y mecanismos inmunológicos.

2) *Reguladores intracelulares*: No se conocen con precisión los reguladores que participan en la apoptosis. Los más estudiados hasta el momento pertenecen a un grupo de genes de la familia del Bcl-2 (*B-cell linfoma*), que son oncogenes. Las proteínas que pertenecen a la familia de la Bcl-2 están localizadas en la superficie de la membrana de las mitocondrias. Dentro de esta familia de genes se incluyen aquellos que favorecen la aparición de la apoptosis (*Bax* y *Bad*) y los que la bloquean (*Bcl-2*, *Bcl-x*). Se ignora todavía cómo modifica esta familia de genes la susceptibilidad a la apoptosis. Una de las teorías parte de la idea de que las proteínas de la familia Bcl-2 inhiben la

activación de las caspasas, bien uniéndose directamente al activador 1 de las proteasas apoptóticas (*Apaf-1*), bien impidiendo la liberación del citocromo C y de otros contenidos de la mitocondria que participan en la activación de las caspasas [109, 110].

3) *Elementos ejecutores (cascada proteolítica)*: Cuando algún estímulo capaz de inducir apoptosis se une a su receptor de la membrana citoplasmática [111, 112], la porción intracelular del receptor cambia de forma y es capaz de unirse a determinadas proteínas intracitoplasmáticas, capaces a su vez de activar una variedad de enzimas proteolíticas llamadas "caspasas" [113, 114]. Las caspasas son una familia de proteasas cisteína-dependientes que poseen una especial especificidad por secuencias con un residuo de aspartado. Se han identificado en las células humanas al menos 10 caspasas diferentes, que se pueden agrupar en ICE-like (caspasas 1, 4 y 5) y CED-3-like (caspasas 3, 6, 7, 8, 9, 10), según su secuencia similar y su relativa susceptibilidad a los inhibidores tetrapéptidos, YVAD y DEVD, respectivamente. Las caspasas activadas rompen el precursor inactivo de otras caspasas, convirtiéndolas a su forma activa y originando así una cascada proteolítica similar a la que la sed produce en la activación del complemento o a la de la coagulación sanguínea [115, 116]. Una vez que las caspasas son activadas, aparecen los cambios morfológicos de la apoptosis y el proceso de muerte no puede detenerse.

### 3.5. Incidencia de la apoptosis.

En la mayoría de los tejidos, la división celular se produce continuamen-

te, sin un aumento del tamaño del órgano y sin que se desarrolle ningún tumor, lo cual parece indicar que el grado de división está equilibrado por el grado de muerte celular. Este equilibrio se mantiene gracias a la apoptosis. La apoptosis se produce en muy diversas situaciones fisiológicas, como la embriogénesis, y juega un papel importante en la homeostasia de los tejidos normales. Se ha apuntado la ruptura en el equilibrio entre supervivencia y apoptosis celular como posible responsable de gran número de enfermedades.

a) *Muerte celular durante el desarrollo normal*: La apoptosis interviene de manera decisiva en el desarrollo embriológico de los vertebrados superiores, al estar presente en fenómenos tales como la delección de la membrana interdigital, la fusión palatal y el desarrollo de la mucosa intestinal y de la retina [7, 117]. También la muerte celular que tiene lugar durante la metamorfosis de los anfibios presenta los clásicos signos de la apoptosis.

b) *Muerte celular en tejidos adultos normales*: La apoptosis se produce continuamente en tejidos como el hígado, la glándula suprarrenal, la mucosa del intestino delgado y durante la espermatogénesis [5, 118, 119]. Existen evidencias de que en la regulación de la masa normal de los tejidos influye la producción cíclica de factores de crecimiento y de factores que inducen muerte, que inducen mitosis y apoptosis, respectivamente [120]. Por otra parte, algunos factores de crecimiento pueden inhibir la apoptosis, además de estimular la mitosis [121]. Hasta el momento se ignora qué factor determina la probabilidad de que un grupo de



células muera en un momento particular y bajo unas condiciones determinadas. La delección apoptótica de los linfocitos cumple una importante función en el sistema inmunológico. Los timocitos inmaduros mueren por apoptosis cuando en un momento crítico de su maduración son estimulados a través de su receptor de célula T. Se ha sugerido también que sea este mecanismo el responsable de la eliminación de clones de células T autorreactivos durante el desarrollo de la auto-tolerancia inmunológica celular [122]. La apoptosis se produce para eliminar células durante una serie de procesos involutivos normales, entre los que se incluyen: la atresia folicular ovárica, la involución catagénica del folículo piloso y la regresión de las glándulas mamarias después del parto, del endometrio después de la menstruación y de la corteza adrenal durante el período neonatal [123-125]. También por medio de la apoptosis se eliminan neutrófilos envejecidos y megacariocitos senescentes que han liberado sus plaquetas bajo apoptosis [126]. Se ignora si la apoptosis interviene o no en los cambios de los tejidos asociados con el envejecimiento del cuerpo como un todo.

c) *Muerte celular durante procesos patológicos*: La lista de enfermedades en las que está implicada la apoptosis es larga y diversa: cáncer (como la hipertrofia prostática y el linfoma de células B), enfermedades neurodegenerativas (como la enfermedad de Alzheimer, enfermedades cardíacas), alteraciones del sistema inmunológico (como la diabetes mellitus tipo I o el SIDA), enfermedades reumatológicas (como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico) [10].

d) *La apoptosis durante el envejecimiento*: No existe la certeza de que la apoptosis intervenga en el cambio de los tejidos asociados con el envejecimiento del cuerpo. Sin embargo, sí parece evidente que el envejecimiento de los organismos, al contrario que la apoptosis, no está sometido a un control genético activo. La idea de que el envejecimiento de los organismos multicelulares esté programado no parece concordar con la teoría más ampliamente aceptada de la evolución del envejecimiento. La hipótesis más aceptada es que la apoptosis puede considerarse el último mecanismo para mantener el fenotipo en los sistemas multicelulares [9]. De esta forma, en el envejecimiento aparece una eventual pérdida del control apoptótico y se produce una acumulación de errores que deberían ser eliminados en los organismos más jóvenes. Cualquier explicación sobre la función de la apoptosis en el envejecimiento debe ser considerada como la *insuficiencia de un programa* más que como un fallo programado edad-dependiente de las células, tejidos u órganos. Por otra parte, existen evidencias de que la habilidad de las células para entrar en apoptosis o muerte celular programada decrece con la edad, y de que un envejecimiento eficaz sería aquel capaz de mantener un programa de apoptosis equilibrado [8].

La idea de mantener la fidelidad del fenotipo no sólo supone un nuevo enfoque experimental en el envejecimiento *in vivo*, sino que además facilita una explicación para la conocida pérdida de la capacidad replicativa que tienen las células en cultivo. Algunos mecanismos comunes a la mitosis y a

la apoptosis suponen que una pérdida de la capacidad para la apoptosis a través de la muerte de células apoptótico-competentes, cosegrega con la pérdida de la capacidad replicativa, originando la senescencia replicativa.

Una teoría diferente es la que se basa en el papel que juega la apoptosis en los procesos patológicos, es decir, en las llamadas generalmente “enfermedades del envejecimiento”, como son, por ejemplo, las enfermedades neurodegenerativas o la artrosis.

Dichas enfermedades representan manifestaciones aceleradas de la pérdida progresiva de la función celular y la muerte de células totalmente diferenciadas que han vivido durante largo tiempo. Esta idea de la degeneración progresiva con la edad de las células no es incompatible con las teorías evolucionistas del envejecimiento y coincide además con el concepto de muerte apoptótica forzada como un mecanismo para evitar que tales células sufran una transformación maligna [127].

### **III. OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

- ❶ Evaluar los efectos del Óxido Nítrico en la proliferación del condrocito articular humano.
- ❷ Determinar si el Óxido Nítrico es un mediador de otros factores que tienen la capacidad de inhibir la proliferación de los condrocitos articulares humanos.
- ❸ Analizar el efecto del Óxido Nítrico sobre la viabilidad de los condrocitos articulares humanos cultivados *in vitro*.
- ❹ Estudiar la producción de Óxido Nítrico durante el envejecimiento del condrocito *in vitro*.
- ❺ Determinar si el Óxido Nítrico contribuye a la reducida respuesta proliferativa que presentan los condrocitos durante la senescencia *in vitro*.
- ❻ Analizar *in vitro* si durante el envejecimiento *in vivo* del cartílago articular humano se incrementa la síntesis de Óxido Nítrico.

## **IV. MATERIAL Y MÉTODOS SEGÚN OBJETIVOS**

## PRIMER Y SEGUNDO OBJETIVOS

- Evaluar los efectos del NO en la proliferación de los condrocitos articulares humanos.
- Determinar si el NO es un mediador de otros factores que tienen la capacidad de inhibir la proliferación de los condrocitos articulares humanos.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

Con estos objetivos pretendemos examinar si el NO es capaz de inhibir la proliferación celular de los condrocitos articulares humanos. Analizamos primero si los donantes de NO, tales como el SNP, inhiben la proliferación celular provocada por el FBS y por el factor de crecimiento TGF $\beta$ . Para ello, los condrocitos son co-incubados con el FBS o el TGF $\beta$  y el SNP en diferentes concentraciones. Con el fin de determinar si el NO media en el efecto inhibitorio que la IL-1 tiene sobre la proliferación de los condrocitos articulares humanos, añadimos un inhibidor de la enzima iNOS, el NMMA, y realizamos a continuación el ensayo de proliferación celular utilizando un medio libre de arginina.

### MÉTODOS

#### 1. Aislamiento de los condrocitos articulares.

El cartílago articular humano fue obtenido de las autopsias realizadas en el Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad de California, San Diego. Ninguno de los donantes había padecido enfermedades articulares.

Todos los donantes llevaban muertos menos de 24 horas. Los fragmentos de cartílago fueron tomados de las superficies articulares utilizando una hoja de bisturí y en condiciones de total asepsia. Posteriormente se introdujeron en un vial estéril que contenía 5% de DMEM, 150 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomina y 2 $\mu$ g/ml de

anfotericina B y se transportaron en una nevera portátil con hielo a una temperatura aproximada de 4 °C hasta la zona de cultivos celulares. Bajo una campana de flujo laminar, el cartilago fue cortado en pequeños fragmentos de aproximadamente 2x2x2 mm<sup>3</sup>, que se lavaron tres veces con medio de cultivo. A continuación se añadieron 20 ml de medio con 10% de tripsina y se incubaron los cartílagos en un baño de agua a 37° C durante 10-15 minutos. Luego se digirió el cartilago añadiendo 25 ml de solución de colagenasa [Colagenasa tipo IV 2mg/ml; 5% FBS; penicilina (150 unidades/ml), estreptomina (50 mg/ml); 1% L-Glutamina en DMEM]. El vial se introdujo en un agitador giratorio a 37°C durante aproximadamente 16-18 horas. Los agregados multicelulares y los residuos de matriz extracelular fueron eliminados tras centrifugar la muestra (1 g). Se filtraron las células a través de un filtro de nylon con poros de 25 µm de diámetro y se lavaron 3 veces en RPMI, FBS 5%, penicilina y estreptomina. Contamos las células y las cultivamos a una densidad de 5.000 a 10.000 células/cm<sup>2</sup> en botellas de cultivo de 25 ó 75 cm<sup>2</sup> de superficie y en cámaras de cultivo a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta el momento de ser usadas en los diferentes experimentos.

## 2. Estudios de proliferación celular.

Distribuimos los condrocitos en placas de 96 pocillos (5.000 células por pocillo) en un volumen total de 200 µl de DMEM suplementado con 1% de L-glutamina, penicilina, estreptomina y FBS según se indica en cada experimento, junto con los diferentes estímulos.

Después de un período de 3 a 5 días, los cultivos fueron pulsados con [<sup>3</sup>H] TdR (1µCi/pocillo) durante 12 horas, al cabo de las cuales fueron sembradas en un papel de filtro de cristal utilizando una máquina sembradora de células (*PHD cell harvester-Cambridge*). Cuantificamos la radioactividad total en un líquido de escintilación utilizando un contador de radioactividad (*Skatron*).

## 3. Reacción de Griess.

Los condrocitos se cultivaron en placas de 96 pocillos (50.000 células por pocillo) durante 48 horas, al cabo de las cuales se recogió el sobrenadante para medir la concentración de nitritos (NO<sub>2</sub>). La síntesis de NO fue detectada por la acumulación de NO<sub>2</sub> en los sobrenadantes de los cultivos utilizando la reacción de Griess. Se usó el nitrato sódico para realizar una curva estándar. Incubamos 50 ml de sobrenadante con 50 ml de 1% sulfanilamida, 0.1% N-1-naftiletilediamida dihidroclorhído en 25% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a temperatura ambiente durante 5 min. La densidad óptica fue medida a 570 nm.

## 4. Medición de PGE<sub>2</sub>.

Cultivamos las células en placas de 24 pocillos (100.000 células por pocillo) con 250 µl de medio DMEM suplementado con 1% de L-glutamina, penicilina, estreptomina y FBS, según se indica en cada experimento. El sobrenadante de los diferentes pocillos se recogió a las 24 horas (intervalo de tiempo necesario para que la síntesis de PGE<sub>2</sub> alcanzase su cota máxima, según experimentos hechos previa-

mente en el laboratorio). Estos sobrenadantes se filtraron a través de unas columnas (*C18 Amersham*) para extraer y separar las prostaglandinas. Medimos el contenido de PGE<sub>2</sub> mediante EIA, utilizando un kit comercial (*Amersham*). Este ensayo tiene una reactividad cruzada de 7% con PGE<sub>1</sub>, 4.3% con PGE<sub>2</sub>α y 5.4% con 6-keto PGF<sub>1</sub>α. La reacción cruzada con otras prostaglandinas fue <1%.

### 5. Análisis estadístico.

Los resultados se muestran como la media SEM. En todos ellos, fueron realizados al menos tres experimentos diferentes, con células de distintos donantes.

En cada uno de los experimentos, la medida individual se llevó a cabo por duplicado o triplicado. El análisis estadístico aplicado fue el test-t con dos colas no apareadas.

### 6. Reactivos.

Interleuquina 1 recombinante humana (IL-1β) y el factor transformador del crecimiento β1 humano purificado (TGF-β1) (*R&D Systems, Minneapolis, MN*). Colagenasa, Nitroprusiato sódico (SNP), Indometacina, PGE<sub>2</sub> (*Sigma Chemical Corp., St Louis, MO*). Kit comercial PGE<sub>2</sub> EIA (*Amersham*) DMEM, L-Glutamina, Penicilina, Estreptomocina (*MA Bioproducts*). Placas y botellas de cultivo (*Costar*).



## TERCER OBJETIVO

- Analizar el efecto del NO sobre la viabilidad de los condrocitos articulares humanos cultivados *in vitro*.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

Aislamos y cultivamos células procedentes de cartílagos sanos. Posteriormente se sometieron a diversos estímulos, como los donantes químicos de NO y las citoquinas. Tras examinar la viabilidad celular mediante el microscopio de luz, se aplicaron las diferentes técnicas para el estudio morfológico de la muerte celular de los condrocitos.

### MÉTODOS

#### 1. Aislamiento de los condrocitos.

El cartílago articular humano fue obtenido de las autopsias realizadas en el Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad de California, San Diego. Ninguno de los donantes había padecido enfermedades articulares. Los donantes eran adultos de edades comprendidas entre 19-72 años (media 54 años). Todos los donantes llevaban

muestras menos de 24 horas. Los fragmentos de cartílago fueron tomados de las superficies articulares utilizando una hoja de bisturí y en condiciones de total asepsia. Posteriormente se introdujeron en un vial estéril que contenía 5% de DMEM, 150 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomycin y 2µg/ml de anfotericina B y se transportaron en una nevera portátil con hielo a una temperatura aproximada de 4° C hasta

la zona de cultivos celulares. Bajo una campana de flujo laminar, el cartílago fue cortado en fragmentos pequeños de unos  $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$ , que se lavaron tres veces con medio de cultivo. A continuación se añadieron 20 ml de medio con 10% de tripsina y se incubaron los cartílagos en un baño de agua a  $37^\circ \text{C}$  durante 10-15 minutos. Luego se digirió el cartílago añadiendo 25 ml de solución de colagenasa [Colagenasa tipo IV 2mg/ml; 5% FBS; penicilina (150 unidades/ml), estreptomina (50 mg/ml); 1% L-Glutamina en DMEM]. El vial se introdujo en un agitador giratorio a  $37^\circ \text{C}$  durante aproximadamente 16-18 horas. Los agregados multicelulares y los residuos de matriz extracelular fueron eliminados tras centrifugar la muestra (1 g). Se filtraron las células a través de un filtro de nylon con poros de  $25 \mu\text{m}$  de diámetro y se lavaron 3 veces en RPMI, FBS 5%, penicilina y estreptomina. Contamos las células y las cultivamos a una densidad de 5.000 a 10.000 células/ $\text{cm}^2$  en botellas de cultivo de 25 ó  $75 \text{ cm}^2$  de superficie y en cámaras de cultivo a  $37^\circ \text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$  hasta el momento de ser usadas en los diferentes experimentos. Finalmente, las células fueron estimuladas con varios reactivos (IL-1,  $\text{TGF}\beta$ , inhibidores de NOS y quelantes de los radicales libres, etc.).

## 2. Estudio de la fragmentación del ADN.

Primeramente las células fueron tripsinizadas, centrifugadas durante 5 minutos a 2.000 rpm y resuspendidas en 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, pH 8.0 ( $10^6$  células en 50 ml *buffer*). A continuación los extractos fue-

ron incubados en hielo durante 20 minutos y agitados bruscamente cada 5 minutos.

Se eliminaron los fragmentos celulares y el ADN de alto peso molecular mediante una centrifugación de 14.000 rpm a  $4^\circ \text{C}$  durante 10 minutos. Los sobrenadantes fueron tratados con fenol y fenol/cloroformo y precipitados con 0.5 volumen de 7.5 M acetato de amonio y 2 volúmenes de etanol durante 2 horas a  $-80^\circ \text{C}$ . El ADN fue resuspendido en TE y se trató 1mg con 5U Klenow polimerasa (*Boehringer Mann-heim*) y 5 mCi  $^{32}\text{P}$ -dCTP durante 10 minutos en presencia de 10 mM Tris pH 7.5, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ . Los nucleótidos que no se incorporaron fueron eliminados con 3 precipitaciones consecutivas. Separamos una mitad del ADN marcado en geles de agarosa al 2%, secados y expuestos a una película de Rayos-X.

## 3. Detección histoquímica de la fragmentación del ADN.

Las células en cultivo fueron tripsinizadas, centrifugadas sobre *slides* y fijadas con 0.25% de gluteraldehído durante 1 minuto. A continuación, se lavaron con agua y se tiñeron con 1 mg/ml 4',6'-dianidino-2-phenylindol dihidroclorhído (DAPI) durante 10 minutos a  $37^\circ \text{C}$ . Los *slides* fueron también lavados con agua, secados al aire y cubiertos con Vectashield (*Vector Labs*). Seguidamente llevamos a cabo el estudio morfológico, para lo que utilizamos un microscopio de fluorescencia junto con filtros de triple banda (#61000; *Chroma Technology, Brattleboro, VT*) en un microscopio Olympus.

#### 4. Técnica de marcaje del DNA para el análisis con citometría de flujo.

Las células fueron fijadas en 70% de etanol a una temperatura de 4 °C durante 60 minutos, lavadas e incubadas con RNA-asa (50 mg/ml) y yoduro de Propidium (PI, 100 mg/ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Medimos la fluorescencia de PI del núcleo mediante citometría de flujo con un FACScan (*Becton and Dickinson, Mountain View, CA*), usando un espejo dicromático de 560 nm y un filtro con una banda de 600 nm.

Los datos son expresados como porcentaje de núcleos hipo-ploides (apoptóticos).

#### 5. Microscopía electrónica.

Los condrocitos fueron cultivados en monocapa. Al cabo de dos días de cultivo, añadimos SNP 2mM o SNAP 2mM durante los tiempos indicados y a continuación recogimos las células, que fueron centrifugadas, lavadas con PBS y fijadas durante 1 hora a temperatura ambiente en 2.5% de glutaraldehído con 0.1 M cacodilato (pH 7.2). Seguidamente fueron lavadas de nuevo con cacodilato *buffer*, pos-fijadas durante 1 hora en 2% OsO<sub>4</sub> con cacodilato, deshidratadas con diferentes concentraciones de etanol y sumergidas en Polybed 812 (*Polysciences, Warrington, PA*).

Finalmente, realizamos secciones finas del *pellet* celular, que fueron teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo.

#### 6. Reacción de Griess.

Cultivamos los condrocitos en placas de 96 pocillos (50.000 células por pocillo) durante 48 horas, al cabo de las cuales se recogió el sobrenadante para medir la concentración de nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). Detectamos la síntesis de NO por la acumulación de NO<sub>2</sub> en los sobrenadantes de los cultivos utilizando la reacción de Griess. Usamos el nitrato sódico para realizar una curva estándar. A continuación incubamos 50 ml de sobrenadante con 50 ml de 1% sulfanilamida, 0.1% N-1-naftiletilediamida dihidroclorhído en 25% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a temperatura ambiente durante 5 minutos. La densidad óptica fue medida a 570 nm.

#### 7. Análisis estadístico.

Los resultados se muestran como la media SEM. En todos ellos, fueron realizados al menos tres experimentos diferentes, con células de distintos donantes.

En cada uno de los experimentos, la medida individual se llevó a cabo por duplicado o triplicado. El análisis estadístico aplicado fue el test-t con dos colas no apareadas.

#### 8. Reactivos.

Interleuquina-1 $\beta$  recombinante humana (IL-1 $\beta$ ), factor transformador del crecimiento  $\beta$ 1 humano purificado (TGF- $\beta$ 1), (*R&D Systems, Minneapolis, MN*). Los medios para los cultivos celulares proceden de MA Bioproducts.

SNP (Sodium Nitroprusida), SOD (Superóxido Dismutasa), NMA (N-Metilo Arginina), NAC (N-Aceto Ciste-

ína), LPS (Lipopoli- sacárido de Salmonella minnesota), catalase, DMSO (dimetilsulfóxido) y DMPO (5-5' dimetilo pirrolina 1-óxido) fueron comprados a Sigma Chemical Corp., St Louis, MO;

SNAP, (s-nitroso-N-acetilo-D-L-penicilamina), SIN-1 (3-morfolinosinonimida-hidroclorhído), de Alexis Corporation, San Diego, CA; Hipoxantina, xantina oxidasa de Calbiochem, La Jolla, CA.

## CUARTO Y QUINTO OBJETIVOS

- Estudiar la producción de NO durante el envejecimiento del condrocito *in vitro*.
- Determinar si el NO contribuye a la reducida respuesta proliferativa que presentan los condrocitos durante la senescencia *in vitro*.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

Los condrocitos fueron aislados de los cartílagos obtenidos de las autopsias y se analizó en cultivos de células primarias la producción de NO, la actividad de la enzima iNOS y la expresión del mRNA. Estos experimentos fueron llevados a cabo con muestras procedentes de donantes de diferentes grupos de edades para determinar si existen diferencias relacionadas con la edad en los niveles de producción de NO, en la actividad de iNOS y en la expresión de mRNA. Para estudiar los posibles cambios en la producción de NO durante el envejecimiento de los condrocitos *in vitro*, las células fueron subcultivadas hasta que alcanzaron la senescencia y en cada pase cuantificamos los niveles de NO sintetizados de forma espontánea e inducida por la IL-1.

### MÉTODOS

#### 1. Aislamiento de condrocitos.

Los donantes eran adultos de edades comprendidas entre 19 y 74 años (media 44 años). El cartílago articular humano procedía de las autopsias realizadas en el Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad de California, San Diego. Ninguno de los

donantes había padecido enfermedades articulares y los análisis macroscópicos revelaban que el cartílago era normal. Todos los donantes llevaban muertos menos de 24 horas.

Los fragmentos de cartílago fueron tomados de las superficies articulares de los condilos femorales y patillos

tibiales utilizando una hoja de bisturí y en condiciones de total asepsia. Posteriormente, se introdujeron en un vial estéril que contenía 5% de DMEM, 150 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomina y 2µg/ml de anfotericina B y se colocaron en una nevera portátil con hielo a una temperatura aproximada de 4 °C para su transporte hasta la zona de cultivos celulares.

Bajo una campana de flujo laminar, el cartílago fue cortado en fragmentos pequeños de, aproximadamente, 2x2x2 mm<sup>3</sup>, que se lavaron tres veces con medio de cultivo. A continuación añadimos 20 ml de medio con 10% de tripsina e incubamos los fragmentos de cartílago en un baño de agua a 37 °C durante 10-15 minutos. Luego se digirió el cartílago añadiendo 25 ml de solución de colagenasa [Colagenasa tipo IV 2mg/ml; 5% FBS; penicilina (150 unidades/ml), estreptomina (50 mg/ml); 1% L-Glutamina en DMEM]. El vial se introdujo en un agitador giratorio a 37 °C durante un tiempo aproximado de 16-18 horas.

Los agregados multicelulares y los residuos de matriz extracelular se eliminaron tras centrifugar la muestra (1g). Las células fueron filtradas a través de un filtro de nylon con poros de 25 µm de diámetro y lavadas a continuación tres veces en RPMI, FBS 5%, penicilina y estreptomina. Contamos las células y las cultivamos a una densidad de 5.000 a 10.000 células/cm<sup>2</sup> en botellas de cultivo de 25 ó 75 cm<sup>2</sup> de superficie y en cámaras de cultivo a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta el momento de ser usadas en los diferentes experimentos.

#### 4. Estudios de Proliferación.

Los condrocitos fueron distribuidos en placas de 96 pocillos (5.000 células por pocillo) en un volumen total de 200 µl de DMEM suplementado con 1% de L-glutamina, penicilina, estreptomina y FBS, según se indica en cada experimento, con los diferentes estímulos. Transcurridos entre 3 y 5 días, los cultivos fueron pulsados con [<sup>3</sup>H] TdR (1µCi/pocillo) durante 12 horas, al cabo de las cuales las células fueron sembradas en un papel de filtro de cristal, utilizando una máquina sembradora de células (*PHD cell harvester-Cambridge*). La radioactividad total fue cuantificada en un líquido de escintilación por medio de un contador de radioactividad (*Skatron*). El porcentaje de la incorporación relativa de timidina se calculó aplicando la siguiente fórmula:  $\text{cpm muestra (TGF}\beta \text{ y/o IL-1) / cpm control + cpm muestra}$ .

#### 5. Reacción de Griess.

Los condrocitos se cultivaron en placas de 96 pocillos (50.000 células por pocillo) durante 48 horas, al cabo de las cuales se recogió el sobrenadante para medir la concentración de nitritos (NO<sub>2</sub>). La síntesis de NO fue detectada por la acumulación de NO<sub>2</sub> en los sobrenadantes de los cultivos utilizando la reacción de Griess. Se usó el nitrato sódico para realizar una curva estándar. Incubamos 50 ml de sobrenadante con 50 ml de 1% sulfanilamida, 0.1% N-1-naftiletilediamida dihidroclorhído en 25% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a temperatura ambiente durante 5 min. La densidad óptica fue medida a 570 nm.

## 6. PCR para iNOS: *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*.

Aislamos el RNA con RNA-STAT (*TEL-TEST "B", Inc.*) a partir de 250.000 células. Posteriormente se hizo la Transcripción Reversa utilizando RT-buffer (*BRL, Bethesda, MD*), 10 mM DTT, 500 mM dNTPs, 50 ng random hexanucleótidos, 20 U MoMLV-RT (*BRL*) y 20 U RNasin (*Promega, Madison, WI*) durante 60 minutos a una temperatura de 37 °C. La PCR fue realizada con 2 ml de cDNA en 20 ml de buffer con 1U Taq DNA polimerasa (*Boehringer Mannheim*), 2 µM dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris (pH 8.3), 50 mM KCl, 200 pmol de cada *primer*.

El protocolo de amplificación fue el siguiente: 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C y 30 segundos a 72 °C. Los productos conseguidos con RT-PCR fueron separados en geles de agarosa 1.5% y teñidos con bromuro de etidio.

Seleccionamos los *primers* para iNOS de la secuencia de bases del cDNA iNOS, excluyendo las regiones de alta homología con la forma constitutiva de la enzima (cNOS). La homología del 3' iNOS *primer* con el cNOS cDNA de las células cerebrales humanas, por un lado, y con el HUVECs, por otro, fueron de 23.8 y 38.1% respectivamente.

La secuencia del *primer* para la cadena sense fue ACA TTG ATC AGA AGC TGT CCC AC (nucleótidos 2.125 a 2.147) y para la cadena antisense fue CAA AGG CTG TGA GTC CTG CAC (nucleótidos 2360 a 2340). Estos *primers* amplifican un producto de 235 bp. Este fragmento fue purificado,

clonado y usado en el *Northern blotting*, donde se hibridó a un mRNA iNOS de 4.5-kb en condrocitos activados por IL-1, pero no en los condrocitos que se encuentran en reposo.

La secuencia del *primer* para la cadena sense de la enzima gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa (GADPH) fue TGG TAT CGT GGA AGG ACT CAT GAC, mientras que para la cadena antisense el *primer* fue ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AGC, que definió un producto de 190 bp.

## 7. *Northern blotting*.

Insertamos en el vector de transcripción PT7 (*Novagen, Madison, WI*) un producto de 235 bp, resultante de la PCR, que comprende desde el nucleótido 2.125 hasta el 2.360 del cDNA iNOS. Este fragmento fue roto y purificado. Marcamos la sonda iNOS con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (*Amersham, Arlington Heights, IL*) y la separamos de los nucleótidos no incorporados mediante la filtración del gel (*Centri-Sep columns; Princeton Separations, Adelphia, NJ*). La actividad específica de la sonda marcada fue aproximadamente de 2x10<sup>8</sup> cpm/µg de muestra. El RNA total fue extraído de 4x10<sup>6</sup> condrocitos primarios. Sometimos el RNA (no seleccionado) (20µg) a electroforesis en un gel de agarosa-formaldehído, transferido a filtros de nylon y fijado por exposición a luz UV durante 5 minutos. Los filtros fueron pre-hibridados en 50% de formamida, 6x SSC, 0.5% SDS, 5x solución de Denhardt y 100 µg/ml yast RNA durante 4 horas a 42 °C. Realizamos una hibridación que permaneció durante toda la noche a 42 °C en el mismo *buffer*, el cual contenía 2x10<sup>6</sup> cpm/ml por sonda, y

seguidamente llevamos a cabo lavados con 1xSSC, 0.1% SDS a temperatura ambiente (2x30 minutos) y en 0.1xSSC, 0.1%SDS a 60°C (2 x 30 minutos). Finalmente, los filtros fueron expuestos a una película Kodak XAR a -70 °C durante 24 horas.

## 8. Reactivos.

Anti-type I o II collagen goat antibody (*Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL*). Anti-goat biotynyla-

ted antibody (*Histostain-sp kit, Zymed Laboratories Inc, San Francisco, CA*). RNA-STAT (*TEL-TEST "B", Inc.*). RT-buffer (*BRL, Bethesda, MD*). MoMLV-RT (*BRL*). RNasin (*Promega, Madison, WI*). Taq DNA polymerasa (*Boehringer Mannheim*). Vector de transcripción PT7 (*Novagen, Madison, WI*). [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (*Amersham, Arlington Heights, IL*). Centri-Sep columns (*Princeton Separations, Adelphia, NJ*). Los medios para los cultivos celulares proceden de MA Bioproducts.



## SEXTO OBJETIVO

- Analizar *in vitro* si durante el envejecimiento *in vivo* del cartílago articular humano se incrementa la síntesis de NO.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

Para analizar la influencia del NO durante el envejecimiento del cartílago articular *in vivo*, se tomaron condrocitos de donantes de diferentes edades y se cuantificó la producción de NO en cultivo y se estudió la expresión del gen INOS y de la enzima. Así mismo, se cuantificó por FACs el número de células apoptóticas aisladas de los cartílagos procedentes de los diferentes donantes.

### MÉTODOS

#### 1. Origen de los tejidos.

El cartílago articular humano fue obtenido de las autopsias realizadas en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Juan Canalejo. Se procesaron catorce muestras procedentes de donantes entre 45 y 92 años de edad.

#### 2. Proceso del cartílago.

De cada dos secciones de cartílago articular extraídas de idéntica región anatómica (zona de carga y zona de no-carga), procesamos 6 cilindros de cartílago adyacentes de idéntico tamaño con *puncher* de 3x5mm. Dos cilindros fueron procesados para almacenar en

nitrógeno líquido. Los cilindros congelados se utilizaron para realizar secciones de 6µm; posteriormente fueron teñidos con hematosilina/eosina para determinar el número de células por sección. Este dato nos facilitó información sobre la celularidad del tejido, al tiempo que nos permitía normalizar la cuantificación de los nitritos en los cultivos de tejidos.

#### **4. Aislamiento y cultivo de condrocitos.**

Los fragmentos de cartílago fueron tomados de las superficies articulares de los cóndilos femorales y platillos tibiales, utilizando una hoja de bisturí y en condiciones de total asepsia. Posteriormente se introdujeron en un vial estéril que contenía 5% de DMEM, 150 U/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomycin y 2µg/ml de anfotericina B y se colocaron en una nevera portátil con hielo a una temperatura aproximada de 4 °C para su transporte hasta la zona de cultivos celulares.

El cartílago fue cortado, bajo una campana de flujo laminar, en pequeños fragmentos de, aproximadamente, 2x2x2 mm<sup>3</sup>, que se lavaron tres veces con medio de cultivo. Posteriormente, añadimos 20 ml de medio con 10% de tripsina e incubamos el cartílago en un baño de agua a 37 °C durante 10-15 minutos. Luego se digirió el cartílago añadiendo 25 ml de solución de colagenasa [Colagenasa tipo IV 2mg/ml; 5% FBS; penicilina (150 unidades/ml), estreptomycin (50 mg/ml); 1% L-Glutamina en DMEM]. El vial se introdujo en un agitador giratorio a 37 °C durante un tiempo aproximado de 16-18 horas. Los agregados multicelulares y

los residuos de matriz extracelular fueron eliminados tras centrifugar la muestra (1g). Filtramos las células a través de un filtro de nylon con poros de 25 µm de diámetro y seguidamente las lavamos 3 veces en RPMI, FBS 5%, penicilina y estreptomycin.

Finalmente contamos las células y las cultivamos a una densidad de 5.000 a 10.000 células/cm<sup>2</sup> en botellas de cultivo de 25 ó 75 cm<sup>2</sup> de superficie y en cámaras de cultivo a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta el momento de ser utilizadas en los diferentes experimentos.

#### **5. Histoquímica para iNOS.**

Realizamos cortes de 6 µm de grosor sobre cartílago congelado, que fueron fijados con acetona durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las secciones fueron incubadas con anticuerpo monoclonal anti-iNOS en concentraciones de 1:500 durante 16-18 horas a 4 °C. Como método de tinción, empleamos un sistema de estreptavidin-biotin-peroxidasa, y utilizamos diaminobenzidina como cromógeno.

#### **6. Reacción de Griess.**

Los condrocitos se cultivaron en placas de 96 pocillos (50.000 células por pocillo) durante 48 horas, al cabo de las cuales se recogió el sobrenadante para medir la concentración de nitritos (NO<sub>2</sub>). La síntesis de NO fue detectada por la acumulación de NO<sub>2</sub> en los sobrenadantes de los cultivos utilizando la reacción de Griess. Se usó el nitrato sódico para realizar una curva estándar. Incubamos 50 µl de sobrenadante con 50 µl de 1% sulfanilamida, 0.1% N-1-naftiletilediamida dihidro-

clorhído en 25% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a temperatura ambiente durante 5 min. La densidad óptica fue medida a 570 nm.

### 7. PCR para iNOS: *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*.

Aislamos el RNA con RNA STAT (*TEL-TEST "B", INC.*) a partir de 1.000.000 de células. Posteriormente se realizó Transcription Reverse utilizando RT-buffer (*BRL*), 10 mM DTT, 500 mM dNTPs, 50 ng random hexanucleótidos, 20 U MoMLV-RT (*BRL*) y 20 U RNasin (Promega) durante 60 minutos a 37 °C.

La PCR fue realizada con 2 ml de cDNA en 20 ml de buffer con 1 U Taq DNA polimerasa (*Boehringer Mannheim*), 2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris pH 8.3, 50 mM KCl, 200 pmol de cada *primer*. El protocolo de amplificación fue el siguiente: 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C y 30 segundos a 72 °C. Los productos conseguidos con RT-PCR fueron separados en geles de agarosal 1.5% y teñidos con bromuro de etidio. La secuencia del *primer* para la cadena sense es ACA TTG ATC AGA AGC TGT CCC AC (nucleótidos 2125 a

2147), y para la cadena antisense CAA AGG CTG TGA GTC CTG CAC (nucleótidos 2360 a 2340). Estos *primers* amplifican un producto de 235 bp.

### 8. Cuantificación de células apoptóticas por FACs.

Las células recién aisladas fueron fijadas en 70% de etanol a 4 °C durante 60 minutos, lavadas e incubadas con RNAase (50 mg/ml) y propidium iodide (PI, 100 mg/ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente en campo oscuro a 4 °C. Medimos la fluorescencia de los núcleos por citometría de flujo en un FACscan (*Becton and Dickinson, Mountain View, CA*), utilizando un espejo dicromático de 560 nm y un filtro de 600 nm. Los datos fueron expresados como porcentajes de núcleos apoptóticos.

### 9. Análisis estadístico.

En cada uno de los experimentos, la medida individual se llevó a cabo por duplicado o por triplicado. El análisis estadístico aplicado para la correlación entre la edad y los niveles de NO y la apoptosis fue un test de regresión lineal.

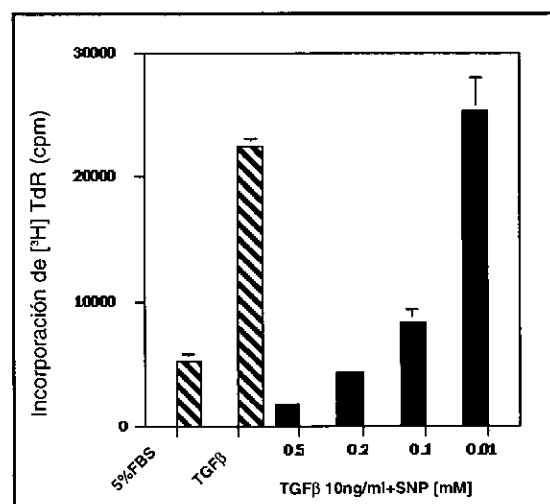
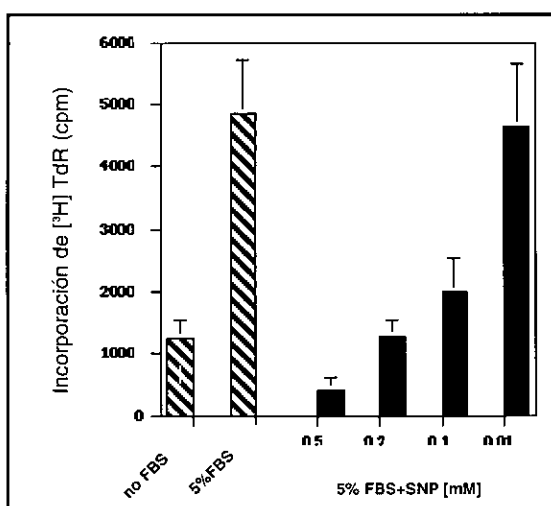
## **V. RESULTADOS**

## I. EL ÓXIDO NÍTRICO Y LA PROLIFERACIÓN DE LOS CONDROCITOS

### 1. Los donantes de NO inhiben la proliferación de los condrocitos.

Realizamos un primer grupo de experimentos con un objetivo de partida: analizar los efectos que el NO exógeno tenía sobre la proliferación de los condrocitos.

Cultivamos los condrocitos con FBS o TGF $\beta$ , factores que desencadenan una respuesta proliferativa en las células (*Figura 1*), y comprobamos que el SNP había inhibido de forma dosis-dependiente la proliferación provocada por el suero (*Figura 1A*) y por el TGF $\beta$  (*Figura 1B*).



**Figura 1.** El donante de NO (nitroprusiato sódico) inhibe la proliferación de los condrocitos. La proliferación de los condrocitos fue inducida con FBS 5% (Panel A) o 10ng/ml TGF $\beta$ 1 (Panel B). El SNP se añadió al inicio de los cultivos y la proliferación fue medida al cabo de 12 horas de cultivo. Los resultados se muestran como media EM de 6 experimentos realizados independientemente y por triplicado a partir de células de 6 donantes diferentes.

En aquellos casos en los que se utilizaron concentraciones de SNP de 0.2mM, este causó una inhibición >50%. La viabilidad de las células fue analizada utilizando una tinción de eritrocina y se comprobó que el efecto antiproliferativo del SNP no estaba causado por su toxicidad celular.

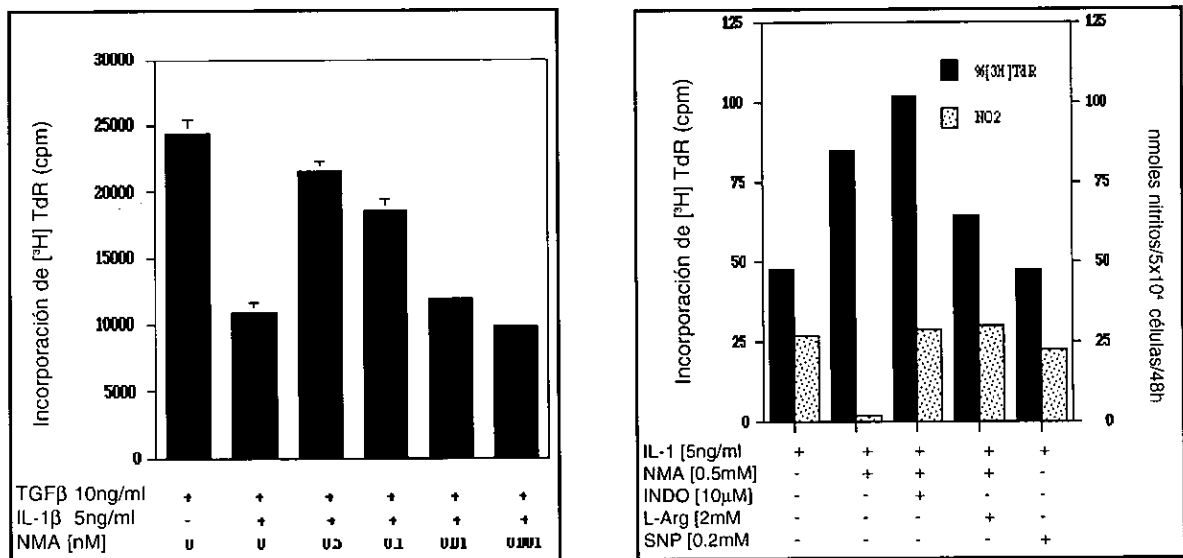
## 2. El NMA neutraliza parcialmente el efecto antiproliferativo de la IL-1.

Estudios previos han demostrado que, en los condrocitos articulares humanos, la estimulación con IL-1 provoca la manifestación de RNAm de iNOS y la liberación de NO. Dado que la IL-1 y el NO derivado de SNP (fuente exógena de NO) inhiben la proliferación de los condrocitos, nosotros nos proponemos averiguar si el NO producido endógenamente interviene en este efecto.

Tras tratar los condrocitos con TGF $\beta$  e IL-1, añadimos en estos cultivos el N-monomethyl-L arginina (MNA) —un inhibidor competitivo de NOS— en diferentes concentraciones.

Los resultados mostraron que, en concentraciones comprendidas entre un 0.1 y un 10 ng/ml, la IL-1 inhibía la proliferación de los condrocitos inducida por el suero (5% FBS) y por TGF $\beta$  (10 ó 1 ng/ml). La adición de NMA (0.01 a 5 mM) neutralizó parcialmente esta inhibición de la IL-1 sobre la proliferación inducida por el suero o por la TGF $\beta$ . El efecto neutralizador del NMA sobre la IL-1 fue aproximadamente de un 70% (Figura 2).

Sabiendo que el NMA compite con la L-arginina por unirse al NOS, realizamos diversos experimentos para demostrar su especificidad.

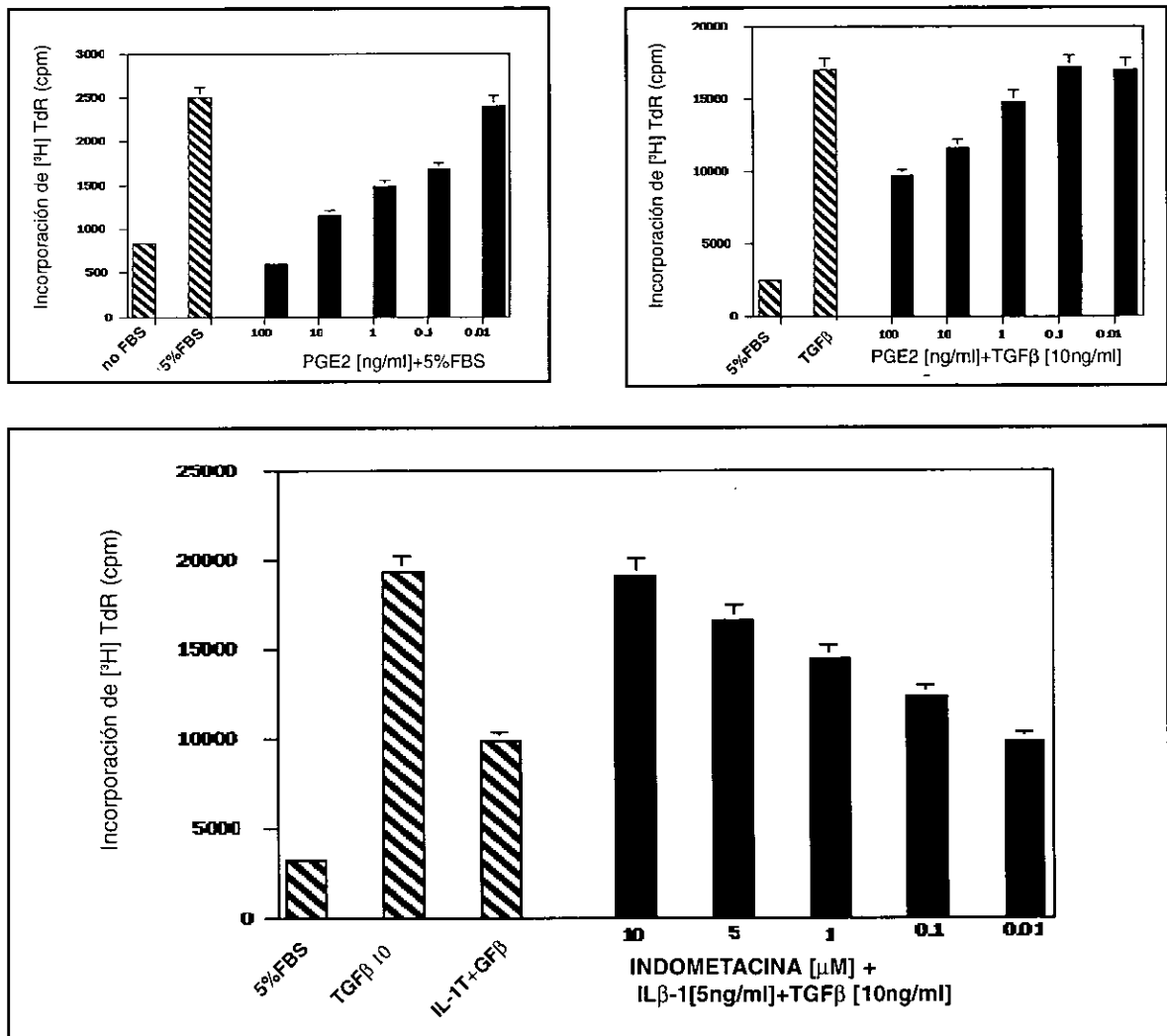


**Figura 2.** El NMA contrarresta el efecto antiproliferativo de la IL-1. Los condrocitos fueron estimulados con 5% FBS o 10ng/ml TGF $\beta$ 1 y cultivados en presencia de IL-1 (1ng/ml) y la dosis indicada de NMA. Los resultados representan 6 experimentos realizados independientemente y se muestran como media de cpm +SEM de la incorporación de la 3H-timidina (Panel A). El Panel B muestra la relación inversa entre los niveles de proliferación de los condrocitos y los niveles de nitritos en el medio de cultivo. Los condrocitos fueron estimulados con TGF $\beta$  y tratados con el otro agente al iniciar el cultivo celular. Al cabo de 48 horas, se recogió el medio para medir los nitritos con la reacción de Griess; la proliferación fue cuantificada al cabo de 4 días. Los resultados se muestran como la media de cpm+SEM de 6 experimentos realizados independientemente y por triplicado con células de 6 donantes diferentes.

La administración excesiva de la L-arginina (2mM) contrarrestó el efecto de NMA sobre la inhibición provocada por IL-1 en la proliferación de condrocitos. El sobrenadante de estos experimentos fue recogido a las 48 horas de pocillos duplicados para analizar los niveles de nitritos. Los resultados mostraron una relación directa entre los niveles de nitritos y la escasa respuesta proliferativa en todas las condiciones estudiadas (Figura 2B).

### 3. La interacción entre PGE2 y NO en el efecto inhibitor de la proliferación de los condrocitos de la IL-1.

La PGE2 posee la capacidad de reducir la proliferación de los condrocitos inducida por el suero. Este hecho nos llevó a examinar las posibles interacciones entre el NO y la PGE2 como mediadores de tal efecto. Demostramos en primer lugar que, al añadir la PGE2, se produce una reducción de la prolife-



**Figura 3.** La PGE2 inhibe la proliferación de los condrocitos. La proliferación de condrocitos fue inducida con 5% FBS (Panel A) o 10ng/ml TGFβ (Panel B). La PGE2 fue añadida al iniciar el cultivo y la proliferación se midió por la incorporación de 3H-timidina al cabo de 4 días. El panel C muestra cómo la indometacina, añadida al inicio del cultivo, bloqueó de forma dosis-dependiente el efecto inhibitor del crecimiento celular de la IL-1. Los resultados se muestran como la media de cpm+SEM de 6 experimentos realizados independientemente y por triplicado con células de seis donantes diferentes en cada experimento.

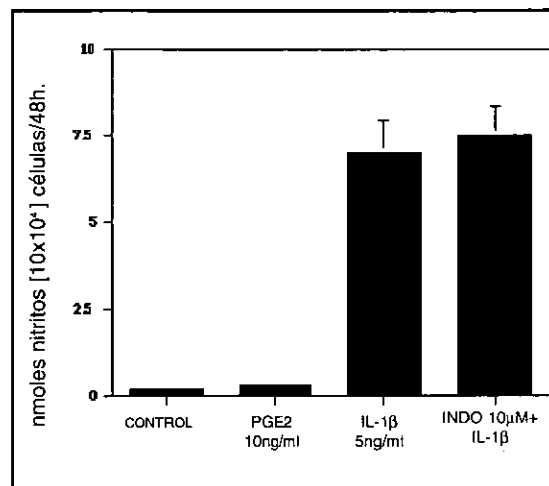
ración celular inducida por el suero (Figura 3A) o por el TGF $\beta$  (Figura 3B), que es dosis-dependiente. Para analizar si la inhibición de la IL-1 sobre la TGF $\beta$  estaba mediada por la PGE2, añadimos indometacina a los cultivos tratados con TGF $\beta$ /IL-1 y comprobamos que la indometacina neutraliza de manera absoluta y dosis-dependiente el efecto antiproliferativo de la IL-1 (Figure 3C).

#### 4. El NO induce la síntesis de la PGE2.

Los resultados mostrados hasta ahora identifican al NO y a la PGE2 como inhibidores de la proliferación de los condrocitos y revelan que estos son efectivos cuando se añaden de forma exógena y, también en parte, como mediadores endógenos de los efectos de la IL-1.

Basándonos en estos resultados, nosotros creemos que es posible que el NO participe en la inducción de la PGE2, o que la PGE2 contribuya a la producción del NO; ambos forman parte de una interacción en serie que, en último término, origina la inhibición de la proliferación de los condrocitos.

Estudiamos en primer lugar el papel de la PGE2 en la inducción del NO y comprobamos que la adición de PGE2 a concentraciones comprendidas entre 1 y 100ng/ml no ocasionaron en los condrocitos en cultivo un aumento significativo en cuanto a la liberación de los niveles de nitritos. Por su parte, la indometacina (0.1-10 $\mu$ M) no mostró ningún efecto inhibitor en la síntesis de NO inducida por la IL-1 (Figura 4).



**Figura 4.** La PGE2 no es capaz de inducir NO. En una placa de 96 pocillos, fueron cultivadas 50.000 células en cada pocillo y tratados estos con PGE2, IL-1 o IL-1 más indometacina ( $\mu$ M). El medio de cultivo fue recogido al cabo de 48 horas y los niveles de nitritos fueron determinados utilizando la reacción de Griess. Los resultados se muestran como media de los niveles de nitritos en nmoles/50,000 células/48h de 6 experimentos realizados independientemente y por triplicado con células de 6 donantes diferentes.

A continuación, examinamos la posibilidad de que el NO indujese la síntesis de la PGE2. Los condrocitos fueron estimulados con IL-1, lo que provocó un incremento en los niveles de PGE2, que alcanzaron su valor máximo a las 24 horas. Este mismo intervalo fue aplicado en todos los experimentos sucesivos. El SNP produjo un incremento de 15 veces la síntesis de PGE2 en comparación con los niveles basales (Tabla 1). Por otra parte, la inducción de la síntesis de PGE2 provocada por la IL-1 fue mediada por el NO, ya que el NMA (en una concentración (1mM) bloqueó completamente la producción de PGE inducida por la IL-1 (Tabla 1).

**Tabla 1: Inducción de PGE2 por el NO**

ESTÍMULOS	PGE2 (pg/ml)
Medio	138
IL-1 (ng/ml)	1109
IL-1+ NMA (1nM)	458
IL-1+ NMA +L-Arg (2mM)	5186
SNP (0.2mM)	2108

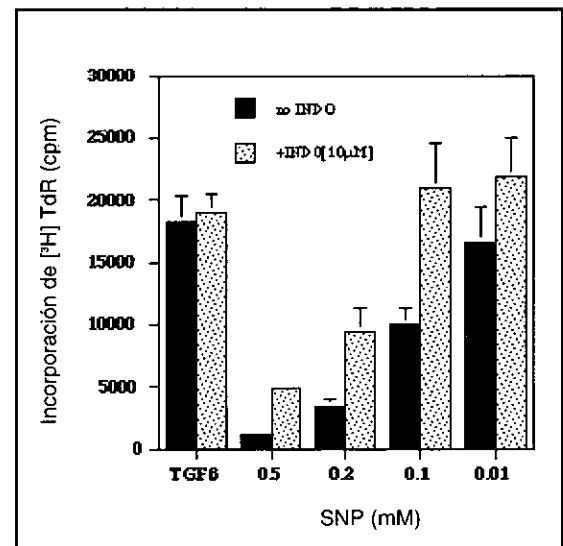


### 5. El efecto de la indometacina en la capacidad antiproliferativa del NO.

Los resultados de los experimentos realizados hasta ahora muestran que tanto el NO como la PGE2 intervienen en la acción antiproliferativa de la IL-1, y que la inducción del NO producida por la IL-1 es necesaria para la síntesis de PGE2.

El último grupo de experimentos de este objetivo pretende analizar si el efecto inhibitor del NO depende de la PGE2. Se añadió TGF $\beta$  para inducir la proliferación de los condrocitos y ésta fue reducida de forma dosis-dependiente por el SNP (*Figura 5*). La adición de la indometacina aumentó la proliferación de cada una de las dosis de SNP utilizadas. En las dosis más altas de SNP (0.5 and 0.2mM) la indometacina neutralizó parcialmente el efecto del SNP e inhibió por completo los efectos de las dosis más bajas del SNP. Estos hallazgos nos muestran que

la PGE2 funciona como un mediador de los efectos del NO y que es responsable, al menos en parte, de su capacidad para inhibir la proliferación de los condrocitos articulares humanos.



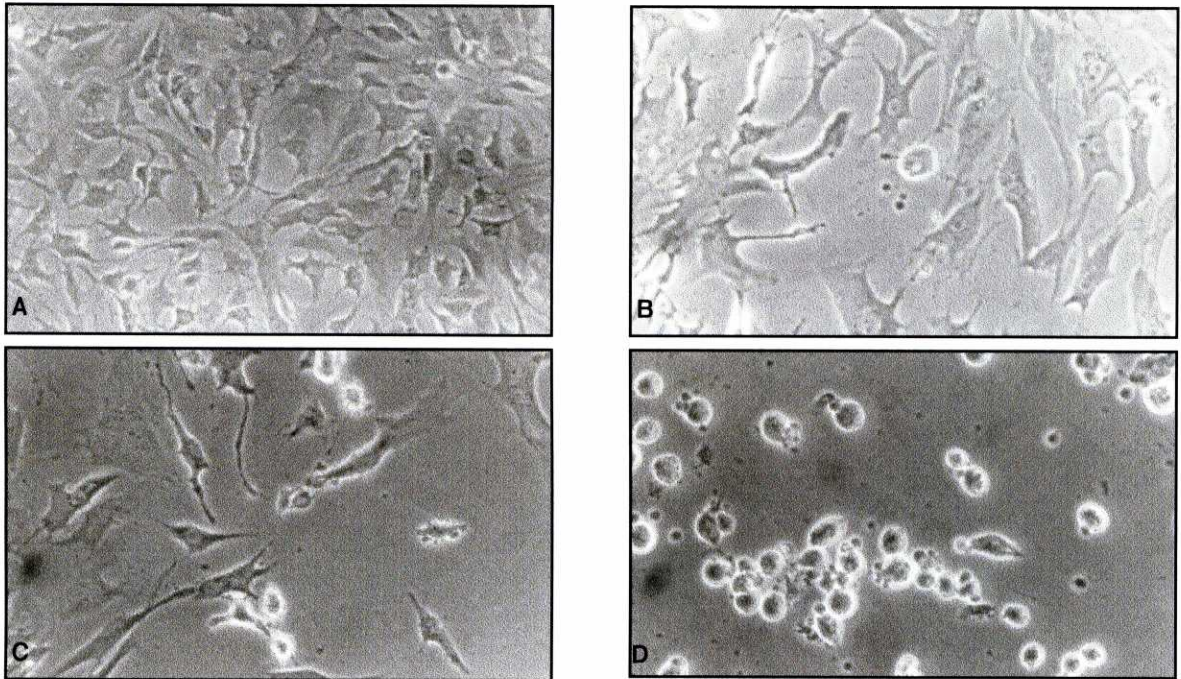
**Figura 5.** La acción de la indometacina sobre el efecto antiproliferativo del SNP. La proliferación de los condrocitos fue inducida con TGF $\beta$  (10ng/ml). Al iniciar el cultivo se añadieron SNP y la dosis indicada de indometacina y la proliferación fue determinada después de 4 días por la incorporación de 3H-timidina.

## II. EL OXIDO NITRICO Y LA VIABILIDAD DE LOS CONDROCITOS

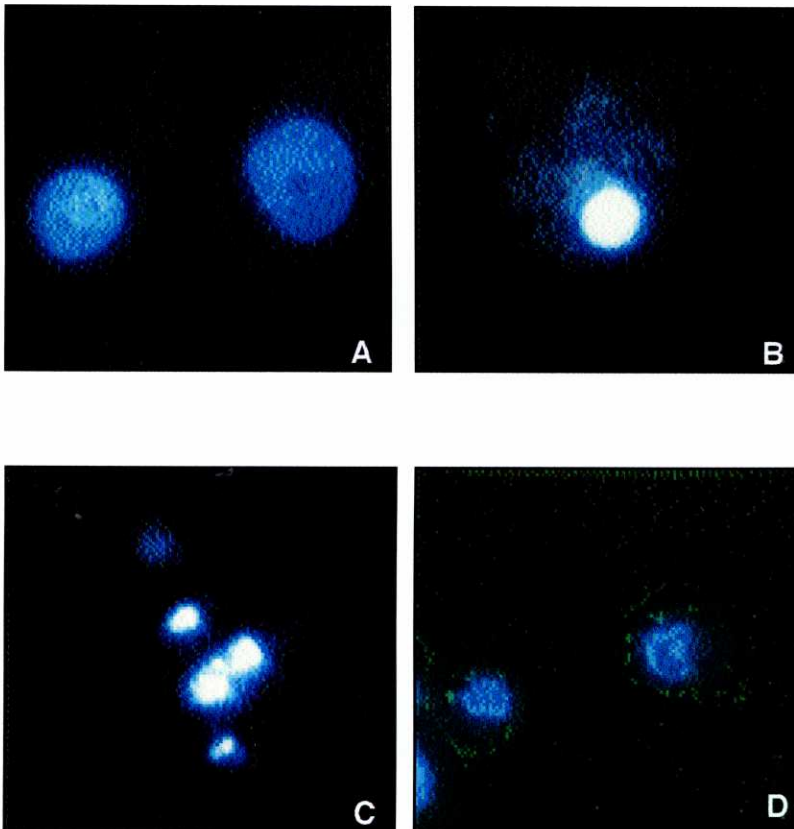
### 1. Los donantes de NO inducen apoptosis en los condrocitos, pero los radicales libres de oxígeno no.

Cuando se suministró NO como SNP, indujo muerte celular en condrocitos articulares humanos primarios o subcultivados. Al analizar por microscopía de luz los cultivos tratados con SNP, observamos que estos contenían células con pequeños cuerpos alrededor de los condrocitos o que surgían de las membranas celulares (*Figuras 1C, D*). Los condrocitos parecían más pequeños en volumen celular, mientras que las células, con el volumen aumentado característico de la necrosis, no fueron observadas excepto a muy altas concentraciones de SNP (>4mM). La tinción con DAPI de las células cultivadas mostró que el SNP y el SNAP inducen condensación y marginación del DNA (*Figura 2*). En un bajo porcentaje de células (<10%), este efecto se detectó al cabo de 6 horas, y afectó a la mayor parte (83% de las células) al cabo de 24 horas.

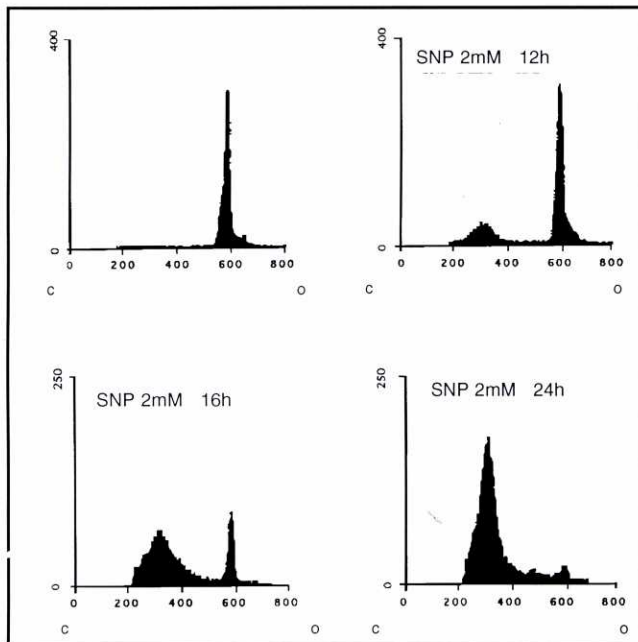
Para cuantificar estos cambios, teñimos las células con ioduro de propideo y las analizamos mediante citometría de flujo (*Figura 3*). El resultado fue que, en respuesta al tratamiento con SNP, se producía un progresivo descenso en el pico diploide y un incremento en el número de células hipoploides. La microscopía electrónica confirmó la formación de típicos cuerpos de apoptosis limitados por membrana citoplasmática (*Figura 4B, C*). Además, se detectaron cambios precoces en los nucleolos, cuya estructura iba desde los nucleolos pobremente organizados y con forma irregular hasta los nucleolos redondos, más pequeños y compactos (*Figura 4B*). Como referencia para la comparación con apoptosis, mostramos en la figura 4D una célula necrótica. Los efectos de SNP y el SNAP fueron similares en todos ellos, pero el tiempo necesario para producir dichos efectos fue diferente: con SNAP, los efectos alcanzaron su plenitud máxima a los 8 horas frente a las 16 horas requeridas por el SNP.



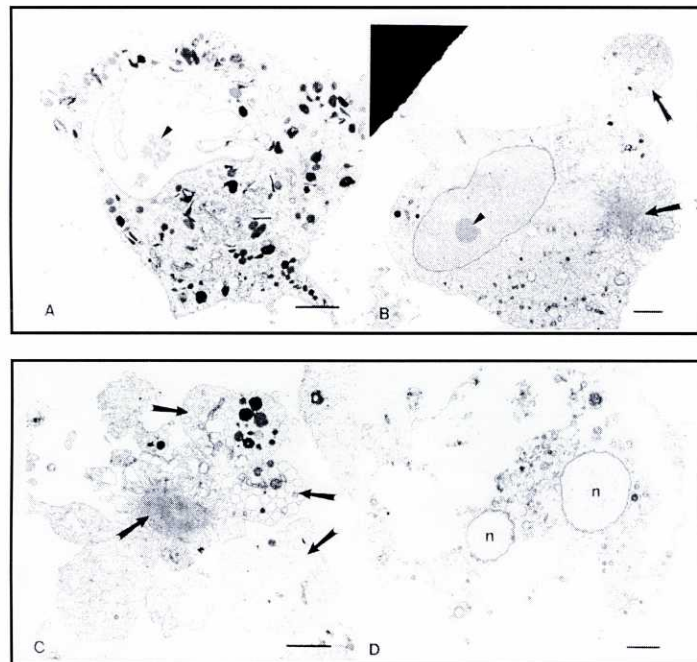
**Figura 1. Los donantes de NO (SNP y SNAP) inducen apoptosis en los condrocitos.** Los condrocitos (pase 1) fueron cultivados en cámaras de cultivo celular y tratados con nitroprusiato sódico (2 mM). Se analizaron por microscopía electrónica células sin tratar (Panel A) y células tratadas con SNP al cabo de 6 (Panel B), 10 (Panel C) y 18 horas (Panel D). Después de 6 horas, las células se reducen de tamaño y se despegan del fondo de la cámara de cultivo. A las 8 horas, algunas células muestran claros cambios citoplasmáticos y en la membrana. A las 18 horas, las células presentan completa fragmentación y algunas células presentan cierto grado de apoptosis.



**Figura 2. Fragmentación de DNA inducida por el SNAP.** La figura muestra la tinción con DAPI analizada por microscopía de fluorescencia (Paneles A-C) y por la combinación de fluorescencia y microscopía de luz (Panel D). **Panel A:** Células sin tratar (Control). **Panel B:** Células tratadas con SNAP (2 mM) durante 8 h. **Paneles C y D:** Células tratadas con SNAP (2 mM) durante 24 h.

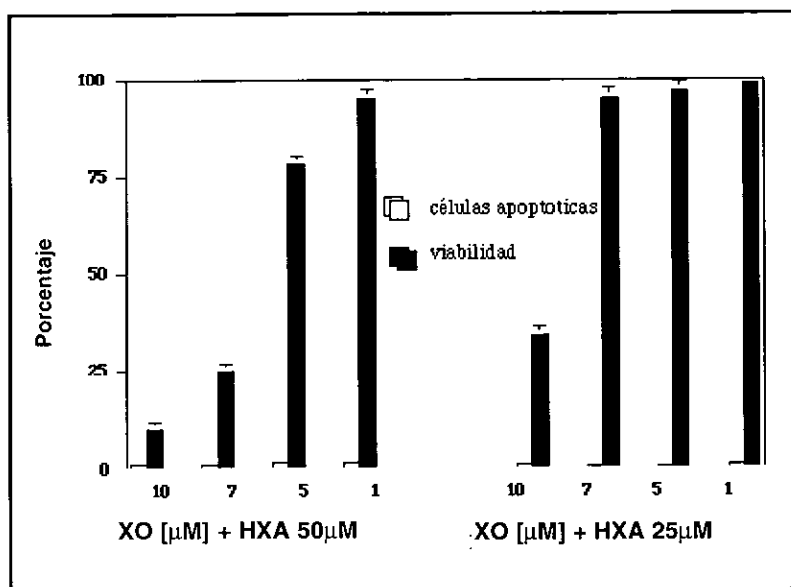


**Figura 3.** Efectos del SNP sobre los condrocitos analizados por citometría de flujo. Los condrocitos fueron cultivados en medio solo o tratados con SNP (2mM) durante 12, 16 y 24 horas y fueron teñidos con yoduro de propidio para ser analizados con la citometría de flujo. El panel A muestra el típico pico de ADN de los condrocitos diploides sin tratar. Los paneles B-D muestran un descenso progresivo en el pico diploide y un incremento en el número de células hipoploides.



**Figura 4.** Microscopía electrónica de los condrocitos en cultivo. A) Control; B) 2 mM SNAP durante 8 h; C y D) 2 mM SNP durante 16 h. A) Control, los condrocitos sin tratar aparecen caracterizados por un citoplasma elaborado con muchas organelas y un núcleo con nucleolo pobremente organizado. Barras igual a 2  $\mu$ m. B) Después de tratamiento con SNAP durante 8 horas, los nucleolos (flechas) están redondos y compactos, y se observan saliendo del citoplasma probables cuerpos apoptóticos (flechas). Es de notar la existencia de pocas organelas. Barra igual a 2  $\mu$ m. C) Después del tratamiento con 2 mM SNP durante 16 horas, muchas células se despegan del fondo de la botella de cultivo y se pueden observar varias clases de cuerpos apoptóticos delimitados (flechas), algunos de los cuales recuerdan a los vistos en el panel B. Barra igual a 2  $\mu$ m. D) Después del tratamiento con 2mM de SNP durante 16 horas, se puede observar una ocasional célula necrótica, con un núcleo tumefacto (n) y una pequeña cantidad de citoplasma con pocas organelas identificadas. Barra igual a 2  $\mu$ m.





**Figura 5.** Los efectos de los radicales de oxígeno en la viabilidad de los condrocitos y en la apoptosis. Los condrocitos fueron incubados en presencia de las concentraciones indicadas de xantina y xantina-oxidasa durante 24 horas. Se tiñeron las células con rojo de eritrocina para analizar la viabilidad y se utilizó DAPI para la detección de los cambios apoptóticos. Los resultados se muestran como la media del % + SEM.

Para saber si los condrocitos sufren cambios similares en respuesta a otros radicales, nosotros analizamos el efecto de la hipoxantina y xantina oxidasa. La exposición de los condrocitos al sistema hipoxantina-xantina oxidasa no indujo cambios apoptóticos perceptibles, pero sí detectó un descenso en cuanto a la viabilidad celular dependiente del tiempo y de la dosis (Figura 5).

En resumen, estos resultados indican que el NO generado por donantes exógenos puede inducir cambios morfológicos y fragmentación del ADN, característicos de la apoptosis. Por el contrario, los radicales de oxígeno no inducen cambios apoptóticos en los condrocitos.

## 2. La IL-1 y otros inductores de la síntesis endógena de NO no provocan la muerte celular de condrocitos.

Estudios previos han demostrado que en los condrocitos articulares humanos la estimulación con IL-1 da como resultado la producción de NO. Dado que el donante de NO SNP induce apoptosis en los condrocitos, nosotros

propusimos analizar si el NO producido endógenamente era capaz de inducir efectos similares. Los condrocitos fueron tratados con IL-1 (0.1 a 10 ng/ml) durante diferentes períodos de tiempo, pero la viabilidad celular no se vio significativamente reducida y no se observaron cambios apoptóticos cuando fueron analizados por microscopía de luz y con la tinción de DAPI (Tabla 1). Además, algunas combinaciones de inductores de NO como el TNF, IL-1, IFNg y LPS no indujeron apoptosis. A las 24 horas se recogió el sobrenadante de los pocillos de los mismos cultivos celulares para medir los niveles de NO. El resultado confirmó la existencia de la esperada inducción de altos niveles de la síntesis de NO endógeno por la IL-1 y por los demás estímulos (Tabla 1).

**Tabla 1:** La producción endógena de NO no se correlaciona con la muerte celular

Estímulos	nitritos	apoptosis	viabilidad
Medio	0.8	<1%	96%
IL-1(5ng/ml)	26.2	<1%	93%
TNF(10ng/ml)	18.4	<1%	91%
LPS (1µg/ml)	21.1	<1%	92%
IL-1+TNF+LPS	29.8	<1%	91%
SNP (2mmol/l)	42	80%	90%

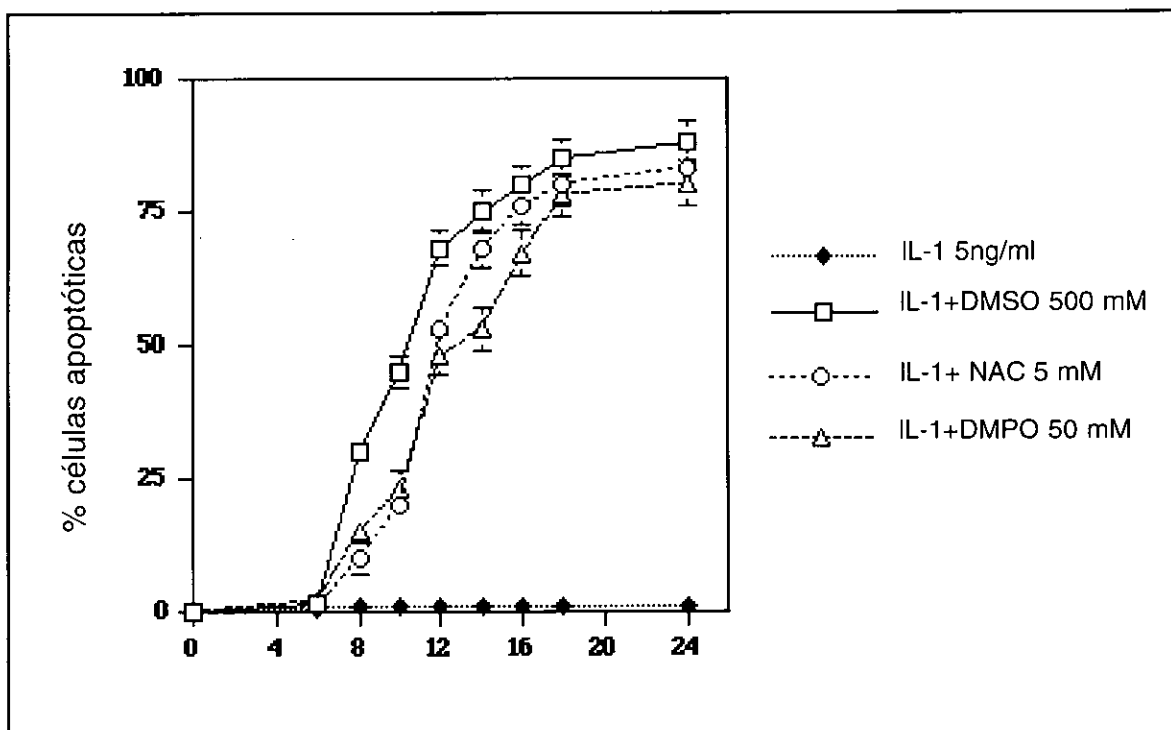
### 3. La interacción del NO y los radicales de oxígeno sobre la inducción de apoptosis en los condrocitos.

Los condrocitos estimulados con IL-1 también producen radicales de oxígeno, que pueden reaccionar con NO para formar peroxinitrito, así como reducir los niveles de NO biológicamente activo e inducir necrosis en otros sistemas celulares.

Nosotros ensayamos la combinación de IL-1 con quelantes de los radicales de oxígeno. La adición de DMSO, DMPO o NAC a los cultivos estimulados con IL-1 no redujo la viabilidad celular y, en ausencia de IL-1, estos

reactivos no indujeron cambios apoptóticos perceptibles. Sin embargo, la combinación de los quelantes de radicales y IL-1 causó un incremento en el número de células apoptóticas, variable según el tiempo y que alcanzó los máximos niveles al cabo de 20 horas (Figura 6).

En las concentraciones analizadas, los tres bloqueantes de los radicales no difieren entre sí ni en la cinética ni en la magnitud de sus efectos. La catalasa, pero no la superóxido dismutasa, ambas empleadas como bloqueantes fisiológicos, causaron similar inducción de la apoptosis en presencia de IL-1 (Figura 7).



**Figura 6.** La IL-1 induce la apoptosis en los condrocitos en presencia de bloqueantes de radicales de oxígeno (A) y catalasa (B). Los condrocitos fueron incubados con IL-1 y DMSO, NAC o DMPO y analizados por citometría de flujo para calcular el porcentaje de células apoptóticas. La comparación de los valores obtenidos con IL-1 sola versus la presencia de bloqueantes de radicales a las 6 y 8 horas  $p < 0.01$ ; en todos los otros tiempos  $p < 0.001$ .

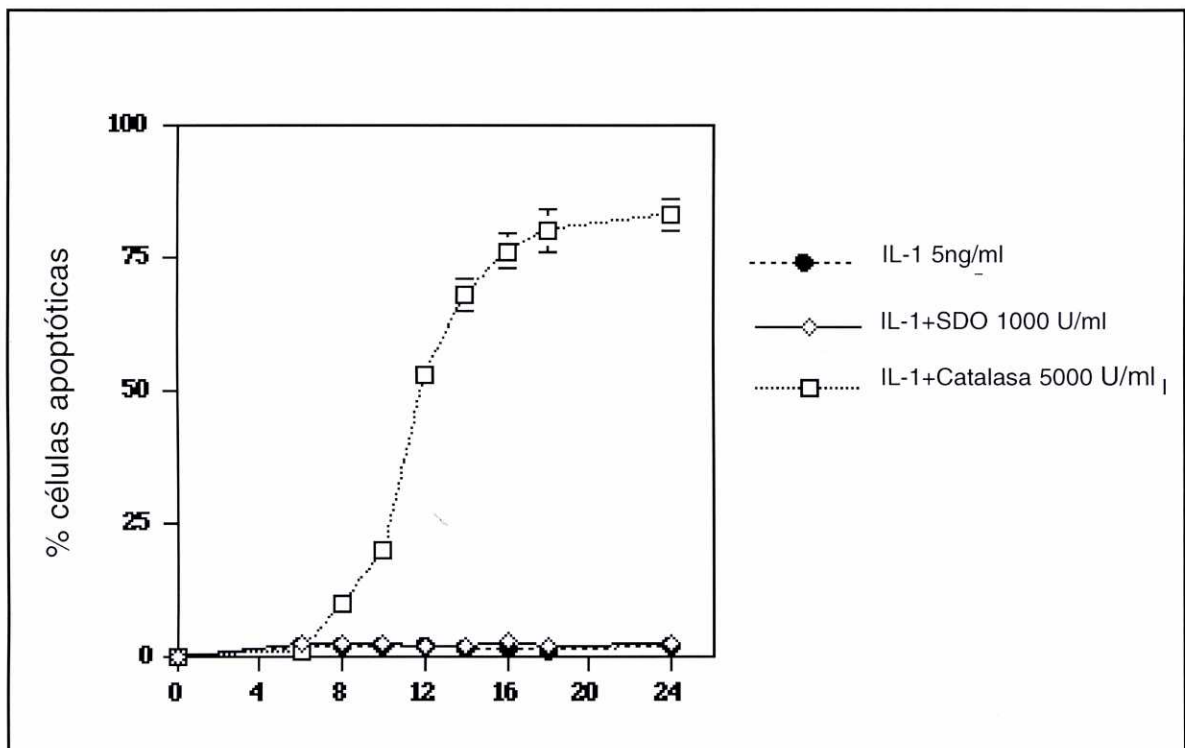


Figura 7. La IL-1 induce la apoptosis en los condrocitos en presencia de catalasa. Los condrocitos fueron incubados con IL-1, superoxidasa dismutasa y catalasa y analizados por citometría de flujo para calcular el porcentaje de células apoptóticas. La comparación de los valores obtenidos con IL-1 sola versus la presencia de bloqueantes de radicales a las 6 y 8 horas  $p < 0.01$ ; en todos los otros tiempos  $p < 0.001$ .

El análisis del ADN mostró el patrón *ladder* típico de la apoptosis causado por la fragmentación internucleosomal en los cultivos que fueron tratados con IL-1 y DMSO, pero no en respuesta a la IL-1 aplicada aisladamente (Figura 8).

#### 4. La apoptosis inducida por la IL-1 en presencia de los bloqueantes de los radicales de oxígeno depende de la síntesis de NO endógena.

Para examinar si el NO endógeno interviene en la apoptosis de los condrocitos inducida por la IL-1 en presencia de bloqueantes de radicales de oxígeno, nosotros añadimos el inhibidor de la NOS N-monometil L-arginina (NMA). Los resultados revelaron que el NMA reduce de forma dosis-dependiente la apoptosis inducida por la IL-1

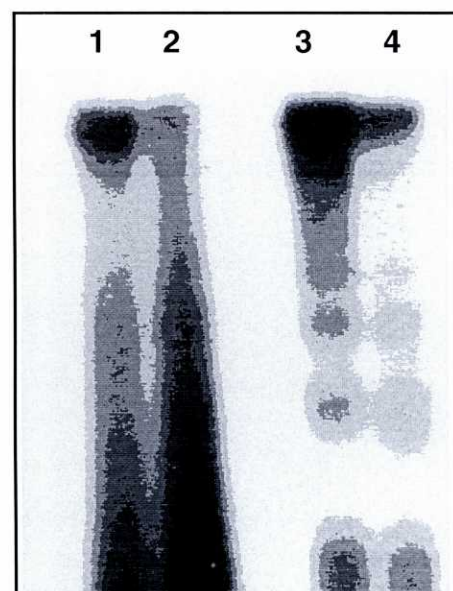
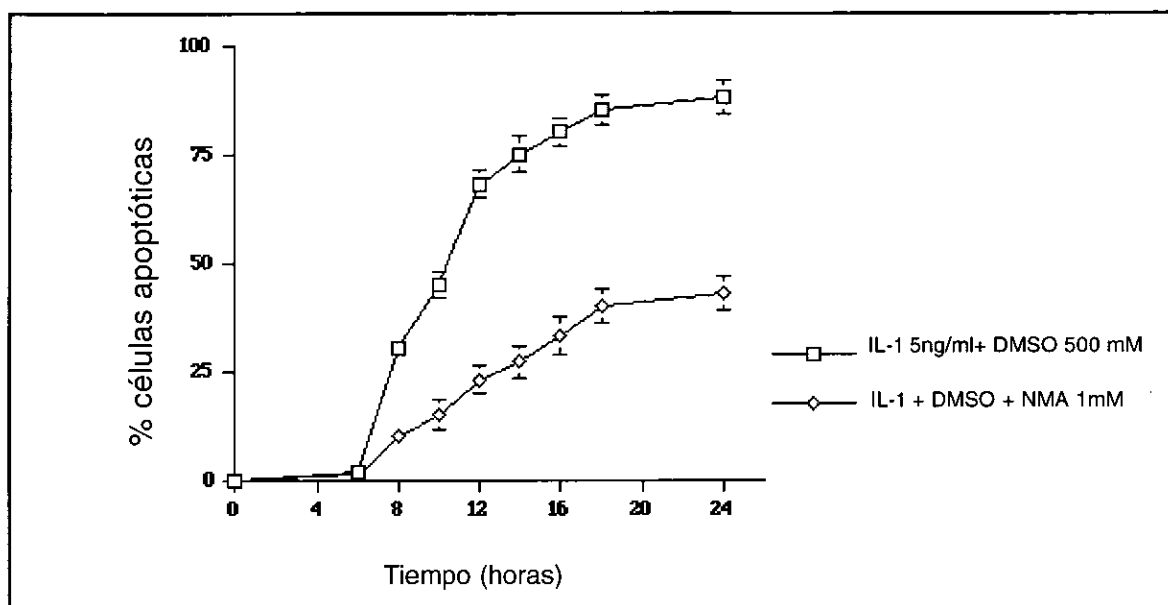


Figura 8. La apoptosis inducida por la IL-1 está asociada con la fragmentación internucleosomal del ADN. Los condrocitos fueron cultivados en medio solo (línea 1), IL-1 (línea 2), SNAP (línea 3) o la combinación de IL-1 y DMSO (línea 4). Las células fueron recogidas después de 12 horas para la extracción de ADN, el cual fue marcado y separado en gel de agarosa.



**Figura 9.** La apoptosis inducida por IL-1 en presencia de los bloqueantes de los radicales de oxígeno es dependiente de la síntesis endógena de NO. Los condrocitos fueron tratados con IL-1 (5 ng/ml) o DMSO (500 mM) en ausencia o presencia del inhibidor de la síntesis de óxido nítrico NMA (1mM). Las células fueron recogidas en los tiempos indicados y analizadas con citometría de flujo para calcular el porcentaje de células apoptóticas. La comparación de los valores obtenidos con IL-1 + DMSO versus IL-1 + DMSO + NMA a las 6 y 8 horas mostró diferencias  $p < 0.01$ ; para todos los otros tiempos  $p < 0.001$ .

(Figura 9) y que, con un dosis óptima de NMA (1mM), se produce un descenso significativo (48-66%) en el número de células apoptóticas. Esto quiere decir que, para que la IL-1 induzca apoptosis, es necesario el NO producido de forma endógena.

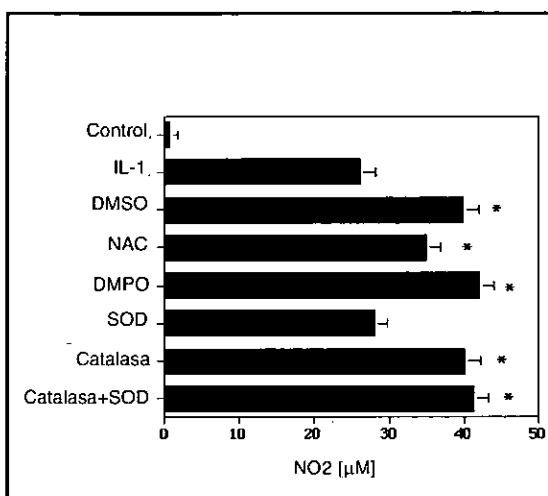
##### **5. Los radicales de oxígeno reducen la apoptosis inducida por el NO mediante la disminución de los niveles del NO biológicamente activo, y el NO protege a los condrocitos de la necrosis inducida por los radicales de oxígeno.**

Los siguientes experimentos están encaminados a estudiar los mecanismos que hacen posible que el superóxido reduzca la apoptosis inducida por el NO. Puesto que los condrocitos estimulados con IL-1 producen NO y radicales de oxígeno, cabía la posibilidad

de que las reacciones entre los diferentes radicales redujesen los niveles del NO biológicamente activo. Esta hipótesis se vio confirmada en nuestros experimentos, en los que la adición de DMSO, DMPO o NAC aumentó los niveles de nitritos en los cultivos de condrocitos estimulados con IL-1 (Figura 10). Estos resultados también revelan una correlación entre altos niveles de NO y la inducción de apoptosis en los condrocitos.

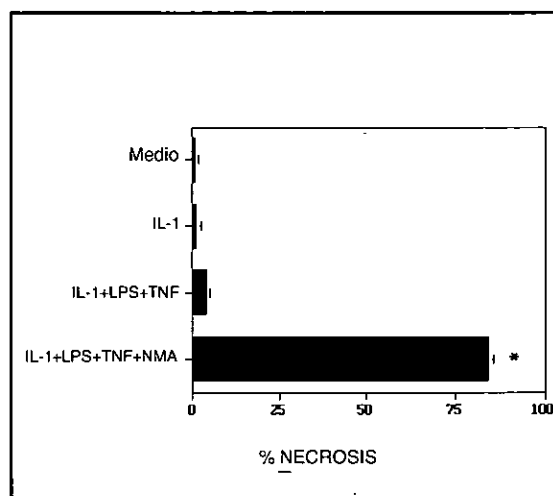
Los radicales de oxígeno generados por la hipoxantina-xantina oxidasa no indujeron cambios apoptóticos, pero causaron necrosis de forma dosis-dependiente. El hecho de que, tras estimular las células con IL-1 y con otros estímulos proinflamatorios, los radicales libres sintetizados endógenamente no estuviesen asociados con la necrosis de los condrocitos fue un hallazgo inesperado. La interacción de los dife-





**Figura 10.** La inhibición de los radicales de oxígeno incrementa los niveles de NO en los cultivos de condrocitos estimulados por IL-1. Los condrocitos fueron cultivados en presencia de IL-1 (5 ng/ml) o IL-1 + DMSO (200 nM), NAC (1 mM), DMPO (5 ng/ml), SOD (100 U/ml), catalasa (1000 U/ml) o ambos, SOD y catalasa. El medio fue recogido al cabo de 48 horas y se determinaron los niveles de nitritos. \* Indica  $p < 0.001$  en comparación con la IL-1.

rentes radicales en la regulación de la apoptosis de los condrocitos sugiere que mecanismos similares pueden gobernar la inducción de la necrosis. Para examinar esta hipótesis, nosotros estimulamos condrocitos con una combinación de IL-1, TNF y LPS, la cual no induce apoptosis ni necrosis. Sin



**Figura 11.** La inhibición de la síntesis del NO en presencia de mediadores pro-inflamatorios provoca necrosis de los condrocitos. Los condrocitos fueron estimulados con IL-1, TNF $\alpha$  y LPS en presencia y en ausencia de NMA. Se determinó la viabilidad celular mediante tinción del rojo de eritrosina.

\* Indica  $p < 0.001$  en comparación con la media.

embargo, cuando la producción de altos niveles de NO en estos cultivos fue inhibida por NMA, había inducción de necrosis (Figura 11).

### III. EL ÓXIDO NÍTRICO Y EL ENVEJECIMIENTO DE LOS CONDROCITOS

#### 1. Variaciones en los efectos de regulación del crecimiento que tienen la IL-1 $\beta$ y el TGF $\beta$ sobre los condrocitos en cultivo.

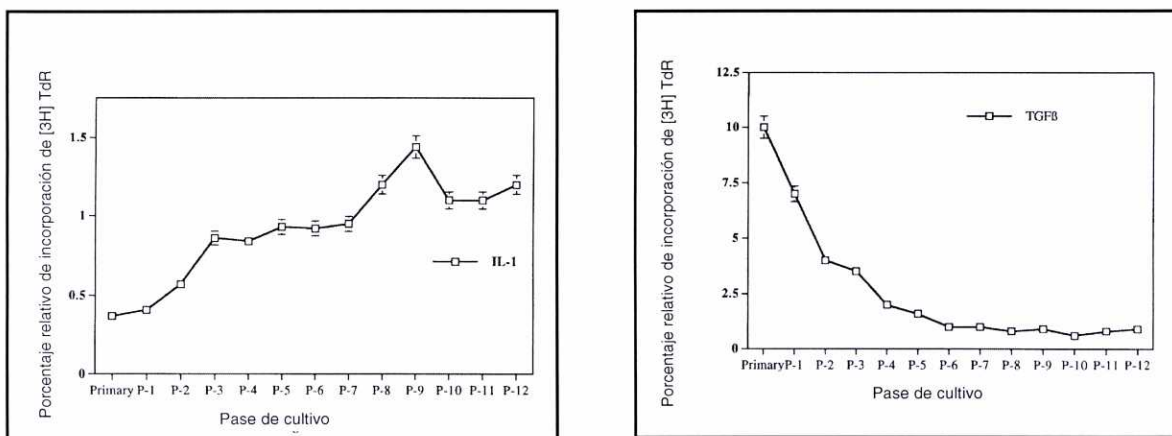
Para analizar la respuesta proliferativa al TGF $\beta$  se examinaron células primarias de condrocitos articulares humanos procedentes de donantes sanos, así como las mismas células sometidas a varios subcultivos *in vitro* (entre 1 y 12 pases). Durante los subcultivos, disminuyó el efecto estimulativo de TGF $\beta$  sobre la proliferación. Después del pase 6, tal efecto había desaparecido (*Figura 1A*); en las células sometidas a los últimos pases, el efecto del factor de crecimiento llegó a ser incluso inhibidor. Por el contrario, la respuesta de los condrocitos a la citoquina IL-1 $\beta$  mostró un patrón inverso: en células primarias y en las sometidas únicamente a los primeros subcultivos, la IL-1 $\beta$  inhibió la proliferación inducida por el suero y por el TGF $\beta$ . El efecto anti-proliferativo de la

IL-1 $\beta$  decreció durante los subcultivos sucesivos y, después del pase 6, la IL-1 $\beta$  llegó a tener un efecto estimulativo sobre el crecimiento de los condrocitos (*Figura 1B*).

#### 2. Interacción de la IL-1 $\beta$ y la TGF $\beta$ sobre la regulación de la expresión de iNOS y la producción de NO por condrocitos primarios.

La IL-1 $\beta$  es un conocido inductor de la producción de NO, mientras que el TGF $\beta$  por si solo no induce la síntesis de NO en los condrocitos primarios. En otros tipos celulares, TGF $\beta$  inhibe la producción de NO inducida por el LPS o el IFN- $\gamma$ , a través de un mecanismo postranscripcional.

No existe información acerca de la acción de la IL-1 y el TGF $\beta$  sobre la regulación de la síntesis de NO por los condrocitos primarios. En condrocitos primarios procedentes de seis donantes diferentes no se detectó ningún

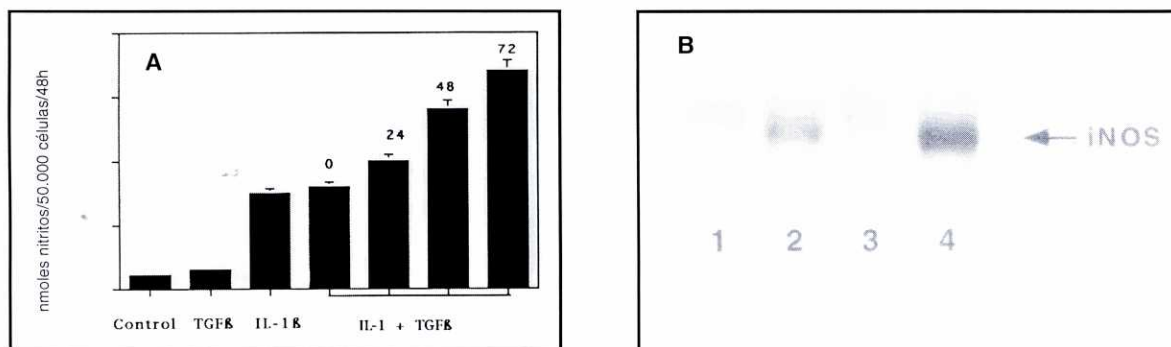


**Figura 1.** Cambios en el efecto regulador del crecimiento celular inducido por el TGF $\beta$  y la IL-1 durante el subcultivo de los condrocitos. Condrocitos procedentes de un mismo donante fueron subcultivados durante 12 pases. En cada pase las células se utilizaron para realizar estudios de proliferación con 5% de FBS y 10 ng/ml de TGF $\beta$ 1 (A) o 1 ng/ml de IL-1 $\beta$  (B), que fue añadido en el momento mismo de iniciarse el cultivo. Los resultados se muestran como la media de cpm de 6 experimentos realizados independientemente y por triplicado.

efecto del TGF $\beta$  en la liberación de NO. En diferentes concentraciones de IL-1 $\beta$  y TGF $\beta$  añadidos conjuntamente, comprobamos que los niveles de NO medidos al cabo de 48 horas no variaban de los inducidos por la acción aislada de la IL-1 $\beta$  (Figura 2A). Esta respuesta difiere del efecto de la TGF $\beta$  en otros tipos de células. Sin embargo, la preincubación de los condrocitos con TGF $\beta$  produjo una elevación tiempo-dependiente de los niveles de NO inducidos por la estimulación de la IL-1 $\beta$ .

El efecto del TGF $\beta$  en la producción de NO en esta ocasión también varía con respecto al de las células mesangiales o el de las células musculares lisas.

Al contrario de lo que sucede en condrocitos de conejo, en los condrocitos articulares humanos la estimulación, e incluso el pretratamiento con el TGF $\beta$ , no disminuye la síntesis de IL-1R, ya que las células todavía responden a IL-1 $\beta$ . El análisis de la expresión del gen iNOS (mRNA iNOS) en

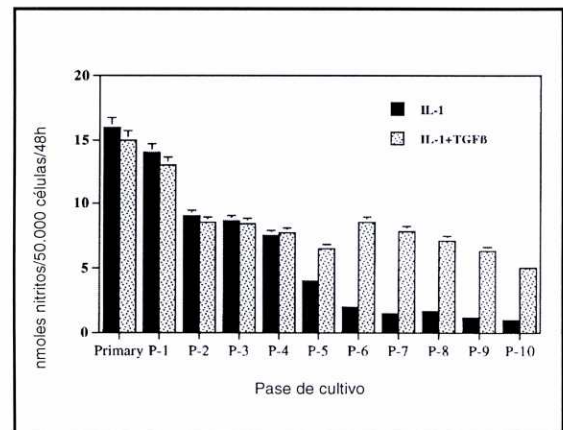


**Figura 2.** Interacciones de IL-1 y TGF $\beta$  en la regulación de la expresión de iNOS y la producción de NO por condrocitos primarios. A: Condrocitos primarios fueron estimulados con IL-1 (1 ng/ml) o TGF $\beta$  (10 ng/ml). Las células fueron preincubadas en medio y luego estimuladas con IL-1 o TGF $\beta$ . Las células fueron también preincubadas durante 24 ó 72 horas y luego estimuladas con IL-1 durante 48 h. B: Northern blot de iNOS RNAm. Línea 1: Condrocitos primarios sin estimular. Línea 2: Estimulación con IL-1 durante 4 horas. Línea 3: Estimulación con TGF $\beta$  durante 48 horas. Línea 4: Preincubación con TGF $\beta$  durante 48 horas seguido de IL-1 durante 4 horas.

cinco experimentos realizados independientemente no muestra efecto alguno del TGF $\beta$  por sí solo. Cuando los condrocitos fueron pre-incubados con TGF $\beta$  durante 48 horas, se detectó sin embargo un incremento en la expresión de iNOS mRNA cuando se utilizaron la IL-1 $\beta$  y el TGF $\beta$  de forma simultánea (*Figura 2B*). Estos resultados demuestran un patrón único en la regulación de iNOS por la IL-1 $\beta$  y TGF $\beta$ .

### 3. La regulación de la producción de NO por la IL-1 $\beta$ y el TGF $\beta$ muestra cambios similares a los efectos de estas citoquinas sobre la síntesis de ADN en los condrocitos.

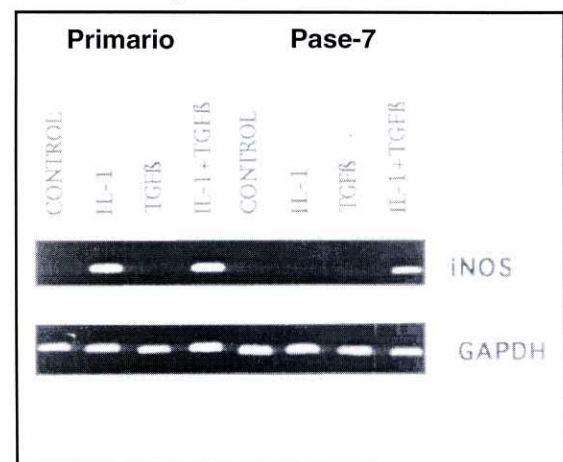
Durante los subcultivos de los condrocitos se producen ciertos cambios morfológicos y funcionales característicos de las células fibroblásticas. Por este motivo, nosotros examinamos la regulación de la expresión de iNOS por la IL-1 $\beta$  y el TGF $\beta$  durante el subcultivo de los condrocitos, para determinar si la variación de los efectos reguladores del crecimiento de IL-1 $\beta$  y TGF $\beta$  está asociada a los cambios en la expresión de iNOS. Al aumentar el número de pases, disminuyen los niveles de NO inducidos por IL-1 $\beta$ , y después del pase número 6 ya no se detecta el efecto de la IL-1 (*Figura 3*). Cuando las células procedentes de diferentes pases fueron coestimuladas con IL-1 $\beta$  y TGF $\beta$ , se constató un incremento sinérgico en los niveles de NO después del pase 5. Esto coincide con la fase en la que la inducción de NO por la IL-1 se hace indetectable. La capacidad de TGF $\beta$  para aumentar la producción de NO durante la co-incubación con IL-1 se



*Figura 3. Regulación de la producción de NO por la IL1 y el TGF $\beta$  durante el cultivo de condrocitos. Se muestran los resultados como la media de los niveles de nitritos en nmoles/100.000 células/48 horas en 8 experimentos.*

puso de manifiesto entre los pases 5 a 6 (*Figura 3*), el mismo período de cultivo en el que la estimulación de la proliferación decrece (*Figura 1A*).

Estos efectos del TGF $\beta$  y la IL-1 $\beta$  sobre la producción de NO durante los diferentes pases están relacionados con los niveles de iNOS mRNA. La *Figura 4* muestra un análisis comparativo de las células primarias y los condrocitos en el pase 7. El hallazgo más importante es el sinergismo entre IL-1 $\beta$  y TGF $\beta$  en la inducción del gen de iNOS en el pase 7.



*Figura 4. RT-PCR iNOS. Regulación de iNOS mRNA por la IL-1 y el TGF $\beta$  durante el cultivo de condrocitos.*

#### 4. Los efectos antiproliferativos del TGF $\beta$ en los pases tardíos son suprimidos por el inhibidor de NOS NMA.

Los resultados presentados hasta ahora muestran que el TGF $\beta$  pierde su efecto estimulativo del crecimiento y llega a ser un inhibidor del mismo durante el subcultivo de los condrocitos, y que existe una correlación entre la síntesis de NO y el efecto proliferativo de la TGF $\beta$ . Para determinar si los cambios de los condrocitos en la respuesta proliferativa del TGF $\beta$  están asociados a la producción del NO, analizamos la proliferación celular desde el pase 2 hasta el 10. Las células fueron estimuladas con 10 mg/ml de TGF $\beta$ 1 en presencia del inhibidor de NOS, NMA (1mM). Los resultados muestran que, en los pases iniciales, en los que el TGF $\beta$  estimula la proliferación de los condrocitos, el NMA no tiene efecto

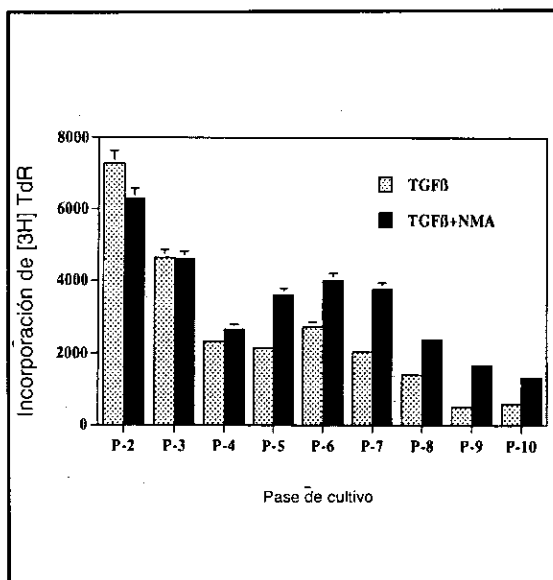
sobre la incorporación de timidina al ADN. Sin embargo, cuando el TGF $\beta$  pierde su poder estimulativo y empieza a inhibir la proliferación de los condrocitos (entre los pases 4 a 6), el NMA aumenta la proliferación de los condrocitos (*Figura 5*).

#### 5. Expresión del Colágeno tipo I y II en los condrocitos primarios y subcultivados.

Uno de los indicadores de diferenciación de los condrocitos más utilizado es el que hace referencia a la expresión del colágeno tipo II.

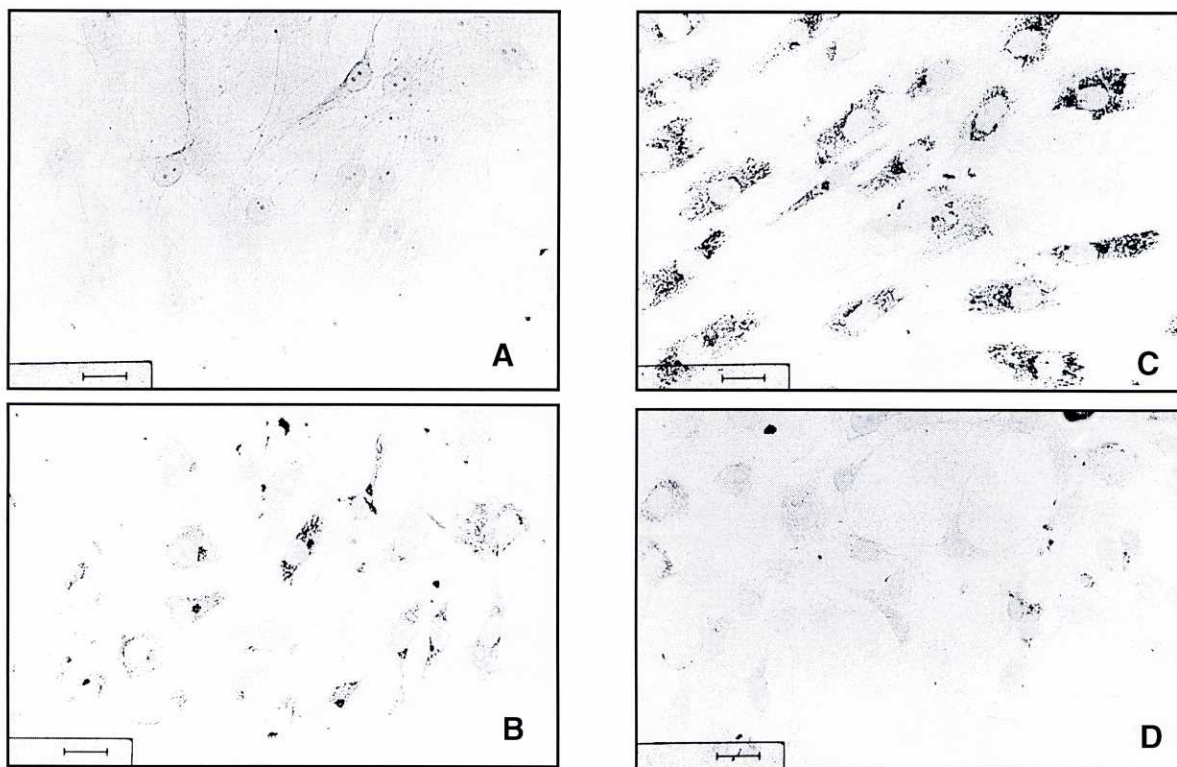
Las condiciones específicas en que las células pierden la expresión del colágeno tipo II varía según determinados factores, tales como la especie del donante de los condrocitos, su edad o las condiciones en las que se realiza el cultivo. Nosotros analizamos la expresión del colágeno tipo I y II por inmunohistoquímica en el sistema de cultivo celular usado para los estudios de los efectos de IL-1 y TGF $\beta$  en la producción de NO y en la proliferación.

La Figura 6 muestra una comparación entre células primarias en cultivo y células en el pase 10. Cuando fueron analizadas las células en cada uno de los pases y se cuantificó mediante inmunohistoquímica el número de ellas que eran positivas, se detectó un descenso gradual en el colágeno tipo II expresado por las células (*tabla 1*). Aún más, los cambios en la expresión fenotípica de colágeno se produjeron durante la misma fase del cultivo en la que se produjo la variación en el efecto del TGF $\beta$  y la IL-1 sobre la producción de NO y la proliferación.



**Figura 5.** El efecto antiproliferativo de la TGF $\beta$  en los últimos pases es bloqueado por el inhibidor de la NOS, NMA. Los condrocitos de los pases 2 al 10 fueron usados para los estudios de proliferación y estimulados con 10 ng/ml de TGF $\beta$  en presencia de NMA (1mM).





**Figura 6.** La expresión del colágeno tipo I y II en condrocitos primarios y subcultivados. Condrocitos primarios (A y B) y condrocitos en el pase 10 (C y D) fueron puestos en slides para cultivo y teñidos con anticuerpos específicos para colágeno humano tipo I (A y C) y tipo II (B y D).

**Tabla 1: Expresión de colágeno durante el subcultivo de condrocitos (%)**

	1º	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
Tipo I	0	0	12	20	25	45	62	74	80	83	90
Tipo II	84	80	77	72	60	35	25	21	20	18	15

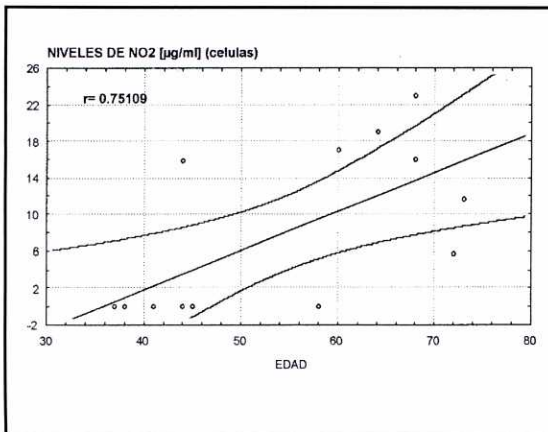
## 6. Los niveles de NO sintetizado por los condrocitos aumentan con la edad del donante.

Hasta ahora los resultados obtenidos demuestran que, en un modelo de envejecimiento *in vitro*, los condrocitos articulares humanos incrementan su capacidad para sintetizar NO. Los siguientes estudios tienen como fin estudiar si este mismo fenómeno tiene lugar *in vivo*.

Para ello, comenzamos aislando condrocitos de cartílagos procedentes

de donantes sanos de diferentes edades. Estos condrocitos se cultivaron y se midió la producción espontánea de NO *ex vivo*.

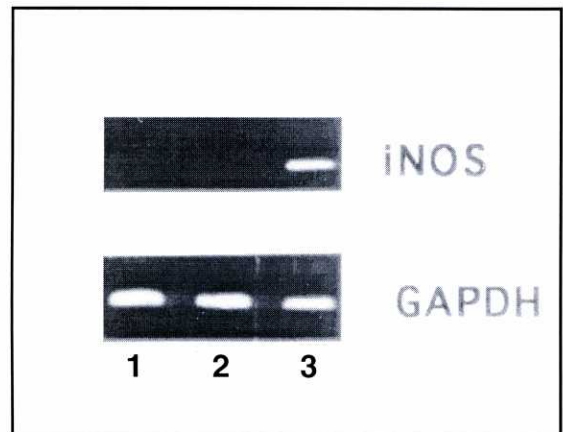
Los resultados de estos experimentos muestran cómo la capacidad de sintetizar NO es prácticamente nula en el caso de los condrocitos articulares humanos de donantes menores de 60 años. Por el contrario, todos los condrocitos procedentes de pacientes mayores de 60 años producen importantes cantidades de NO de forma espontánea e *in vitro* (Figura 7).



**Figura 7.** Niveles de nitritos liberados por los condrocitos articulares. Se cultivaron células procedentes de donantes sanos de diferentes edades (50.000/pocillo) y el sobrenadante fue recogido 48 horas después. Los niveles de nitritos fueron calculados utilizando la reacción de Griess.

## 7. La expresión de iNOS en los condrocitos de diferentes donantes.

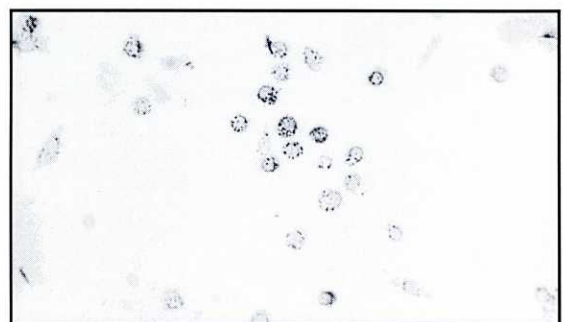
Una vez demostrada la capacidad de sintetizar NO, el siguiente paso fue analizar la expresión del gen y de la enzima iNOS en las células de donantes de diferentes edades. El estudio por PCR y por histoquímica demuestra que la presencia del gen y de la proteína es superior en los donantes de edades avanzadas (*Figuras 8 y 9*).



**Figura 9.** RT-PCR de iNOS. Dos donantes de edad < 40 años (Líneas 1 y 2) y un donante de 82 años (Línea 3).

## 8. El número de condrocitos apoptóticos aumenta con la edad del donante.

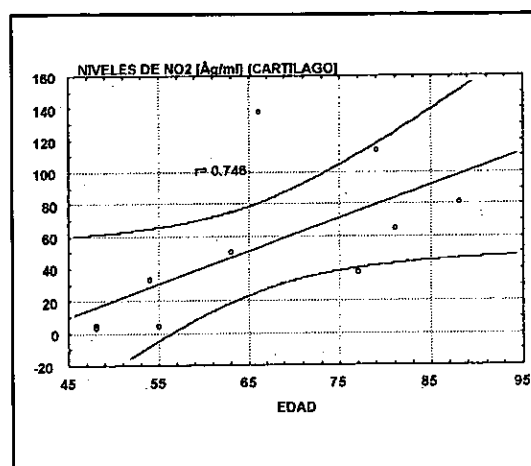
En experimentos anteriores, demostramos que el NO es capaz de inducir apoptosis en los condrocitos cultivados. Sabiendo que la liberación de NO aumenta con el envejecimiento, pensamos que la hipocelularidad del cartílago articular que se produce durante el envejecimiento podría explicarse por una mayor incidencia de



**Figura 8.** Inmunohistoquímica de la iNOS en condrocitos articulares humanos de un donante de 35 años (Panel A) y de donante de 82 años (Panel B). Las células fueron aisladas y cultivadas en slides de cultivo. Posteriormente fueron fijadas con acetona durante 15 minutos a temperatura ambiente y teñidas para detectar la enzima iNOS. En el donante joven no se pudo detectar la expresión de la enzima. Sin embargo, en los condrocitos procedentes del donante de 82 años se pudo objetivar la presencia de la proteína en algunas células.

apoptosis, quizás inducida por el NO. Con el fin de estudiar esta posibilidad, realizamos citometría de flujo para cuantificar el número de células apoptóticas procedentes de 11 cartílagos de donantes de diversas edades.

En los donantes menores de 50 años, el porcentaje de apoptosis fue menor del 10%. Los pacientes con edades comprendidas entre 70 y 90 años mostraron valores que oscilaron entre el 15 y el 25%. El estudio estadístico de regresión lineal reflejó una correlación con una  $r=0.7814$ . (Figura 10).



**Figura 10.** La apoptosis en los condrocitos articulares aumenta con la edad del donante. Se aislaron células procedentes de cartílagos de donantes sanos de diferentes edades y se procesaron para cuantificar la apoptosis por FACS.



## **VI. DISCUSIÓN**

El cartílago articular muestra una reducción importante en la celularidad con el envejecimiento [3, 4, 36, 41, 42], lo que se presenta como una posible causa para el desarrollo de la OA, la enfermedad relacionada con la edad más común en los humanos. El origen de este cambio celular relacionado con el envejecimiento es desconocido. Durante el desarrollo del cartílago, los condrocitos sufren una serie de fenómenos que incluyen proliferación, hipertrofia y muerte celular. Partiendo de esto, la hipocelularidad del cartílago puede deberse, entre otras causas, a un defecto en la proliferación de los condrocitos o a un exceso de la muerte celular.

Se han identificado factores reguladores diferentes como posibles inductores de distintas funciones en los condrocitos articulares humanos [28]. La IL-1 es una de las citoquinas más potentes que estimulan la degradación del cartílago articular [30-33]. Entre

sus efectos catabólicos están la estimulación de la síntesis de las enzimas metaloproteinasas, la producción de otras citoquinas y la inhibición de la producción de la matriz extracelular. En los condrocitos articulares humanos, la IL-1 posee un efecto inhibitorio de la proliferación. Todos los factores (incluyendo la IL-1, el TNF, el LIF y el LPS) con capacidad para inducir una respuesta catabólica y proinflamatoria estimulan la síntesis del NO [15-17]. Por el contrario, el TGF $\beta$ , uno de los factores que estimulan el crecimiento de los condrocitos y que ayuda a la formación de la matriz extracelular, no induce la síntesis de niveles apreciables de NO [16, 17].

El primer grupo de objetivos de nuestro estudio (objetivos 1 y 2) tuvo como finalidad analizar los mecanismos del efecto inhibitorio de la proliferación de los condrocitos inducida por la IL-1 y, más específicamente, el papel del NO. Los resultados que obtuvimos

demonstraron que el NO exógeno (el SNP), en bajas concentraciones, inhibe la proliferación de los condrocitos inducida por el TGF $\beta$  o el suero. Además del NO liberado por los donantes químicos, el NO inducido por la estimulación de la IL-1 inhibió también la proliferación celular y fue, al menos en parte, responsable de los efectos inhibidores del crecimiento que posee la IL-1. El NO inhibe la proliferación de los linfocitos, de las células mesenquimales, de las células del músculo liso, de los fibroblastos y de los queratinocitos [14, 87].

Estos efectos antiproliferativos pueden ser observados con los donantes de NO exógeno y, en algunos de estos sistemas celulares, el NO es responsable de la inhibición del crecimiento inducida por determinadas citoquinas o por otros agentes. De modo opuesto, los factores que estimulan la proliferación de un cierto tipo de célula a menudo inhiben la formación del NO [128].

En el condrocito articular humano, ninguno de los factores que pueden incrementar la proliferación celular estimulan la producción del NO [16]. Sin embargo, la IL-1 es tanto un potente inductor del NO [13, 15] como un inhibidor de la proliferación de los condrocitos [45]. Basándonos en los resultados obtenidos con el inhibidor de la enzima NOS, el NMMA, nosotros podemos afirmar que los efectos de la IL-1 sobre la proliferación de los condrocitos articulares humanos son mediados por el NO. En aquellos casos en que la IL-1 y el NO (liberado por el SNP o producido por condrocitos en respuesta a la IL-1) inhibieron la proli-

feración de los condrocitos articulares humanos, no se produjo una inducción aparente de muerte celular. Este hecho parece indicar que la inhibición de la proliferación de los condrocitos mediada por el NO puede deberse al efecto celular reversible.

Por otra parte, los resultados de nuestras investigaciones demuestran que el NO estimula también la producción de la PGE<sub>2</sub> en los condrocitos, pero la PGE<sub>2</sub> inducida por la IL-1 no tiene ningún efecto sobre la síntesis de NO. Finalmente, la PGE<sub>2</sub> es un mediador de los efectos inhibidores del crecimiento que tiene la IL-1. Algunos estudios previos parecen indicar que los efectos antiproliferativos de la IL-1 pueden estar mediados por la inducción de la PGE<sub>2</sub> [18].

En la investigación sobre las posibles interacciones entre la PGE<sub>2</sub> y el NO, nos detuvimos a analizar si la PGE<sub>2</sub> era capaz de inducir la síntesis de NO. Utilizamos distintas aproximaciones experimentales que colectivamente sugieren que la PGE<sub>2</sub> no induce la síntesis del NO y que no es necesaria para la inducción del NO o del RNAm de iNOS estimulada por la IL-1. Sin embargo, el NO sí es capaz de inducir la síntesis de la PGE<sub>2</sub>, probablemente debido a su capacidad de activar la isoforma inducible de la enzima ciclooxigenasa (COX-2) [129]. En ausencia de otros estímulos, el SNP provocó la liberación de niveles muy altos de la PGE<sub>2</sub> en los condrocitos articulares humanos. El inhibidor de la enzima iNOS, el NMA, redujo los niveles de la PGE<sub>2</sub> estimulados por la IL-1, lo que parece indicar que el NO es, al menos en parte, un mediador de la inducción de la síntesis de PGE<sub>2</sub> origi-

nada por la IL-1. Esta observación coincide con la demostración de que el SNP puede activar la enzima ciclooxigenasa cuando reacciona con la proteína purificada [130]. El descubrimiento de que el NO es capaz de inducir la producción de la PGE<sub>2</sub> no sólo es importante para comprender cómo estas citoquinas inhiben la proliferación de los condrocitos, sino que además resulta revelador para entender otra serie de acciones pro-inflamatorias mediadas por la PGE<sub>2</sub>, que van desde la inducción del dolor en las articulaciones, hasta el incremento de la proteína de ligamiento AP-1 del ADN.

Además de los efectos inhibidores del crecimiento celular, el NO es capaz de inducir citotoxicidad [76]. El NO es un mediador de citotoxicidad inducida por los monocitos o citoquinas, tales como el IFN- $\gamma$ , la IL-2, el TNF- $\alpha$  o el LPS [88, 89, 92]. En el sistema nervioso central, el NO mediatiza la neurotoxicidad del glutamato a través de la formación del cGMP [72, 70, 88, 90]. La toxicidad de la IL-1 para las células no endocrinas de los islotes pancreáticos se debe a que es ella quien induce la síntesis y la liberación del NO, que resulta altamente tóxico para estas células [91].

Dado que el NO posee la capacidad de inducir muerte celular, el segundo grupo de objetivos de nuestro trabajo tuvo como fin estudiar el posible efecto del NO como inductor de muerte en los condrocitos articulares humanos. El presente trabajo supone el primer análisis de los mecanismos de muerte celular que pueden ser inducidos en los condrocitos articulares humanos.

Demostramos que los condrocitos pueden sufrir muerte celular, cambios morfológicos y ultraestructurales, así como la fragmentación del ADN característica de la apoptosis. El análisis de los estímulos extracelulares reveló que ninguno, de entre un amplio espectro de factores reguladores de los condrocitos, induce apoptosis. La IL-1 $\beta$ , el TNF, el LPS, el IFN- $\gamma$ , y las combinaciones de estas citoquinas, que estimulan la expresión de mediadores pro-inflamatorios y de metaloproteinasas, no indujeron la aparición de apoptosis ni de necrosis. Sin embargo, el NO fue capaz de inducir apoptosis en los condrocitos. Los radicales de oxígeno, por el contrario, no provocaron la aparición de la apoptosis, sino que imposibilitaron que el NO producido endógenamente provocase apoptosis. A raíz de nuestras investigaciones, hemos observado que la capacidad del NO para inducir citotoxicidad depende de la concentración.

Son varios los mecanismos que pueden justificar los efectos inhibidores y citotóxicos del NO. El NO puede inhibir la síntesis de las proteínas y limitar la respiración mitocondrial [131]. En los macrófagos de murinos que producen óxido nítrico, la actividad de la enzima iNOS está inversamente relacionada con la esperanza de vida, y la apoptosis inducida por el LPS y el INF- $\gamma$  en estas células depende del óxido nítrico [132, 133].

Partiendo de la base de que un posible mecanismo para la inducción de muerte celular por el NO, en este y otros tipos de células, es la inhibición de la enzima aconitasa, se ha sugerido que el ciclo del ácido tricarbóxico

pueda desempeñar un papel importante en este tipo de muerte. Este mecanismo interfiere en el ciclo oxidativo y de la respiración, hecho que viene a ratificar la idea de que el óxido nítrico induce apoptosis en las condiciones de falta de glucosa que pueden tener lugar en el medio intraarticular durante la inflamación de las articulaciones. El líquido sinovial, en particular el de los pacientes con artritis reumatoide (AR), se caracteriza por un reducido  $pO_2$  y pH, pero muestra un  $pCO_2$  incrementado, lo que parece indicar un cambio del metabolismo local aeróbico a metabolismo anaeróbico glicolítico [134].

Un objetivo molecular adicional para la acción citoestática del NO puede ser la reductasa ribonucleótida, una enzima que limita el ritmo de la síntesis del ADN. Tanto el NO en gas, como el NO generado por lisados de macrófagos activados, inhiben la reductasa ribonucleótida [81, 93].

Por otra parte, el superóxido y el NO pueden combinarse para formar un anión de peroxinitrito. El peroxinitrito inicia la peroxidación de los lípidos, lo que representa un mecanismo potencial que contribuye a la citotoxicidad mediada por los superóxidos y por el NO [135]. El peroxinitrito también puede ejercer efectos citopáticos oxidando los radicales sulfidrilos de los tejidos [136]. El NO estimula la monorribosilación del ADP de la enzima glicolítico gliceralhído-3-fosfato dehidrogenasa, provocando una pérdida de la actividad enzimática. Esto es un efecto citotóxico del NO, susceptible de convertirse en un mecanismo relevante de citotoxicidad en aquellos

casos en los que actúa de forma complementaria con otras acciones inhibitorias sobre las enzimas que contienen radicales de hierro/azufre, como son la acotinasa y las proteínas del transporte de electrones de la cadena respiratoria [79]. Los grupos N-terminal de algunas proteínas pueden ser modificados por el NO, quizás por la deaminación [137]. El óxido nítrico puede también producir alteraciones genómicas. *In vitro*, el NO deamina los deoxinucleótidos y el ADN intacto, provocando la rotura de las cadenas de ADN [138].

En las células del insulinooma de la rata, la combinación de IL-1, TNF y IFN- $\gamma$  induce altos niveles de óxido nítrico, daño de la mitocondria, fragmentación del ADN y muerte celular, cambios que son bloqueados por el inhibidor de la NOS, el L-NG-monometilo arginina. Aunque la IL-1 por sí sola también induce niveles de NO altos, no origina apoptosis. La nicotinamida, que inhibe la ribosilación del ADP y bloquea los radicales de oxígeno, imposibilitó la muerte celular sin afectar los niveles de óxido nítrico. El NO puede, de esta manera, ser necesario, pero es aparentemente insuficiente para la inducción de apoptosis en este sistema celular [139].

La neurotoxicidad del glutamato afecta al superóxido [140, 141] y al NO [90]. La neurotoxicidad mediada por el óxido nítrico se correlaciona con la activación de la poli-(ADP) ribosa sintetasa, que puede dar lugar a la muerte celular debido al agotamiento de la beta-nicotinamida adenina dinucleótida y al ATP [142]. La benzanidina, un inhibidor de la poli-(ADP) ribosa sinte-

tasa, bloquea la neurotoxicidad mediada por el NO [138]. El NO también puede deaminar las bases purínicas y pirimidínicas y dar lugar a mutaciones y roturas de las cadenas de ADN, que son un estímulo para la activación de la enzima sintetasa poli-(ADP) ribosa.

Todos estos estudios no sólo sugieren que existen distintos y específicos mecanismos de muerte celular inducido por el NO en los tejidos, sino que también ponen de relieve la importancia de las interacciones del NO con otros radicales. Los condrocitos cultivados producen radicales hidroxilo, peróxido de hidrógeno, superóxido y oxígeno simple en respuesta a la activación de las citoquinas, ésteres de forbol o a la anoxia-reoxigenación [143, 144]. Los condrocitos han sido caracterizados como la fuente principal NO de origen intraarticular [13, 15, 16]. El peróxido de hidrógeno y el óxido nítrico inhiben la síntesis de los proteoglicanos en los condrocitos [145] y otros procesos sintéticos, incluyendo la síntesis total de proteínas y del ADN. Esto está íntimamente relacionado con los niveles reducidos de ATP y la inactivación oxidativa de la enzima gliceraldehído 3-fosfato de hidrogenasa ( $G_3PDH$ ).

El daño por parte de los radicales de oxígeno intracelular puede, pues, producirse a través de la inhibición de la  $G_3PDH$  y consecuentemente por la reducción de la ATP intracelular. Esta información nos llevó a analizar las interacciones del NO y los radicales de oxígeno en la inducción de apoptosis en los condrocitos. Basándonos en los efectos de varios donantes de NO exógenos, incluidos el SNP, SNAP y SIN-1,

el NO parece suficiente para inducir apoptosis en los condrocitos. Los efectos de los donantes de NO son típicos de la muerte celular apoptótica de acuerdo con criterios morfológicos, ultraestructurales y bioquímicos. Los resultados obtenidos con los donantes exógenos del NO difieren de los hallazgos con los inductores de la síntesis endógena del NO. La IL-1, el TNF, el IFN- $\gamma$  y el LPS, así como las combinaciones de estos estímulos que causaron el incremento esperado de la síntesis del óxido nítrico, no redujeron la viabilidad de los condrocitos, ni indujeron cambios apoptóticos. Los radicales de oxígeno generados por el sistema hipoxantina/xantina oxidasa tampoco indujeron apoptosis, pero sí bajaron los niveles del óxido nítrico biológicamente activo. El bloqueo de los radicales de oxígeno dio como resultado la inducción de la apoptosis por la IL-1. Este efecto fue visto con distintos compuestos, entre ellos el DMSO, el DMPO, el NAC y la catalasa. Además, este efecto está asociado al incremento de los niveles de NO en comparación con los medidos en los sobrenadantes de las células estimuladas únicamente con IL-1. Los cambios apoptóticos mostrados con la IL-1 en presencia de los quelantes de los radicales de oxígeno dependen del NO, puesto que el NMA actúa como un agente protector.

Estos resultados sobre las interacciones de los distintos radicales revelan que el NO es el principal iniciador de la apoptosis en los condrocitos. La constatación de que altos niveles de NO liberados por donantes exógenos inducen apoptosis, mientras que el NO producido endógenamente sólo induce

apoptosis en presencia de quelantes de los radicales de oxígeno, demuestra que el balance relativo de los distintos radicales es determinante para la función y la supervivencia de los condrocitos.

De entre los radicales, el peróxido de hidrógeno se reveló como más importante que el superóxido, ya que fue la catalasa y no la superóxido dismutasa la que propició la aparición de la apoptosis dependiente del NO e inducida por la IL-1. Los radicales de oxígeno indujeron la aparición de necrosis en los condrocitos articulares cuando se generaron a partir del sistema hipoxantina/xantina oxidasa. Los radicales de oxígeno endógenos inducidos por los mediadores inflamatorios únicamente causaron necrosis en aquellas condiciones en que la producción simultánea de NO estaba reducida.

Por tanto, el tipo de muerte celular se encuentra determinado por el balance entre los distintos radicales. La formación de los distintos tipos de radicales se ve influida por factores específicos de los tejidos, entre los que se incluyen la tensión parcial de oxígeno, el pH y los niveles de las enzimas que bloquean y que producen los radicales. La avascularidad del cartílago articular y una relativamente baja tensión parcial de oxígeno en el fluido sinovial favorecen la producción del NO por los condrocitos activados por las citoquinas; y estas condiciones refuerzan la idea de que la muerte celular programada y mediada por el NO es un mecanismo central en el desarrollo del cartílago y contribuye a los cambios relacionados con la edad en este tejido.

Una vez probado que el NO es un factor con capacidad para reducir la celularidad del cartílago articular del condrocito, y sabiendo que durante el envejecimiento el número de condrocitos descende, el siguiente objetivo fue estudiar si la expresión de la iNOS, los efectos antiproliferativos y la capacidad de inducir apoptosis del NO representan una base para los cambios relacionados con la edad en los condrocitos y en el cartílago articular humano.

Para llevar a cabo este estudio, utilizamos el modelo de senescencia celular *in vitro*, en el que sabemos que la capacidad proliferativa de las células descende de forma progresiva. Demostramos que la regulación de la expresión de la enzima iNOS y la producción del NO varían durante la dediferenciación de los condrocitos, un proceso durante el cual las células pierden algunas de las características específicas de los condrocitos. A continuación, comprobamos que la expresión de la iNOS en respuesta a la IL-1 $\beta$  en los condrocitos primarios se manifiesta como uno de los posibles mecanismos para explicar las diferencias en la regulación del crecimiento de estas células.

El cambio más notable en la respuesta a la IL-1 es la pérdida de su capacidad para inhibir la proliferación durante el subcultivo *in vitro*. Este efecto se acompaña de la pérdida de su capacidad para estimular la síntesis del NO. Por el contrario el TGF $\beta$ , que estimula la proliferación en los condrocitos primarios y que pierde su capacidad de inducir esta respuesta durante el subcultivo, es

capaz de inducir la síntesis de NO en los condrocitos de los últimos pases del cultivo. Estos resultados parecían indicar que el NO podría desempeñar un papel importante durante el envejecimiento *in vivo* del cartílago articular. Para analizar esta relación decidimos medir *in vitro* el NO en los condrocitos articulares de donantes de diferentes edades. Nuestros hallazgos confirman que los condrocitos de los

donantes más viejos sintetizan de forma espontánea niveles más elevados de NO. Además, partiendo de la certeza de que el NO tiene capacidad de inducir apoptosis en los condrocitos, cuantificamos el número de células apoptóticas en los cartílagos de estos mismos donantes. El resultado fue que los cartílagos de donantes de edad más avanzada presentan también mayor número de células en apoptosis.



## **VII. CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

- 1 El Óxido Nítrico exógeno, en concentraciones  $\leq 0.5\text{mM}$ , inhibe la proliferación de los condrocitos articulares humanos inducida por el  $\text{TGF}\beta$  y por el suero.
- 2 El Óxido Nítrico induce la síntesis de la Prostaglandina E2, la cual inhibe la proliferación de los condrocitos.
- 3 La interacción del Óxido Nítrico y la Prostaglandina E2 representa un mecanismo por el cual se potencia la respuesta catabólica inducida por la IL-1 en el cartílago articular humano.
- 4 El Óxido Nítrico exógeno, en concentraciones  $> 0.5\text{ mM}$ , induce la apoptosis en los condrocitos articulares humanos en cultivo.
- 5 El Óxido Nítrico endógeno sintetizado por la IL-1, sola o en combinación con otros inductores de la síntesis de NO como el LPS, TNF-a y el INF-g, no inducen apoptosis en los condrocitos articulares humanos.
- 6 La IL-1 en combinación con quelantes de los radicales libres de oxígeno induce apoptosis que puede ser bloqueada por los inhibidores de la síntesis de Óxido Nítrico.
- 7 Durante la senescencia *in vitro* de los condrocitos, el  $\text{TGF}\beta$  pierde la capacidad de provocar proliferación celular e induce la síntesis de Óxido Nítrico. La IL-1 pierde su capacidad de inhibir la proliferación celular y de inducir la síntesis de Óxido Nítrico.
- 8 Algunos de los efectos del  $\text{TGF}\beta$  y de la IL-1 sobre la proliferación de los condrocitos articulares humanos cultivados *in vitro* son mediados por el Óxido Nítrico.
- 9 Durante el proceso de envejecimiento *in vivo*, el condrocito articular humano sano incrementa la capacidad de sintetizar Óxido Nítrico en los cultivos *in vitro*.
- 10 El número de condrocitos en apoptosis aislados del cartílago articular humano sano se incrementa con la edad del donante.

## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**

1. Poole C: The structure and function of articular cartilage matrices. In: Joint cartilage degradation: basis and clinical aspects. Edit. Woessner JF HD, Miami: Marcel Dekker, Inc, 1993; 1-35.
2. Francisco J. Blanco, José-L. Fernández-Sueiro. Artrosis: Concepto, clasificación y patogénesis. In: Tratado de Reumatología. Edit. Pascual, Gómez-Reino, Carbonell, Rodríguez-Valverde. ARAN Ediciones, S.A. Madrid. 1998: 1609-24.
3. Quintero M, Mitrovic M, Stankovic M, de Seze S, Miravet L, Reyckewaert A: Cellular aspects of the aging of the articular cartilage. II Condylar cartilage with fissured surface taken from normal and arthritic knees. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 1984; 51: 445-50.
4. Vignon E, Arlot M, Patricot L, Vignon G: The cell density of human femoral head cartilage. *Clin Orthop*. 1976; 121: 303-10.
5. Kerr J: Shrinkage necrosis: A distinct mode of cellular death. *J. Pathol*. 1971; 105: 13-21.
6. Kerr J, Wyllie A, Currie A: Apoptosis a basic biologic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 1972; 26: 239-257-62.
7. Kerr J, Searle J, Harmon B, CJ. B: Apoptosis. In: Perspectives on mammalian cell death. Edit. Potter, M. England: Oxford University Press, 1987, 124-135.
8. Franceschi C, Monti D, Rosario Scarfi M, et al.: Genomic instability and aging: studies in centenarians (successful aging) and in patients with Down's syndrome (accelerated aging). *Ann New York Acad Sci* 1992; 663: 4-13.
9. Tomei L, Cope F, Barr P: Apoptosis: aging and phenotypic fidelity. In: Apoptosis II: The molecular basis of apoptosis in disease. Edit. Cope Ta. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994, 321-34
10. Barr P, Tomei L: Apoptosis and its role in human disease. *Bio/Technology* 1994; 12: 487-92.
11. Blanco FJ, Guitián R, Vázquez-Martul E, De Toro F, Galdo F: Chondrocytes OA die by apoptosis: a possible pathway for OA Pathology. *Arthritis and Rheumatism* 1998; 41: 540-45.
12. Ignarro L, Buga G, Wood K, Byrns K, Chaudhuri G: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9265-9274.
13. Palmer R, Ferige A, Moncada S: Nitric Oxide accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-30.
14. Garg U, Hassid A: Nitric oxide generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 1774.

15. Stadler J, Stefanovic-Racic M, Billiar T: Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J Immunol* 1991; 147: 3915-3922.
16. Rediske J, Koehne C, Zhang B, Lotz M: The inducible production of nitric oxide articular cell types. *Osteoarthritis Cartilage* 1994; 2: 199-206.
17. Stefanovic-Racic M, Stadler J, Evans C: Nitric Oxide and arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 1993; 36: 1036-44.
18. Chin J, Lin Y: Human articular chondrocytes produce PGE2. *Arthritis and Rheumatism* 1988; 31: 1290-98.
19. Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M: Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* 1995; 146: 75-85.
20. Poole C, Flint M, Beaumont B: Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages. *J Orthopaed Res* 1987; 5: 509-22.
21. Mendler S, Eich-Bender L, Vaughan K: Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX and XI. *J Cell Biol* 1989; 108: 191-197.
22. Neame P: Extracellular Matrix of cartilage: Proteoglycans. In: Joint cartilage degradation: basic and clinical aspects. Edit. Woessner H. Miami: Marcel Dekker, Inc, 1993; 109-138.
23. Miller E, Harris E, Chung J, Finch P, McCroskery, Butler W: Cleavage of type II and III collagens with mammalian collagenase: site of cleavage and primary structure at the NH2-terminal portion of the smaller fragment released from both collagens. *Biochemistry* 1976; 15: 787-92.
24. Mitchell P, Magna H, Reeves L et al.: Cloning, expression and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1996; 97: 761-768.
25. Dean D: Proteinase-mediated cartilage degradation in osteoarthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 1991; 20: 2-11.
26. Nagase H, Woessner J: Role of endogenous proteinases in the degradation of cartilage matrix. In: Joint cartilage degradation: basic and clinical aspects. Edit. Woessner H. Miami: Dekker, 1993; 159-185.
27. Dean D, Marter-Pelletier J, Pelletier J, Howell D, Woessner J: Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1989; 84: 678-85.
28. Blanco F, Lotz M: Citocinas, condrocitos y artrosis. *Rev Esp Reumatol* 1995; 22: 27-31.
29. Lotz M, Blanco FJ, Johanes V, et al.: Cytokine regulation of chondrocyte functions. *J Rheumatol* 1994; 22 (suppl 43): 104-108.

30. Marter-Pelletier J, McCollum R, DiBattista J, et al.: The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 530-540.
31. Pelletier J, DiBattista J, Roughley P, McCollum R, Mater-Pelletier J: Cytokines and inflammation in cartilage degradation. *Rheum Dis Clin North Am* 1993; 19: 545-568.
32. Goldring M, Fukuo K, Kirkhead J, Dudek E, Sandell L: Transcriptional suppression by IL-1 and interferon-gamma of type II collagen gene expression in human chondrocytes. *J Cell Biochem* 1994; 54: 85-99.
33. Pettipher E, Higgs G, Henderson B: IL-1 induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 8749-53.
34. Geng Y, Blanco F, Cornelisson M, Lotz M: Regulation of cyclooxygenase-2 expression in human articular chondrocytes. *J Immunology* 1995; 155: 796-801.
35. Gunther M, Haubeck H: TGF $\beta$  regulates tissue inhibitor of metalloproteinases-1 expression in differentiated human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 395-405.
36. Vetter U, Helbing G, Heit W, Pirsig W, Sterzig K, Heinze E: Clonal proliferation and cell density of chondrocytes isolated from human fetal epiphyseal, human adult articular and nasal septar cartilage. Influence of hormones and growth factors. *Growth* 1985; 49: 229-33.
37. Engerlmann G, Leutert G: The aging alterations of the arytenoid cartilage. *Z Mikrosk Anat Forsch* 1989; 103: 597.
38. Howell D: Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis: Diagnosis and management*. Edit. Moskowitz, Goldberg, Philadelphia: Saunders, 1984; 129-146.
39. Arend W, Dayer J: Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 305-315.
40. Guerne P, Vaughan J, Carson D: IL-6 and joint tissues. *Ann NY Acad Sci* 1989; 557: 558-61.
41. Abyad A, Boyer JT: Arthritis and aging. *Curr Opin Rheumatol* 1992; 4: 153-9.
42. Evans C, Georgescu H: Observations on the senescence of cells derived from articular cartilage. *Mech Ageing Dev* 1983; 22: 179-85.
43. Adolphe M, Ronot X, Jaffray P, Hecquet C, Fontagne J, Lechat P: Effects of donor's age on growth kinetic of rabbit articular chondrocytes in culture. *Mech Ageing Dev* 1983; 23: 191.

44. Cominice J, Levasseur C, Larno S, Ronot X, Adolphe M: Age-related changes in rabbit articular chondrocytes. *Mech Ageing Dev* 1986; 37: 231-7
45. Guerne P, Sublet A, Lotz M: Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes: distinct profiles in primary chondrocytes, subcultured chondrocytes, and fibroblasts. *J Cell Physiol* 1994; 158: 476-81.
46. Guerne P, Blanco FJ, Kaelin A, Desgeorges A, Lotz M: Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes in aging and development. *Arthr Rheum* 1995; 38: 960-71.
47. Brenner R, Nerlich A, Heinze E, Vetter U, Teller W: Different regulation of clonal growth by transforming growth factor-beta 1 in human fetal articular and costal chondrocytes. *Pediatr Res* 1993; 33: 390-97.
48. Rajfer J, Aronson W, Bush P, Dorey F, Ignarro L: Nitric oxide as a mediator of the corpus cavernosum in response to non adrenergic non colinergic transmission. *N Engl J Med* 1992; 326: 90-98.
49. Radomski M, Palmer R, Moncada S: An L-Arg/nitric oxide pathway in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5193-5198.
50. Nathan C, Xie Q: Nitric Oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell* 1994; 78: 915-23.
51. Lipton S, Choi Y-B, Pan Z, et al.: A redox based mechanism for neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso compounds. *Nature* 1993; 364: 626-34.
52. Guo F, De Raeve H, Rice T, Stuehr D, Thunnissen F, Erzurum S: Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7809-7814.
53. Moncada S, Higgs A, Furchgott R: International Union of Pharmacology nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol Rev* 1997; 49: 137-145.
54. Silvagno F, Xia H, Bredt D: Neuronal nitric-oxide synthase- $\mu$  an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J Biol Chem* 1996; 271: 11204-9.
55. Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith T, Kelly R, Michel T: Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae: specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 22810-21.
56. Michel T, Feron O: Perspective Series: Nitric Oxide and Nitric Oxide Synthases. *J Clin Invest* 1997; 100: 2146-53.
57. Nathan C, Xie Q: Nitric Oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994; 78: 915-23.

58. Marletta M: Nitric Oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 1994; 78: 927-934.
59. Charles I, Palmer R, Hickery M, et al.: Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11419-32.
60. Maier R, Bilbe G, Rediske J, Lotz M: Inducible nitric oxide synthase from human articular chondrocytes: cDNA cloning and analysis of mRNA expression. *Bioch Bioph Acta* 1994; 1208: 145-152.
61. Geller D, Lowenstein C, Shapiro R, et al.: Cloning and characterization of Nitric oxide synthase in human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3491-99.
62. Schini V, Vanhoutte P: Inhibitors of calmodulin impair the constitutive but not the inducible nitric oxide synthase activity in the rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 261: 553-64.
63. Forstermann U, Pollock J, Schmidt H, Heller M, Murad F: Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88: 1788-96.
64. Stuehr D, Fasehum O, Kwon N, et al.: Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenylethylidenehydrazide and its analogs. *FASEB J*. 1991; 5: 98-107.
65. Stuehr D, Gross S, Sakuma I, Levi R, Nathan C: Activated murine macrophages secrete a metabolite or arginine with the bioactivity of endothelium derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. *J Exp Med* 1989; 169: 1011-19.
66. Gaillard T, Mulsch A, Busse R, Klein H, Decker K: Regulation of nitric oxide production by stimulated rat Kupffer cells. *Pathobiology* 1991; 59: 280.
67. Nussler A, Di Silvio M, Billiar T, et al.: Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J Exp Med* 1992; 176: 261-71.
68. Palmer R, Andrews T, Foxwell N, Moncada S: Glucocorticoids do not affect the induction of a novel calcium-dependent nitric oxide synthase in rabbit chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 188: 209-216.
69. Radomski M, Palmer R, Moncada S: Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 10043-55.



70. Bredt D, Ferris C, Snyder S: Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase, identification of flavin and calmodulin binding sites. *J Biol Chem* 1992; 267: 10976-10983.
71. Rogers N, Ignarro L: Constitutive nitric oxide synthase from cerebellum is reversibly inhibited by nitric oxide formed from L-Arginine. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189: 242-9.
72. Southand E, Garthwaite J: Comparative effects of some nitric oxide donors on cyclic GMP levels in rat cerebellar slices. *Neuroscience Letters* 1991; 130: 107-15.
73. Stamler J: Redox signaling: Nitrosylation and related target interactions of Nitric Oxide. *Cell* 1994; 78: 931-43.
74. Klatt P, Schmidt K, Brunner F, Mayer B: Inhibitors of brain nitric oxide synthase. Binding kinetics, metabolism and enzyme activation. *Biological Chemistry* 1994; 269: 1674.
75. Stamler J, Jaraki O, Osborne J, et al.: Nitric Oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 80: 4518-23.
76. Lancaster J, Hibbs J: EPR demonstration of iron-nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1223-31.
77. Ignarro L: Signal trasduction mechanism involving nitric oxide. *Biochem Pharmacol* 1991; 41: 485-89.
78. Drapier J, Hibbs J: Differentiation of murine macrophages to express non-specific cytotoxicity for tumor results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. *J Immunol* 1988; 140: 2829-34.
79. Dimmeler S, Lottspeich F, Vruene B: Nitric oxide causes ADP-ribosylation and inhibition of gliceroaldehydo-3 fosfato dehidrogenasa. *J Biol Chem* 1992; 267: 16771-77.
80. Brune B, Lapetina E: Activation of a cytosolic ADP-ribosyltransferase by nitric oxide-generating agents. *J Biol Chem* 1989; 264: 8455-61.
81. Leproivre M, Cherais B, Yapo A, Lemaure G, Thelander L, Tenu J: Alteration of ribonucleotide reductase activity following induction of the nitrite-generating pathway in adenocarcinoma cells. *J Biol Chem* 1990; 265: 14143-49.
82. Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, et al.: Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298: 431-438.
83. Wink D, Kasprzak K, Maragos C, et al.: DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science*, 1991; 254: 1001-8.

84. Beckman J, Beckman T, Chen J, Marshall P, Freeman B: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1620-28.
85. Zhu L, Gunn C, Ischiropoulos H, Beckman J: Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch. Biochem Biophys* 1992; 298: 446-52.
86. Rubanyi G, Ho E, Cantor E, Lumma W, Botelho L: Cytoprotective function of nitric oxide: inactivation of superoxide radicals produced by human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181: 1392.
87. MacIntyre I, Zaidi M, Alam S, et al.: Osteoclastic inhibition: an action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2936-41.
88. Estrada C, Gomez C, Maartin C, Moncada S, Gonzalez C: Nitric oxide mediates tumor necrosis factor-alpha cytotoxicity in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; 186: 475-83.
89. Cox G, Melillo G, Chattopadhyay U, Mullet D, Fertel R, Varesio R: Tumor necrosis factor-alpha-dependent production of reactive nitrogen intermediates mediates INF-gamma plus IL-2-induced murine macrophage tumoricidal activity. *J Immunol* 1992; 149: 3290-97.
90. Dawson V, Dawson T, London E, Brecht D, Snyder S: Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6368-75.
91. Bergmann L, Ironcke K, Suscheck C, Kolb H, Kolb-Bachofen V: Cytotoxic action of IL-1 beta against pancreatic islets is mediated via nitric oxide formation and is inhibited by NG-monomethyl-L-arginine. *FEBS Lett* 1992; 299: 103-9.
92. Dijkmans R, Billiau A: Interferon-gamma/lipopolysaccharide-treated mouse embryonic fibroblasts are killed by glycolysis/L-arginine-dependent process accompanied by depression of mitochondrial respiration. *Eur J Biochem* 1991; 202: 151.
93. Kwon N, Stuehr D, Nathan C: Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J Exp Med* 1991; 174: 761.
94. Farrell AJ, Blake DR, Palmer RM, Moncada S: Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 1992; 51: 1219-22.
95. Cohen J, Duke R: Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J. Immunol.* 1984; 132: 38-53.
96. Tata J: Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of tadpole tail in organ culture. *Dev. Biol.* 1966; 13: 77-94.

97. Wyllie A, Morris R, Smith A, Duniop D: Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* 1984; 142: 67-77.
98. Majno G, Joris I: Apoptosis, Oncosis and Necrosis: An overview of cell death. *Am J Pathology* 1995; 146: 3-15.
99. Kerr JF: A histochemical study of hypertrophy and ischemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J. Pathol. Bacteriol.* 1965; 90: 419-24.
100. Eleftheriou E: Ultrastructural studies on protophloem sieve elements in *Triticum aestivum* L. Nuclear degeneration. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* 1986; 95: 47-54.
101. Cohen J: Overview: Mechanisms of apoptosis. *Immunology Today* 1993; 14: 126-34.
102. Savill J, Dransfield I, Haslett C: Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 1990; 343: 170-81.
103. Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C: Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunology Today* 1993; 14: 131-39.
104. Trump B, Berezesky I, Osornio-Vargas A: Cell death and the disease process. The role of calcium. In: *Cell death in biology and pathology*. Edit. Lockshin. London: Chapman and Hall, 1981; 209-215.
105. Arends J, Morris R, Wyllie A: Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990; 136: 593-9.
106. Wyllie A: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; 284: 555-63.
107. Gromkowski S, Brown T, Masson D, Tschopp J: Lack of DNA degradation in target cells lysed by granules derived from cytolytic T lymphocytes. *J Immunol* 1988; 141: 774-85.
108. Gromkowski S, Brown T, Cerutti P, Cerottini J: DNA of human Raji target cells is damaged upon lymphocyte-mediated lysis. *J. Immunol.* 1996; 136: 752-59.
109. Vaux D: CED-4 the third horse-man of apoptosis. *Cell* 1997; 90: 389-95.
110. Reed J: Double identity for proteins of the bcl-2 family. *Nature* 1997; 387: 773-84.
111. Hsu Hk, Xiong J, Goeddel D: The TNF receptor-1 associated protein TRADD signals cell death and NF-kB activation. *Cell* 1995; 81: 495-501.
112. Chinnaiyan A, O'Rourke K, Tewari M, Dixit V: FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995; 81: 505-19.

113. Boldin M, Goncharov T, Goltsev Y, Wallach D: Involvement of MACH, a Novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1 and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 1996; 85: 803-901.
114. Muzio M, Chinnaiyan A, Kischkel F: FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3 like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 1996; 85: 817-23.
115. Nagata S: Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355-63.
116. Alnemri E, Livingston D, Nicholson D: Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87: 171-83.
117. Penfold P, Provis J: Cell death in the development of the human retina: Phagocytosis of pyknotic and apoptotic bodies by retinal cells. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1986; 224: 549-55.
118. Benedetti A, Jezequel A, Orlandi F: Preferential distribution of apoptotic bodies in acinar zone 3 of normal human and rat liver. *J Hepatol* 1988; 7: 319-36.
119. Potten C: Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and g irradiation. *Nature* 1977; 269: 518-27.
120. Lynch M, Nawaz S, Gerschenson L: Evidence for soluble factors regulating cell death and cell proliferation in primary cultures of rabbit endometrial cells grown on collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1986; 83: 4784-98.
121. Duke R, Cohen J: IL-2 addiction: Withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells. *Lymphokine Res* 1986; 5: 289-95.
122. Smith C, Williams G, R. K, Jenkinson E, Owen J: Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature* 1989; 337: 181-87.
123. O'Shea J, Hay M, Cran D: Ultrastructural changes in the theca interna during follicular atresia in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 1978; 54: 183.
124. Weedon D, Strutton G: Apoptosis as the mechanism of the involution of hair follicles in catagen transformation. *Acta Derm. Venereol.* 1981; 61: 335-43.
125. Walker N, Bennet R, Kerr J: Cell death by apoptosis during involution of the lactating breast in mice and rats. *Am J Anat* 1989; 185: 19-28.
126. Savill J, Wyllie A, Henson J, Walport M, Henson P, Haslett C: Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J. Clin. Invest.* 1989; 83: 865-74.
127. Heintz N: Cell death and the cell cycle: a relationship between transformation and neurodegeneration? *Trends Biochem Sci* 1993; 18: 157-63.

128. Heck D, Laskin D, Gardner C, Laskin J: *J Biol Chem* 1992; 267: 21277.
129. Salvemini D, Settle SL, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P: Regulation of prostaglandin production by nitric oxide; an in vivo analysis. *Br J Pharmacol* 1995; 114: 1171-8.
130. Bry K, Lappalainen U, Hallman M: *Biochem Biophys Acta* 1993; 1181: 31.
131. Curran R, Ferrari F, Kispert P, et al.: Nitric oxide and nitric oxide-generating compounds inhibit hepatocyte protein synthesis. *FASEB J* 1991; 5: 2085.
132. Albina J, Cui S, Mateo R, Reichner J: Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 1993; 150: 5080.
133. Sarih M, Souvannavong V, Adam A: Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191: 503.
134. Treuhaft P, McCarty D: Synovial fluid pH, lactate, oxygen and carbon dioxide partial pressure in various joint diseases. *Arthritis and Rheumatism* 1971; 14: 475-83.
135. Radi R, Beckman J, Bush K, Freeman B: Peroxynitrite induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1991; 288: 481-87.
136. Radi R, Beckman J, Bush K, Freeman B: Peroxynitrite oxidation of silylhydriyls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 1991; 266: 4244-53.
137. Moriguchi M, Manning L, Manning J: Nitric oxide can modify amino acid residues in proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 183: 598-603.
138. Nguyen T, Brunson D, Crespi C, Penman B, Wishnok J, Tannenbaum S: DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3030-39.
139. Suárez Pinzón W., Strynadka K., Schulz R and Rabinovitch A.: Mechanisms of cytokine-induced destruction of rat insulinoma cells: the role of nitric oxide. *Endocrinology* 1994; 134: 1006.
140. Chan P, Chu L, Chen S, Carlson E, Epstein C: Reduced neurotoxicity in transgenic mice overexpressing human copper-zinc-superoxide dismutase. *Stroke* 1990; 21: III80.
141. Lafon-Cazal M, Pietri S, Culcasi M, Bockaert J: NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 1993; 364: 535-42.
142. Zhang J, Dawson V, Dawson T, Snyder S: Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthase in neurotoxicity. *Science* 1994; 263: 687-95.

143. Henrotin Y, Deby-Dupont G, Deby C, De Bruyng M, Lamy M, Franchimont P: Production of active oxygen species by isolated human chondrocytes. *Br J Rheumatol* 1993; 32: 562.
144. Tiku M, Liesch J, Robertson F: Production of hydrogen peroxide by rabbit articular chondrocytes: enhancement by cytokines. *J Immunol* 1990; 145: 690-7.
145. Baker M, Feigan J, Lowther D: Chondrocytes antioxidant defences: the roles of catalase and glutathione peroxidase in protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependent inhibition of proteoglycan biosynthesis. *J Rheumatol* 1993; 15: 670-8.

UNIVERSIDADE DA CORUÑA  
Servicio de Bibliotecas



1700744180