



ESCUELA DE DOCTORADO  
INTERNACIONAL DE LA USC

Carlota  
García Santiago

Tesis doctoral

Efecto de Diferentes AINEs  
Sobre la Funcionalidad de los  
Condrocitos Humanos en  
Cultivo

Santiago de Compostela, 2021



TESIS DE DOCTORADO

**EFFECTO DE DIFERENTES AINES  
SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE  
LOS CONDROCITOS HUMANOS EN  
CULTIVO**

Carlota García Santiago

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE MEDICAMENTOS

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2021





D./Dña. **Carlota García Santiago**

Título da tese: **Efecto de Diferentes AINEs sobre la Funcionalidad de los Condrocitos Humanos en Cultivo**

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De ser o caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.
- 4) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide a versión impresa coa presentada en formato electrónico.

E comprométome a presentar o Compromiso Documental de Supervisión no caso de que o orixinal non estea na Escola.

En **Santiago de Compostela, 06 de Decembro de 2021**

**Sinatura electrónica**

## AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR/TITOR DA TESE

D./Dña. **Manuel Alejandro Freire-Garabal Núñez**

En condición de: **Titor/a e director/a**

Título da tese: **Efecto de Diferentes AINEs sobre la Funcionalidad de los Condrocitos Humanos en Cultivo**

### INFORMA:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna Carlota García Santiago, baixo a miña dirección/titorización, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director/titor desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

**En Santiago de Compostela, 06 de Decembro de 2021**

**Sinatura electrónica**

## AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR/TITOR DA TESE

D./Dña. **Jesús Pino Mínguez**

En condición de: **Director/a**

Título da tese: **Efecto de Diferentes AINEs sobre la Funcionalidad de los Condrocitos Humanos en Cultivo**

### INFORMA:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna Carlota García Santiago, baixo a miña dirección/titorización, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director/titor desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En **Santiago de Compostela, 06 de Decembro de 2021**

**Sinatura electrónica**



*A Ramiro, por su paciencia.*



## **AGRADECIMIENTOS**

*En primer lugar, quiero darles las gracias a mis directores de tesis, los Doctores Manuel Alejandro Freire-Garabal Núñez y Jesús Pino Mínguez, ya que sin ellos esto no habría sido posible.*

*También quiero agradecerle al Dr. Pedro Guillén de la Clínica CEMTRO y al equipo del laboratorio Amplicel, la Dra. Elena Rodríguez, el Dr. Juan Manuel López-Alcorocho, Rosa Caballero y Mercedes Casqueiro, la oportunidad brindada de trabajar con ellos.*

*A mis compañeras del Laboratorio SNL-Lennart Levi, las Dras. María Jesús Núñez Iglesias, Silvia Novío Mallón y Elena Pérez Muñuzuri, por su apoyo, colaboración y amistad.*

*A mi familia, a María, a Cris y a Juan, por ser los mejores motivadores que cualquier persona desearía tener.*



# *ÍNDICE*



## ÍNDICE

<b>Declaraciones de la autora</b> .....	9
<b>i. Conflictos de interés</b> .....	11
<b>ii. Autoría de las imágenes y tablas</b> .....	11
<b>iii. Dictamen del Comité Ético</b> .....	11
<b>Abreviaturas</b> .....	15
<b>Resúmenes</b> .....	21
<b>1. Introducción</b> .....	29
1.1. Artrosis vs. artritis .....	31
1.1.1. Artrosis: Prevalencia e incidencia .....	33
1.2. La articulación sinovial .....	34
1.2.1. Características generales de las articulaciones .....	35
1.2.2. Condrocitos .....	39
1.2.3. Matriz extracelular y cartílago articular .....	41
1.2.4. Cápsula articular, membrana y líquido sinoviales .....	42
1.3. Homeostasis del cartílago .....	43
1.4. Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) .....	46
1.4.2. Indometacina .....	47
1.4.3. Diclofenaco sódico .....	48
1.4.4. Celecoxib .....	49
1.5. Componentes moleculares .....	50
1.5.1. Enzimas .....	51
1.5.1.1. Ciclooxigenasas (COX) .....	51
1.5.1.1.1. Papel de la prostaglandina E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) .....	54
1.5.1.1.2. COX y AINEs .....	55
1.5.1.2. Metaloproteinasas de matriz .....	59
1.5.1.2.1. Metaloproteinasa de matriz-13 (MMP-13) .....	60

1.5.2. Citoquinas proinflamatorias .....	61
1.5.2.1. Catabólicas .....	62
1.5.2.1.1. Interleucina-1 (IL-1 $\beta$ ) .....	62
1.5.2.1.2. Factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) .....	64
1.5.2.2. Regulatorias .....	64
1.4.2.2.1. Interleucina-6 (IL-6) .....	64
1.5.3. Apoptosis .....	66
1.5.3.1. Caspasa-9 .....	67
1.5.3.2. Ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL) .....	69
1.5.4. Proteínas colagénicas .....	70
1.5.4.1. Colágeno tipo II (COL2A1) .....	71
1.5.4.2. Colágeno tipo X (COL10A1) .....	72
1.5.5. Proteínas no colagénicas .....	73
1.5.5.1. Matrilinas .....	73
1.5.5.1.1. Matrilina-1 (MATN1) .....	74
1.5.5.1.2. Matrilina-3 (MATN3) .....	75
1.5.5.2. Fibronectina (FN) .....	77
1.5.6. Proteoglucanos .....	79
1.5.6.1. Glicosaminoglucanos (GAG) .....	79
1.5.6.2. Agrecano (ACAN) .....	81
1.6. El cultivo celular <i>in vitro</i> .....	83
1.6.1. El cultivo celular .....	83
1.6.2. Los procesos de hipertrofia y desdiferenciación .....	84
1.6.3. Conteo de células .....	86
1.6.4. Concentraciones de fármacos .....	86
1.6.5. Ensayos colorimétricos .....	86
1.6.5.1. Ensayo de proliferación celular .....	86
1.6.5.2. Cuantificación de GAG .....	88
1.6.5.3. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) .....	88
1.6.6. Técnicas de imagen .....	89
1.6.6.1. Ensayo de cicatrización .....	89

1.6.6.2. Viabilidad por microscopía confocal .....	90
1.6.7. Expresión génica por qPCR .....	92
1.6.7.1. Aislamiento y cuantificación del ARN ....	93
1.6.7.2. Síntesis y cuantificación del ADN complementario (cDNA) .....	94
1.7. El análisis estadístico .....	94
<b>2. Justificación, Hipótesis y Objetivos</b> .....	<b>97</b>
2.1. Justificación .....	99
2.2. Hipótesis .....	100
2.3. Objetivos .....	100
2.3.1. Objetivo principal .....	100
2.3.2. Objetivos secundarios .....	100
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	<b>103</b>
3.1. Consideraciones previas y condiciones experimentales .....	105
3.1.1. Recolección de las muestras clínicas .....	105
3.1.2. Tiempos de incubación.....	105
3.1.3. Medio de cultivo con rojo fenol .....	105
3.1.4. Cultivo en jarras .....	106
3.1.5. Precauciones .....	106
3.2. Obtención de cultivos y muestras .....	108
3.2.1. Obtención del cartílago articular, aislamiento de condrocitos y proliferación de los cultivos .....	108
3.2.2. Línea celular comercial .....	111
3.2.3. Mantenimiento de los cultivos .....	112
3.3. Concentraciones de fármacos en ensayo .....	113
3.4. Ensayos colorimétricos .....	115
3.4.1. Ensayo de proliferación celular .....	115
3.4.1.1. Curvas dosis-respuesta y cálculo del IC <sub>50</sub> .....	115
3.4.1.2. Proliferación de los cultivos a 5, 10 y 15 días .....	116
3.4.2. Cuantificación de GAG .....	117
3.4.3. ELISA .....	120
3.5. Técnicas de imagen .....	124
3.5.1. Ensayo de cicatrización .....	124

3.5.2. Viabilidad por microscopía confocal .....	125
3.6. Análisis de la expresión génica por qPCR .....	127
3.6.1. Extracción y cuantificación de ARN .....	130
3.6.2. Síntesis y cuantificación del ADN complementario (cDNA) .....	132
3.6.3. Estudio del perfil de expresión génica por qPCR .....	135
3.6.3.1. Diseño del análisis .....	135
3.6.3.2. Preparación de las placas de reacción y análisis .....	135
3.6.3.3. Análisis de los datos mediante el método comparativo de Cq.....	136
3.7. Estudio estadístico .....	137
<b>4. Resultados</b> .....	<b>141</b>
4.1. Ensayos colorimétricos .....	142
4.1.1. Efecto de los fármacos en estudio sobre la proliferación celular .....	142
4.1.1.1. Cálculo del IC <sub>50</sub> para los fármacos .....	142
4.1.1.2. Estudio de la proliferación celular mediante MTT .....	143
4.1.2. Cuantificación de GAG .....	150
4.1.3. ELISA .....	156
4.1.3.1. MMP-13 .....	156
4.1.3.2. IL-1 $\beta$ .....	162
4.1.3.3. TNF $\alpha$ .....	168
4.1.3.4. IL-6 .....	175
4.1.3.5. Caspasa-9 .....	181
4.1.3.6. TRAIL .....	187
4.1.3.7. Fibronectina .....	192
4.2. Técnicas de imagen .....	198
4.2.1. Ensayo de cicatrización .....	198
4.2.2. Viabilidad por microscopía confocal .....	213
4.3. Análisis de la expresión génica por qPCR.....	220
4.3.1. <i>PGST-2</i> .....	220
4.3.2. <i>COL2A1</i> .....	221
4.3.3. <i>COL10A1</i> .....	221

4.3.4. <i>MATN1</i> .....	222
4.3.5. <i>MATN3</i> .....	222
4.3.6. <i>ACAN</i> .....	223
<b>5. Discusión</b> .....	225
5.1. Efecto de los fármacos .....	227
5.2. Proliferación .....	228
5.3. Apoptosis: Caspasa-9 y TRAIL .....	229
5.4. Experimentos de cicatrización .....	232
5.5. Morfología y viabilidad: Confocal .....	232
5.6. COX-2 .....	233
5.7. MMP-13 .....	234
5.8. IL-1 $\beta$ .....	235
5.9. TNF $\alpha$ .....	236
5.10. IL-6 .....	237
5.11. Colágeno tipo II .....	239
5.12. Colágeno tipo X .....	240
5.13. Fibronectina .....	241
5.14. Matrilina-1 .....	241
5.15. Matrilina-3 .....	242
5.16. Glicosaminoglucanos .....	243
5.17. Agrecano .....	244
5.18. Adecuación de los fármacos a la mejora de la patología .....	246
<b>6. Conclusiones</b> .....	249
6.1. Proliferación .....	251
6.2. Apoptosis: Caspasa-9 y TRAIL .....	251
6.3. Experimentos de cicatrización .....	251
6.4. Morfología y viabilidad: Confocal .....	251
6.5. COX-2 .....	252
6.6. MMP-13 .....	252
6.7. IL-1 $\beta$ .....	252
6.8. TNF $\alpha$ .....	253
6.9. IL-6 .....	253
6.10. Colágeno tipo II .....	253
6.11. Colágeno tipo X .....	254
6.12. Fibronectina .....	254

6.13. Matrilina-1 .....	254
6.14. Matrilina-3 .....	254
6.15. Glicosaminoglucanos .....	255
6.16. Agrecano .....	255
6.17. Adecuación de los fármacos a la mejora de la patología .....	255
<b>7. Índice de figuras</b> .....	<b>257</b>
<b>8. Índice de tablas</b> .....	<b>263</b>
<b>9. Apéndice</b> .....	<b>267</b>
<b>10. Bibliografía</b> .....	<b>301</b>

*DECLARACIONES DE LA  
AUTORA*



## DECLARACIONES DE LA AUTORA

### I. CONFLICTOS DE INTERÉS

La doctoranda declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral.

### II. AUTORÍA DE LAS IMÁGENES Y TABLAS

El diseño de figuras y tablas presentadas es original de la autora, elaboradas en base a la bibliografía existente. Las figuras se realizaron con el programa *Microsoft® Office PowerPoint® 2007*.

Las fotografías e imágenes al microscopio expuestas son propiedad de la autora.

### III. DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO

Esta Tesis implica a *seres humanos, sus muestras o sus datos de carácter personal*.

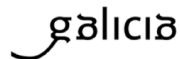
Se declara que el estudio, con código de registro 2019/166 realizado con muestras humanas anónimas, de las que no se han obtenido ningún tipo de dato personal de paciente, de procedencia clínica y bajo consentimiento informado, ha pasado el proceso de evaluación del Comité de Ética de la Investigación de Santiago–Lugo en la fecha 20/03/2019, del que se adjunta copia del dictamen favorable para su realización.

# CARLOTA GARCÍA SANTIAGO: EFECTO DE DIFERENTES AINES SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE LOS CONDRROCITOS HUMANOS EN CULTIVO

---



Secretaría Técnica  
Comité de Ética de la Investigación de Galicia  
Secretaría Xeral, Consellería de Sanidade  
Edificio Administrativo San Lázaro S/N  
15781 Santiago de Compostela  
A Coruña



## DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Lorenzo Armenteros del Olmo, Secretario Suplente del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

### CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 20/03/2019 el estudio:

**Título:** Efecto de las moléculas OAA1-6 sobre la funcionalidad de los condrocitos humanos en cultivo

**Versión modificación:** v01/Feb-2019

**Promotor/a:** Carlota García Santiago

**Investigador/a:** Carlota García Santiago

**Código de Registro:** 2019/166

Y que este Comité, tomando en consideración la pertinencia del estudio, el conocimiento disponible, los requisitos éticos, metodológicos y legales exigibles a los estudios de investigación con seres humanos, sus muestras o registro y los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité, emite un dictamen **FAVORABLE** para la realización del citado estudio.

Documento asinado dixitalmente por:  
Lorenzo Armenteros Del Olmo (01/04/2019 19:13)  
<https://sede.xunta.gal/cvehdove=SAOC-H4C4-BOAH-OF-C-TRAM-2155-4138-7846-73>

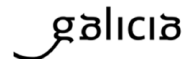


# Declaraciones de la autora: Efecto de Diferentes AINEs Sobre la Funcionalidad de los Condrocitos Humanos en Cultivo



XUNTA DE GALICIA  
CONSELLERÍA DE SANIDADE  
Secretaría Xeral Técnica

Secretaría Técnica  
Comité de Ética de la Investigación de Galicia  
Secretaría Xeral, Consellería de Sanidade  
Edificio Administrativo San Lázaro S/N  
15/81 Santiago de Compostela  
A Coruña



## Y HACE CONSTAR QUE:

1.- El Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo cumple tanto en su composición como en sus Procedimientos Normalizados de Trabajo los requisitos legales vigentes.

2.- La composición actual del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo es:

- **Juan Manuel Vázquez Lago (Presidente)**. Médico especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Pilar Rodríguez Ledo (Vicepresidenta)**. Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Lorenzo Armenteros del Olmo (Secretario Suplente)**. Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Francisco Campos Pérez**. Biólogo. Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.
- **Rosana Castelo Domínguez**. Farmacéutica de Atención Primaria. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Ricardo García Martínez**. Licenciado en Derecho. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Jaime Gulín Dávila**. Farmacéutico especialista en Farmacia Hospitalaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Cristina Márquez Riveras**. Enfermera. Dirección Xeral de Saúde Pública.
- **Guillermo José Prada Ramallal** Médico especialista en Farmacología Clínica. Área de Gestión Integrada de Santiago. Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.
- **Carlos Rodríguez Moreno**. Médico especialista en Farmacología Clínica. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Sandra Vidal Martínez**. Enfermera. Área de Gestión Integrada de Santiago.

En Lugo,

El Secretario Suplente del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago Lugo,

Documento firmado digitalmente por:  
Lorenzo Armenteros Del Olmo (01/04/2019 19:13)  
<https://sede.xunta.gal/ce?bdeve=SAC-44C4-BOAH-OF4O-TRAM-2155-4138-7846-73>





# *ABREVIATURAS*



## ABREVIATURAS

### Grafía latina

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ACAN	Agrecano
AINEs	Analgesicos antiinflamatorios no esteroideos
ABC	Complejo Avidin- Biotin- Peroxidasa
ATP	Adenosin trifosfato
c/cm <sup>2</sup>	Células por cm <sup>2</sup>
c/p	Células por pocillo
cDNA	ADN complementario
COL2A1	Colágeno tipo II
COL10A1	Colágeno tipo X
COX	Ciclooxigenasa; prostaglandina endoperóxido sintasa; PTGS
COXIB	Inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2
Cxb	Celecoxib
DAS	Double- antibody sandwich, tipo de ELISA
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
Dcf	Diclofenaco
DMEM	Modificación de Dulbecco del medio de cultivo basal Eagle
DMF	Dimetilformamida
DMMB	Azul de 1, 9- dimetilmetileno
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato

dTTP/dUTP	Desoxitimidina trifosfato /desoxiuridina trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FBS	Suero fetal bovino
g	Fuerza g, RCF, o fuerza centrífuga relativa
GAG	Glicosaminoglucanos
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
gDNA	ADN genómico
g/L	Gramos por litro
HA	Ácido hialurónico
HADAS	Heterologous double-antibody sandwich, tipo de ELISA
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IND	Indometacina
IP	Ioduro de propidio
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
M, mM	Molar, milimolar
MATN1	Matrilina 1
MATN3	Matrilina 3
mg	Miligramo
mg/mL	Miligramos por mililitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MMP	Metaloproteinasa de matriz
mRNA	ARN mensajero
MS	Medio de cultivo suplementado
MSF	Medio de cultivo suplementado con fármaco
nm	Nanómetro
NTC	<i>No Template Control</i> , control sin hebra molde
Número CAS	Identificador numérico estandarizado y único en el <i>Chemical Abstracts Service</i> para cada

	compuesto químico descrito en la literatura
PBS	Tampón fosfato salino
pg/mL	Picogramos por mililitro
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina, prostaglandina I <sub>2</sub>
PM	Peso molecular
PTGS2	Prostaglandina-endoperóxido sintasa 2; COX-2; prostaglandina G/H sintetasa; ciclooxigenasa-2
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o a tiempo real
r.p.m.	Revoluciones por minuto
ROX	Es un fluoróforo de referencia
RQ	Cuantificación relativa
SDS	Dodecil sulfato sódico
sGAG	Glicosaminoglucanos azufrados
TMB	3,3', 5,5'- tetrametilbenzidina, un cromógeno utilizado como sustrato para la HRP en las pruebas ELISA.
TxA <sub>2</sub>	Tromboxanos
U	Unidad internacional de actividad de los enzimas
UDG	Uracil ADN glicosilasa, elimina el uracilo

### Caracteres especiales

µg	Microgramo
µg/mL	Microgramos por mililitro
µL	Microlitro
µm	Micrómetros; micras
µM	Micromolar



# *RESÚMENES*



## RESÚMENES

La artrosis es la forma más común de artritis, una enfermedad crónica y degenerativa que involucra al cartílago articular y estructuras aledañas, cursando con dolor y ocasionando en última instancia la pérdida de la movilidad y la funcionalidad de la articulación afectada.

Las investigaciones llevadas a cabo en este campo atribuyen el desarrollo de la patología a diferentes eventos mecánicos y biológicos que resultan en el desequilibrio de los procesos de degradación y reparación que ocurren de forma natural en el cartílago articular, membrana sinovial y hueso subcondral, y que a nivel celular se traducen en un aumento de mediadores inflamatorios y enzimas proteolíticas que degradan progresiva e irremediamente la matriz extracelular, la base en la que radica la estructura y resistencia del cartílago.

Hoy en día no existe ninguna terapia que logre curar o frene la progresión de la artrosis, con lo cual los objetivos principales en la terapia actual son el control del dolor y la mejora de la funcionalidad de la articulación. Es por ello por lo que la prescripción de analgesia antiinflamatoria se realice antes que la intervención quirúrgica por ser esta última la opción más agresiva.

En esta Tesis se ha estudiado el efecto de los fármacos indometacina, diclofenaco y celecoxib a la concentración de 1  $\mu\text{M}$  en cultivos humanos celulares artrósicos y sanos sobre diferentes procesos celulares, componentes de la matriz extracelular, y mediadores inflamatorios involucrados en la degeneración artrósica.

Nuestros resultados contribuyen a la investigación sobre esta enfermedad incapacitante complementando la literatura existente y completando la ausencia de información en algunos apartados.

Los tres fármacos antiinflamatorios empleados en este estudio, indometacina, diclofenaco y celecoxib, a la concentración de 1  $\mu\text{M}$  no tienen un efecto apreciable sobre la apoptosis, morfología, viabilidad o niveles de glicosaminoglucanos azufrados, inhiben la expresión de las

matrilinas 1 y 3 y la síntesis de PGE<sub>2</sub> de forma indirecta por medio de la inhibición de la expresión de COX2, pero no ofrecen ninguna mejora al entramado extracelular en lo que se refiere a la expresión de colágeno de tipo II o X, ejerciendo un efecto deletéreo sobre la expresión de agrecano. El uso de cualquiera de estos tres AINEs a la concentración establecida no modifica los niveles de IL-6 en cultivos artrósicos, pero los disminuye en cultivos sanos. Paralelamente, provocan un aumento de la liberación de TNF $\alpha$  por esos mismos cultivos artrósicos; sin embargo, en cultivos sanos, no se observa ningún efecto sobre este parámetro debido al tratamiento.

De forma particular, la indometacina, tanto en cultivos sanos como artrósicos, no ejerce ningún efecto sobre la cicatrización y disminuye los niveles de MMP-13. Tampoco tiene efectos sobre la proliferación o la liberación de IL-1 $\beta$  en cultivos artrósicos, aunque en sanos inhibe la proliferación y potencia la liberación de esta interleucina. Al final del estudio los valores de fibronectina se estabilizan a niveles basales en cultivos artrósicos, pero aumentan en los sanos.

El diclofenaco produce el mismo efecto que la indometacina sobre los parámetros de proliferación, cicatrización y liberación de MMP-13 al medio. No ejerce ningún efecto sobre la liberación de IL-1 $\beta$  en ambas líneas, y su efecto es negativo en cultivos artrósicos al aumentar los niveles de fibronectina por encima de los niveles basales, pero neutro en sanos.

El celecoxib produce el mismo efecto que la indometacina sobre la liberación de IL-1 $\beta$  y fibronectina al medio. Al contrario que indometacina y diclofenaco, sí ejerce un efecto negativo sobre la proliferación en ambas líneas celulares. Su acción sobre la cicatrización es negativa solamente en cultivos artrósicos, pero neutra en cultivos sanos. En estos tampoco ejerce ningún efecto sobre la liberación de MMP-13, aunque sí produce la disminución de esta metaloproteinasa en cultivos artrósicos.

A artrose é a forma máis común de artrite, unha enfermidade crónica e dexenerativa que involucra á cartilaxe articular e estruturas contiguas, cursando con dor e ocasionando en última instancia a perda da mobilidade e a funcionalidade da articulación afectada.

As investigacións levadas a cabo neste campo atribúen o desenvolvemento da patoloxía a diferentes eventos mecánicos e biolóxicos que resultan no desequilibrio dos procesos de degradación e reparación que ocorren de forma natural na cartilaxe articular, membrana sinovial e óso subcondral, e que a nivel celular tradúcense nun aumento de mediadores inflamatorios e encimas proteolíticas que degradan progresiva e irremediamente a matriz extracelular, a base na que radica a estrutura e resistencia da cartilaxe.

Hoxe en día non existe ningunha terapia que logre curar ou free a progresión da artrose, co cal os obxectivos principais na terapia actual son o control da dor e a mellora da funcionalidade da articulación. É por iso que a prescrición de analxesia antiinflamatoria realízese antes que a intervención cirúrxica por ser esta última a opción máis agresiva.

Nesta Tese estudouse o efecto dos fármacos indometacina, diclofenaco e celecoxib á concentración de 1  $\mu\text{M}$  en cultivos celulares humanos artrósicos e sans sobre diferentes procesos celulares, compoñentes da matriz extracelular, e mediadores inflamatorios involucrados na dexeneración artrósica.

Os nosos resultados contribúen á investigación sobre esta enfermidade incapacitante complementando a literatura existente e completando a ausencia de información nalgúns apartados.

Os tres fármacos antiinflamatorios empregados neste estudo, indometacina, diclofenaco e celecoxib, á concentración de 1  $\mu\text{M}$  non teñen un efecto apreciable sobre a apoptosis, morfoloxía, viabilidade ou niveis de glicosaminoglucanos azufrados, inhiben a expresión das matrinas 1 e 3 e a síntese de PGE2 de forma indirecta por medio da inhibición da expresión de COX2, pero non ofrecen ningunha mellora ao armazón extracelular no que se refire á expresión de colágeno de tipo II ou X, exercendo un efecto deletéreo sobre a expresión de agregano. O uso de calquera destes tres AINEs á concentración establecida non modifica os niveis de IL-6 en cultivos artrósicos, pero diminúeos en cultivos sans. Paralelamente, provocan un aumento da liberación de

TNF $\alpha$  por esos mesmos cultivos artrósicos; con todo, en cultivos sans, non se observa ningún efecto sobre este parámetro debido ao tratamento.

De forma particular, a indometacina, tanto en cultivos sans como artrósicos, non exerce ningún efecto sobre a cicatrización e diminúe os niveis de MMP-13. Tampouco ten efectos sobre a proliferación ou a liberación de IL-1 $\beta$  en cultivos artrósicos, aínda que en sans inhibe a proliferación e potencia a liberación desta interleucina. Ao final do estudo os valores de fibronectina estabilízanse a niveis basales en cultivos artrósicos, pero aumentan nos sans.

O diclofenaco produce o mesmo efecto que a indometacina sobre os parámetros de proliferación, cicatrización e liberación de MMP-13 ao medio. Non exerce ningún efecto sobre a liberación de IL-1 $\beta$  en ambas as liñas, e o seu efecto é negativo en cultivos artrósicos ao aumentar os niveis de fibronectina por encima dos niveis basales, pero neutro en sans.

O celecoxib produce o mesmo efecto que a indometacina sobre a liberación de IL-1 $\beta$  e fibronectina ao medio. Ao contrario que indometacina e diclofenaco, si exerce un efecto negativo sobre a proliferación en ambas as liñas celulares. A súa acción sobre a cicatrización é negativa soamente en cultivos artrósicos, pero neutra en cultivos sans. Nestes tampouco exerce ningún efecto sobre a liberación de MMP-13, aínda que si produce a diminución desta metaloproteinasa en cultivos artrósicos.

Osteoarthritis is the most common form of arthritis, a chronic and degenerative disease that involves the articular cartilage and surrounding structures, causing pain and ultimately the loss of mobility and functionality of the affected joint.

Research developed in this field attributes the progress of the pathology to different mechanical and biological events that result in the imbalance of the degradation and repair inherent processes that occur in the articular cartilage, synovial membrane and subchondral bone, which, at the cellular level, are translated towards an increase of inflammatory mediators and proteolytic enzymes that progressively and irredeemable degrade the extracellular matrix, the basis on which both, the structure and resistance of cartilage, lies.

Nowadays, there is no therapy that can cure or halt the progression of osteoarthritis, so the main objectives in current therapy are pain management and the improvement of the functionality of the joint. This is the reason why the prescription of anti-inflammatory analgesia is preferred before surgical intervention, since the latter is the most aggressive option.

In this Thesis, the effect of the drugs indomethacin, diclofenac, and celecoxib at a concentration of 1  $\mu\text{M}$  in healthy and arthritic human cell cultures on different cellular processes, components of the extracellular matrix, and inflammatory mediators involved in arthritic degeneration has been studied.

Our results contribute to the research on this disabling disease by complementing the existing literature and completing the absence of information in some sections.

The three anti-inflammatory drugs used in this study, indomethacin, diclofenac and celecoxib, at a concentration of 1  $\mu\text{M}$  do not have an appreciable effect on apoptosis, morphology, viability or levels of sulfated glycosaminoglycans, they inhibit the expression of matrilins 1 and 3 and, indirectly, the synthesis of PGE2 by inhibiting the expression of COX2. However, they do not provide any improvement to the extracellular network in terms of the expression of type II or X collagens, and exerting a deleterious effect on the expression of aggrecan. The use of any of these three NSAIDs at the established concentration does not modify IL-6 levels in osteoarthritic

cultures and decreases them in healthy cultures. In parallel, they cause an increase in the release of TNF $\alpha$  in those same osteoarthritic cultures; however, in the healthy ones, no effect on this parameter is observed due to treatment.

In particular, indomethacin, has no effect in both cell lines on wound healing and also lowers MMP-13 levels. It also has no effect on the proliferation or release of IL-1 $\beta$  in osteoarthritic cultures, even though it inhibits proliferation in healthy cultures and enhances the release of this interleukin. At the end of the study, fibronectin values were stabilized at baseline levels in arthritic cultures and were increased in the healthy ones.

Diclofenac produces the same effect as indomethacin on proliferation, wound healing and the release of MMP-13. It does not exert any effect in the release of IL-1 $\beta$  in both lines, and its effect is negative in arthritic cultures by increasing fibronectin levels above the baseline, although the effect is neutral in the healthy ones.

Celecoxib has the same effect as indomethacin in the release of fibronectin and IL-1 $\beta$ . Unlike indomethacin and diclofenac, this coxib has a negative effect on proliferation in both cell lines. It exerts a negative effect on wound healing only in osteoarthritic cultures, being neutral in the healthy ones. In these, it does not exert any effect in the release of MMP-13, although it produces a decrease in the release of this metalloproteinase in osteoarthritic cultures.

# *1. INTRODUCCIÓN*



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. ARTROSIS VS. ARTRITIS

La artritis no es una enfermedad aislada, es un término que engloba múltiples patologías y enfermedades relacionadas con la articulación. La artrosis es el tipo más común de artritis. Es una enfermedad crónica y degenerativa cuya característica determinante es la degradación progresiva de la matriz extracelular que compone el cartílago articular, involucrando en el proceso a todos los tejidos de la articulación y cursando con dolor, pérdida de la movilidad y funcionalidad de la articulación, presentando un alto grado de comorbilidad con otras enfermedades.

Durante el proceso artrósico se pueden identificar diferentes alteraciones (253) (Fig. 1/1A):

- Macroscópicamente, se observan pequeñas protuberancias en los márgenes de la articulación denominados osteofitos, formados por la proliferación de tejido cartilaginoso que sufre osificación endocondral y que contribuyen a la limitación del movimiento de la articulación, produciéndose además inflamación moderada en las estructuras sinoviales y esclerosis del hueso subcondral —aumento de la densidad ósea— bajo el cartílago adyacente.

- Microscópicamente, en la superficie articular se identifican grietas o fisuras a la par que se detectan procesos fibrilativos con pérdida parcial o total del tejido y desprendimiento de fragmentos desde los osteofitos. Estos fragmentos —cuyo tamaño oscila desde varios milímetros hasta 1 centímetro— se conocen como cuerpos libres articulares (Fig. 1/1B) y pueden bloquear la articulación, desencadenar una respuesta inflamatoria y aumentar *in situ* la degradación de las estructuras articulares.

- A nivel molecular se describe la producción de enzimas proteolíticas e inhibidores que degradan la matriz del cartílago, y la sobreexpresión de citoquinas y factores de crecimiento que alteran la actividad de los condrocitos y su capacidad para mantener la homeostasis del tejido.

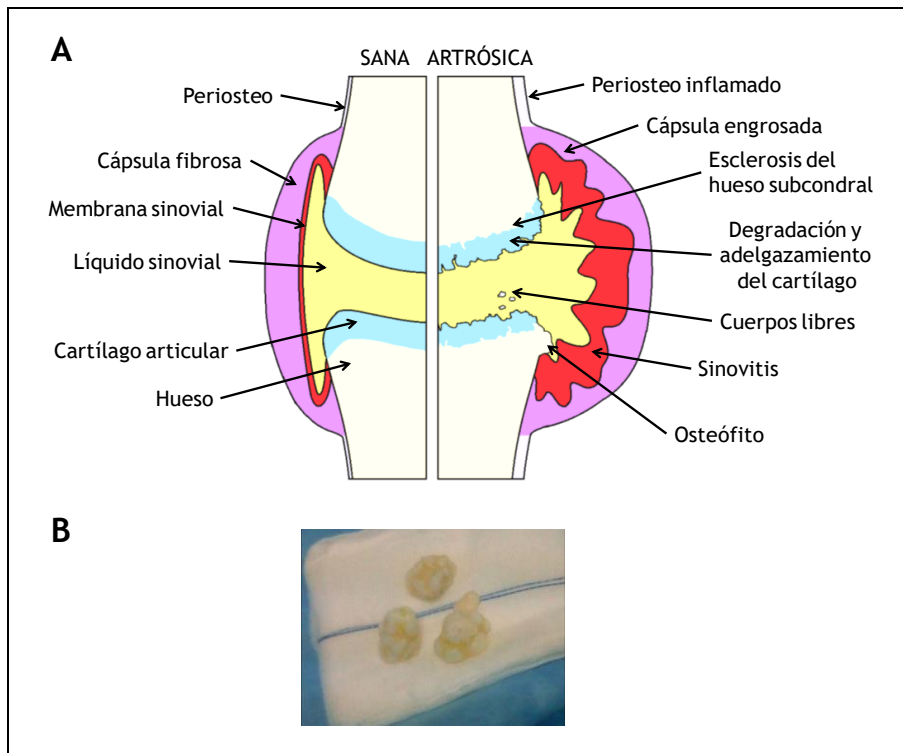


Fig. 1/1. A: Articulación sana vs. artrósica. B: Cuerpos libres articulares.

El dolor se define como el síntoma clínico más incapacitante en la artrosis. El cartílago es un tejido que carece de vasos sanguíneos, sistema linfático y terminaciones nerviosas, con lo que el dolor se percibe por la estimulación de los nociceptores localizados en la cápsula articular y estructuras circundantes mediante sustancias conocidas en conjunto como *mediadores inflamatorios* —factores solubles liberados al líquido sinovial que afectan a los tejidos y que perpetúan la progresión de la enfermedad— y fragmentos generados en la

degradación de la matriz.

Algunos autores consideran a la artrosis como una artropatía no inflamatoria. En pacientes artrósicos se observó inflamación del sinovio adyacente al cartílago degenerado, pero no se pudo detectar siempre cartílago degenerado en los casos de sinovitis. Esto sugiere que la inflamación está causada por los productos de degradación del cartílago y por mediadores inflamatorios (69, 124, 253), aunque la inflamación del sinovio o *sinovitis* tenga un papel crucial en su patogénesis. Todos los elementos anteriormente citados van a activar a los macrófagos de la membrana sinovial, que a su vez producirán y liberarán más mediadores inflamatorios. La sinovitis cursa en un 90% de los casos y está asociada al dolor, a la severidad y a la progresión de la artrosis. Si el dolor es el síntoma principal, la inflamación es factor principal asociado a los síntomas de la enfermedad y al riesgo de pérdida progresiva de cartílago. La inflamación, a su vez, podría rebajar el umbral nociceptivo (108, 162). Como el dolor y la inflamación están causados por mediadores inflamatorios, el tratamiento de primera línea recomendado para la artrosis moderada a severa son los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (213).

### 1.1.1. Prevalencia e incidencia de la artrosis<sup>1</sup>

La artrosis es uno de los motivos principales de discapacidad en adultos, pudiéndose clasificar en dos grupos: *artrosis primaria o idiopática*, que puede afectar a una o varias articulaciones, y *artrosis secundaria*. Se considera que una conjunción de factores va a llevar al desarrollo de esta patología. La mayoría de las causas clave son prevenibles en mayor o menor medida, como la obesidad, traumatismos, patologías previas, alimentación, cargas articulares anormales o excesivas relacionadas con trabajos específicos o deporte de élite; otras no son modificables como la edad, el género, densidad ósea, forma y alineación de las articulaciones, antecedentes familiares o características demográficas.

---

<sup>1</sup> La prevalencia examina los casos ya existentes mientras que la incidencia examina los casos nuevos, en un período específico.

La incidencia de la artrosis aumenta de forma progresiva con la edad, y presenta un alto grado de comorbilidad con otras enfermedades, afectando a un 10% de los varones y a un 18% de las mujeres mayores de 60 años. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se trata de un problema de salud pública a nivel mundial debido al creciente envejecimiento de la población. En 2004 la OMS calculó que el 15.9% de la población mundial —el 25.9% en los países desarrollados y el 14.3% en los menos desarrollados— tendrá más de 65 años para el año 2050, con una previsión creciente de hasta el 32.3% para el año 2300. La artrosis presenta una elevada prevalencia en adultos, apareciendo con mayor frecuencia en rodilla, cadera, mano, columna y pie, siendo las muñecas, hombros y tobillos las articulaciones menos frecuentemente afectadas (Fig. 1/2). Por su naturaleza multifactorial, se han intentado correlacionar las causas de la artrosis con su desarrollo y progresión (9, 14, 167, 179, 223, 264), no obteniéndose en todos los casos (22, 87) resultados concluyentes.

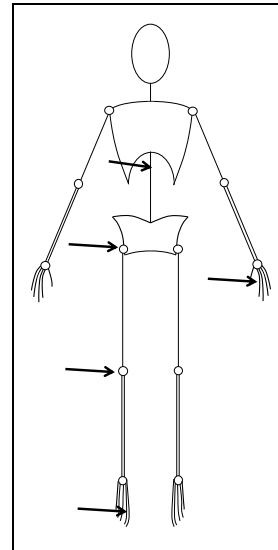


Fig. 1/2. Principales articulaciones afectadas en la artrosis.

## 1.2. LA ARTICULACIÓN SINOVIAL

Las articulaciones son las zonas de ensamblaje de los huesos que otorgan un grado de flexibilidad variable al esqueleto. Pueden clasificarse en tres grupos dependiendo del grado de movilidad que otorguen (103):

- *Sinartrosis* o articulaciones inmóviles, como las presentes en los huesos del cráneo.
- *Anfiartrosis* o articulaciones semimóviles, como las de la columna vertebral.
- *Diartrrosis* o articulaciones móviles o sinoviales, como la mayoría de las presentes en las extremidades.

La articulación sinovial es una estructura compleja en la que se pueden diferenciar varios elementos: el hueso subcondral, localizado por debajo del cartílago calcificado y que junto con el cartílago articular forma la unidad osteocondral (62), el cartílago articular hialino, la cápsula articular junto con la membrana sinovial, y otros tejidos blandos como meniscos, ligamentos y tendones.

El objeto de este estudio es el cartílago hialino, que puede ser temporal o permanente. El cartílago *temporal* es el reemplazado por hueso durante la osificación endocondral, y el *permanente* está presente —entre otros— en las articulaciones móviles, y como regla general no va a sufrir diferenciación terminal (266).

En las articulaciones, el cartílago hialino recubre el hueso subcondral y en él se integran los condrocitos y la matriz extracelular. Durante el desarrollo de una patología se pueden detectar en el sitio de la lesión los diferentes procesos de proliferación, maduración, hipertrofia y diferenciación terminal de los condrocitos antes mencionados (294).

### **1.2.1. El cartílago articular y estructuras relacionadas**

El cartílago articular es un tejido conectivo de tipo hialino y origen mesenquimal, de entre 1 y 7 mm de grosor (103, 111) que recubre la superficie de los extremos de los huesos en las articulaciones diartrodiales y que se calcifica con la edad. Se considera que es el tejido más comprometido en las patologías articulares del adulto, y una vez dañado sí es capaz de repararse, pero no es capaz de iniciar de forma espontánea un proceso regenerativo eficiente, con lo que frecuentemente se acaba formando un tejido fibroso en su lugar.

El cartílago articular adulto consta de hasta un 95% matriz extracelular, correspondiendo menos de un 2% del total al porcentaje celular. En peso húmedo, entre el 65 y el 80% de su composición sería agua, el colágeno entre un 15 y un 25%, y agregano aproximadamente un 10% del total. En peso seco, los componentes mayoritarios son entre un 30 y un 50% colágeno de tipo II y entre un 25 y un 30% proteoglucanos, principalmente agregano. El porcentaje restante

correspondería a glucoproteínas y células (43, 111, 177).

El hecho de que el cartílago articular sano sea un tejido avascular, alinfático y aneural va a influir en la oxigenación y nutrición del tejido. La presión parcial de oxígeno en las zonas profundas es menor al 1%, siendo diez veces superior en las zonas más superficiales. La ausencia de un sistema vascular implica también que la nutrición de las células y la eliminación de los deshechos se realice por difusión a través de la matriz desde y hacia el líquido sinovial durante el movimiento, y mediante transportadores de glucosa y sistemas de transporte activo a través de la membrana celular (1, 112).

A nivel estructural presenta cuatro zonas diferenciadas. Estas se mantienen a lo largo de la vida adulta salvo que se desarrolle una patología —por lesión o defectos genéticos— que rompa el equilibrio de señales que mantiene la estructura estable (Fig. 1/3). En cada zona la densidad celular va decreciendo desde la más superficial hasta la más profunda, con aumento del tamaño celular y proporción de proteoglucanos frente a colágenos (111-112, 118, 177):

- *Zona tangencial superficial o de deslizamiento* (10-20%). Es la superficie que entra en contacto con el líquido sinovial. El contenido en agua es el mayor de las zonas y está compuesta por fibras delgadas de colágeno dispuestas de forma tangencial. Los condrocitos de la zona superficial son pequeños, elongados y aplanados, dispuestos paralelamente a la superficie. Además de sintetizar y secretar lubricina, sintetizan también altas concentraciones de colágeno tipo II, pero bajas de proteoglucano.

- *Zona media o transicional* (40-60%), con haces de colágeno algo más gruesos dispuestos radialmente de forma aleatoria. Los condrocitos son redondeados y están presentes en un número menor; la concentración de proteoglucanos aumenta con respecto a la zona anterior.

- *Zona profunda o radial* (30%). En esta zona la concentración de proteoglucanos es la más alta, pero sin embargo la de agua está al mínimo nivel. En esta zona los condrocitos son redondeados y están agrupados en columnas dispuestas de forma perpendicular a la

superficie, al igual que las fibras de colágeno, mucho más gruesas que las anteriores, atravesando la línea de marea, que es el frente de calcificación, permitiendo la unión estable entre la zona profunda y la zona calcificada. Los condrocitos de la zona radial expresan marcadores de hipertrofia como colágeno tipo X (294).

- *Zona de cartílago calcificado*, localizada justo debajo de la línea de marea, separa el cartílago hialino del hueso subcondral. La línea de marea marca el frente de calcificación, y la línea de cementación marca el límite entre el cartílago calcificado y la placa de hueso subcondral (62, 103). En esta zona los condrocitos, muy escasos, expresan un fenotipo hipertrófico y están embebidos en una matriz calcificada.

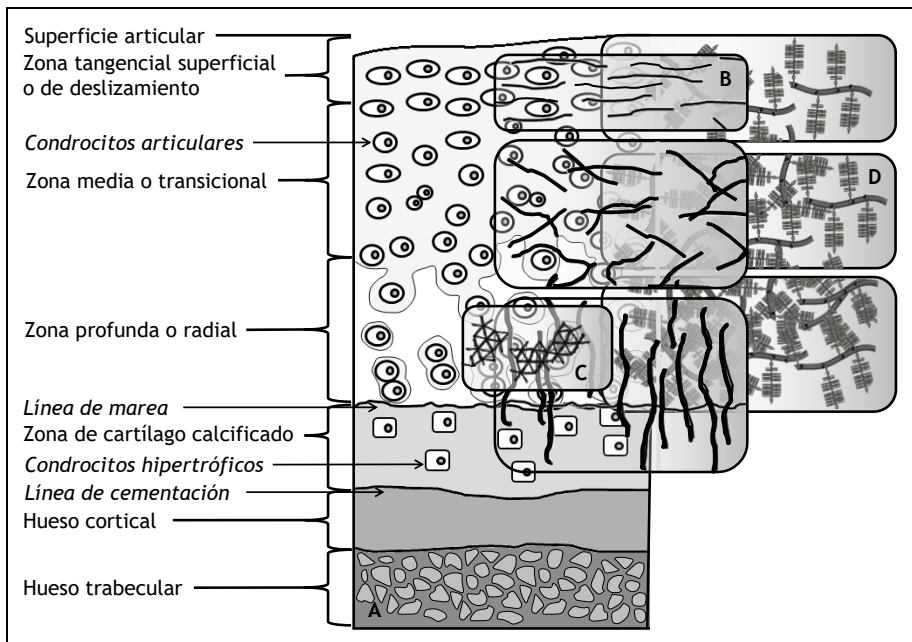


Fig. 1/3. Esquema de las zonas del cartílago articular y transición al tejido óseo.  
A: Distribución de los condrocitos en cada zona; B: Disposición de fibras de colágeno tipo II; C: Disposición de colágeno tipo X; D: Disposición de proteoglucanos.

a la lubricación continua, y también resistencia debido a presentar características viscoelásticas. Esto significa que se comporta de forma elástica bajo un impacto repentino, pero que al mismo tiempo desarrolla una deformación inelástica que amortigua la compresión en los procesos de carga sostenida (151). Esta propiedad, la de sufrir una deformación reversible y de repartir la carga sobre el hueso subcondral, tiene su origen en las características de la matriz extracelular, cuya composición, arquitectura e integridad depende directamente de los condrocitos que la secretan.

En este sentido, la capacidad de resistir las fuerzas de compresión está asociada a la capacidad de expulsar el agua cuando el cartílago se comprime. El modelo que refleja de forma más adecuada las propiedades biomecánicas de este tejido es el modelo bifásico de Mow en 1980 de respuesta al estrés mediante la interacción de las fases sólida —la matriz extracelular— y líquida —el agua— del cartílago (43).

Establecida la porosidad del entramado de la matriz en  $60\text{\AA}$  ( $1\text{\AA}=0,1\text{ nm}$ ) en condiciones normales, y en  $20\text{\AA}$  bajo compresión, cuando se aplica una carga el agua sale despacio del tejido debido a la baja porosidad y a las cargas negativas de los glicosaminoglucanos que se resisten a la pérdida del volumen acuoso: el agua soporta el estrés por compresión protegiendo el componente sólido de la matriz extracelular. Sin embargo, cuando el entramado de la matriz se ve alterado también se ve alterada su porosidad: el agua sale a mayor velocidad y el componente sólido de la matriz tiene que hacerse cargo de la amortiguación, con lo que se inicia degradación. En el caso de que lo que se produzca sea una fricción superior a la que la lubricación normal del cartílago es capaz de soportar, la superficie fibrilaría conllevando un daño progresivo del tejido.

Los condrocitos del cartílago articular adulto presentan una baja tasa de reposición y un fenotipo estable en condiciones normales. La percepción del estrés mecánico por este tipo celular es un importante modulador de su función y mientras la carga mecánica sea moderada responden de forma positiva. Por el contrario, si se producen aumentos repentinos en la carga sobre la articulación, o períodos extensos de inactividad, se desencadenan procesos catabólicos en la matriz que

conlleven la destrucción del entramado de colágeno y la pérdida de proteoglucanos (294).

En resumen, los cambios en el esfuerzo biomecánico, mediadores inflamatorios y fragmentos de la matriz generados actúan como señales promoviendo la degradación progresiva de la articulación. Esto sumado a la incapacidad de regeneración espontánea del cartílago bajo condiciones fisiológicas inicia el proceso de artrosis.

### 1.2.2. Condrocitos

Los condrocitos son el único tipo celular residente en el cartílago articular y los responsables de la síntesis, mantenimiento y degradación de la matriz extracelular. Son células altamente diferenciadas que permanecen en estado latente y en esta situación ni se multiplican ni se diferencian terminalmente. Su actividad mitótica es indetectable y su capacidad de síntesis muy baja, manteniendo estable la matriz extracelular que los rodea. Al no contener un número elevado de mitocondrias, su actividad metabólica depende del aporte de glucosa al tejido articular, y este requerimiento depende a su vez del estrés mecánico al que el tejido se vea sometido. Su densidad en el cartílago articular es escasa y disminuye con la edad. Además, su comportamiento va a estar fuertemente influenciado por las señales recibidas desde la matriz extracelular. Las propiedades y funcionalidad del cartílago van a depender del buen mantenimiento de las funciones celulares y de la estructura de la matriz extracelular. Aparte de que los condrocitos no migran a través de la matriz al sitio de la lesión, sumado a que el cartílago articular es avascular y que la respuesta inflamatoria en este tejido está ausente, la consecuencia en caso de agresión es que no se atraigan células indiferenciadas a la zona dañada, con lo que la reparación del tejido no se realizará adecuadamente (111, 177, 202).

La ruta por defecto de la diferenciación de los condrocitos es la terminal hipertrófica que concluye en apoptosis. Al comienzo de la esqueletogénesis, en el período embrionario, las células condroprogenitoras, de origen mesenquimal, se diferencian en condrocitos en un proceso conocido como *condrogénesis*, permitiendo el desarrollo de los diferentes tipos de cartílago existentes en el

organismo. En la placa de crecimiento, los condrocitos proliferan, se diferencian, maduran, entran en hipertrofia y forman la matriz calcificada sobre la que actúan los osteoclastos, para después ser invadida por vasos sanguíneos para que, finalmente, los osteoblastos depositen matriz ósea y el cartílago sea sustituido por hueso concluyendo los procesos de osificación endocondral (111, 256, 294).

La unidad básica en el cartílago articular es el *condrón* (Fig. 1/4), que consiste en condrocitos o *grupos isogénicos* localizados en sus lagunas y rodeados por su matriz pericelular. Los condrones pueden ser *simples*, conteniendo un condrocito, o *complejos*, conteniendo más de uno. Los *clústers* son múltiples condrones que comparten matriz pericelular. La *matriz pericelular* es una región estrecha característica en los condrocitos del tejido adulto, situada inmediatamente a continuación de la membrana celular y anterior a la propia matriz extracelular, con la que presenta ligeras características diferenciales como una mayor concentración de proteoglucanos o una mayor ordenación de las fibras de colágeno.

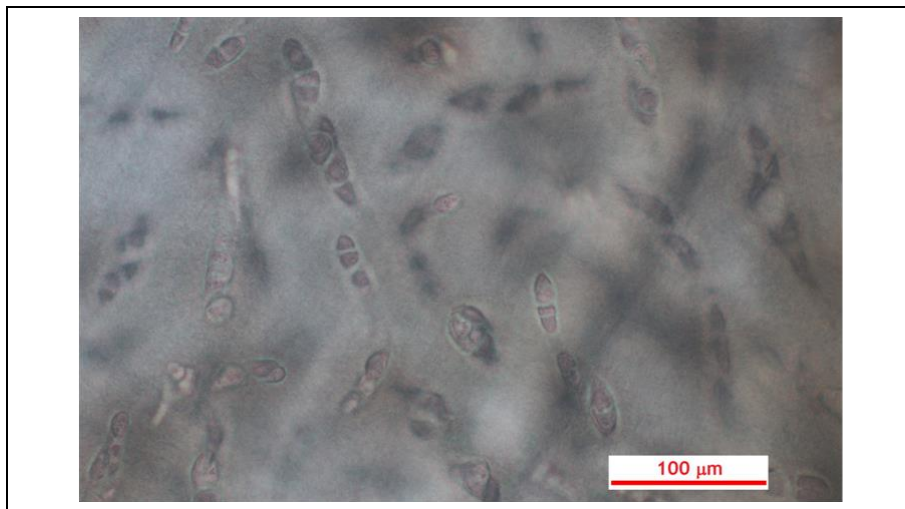


Fig. 1/4. Tejido disgregado en el que se pueden apreciar todavía condrones.

La función de esta matriz pericelular no está completamente caracterizada. Se ha hipotetizado con que la alteración de su composición o estructura provoca variaciones en la difusión y retención

de las moléculas que median la respuesta celular, atribuyéndosele la capacidad de influir sobre el tipo de respuesta de los condrocitos a las señales bioquímicas y biomecánicas provenientes del exterior (119).

Aunque en los estadios tempranos de la enfermedad los condrocitos expresan marcadores típicos que promueven la degradación del cartílago, los condrocitos presentes en la zona afectada normalmente salen de su latencia y se vuelven metabólicamente activos, aumentando la expresión génica de proteoglucanos y colágenos. Esto se ha interpretado como un intento de mantener el fenotipo por medio de la reparación del daño. Pese a todo, los intentos de reparación de la matriz deteriorada fracasan a medida que la lesión avanza puesto que los condrocitos son incapaces de hacer frente a la síntesis de una nueva matriz funcional (21, 273).

### 1.2.3. Matriz extracelular

La matriz extracelular del cartílago es secretada por los condrocitos. Estructuralmente es un entramado de fibras de colágeno —principalmente de tipos II, IX y XI— estabilizadas por entrecruzamientos moleculares, que le confiere estructura y resistencia a la tensión al cartílago. En esta red de colágeno está embebido un gel altamente hidratado de agrecano y otros proteoglucanos, que aporta resistencia a la compresión, resiliencia y ayuda al control de la difusión de las moléculas circulantes. El agrecano, al estar constituido principalmente por glicosaminoglucanos cargados negativamente, atrae cationes y con ello agua, creando grandes dominios hidrodinámicos que actúan elevando la presión osmótica del tejido. Es de esta forma como los grandes agregados de agrecano proporcionan al tejido su resistencia a la compresión (21, 36, 112).

La matriz extracelular puede ser zonificada por su proximidad al condrocito, variando en su composición según su proximidad a la célula, (43, 177):

- La *matriz pericelular* rodea a una única célula. Es rica en colágeno tipo VI, presentando también colágenos tipos II y IX y proteoglucanos. Se le adjudica un papel en la mecanotransducción (148), es decir, en la

modulación de la respuesta celular frente al microambiente y factores mecánicos.

- La *matriz territorial* rodea la región pericelular de un condrocito y está comprendida dentro de un grupo de células que incluye su matriz pericelular. En la zona profunda rodea a cada columna de células. Esta matriz es rica en proteoglucanos y en colágeno tipo II.

- La *matriz interterritorial* provee la fuerza tensional y está compuesta principalmente por una red de colágeno fibrilar tipo II asociado a colágenos tipo XI dentro del entramado, y IX hacia la superficie permitiendo la asociación con otros componentes de la matriz y la retención de proteoglucanos.

#### 1.2.4. Cápsula articular, membrana y líquido sinoviales

Estos tres elementos presentan una continuidad en la articulación (33, 103, 159, 232, 242, 253):

- La *cápsula articular* es una estructura que sujeta los extremos óseos que forman la articulación y se extiende por los bordes de las superficies articulares. Consta de una capa exterior fibrosa que es continuación del periostio, y de una membrana interna denominada membrana sinovial, que al llegar al hueso contacta con el cartilago hialino de la superficie articular.

- La *membrana sinovial* o *sinovio* reviste el interior de la cápsula articular y es la responsable de la secreción del líquido sinovial. Consta a su vez de dos elementos:

- La *capa subíntima* o *subsinovial*, que se fusiona con la cápsula articular e incluye vasos sanguíneos, linfáticos y terminaciones nociceptivas. Las células que contiene son fibroblastos, linfocitos y macrófagos, que participan en la respuesta inmune celular y humoral. Es semipermeable, permitiendo únicamente la difusión de nutrientes u otras moléculas de bajo peso molecular como factores de crecimiento o citoquinas, reteniendo las moléculas de lubricina y ácido hialurónico —ambas de

elevado peso molecular— dentro de la articulación.

○ La capa *íntima*, que entra en contacto con la cavidad articular. Contiene dos tipos celulares, A y B. Los *sinoviocitos tipo A* son macrófagos responsables de la eliminación de detritos a lo largo de la membrana sinovial, los *sinoviocitos tipo B* son mayoritarios, de tipo fibroblástico y producen ácido hialurónico.

• El *líquido sinovial*, que es un líquido viscoso dentro de la articulación y cuya función es la de lubricar y disminuir la fricción entre las superficies articulares, posibilitando el movimiento. Su volumen en las articulaciones humanas sanas es de apenas un par de mililitros (0.5-2.0 ml). En su composición se encuentra ácido hialurónico, lubricina y fosfolípidos activos de superficie, que se adsorben e interaccionan con la superficie —hidrofóbica— del cartílago articular permitiendo el desplazamiento suave de las superficies en contacto. Estos compuestos, además de lubricar y reducir la fricción, eliminan los depósitos de proteínas plasmáticas que hubieran penetrado a través del sinovio y que podrían alterar la superficie articular o la viscosidad o composición del líquido sinovial. En este líquido sinovial también se van a encontrar mediadores de la respuesta inflamatoria y productos resultantes de la lesión en el tejido.

### 1.3. HOMEOSTASIS DEL CARTÍLAGO

Los condrocitos se encuentran dispersos en el cartílago hialino sano sin que exista contacto directo entre ellos, así que la comunicación entre las células depende de una interacción constante entre ellas y la matriz, que es la que les transduce las señales mecánicas del entorno (102). Se sabe que no todas las proteínas presentes en la matriz son potencialmente mecanosensitivas, pero las que sí lo son están situadas en áreas estratégicas en donde es más probable que se sufra una carga mecánica como puede ser la periferia —la matriz pericelular— y estructuras subcelulares. Estas proteínas estarían ancladas a la membrana, a elementos de la matriz o a ambas estructuras (126).

En el cartílago sano se mantiene un equilibrio entre los procesos

anabólicos y catabólicos para preservar la integridad del cartílago, aunque, en contraste, la tasa de reposición de los componentes de la matriz es baja debido al estado de latencia y el bajo metabolismo de los condrocitos. Diversos estímulos —estrés mecánico, oxidativo, traumatismo, moléculas señal— interrumpirían esa latencia, originando un desequilibrio en donde predominarían los procesos catabólicos. En el caso de la artrosis, la integridad de la matriz se ve comprometida al reactivarse procesos que inducen cambios fenotípicos similares a los que ocurren durante la esquelotogénesis, induciendo la remodelación de la matriz y dirigiendo a las células a la diferenciación hipertrófica que culminaría con la muerte celular y calcificación del cartílago. Entre los mediadores catabólicos que regulan estos procesos se encuentran diferentes citoquinas, que a su vez estimulan la síntesis de otras citoquinas y proteasas, prostaglandinas y óxido nítrico, creando sinergias y suprimiendo la expresión de genes asociados al fenotipo diferenciado de los condrocitos, incluyendo los genes de agrecano y de colágeno tipo II que son los principales constituyentes de la matriz y los que le otorgan sus propiedades al cartílago (102, 108, 112, 253). El resultado es la pérdida de las propiedades mecánicas del cartílago y su incapacidad para mantener su resistencia a la deformación, capacidad hídrica e integridad del tejido (99). La señalización autocrina y paracrina es esencial en la extensión de la patología a toda la articulación, y esta viene dada por la capacidad de los factores solubles de difundir a través del líquido sinovial para llegar a los diferentes tipos celulares presentes en los tejidos anejos. Aunque estas células van a reaccionar a los componentes liberados al líquido sinovial y van a contribuir a la progresión de la artrosis, la mayoría de los procesos degradativos se encuentran en el propio cartílago (124).

La proteólisis de los proteoglucanos y la pérdida de las regiones ricas en glicosaminoglucanos del agrecano es uno de los eventos iniciales en la artrosis. Si la situación es favorable se pueden reemplazar rápidamente, ya que la pérdida de agrecano ocurre con anterioridad a la degradación del colágeno tipo II. El agrecano protegería al entramado colagénico de la acción de las proteinasas, así que la disrupción de la red de colágeno representa un punto de no retorno en la degradación del cartílago. La progresión de la patología viene dada por la

sobreproducción de citoquinas que mantienen el fenotipo catabólico de los condrocitos, causando la degeneración paulatina del cartílago y haciendo que la patología entre en un círculo vicioso degenerativo (47, 69, 239, 248).

En estas fases más tempranas de la enfermedad el cartílago pierde su habilidad para mantener agua y proteoglicanos, y se puede detectar un aumento en la producción de citoquinas catabólicas (como IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ ), proteinasas (como MMP-13) y agreginasas. Los daños comienzan a apreciarse en la superficie del cartílago en la forma de pérdidas localizadas de proteoglicanos y rotura de las fibras de colágeno tipo II:

- La pérdida de agregano provoca una merma de las capacidades compresiva del cartílago, y la sobrecompresión que se genera estimula la secreción de proteasas lo cual favorece el daño tisular.
- La proteólisis del colágeno tipo II ocasiona la pérdida de la resistencia tensional contribuyendo al aumento de la hidratación del cartílago articular, ya que pierde la capacidad de regular el secuestro de agua por los proteoglicanos, permitiendo con ello que se hidraten más de lo normal.

La proliferación y la formación de condrones es característica en los primeros estadios de la patología en respuesta a las citoquinas catabólicas, que también potencian el aumento en la expresión génica de COX-2, aumentando los niveles de prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>). La PGE<sub>2</sub> tiene un carácter dual y en este momento participaría en los procesos anabólicos estimulando la síntesis de colágeno tipo II y de proteoglicanos en un supuesto intento de compensar la pérdida de la matriz. El cartílago articular aparecería más grueso de lo normal en esta fase, aunque solamente sería de forma transitoria ya que el daño causado a la matriz sería irreversible debido a las limitaciones del condrocito adulto respecto a su capacidad de reparación. Aunque se genera nueva matriz, ésta es de calidad inferior y es más susceptible a la degradación. Una vez iniciado el patrón alterado de la expresión génica, la presencia de nuevos compuestos y la expresión de

marcadores hipertróficos favorecen el desarrollo de la patología (69, 109, 112, 257).

A medida que progresa la enfermedad, los proteoglucanos comienzan a perder la capacidad de agregación de sus glicosaminoglucanos a la par que disminuye su producción, seguida de una degradación severa del colágeno tipo II. Cuando la proporción de proteoglucanos llega a un valor crítico, los niveles de agua que en un principio habían aumentado caen por debajo de lo normal. Al mismo tiempo se produce un incremento en la expresión de citoquinas proinflamatorias, colagenasas y agrecanasas, y una disminución de la síntesis de sus inhibidores, dirigiendo al cartílago hacia una degradación definitiva (69, 257, 294).

Aparte de la muerte celular debida al desenlace de los procesos de calcificación, el número de condrocitos se va a ver afectado debido a PGE<sub>2</sub>. La síntesis de PGE<sub>2</sub>, en colaboración con citoquinas y otros mediadores, va a promover la apoptosis de los condrocitos al alterar la función mitocondrial, disminuyendo el número de células que podrían colaborar en hacer frente al daño y colaborar en la restauración (108, 202).

#### **1.4. ANALGÉSICOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINES)**

Los AINEs son un grupo farmacológico que actúa inhibiendo las isoformas de la enzima ciclooxigenasa (COX) impidiendo con ello la transmisión del estímulo nervioso en los sitios de inflamación al bloquearse la síntesis de prostanoides a partir del ácido araquidónico (61). Están entre los fármacos más prescritos a lo largo de las últimas décadas para el tratamiento de la sintomatología de la artrosis por su acción antiinflamatoria, analgésica y antipirética, aunque la mayor parte de sus efectos adversos están relacionados con la inhibición de la síntesis de las prostaglandinas y su seguridad en relación con los trastornos gastrointestinales, cardiovasculares y renales que pueden provocar limita su uso en muchos pacientes (44, 211). En el año 2017, la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) emitió un informe respecto al consumo de AINEs en España para el período 2013-2016. En él se refleja una merma en el consumo

de AINEs a lo largo de ese período, pero también se detalla que el subgrupo de AINEs de mayor consumo había sido el de derivados del ácido propiónico, seguido por el de los coxibs, encontrándose en tercer lugar el de los derivados del ácido acético con el diclofenaco el fármaco de mayor consumo dentro del subgrupo (4, 61) (Tabla 1/1).

Tabla 1/1. Clasificación de los AINEs en estudio según su grupo químico.

Grupo	Subgrupo	AINE
Ácidos carboxílicos	Ácidos acéticos	
	Ácidos indol e indenacéticos	Indometacina
	Ácidos heteroarilacéticos	Diclofenaco
Inhibidores selectivos COX-2 (Coxibs)	Sulfonamidas	Celecoxib

Los AINEs se absorben rápidamente después de su administración por vía oral, y se unen a proteínas plasmáticas en porcentajes superiores al 95%, sobre todo a la albúmina, en los fluidos extracelulares. El metabolismo de todos ellos se realiza en el hígado y la excreción es renal. La unión a proteínas es un factor importante puesto que al aumentar la dosis de fármaco o disminuir la concentración de proteínas plasmáticas puede provocar el aumento de la fracción de fármaco libre, que es la que va a poder salir del sistema vascular para producir el efecto deseado, ya que si es captado por estas proteínas plasmáticas no podrá actuar. Los fármacos tienden a acumularse en el líquido sinovial, en donde la concentración de proteínas es entre un 50 y un 80% menor que en plasma, con lo que la fracción de fármaco libre es mayor y permanece más estable (61, 278).

#### 1.4.1. Indometacina

La indometacina (Fig. 1/5) se introdujo en la práctica clínica a principios de los años sesenta. Presenta gran actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética.

Es un AINE no selectivo, tiempo dependiente (Tabla 1/2), que actúa impidiendo la síntesis de prostaglandinas al inhibir de forma reversible la actividad de las isoformas COX-1 y -2 en el sitio de inflamación (60, 83, 275).

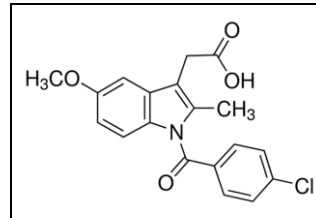


Fig. 1/5. Indometacina.

Tabla 1/2. Indometacina.

Nomenclatura sistemática (IUPAC)	Ácido 1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-1H-indol-3 acético
Fórmula química	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> ClNO <sub>4</sub>
PM	35779
Número CAS	53-86-1
Solubilidad en DMSO	72 mg/mL (200 mM) (288)
Semivida	3-11 horas (82-83), 4'5 horas (203)
Aclaramiento	1'4 mL/min/Kg (83)
Biodisponibilidad (oral)	98% (83)
Unión a proteínas plasmáticas	90% (83)
Metabolismo	Hepático (83)
Eliminación	Orina y heces (83)
No se recomienda almacenar las soluciones acuosas de indometacina más de 1 día.	

#### 1.4.2. Diclofenaco sódico

El diclofenaco (Fig. 1/6) se desarrolló en los años setenta demostrando gran capacidad antiinflamatoria, analgésica y antipirética, siendo mayor su efecto antiinflamatorio.

Es también un AINE no selectivo, tiempo dependiente (Tabla 1/3) y uno de los inhibidores más efectivos de la enzima COX, que actúa

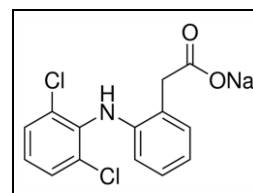


Fig. 1/6. Diclofenaco.

impidiendo la síntesis de prostaglandinas mediante la inhibición pseudo reversible de la actividad de sus isoformas 1 y 2 (60, 83).

Tabla 1/3. Diclofenaco sódico.

Nomenclatura sistemática (IUPAC)	Sal monosódica del ácido 2-[(2,6-diclorofenil)amino]-bencenoacético
Fórmula empírica	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> NaNO <sub>2</sub>
PM	318'13
Número CAS	15307-79-6
Solubilidad en DMSO	31'81 mg/mL (100 mM) (267)
Semivida	2 horas (209, 211)
Aclaramiento	350 mL/min/Kg (83)
Biodisponibilidad (oral)	Superior al 99% (83) *en ausencia de alimento
Unión a proteínas plasmáticas	Superior al 99% (83), principalmente albúmina (63)
Metabolismo	Hepático (83)
Eliminación	60-70% orina, y heces (63,83)
No se recomienda almacenar las soluciones acuosas de diclofenaco sódico más de 12 horas.	

### 1.4.3. Celecoxib

El celecoxib (Fig. 1/7) presenta propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas. Es un AINE integrado en el grupo de los coxibs, inhibidores selectivos de la actividad de la enzima COX-2 (Tabla 1/4). Además de ser un inhibidor irreversible fuerte, tiempo dependiente, de COX-2 es también un inhibidor débil, reversible y tiempo independiente de la isoforma COX-1 (61, 275).

Los inhibidores selectivos de COX-2 fueron introducidos en el año 1999 (40) y se desarrollaron para producir analgesia y efecto antiinflamatorio reduciendo los efectos tóxicos gastrointestinales asociados a los AINEs no selectivos (215).

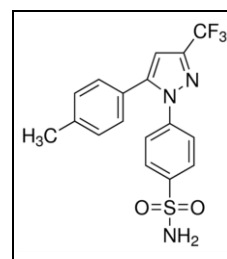


Fig. 1/7. Celecoxib.

Tabla 1/4. Celecoxib.

<b>Nomenclatura sistemática (IUPAC)</b>	4- [5- 4- metilfenil)- 3- (trifluorometil)- 1H- pirazol- 1- ilo] bencenosulfonamida
<b>Fórmula química</b>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S
<b>PM</b>	381'37
<b>Número CAS</b>	169590-42-5
<b>Solubilidad en DMSO</b>	100 mg/mL (262 mM) (149)
<b>Semivida</b>	8-11 horas (95, 107, 185, 237, 260)
<b>Semivida de eliminación</b>	0'6 mL/min/Kg (83)
<b>Biodisponibilidad (oral)</b>	99% (48)
<b>Unión a proteínas plasmáticas</b>	-97% (95, 107, 260)
<b>Metabolismo</b>	Hepático (83)
<b>Eliminación</b>	27%, orina; 57%, heces (83)
No se recomienda almacenar las soluciones acuosas de celecoxib más de 1 día.	

El celecoxib fue el primer inhibidor altamente selectivo de COX-2 aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) americana. A concentraciones clínicas parece que el celecoxib no inhibe la COX-1 y ejerce su actividad en el sitio de inflamación inhibiendo selectivamente a COX-2 (95) disminuyendo con ello la síntesis de prostaglandinas (83)

Existe gran variabilidad entre pacientes a la respuesta al tratamiento por celecoxib debido a la heterogeneidad en la metabolización del fármaco a causa de los diversos polimorfismos existentes en el citocromo P-450 2C9 —CYP2C9—, la principal enzima responsable de su metabolismo (80, 95, 115).

## 1.5. COMPONENTES MOLECULARES

Los componentes celulares y mediadores estudiados son solo una pequeña parte entre todos los elementos que participan en el desarrollo y progresión de la enfermedad.

## 1.5.1. Enzimas

### 1.5.1.1. Ciclooxygenasa (COX)

La COX es una enzima clave en la biosíntesis de las prostaglandinas, y puede actuar al mismo tiempo como ciclooxygenasa (COX) y peroxidasa (POX), catalizando los dos primeros pasos en la síntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico (AA).

Fue conocida inicialmente como *prostaglandina sintetasa*, pero se le cambió el nombre al no utilizar ATP, denominándose desde entonces como *prostaglandina G/H sintasa* (PGHS), *prostaglandina H2 sintasa*, *prostaglandina endoperóxido sintasa* (PTGS), o simplemente COX aludiendo a una de sus dos actividades enzimáticas. En vertebrados existen dos isozimas de PTGS, la constitutiva PTGS1, con sus variantes COX-1 y COX-3 —la cual sigue siendo objeto de estudio y abunda en el córtex cerebral y corazón— y la inducible PTGS2 o COX-2 (Fig. 1/8).

Ambas isozimas están codificadas por genes distintos con un 60% de homología en la región catalítica del AA (50, 51, 83, 227), sin embargo, el cambio de un único aminoácido en la posición 523, isoleucina en COX-1 por valina en COX-2, es crítico para la selectividad por COX-2 de los coxibs (127). Para cualquiera de las isoformas la forma funcional es un homodímero en el que cada monómero consta de un canal hidrofóbico y tres dominios diferentes (60, 77, 227, 243):

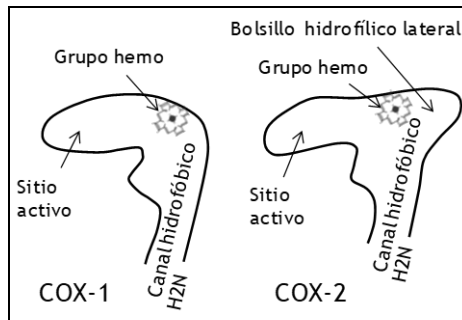


Fig. 1/8. Monómeros de COX1 y COX2.

- *Dominio de factor de crecimiento epidérmico*, N-terminal, responsable de la dimerización de la enzima.
- *Dominio de unión a membrana*, que forma el canal hidrofóbico en el centro del dominio catalítico

- *Dominio catalítico*, C-terminal, que contiene los sitios activos de COX y peroxidasa, presentando dos lóbulos y una hendidura en donde se encuentra el sitio activo peroxidasa y se une el grupo prostético hemo; los fármacos en estudio se unen a este dominio causando una pérdida total o casi total de la actividad de la enzima

Hay que destacar que el dímero en sí actúa como un *heterodímero conformacional*, en el que uno de los monómeros presenta actividad alostérica, regulatoria, y el otro, actividad catalítica, funcional. Ambos monómeros son interdependientes, pero por cada dímero solo puede haber actividad COX en un único sitio activo (77, 243).

El AA es un ácido graso poliinsaturado de 20 carbonos liberado de la membrana plasmática por fosfolipasas A2 (PLA2) tras la recepción de un estímulo (Fig. 1/9). En la enzima, el sitio activo *ciclooxigenasa* —también llamado *bis-dioxigenasa*— es el canal hidrofóbico que se abre en el dominio de unión a la membrana y que es por donde penetra el AA. Por medio de la actividad COX se añaden dos moléculas de oxígeno al AA generando prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>).

PGG<sub>2</sub> va a difundir al sitio *peroxidasa*, que es una hendidura en la superficie de

la enzima en la región que contiene al grupo hemo (18, 51). Para que la actividad peroxidasa se lleve a cabo se necesita la oxidación del grupo hemo, resultando en la reducción de PGG<sub>2</sub> a prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), el precursor común de todos los prostanoides, que serán posteriormente sintetizados por sus sintasas específicas (44, 88, 241, 268) (Fig. 1/10).

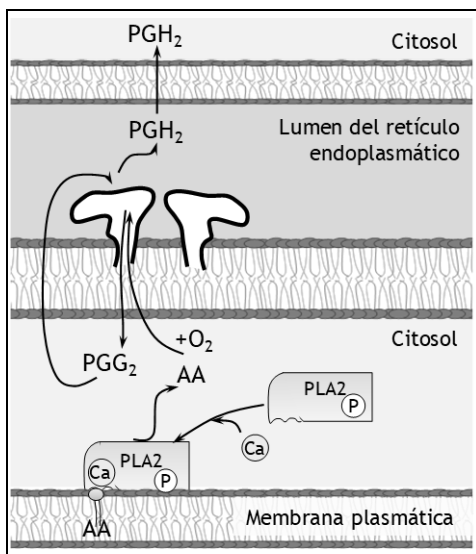


Fig. 1/9. Producción de PGH<sub>2</sub>.  
PLA2: Fosfolipasa A2. AA: Ácido araquidónico. PGG<sub>2</sub>: Prostaglandina G<sub>2</sub>.  
PGH<sub>2</sub>: Prostaglandina H<sub>2</sub>.

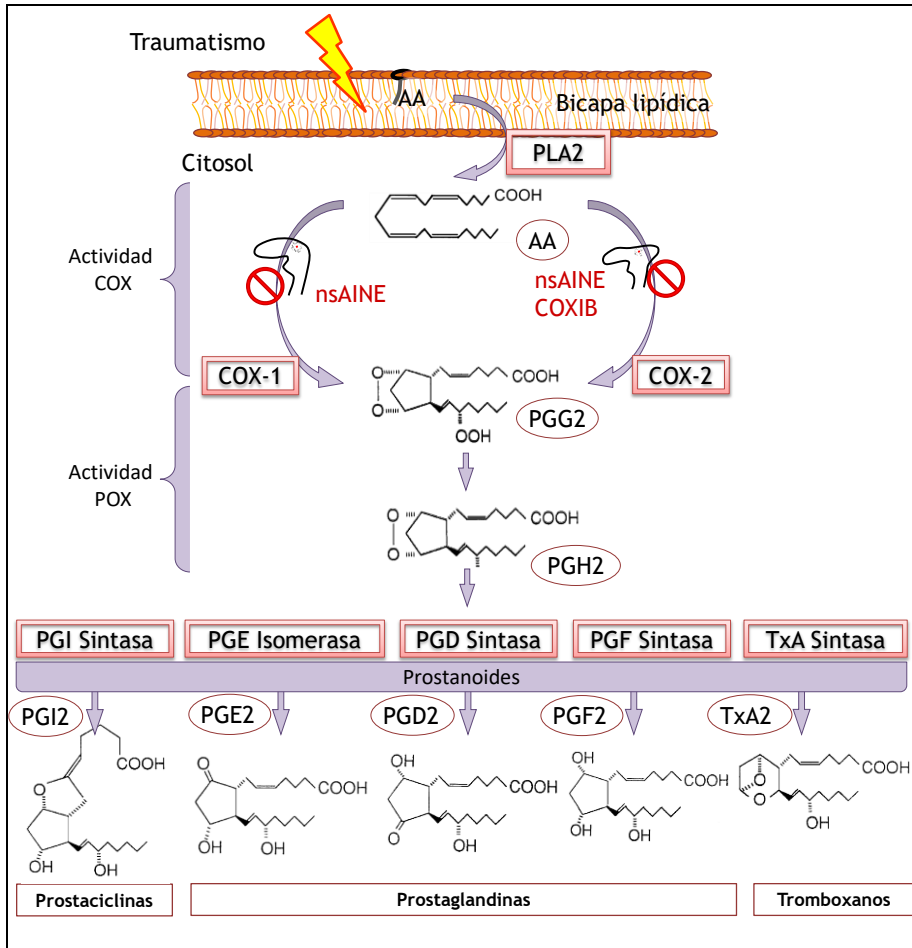


Fig. 1/10. Ruta de biosíntesis y acciones de los prostanoides (vía COX). AA: ácido araquidónico; PLA2: fosfolipasa-2; COX: ciclooxigenasa; POX: peroxidasa; nsAINE: AINEs no selectivos; COXIB: Inhibidores selectivos de COX-2; PG: prostaglandina.

#### 1.5.1.1.1. Ciclooxygenasa 1 (COX-1)

COX-1 es una proteína integral de membrana localizada principalmente en el retículo endoplasmático. Es una isoforma ubicua y se expresa de forma constitutiva —en condiciones basales, en células en reposo— en prácticamente todos los tejidos. Su activación permite

la síntesis de prostaciclina que cuando son liberadas median respuestas fisiológicas de tipo homeostasis renal, citoprotección gástrica, y de antiagregación plaquetaria al permitir la biosíntesis de tromboxanos  $\text{TxA}_2$  (83)

#### *1.5.1.1.2. Ciclooxygenasa-2 (COX-2)*

COX-2 es una proteína integral de membrana localizada principalmente en el retículo endoplasmático. Se expresa en un número limitado de tipos celulares, su actividad es apenas detectable a nivel basal en el cartílago normal y, respondiendo a su función, inducible en los sitios de inflamación como el cartílago artrósico (83, 88, 124, 218).

La expresión de COX-2 responde al estrés mecánico, ya que la compresión sería uno de los eventos que inducirían la síntesis y liberación de grandes cantidades de prostaglandinas, especialmente  $\text{PGE}_2$ , en los tejidos inflamados. Esto incluiría a COX-2 dentro del grupo de genes mecanosensitivos (116).

Su expresión también está relacionada con la remodelación de la matriz en respuesta a mediadores inflamatorios como  $\text{IL-1}\beta$  o  $\text{TNF}\alpha$ . La consiguiente producción de  $\text{PGE}_2$  se correlacionaría con la degradación de proteoglucanos, así que la inhibición de COX-2 sería, *a priori*, una medida preventiva contra la degradación de proteoglucanos inducida por estos mediadores (69).

#### *1.5.1.1.3. Papel de la prostaglandina $E_2$ ( $\text{PGE}_2$ )*

Los factores clave en los procesos inflamatorios son las prostaglandinas. Las prostaglandinas son moléculas de origen lipídico del grupo de los eicosanoides, sintetizadas a partir del AA vía COX. Los efectos de estas moléculas en el metabolismo de los condrocitos son complejos e incluyen el aumento de la síntesis de colágeno tipo II, la promoción de la apoptosis y la activación de metaloproteinasas y agregasas (69).

A nivel fisiológico,  $\text{PGE}_2$  es esencial para el mantenimiento de la homeostasis en las funciones de diferentes órganos. Paralelamente es considerada un importante mediador proinflamatorio (18, 144) ya que

se ha observado que se libera de forma espontánea en grandes cantidades en patologías inflamatorias, como la artrosis, cuando se compara con el cartílago sano (17, 138).

En este sentido y aunque sus efectos sean predominantemente catabólicos, PGE<sub>2</sub> tiene una actividad dual en el cartílago artrósico (252): se relaciona con IL-1 $\beta$  de forma que ambas moléculas aumentan su liberación, estimulando la secreción de MMP-13 e inhibiendo la síntesis de proteoglucanos, además de potenciar la degradación del colágeno tipo II y del agrecano (17, 213).

Por sí sola, PGE<sub>2</sub> no produce ningún efecto en la rotación de los proteoglucanos del cartílago sano (295), pero en presencia de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , que estimulan su producción, la rotación aumenta y la propia PGE<sub>2</sub> potencia el daño (2) al estimular la secreción de MMP-13 y agreganasas potenciando con ello degradación de agrecano y colágeno tipo II, al mismo tiempo que inhibe la síntesis de proteoglucanos. Se han estudiado las concentraciones a las que se ejercerían estos efectos catabólicos, que se incluyen en el rango de nano (10<sup>-9</sup>) a micromolar (10<sup>-6</sup>). A concentraciones menores, del rango de picomolar (10<sup>-12</sup>), PGE<sub>2</sub> sería capaz de revertir el deterioro inducido por IL-1 $\beta$ , inhibiendo la degradación de los proteoglucanos, estimulando la proliferación y la síntesis de colágeno tipo II y de los propios proteoglucanos (17, 141, 252). En resumen, con la inhibición de PGE<sub>2</sub> se prevendría el daño inducido por citoquinas (182, 193) y se mejoraría la síntesis de proteoglucanos en el cartílago artrósico (180). Respecto a su relación con los eventos apoptóticos, sí se ha comprobado que por sí misma, PGE<sub>2</sub> tampoco induce la muerte celular pero sí potencia la muerte celular inducida por óxido nítrico (NO), una molécula mensajera implicada en procesos catabólicos de inflamación y destrucción de tejidos articulares (2, 202).

#### 1.5.1.1.4. COX y AINEs

Los fármacos inhibidores de COX pueden ser selectivos o no selectivos, pudiendo clasificarse en 4 grupos diferentes (95):

##### 1. Inhibidores selectivos de COX-1

2. Inhibidores no selectivos de COX (indometacina y diclofenaco)
3. Inhibidores con moderada selectividad por COX-2
4. Inhibidores altamente selectivos de COX-2 (celecoxib)

Que un fármaco sea considerado un inhibidor selectivo de alguna de las isoformas quiere decir que, aunque se pueda unir con igual eficacia a ambas isoformas, presenta una mayor afinidad por una que por la otra. En el caso de COX, esta selectividad la marcan los aminoácidos que componen sus isoformas. Los AINEs no selectivos se unen generalmente a COX por Arg120 por su grupo carboxilo (Fig. 1/11), bloqueando en cualquier caso la entrada del sustrato a la enzima, como es el caso de la indometacina.

En el caso del diclofenaco, este se une a COX por Ser530. Debido a su tamaño, Ile523, Ile434 e His513 obstruyen el acceso de los coxibs, por tanto, los coxibs no se unen a COX-1. La sustitución por Val523, Val434 y Arg513 crea un bolsillo hidrofílico lateral que permite el acceso de los coxibs.

En el caso del celecoxib en lugar de un grupo carboxilo aparece un grupo sulfonamida, que es el que va a permitir la unión a COX-2 por Arg513 (40, 60, 127).

La selectividad por las isozimas de COX se define por  $IC_{50}$  o *concentración inhibitoria*, la concentración de fármaco necesaria para inhibir la producción de prostaglandinas un 50%, entendiéndose que, a menor valor, mayor potencia del fármaco. Para comparar la selectividad de los diversos inhibidores entre las isoformas -1 y -2 de COX se utiliza el índice de selectividad, SI (218).

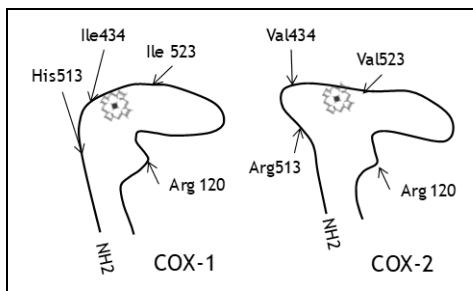


Fig. 1/11. Aminoácidos representativos para la interacción de los fármacos con COX.

Esta ratio, a pesar de ser una herramienta útil para comparar la potencia de diferentes AINEs, tiene el inconveniente de que es un valor variable: en la literatura se recalca que los valores  $IC_{50}$  para cada isoforma de COX no solo varían entre especies, si no que también varían dependiendo del tipo celular estudiado o si ha sido medido en células intactas u homogenados celulares (Tabla 1/5).

Tabla 1/5.  $IC_{50}$  para COX-1 y COX-2.

Fármaco	Ref.	$IC_{50}$ COX-1	$IC_{50}$ COX-2	SI (COX1/COX2)
Indometacina	(269) (*1)	0'028 $\mu$ M	1'680 $\mu$ M	0,017
	(30) (*2)	0'063 $\mu$ M	0'48 $\mu$ M	0'131
	(104) (*3)	0'1 $\mu$ M	1'0 $\mu$ M	0'1
	(104) (*4)	0'3 $\mu$ M	0'1 $\mu$ M	3
	(218) (*4)	0'013 $\mu$ M	1'0 $\mu$ M	0'013
Diclofenaco	(269) (*1)	1'57 $\mu$ M	1'10 $\mu$ M	1'427
	(30) (*2)	0'611 $\mu$ M	0'63 $\mu$ M	0'96
	(104) (*3)	0'03 $\mu$ M	0'01 $\mu$ M	3
	(104) (*4)	0'2 $\mu$ M	0'02 $\mu$ M	10
	(218) (*4)	0'075 $\mu$ M	0'038 $\mu$ M	1'97
Celecoxib	(214) (*3)	15 $\mu$ M	0'04 $\mu$ M	375
	(104) (*3)	15 $\mu$ M	0'04 $\mu$ M	375
	(104) (*4)	8'3 $\mu$ M	0'3 $\mu$ M	27'6
	(218) (*4)	6'7 $\mu$ M	0'87 $\mu$ M	7'7
(*1): Valores en células intactas: Macrófagos murinos; (*2): Valores en células intactas: Condrocitos humanos; (*3): Enzimas recombinantes humanas; (*4) Valores en muestras sanguíneas humanas; SI: índice de selectividad (ratio COX-1/COX-2).				

Basándonos en el  $IC_{50}$ , la indometacina y el diclofenaco pertenecerían al grupo de fármacos que inhiben con escasa selectividad ambas isoformas de COX. Por el contrario, el celecoxib se incluiría en el grupo de fármacos cuya potencia por la isoforma -2 es mucho mayor.

Las reacciones adversas con el uso de AINEs son frecuentes. Esto es debido a que la acción antiinflamatoria de los AINEs responde a la inhibición de COX-2 y los efectos adversos a la inhibición de COX-1. Aunque los fármacos sean usados a sus dosis terapéuticas y demuestren propiedades antiinflamatorias similares, van a producir efectos adversos diferentes que responden a una mayor especificidad por COX-1 que por COX-2, con lo que uno de los grandes problemas del tratamiento con AINEs es la aparición de trastornos gastrointestinales, que aparecen en respuesta a la inhibición de la actividad de COX-1. La indometacina, como presenta mayor potencia por esta isoforma, está entre los fármacos que provocan mayor toxicidad gastrointestinal.

Estos efectos adversos se explican con la inhibición de la síntesis de la prostaciclina PGI<sub>2</sub> debida a la inhibición no selectiva de COX. PGI<sub>2</sub> es una prostaglandina antitrombótica, vasodilatadora, que previene la activación plaquetaria y neutraliza la acción de los TxA<sub>2</sub>, prostaglandinas protrombóticas, aumentando el riesgo de sangrado gástrico. PGI<sub>2</sub> también es responsable de la homeostasis renal con lo que con su inhibición también se aumenta el riesgo de trastornos renales.

En relación con los efectos adversos (Fig. 1/12), los inhibidores selectivos de COX-2, *coxibs*, se desarrollaron para producir efectos antiinflamatorios, analgesia, y reducir los efectos secundarios de los AINEs tradicionales. Como son altamente selectivos por COX-2 presentan la ventaja de no alterar la síntesis de prostanoïdes a través de COX-1. Sin embargo, el uso de *coxibs* puede aumentar el riesgo de sufrir trastornos

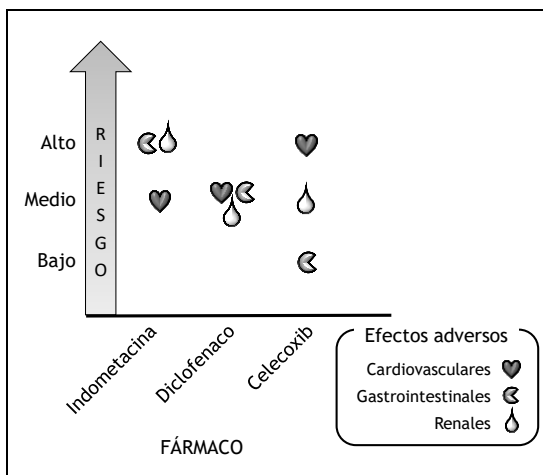


Fig. 1/12. Riesgo de efectos adversos de los fármacos en estudio.

cardiovasculares ya que la alteración selectiva de la ratio  $\text{PGI}_2\text{-TxA}_2$  hacia los tromboxanos aumenta el riesgo de trombosis (44, 56, 95, 137, 247).

Analizando los efectos secundarios de los fármacos en estudio, el celecoxib sería el de menos riesgo gastrointestinal, el diclofenaco el de riesgo medio, y la indometacina la de riesgo alto. Por otra parte, el celecoxib presentaría un riesgo cardiovascular elevado al favorecer eventos trombóticos, mientras que diclofenaco e indometacina tendrían riesgos moderados (46, 100, 186). A nivel renal, el riesgo es relativamente alto con indometacina, e intermedio con diclofenaco y celecoxib (100).

Los efectos adversos son más frecuentes en pacientes artrósicos de edad avanzada a tratamiento con AINEs porque presentan mayor comorbilidad con otras afecciones propias de la edad, como disminución de la masa hepática o alteraciones en la circulación sanguínea y en la función renal. Otros factores que pueden intervenir en la aparición de efectos adversos son el tabaquismo y el consumo de alcohol. Como los AINEs pueden desplazar o ser desplazados de sus sitios de unión por otros fármacos, el uso simultáneo de otros medicamentos también aumenta la posibilidad de desarrollar reacciones cruzadas (56, 61).

#### 1.5.1.2. Metaloproteinasas de matriz (MMPs)

Las MMP son proteinasas enclavadas dentro de la familia M10 dentro del clan MA de las endopeptidasas, pudiendo ser de dos tipos: *secretadas* o *de anclaje a la membrana*. Están relacionadas con la actividad proteolítica y la remodelación tisular, así que su regulación es a nivel de mRNA para evitar su acción anticipada. Son sintetizadas como preproenzimas y expresadas como *zimógenos* —proenzimas inactivas— una vez que el péptido señal es eliminado, requiriendo de un procesado posterior para desarrollar su actividad. La composición de sus dominios en su estructura va a determinar la especificidad por el substrato, y según estos dos aspectos se van a poder categorizar en diferentes grupos (69, 197, 230).

### 1.4.1.2.1. Metaloproteínasa de matriz-13 (MMP-13)

La MMP-13 —también llamada colagenasa-3— (Fig. 1/13) pertenece las denominadas *colagenasas*, un grupo de MMPs secretadas que escinden preferentemente cadenas de triple hélice de colágeno. Es la más potente de las tres colagenasas conocidas y se sintetiza como preproenzima con activación extracelular. El péptido señal se elimina durante la traducción, se origina el zimógeno proMMP-13, y la enzima se mantiene latente en tanto en cuanto su prodominio se mantenga unido. Estructuralmente, presenta un péptido señal y un propéptido en el extremo N-terminal, seguido de un dominio catalítico con zinc en el sitio activo, una región bisagra, y un dominio con homología a la proteína sérica hemopexina en el extremo C-terminal, que determina la especificidad por el sustrato y se encarga de interactuar con los componentes de la matriz extracelular (69, 166, 197, 205, 230).

La expresión de MMP-13 se va a realizar por los condrocitos hipertróficos con una diferenciación más terminal (155, 294) y va a estar fuertemente influenciada por cascadas de señalización inflamatorias mediadas por citoquinas y otros factores (157). En el cartílago sano adulto, su expresión va a ser escasa o nula (230).

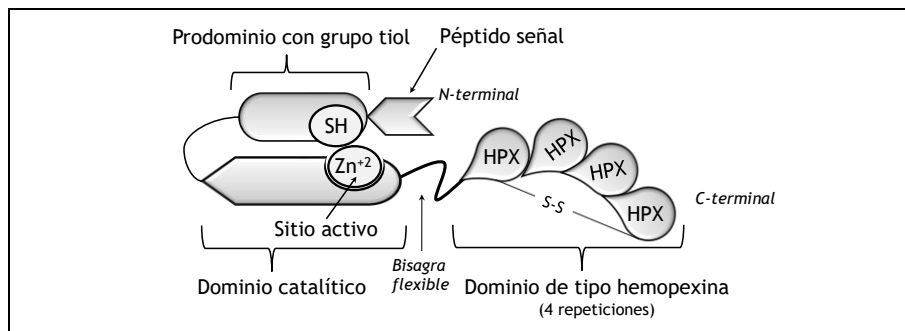


Fig. 1/13. Estructura de la metaloproteínasa de matriz 13 (MMP-13).

Diversos estudios han intentado demostrar la localización de esta enzima en el cartílago: puede localizarse en las zonas superficiales, en donde se la ha encontrado colocalizada con IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en zonas superficiales del cartílago artrósico (259), y en las zonas más profundas,

aunque su expresión va a ser mayor en las zonas que rodean a las lesiones. También se ha comprobado que la actividad degradativa sobre el colágeno tipo II varía en función de la extensión de la lesión, siendo mayor en la zona profunda y en las zonas dañadas. Muestra una gran especificidad por el colágeno tipo II y actúa también sobre otros tipos de colágeno, agregano y fibronectina, entre otras moléculas, presentando la actividad gelatinolítica más eficiente de las colagenasas (84, 230). Las colagenasas actúan sobre el colágeno tipo II desenrollando en primer lugar la triple hélice de colágeno para después hidrolizar los enlaces peptídicos, generando fragmentos de  $\frac{3}{4}$  y  $\frac{1}{4}$  de longitud, con lo que las propiedades mecánicas del cartílago disminuyen significativamente al exponerse los constituyentes de la matriz a más proteasas. Los propios fragmentos de colágeno tipo II generados van a promover la actividad catabólica al sobreregular los niveles de MMP-13 (entre otras MMP), aumentar la degradación del colágeno fibrilar y fomentar la actividad gelatinasa (205, 230, 244).

Como esta MMP va a intervenir en los procesos de degradación de la matriz y de intercambio de cartílago por hueso, se la considera un marcador hipertrófico junto con el colágeno tipo X (55). La expresión de ambos genes se ha encontrado colocalizada en los condrocitos artrósicos; sin embargo, diferentes estudios han demostrado que la expresión de MMP-13 no está sometida a la de colágeno tipo X ya que la síntesis de esta MMP puede ser inducida por rutas alternativas a la diferenciación terminal de los condrocitos, como la inflamación o el estrés mecánico, y puede expresarse en el cartílago artrósico a niveles superiores que los de colágeno tipo X (39, 248, 266).

### 1.5.2. Citoquinas proinflamatorias

Las citoquinas —en las que se engloban *interleucinas*, *linfoquinas*, *factores de necrosis tumoral* (TNF), e *interferones*— son pequeñas proteínas liberadas por las células que intervienen en el metabolismo del cartílago y causan su degradación al promover procesos catabólicos mediante la síntesis de MMPs, prostanoïdes y apoptosis de los condrocitos (Fig. 1/14). Como afectan al comportamiento de otras células su acción no es muy diferente a la de las hormonas.

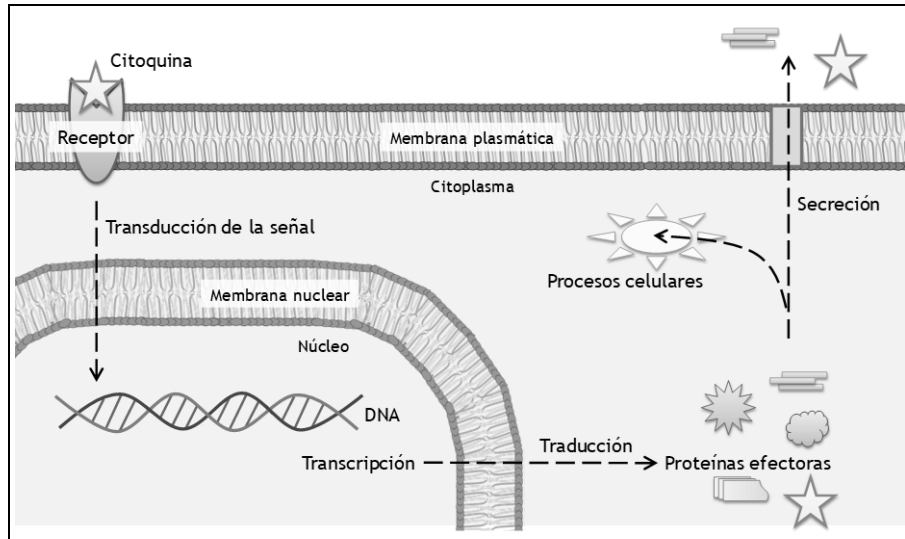


Fig. 1/14. Señalización y regulación mediada por citoquinas.

### 1.5.2.1. Catabólicas

En este apartado se incluyen las citoquinas IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ . Ambas son sintetizadas como precursores en el interior de la célula y convertidas a su forma activa por rotura proteolítica (69). Su producción está aumentada en los condrocitos artrósicos y pueden actuar de forma conjunta o por separado (175, 284), localizándolas en zonas superficiales del cartílago (259). A ambas se las puede detectar en el líquido sinovial de los pacientes artrósicos (124), pero la actividad de estas citoquinas no se basa únicamente en su concentración si no también en la capacidad de modular la síntesis de otras citoquinas (124).

#### 1.5.2.1.1. Interleucina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

La citoquina IL-1 $\beta$  ejerce un papel fundamental en la destrucción del cartílago (213). Se expresa en el citosol como el proIL-1 $\beta$  y no tiene actividad biológica hasta que sufre proteólisis y se libera al exterior de la célula en su forma activa (7, 178). Ejerce su acción por unión al receptor IL-1R1, al cual también se pueden unir la interleucina IL- $\alpha$  y

el inhibidor fisiológico IL-1Ra (antagonista del receptor de IL-1). La actividad biológica de IL-1 $\beta$  estaría limitada mediante diversos mecanismos de control, como son la unión de IL-1 $\beta$  al receptor IL-1R2, con lo que se crearía un complejo inactivo incapaz de inducir ninguna señal, o la unión de IL-1Ra al receptor R1, que bloquearía el receptor para IL-1 $\beta$  y tampoco permitiría la inducción de señal (177, 284).

Sus niveles no parecen estar elevados en el líquido sinovial en la articulación artrósica humana (38, 231) pero los condrocitos aumentan su liberación durante la artrosis (142), y sus efectos durante la patología han sido definidos y son variados (27, 110, 112, 124, 150, 177-178, 238, 253, 277):

- Estimula su propia expresión y la síntesis proteica de otras citoquinas proinflamatorias como IL-6 y TNF $\alpha$ , induciendo su actividad y creando sinergias
  - En sinergia con TNF $\alpha$ , induce la expresión COX-2 por los condrocitos articulares activando y promoviendo la síntesis de prostaglandinas, sin alterar la expresión COX-1
  - En sinergia con TNF $\alpha$ , estimula la expresión de COX-2 en condrocitos articulares aumentando la producción de PGE<sub>2</sub>
  - Inhibe la expresión génica y síntesis de colágeno tipo II
  - Aumenta la expresión génica de MMPs en las articulaciones artrósicas, promoviendo su síntesis —entre ellas la de MMP-13— y la síntesis de agreganasas
  - Inhibe la síntesis de los principales inhibidores de las enzimas proteolíticas
  - Inhibe la expresión génica y síntesis de proteoglicanos como el agregano, aumentando su liberación de la matriz, y disminuyendo la síntesis de glicosaminoglicanos
  - Aumenta la reabsorción de cartílago y hueso, estimula la liberación de factores proangiogénicos
  - Estimula la producción de óxido nítrico e induce la apoptosis de los condrocitos

### 1.5.2.1.2. Factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF $\alpha$ )

Esta citoquina pertenece a la superfamilia de los factores de necrosis tumoral. Es un importante mediador en la degradación de la matriz y también se expresa como precursor y es secretado en su forma libre como TNF $\alpha$  tras su rotura en la superficie celular (86, 177, 284), encontrándola en etapas severas de la enfermedad (177). Comparte la mayoría de los efectos de IL-1 $\beta$ , pudiendo actuar sinérgicamente con ella durante los procesos artrósicos al activar las mismas rutas de señalización intracelular que desencadenan los procesos inflamatorios y de daño articular (102, 110, 150, 178, 187, 194, 253, 284):

- Estimula la producción de diferentes citoquinas proinflamatorias como IL-6, factores de crecimiento y quimiocinas
  - Inhibe la síntesis de colágeno tipo II
  - Inhibe la síntesis de glucoproteínas, potenciando la pérdida de proteoglicanos
  - En sinergia con IL-1 $\beta$ , induce la expresión COX-2 por los condrocitos articulares activando y promoviendo la síntesis de prostaglandinas
  - Estimula la expresión de MMPs
  - Inhibe la síntesis de inhibidores de las enzimas proteolíticas
  - Aumenta la reabsorción de cartílago y hueso, estimula la liberación de factores proangiogénicos
  - Estimula la producción de óxido nítrico y, aunque por sí solo no tiene efecto sobre la apoptosis, también tiene un poder inductor sobre esta
  - A altas concentraciones detiene la migración

### 1.5.2.2. Regulatorias

#### 1.5.2.2.1. Interleucina 6 (IL-6)

Al igual que IL-1 $\beta$ , esta interleucina también es expresada constitutivamente por los condrocitos articulares. Sus niveles suelen

aumentar durante los procesos inflamatorios, pero solo se han encontrado niveles elevados de IL-6 en cartílago y líquido sinovial en una fracción de pacientes artrósicos, con lo que se ha sugerido que tampoco sea un mediador clave en la patología (81). Su papel no está del todo claro puesto que por sí misma no es capaz de estimular directamente la degradación del cartílago (109) y también se ha descrito que, en la artrosis, la mayor parte de la IL-6 presente en la articulación proviene del sinovio (25). Su producción ocurre generalmente en respuesta a IL-1 $\beta$  y actúa sinérgicamente con IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  (284). Su actividad puede ser inducida por la presencia de fragmentos de colágeno tipo II, y los condrocitos responderían a esta interleucina produciendo más citoquinas proinflamatorias y MMPs que degradarían más colágeno tipo II, entrando en un círculo vicioso y perpetuando la degradación de la matriz (153).

Los condrocitos artrósicos producen altas concentraciones de IL-6 durante la regeneración de la matriz (175, 262) pero no todos los pacientes artrósicos expresan los mismos niveles de IL-6, así que se pueden encontrar subgrupos de grandes y menores productores. La fluctuación de estos valores es objeto de debate, explicándose por la duración de la enfermedad o la fase de desarrollo (78, 192).

IL-6 es otra molécula ambivalente en la patogénesis de la artrosis ya que modula al mismo tiempo actividades anabólicas y catabólicas (150, 155-156, 177, 201, 253, 262, 284):

- En sinergia con otras citoquinas, reduce la expresión y síntesis de colágeno tipo II
- Estimula la síntesis de colágeno tipo II en condrocitos artrósicos
  - En sinergia con IL-1 $\beta$ , aumenta la producción de MMPs, entre ellas MMP-13, potenciando la degradación del colágeno tipo II
  - Induce la producción de moléculas inhibitoras o bloqueantes de la acción de metaloproteinasas y citoquinas
  - Inhibe la síntesis de proteoglicanos como el agrecano
  - Potencia el catabolismo de proteoglicanos mediado por agrecanasas

- Aumenta la producción de glicosaminoglucanos en condrocitos sanos
- Reduce o estimula la proliferación de los condrocitos

### 1.5.3. Apoptosis

Cuando se habla de muerte celular hay que diferenciar tres tipos principales: La *apoptosis*, que es la muerte celular propia de los procesos naturales, organizada y regular, que no induce inflamación y que requiere energía en forma de ATP; la *autofagia*, asociada a la muerte celular, cuyas características principales son la formación de vacuolas autofágicas de doble membrana y la ausencia de condensación de la cromatina; y la *necrosis*, que es debida a un trauma o estrés celular agudo (117, 195). A mayores se ha descrito un tipo de muerte celular propio de los condrocitos denominado *condroptosis*. La condroptosis comparte características con la apoptosis, pero en lo que respecta a los cambios citoplasmáticos, en la condroptosis sí se observaría el incremento de las organelas destacando la expansión el retículo endoplasmático rugoso y del aparato de Golgi (54, 135).

La muerte celular por apoptosis es un proceso fisiológico celular normal, pero como el cartílago no está vascularizado y los fagocitos no pueden acceder a él, los cuerpos apoptóticos se acumulan contribuyendo a la destrucción de la matriz pericelular en la medida en que sus señales permanecen en la zona (123).

Los procesos de diferenciación terminal hipertrófica culminan en apoptosis y provocan la desintegración del cartílago para hacer que la deposición de hueso sea posible (122-123, 172). Se asume que la artrosis está relacionada con la muerte celular por apoptosis (184), viéndose que en el cartílago artrósico existe un mayor número de células apoptóticas que en el cartílago sano, y correlacionándose el número de células apoptóticas con la severidad de la lesión (31, 122).

La apoptosis puede desarrollarse a través de dos vías diferentes dependiendo del estímulo que la desencadene: la *extrínseca* o mediada por receptores de muerte, y la *intrínseca* o mitocondrial. Ambas vías van a provocar la activación de las caspasas. Las caspasas son un grupo de cisteín-proteasas intracelulares encargadas de ejecutar la apoptosis.

Se caracterizan por no degradar sus sustratos, si no que los escinden en varios fragmentos permitiendo su activación o inactivación generalmente mediante la eliminación de sus dominios regulatorios. Se sintetizan como zimógenos que son activados por dimerización inducida por proximidad y/o la escisión de sus subunidades en respuesta a estímulos inflamatorios o proapoptóticos provocando a su vez la escisión de diversas proteínas celulares y precipitando los cambios que llevan a la muerte celular. Existen dos tipos de caspasas: las iniciadoras (-2, -8, -9, -10) que son activadas a través de rutas de señalización apoptótica y participan en la transmisión de la señal, y las efectoras (-3, -6, -7) que causan la rotura proteolítica de sus sustratos, expanden y amplifican la cascada que provoca los eventos apoptóticos determinando la muerte celular (131, 195, 200, 266, 276, 282).

### 1.5.3.1. Caspasa-9

La caspasa-9 —anteriormente conocida como Apaf-3 (factor-3 de activación de la apoptosis)— es la caspasa activa situada más arriba en la cascada de caspasas, siendo la responsable de provocar la escisión y activación de las procaspasas efectoras -3, -6, y -7 (131). Estructuralmente (Fig. 1/15) presenta un prodominio CARD (dominio de reclutamiento de caspasas, para el reclutamiento y activación por el apoptosoma) en el extremo N-terminal, un dominio catalítico formado por una subunidad grande con el sitio activo cisteína, y una subunidad más pequeña C-terminal (165, 282).

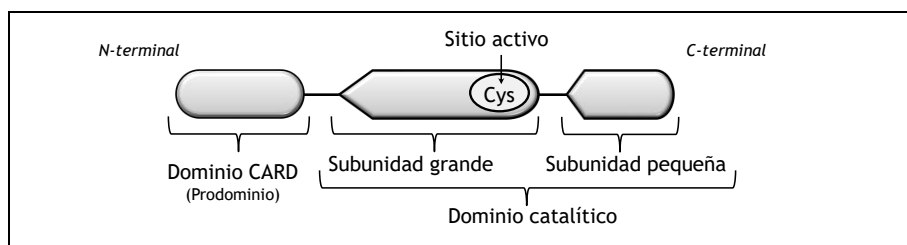


Fig. 1/15. Estructura de la caspasa-9.

La caspasa-9 participa en forma de procaspasa-9 en la ruta intrínseca o mitocondrial (Fig. 1/16). Esta ruta se activa por señales

intracelulares, especialmente en respuesta a la desaparición de estímulos de supervivencia que inducen a que la membrana mitocondrial externa se permeabilice. Cuando esto ocurre, el *citocromo c* (también denominado Cyt c ó Apaf-2) es traslocado al citosol. Cyt c es una proteína intermembrana esencial en la cadena respiratoria mitocondrial, con lo que su traslocación causa la disfunción de la cadena de transporte de electrones. Una vez en el citosol, Cyt c interactúa con la proteína adaptadora *Apaf-1* y con la procaspasa-9 en presencia de dATP dando forma al *apoptosoma*, una plataforma para la unión y activación de la procaspasa-9 (54, 131, 135).

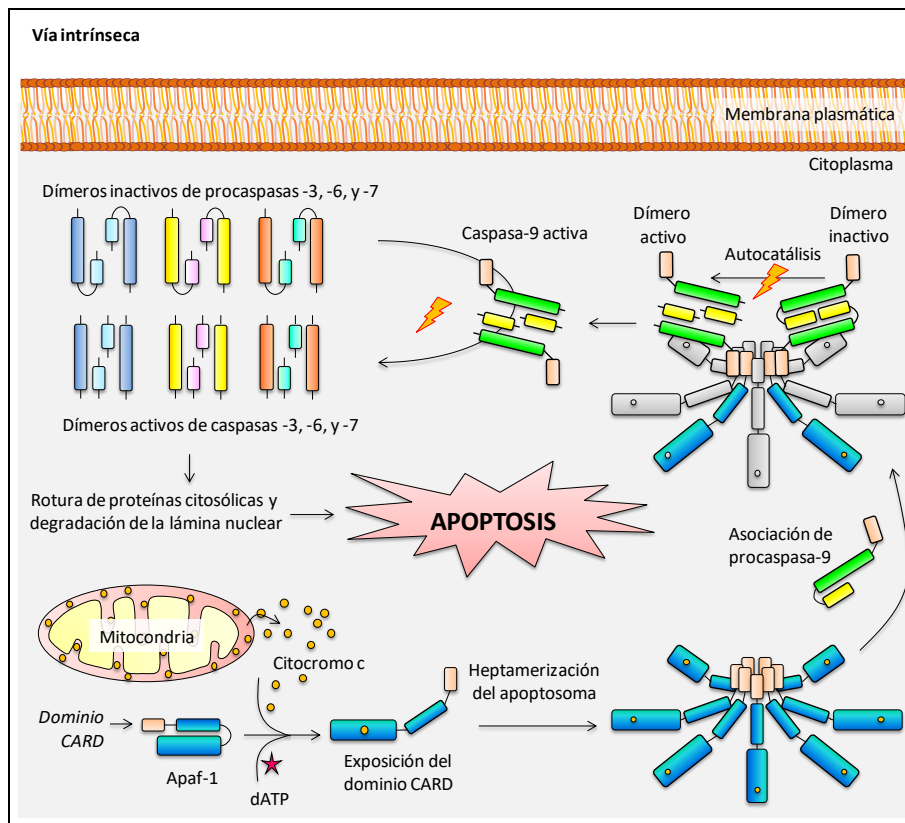


Fig. 1/16. Esquema de la vía intrínseca mediada por caspasa-9. Para mayor claridad solo se muestran dos dímeros de caspasa-9 en el apoptosoma.

Apaf-1 existe como monómeros inactivos en el citoplasma celular. Posee un dominio CARD similar al de caspasa-9, un lugar de unión de nucleótidos, y un dominio de oligomerización. Cuando interacciona con Cyt c en presencia de dATP sufre un cambio conformacional y expone el dominio de oligomerización, con lo que se permite la heptamerización de la molécula y la creación de un apoptosoma activo y funcional. La activación de caspasa-9 requiere su dimerización, con lo que a partir de este momento la procaspasa-9 es reclutada en dímeros por el apoptosoma, activándose y sufriendo un proceso de rotura autocatalítica entre sus subunidades, siendo liberada más tarde para permitir el reclutamiento de nuevas moléculas de procaspasa-9 (221, 282, 287).

#### 1.5.3.2. Ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL)

TRAIL es una citoquina miembro de la familia de los TNF que actúa en la ruta extrínseca de la apoptosis. Esta ruta está inducida por señales extracelulares que incluyen la activación de receptores de muerte de la superfamilia TNF, TRAIL-R1 (DR4) y TRAIL-R2 (DR5), que poseen un dominio de muerte que media la apoptosis celular.

Para poder llevar a cabo su actividad, TRAIL necesita trimerizarse con su receptor y reclutar a FADD, (proteína asociada a Fas con dominio de muerte), una proteína acopladora que recluta a su vez procaspasas iniciadoras (Fig. 1/17), como procaspasa-8. Su asociación en el complejo DISC (complejo de señalización inductor de muerte) provoca la rotura proteolítica y activación de la caspasa-8, que una vez liberada en el citosol escinde y activa procaspasas ejecutoras propagando la señal apoptótica. La caspasa-8 puede escindir a BID (proteína con dominio BH3 de interacción agonista de muerte), una proteína proapoptótica de la familia Bcl-2, que se transloca a la mitocondria y activa a su vez la ruta intrínseca de la apoptosis (54, 163, 216, 282).

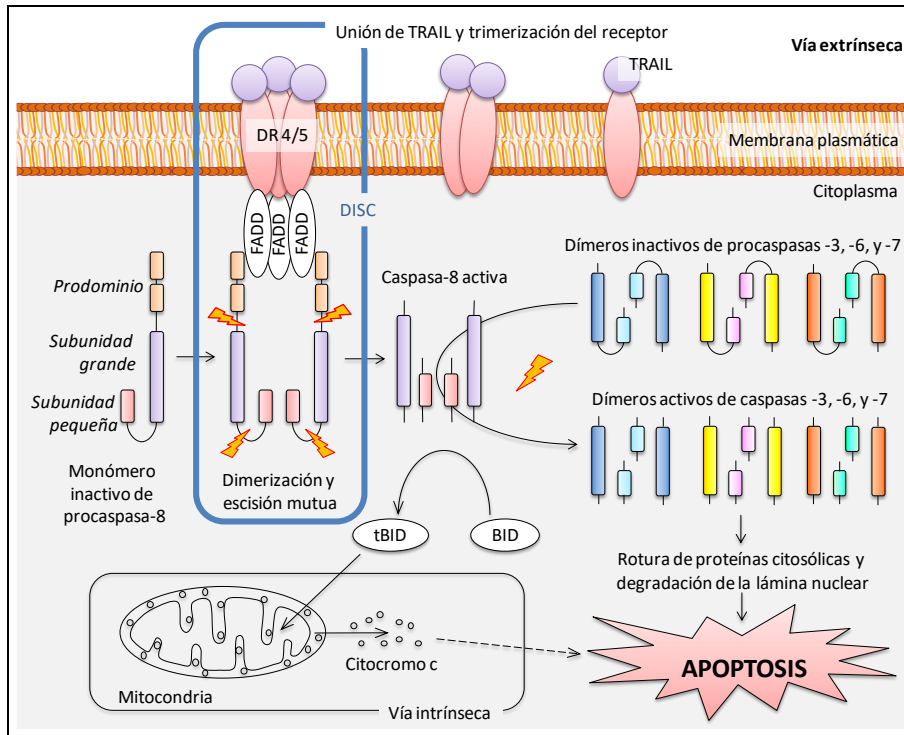


Fig. 1/17. Esquema de la vía extrínseca de la apoptosis mediada por TRAIL. *FADD*: Proteína asociada a Fas con dominio de muerte. *DISC*: complejo de señalización inductor de muerte. *BID*: proteína con dominio BH3 de interacción agonista de muerte.

### 1.5.4. Proteínas colagénicas

El colágeno es el principal componente de la matriz extracelular de los tejidos conectivos. En vertebrados existen 28 tipos de colágenos numerados del I al XXVIII según el orden de su descubrimiento, y todos comparten una estructura básica en triple hélice dextrógira, formada por tres cadenas  $\alpha$  polipeptídicas levóginas unidas por puentes de hidrógeno y formadas por la secuencia de aminoácidos repetitiva Gly-X-Y donde Gly es glicina, X suele ser prolina, e Y suele ser 4-hidroxiprolina. La glicina es el aminoácido más pequeño, con lo que se puede ubicar hacia el interior de la hélice provocando que los otros aminoácidos tengan que exponerse hacia el exterior. La prolina otorga el giro levógiro a la

cadena  $\alpha$  y la hidroxiprolina otorga estabilidad a la triple hélice. Las cadenas  $\alpha$  presentan dominios colagénicos y no colagénicos, que participan en el ensamblaje y en la actividad biológica del colágeno. Los colágenos se depositan en la matriz extracelular proporcionando puntos de anclaje a diferentes macromoléculas —como proteoglicanos o fibronectina— y permitiendo la interacción entre la célula y la matriz por medio de la unión a diferentes receptores (26, 145, 222). En este estudio solamente se abordan los tipos II y X, homotrímeros de la isoforma  $\alpha 1$  (Fig. 1/18).

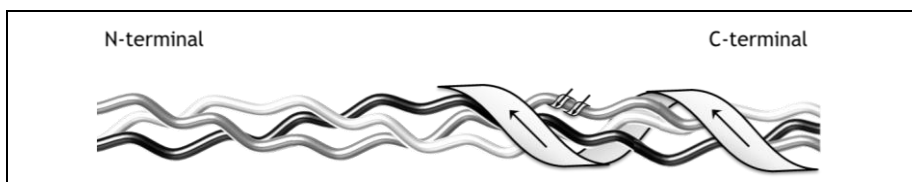


Fig. 1/18. Esquema del homotrímero de la isoforma  $\alpha 1$ .

#### 1.5.4.1. Colágeno tipo II (COL2A1)

El colágeno tipo II es un homotrímero de cadenas  $\alpha 1$ , capaz de formar fibrillas relativamente largas (Fig. 1/19). Se le considera, por tanto, un colágeno fibrilar. Su estructura se escribe como  $[\alpha 1(\text{II})]_3$  (145). Representa más del 95% del colágeno presente en el cartílago articular sano y le proporciona al tejido sus propiedades características de resistencia a la tensión, entrecruzándose con otros colágenos para formar las largas fibrillas que forman el entramado en el que se enlazan otras moléculas no colagénicas (43, 111).

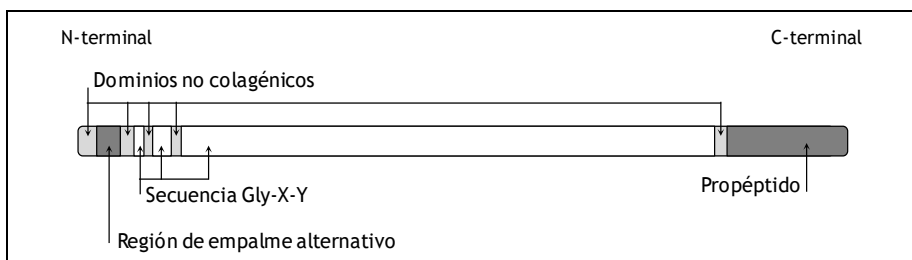


Fig. 1/19. Estructura de la cadena  $\alpha 1(\text{II})$ .

Es degradado preferentemente por MMP-13, que escinde la molécula en fragmentos de  $\frac{3}{4}$  y  $\frac{1}{4}$  de longitud, los cuales son degradados por otras enzimas y secretados al fluido sinovial (205, 244). Este proceso desestabiliza la matriz con su correspondiente pérdida de funcionalidad, además de exponer a otros elementos a la acción proteolítica. El colágeno tipo II media y modula la degradación de la matriz, ya que los fragmentos generados son a su vez capaces de inducir la actividad de citoquinas proinflamatorias y diversas MMP, perpetuando los procesos catabólicos y acelerando la destrucción del cartílago (155).

#### 1.5.4.2. Colágeno tipo X (COL10A1)

El colágeno tipo X es un homotrímero de corta longitud formado por cadenas  $\alpha 1$ , y no forma fibras (Fig. 1/20) si no que se organiza en el cartílago hipertrófico de forma multimérica como un enrejado hexagonal por medio de la interacción de sus dominios globulares C-terminales. La asociación entre multímeros próximos está mediada por las interacciones entre dominios en triple hélice adyacentes y su estructura se escribe como  $[\alpha 1(X)]_3$  (161, 222).

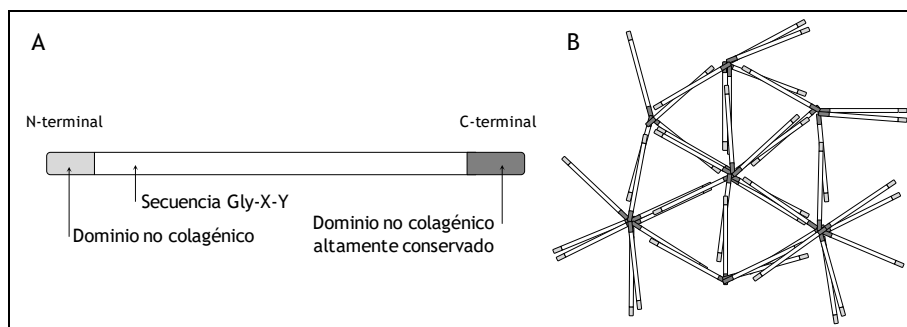


Fig. 1/20. A: Estructura de la cadena  $\alpha 1(X)$ . B: Diagrama de la malla hexagonal.

Normalmente su expresión está restringida al cartílago hipertrófico y a la zona hipertrófica de la placa de crecimiento durante la esquelotogénesis de los vertebrados —los procesos de osificación endocondral—, ausente en condiciones normales en el cartílago

articular adulto pero presente en diferentes patologías como la artrosis, detectándose su sobreexpresión en las zonas próximas a una lesión. La presencia de colágeno tipo X es indicativa de procesos de calcificación y de la mineralización típica del tejido en los estadios finales de la artrosis. Está considerado, junto con la enzima MMP-13, como un marcador estándar para los condrocitos hipertróficos y el aumento de su expresión va acompañado de la disminución de la expresión del colágeno tipo II (139, 236, 266). A pesar de estar reconocido como marcador hipertrófico, se lleva tiempo cuestionado que el aumento de su síntesis no sea un evento causal de la degeneración del cartílago, si no que la diferenciación hipertrófica venga provocada por la incapacidad de la célula para sintetizar una matriz funcional tras un estímulo (273).

Se demostró también que su gen es mecanosensitivo y responde a esfuerzos elásticos (286), reactivándose su expresión en el adulto para llevar a cabo procesos de reparación de fracturas y durante la artrosis (41).

### **1.5.5. Proteínas no colagénicas**

#### 1.5.5.1. Matrilinas

La de las matrilinas es una familia de cuatro proteínas oligoméricas no colagénicas que se encuentran en las matrices celulares de diferentes tejidos. Las matrilinas -1 y -3 están más restringidas al cartílago, en una proporción mucho mayor que las -2 y -4, cuya distribución es mucho más amplia (274). Su función es adaptadora y colaboran en la formación de una red filamentosa en la matriz pericelular al interconectar los componentes de la matriz extracelular, como fibrillas de colágeno, agregano y diversas macromoléculas. Estructuralmente, presentan un péptido señal en el extremo N-terminal, dominios denominados factor de von Willebrand tipo A (vWFA o más comúnmente VWA, relacionado con la adhesión celular, las interacciones entre proteínas de la matriz extracelular, y los receptores de integrinas), dominios similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF), y un superenrollamiento en forma de  $\alpha$ -hélice —*coiled-coil*—

C-terminal que es el responsable de que las matrilinas se ensamblen formando oligómeros (70, 212, 280).

Las matrilinas -1 y -3 tratadas en este estudio se expresan casi exclusivamente en los tejidos del cartílago articular y óseo (152, 212), y la expresión de ambas está aumentada durante la artrosis (111, 274). Estas dos matrilinas son capaces de formar heterooligómeros — heterotetrámeros— conteniendo dos cadenas de matrilina-1 y dos cadenas de matrilina-3, unidas entre ellas por medio de puentes disulfuro en sus dominios superenrollados C-terminales (274, 285).

La proteólisis de estas moléculas influye negativamente sobre su función adaptadora porque provoca la separación de sus subunidades y con ello una reducción en la capacidad de asociación con otras moléculas, colaborando en la desestructuración de la matriz (152, 212).

#### 1.5.5.1.1. Matrilina-1 (MATN1)

Originalmente, a la matrilina-1 se la denominó *proteína de la matriz del cartílago (CMP)*, aludiendo a su localización principal. Es uno de los componentes principales del cartílago hialino y un marcador del condrocito maduro ya que su concentración aumenta con la maduración del tejido y con la edad (67, 212). También sirve como marcador en etapas tempranas de proliferación durante la diferenciación de los condrocitos (27). Por el contrario, su expresión en el cartílago articular adulto sano es muy limitada o nula (217).

Se autoensambla predominantemente en forma de trímeros (285) y su monómero (Fig. 1/21) presenta un péptido señal, dos VWA, un dominio similar a EGF, y un dominio C-terminal para la oligomerización (188), pudiendo interaccionar consigo misma, con fibrillas de colágeno, proteoglucanos,

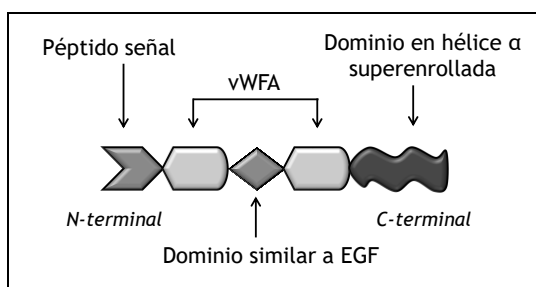


Fig. 1/21. Estructura de la matrilina-1.

e integrinas  $\alpha 1\beta 1$  (217) y potenciando la adhesión de los condrocitos (204).

Se ha sugerido que la expresión de matrilina-1 en el cartílago artrósico sea interpretada como una respuesta reparativa ante una matriz endeble y que la molécula juegue un papel importante en la restauración de las interacciones entre las moléculas de la matriz y entre esta y la propia célula (204). También existen evidencias de la sobreexpresión del gen *MATN1* en condiciones de estrés mecánico, con lo que se le considera un gen mecanosensitivo (286).

#### 1.5.5.1.2. Matrilina-3 (*MATN3*)

La matrilina-3 es la más pequeña de las matrilinas y a diferencia de las otras tres su monómero solamente presenta un VWA. Presenta también cuatro dominios similares a EGF, y un dominio C-terminal para la oligomerización (Fig. 1/22). Se autoensambla predominantemente en forma de tetrámeros, aunque en menor medida también en trímeros y dímeros, y como solamente dispone de un dominio VWA no hay interacción entre sus subunidades y su estructura es mucho más flexible (154, 217).

Esta matrilina se localiza principalmente en el cartílago, y aunque se la suele encontrar coexpresada con la matrilina-1, el contenido de cada una en el tejido puede variar a lo largo de la vida del individuo

(154). Colabora en la formación de una matriz pericelular interaccionando con fibrillas de colágeno, proteoglucanos, glucoproteínas, e integrinas  $\alpha 5\beta 1$ , encargadas de mediar la adhesión celular (271, 281).

Su expresión es débil o nula en los condrocitos hipertróficos (154, 292), y en el cartílago sano (217). Por lo contrario, se sobreexpresa en las lesiones artrósicas en la medida de la extensión del daño, aunque su

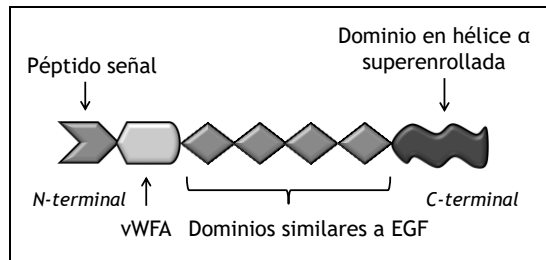


Fig. 1/22. Estructura de la matrilina-3.

contenido acabe disminuyendo debido al aumento de su proteólisis y a la desorganización de la matriz provocada por la acción de las enzimas proteolíticas, que al degradar los componentes de la matriz eliminan los sitios de anclaje de la matrilina, contribuyendo a la desestabilización del entramado matricial. Este hecho hace que se la pueda usar como un marcador de la progresión de la artrosis (70, 217) pero con reservas, ya que sus valores, aunque sean elevados durante la patología, no son homogéneos entre pacientes (271). Que sus niveles aumenten durante la progresión de la artrosis ha sugerido que este evento, al igual que ocurre con el colágeno tipo II y el agregano, sea una respuesta compensatoria frente al avance de la enfermedad (217).

Además de su función como elemento de anclaje, se ha estudiado la capacidad de prevenir la diferenciación terminal hipertrófica de los condrocitos. Esta ocurriría al unirse a BMP-2 (proteína morfogenética del hueso-2), impidiendo la interacción con su receptor, y bloqueando por tanto la ruta que regula la expresión de genes relacionados con la hipertrofia, por ejemplo, del colágeno tipo X (290).

Al igual que ocurre con otros componentes de la matriz, la matrilina-3 presenta un carácter dual en función de su concentración o estado circulante. Se ha descrito que, en su forma soluble y circulante, la matrilina-3 estimula procesos catabólicos a la par que infrarregula la síntesis de componentes de la matriz extracelular. Cuando la molécula era inmovilizada vía integrinas  $\alpha 5\beta 1$ , se inducía la adhesión celular favoreciendo la supervivencia y la síntesis de matriz al sobrerregular la expresión del colágeno tipo II e infrarregular la expresión de MMP-13 (271). También se ha descrito que puede ejercer funciones anabólicas o catabólicas dependiendo de la concentración existente de proteína. A bajas concentraciones, entre 100 a 200 ng/mL, puede ejercer efectos anabólicos al provocar la expresión del receptor antagonista de interleucina (IL-Ra) en los condrocitos tratados y favorecer la supresión de la inflamación mediada por IL-1 $\beta$ , pudiendo también inducir la síntesis de colágeno tipo II y agregano, y la reducción de la expresión génica de las proteasas MMP-13, ADAMTS-4 y ADAMTS-5<sup>2</sup>. A

---

<sup>2</sup> Estas dos enzimas ADAMTS (metaloproteinasas con actividad de desintegrina con motivos de trombospondina) son importantes en el remodelado de la matriz extracelular ya que son

concentraciones superiores, entre 5 a 50  $\mu\text{g/mL}$ , ejercería efectos catabólicos, estimulando la expresión de MMP-1, -3 y -13, e interleucinas Il-1 $\beta$ , Il-6 e IL-8, además de la de las enzimas óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y COX-2, amplificando con ello la inflamación y la degradación de la matriz (140, 153, 196, 271).

### 1.5.5.2. Fibronectina (FN)

La fibronectina es una glucoproteína que media procesos de adhesión en los tejidos conjuntivos, organizando la matriz extracelular, interconectando proteoglicanos y colágeno con la superficie celular. Existen varias isoformas de fibronectina que además de participar en la adhesión, intervienen en procesos de diferenciación celular, migración, cicatrización y procesos neoplásicos, facilitando o impidiendo el movimiento del citoesqueleto, expresándose preferencialmente en lugares con morfogénesis activa, migración celular e inflamación.

Se secreta formando dímeros solubles, que permanecen inactivos mientras circulan libremente en el plasma. Las subunidades del dímero se unen por sus extremos C-terminales por medio de puentes disulfuro y cada una de ellas presenta tres dominios de unión diferentes (Fig. 1/23).

En reposo, esta proteína adopta una conformación plegada. En el momento en que interacciona con integrinas de superficie, se despliega y se vuelve altamente insoluble, formando las denominadas

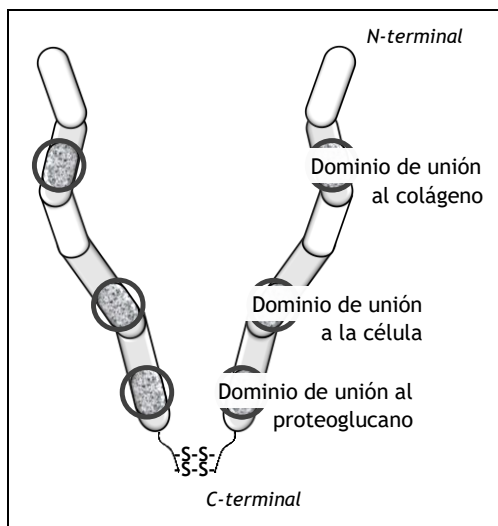


Fig. 1/23. Estructura de la fibronectina.

fibrillas de fibronectina (Fig. 1/24), que se mantienen muy estiradas y bajo tensión.

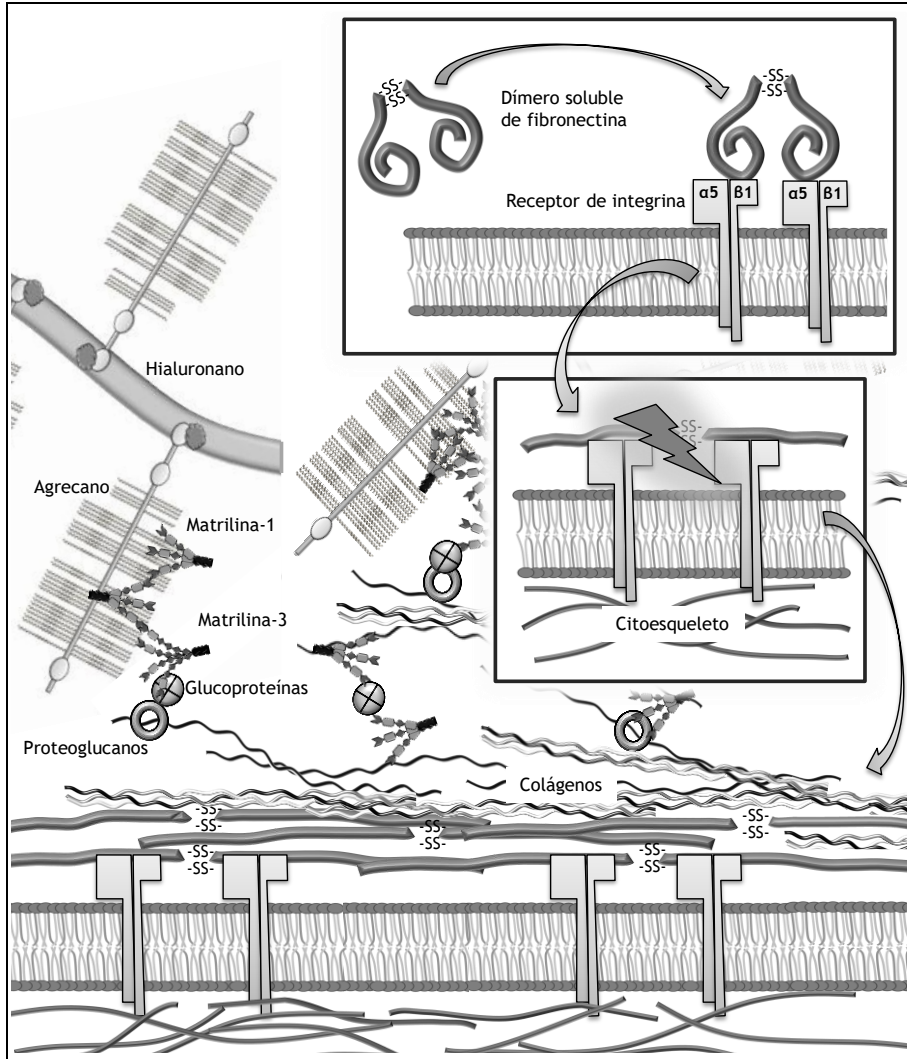


Fig. 1/24. Polimerización de fibronectina. Tras unirse a las integrinas, los dímeros de fibronectina sufren un cambio conformacional por la unión del citoesqueleto a las integrinas, exponiendo los sitios de unión a otras macromoléculas de la matriz.

Las fibrillas son esenciales para el posterior ensamblaje simultáneo de diferentes macromoléculas como colágenos, glicosaminoglucanos, otras fibronectinas y diferentes componentes de la matriz, permitiendo a la fibronectina adoptar funciones mecanorreguladoras en el ambiente extracelular (8, 29, 90, 121, 146).

La fibronectina en sí misma no ejerce un efecto catabólico, pero al ser degradada por proteasas —entre ellas MMP-13— se generan fragmentos que adquieren propiedades catalíticas (al igual que ocurre con los fragmentos de colágeno tipo II) al interactuar con integrinas de superficie, potenciando la desestabilización de la matriz al promover la síntesis de más enzimas proteolíticas, ya de por sí sobreexpresadas en la artrosis, citoquinas, degradación de proteoglucanos y liberación de colágeno tipo II, provocando una retroalimentación positiva que acaba destruyendo el cartílago de forma irreversible (81, 108, 177, 244).

### 1.5.6. Proteoglucanos

#### 1.5.6.1. Glicosaminoglucanos (GAG)

Los GAG son largos polisacáridos no ramificados compuestos por repeticiones de disacáridos. Se denominan así ya que uno de los azúcares es siempre un aminoazúcar (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina) y generalmente está sulfatado. El segundo azúcar es casi siempre un ácido urónico (glucurónico o idurónico) (Fig. 1/25).

Existen dos tipos principales de GAG: los *no sulfatados*, que incluyen al ácido hialurónico (HA), y los *sulfatados*, en donde se incluyen el condroitín y dermatán sulfato, heparán sulfato, y ketarán sulfato. La terminología en este grupo es diferencial ya que, aunque se nombran de forma genérica, los glicosaminoglucanos que contienen galactosamina, como condroitín o dermatán sulfato, se denominan *galactosaminoglucanos* y los que contienen glucosamina, como el heparín o heparán sulfato, *glucosaminoglucanos* (98).

La importancia de los GAG radica en presentar una carga muy negativa debido a la presencia de numerosos grupos carboxilo ( $\text{COOH}/\text{COO}^-$ ) y sulfato ( $\text{SO}_4/\text{SO}_3^-$ ). Esto hace que atraigan cationes como el  $\text{Na}^+$ , que es osmóticamente activo, resultando en el arrastre de

agua hacia la matriz, que le proporciona turgencia y soporte mecánico al tejido.

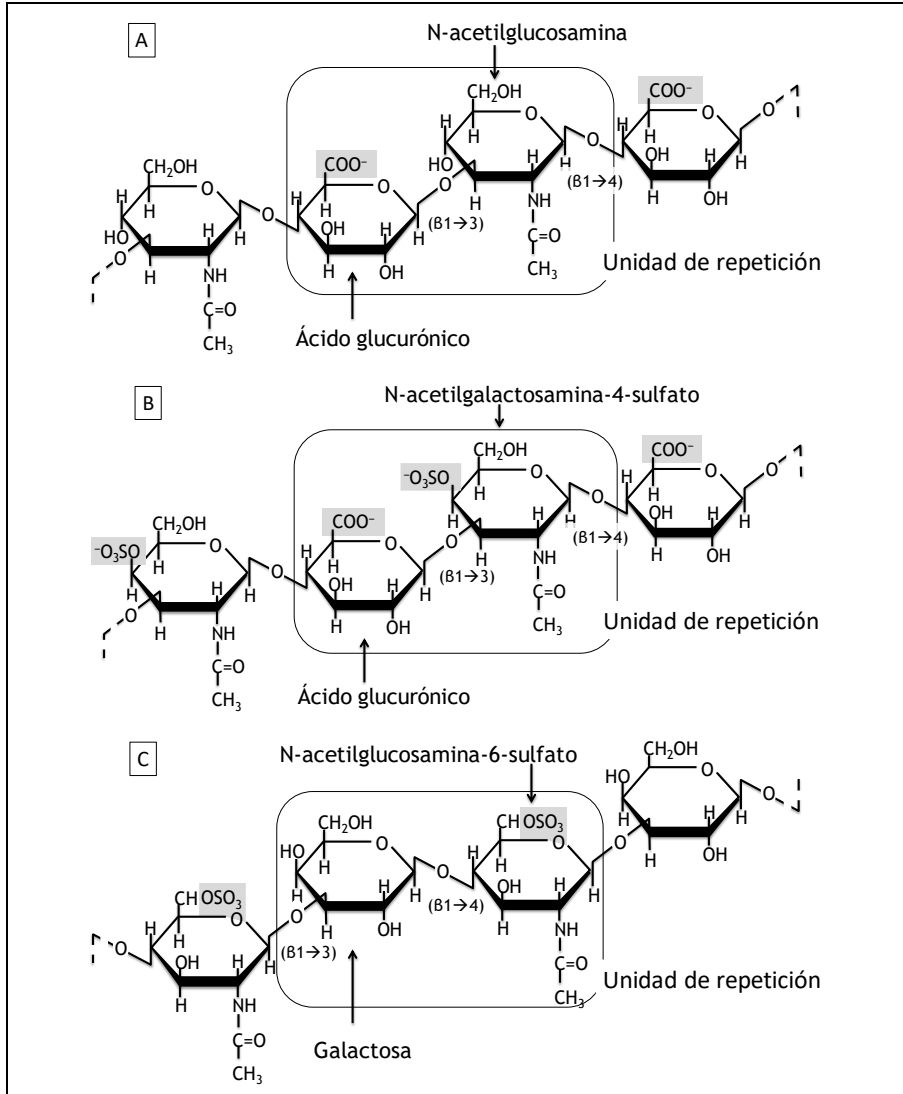


Fig. 1/25. Ejemplos de glicosaminoglucanos. A: Ácido hialurónico; B: Condroitín-4-sulfato; C: Keratán sulfato. Los grupos aniónicos se han sombreado en gris.

Que los GAG presenten una carga negativa neta provoca fuerzas de repulsión entre ellos, con lo que en solución tienden a extenderse y deslizarse unos sobre otros, propiedad que hizo que inicialmente fueran denominados *mucopolisacáridos* (8, 43, 169).

Las funciones principales de los GAG son la de ensamblaje de complejos proteicos tanto en la superficie celular como en la matriz extracelular, y de intervención en procesos de señalización celular al interactuar con diversos elementos de la matriz extracelular, como proteoglucanos, glucoproteínas, fibronectina, quimiocinas, compuestos solubles y receptores de superficie (29). La pérdida de GAG y su liberación al medio es un rasgo distintivo en la artrosis y un marcador muy usado de la degeneración del cartílago articular (133).

#### 1.5.6.2. Agrecano (ACAN)

Excepto el HA, todos los GAG se encuentran unidos de forma covalente a una proteína central o núcleo proteico —*core protein*— formando monómeros de proteoglucano. Los proteoglucanos son, por tanto, agregados supramoleculares, y constituyen entre el 5 y el 10% del peso seco del cartílago y representan el segundo componente más importante de la matriz extracelular por detrás del colágeno tipo II. El agrecano es el principal proteoglucano del cartílago articular (8).

Es esencial para el mantenimiento de las funciones de compresión y de recuperación tras la deformación del cartílago. Su funcionalidad va a estar determinada por su grado de retención en la matriz extracelular y por la concentración de sus GAG (8), con lo que cualquier alteración que cause una disminución en la concentración de GAG o potencie la liberación de proteoglucanos de la matriz va a provocar una sobrecompresión del tejido durante la carga, estimulando la secreción de proteinasas y con ello la degeneración tisular (225).

Su estructura consta de un núcleo proteico con cadenas de GAG unidas covalentemente. Este núcleo proteico presenta a su vez tres dominios globulares estabilizados por puentes disulfuro, denominados *G1*, aminoterminal, que interactúa con unas pequeñas glucoproteínas denominadas proteínas de unión —*link proteins*— y que a su vez estabilizan una unión no covalente con las cadenas de HA; *G2*, de

función desconocida; y *G3*, carboxiterminal, con propiedades similares a las lectinas que le permiten interactuar con otras moléculas de la matriz extracelular (Fig. 1/26). Los dominios *G1* y *G2* están separados por un dominio interglobular (IGD) y entre los dominios *G2* y *G3* se sitúan dos dominios de unión a GAG, *KS* (de keratán sulfato), y *CS* (de condroitín sulfato), subdividido en *CS1* y *CS2* (120, 177, 244, 270).

La rotura proteolítica de la molécula se produce por medio de agreganasas, que actúan a lo largo núcleo proteico separando las cadenas laterales de GAGs (270).

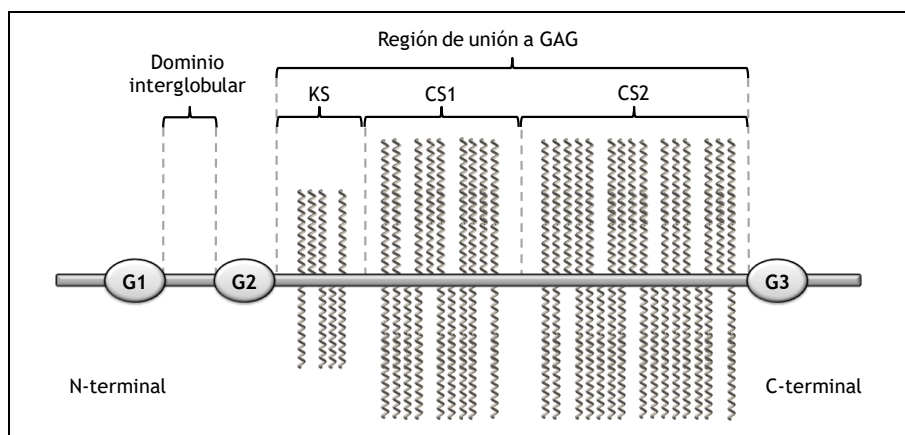


Fig. 1/26. Estructura del agregano.

El agregano forma agregados al unirse al HA. Estos *agregados de agregano* pueden llegar a contener hasta 100 unidades de agregano dispuestas de forma radial a lo largo del mismo filamento de HA (Fig. 1/27), y su estructura va a depender de la longitud de la fibra de HA y de la cantidad de proteínas de unión presentes. Presenta una carga altamente negativa debido a los ya mencionados grupos carboxilo y sulfato de los GAG del agregano. Las propiedades compresivas del tejido tienen su origen en esta carga negativa, ya que atrae iones cargados positivamente como  $\text{Na}^+$  o  $\text{Ca}^{2+}$ , creando un gradiente eléctrico que provoca el establecimiento de un osmótico<sup>3</sup>, secuestrando agua hacia el interior de la matriz del cartílago.

<sup>3</sup> Se explica por el equilibrio de Gibbs-Donnan.

Aunque la concentración de HA en el cartílago aumenta con la edad, su longitud y la proporción de GAG en el agregano disminuye y con ello el número de cargas negativas y la capacidad de atrapar agua, resultando en la pérdida de las propiedades amortiguadoras y compresivas del tejido (43, 49, 120, 226).

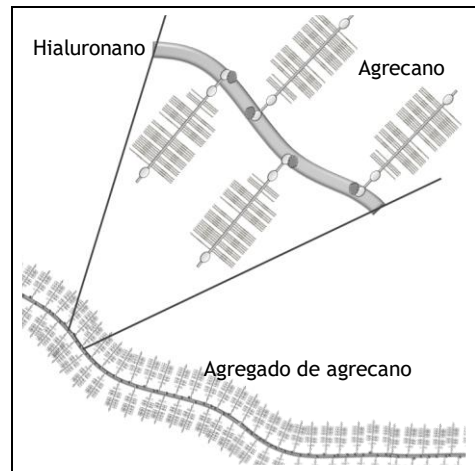


Fig. 1/27. Diagrama de un agregado de agregano.

## 1.6. EL CULTIVO CELULAR *IN VITRO*

### 1.6.1. El cultivo celular

El término cultivo celular se refiere al proceso completo de aislar las células de un organismo y hacerlas proliferar manteniendo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas en un ambiente artificial. Todas las soluciones, medios y equipamiento que entren en contacto con las células tienen que ser estériles, debiendo trabajar en condiciones que también aseguren la esterilidad.

En una primera etapa del cultivo celular se intenta establecer un *cultivo primario* aislando las células del tejido y haciéndolas proliferar bajo las condiciones adecuadas hasta llegar a la *confluencia*. En la confluencia las células han ocupado toda la superficie disponible y no queda espacio para seguir expandiéndose. Las células de mamífero presentan una característica que es la inhibición de la proliferación por contacto, con lo que en confluencia el crecimiento del cultivo se detiene (59). Para mantener los cultivos a una densidad óptima y estimular la proliferación, el cultivo tiene que ser dividido en nuevas jarras y debe proporcionársele medio fresco. Este proceso se conoce como

*subcultivo*. Tras el primer subcultivo, el cultivo pasa a conocerse como *línea celular*. Las células derivadas de los cultivos primarios tienen un número de divisiones limitado antes de perder su capacidad de proliferar y morir. Este evento se llama *senescencia*.

### **1.6.2. Los procesos de hipertrofia y desdiferenciación**

Tras la condrogénesis, los condrocitos del cartílago articular permanecen en estado latente hasta que la homeostasis se ve alterada. Entonces, algunos condrocitos pierden su fenotipo y, de forma gradual, comienzan a expresar marcadores típicos como el colágeno tipo X y MMP-13, iniciando los procesos de diferenciación terminal hipertrofica que culminan en procesos de apoptosis, mineralización del cartílago y osificación endocondral (79, 108, 142).

Hay una tendencia a considerar que el desarrollo y progresión de la artrosis están influenciados por los procesos de hipertrofia y senescencia de los condrocitos, ya que tanto los condrocitos artrósicos como los sanos que sufren hipertrofia o senescencia comparten características comunes (91, 224). El fenotipo del condrocito va a estar influenciado por la composición de su matriz extracelular (27), y el de los condrocitos artrósicos va a estar alterado en las zonas próximas a la lesión y a la matriz mineralizada del cartílago, provocando procesos similares a los hipertrofos, lisis celular, y favoreciendo la degeneración del cartílago articular (27, 79, 266).

El fenotipo de los condrocitos es de tipo adherente cuando son cultivados en laboratorio, por lo que es importante que tras su aislamiento se asegure que las células lo retienen mientras proliferan. En los condrocitos articulares de mamífero en cultivo ocurre un fenómeno que hasta ahora se ha observado únicamente *in vitro* denominado *desdiferenciación*, ya desde el momento en que son liberados del cartílago. En monocapa, los condrocitos mantienen una morfología entre redondeada y poligonal, aplanada. A partir del cuarto pasaje de cultivo en monocapa comienzan a perder su fenotipo y a sintetizar marcadores de desdiferenciación y senescencia. No existe un conjunto de marcadores específico de cada proceso, si no que varios fenotipos coexisten en el mismo ambiente alterado. Van perdiendo la

capacidad de producir matriz extracelular alterando la expresión de determinados genes, y la morfología comienza a cambiar a formas aplanadas y ameboides, adoptando incluso una morfología más elongada, de tipo fibroblástica (16, 111, 129, 233-234, 272). La expresión más afectada en los procesos de desdiferenciación y de artrosis es sobre todo la de colágeno II, pero también se ven disminuidas la de otras macromoléculas como agregano, GAG y COX-2. Los condrocitos senescentes producen MMP-13, y durante los procesos de desdiferenciación se refieren resultados contradictorios, unos describiendo el aumento de su expresión (106) y otros que esta decrece tras varios subcultivos (168, 173, 291).

Cuando se cultivan condrocitos de forma aislada se van a presentar también procesos de desdiferenciación, que puede ser debido a que una baja densidad celular interfiera en la comunicación intercelular, sea por la ausencia de contacto entre células o por la ausencia de interacción con factores celulares secretados (279). Por todo ello los condrocitos cultivados *in vitro* no solamente se van a desdiferenciar con el subcultivo repetido si no que su potencial proliferativo también va a disminuir con el aislamiento y con la edad.

Mantener el fenotipo de las células cultivadas en monocapa es complicado cuando se utilizan células procedentes de tejidos adultos, ya que la estabilidad fenotípica se pierde más rápidamente que con células juveniles o embrionarias (111). La forma más utilizada para estabilizar el fenotipo de los condrocitos es realizar cultivos a alta densidad. En la bibliografía encontramos referencias a cultivos de alta densidad desde  $5 \times 10^4$  c/cm<sup>2</sup> hasta  $2 \times 10^5$  c/cm<sup>2</sup> (59, 66, 279). Las células mantenidas a elevada densidad mantienen bien el fenotipo, pero su proliferación es escasa ya que, como hemos dicho anteriormente, una de las características de las células no tumorales de mamíferos es la inhibición de la proliferación por contacto (59). Es importante tener en cuenta este aspecto a la hora de realizar cultivos de condrocitos artrósicos ya que suelen obtenerse en pocas cantidades de una misma muestra.

### **1.6.3. Conteo de células**

El protocolo de exclusión de captación de azul tripán es un método por el que se puede determinar el número de células viables en una suspensión celular. Se basa en la propiedad que tienen las membranas celulares íntegras de excluir la integración de ciertos colorantes como el azul tripán o el yoduro de propidio, mientras que las membranas de las células muertas sí son permeables e incorporan esas sustancias en su interior.

### **1.6.4. Concentraciones de fármacos**

Hay que considerar que las concentraciones a las que el fármaco puede llegar a los tejidos de la articulación dependen en gran medida de su metabolismo en el organismo y que para que en la articulación se alcancen las mismas concentraciones de fármaco que en los cultivos *in vitro*, las dosis ingeridas por el paciente podrían exceder la ventana terapéutica provocando efectos tóxicos o letales.

### **1.6.5. Ensayos colorimétricos**

Los ensayos colorimétricos devuelven un producto de reacción coloreado que absorbe luz en el espectro visible, y cuya densidad óptica se puede medir con un espectrofotómetro y un filtro a la longitud de onda adecuada. El desarrollo del color será proporcional, dentro de unos rangos, a la cantidad de reacción. Cotejando los resultados con un patrón de estándares de concentraciones conocidas de molécula o controles negativos, se podrá inferir la cantidad de moléculas presentes en la muestra problema o la variación entre muestras diferentes.

#### **1.6.5.1. Ensayo de proliferación celular**

Este ensayo es útil para cuantificar parámetros como proliferación, viabilidad celular, o citotoxicidad de una sustancia en cultivos, detectando exclusivamente células viables ya que depende de la capacidad que poseen las células metabólicamente activas de reducir

sales de tetrazolio (*bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol- 2- il)- 2,5-difeniltetrazolio*), conocido como MTT, a 2- 4 *formazán* por medio de deshidrogenasas celulares (Fig. 1/28 A).

La capacidad de las células viables para transformar MTT permite estimar los parámetros anteriores en presencia de diferentes concentraciones de fármaco mediante la cuantificación del producto de formazán resultante solubilizado.

Los cristales de formazán son insolubles en soluciones acuosas, pero pueden ser solubilizados mediante una solución compuesta por SDS y ácido clorhídrico o mediante DMSO, y el resultado es cuantificable con un lector de placas tipo ELISA a una absorbancia máxima de 570 nm.

La ausencia del uso de radioisótopos, su sencillez y alta sensibilidad hacen que sea considerado un método limpio, rápido y preciso que proporciona una buena correlación entre la absorbancia espectrofotométrica y el número de células viables; esto es, a mayor coloración, mayor número de células viables presentes y por tanto mayor supervivencia frente a la dosis de fármaco administrada, siendo por tanto una concentración de fármaco menos efectiva o más inocua (Fig. 1/28 B).

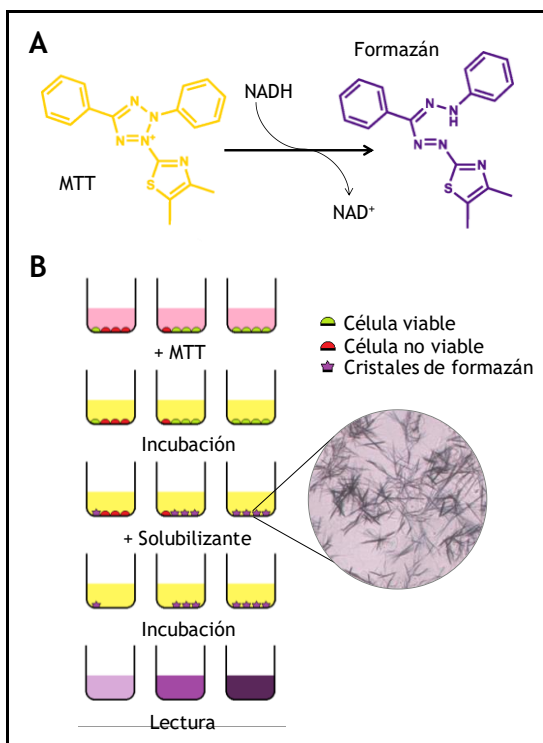


Fig. 1/28. A: Reducción del MTT a su producto de formazán por deshidrogenasas celulares. B: Esquema del ensayo de MTT; en el círculo, cristales de formazán al microscopio óptico.

El concepto de  $IC_{50}$  en el ámbito de los ensayos de proliferación se utiliza para cuantificar la concentración a la que los fármacos en estudio ralentizan el crecimiento celular.

#### 1.6.5.2. Cuantificación de glicosaminoglucanos azufrados (sGAG)

La cuantificación de sGAG se utiliza como medida de la degradación de los proteoglucanos. Es una tinción que provee un marcaje específico del componente polisacárido azufrado de los proteoglucanos o de las cadenas de glicosaminoglucanos azufradas libres por la unión del colorante básico *azul de 1, 9 -dimetilmetileno* (DMMB) resultando en un precipitado coloreado que puede ser solubilizado. La papaína utilizada en el proceso es necesaria ya que va a solubilizar completamente a los sGAG al separarlos del núcleo proteico del proteoglucano (128). La absorbancia de la solución puede ser leída a 525 nm, pero el kit de ensayo utilizado ha mejorado la formulación original de Farndale (85) eliminando fuentes de interferencia que competían por el DMMB e inestabilidades entre los complejos sGAG-DMMB. Presenta un espectro de absorción con un pico máximo a 656 nm, dentro de una ventana entre 625 y 675 nm. La concentración de sGAG se determina mediante el uso de una curva de calibración con un estándar de referencia.

#### 1.6.5.3. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

ELISA es una técnica muy sensible para la detección y cuantificación de pequeñas cantidades de proteínas u otros antígenos en una muestra, basada en las reacciones específicas que ocurren entre antígenos y anticuerpos. Durante el análisis de las muestras se realizaron los dos tipos de ELISA *sándwich* existentes: DAS (*Double-antibody sandwich*) y HADAS (*Heterologous double-antibody sandwich*). El nombre de “sándwich” viene dado porque las moléculas a detectar son inmovilizadas por anticuerpos específicos adsorbidos a una placa de 96 pocillos. Los pocillos se lavan y se añaden otros

anticuerpos biotinilados que se unen por otro epítopo a la molécula problema. Otro lavado elimina el exceso de anticuerpos no unidos y se añade un conjugado de HRP y avidina. Posteriormente se añade un sustrato reactivo que va a producir en el contenido del pocillo un color apreciable a simple vista, proporcional a la cantidad de molécula problema y cuantificable por medio de un espectrofotómetro.

### 1.6.6. Técnicas de imagen

Todas las técnicas de imagen van a tener en común el uso de un microscopio asociado a una cámara y un procesado por ordenador con programas específicos.

#### 1.6.6.1. Ensayo de cicatrización

Este ensayo es una técnica *in vitro* simple y de bajo coste, usada para estudiar los fenómenos de migración celular colectiva que ocurren en procesos entre los que se encuentra la reparación tisular. Las células se cultivan en confluencia y se crea un arañazo o herida en el cultivo, en este caso por medios mecánicos. La exposición al espacio libre induce a las células a migrar hacia esa área, y la adición de sustancias potenciadoras o inhibidoras al medio de cultivo puede alterar sus capacidades de migración. La toma de imágenes previas al cierre de la herida provee información sobre las características migratorias de las células y de su capacidad de colonizar el área dañada.

El punto inicial de la toma de imágenes debe localizarse dentro de la fase de latencia del cultivo, una vez realizada la herida y antes de que las células comiencen a migrar a velocidad constante (Fig. 1/29). El punto final no debe estar incluido en la fase de saturación, ya que cuando se alcanza la confluencia la velocidad de migración primero se ralentiza y luego se detiene, debido a la inhibición por contacto característica de las células no tumorales de los mamíferos (59).

El método de análisis con el programa *ImageJ* permite calcular el porcentaje de fondo que hay en una imagen, esto es, el área libre de células o espacio vacío existente en una imagen determinada. De esta forma se puede inferir la mayor o menor medida en la cual el fármaco

permite la proliferación de las células y la migración y colonización en el tiempo del área expuesta tras la realización de la herida.

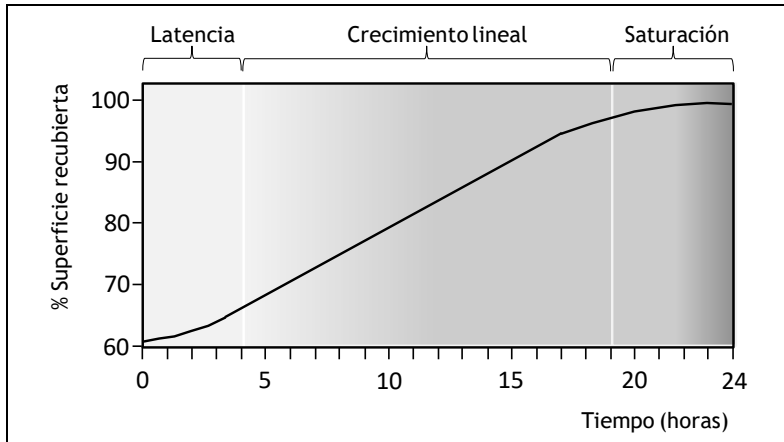


Fig. 1/29. Fases del crecimiento de un cultivo celular.

Una evolución temporal que muestre porcentajes decrecientes en la superficie libre indicaría por tanto un movimiento de las células hacia el área libre y un aumento de la colonización celular. Una mayor colonización sería indicativa de un menor efecto de la concentración del fármaco aplicada en esos cultivos.

#### 1.6.6.2. Viabilidad por microscopía confocal

La microscopía confocal combina técnicas de microscopía con las tecnologías láser y óptica (170, 246). El principio de esta técnica para diferenciar las células viables de las que no lo son se basa en iluminar puntos de la muestra que están en un mismo plano focal, y en unas moléculas presentes en la muestra denominadas fluorocromos que son excitadas punto por punto con un haz de láser que se polariza tras ser reflejado hacia la muestra desde un espejo dicróico. El *espejo dicróico* es un tipo de filtro diseñado para reflejar sólo una parte concreta del espectro visible (Fig. 1/30).

La fluorescencia emitida desde el plano focal en respuesta a la excitación por el láser se enfoca a un segundo punto, llamado *punto*

*confocal*, en donde hay una abertura que solamente permite el paso de la longitud de onda de interés hacia el detector fotomultiplicador, permitiendo que el ordenador genere la imagen.

Un *fluorocromo* o *fluoróforo* es el componente de una molécula que permite que sea fluorescente, es decir, un grupo funcional de una molécula que cuando es excitado con energía electromagnética en una determinada longitud de onda, responde emitiendo energía electromagnética de menor energía, en otra longitud de onda mayor.

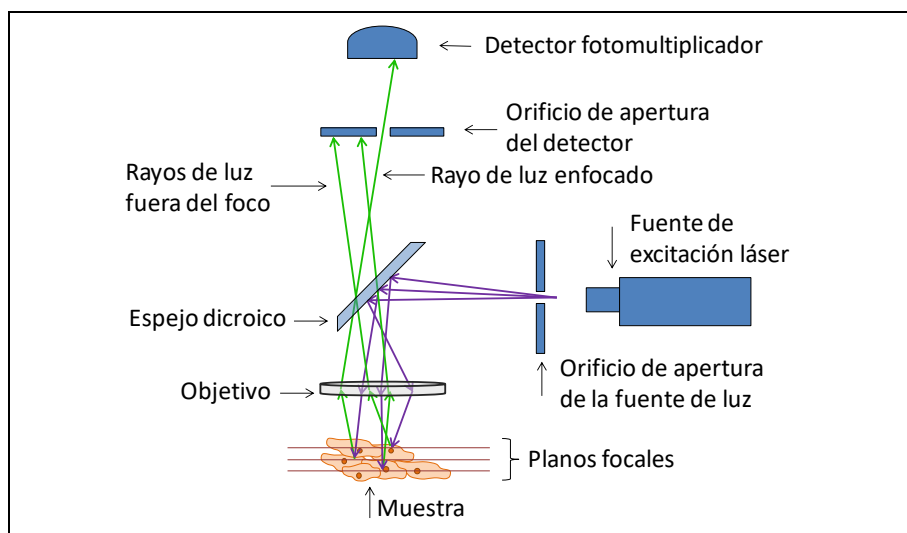


Fig. 1/30. Esquema de un microscopio confocal espectral con escaneado láser.

Para evaluar la viabilidad se utilizaron los fluorocromos calceína-AM e yoduro de propidio (IP). La calceína-AM es un derivado acetoximetilado y no fluorescente de la calceína. Tras penetrar en las células únicamente las esterasas presentes en las células vivas son capaces de eliminar su porción éster y de retener la calceína en el interior, que se une al calcio y pasa a su forma fluorescente. El IP solo es capaz de penetrar en las células no viables o muertas y se vuelve fluorescente por unión al ADN del núcleo.

En resumen, la tinción de los cultivos previa a la toma de imágenes permite interpretar dos parámetros relacionados con la viabilidad celular, que son la actividad

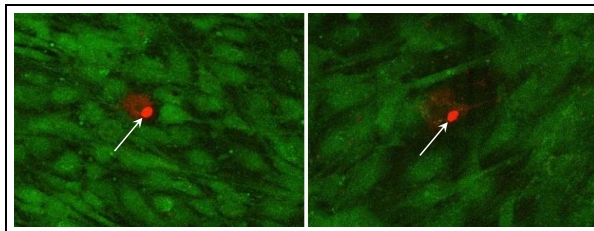


Fig. 1/31. Células vivas (citoplasma en verde) y muertas (núcleos en rojo, flechas).

de las esterases celulares y la integridad de la membrana celular, permitiendo la determinación simultánea de las células vivas, teñidas con calceína-AM, y de las células muertas, de membrana plasmática dañada y cuyos núcleos han sido teñidos por el IP (Fig. 1/31).

### 1.6.7. Expresión génica por PCR en tiempo real (qPCR)

La cuantificación por qPCR permite monitorizar el progreso de las reacciones de PCR al mismo tiempo en que tienen lugar ya que los datos se van recogiendo a lo largo de todo el proceso en vez de al final de la PCR. Las reacciones de qPCR se caracterizan por el momento temporal durante la ciclación en que la amplificación de la secuencia génica diana se detecta por primera vez, en vez de por la cantidad de señal acumulada tras un número determinado de ciclos.

Durante los primeros ciclos se detecta poca señal de fluorescencia y se forma una línea basal o *fluorescencia de fondo* para la curva de amplificación (Fig. 1/32). En cuanto se produce un aumento de la fluorescencia sobre esta línea de base se inicia la detección con lo que, a mayor número de copias, más pronto se detectará un aumento significativo de la fluorescencia.

Ligeramente por encima de esta fluorescencia de fondo se puede fijar un valor umbral de detección de la fluorescencia o *threshold*. Los valores umbrales, denominados  $Cq^4$ , se determinan identificando el ciclo de amplificación en el que la intensidad de la fluorescencia del marcador fluorescente sobrepasa se eleva por encima de la línea basal,

---

<sup>4</sup> La guía MIQE (45) ha propuesto el uso del término  $Cq$  para estandarizar las diferentes nomenclaturas utilizadas hasta el momento para la definición de este concepto.

sobrepasando su umbral e iniciándose con ello la detección.

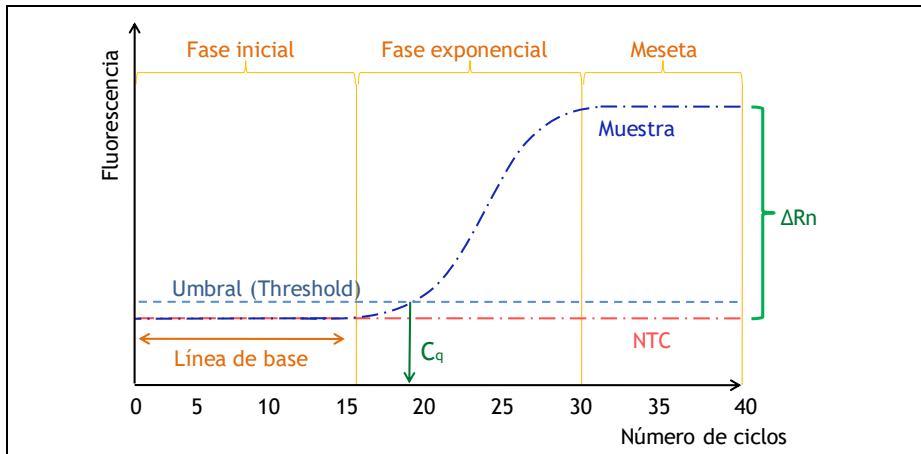


Fig. 1/32. Cinética de la amplificación por qPCR.  $\Delta Rn$ : Magnitud real generada de la señal de fluorescencia; calculada como la diferencia entre la emisión del *reporter* cuando la reacción incorpora ADN molde y la emisión de fluorescencia normalizada por ROX medida en el NTC (control negativo).

En el proceso de amplificación y emisión de fluorescencia se distinguen varias etapas, durante las cuales la separación de la sonda permite que el proceso de extensión del cebador continúe hasta el final. En cada ciclo se repite todo el proceso y se provoca un aumento de la intensidad de la fluorescencia, que será proporcional al producto de reacción generado. Las sondas TaqMan®<sup>5</sup> utilizadas aseguran la especificidad ya que han sido diseñadas para detectar genes concretos, ya que la detección basada en TaqMan utiliza una sonda fluorogénica específica del gen objetivo para detectarlo a medida que se acumula durante la PCR.

#### 1.6.7.1. Aislamiento y cuantificación del ARN

El ARN total incluye *todos* los tipos de ARN presentes en la célula,

<sup>5</sup> La guía MIQE (45) recomienda utilizar el término *sondas de hidrólisis* para referirse a las sondas TaqMan, sondas con marcación fluorogénica que utilizan la actividad de 5' nucleasa de la ADN polimerasa *Taq*.

no solamente los mensajeros si no también los ribosómicos, transferentes, poliadenilados, interferentes, de reconocimiento de señal, largos no codificantes... Es conveniente que se aisle el ARN total ya que algunos ARN son capaces de actuar sobre los mRNA y degradarlos, bloquear la translación o incluso marcar secuencias génicas para su metilación y reprimir la transcripción o bloquear la movilidad de los transposones en el ADN.

#### 1.6.7.2. Síntesis y cuantificación del ADN complementario (cDNA)

El cDNA es un ADN bicatenal generado por la enzima transcriptasa inversa a partir de los mRNA presentes en la mezcla de reacción. La transcriptasa inversa es una ADN-polimerasa ARN-dependiente que utiliza los mRNA como molde y oligo(dT) como cebadores. Hay que tener en cuenta que los mRNA son ARN maduros y carecen de intrones (secuencias no codificantes) debido a los procesos de *splicing* (corte y empalme) posteriores a la transcripción del ADN del núcleo, con lo que el cDNA será diferente al ADN original en estas secuencias.

### 1.7. EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A la hora de realizar un análisis estadístico hay que tener en cuenta previamente diferentes conceptos condicionados por el diseño del experimento y el tipo de datos recabados.

El *tamaño muestral* (N) es el número total de observaciones que aparecen en la muestra y afecta a la potencia de la prueba a realizar ya que, generalmente, si existen diferencias es más fácil encontrarlas en una población más grande.

Una *prueba estadística* se basa en dos hipótesis competitivas: la hipótesis nula  $H_0$  y la hipótesis alternativa  $H_1$ .

Antes de comenzar con el análisis estadístico en sí mismo, se debe realizar una prueba de normalidad a los datos para saber si se debe rechazar o no se puede rechazar la hipótesis nula de que los datos provengan de una población distribuida normalmente.

La *distribución normal* es una distribución con forma de campana en la que las *desviaciones estándar* sucesivas con respecto a la *media* establecen valores de referencia para estimar el porcentaje de observaciones de los datos. La *prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov* (KS), compara la función de distribución acumulada empírica de los datos de la muestra con la distribución esperada si los datos se ajustasen a una distribución Normal,  $N(0,1)$ . Si esta diferencia observada es adecuadamente grande, la prueba rechazará la hipótesis nula de normalidad de la población.

Cuando los análisis se establecen con *simetría bilateral o de dos colas* se espera que se resalte una diferencia cuando se comparan dos medias, y ya que a priori no se sabe cuál de las medias de los grupos sujetos a comparación va a ser superior el análisis se asocia a la hipótesis alternativa  $H_1 \bar{x}$  grupo muestral A  $\neq$   $H_1 \bar{x}$  grupo muestral B.

El *valor p* es una probabilidad que mide la evidencia que existe en contra de la hipótesis nula. Un valor  $p$  más pequeño va a otorgar una evidencia más fuerte en contra de  $H_0$ .

Valor  $p \leq \alpha$ : Los datos no siguen una distribución normal, y se rechaza  $H_0$ .

Valor  $p > \alpha$ : No se puede concluir que los datos no sigan una distribución normal, por lo tanto, no se puede rechazar  $H_0$ .

Es decir, que, si el valor  $p$  es mayor que el nivel de significancia  $\alpha$  elegido, no hay evidencias para rechazar la hipótesis nula y se puede concluir que se trata de una población normal. Si el valor de  $p$  es menor o igual que  $\alpha$ , se puede rechazar la hipótesis nula y concluir que se trata de una población no normal.

El *nivel de significancia  $\alpha$*  es la potencia de la prueba cuando  $H_0$  es verdadera. Con valores altos de  $\alpha$  la potencia de la prueba es mayor, pero como al mismo tiempo es el nivel máximo aceptable de rechazar  $H_0$  si es verdadera, también aumenta la probabilidad de cometer un error de tipo I que sería rechazar  $H_0$  cuando es verdadera. El  $\alpha$  predeterminado es 0'05. Este valor indica un riesgo del 5% de concluir que existe un efecto cuando en realidad no existe.

La *desviación estándar* (SD) es una medida de dispersión que indica cuán dispersos están los datos con respecto a la media.

La *media* ( $\bar{x}$ ) es el promedio de los datos, describiendo la muestra con un valor resultado de la suma de todas las observaciones dividida entre el número de observaciones.

La *mediana* ( $\eta$ ) es el punto medio del conjunto de datos, en el cual la mitad de las observaciones está por encima del valor y la otra mitad está por debajo del valor. En comparación con la media, la mediana no es sensible a datos con valores extremos y suele ser una medida más informativa con respecto al centro de los datos asimétricos.

La *prueba t de Student* es una prueba que se utiliza bajo el supuesto de normalidad. Se utiliza para comparar dos grupos muestrales e identificar si existe una diferencia significativa entre sus medias:

Hipótesis nula  $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$

Hipótesis alternativa  $H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$

Bajo la *corrección de Welch* no se presupone ni se requiere que las dos muestras tengan varianzas iguales. Según estudios, la prueba se desarrolla adecuadamente con varianzas desiguales, incluso cuando los tamaños de las muestras no son iguales.

Cuando se parte de un supuesto de no normalidad, el análisis se realiza de forma *no paramétrica*. Las *pruebas no paramétricas* sí requieren que los datos sean una muestra aleatoria independiente y no presuponen una distribución específica para la población, resultando útiles en los casos en los que se tiene una muestra pequeña asimétrica o una muestra que contiene valores atípicos.

El equivalente no paramétrico a la prueba t de Student es la *prueba de Mann-Whitney*. Es una prueba útil para muestras de poblaciones no normales con la misma forma y dispersión y que sean relativamente pequeñas. Utiliza la mediana y atiende a las siguientes condiciones:

Hipótesis nula  $H_0: \eta_1 - \eta_2 = 0$

Hipótesis alternativa  $H_1: \eta_1 - \eta_2 \neq 0$

## *2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS*



## 2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1. JUSTIFICACIÓN

La artrosis es una enfermedad incapacitante para la que los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos han sido el tratamiento de primera línea más recetado durante los últimos treinta años para aliviar los síntomas de esta patología, ya que actúan inhibiendo la síntesis y acción de prostaglandinas al bloquear la actividad de la enzima COX (245).

El tratamiento con fármacos por vía oral es el más habitual y la selección de la bibliografía se ha realizado acorde a este parámetro, procurando acotarla en el campo de los cultivos celulares a aquellas referencias que no estimulan las muestras con citoquinas exógenas u otros factores promotores de la inflamación. En esta bibliografía se documenta profusamente que la inhibición de la actividad de COX no provoca una mejora sustancial del cartílago artrósico, pero trata someramente la acción de los fármacos sobre la articulación sana, sometida también a la acción del fármaco administrado por esta vía.

Durante la artrosis se suceden diversos eventos que se traducen en la pérdida de cartílago y funcionalidad de la articulación. Todavía no se han establecido los cambios en la progresión de la enfermedad con el uso de AINEs, pero diversos estudios en pacientes, pruebas en modelos animales y cultivos celulares, manifiestan que existe un efecto negativo sobre diferentes parámetros como pueden ser la síntesis de proteoglucanos, el deterioro del espacio articular o el estado general del tejido. Particularmente, respecto a los inhibidores selectivos de COX-2, estos parecen tener un efecto beneficioso en pruebas *in vitro* (80, 134, 180-181, 219-220).

La bibliografía disponible al respecto de los fármacos estudiados —indometacina, diclofenaco, celecoxib— describe los efectos generalmente adversos de estos AINEs sobre el cartílago, entre otras líneas celulares, en modelos animales, estudios clínicos en pacientes, y

cultivos celulares tanto animales como humanos.

Los modelos celulares localizados en esta bibliografía no abordan el porqué de la elección de las concentraciones de fármaco seleccionadas para cada estudio. Ya que el líquido sinovial es el lugar de acción de los AINEs y la concentración de fármaco es un determinante importante de la respuesta clínica al alcanzarse y mantenerse por difusión del fármaco libre desde la sangre (209), el análisis *in vitro* está enfocado a la concentración en líquido sinovial de los tres fármacos (3.3. *Concentraciones de fármacos en ensayo*), teniendo en cuenta que concentraciones superiores, en caso de poder alcanzarse *in vivo* en el líquido sinovial, podrían suponer la exposición del individuo a dosis de fármaco tóxicas administradas por vía oral.

Para finalizar, no se encontró ningún artículo que abordase al mismo tiempo un estudio comparativo *in vitro* de parámetros relacionados con la evolución de la artrosis bajo tratamiento con los tres fármacos en condrocitos humanos sanos y artrósicos, lo que justifica la necesidad de una puesta en común en condiciones homogéneas para el estudio de la evolución *in vitro* de la patología bajo analgesia.

## 2.2. HIPÓTESIS

Existe una relación entre el uso de diferentes fármacos antiinflamatorios no esteroideos y la progresión de parámetros asociados al desarrollo de la artrosis en condrocitos humanos, sanos y artrósicos, en cultivo.

## 2.3. OBJETIVOS

### 2.3.1. Objetivo principal

Estudiar el efecto de dos AINEs clásicos (indometacina y diclofenaco) y un inhibidor altamente selectivo de COX-2 (celecoxib) sobre la funcionalidad del cartílago a través de cultivos celulares.

### 2.3.2. Objetivos secundarios

1. Examinar el efecto de los fármacos

seleccionados en la proliferación y viabilidad de las células sanas y artrósicas en cultivo.

2. Investigar el efecto de los fármacos mencionados sobre la síntesis de marcadores proinflamatorios y componentes de la matriz extracelular.

3. Analizar la expresión de genes implicados en el mantenimiento del tipo celular en condiciones de tratamiento farmacológico.

4. Determinar, bajo condiciones homogéneas, el fármaco menos agresivo para la evolución de marcadores artrósicos.



### *3. MATERIALES Y MÉTODOS*



## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. CONSIDERACIONES PREVIAS Y CONDICIONES EXPERIMENTALES**

#### **3.1.1. Recolección de las muestras clínicas**

La superficie del cartílago contiene una mayor densidad de células y de colágeno, pero menor proporción de GAG. Esta proporción de GAG aumenta en la forma de un gradiente proximodistal, y la densidad celular es superior en las regiones no sometidas a carga (128).

#### **3.1.2. Tiempos de incubación**

Los tiempos de incubación seleccionados se escogieron en base a diferentes aspectos:

- bibliografía existente
- para dar tiempo suficiente a que sucedan cambios inducidos por los tratamientos en los procesos celulares y en los cultivos

#### **3.1.3. Medio de cultivo con rojo fenol**

El rojo fenol es un colorante usado como indicador del pH en los medios de cultivo. Los cambios de color ocurren cuando el pH varía fuera del rango 6'8 (viraje al amarillo) a 8'4 (viraje al violeta). La presencia del color rojo en el medio de cultivo no va a tener mayor repercusión sobre la medición espectrofotométrica en los ensayos realizados ya que va a virar al amarillo al reaccionar con el componente ácido del solvente. Este viraje apenas va a contribuir a la densidad óptica de la solución puesto que en los ensayos con formazán la longitud de onda se corresponde al espectro azul y en las demás pruebas con componente de lectura espectrofotométrica el medio de cultivo es

descartado durante el procedimiento.

### **3.1.4. Cultivo en jarras**

La forma de cultivar las células consiste en una jarra plástica de cultivo de tapón de rosca ventilado que contiene un medio líquido con los nutrientes necesarios y el pH adecuado para que las células proliferen, manteniendo el interior aislado de contaminaciones externas. Para el cultivo de condrocitos, este medio de cultivo tiene que ser suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y un 1% de solución antibiótica conteniendo penicilina y estreptomina. Este medio suplementado (MS) es mantenido en refrigeración para su conservación, pero debe ser atemperado a 37°C previamente a su utilización con la ayuda de un baño termostático.

Los parámetros de cultivo de los ensayos *in vitro* están resumidos en la Tabla 3/1.

### **3.1.5. Precauciones**

Cualquier tipo de cultivo celular debe tratarse como potencialmente contaminable y, además, se debe evitar el contacto de las soluciones de trabajo con piel y mucosas. También es necesario el uso de una solución antiséptica para desinfección de materiales y limpieza rutinaria.

Las jarras, placas o cámaras de cultivo al uso deben mantenerse con el interior estéril y dentro de un incubador de atmósfera húmeda a las condiciones estándar de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> para asegurar la viabilidad de las células.

Tabla 3/1. Resumen de las condiciones experimentales de los ensayos realizados

Ensayo	Placa	Células	Densidad de siembra	Concentración de fármacos	Tiempo de incubación
Proliferación	96 pocillos	Sanas y artrósicas	$1.5 \times 10^3$ c/p	0-100000 $\mu\text{M}$	5; 10; 15 días
Inmunoensayos	48 pocillos	Sanas y artrósicas	$3 \times 10^4$ c/p	0; 1 $\mu\text{M}$	5; 10; 15 días
Glicosaminoglucanos	48 pocillos	Sanas y artrósicas	$3 \times 10^4$ c/p	0-100 $\mu\text{M}$	5; 10; 15 días
Cicatrización	12 pocillos	Sanas y artrósicas	$5 \times 10^4$ c/cm <sup>2</sup>	0-100 $\mu\text{M}$	0; 12, 20 h
Viabilidad	Lab-Tek™ Chamber Slide™ System (Nunc)	Sanas y artrósicas	$1.5 \times 10^4$ c/cm <sup>2</sup>	0 -100 $\mu\text{M}$	5, 15 días
qPCR	Jarra de cultivo de 75 cm <sup>2</sup>	Sanas y artrósicas	$2 \times 10^6$ c/jarra	0; 1 $\mu\text{M}$	0; 15 días
c/p: células por pocillo; c/cm <sup>2</sup> : células por centímetro cuadrado; c/jarra: células por jarra de cultivo; $\mu\text{M}$ : micromolar.					

### **3.2. OBTENCIÓN DE CULTIVOS**

Durante la realización de la parte experimental se utilizaron condrocitos de origen humano, procedentes tanto de cartílago sano como artrósico.

Para asegurar el mantenimiento del fenotipo, ninguna de las líneas celulares superó el pase 6.

#### **3.2.1. Obtención del cartílago articular, aislamiento de condrocitos y proliferación de los cultivos**

Los condrocitos se aislaron a partir de las cabezas femorales de pacientes del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Complejo Hospitalario Clínico Universitario de Santiago de Compostela (CHUS), de ambos sexos y edades superiores a los 60 años, que cumplieran con los criterios de diagnóstico para la patología artrósica. Tenían seguimiento por parte del facultativo y fueron sometidos a intervención quirúrgica. Las muestras se obtuvieron previo consentimiento informado de los pacientes según lo establecido por el Comité Ético del CHUS.

La manipulación y procesado del cartílago se realizó dentro de una cabina de flujo laminar vertical de protección biológica para garantizar unas condiciones de esterilidad adecuadas.

Las piezas fueron lavadas con tampón fosfato salino (PBS) para eliminar posibles residuos provenientes de la intervención quirúrgica.

El aislamiento de condrocitos a partir de las muestras clínicas (Fig. 3/1) se realizó siguiendo las indicaciones descritas por Couceiro et al. 2002 (59).

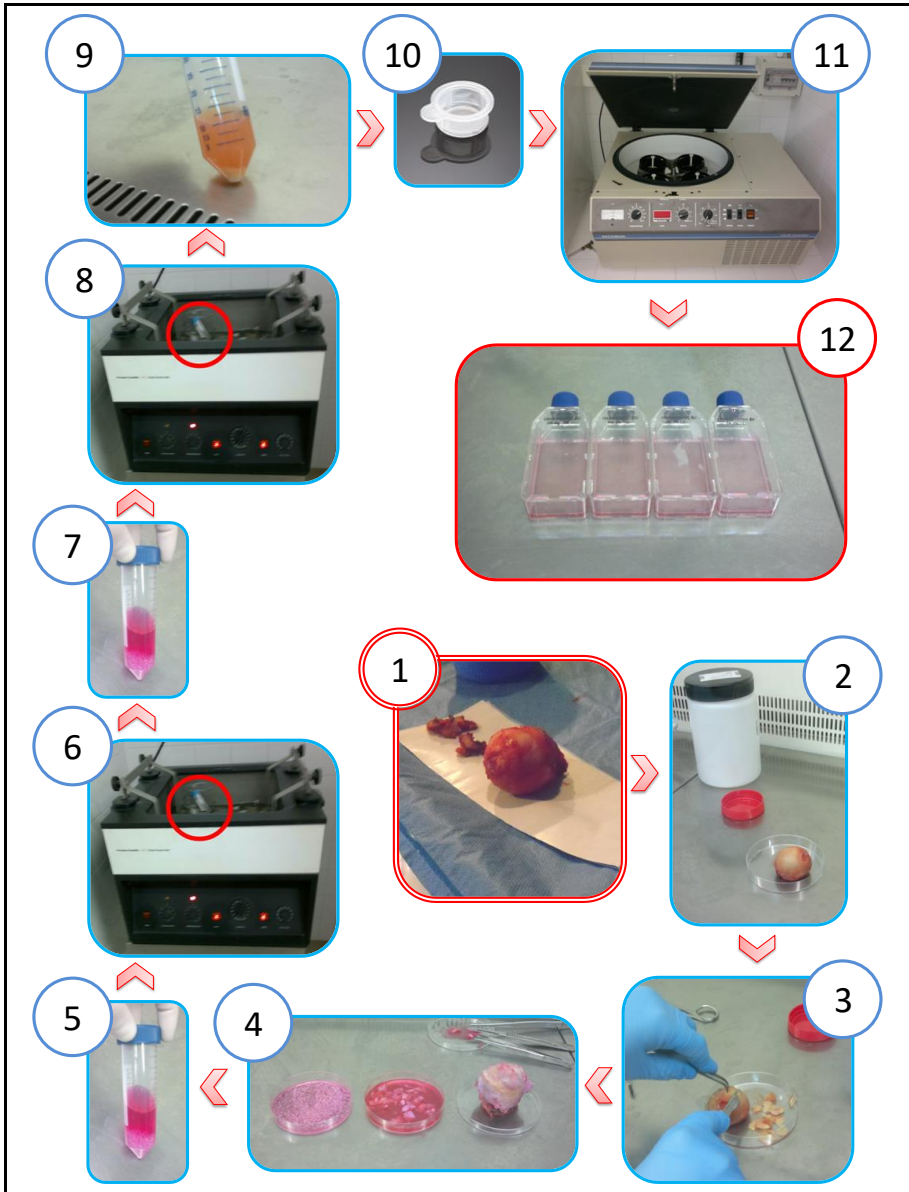


Fig. 3/1. Proceso del aislamiento de condrocitos. 1-4: Recepción, preparación y procesado de la muestra. 5-6: Digestión con tripsina. 7-9: Digestión con colagenasa. 10: Filtrado. 11: Lavado, centrifugación y recogida de condrocitos. 12: Siembra en jarras e incubación.

5. Con ayuda de pinza y escalpelo se extraen láminas de cartílago artrósico a una placa de Petri conteniendo DMEM para evitar su desecación.

6. Cada una de las láminas de cartílago obtenida se disgrega a su vez en fragmentos de 1–2 mm<sup>3</sup> que se recogen a un tubo Falcon de 50 mL.

7. Estos fragmentos se tratan a 37°C durante 30 minutos en un baño termostático de agitación orbital con una solución de tripsina-EDTA al 0'25% para eliminar los fibroblastos que pudieran existir.

8. Durante el tiempo de espera del paso 3, se prepara una solución de colagenasa en MS. Para la digestión del cartílago se recomienda una concentración entre 1-2 mg/mL. Una vez solubilizada la colagenasa, la solución se filtra con un filtro de 0'2 µm.

9. Finalizada la digestión con tripsina-EDTA (descrita en el paso 3) se retira el medio por aspiración con pipeta serológica. Se realiza un lavado con MS, que se elimina por aspiración.

10. Se añade la solución filtrada de colagenasa (descrita en el paso 4), y se mantiene a 37°C durante 12 horas en un baño termostático de agitación orbital.

11. Tras la digestión enzimática, la suspensión celular se filtra a través de una criba de nylon de 70 µm.

12. La suspensión celular se centrifuga a 1500 r.p.m. durante 5 minutos. Se descarta el sobrenadante, se añade MS para eliminar los restos de colagenasa y se vuelve a centrifugar (20).

13. El pellet resultante se resuspende en MS y se evalúa la cantidad de células viables por medio de azul tripán.

a) Se limpia la cámara Neubauer con alcohol 70° y se deja secar

b) Se coloca un cubreobjetos limpio

c) Se toman 10 µL de suspensión celular y se mezclan con otros 10 µL de solución de azul tripán

d) Se recogen 10 µL de la mezcla y se carga la cámara

e) Se coloca en el microscopio invertido y se examinan con contraste de fases los cuatro cuadrantes de

las esquinas<sup>6</sup> a magnificación 10X.

f) Las células no viables estarán teñidas de azul. La viabilidad celular se estima de la siguiente forma:

$$\% \text{ células viables} = [1 - (\text{n}^\circ \text{ células teñidas} / \text{n}^\circ \text{ total de células})] * 100$$

g) Para calcular el número total de células por mililitro de suspensión celular se utiliza la siguiente fórmula<sup>7</sup>:

$$N^\circ = \bar{x} * 10000 * 2$$

14. Se siembra en jarra de superficie adecuada a la cantidad de células obtenida, recordando que una alta densidad celular colabora al mantenimiento de las características del condrocito *in vitro*.

15. Se devuelven las jarras al incubador y se mantienen al menos 24 horas para permitir la adhesión de los condrocitos antes de cambiar el medio por MS nuevo para descartar las células que no se hayan adherido.

### 3.2.2. Línea celular comercial

Para poder realizar las comparaciones de las pruebas con cultivos sanos se adquirió el cultivo primario de *Condrocitos humanos articulares P10970* a Innoprot (*Innovative Technologies in Biological Systems, S.L.*).

Los condrocitos humanos articulares (HC-a) proporcionados por Innoprot fueron aislados a partir de tejido de la articulación de la rodilla. Estas células fueron criogenizadas tras su primer pase y son recepcionadas en nuestro laboratorio en hielo seco.

Para proceder a su cultivo se siguió el siguiente protocolo:

---

<sup>6</sup> Las dimensiones de la cuadrícula en estas áreas son 1 mm x 1 mm x 0'1 mm de profundidad, el volumen es 0'1 mm<sup>3</sup> que equivale 10<sup>-4</sup> mL.

<sup>7</sup> “ $\bar{x}$ ” es la media aritmética de resultante de sumar las células que aparecen en los cuatro cuadrantes. “10000” es un valor relacionado con el diseño de la cámara, ver nota anterior. “2” es el factor de dilución aplicado en este caso.

1. Se descongela el criovial a 37°C en el baño termostático.
2. Se seca y se lava con etanol al 70%. Se introduce en la cabina de cultivo.
3. Se resuspende el contenido con cuidado.
4. Se deposita el contenido del vial en jarras de cultivo con MS. La densidad inicial recomendada fue de 5000 c/cm<sup>2</sup>.
5. Se introducen las jarras en el incubador de atmósfera húmeda con las condiciones de cultivo anteriormente descritas y se dejan 24 horas, al cabo de las cuales se procede a revisar la adhesión al soporte y se realiza un cambio completo de MS para eliminar las células que no se hubieran adherido.

### 3.2.3. Mantenimiento de los cultivos

Se realizaron subcultivos durante la etapa de proliferación, cuando los estos alcanzaron un 90% de confluencia, comprobando el estado viable de las células por medio de azul tripán.

1. Se identifican las nuevas jarras de cultivo con el tipo celular, número de pase y fecha. Se añade MS suficiente. Se mantienen en incubación para conservar la temperatura del medio.
2. Se realiza un lavado con PBS de los cultivos.
3. Se añaden 3 ml de tripsina-EDTA a cada jarra de cultivo de 100 cm<sup>2</sup>, dejando en incubación 2 minutos.
4. Se comprueba bajo el microscopio la pérdida de la adhesión, se neutraliza la acción de la tripsina con un volumen equivalente de MS y la monocapa de células es levantada a presión por pipeteo.
5. Se recoge la suspensión celular en tubos Falcon debidamente identificados, centrifugando a 1500 r.p.m. durante 5 minutos.
6. Se descarta el sobrenadante y el pellet se resuspende en MS.
7. Se realiza un conteo con azul tripán de la resuspensión.

8. Se reparte la resuspensión entre las jarras preparadas y se llevan a incubación.

### 3.3. CONCENTRACIONES DE FÁRMACOS EN ENSAYO

Con el fin de obtener un marco de referencia, se realizó una búsqueda bibliográfica para hallar las concentraciones que alcanzan los fármacos, administrados por vía oral, en líquido sinovial *in vivo* de pacientes humanos aquejados de osteoartritis. Los resultados de esta búsqueda se exponen en la Tabla 3/2.

Las referencias de los fármacos utilizados son las siguientes:

- Indometacina: *Indomethacin*, Ref. I7378 *Sigma-Aldrich*
- Diclofenaco sal sódica: *Diclofenac sodium salt* Ref D6899 *Sigma-Aldrich*
- Celecoxib: *Celecoxib* Ref. PZ0008 *Sigma-Aldrich*

Debido a la escasa o nula solubilidad de la indometacina y celecoxib en soluciones acuosas, todos los fármacos fueron solubilizados en DMSO a una concentración de 100 mM. La manipulación de los fármacos y la preparación de las diferentes soluciones se llevó a cabo con material y en condiciones que garantizasen la esterilidad de los medios de cultivo finales. Las soluciones stock en DMSO se alicuotaron, etiquetaron y conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su uso posterior.

En los días de tratamiento, se prepararon diluciones de forma seriada (Fig. 3/2) en MS a 1 mM, y a 100, 10, 1, 0,1, y 0,01  $\mu\text{M}$  en función del experimento a realizar.

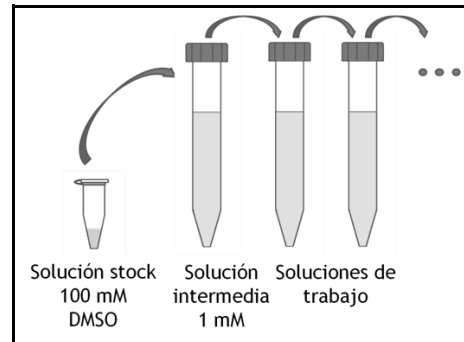


Fig. 3/2. Esquema de las diluciones seriadas.

Tabla 3/2. Resultados de la búsqueda de concentraciones de los fármacos en líquido sinovial.

Fármaco	Ref.	Vía	mg	Dosis	Horas tras última dosis	Conc. (ug/ml)	Conc. (uM)
I	(82)	oral	50	única	0,5	0,13	0,363
					2(*)	0,69	1,929
					5	0,57	1,593
					9	0,4	1,118
D	(191)	oral	37,5	única	nd	0,3	0,838
					12	0,01676	0,053
					4(*)	0'181	5'689
B	(105)	oral	100	única	8	0'176	5'532
					12	0'118	3'709
			100	2/día	3	0,5	1,311

Ref. Referencia bibliográfica. I: indometacina, D: diclofenaco, B: celecoxib. (\*): Tiempo en el que se encontró la máxima concentración de fármaco. nd: no determinado. Loc.: Localización. Conc.: Concentración.

El volumen de DMSO en estos medios de cultivo suplementado y con fármaco fue ajustado para que no superase el 0'1%.

### 3.4. ENSAYOS COLORIMÉTRICOS

#### 3.4.1. Ensayo de proliferación celular

Los materiales utilizados en este ensayo fueron el kit de proliferación celular *Cell Proliferation Kit I (MTT)* Ref. 11465007001, de *Roche Applied Science*, y un espectrofotómetro modelo *ELx800* de *BioTek Instruments, Inc.* con un filtro de 570 nm.

##### 3.4.1.1. Curvas dosis-respuesta y cálculo del IC<sub>50</sub>

Se elaboró una curva dosis-respuesta a cinco días para determinar la concentración inhibitoria del 50% o IC<sub>50</sub>, que es el valor al cual una sustancia ejerce la mitad de la inhibición máxima sobre un parámetro, en este caso, la proliferación de los cultivos en presencia de cada uno de los fármacos.

Se sembraron 1500 c/p sanas y artrósicas en placas de 96 pocillos, en volúmenes de 100 µL, dejando a las células 24 horas en incubación en condiciones estándar de CO<sub>2</sub>, humedad y temperatura para permitir su adhesión. A las 24 horas se cambian los MS por MS para los pocillos control, sin tratamiento, y MS con fármaco (MSF) para los pocillos correspondientes a cada concentración y fármaco. Se realizaron cambios de medio cada dos días. Las concentraciones utilizadas para hallar el IC<sub>50</sub> fueron de 0, 0'01, 0'1, 1, 10 y 100 µM, 1, 10 y 100 mM, y 1 M para los tres fármacos.

A los 5 días tras la siembra se procede, en condiciones de esterilidad, a la adición de MTT, incubación y solubilización del formazán según el procedimiento establecido por el fabricante:

1.- Sobre el volumen de cultivo se añaden a cada pocillo 10 µL de la solución de MTT por cada 100 µL volumen de medio.

2.- Se mantiene durante 4 horas en incubación a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda, tiempo durante el cual las

células metabólicamente activas asimilan y convierten las sales de tetrazolio en cristales de formazán.

3.- Es recomendable comprobar al microscopio la formación de los cristales pasadas las 4 horas.

4.- Una vez cumplido el tiempo de incubación y formación de los cristales se añaden 100  $\mu\text{L}$  de la solución solubilizante suministrada con el kit de ensayo (10% de SDS en 0.01 M de ácido clorhídrico).

5.- La placa se incuba otras 12 horas para permitir la acción del solubilizante.

6.- La solución coloreada resultante es cuantificada por espectrofotometría a una longitud de onda de 570 nm.

Las absorbancias obtenidas fueron normalizadas utilizando la media aritmética de sus respectivos controles, y los resultados analizados mediante la aplicación *Dose-response-X is log (dose)* contenida en el programa *GraphPad Prism v.7.04*, de *GraphPad Software, Inc.*, obteniéndose los valores  $\text{IC}_{50}$  para cada fármaco. En este programa, las concentraciones deben representarse de forma logarítmica en base 10, y puesto que  $\log_{10}(0)$  no es un número real, el programa recomienda utilizar en su lugar el valor  $10^{-10}$  ya que es un valor lo suficientemente pequeño como para que pueda considerarse igual a 0 y se pueda realizar el análisis.

#### 3.4.1.2. Proliferación de los cultivos a 5, 10 y 15 días

Se sembraron 1500 c/p sanas y artrósicas en placas de 96 pocillos, en volúmenes de 100  $\mu\text{L}$ , dejando a las células 24 horas en incubación en condiciones estándar de  $\text{CO}_2$ , humedad y temperatura para permitir su adhesión. Al cabo de esas 24 horas se cambian los MS por MS para los pocillos control, sin tratamiento, y MSF para los pocillos correspondientes a cada concentración y fármaco. Se realizan cambios de medio cada dos días. Las concentraciones utilizadas fueron de 0, 0'01, 0'1, 1, 10, 100  $\mu\text{M}$  para los tres fármacos.

A los 5, 10 y 15 días tras la siembra se procede, en condiciones de esterilidad, a la adición de MTT, incubación y solubilización del formazán según la forma ya descrita.

Las absorbancias obtenidas fueron normalizadas a porcentajes utilizando la media aritmética de sus respectivos controles, para poder referenciar numéricamente la capacidad proliferativa de cada cultivo y tratamiento.

Se escogieron las concentraciones de 0 y 1  $\mu\text{M}$  para la realización del análisis estadístico según se explica en el apartado 3.7. *Estudio estadístico*.

### 3.4.2. Cuantificación de sGAG

La cuantificación de sGAG se llevó a cabo mediante el kit comercial *Blyscan<sup>TM</sup> Sulfated Glycosaminoglycan Assay* de *Biocolor Ltd*. Los reactivos, de *Sigma—Aldrich*, para la preparación de la solución de papaína para la extracción de sGAG fueron los siguientes:

- *Fosfato disódico dodecahidrato*, Cód. 71649
- *Fosfato monosódico monohidrato*, Cód. 71507
- *Acetato de sodio*, Ref. S7545
- *Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) sal disódica dihidrato*, Cód. E1644
- *Clorhidrato de L- cisteína* Ref. C1276
- *Papaína de látex de papaya*, Cód. P3125

Aspectos para tener en cuenta con el kit utilizado son que el ensayo no es adecuado para fragmentos degradados de disacáridos azufrados o para muestras que contengan alginato pues al igual que los sGAG, poseen residuos de ácido urónico; el ácido hialurónico (HA) no es detectado por el kit utilizado y la presencia de HA en las muestras no va a interferir en la medición. Las muestras no deben contener demasiadas sales que puedan interferir en la interacción del DMMB con los sGAG ni que el contenido de sGAG exceda los 5  $\mu\text{g}$  o la saturación sGAG-DMMB no ocurrirá.

Se sembraron  $3 \times 10^4$  c/p sanas y artrósicas en placas de 48 pocillos, dejando a las células 24 horas en incubación en condiciones estándar de  $\text{CO}_2$ , humedad y temperatura para permitir su adhesión. Al cabo de esas 24 horas se cambian los MS por MS para los pocillos control, sin tratamiento, y MSF para los pocillos correspondientes a cada

concentración y fármaco. Se realizan cambios de medio cada dos días. Las concentraciones estudiadas fueron de 0 y 1  $\mu\text{M}$  para los tres fármacos.

Para el proceso de extracción se utilizaron un agitador mecánico orbital *Nahita* modelo AX685/2, un vórtex *Unimag ZX3* de *Uniequip* y una microcentrífuga *Microfuge® 18* de *Beckman Coulter*. Se emplearon microtubos de 1'5 mL de baja retención *Microcentrifuge Tube with X-Resin™* Ref. MTL-0150-BC de *Biotix*. Para la cuantificación por colorimetría se utilizó un espectrofotómetro modelo *ELx800* de *BioTek Instruments, Inc.* con un filtro de 656 nm.

Para la extracción de los sGAG se necesita preparar un reactivo que contenga papaína. El protocolo se describe a continuación:

1. Preparación de 100 mL de tampón sodio fosfato 0'2M ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ ), pH 6'4.
2. Para preparar el reactivo de extracción de papaína, se añade a los 100 mL de tampón sodio fosfato preparado con anterioridad:
  - 820 mg de acetato de sodio (0'1M)
  - 370 mg de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (0'01M)
  - 80 mg de cisteína HCl (0'005M)
3. Cuando todos los componentes se han disuelto, se añade la papaína de forma que haya entre 15 y 20 mg de compuesto por cada 100 mL de tampón de extracción. Este reactivo es estable a 4°C durante 7 días en un frasco de cristal topacio.

Como la cantidad de sGAG liberados al medio antes de que ocurra la confluencia del cultivo es muy pequeña, el kit *Blyscan™* ha desarrollado diferentes métodos para poder determinar los niveles de sGAG tanto dentro de la célula como en la matriz extracelular circundante. El protocolo seguido en este ensayo lleva a la cuantificación de las concentraciones de sGAG asociados a la matriz extracelular, excluyendo los sGAG anclados a superficie:

1. Se lavan los pocillos con PBS y se vacían.

2. Se añaden 50  $\mu\text{L}$ <sup>8</sup> del reactivo de papaína preparado con anterioridad durante 60 segundos a 37°C.

3. Se golpetean ligeramente los pocillos y se transfiere la suspensión celular a tubos de microcentrífuga de 1'5 mL. Los tubos deben trasladarse inmediatamente a un baño de hielo.

4. Se centrifuga la suspensión celular durante 10 minutos a 10000 x g para eliminar las células del sobrenadante. Se toman 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se inicia el protocolo del kit Blyscan.

5. Se preparan las muestras, estándares y blancos en tubos de microcentrífuga de 1'5 mL debidamente identificados. El estándar de referencia es una solución estéril de condroitín sulfato (*chondroitin- 4- sulfate*) de tráquea bovina a la concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Los estándares y el blanco van a servir para realizar la curva de calibración.

6. Se añade 1 mL del reactivo de tinción a cada tubo. Se cierran los tubos; se mezclan por inversión y se mantienen en agitación suave durante 30 minutos.

7. Se trasladan los tubos a la microcentrífuga y se centrifugan a 12000 r.p.m. durante 10 minutos (Fig. 3/3).

8. Se invierten los tubos con cuidado y se vacía el contenido. El fabricante establece que cualquier gota remanente puede ser eliminada golpeando sutilmente el tubo sobre un papel absorbente siempre y cuando no se produzca un arrastre del pellet.

9. Se añaden 0'5 mL del reactivo de disociación a cada tubo.

10. Se cierran bien los tubos<sup>9</sup> y se procede a solubilizar el pellet usando un vórtex. Una solubilización completa, dependiendo de la concentración de sGAG, puede tardar entre 5 y 10 minutos.

11. Se centrifugan los tubos nuevamente a 12000 r.p.m. durante 5 minutos para eliminar la espuma. Se

---

<sup>8</sup> El volumen aconsejado por el kit para el reactivo de extracción con papaína es de 1 mL para una jarra de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>.

<sup>9</sup> Para evitar pérdidas por evaporación que alteren la medición: el reactivo de disociación contiene propan-1-ol.

mantienen cerrados hasta medir la absorbancia<sup>10</sup>.

12. Para realizar la lectura de la absorbancia a 656 nm se transfieren 200  $\mu$ L de cada blanco, estándar y muestra a una placa de 96 pocillos.

Las absorbancias obtenidas se compararon con una curva de calibrado obtenida mediante el análisis simultáneo de estándares de concentraciones conocidas y los resultados se analizaron de la forma descrita en el apartado 3.7. *Estudio estadístico*.

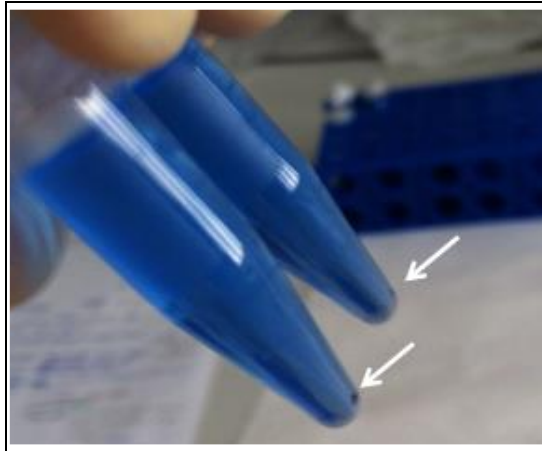


Fig. 3/3. Depósitos de sGAG (flechas).

### 3.4.3. ELISA

Los materiales utilizados fueron los siguientes kits de ELISA:

Método sándwich DAS, kits de *Boster Biological Technology Co., Ltd.*:

- *Human Fibronectin ELISA Kit*, Catalog No. EK0349,
- *Human IL-1 $\beta$  ELISA Kit*, Catalog No. EK0392
- *Human IL-6 ELISA Kit*, Catalog No. EK0410
- *Human TNF $\alpha$  ELISA Kit*, Catalog No. EK0525
- *Human MMP13 ELISA Kit*, Catalog No. EK0468
- *Human TRAIL ELISA Kit*, Catalog No EK0532

---

<sup>10</sup> Aunque el color es estable durante algunas horas, se recomienda guardar los tubos en oscuridad si la lectura se retrasa.

Método sándwich HADAS, kit de *Abcam*:

- *Caspase-9 Human ELISA Kit*, Ref. ab119508

Para la lectura colorimétrica se utilizó el espectrofotómetro *ELx800 de BioTek Instruments, Inc.* con un filtro de 450 nm.

Se sembraron  $3 \times 10^4$  c/p sanas y artrósicas en placas de 48 pocillos, dejando a las células 24 horas en incubación en condiciones estándar de CO<sub>2</sub>, humedad y temperatura para permitir su adhesión. Al cabo de esas 24 horas se cambian los MS por MS para los pocillos control, sin tratamiento, y MSF para los pocillos correspondientes a cada concentración y fármaco. Se realizan cambios de medio cada dos días. Las concentraciones estudiadas fueron de 0 y 1 μM para los tres fármacos. Los sobrenadantes destinados a los ensayos ELISA se prepararon según la recomendación del fabricante, eliminando los residuos particulados por centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Los sobrenadantes deben ser analizados inmediatamente o alicuotados y mantenidos a -20°C para su análisis posterior.

Los procedimientos fueron realizados en condiciones de esterilidad dentro de cabina de cultivo siguiendo estrictamente las especificaciones de cada fabricante, expuestas a continuación para cada uno. El proceso esquematizado se muestra en la figura 3/4.

### DAS

- 1.- Se añaden las muestras y los estándares.
- 2.- Se sella la placa y se incuba a 37°C durante 90 minutos.
- 3.- Se quita el sello y se descarta el contenido de los pocillos. En este momento no se realiza ningún lavado, solamente se seca la placa sobre papel absorbente. No se deben dejar secar nunca los pocillos por completo.
- 4- Se añaden los anticuerpos biotinilados anti- la molécula problema y se lleva a incubación a 37°C durante 60 minutos.
- 5.- Se realizan 3 lavados veces con PBS 0'01M dejando estar el tampón en los pocillos 1 minuto, descartando el tampón de lavado de cada vez y secando la placa sobre papel absorbente.
- 6.- Se añade la solución ABC preparada con

anterioridad y se incuba la placa a 37°C durante 30 minutos.

7.- Se realizan 5 lavados con PBS 0'01M dejando estar el tampón en los pocillos 1-2 minutos. Se descarta el tampón de lavado de cada vez y se seca la placa sobre papel absorbente.

8.- Se añade el cromógeno TMB e incubar la placa a 37°C en oscuridad durante 25- 30 minutos<sup>11</sup>.

9.- Al finalizar el período de incubación se añade la solución de parada del TMB. El color vira a amarillo inmediatamente.

10.- La lectura debe realizarse inmediatamente a 450 nm, o en un máximo de 30 minutos tras la adición de la solución de parada.

### **HADAS**

1.- Se lava la placa 2 veces con el tampón de lavado preparado, permaneciendo el tampón en los pocillos 10-15 segundos, dejándola secar sobre papel absorbente. La placa debe ser usada inmediatamente. No se deben dejar secar nunca los pocillos por completo.

2.- Se añaden a los pocillos las muestras, los estándares y el anticuerpo de detección preparado.

3.- Se sella la placa y se incuba a temperatura ambiente (18°- 25°C) durante 2 horas.

4.- Se quita el sello y se vacían los pocillos, realizándose 3 lavados con el tampón de lavado preparado, dejándolo 10- 15 segundos en cada pocillo. Se seca la placa sobre papel absorbente.

5.-Se añade el anticuerpo conjugado con HRP preparado a todos los pocillos.

6.- Se sella la placa y se incuba a temperatura ambiente (18°- 25°C) durante 1 hora.

7.- Se quita el sello y se vacían los pocillos. Se lavan 3 veces con el tampón de lavado preparado, dejando estar

---

<sup>11</sup> El desarrollo de color puede ser monitorizado antes de que la señal en los pocillos de estándares se sature. Se desarrolla un color azul en los estándares más concentrados. Los pocillos de muestras pueden no mostrar un color diferenciable. De forma general se recomienda añadir la solución de parada cuando el estándar más alto alcanza un azul oscuro.

el tampón en los pocillos 10- 15 segundos. Se seca la placa sobre papel absorbente.

8.- Se añade la solución TMB y se incuba en oscuridad a temperatura ambiente (18°- 25°C) durante 10 minutos<sup>12</sup>.

9.- Pasado este tiempo se añade la solución de parada (ácido fosfórico 1M) para interrumpir la reacción. El color del pocillo vira a amarillo.

10.- La lectura de la placa debe realizarse inmediatamente a 450 nm, o en el plazo máximo de 1 hora si durante ese tiempo se mantiene la placa entre 2° y 8°C en oscuridad.

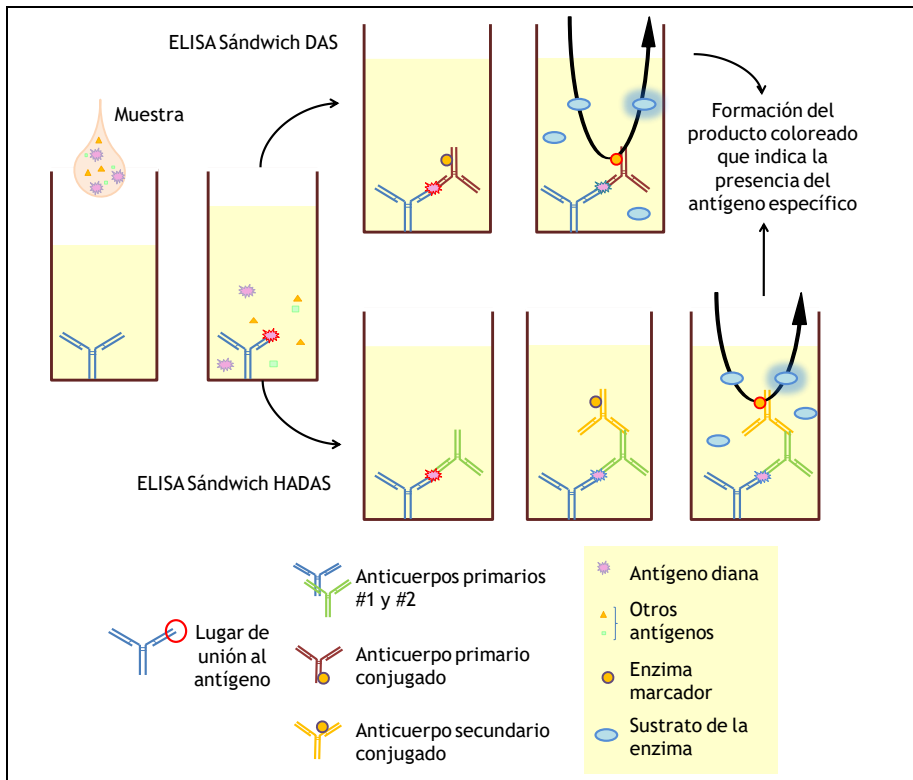


Fig. 3/4. Esquema del principio de los dos tipos de ELISA sándwich utilizados.

Las absorbancias obtenidas se compararon con una curva de calibrado obtenida con el análisis simultáneo de los estándares de concentraciones conocidas y los resultados se analizaron de la forma descrita en el apartado 3.7. *Estudio estadístico*.

### 3.5. TÉCNICAS DE IMAGEN

#### 3.5.1. Ensayo de cicatrización

La toma de imágenes se realizó con el programa *OptixCam ToupView* de *ToupTek Photonics* usando un microscopio óptico conectado a una cámara digital *OptixCam Summit SK2-5.2X 5.0MP PC/MAC Digital Microscope Camera* de *Microscope LLC*. El análisis de las imágenes se realizó mediante el programa *ImageJ 1.51q* desarrollado por el *National Institutes of Health (NIH), USA*.

Las células, sanas y artrósicas, se sembraron en MS a una densidad próxima a la confluencia ( $5 \times 10^4$  c/cm<sup>2</sup>) en placas de 12 pocillos, permaneciendo 24 horas en incubación. Al cabo de esas 24 horas se comprueba la confluencia y se realizan dos heridas perpendiculares en forma de cruz (Fig. 3/5) dividiendo el cultivo en cuadrantes con una punta de pipeta estéril de 200  $\mu$ L manteniendo el mismo ángulo en todas las muestras para que las heridas tengan un ancho uniforme. Se aspira el medio y se lava con PBS para eliminar los restos celulares, añadiendo MS para los pocillos control, sin tratamiento, y MSF para los pocillos correspondientes a cada concentración y fármaco. Las concentraciones estudiadas fueron de 0, 0,01, 0,1, 1, 10, 100  $\mu$ M para los tres fármacos.

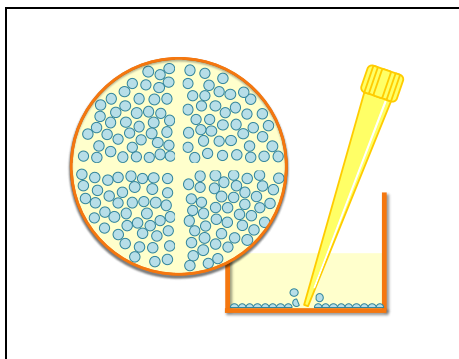


Fig. 3/5. Ensayo de cicatrización por raspado o *scratching*.

Se tomaron imágenes de los mismos campos para comprobar la

evolución de las heridas a las 0, 4, 12 y 20 horas ( $t_0$ ,  $t_4$ ,  $t_{12}$ ,  $t_{20}$ ) usando un objetivo de 10x aumentos (Fig. 3/6). En cada línea, los cultivos control sin tratamiento son compartidos por los propios controles y los cultivos con tratamiento. El punto de toma de imágenes a 20 horas, aunque pertenece a la fase de saturación del cultivo, se incluyó para comprobar el estado de cierre de la herida.

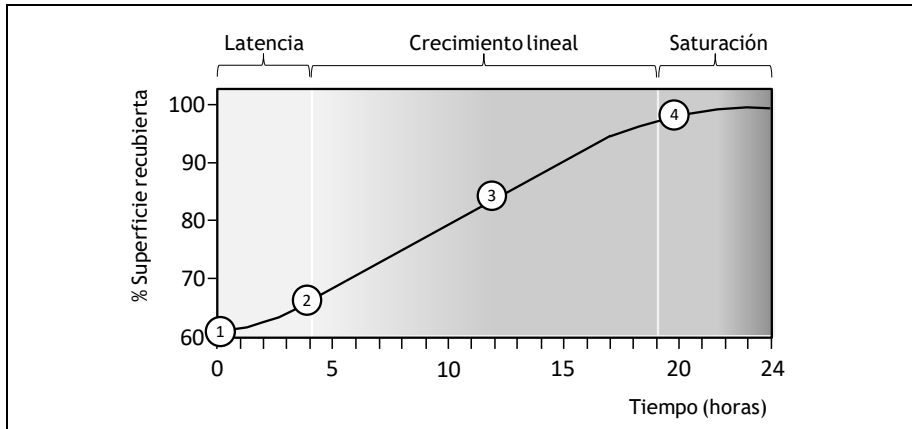


Fig. 3/6. Puntos elegidos para la toma de imágenes en el ensayo de cicatrización.

El programa *ImageJ 1.51q* mide los valores de cicatrización en porcentaje de superficie libre de células. Los resultados son analizados de la forma descrita en el apartado 3.7. *Estudio estadístico*.

### 3.5.2. Viabilidad por microscopía confocal

En este ensayo se utilizó el sistema de cámara de cultivo sobre portaobjetos especial para el uso en microscopía confocal *Lab-Tek™ Chamber Slide™ System*, Ref. 177399, de *Nunc*.

Para la toma de imágenes se utilizó el servicio proporcionado por la *Rede de Infraestructuras de Apoyo á Investigación e ao Desenvolvemento Tecnolóxico (RIAIDT)*, que presta servicios de apoyo a la investigación de la Universidad de Santiago de Compostela (USC). Las muestras fueron observadas bajo el *Microscopio Confocal Espectral Leica TCS-SP2*, de *LEICA Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany* localizado en el edificio CACTUS e integrado en

la RIAIDT. El análisis de las imágenes se realizó mediante el programa *ImageJ 1.51q* desarrollado por el *National Institutes of Health (NIH), USA*.

Los reactivos utilizados fueron

- Calceína-AM, *Calcein-AM*, Ref. 17783, de *Sigma-Aldrich*
- Ioduro de propidio, *Propidium iodide*, Ref. P4170, de *Sigma-Aldrich*

Se sembraron  $1'5 \times 10^4$  c/cm<sup>2</sup> artrósicas en cada pocillo de las cámaras de cultivo con MS. dejando a las células 24 horas en incubación en condiciones estándar de CO<sub>2</sub>, humedad y temperatura para permitir su adhesión. A las 24 horas se retira el medio y se añade MS para los pocillos control, sin tratamiento, y MSF para los pocillos correspondientes a cada concentración y fármaco, realizando cambios de medio cada dos días. Al finalizar los períodos de cultivo de 5 y 15 días, se procedió al marcaje y toma de imágenes de las muestras.

Las tinciones de las muestras con calceína-AM e IP se realizaron de la forma siguiente:

1. Se añaden 8 µL/mL de calceína-AM al medio de cultivo, dejando 15 minutos en incubación.
2. Se retira el medio con una pipeta Pasteur y se lava con DMEM.
3. Se añade DMEM que recubra la muestra y se añade 1 µL de IP, incubando unos segundos.
4. Se realiza un lavado con DMEM.
5. Se desmontan las cámaras<sup>13</sup> según las instrucciones del fabricante y se cubren los cultivos con un cubreobjetos evitando incluir burbujas de aire que distorsionen el análisis y disminuyan la calidad de las imágenes.
6. Se procede a la toma de imágenes teniendo en

---

<sup>13</sup> Es conveniente que el proceso de marcaje y toma de imágenes sea realizado en condiciones de penumbra para minimizar el riesgo de pérdida de fluorescencia de los marcadores.

cuenta las bandas de emisión de los fluorocromos (Tabla 3/3). Todas las imágenes se tomaron en las zonas más representativas de las cámaras de cultivo bajo los mismos parámetros y condiciones.

Tabla 3/3. Longitudes de onda máximas de excitación y emisión

Marcador	Excitación	Emisión	Marcaje
Calceína	$\lambda = 488 \text{ nm}$	$\lambda = 492\text{-}550 \text{ nm}$	Verde (vivo)
Ioduro de propidio	$\lambda = 561 \text{ nm}$	$\lambda = 581\text{-}625 \text{ nm}$	Rojo (muerto)

### 3.6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR QPCR

Los análisis de qPCR se llevaron a cabo en el Laboratorio Farmacéutico de Terapia Celular Amplicel© de la Clínica CEMTRO, en Madrid.

En el análisis de qPCR se realizó mediante *cuantificación relativa* por el *método de comparación de Cq*. De esta forma se puede analizar el cambio en la expresión génica de una muestra comparando los valores Cq de un gen diana con un control o *gen de referencia*<sup>14</sup>. El análisis se realizó mediante el programa suministrado con el equipo para tiempo real *StepOnePlus™* de *Applied Biosystems* utilizando las placas de reacción *MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0'1 mL*, Ref. 4346906 junto con las películas adhesivas *MicroAmp™ Optical Adhesive Film*, Ref. 4360954

Para la amplificación se utilizó la mezcla de reacción *TaqMan™ Gene Expression Master Mix* Ref. 4369016, de *Applied Biosystems*, que contiene todos los componentes de la mezcla de reacción a excepción de sondas y primers (cebadores). Su composición es la siguiente:

- *AmpliTaq Gold® ADN Polymerase*, es una polimerasa termoestable con actividad exonucleasa en dirección 5'-3', que requiere una activación por calor para comenzar su actividad. Una vez iniciada la acción enzimática es regenerada y continua. El inicio de la

amplificación en caliente proporciona una mayor sensibilidad, especificidad y rendimiento sobre las técnicas de PCR convencionales.

- Una mezcla de dNTPs con dTTP/dUTP y Uracil-ADN glicosilasa (UDG). El uso de dUTP en las mezclas de reacción es crítico ya que permite el uso de la UDG para bloquear cualquier ADN que contenga uridina en las reacciones de PCR antes de la etapa de amplificación, evitando falsos positivos por contaminación con amplicones de ciclos anteriores.
- Una referencia pasiva interna basada en el fluorocromo ROX™ que sirve para normalizar la señal emitida por el reporter durante la toma de datos.

Se utilizaron las siguientes sondas, de *Applied Biosystems*:

- *TaqMan® Gene Expression Assays* Ref. Hs02758991\_g1 (*GAPDH*). Este gen es constitutivo y es el gen endógeno al que se referirá la expresión.
- *TaqMan® Gene Expression Assays* Ref. Hs00264051\_m1 (*COL2A1*)
- *TaqMan® Gene Expression Assays* Ref. Hs00166657\_m1 (*COL10A1*)
- *TaqMan® Gene Expression Assays* Ref. Hs01048726\_m1 (*ACAN*)
- *TaqMan® Gene Expression Assays* Ref. Hs00153133\_m1 (*PTGS2*)
- *TaqMan® Gene Expression Assays* Ref. Hs00159075\_m1 (*MATN1*)
- *TaqMan® Gene Expression Assays* Ref. Hs00159081\_m1 (*MATN3*)

Cada uno de los *TaqMan® Gene Expression Assays* viene en forma de premezcla 20x con una concentración stock de 18  $\mu\text{M}$  para cada primer *forward* (hacia delante) y *reverse* (reverso), y en una concentración stock de 5  $\mu\text{M}$  una sonda *TaqMan®* con un grupo MGB (*Minor Groove Binder*), grupo que permite aumentar la temperatura de fusión de la sonda y gracias a ello utilizar sondas cortas; y con un

fluoróforo señal o *reporter* FAM™ en el extremo 5' y un *quencher* o desactivador no fluorescente en el extremo 3'.

Cada muestra se analizó por triplicado para cada uno de los genes.

Con este experimento se pretende cuantificar el nivel de expresión de los genes seleccionados bajo la influencia de los fármacos en ambas líneas, sana y artrósica, respecto a sus controles.

Los códigos para las muestras se resumen de la forma siguiente:

- SC0: Cartílago sano, sin tratamiento,  $t_0$
- AC0: Cartílago artrósico, sin tratamiento,  $t_0$
- SC15: Cartílago sano, sin tratamiento,  $t_{15}$
- AC15: Cartílago artrósico, sin tratamiento,  $t_{15}$
- SI0: Cartílago sano, indometacina,  $t_0$
- AI0: Cartílago artrósico, indometacina,  $t_0$
- SI15: Cartílago sano, indometacina,  $t_{15}$
- AI15: Cartílago artrósico, indometacina,  $t_{15}$
- SD0: Cartílago sano, diclofenaco,  $t_0$
- AD0: Cartílago artrósico, diclofenaco,  $t_0$
- SD15: Cartílago sano, diclofenaco,  $t_{15}$
- AD15: Cartílago artrósico, diclofenaco,  $t_{15}$
- SB0: Cartílago sano, celecoxib,  $t_0$
- AB0: Cartílago artrósico, celecoxib,  $t_0$
- SB15: Cartílago sano, celecoxib,  $t_{15}$
- AB15: Cartílago artrósico, celecoxib,  $t_{15}$

Para el ensayo a  $t_0$  se utilizaron los mismos condrocitos que para el análisis a  $t_{15}$ . Todos los condrocitos compartieron el mismo número de subcultivo.

Para los cultivos a  $t_{15}$  se sembraron  $2 \times 10^6$  condrocitos sanos y artrósicos en jarras de cultivo de  $75 \text{ cm}^2$  con MS dejando a las células 24 horas en incubación en condiciones estándar de  $\text{CO}_2$ , humedad y temperatura para permitir su adhesión. A las 24 horas se retiró el medio y se añadió MS para las jarras control, sin tratamiento, y MSF correspondiente a cada concentración y fármaco realizando cambios de medio cada dos días. Al finalizar el período de ensayo de 15 días se procedió a la extracción del ARN de estas muestras.

Debido a que se recomienda una cantidad mínima de  $10^6$  células

por cada extracción, se requiere disponer de una población original numerosa para poder realizar la extracción inicial a  $t_0$  y asegurar una población suficiente para realizar los ensayos a  $t_{15}$ .

### 3.6.1. Aislamiento y cuantificación de ARN

Para realizar este ensayo se necesita una suspensión celular que contenga  $10^6$  células en 250  $\mu\text{L}$  de MS. El procedimiento para su obtención se encuentra descrito entre los puntos 2 y 7 del apartado 3.2.3. *Mantenimiento de los cultivos.*

Los reactivos utilizados para la extracción de ARN fueron:

- *Trizol® LS Reagent*, Ref 10296-028, de *Invitrogen*
- Medio de cultivo suplementado (MS)
- Cloroformo *Chloroform*, Ref. 372978, de *Sigma-Aldrich*
- Isopropanol *2-Propanol*, Ref. I9516, de *Sigma-Aldrich*
- Agua libre de nucleasas *Water*, Ref. 95284, de *Sigma-Aldrich*
- Tubos de microcentrífuga tipo eppendorf de 1'5 mL, estériles, libres de nucleasas y apirogénicos.

El protocolo de aislamiento de ARN utilizado se describe a continuación:

1. En cada tubo eppendorf estéril identificado se alícuota una suspensión celular conteniendo  $10^6$  células en 250  $\mu\text{L}$  de MS
2. A cada eppendorf se añade 750  $\mu\text{L}$  de trizol.
3. Se incuba 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Se añaden 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo y se agitan los eppendorfs durante 15 segundos, incubando 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Se centrifugan durante 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$  y 13000 rpm.

6. En eppendorfs nuevos estériles identificados se añaden 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol y 400  $\mu\text{L}$  de la fase acuosa del suero (Fig. 3/7 A).

7. Se mezcla invirtiendo los tubos y se incuban 10 minutos a temperatura ambiente.

8. Se centrifugan durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y 13000 rpm (Fig. 3/7 B). Se decantan.



Fig. 3/7. A: Extracción de ARN. a): Fase acuosa: ácidos nucleicos, polisacáridos y sales; b) Interfase: proteínas; c) Fase orgánica: otras proteínas y lípidos.  
B: Precipitación del ARN con isopropanol.

9. Se añade 1 mL de etanol 75% a cada tubo.

10. Se centrifugan durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y 13000 rpm. Se decantan.

11. Una vez decantados, se invierten los eppendorfs y se dejan secar los pellets durante unos diez minutos<sup>15</sup>.

12. Se resuspenden bien los pellets en 10  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas.

13. Se alícuotan 2  $\mu\text{L}$  en eppendorfs nuevos y estériles identificados para la posterior cuantificación de la cantidad de ARN extraída por cada muestra.

14. Los viales originales con los 8  $\mu\text{L}$  restantes se

---

<sup>15</sup> El tiempo de secado es orientativo y depende de la cantidad de etanol que haya quedado en el tubo. Tras la decantación el pellet es de color blanquecino; una vez el etanol se ha evaporado el pellet es menos evidente.

conservan a  $-20^{\circ}\text{C}$ <sup>16</sup>.

Para la cuantificación y verificación de la calidad del ARN extraído se utiliza un espectrofotómetro *NanoDrop® ND-1000* de *Thermo Scientific*, usando el programa de análisis de muestras *NanoDrop 1000 Operating Software, version 3.8.1* asociado.

1. Se abre el programa y se selecciona la medición del ratio 260/280 para ARN.
2. Se carga 1  $\mu\text{L}$  de la alícuota de ARN en el NanoDrop; se procede a la lectura.
3. Para una buena calidad de extracción, el ratio 260/280 debe situarse entre 1'7 y 2'1.
4. Se recoge el valor de la medición y se registra el nombre y concentración de cada muestra en  $\text{ng}/\mu\text{L}$ .
5. Es imprescindible limpiar el sistema de recepción de muestra del NanoDrop entre mediciones.
6. A partir de los datos obtenidos se calcula el volumen de muestra que contiene 1  $\mu\text{g}$  de ARN.

### 3.6.2. Síntesis y cuantificación del cDNA

Previo a la síntesis del cDNA hay que eliminar el ADN genómico (gDNA), que puede interferir dando falsos resultados tras la qPCR. Se utilizó *DNase I, RNase-free, #EN0525*, de *Thermo Scientific* siguiendo las disposiciones descritas por el fabricante, y un termociclador *Thermomixer comfort* de *Eppendorf* para tubos de microcentrífuga de 1'5 mL. El proceso se realiza como sigue:

1. Se programa el termociclador a  $37^{\circ}\text{C}$ .
2. En tubos de 1'5 mL debidamente identificados se añaden en un orden definido los diferentes reactivos.
3. Primero el volumen de muestra correspondiente a 1  $\mu\text{g}$  de ARN
4. Después 1  $\mu\text{L}$  del buffer 10X con  $\text{MgCl}_2$ .

---


<sup>16</sup> Este paso no es necesario si la eliminación del ADN genómico se va a realizar el mismo día en el plazo de horas. En este caso sería menos lesivo para el ARN el mantenimiento en nevera a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su procesado que los efectos de la congelación y descongelación continuadas.

5. En tercer lugar 1  $\mu$ L de DNasa I libre de RNasas<sup>17</sup>.
6. Por último, agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 10  $\mu$ L.
7. Se introducen en el termociclador y se incuban a 37°C durante 30 minutos.
8. Se quitan del termociclador y se sube la temperatura a 65°C.
9. Se añade a cada tubo 1  $\mu$ L de EDTA 50 mM.
10. Se incuban a 65°C durante 10 minutos.
11. Al cabo de ese tiempo se quitan los tubos y se mantienen en frío, pero se mantiene el termociclador a 65°C, ya que se necesita esa temperatura en pasos posteriores.
12. El ARN preparado se va a utilizar como plantilla para la transcriptasa inversa a utilizar en la fase siguiente.

Para la síntesis del cDNA se utilizó el *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit*, #K1632, de *Thermo Scientific*.

13. Se descongelan los reactivos, se mezclan por inversión y se centrifugan un segundo para bajar los componentes al fondo del tubo.
14. En un nuevo eppendorf de 1'5 mL estéril y libre de nucleasas, mantenido en frío, se recoge un volumen correspondiente a 0'1 ng–5  $\mu$ g de muestra del ARN a utilizar como plantilla.
15. A cada muestra se le añade 1  $\mu$ L de primer oligo(dT)<sub>18</sub> mezclando bien.
16. Se completa con agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 12  $\mu$ L.
17. Las muestras se incuban en el termociclador a 65°C durante 5 minutos.
18. Pasado ese tiempo, se sacan, se enfrían en hielo, se centrifugan un segundo para bajar la mezcla al fondo del tubo y se devuelven al hielo.
19. Se baja la temperatura del termociclador a 45°C en preparación para los pasos siguientes.

---

 <sup>17</sup> El protocolo recalca que no se utilice más de 1 U de DNasa I por cada  $\mu$ g de ARN.

20. Se añaden en cada muestra y en el orden establecido los restantes reactivos.
21. Primero 4  $\mu\text{L}$  del buffer de reacción 5X.
22. Después 1  $\mu\text{L}$  del inhibidor de RNasa Ribolock.
23. En tercer lugar 2  $\mu\text{L}$  del mix dNTP 10 mM.
24. Por último 1  $\mu\text{L}$  de la transcriptasa inversa RevertAid H Minus M-MuLV.
25. Se mezclan los componentes y se centrifuga un segundo para bajar la mezcla al fondo de cada vial. En este momento las muestras poseen un volumen de 20  $\mu\text{L}$ .
26. Las muestras se incuban en el termociclador a 45°C durante 60 minutos. A los 59 minutos se sube la temperatura del termociclador a 70°C.
27. Se acaba la reacción calentando las muestras a 70°C durante 5 minutos.
28. Se alícuotan 2  $\mu\text{L}$  de cada producto de reacción en eppendorfs nuevos y estériles identificados para la posterior cuantificación de la cantidad de cDNA sintetizada en cada muestra.
29. Los viales originales con los 18  $\mu\text{L}$  restantes se pueden conservar a -20°C o ser almacenados a -70°C.

Para determinar la pureza del cDNA obtenido, se examina la ratio 260/280, utilizando el ya mencionado espectrofotómetro *NanoDrop*® *ND-1000*. El procedimiento de cuantificación es similar:

1. Se abre el programa y se selecciona la medición de la ratio 260/280 para ADN.
2. Se carga 1  $\mu\text{L}$  de la alícuota de cDNA en el NanoDrop, se procede a la lectura.
3. La ratio 260/280 debe situarse entre 1'7 y 2'1.
4. Se recoge el valor de la medición y se registra el nombre y concentración de cada muestra en ng/ $\mu\text{L}$ .
5. Es imprescindible limpiar el sistema de recepción de muestra del NanoDrop entre mediciones.
6. Se diluye el cDNA para tener una concentración de 200 ng/ $\mu\text{L}$ .
7. Los viales de cDNA así diluidos pueden ser conservados a -20°C o ser almacenados a -70°C.

8. Para llevar a cabo las reacciones de qPCR se necesitarán 200 ng/ $\mu$ L por muestra, esto es 1  $\mu$ L.

### 3.6.3. Estudio del perfil de expresión génica por qPCR

#### 3.6.3.1. Diseño del análisis

Una vez obtenidos los cDNA a analizar, para ahorrar tiempo y optimizar los reactivos es conveniente realizar un diseño previo del análisis en papel con una plantilla que simule una placa de 96 pocillos y calcular los volúmenes de reactivos a utilizar teniendo en cuenta el número de muestras a testar y los NTCs<sup>18</sup> correspondientes para cada gen a amplificar, calculando un exceso de 1 o 2 reacciones. El volumen de cada reactivo por cada muestra (reacción) fue 8  $\mu$ L de agua, 10  $\mu$ L de *TaqMan® Gene Expression Master Mix*, y 1  $\mu$ L de *Gene Expression Assays*, debiendo añadirse en este orden.

Se establece un volumen de reacción estándar de 20  $\mu$ L por pocillo, 45 ciclos y el perfil térmico del método a ejecutar, establecido con los siguientes tiempos y temperaturas: 2 minutos a 50°C; 10 minutos a 95°C; 15 segundos a 95°C; 1 minuto a 60°C.

#### 3.6.3.2. Preparación de las placas de reacción y análisis.

Las placas de reacción se preparan a temperatura ambiente. Es fundamental que nunca se pongan en hielo para evitar fenómenos de condensación y ensuciamiento de la placa.

1. La *TaqMan® Gene Expression Master Mix* debe mantenerse en hielo, protegida de la luz.
2. Se descongelan los cDNA que van a ser analizados y se mantienen en hielo hasta su utilización.
3. Se descongelan los reactivos *TaqMan® Gene Expression Assay*, protegidos de la luz.

---

<sup>18</sup> Los NTC (No Template Control) van a llevar los mismos reactivos que cualquier otro pocillo excepto la carga de cDNA, cuyo volumen va a ser suplido por agua libre de nucleasas para no alterar el volumen final de 20  $\mu$ L por pocillo. El NTC se utiliza como control negativo que indica que la reacción no está contaminada.

4. Para cada muestra, se preparan las mezclas de amplificación sin cDNA en un eppendorf estéril e identificado con nombre del gen a analizar.
5. De la mezcla preparada se dispensan 19  $\mu\text{L}$  en los pocillos correspondientes de la placa de PCR.
6. Se añade 1  $\mu\text{L}$  del cDNA correspondiente (200ng/ $\mu\text{L}$ )<sup>19</sup>.
7. Se sella la placa con las películas adhesivas presionando con el aplicador y se recorta el sobrante por la línea de puntos con el borde del aplicador.
8. Se inserta la placa firmemente cuidando de no agitarla en el bloque térmico del aparato StepOnePlus™.
9. Se empuja el bloque térmico comprobando que queda bien cerrado
10. Se inicia el análisis y al finalizar, se guardan los datos del experimento para su estudio posterior.

### 3.6.3.3. Análisis de los datos mediante el método comparativo de Cq

Los resultados se analizan combinando los dos programas de *Applied Biosystems*. Mediante el programa *StepOne Software v2.3* se diseña el experimento y se llevan a cabo la lectura de las placas y la toma de datos, estableciéndose un mismo umbral para cada uno de los genes en todas las muestras. Las muestras en las que no se produce la amplificación del gen diana en la qPCR son negativas para ese gen y se denominan *no amp* (no amplificación). El programa *DataAssist v3.01* está diseñado para llevar a cabo el cálculo de RQ (cuantificación relativa) usando el método comparativo del Cq ( $\Delta\Delta\text{Cq}$ ).

Los resultados de RQ obtenidos con el programa *DataAssist* se normalizan a los valores del gen de referencia aplicando la fórmula  $\text{Log}_2\text{RQ}$ , obteniendo un valor que es la medida del cambio entre la medición de la muestra de referencia y la de la muestra diana. Si el gen diana se sobreexpresa respecto a la muestra de referencia el valor será un número positivo, si se subexpresa será negativo.

---

<sup>19</sup> Es muy importante que no aparezcan burbujas en el interior de los pocillos, ya que interfieren con el análisis y anulan la muestra.

### 3.7. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Se describe el análisis prospectivo del estudio (Tabla 3/4) realizado con el programa de análisis estadístico *Minitab v18.1*, de *Minitab, Inc.*

Las medidas de resultado se obtienen en relación con las características de las variables asociadas a cada técnica, no siendo aplicable a todas las variables el análisis estadístico:

- 1. Técnica**
  - 2. Variable**
  - 3. Categorización**
  - 4. Tipo de variable**
- 
1. Ensayo de proliferación celular mediante MTT
  2. Índice de actividad proliferativa
  3. % de células con capacidad proliferativa con respecto al control
  4. Cuantitativa continua
- 
1. Cuantificación de glicosaminoglucanos
  2. Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )
  3. Microgramos de glicosaminoglucanos por mililitro de la muestra frente a control
  4. Cuantitativa continua
- 
1. Ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)
  2. Concentración ( $\text{pg/ml}$ )
  3. Microgramos de compuesto por mililitro de muestra
  4. Cuantitativa continua
- 
1. Ensayos de cicatrización (wound healing)
  2. % de superficie libre
  3. % de superficie libre frente a control
  4. Cuantitativa continua

1. Viabilidad por microscopía confocal con calceína-AM y yoduro de propidio
  2. Morfología celular
  3. Normal/alterada
  4. Cuantitativa nominal dicotómica
- 
1. Viabilidad por microscopía confocal con calceína-AM y yoduro de propidio
  2. Viabilidad
  3. Vivo (viable)/Muerto (no viable)
  4. Cuantitativa nominal dicotómica
- 
1. Análisis de la expresión génica por PCR a tiempo real (qPCR)
  2. Amplificación
  3. Amplifica/No amplifica
  4. Cuantitativa nominal dicotómica
- 
1. Análisis de la expresión génica por PCR a tiempo real (qPCR)
  2. Cuantificación de la amplificación
  3. Valores de cuantificación relativa de la muestra frente a control
  4. Cuantitativa continua

Tabla 3/4. Justificación estadística del tamaño muestral

Tamaño de la muestra para intervalos de tolerancia				
<b>Método</b>				
Nivel de confianza				95%
Porcentaje mínimo de población en el intervalo				10%
Probabilidad de que la cobertura de la población exceda $p^*$				0,05
<b>Tamaño de muestra para intervalo de tolerancia de 95%</b>				
$P^*$	Método normal	Método no paramétrico	Confianza lograda	Probabilidad de error alcanzada
95,000%	3	4	99,6%	0,014
<i><math>P^*</math> = Porcentaje máximo aceptable de población en el intervalo El nivel de confianza alcanzado y la probabilidad de error alcanzada se aplican sólo al método no paramétrico.</i>				
Tamaño de la muestra para estimación				
<b>Método</b>				
Parámetro	Media			
Distribución	Normal			
Desviación estándar	0,05 (estimación)			
Nivel de confianza	95%			
Intervalo de confianza	Bilateral			
<b>Resultados</b>				
Margen de error	Tamaño de la muestra			
0,05	7			
<b>Potencia y tamaño de la muestra</b>				
Prueba t de 2 muestras				
Probando la media 1 = media 2 (vs. $\neq$ )				
Calculando la potencia para la media 1 = media 2 + diferencia				
$\alpha = 0,05$ Desviación estándar asumida = 0,05				
<b>Resultados</b>				
Diferencia	Tamaño de la muestra	Potencia		
0,1	10	0,988179		
<i>El tamaño de la muestra es para cada grupo.</i>				

Para la realización del estudio estadístico correspondiente a los resultados numéricos de los ensayos colorimétricos y de cicatrización se utilizó el programa *Minitab v18.1*, de *Minitab, Inc.*

Para llevar a cabo el análisis estadístico se utilizaron un mínimo de tres réplicas biológicas ( $n=3$ ) con triplicados para cada muestra. Una vez recogidas todas las observaciones se inicia el análisis descriptivo de las mismas, comenzando por realizar un test de Kolmogorov-Smirnov para confirmar que los datos siguen una distribución normal. En los casos en los que la nube de datos sigue una distribución normal se realizan tests  $t$  de Student para encontrar diferencias entre pares de muestras con un intervalo de confianza bilateral, asumiendo la corrección de Welch bajo el supuesto de varianzas desiguales. En los casos en los que los datos no siguen una distribución normal se realiza la prueba no paramétrica de Mann-Whitney con el mismo fin, escogiéndose el valor  $p$  para *datos ajustados para empates* ya que el valor  $p$  ajustado es por lo general más exacto que el valor  $p$  sin ajustar.

Los resultados numéricos definitivos son redondeados hacia arriba a tres dígitos a la derecha del separador decimal.

Las pruebas se realizaron con un nivel de significación estadística del 5% ( $\alpha_{0.05}$ ).

---

## *4. RESULTADOS*

## 4. RESULTADOS

### 4.1. ENSAYOS COLORIMÉTRICOS

#### 4.1.1. Efecto de los fármacos en estudio sobre la proliferación celular

##### 4.1.1.1. Cálculo del IC<sub>50</sub> para los fármacos

Con el análisis de las curvas dosis-respuesta mediante el programa *GraphPad Prism* se obtuvieron los valores IC<sub>50</sub> (Tabla 4/1) para ambas líneas celulares, sana y artrósica, tras el tratamiento a cinco días con los tres fármacos.

Tabla 4/1. Valores IC<sub>50</sub> a cinco días.

Fármaco	Cultivo	IC <sub>50</sub>
Indometacina	Artrósico	304'1 µM
	Sano	522'9 µM
Diclofenaco	Artrósico	268'5 µM
	Sano	792'9 µM
Celecoxib	Artrósico	4'8 µM
	Sano	153'8 µM

Según los resultados obtenidos, los valores IC<sub>50</sub> bajo tratamiento con cualquiera de los tres fármacos son superiores en las líneas sanas, oscilando entre 1'7 y 3 veces para indometacina y diclofenaco, y 32 veces bajo tratamiento con celecoxib.

Estos datos sugieren que la proliferación de las células sanas es menos sensible al tratamiento con el fármaco, o, visto desde otro enfoque, que en los cultivos sanos se necesita una dosis mayor de fármaco para que la proliferación de los condrocitos se vea afectada

negativamente. También según los datos, el tratamiento con diclofenaco sería el que menos afectaría a la proliferación, y el tratamiento con celecoxib, especialmente en cultivos artrósicos, el que más.

#### 4.1.1.2. Estudio de la proliferación celular mediante MTT

El análisis estadístico reveló las diferentes concentraciones a las que se produjo un descenso significativo de la proliferación (Tabla 4/2) con los distintos tratamientos en ambas líneas celulares.

**Tabla 4/2. Concentraciones a las que se observan cambios significativos en la proliferación de los cultivos respecto al control sin tratamiento.**

Indometacina			
Cultivo	5 días	10 días	15 días
Artrósico	10 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$
Sano	(*)	0'1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$
Diclofenaco			
Cultivo	5 días	10 días	15 días
Artrósico	10 $\mu\text{M}$	(**)	10 $\mu\text{M}$
Sano	(***)	0'1 $\mu\text{M}$	0'1 $\mu\text{M}$
Celecoxib			
Cultivo	5 días	10 días	15 días
Artrósico	0'01 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$
Sano	10 $\mu\text{M}$	0'01 $\mu\text{M}$	0'1 $\mu\text{M}$

(\*): Se observan a 0'01 y a partir de 1  $\mu\text{M}$ , pero no a 0'1  $\mu\text{M}$ . (\*\*): No aparecen a ninguna concentración. (\*\*\*) : Se detectan a 0'1 y a partir de 10  $\mu\text{M}$ , pero no a 1  $\mu\text{M}$ .

Se puede apreciar mediante las gráficas (Fig. 4/MTT/1) el efecto dosis-dependiente de cada fármaco sobre la proliferación, más acusado con el celecoxib que con indometacina o diclofenaco.

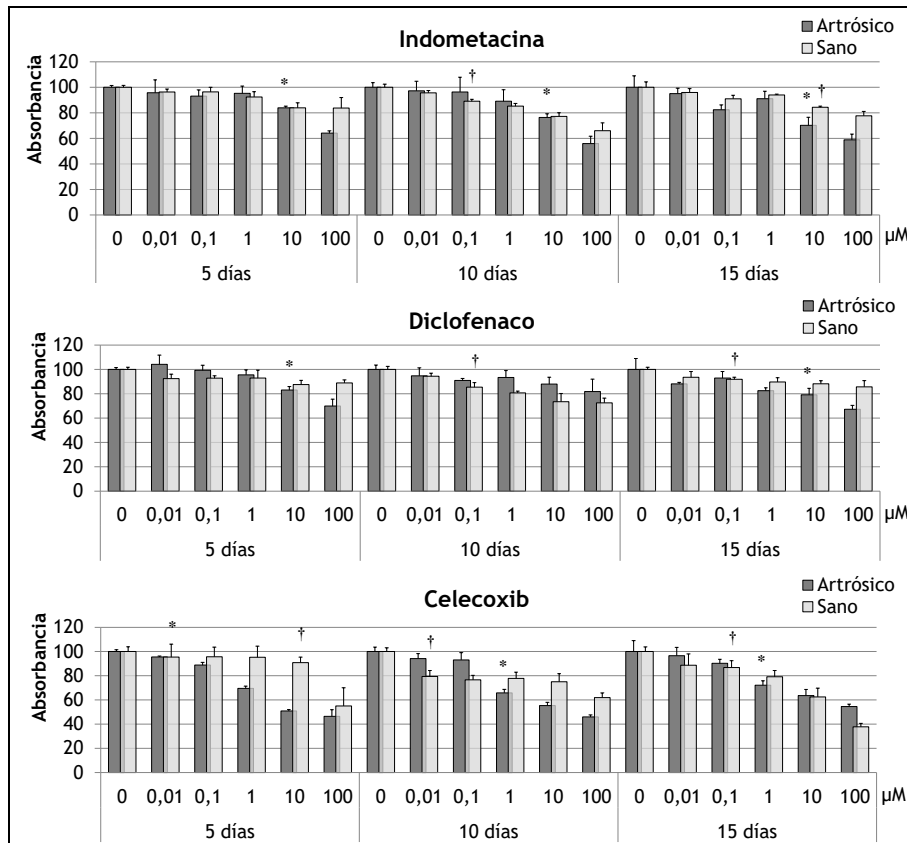


Fig. 4/MTT/1. Diagrama de barras para las medias del estudio de proliferación celular para indometacina, diclofenaco y celecoxib a concentraciones 0 a 100  $\mu\text{M}$  en cultivos sanos y artrósicos. Concentraciones a las que se observa un cambio significativo en la proliferación: \*-cultivos artrósicos; †-cultivos sanos. Datos para indometacina-5 días-sano; diclofenaco-10 días-artrósico, y diclofenaco-5 días-sano disponibles en Tabla 4/2.

Los estadísticos descriptivos para este ensayo se recogen con la media, desviación estándar (SD), error estándar de la media (EE) y límites de los intervalos de confianza (IC) al 95% en 9. *Apéndice* (Tablas 9/1–9/6). Asimismo, un esquema de las significancias de las pruebas colorimétricas, entre las que se incluye este ensayo, se puede encontrar en el mismo 9. *Apéndice* (Tablas 9/15–9/24).

#### 4.1.1.2.1. Comparación entre controles

Los controles no son comparables debido a la normalización de los datos, que iguala las medias al valor 100 (100% de capacidad proliferativa).

#### 4.1.1.2.2. Indometacina en cultivos artrósicos

No se observaron diferencias significativas en la proliferación entre los tres puntos de estudio (Fig. 4/MTT/2), ni respecto a la capacidad proliferativa de los controles artrósico (Fig. 4/MTT/3) o sano (Fig. 4/MTT/4).

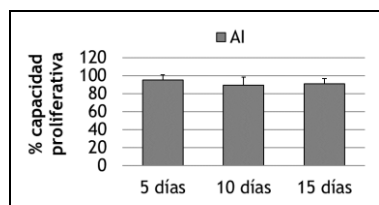


Fig. 4/MTT/2. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI).

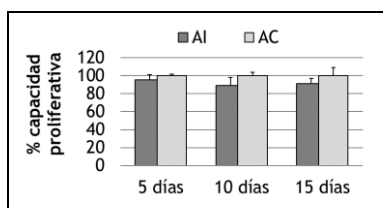


Fig. 4/MTT/3. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI), control (AC).

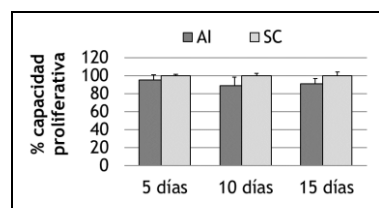


Fig. 4/MTT/4. Indometacina en cultivos artrósicos (AI), control sano (SC).

#### 4.1.1.2.3. Indometacina en cultivos sanos

Bajo tratamiento, la proliferación a 10 días resultó ser significativamente menor que la cuantificada en los otros dos puntos de estudio (Fig. 4/MTT/5). En la comparación con el control sano, fue estadísticamente inferior, con un nivel de significancia de  $\alpha=0'05$ , bajo tratamiento durante los dos primeros períodos de ensayo (Fig. 4/MTT/6).

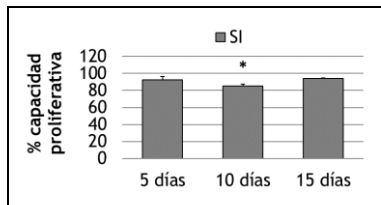


Fig. 4/MTT/5. Cultivos sanos. Indometacina (SI).

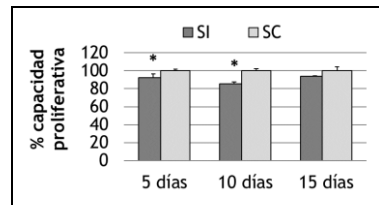


Fig. 4/MTT/6. Cultivos sanos. Indometacina (SI), control (SC).

#### 4.1.1.2.4. Diclofenaco en cultivos artrósicos

El tratamiento con diclofenaco provocó una merma significativa en la proliferación a los 15 días desde la siembra (Fig. 4/MTT/7), que no resultó ser significativa frente a su control (Fig. 4/MTT/8) pero sí frente al control sano (Fig. 4/MTT/9).

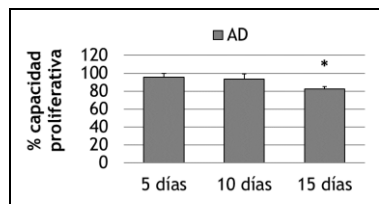


Fig. 4/MTT/7. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD).

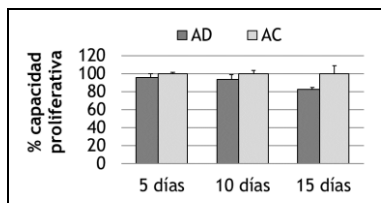


Fig. 4/MTT/8. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD), control (AC).

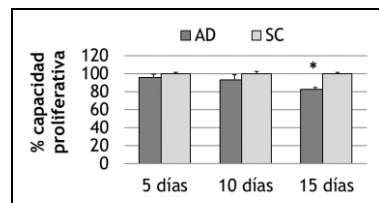


Fig. 4/MTT/9. Diclofenaco en cultivos artrósicos (AD) y control sano (SC).

#### 4.1.1.2.5. Diclofenaco en cultivos sanos

No se encontraron diferencias en la proliferación a lo largo del tratamiento con diclofenaco en los cultivos sanos (Fig. 4/MTT/10). En la comparación con los cultivos control sano se detectó una pérdida en la proliferación a los 10 y 15 días (Fig. 4/MTT/11).

## Resultados: Efecto de Diferentes AINEs Sobre la Funcionalidad de los Condrocitos Humanos en Cultivo

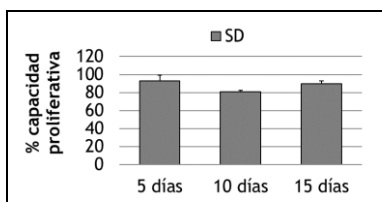


Fig. 4/MTT/10. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD).

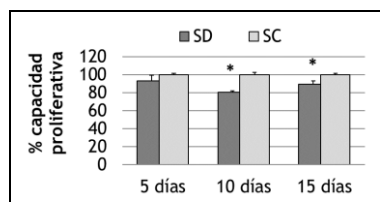


Fig. 4/MTT/11. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD), control (SC).

### 4.1.1.2.6. Celecoxib en cultivos artrósicos

No se estimaron diferencias significativas en la proliferación entre los tres puntos de estudio en los cultivos con celecoxib (Fig. 4/MTT/12), aunque esta sí fue significativamente menor a la observada en los controles artrósico (Fig. 4/MTT/13) y sano (Fig. 4/MTT/14).

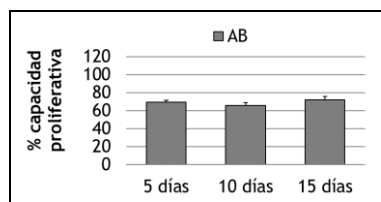


Fig. 4/MTT/12. Cultivos artrósicos. Celecoxib (AB).

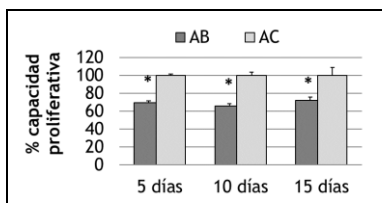


Fig. 4/MTT/13. Cultivos artrósicos. Celecoxib (AB), control (AC).

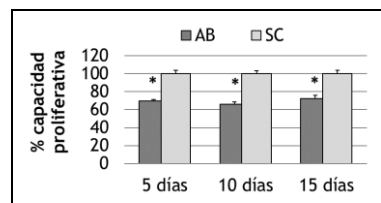


Fig. 4/MTT/14. Celecoxib en cultivos artrósicos (AB) y control sano (SC).

### 4.1.1.2.7. Celecoxib en cultivos sanos

La proliferación en los cultivos sanos disminuyó de forma significativa a los 10 y 15 días de incubación con el fármaco (Fig. 4/MTT/15), siendo también significativamente menor en estos períodos a lo detectado en los cultivos control (Fig. 4/MTT/12).

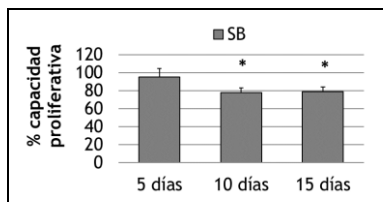


Fig. 4/MTT/15. Cultivos sanos. Celecoxib (SB).

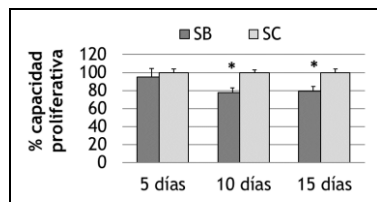


Fig. 4/MTT/16. Cultivos sanos. Celecoxib (SB), control (SC).

#### 4.1.1.2.8. Comparación entre fármacos en cultivos artrósicos

No se apreciaron diferencias significativas sobre el efecto en la capacidad proliferativa entre los fármacos indometacina y diclofenaco (Fig. 4/MTT/17), sin embargo, el tratamiento con celecoxib sí redujo significativamente la proliferación respecto a los otros fármacos en al menos dos de los tres puntos de estudio (Figs. 4/MTT/18-19).

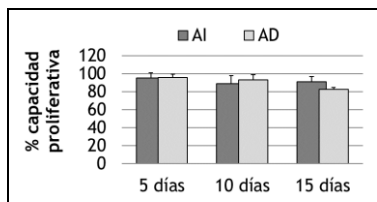


Fig. 4/MTT/17. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI), diclofenaco (AD).

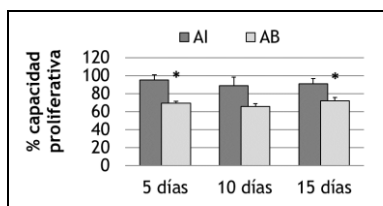


Fig. 4/MTT/18. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI) y celecoxib (AB).

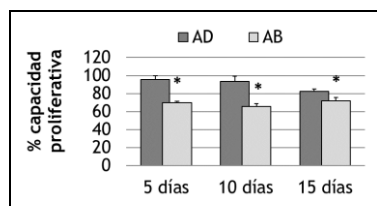


Fig. 4/MTT/19. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD), celecoxib (AB).

#### 4.1.1.2.9. Comparación entre fármacos en cultivos sanos

El efecto sobre la proliferación en cultivos sanos fue similar para los tres fármacos (Figs. 4/MTT/20-22), menos bajo tratamiento con celecoxib a 15 días, en que la proliferación fue significativamente menor frente a los valores observados bajo tratamiento con indometacina en el mismo período (Fig. 4/MTT/21).

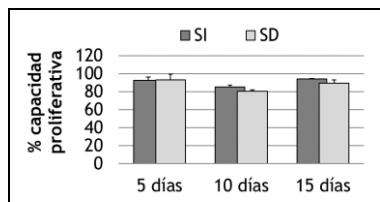


Fig. 4/MTT/20. Cultivos sanos. Indometacina (SI), diclofenaco (SD).

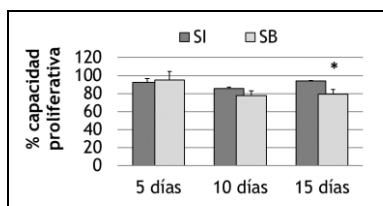


Fig. 4/MTT/21. Cultivos sanos. Indometacina (SI), celecoxib (SB).

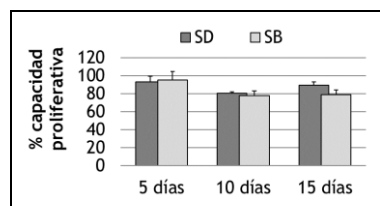


Fig. 4/MTT/22. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD), celecoxib (SB).

#### 4.1.1.2.10. Comparación del efecto de cada tratamiento entre las líneas celulares

El efecto sobre la proliferación fue similar bajo tratamiento con indometacina o diclofenaco entre los cultivos sanos y artrósicos (Figs. 4/MTT/23-24). En cambio, sí se encontraron diferencias significativas entre cultivos bajo tratamiento con celecoxib a 5 y 10 días, detectándose una menor proliferación en los cultivos artrósicos en estos períodos (Fig. 4/MTT/25).

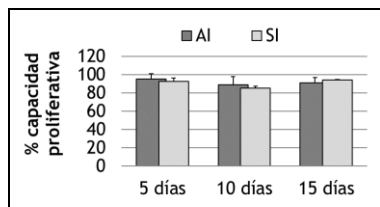


Fig. 4/MTT/23. Comparación tratamientos indometacina.

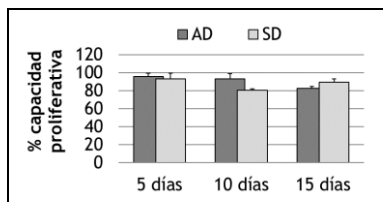


Fig. 4/MTT/24. Comparación tratamientos diclofenaco.

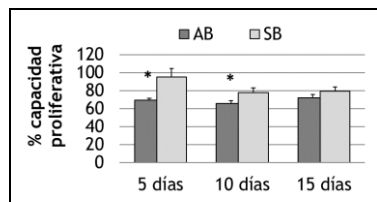


Fig. 4/MTT/25. Comparación tratamientos celecoxib.

### 4.1.2. Cuantificación de sGAG

Los estadísticos descriptivos para las pruebas de cuantificación de sGAG se recogen con la media, desviación estándar (SD), error estándar de la media (EE) y límites de los intervalos de confianza (IC) al 95% en 9. *Apéndice* (Tabla 9/7), junto con un esquema de los resultados del análisis estadístico de las pruebas colorimétricas (Tablas 9/15–9/24).

Se describen a continuación los resultados del análisis estadístico para cada prueba y fármaco, a las concentraciones de 0 y 1  $\mu\text{M}$ .

#### 4.1.2.1. Comparación entre controles

No se hallaron diferencias significativas en los valores basales entre cultivos sanos y artrósicos ni entre los períodos de estudio de cada uno (Fig. 4/GAG/1).

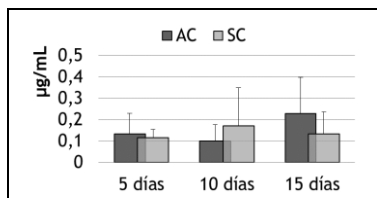


Fig. 4/GAG/1. Cultivos control artrósico (AC), sano (SC).

#### 4.1.2.2. Indometacina en cultivos artrósicos

El tratamiento con indometacina parece aumentar la concentración de sGAG en la matriz a lo largo del tiempo. A pesar de la gráfica, no se detectaron diferencias significativas en el contenido de sGAG entre los períodos de estudio (Fig. 4/GAG/2). Tampoco se encontraron diferencias significativas respecto a su control (Fig. 4/GAG/3).

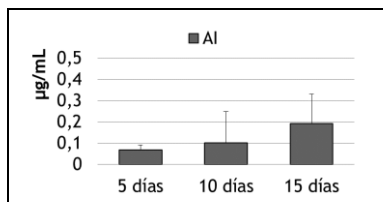


Fig. 4/GAG/2. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI).

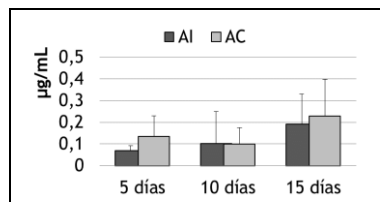


Fig. 4/GAG/3. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI), control (AC).

Sí se encontraron diferencias significativas a 5 y 15 días bajo tratamiento respecto al control sano (Fig. 4/GAG/4).

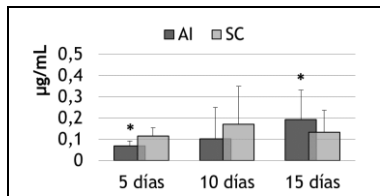


Fig. 4/GAG/4. Indometacina en cultivos artrósicos (AI), control sano (SC).

#### 4.1.2.3. Indometacina en cultivos sanos

El contenido de sGAG en los cultivos sanos aumentó con el tiempo bajo tratamiento de forma no significativa (Fig. 4/GAG/5). Con una significancia de  $\alpha=0,05$ , el contenido de sGAG a 5 días resultó ser significativamente inferior al del control. No se observaron diferencias significativas entre los períodos siguientes (Fig. 4/GAG/6).

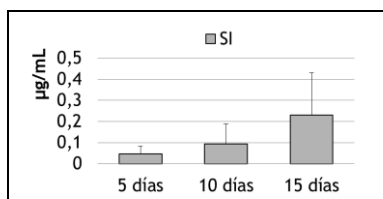


Fig. 4/GAG/5. Cultivos sanos. Indometacina (SI).

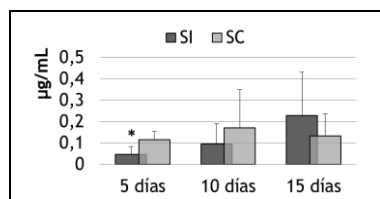


Fig. 4/GAG/6. Cultivos sanos. Indometacina (SI), control (SC).

#### 4.1.2.4. Diclofenaco en cultivos artrósicos

El aumento en el contenido de sGAG en el tiempo no es significativo entre periodos (Fig. 4/GAG/7), ni frente a su control (Fig. 4/GAG/8). Al igual que bajo tratamiento con indometacina, el tratamiento con diclofenaco provocó una liberación significativamente menor de sGAG a 5 días frente al control sano (Fig. 4/GAG/9).

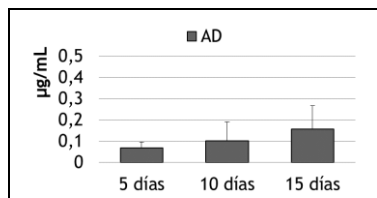


Fig. 4/GAG/7. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD).

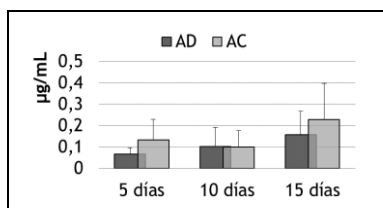


Fig. 4/GAG/8. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD), control (AC).

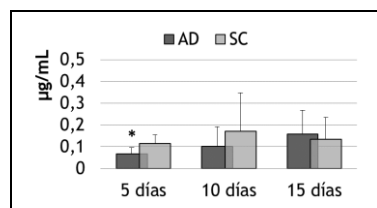


Fig. 4/GAG/9. GAG. Diclofenaco en cultivos artrósicos (AD), control sano (SC).

#### 4.1.2.5. Diclofenaco en cultivos sanos

En cultivos sanos, existen diferencias significativas entre los valores de sGAG obtenidos a 5 y 10 días (Fig. 4/GAG/10). Los valores a 10 días bajo tratamiento con diclofenaco resultaron ser significativamente diferentes respecto a los valores basales para el mismo período (Fig. 4/GAG/11).

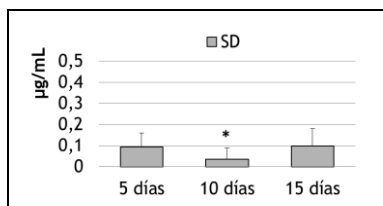


Fig. 4/GAG/10. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD).

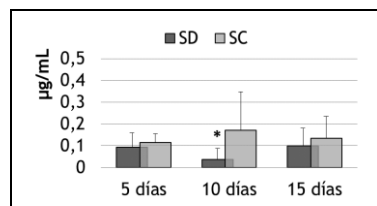


Fig. 4/GAG/11. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD), control (SC).

#### 4.1.2.6. Celecoxib en cultivos artrósicos

El contenido en sGAG en la matriz bajo tratamiento con celecoxib aumentó significativamente a los 15 días en comparación con los períodos anteriores (Fig. 4/GAG/12). Frente a los valores artrósicos basales, los niveles de sGAG a 5 y 10 días fueron significativamente menores (Fig. 4/GAG/13).

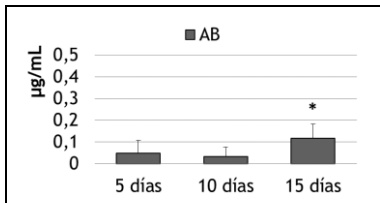


Fig. 4/GAG/12. GAG. Cultivos artrósicos. Celecoxib (AB).

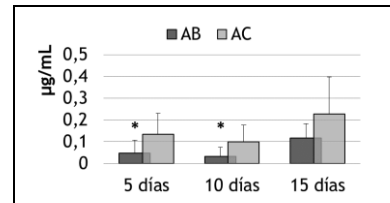


Fig. 4/GAG/13. Cultivos artrósicos. Celecoxib (AB) y control (AC).

Respecto a la concentración de sGAG en los cultivos control sanos, el resultado fue similar a lo calculado en los controles artrósicos (Fig. 4/GAG/14).

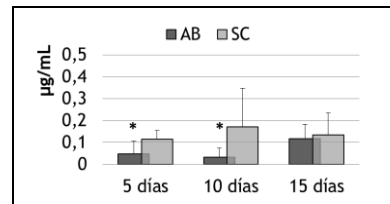


Fig. 4/GAG/14. Celecoxib en cultivos artrósicos (AB), control sano (SC).

#### 4.1.2.7. Celecoxib en cultivos sanos

El celecoxib provoca en cultivos sanos un aumento en el contenido de sGAG a lo largo del estudio que no resulta significativo en ningún caso (Fig. 4/GAG/15). En comparación con los niveles basales sí se observó a 5 días una disminución significativa, con un nivel de significancia de  $\alpha=0,05$ , en el contenido de sGAG (Fig. 4/GAG/16).

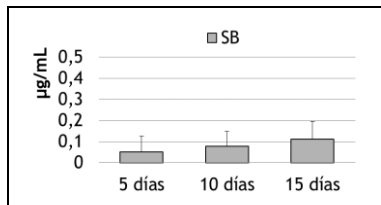


Fig. 4/GAG/15. Cultivos sanos. Celecoxib (SB).

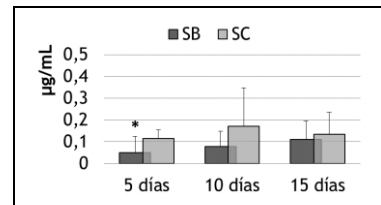


Fig. 4/GAG/16. Cultivos sanos. Celecoxib (SB), control (SC).

#### 4.1.2.8. Comparación entre fármacos en cultivos artrósicos

El efecto del tratamiento con indometacina frente al diclofenaco (Fig. 4/GAG/17) y frente al celecoxib (Fig. 4/GAG/18) fue similar, sin encontrarse diferencias significativas en el contenido de sGAG en la matriz.

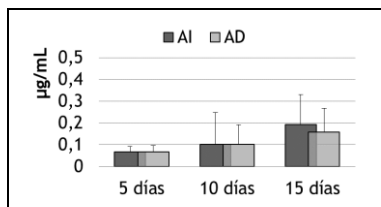


Fig. 4/GAG/17. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI) y diclofenaco (AD).

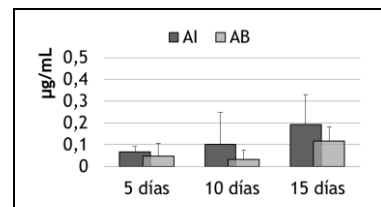


Fig. 4/GAG/18. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI) y celecoxib (AB).

Por el contrario, sí se hallaron diferencias en el período de 10 días entre los tratamientos con diclofenaco y celecoxib, en donde el contenido de sGAG fue significativamente menor en los cultivos tratados con el coxib (Fig. 4/GAG/19).

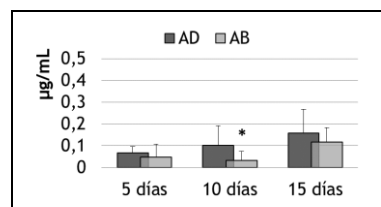


Fig. 4/GAG/19. GAG. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD) y celecoxib (AB).

#### 4.1.2.9. Comparación entre fármacos en cultivos sanos

Se obtuvieron valores de sGAG significativamente superiores a 5

días bajo tratamiento con diclofenaco que bajo tratamiento con indometacina (Fig. 4/GAG/20) o celecoxib (Fig. 4/GAG/21).

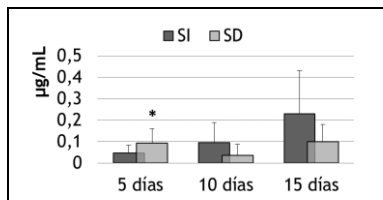


Fig. 4/GAG/20. Cultivos sanos. Indometacina (SI), diclofenaco (SD).

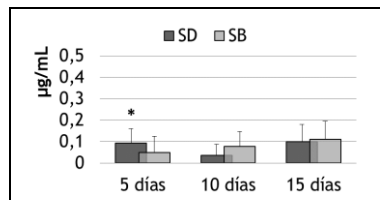


Fig. 4/GAG/21. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD) y celecoxib (SB).

El estudio estadístico no ofreció diferencias significativas en los niveles de sGAG entre los tratamientos con indometacina o celecoxib en cultivos sanos (Fig. 4/GAG/22).

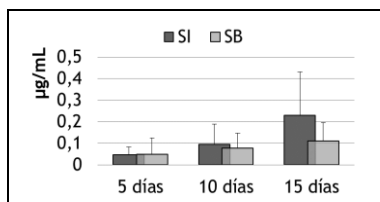


Fig. 4/GAG/22. Cultivos sanos. Indometacina (SI), celecoxib (SB).

#### 4.1.2.10. Comparación del efecto de cada tratamiento entre las líneas celulares

Al comparar cultivos sanos y artrósicos, el tratamiento con indometacina (Fig. 4/GAG/23) o celecoxib (Fig. 4/GAG/25) no ofreció diferencias significativas en la liberación de sGAG entre ambas líneas.

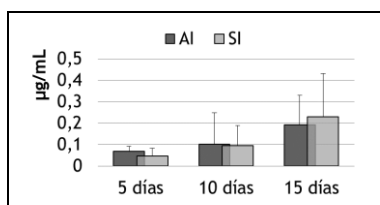


Fig. 4/GAG/23. Comparación tratamientos indometacina.

Por el contrario, la cantidad de sGAG liberada aumentó de forma significativa en los cultivos artrósicos tratados con diclofenaco a 10 y 15 días (Fig. 4/GAG/24)

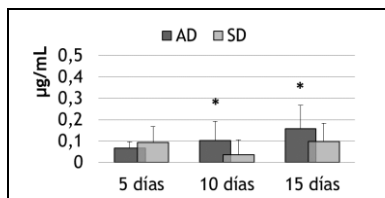


Fig. 4/GAG/24. Comparación tratamientos diclofenaco.

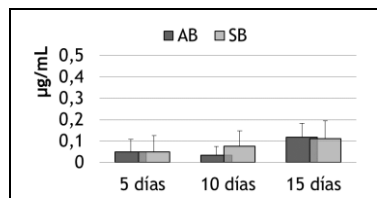


Fig. 4/GAG/25. Comparación tratamientos celecoxib.

### 4.1.3. ELISA

Los estadísticos descriptivos para las pruebas ELISA se recogen con la media, desviación estándar (SD), error estándar de la media (EE) y límites de los intervalos de confianza (IC) al 95% en 9. *Apéndice* (Tablas 9/8–9/14), junto con un esquema de los resultados del análisis estadístico de las pruebas colorimétricas (Tablas 9/15–9/24).

Se analizan ahora las diferencias significativas encontradas en el análisis estadístico para cada prueba y fármaco, a las concentraciones de 0 y 1  $\mu\text{M}$ .

#### 4.1.3.1. MMP-13

##### 4.1.3.1.1. Comparación entre controles

La liberación basal de MMP-13 fue significativamente superior a 10 y 15 días en la línea artrósica (Fig. 4/MMP/1a).

En la línea artrósica se observó un aumento significativo en la liberación a 10 y 15 días (Fig. 4/MMP/1b) mientras que en la línea sana los valores obtenidos a 10 y 15 días fueron significativamente diferentes entre ellos y significativamente inferiores a los cuantificados a 5 días (Fig. 4/MMP/1c).

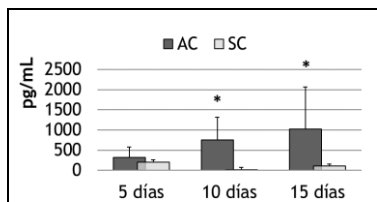


Fig. 4/MMP/1a. Cultivos control artrósico (AC) y sano (SC).

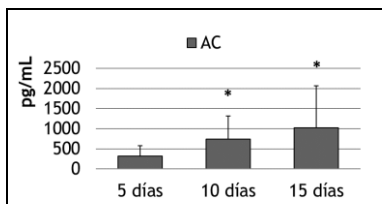


Fig. 4/MMP/1b. Cultivos control artrósico (AC).

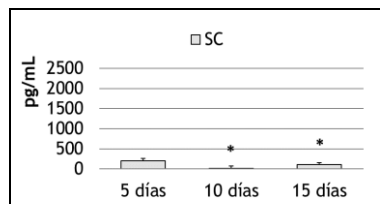


Fig. 4/MMP/1c. Cultivos control sano (SC).

#### 4.1.3.1.2. Indometacina en cultivos artrósicos

Los niveles de MMP-13 aumentaron significativamente a 10 y 15 días bajo tratamiento con indometacina (Fig. 4/MMP/2), siendo significativamente inferiores a los niveles basales en los tres puntos de estudio (Fig. 4/MMP/3). Las diferencias con el control sano únicamente fueron significativas a 10 y 15 días, con una mayor liberación en el cultivo artrósico (Fig. 4/MMP/4).

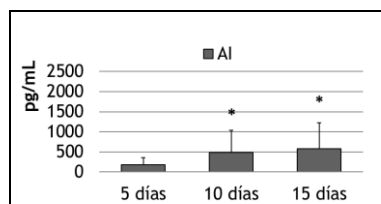


Fig. 4/MMP/2 Cultivos artrósicos. Indometacina (AI).

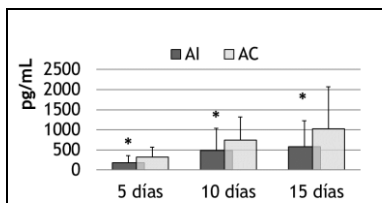


Fig. 4/MMP/3. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI) y control (AC).

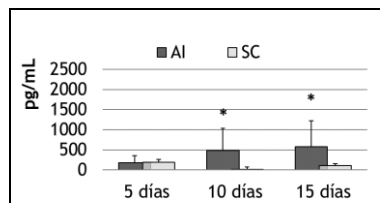


Fig. 4/MMP/4. Indometacina en cultivos artrósicos (AI) y control sano (SC).

#### 4.1.3.1.3. Indometacina en cultivos sanos

En los cultivos sanos, el aumento en la concentración de MMP-13 liberada al medio fue significativo a 15 días frente al período inicial (Fig. 4/MMP/5). Por otra parte, el tratamiento con indometacina provocó una disminución significativa en la liberación de MMP-13 a 5

y 15 días respecto a su control (Fig. 4/MMP/6).

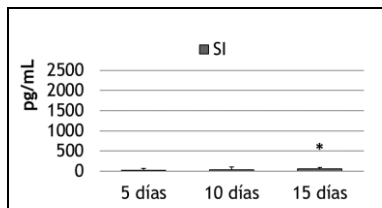


Fig. 4/MMP/5. Cultivos sanos. Indometacina (SI).

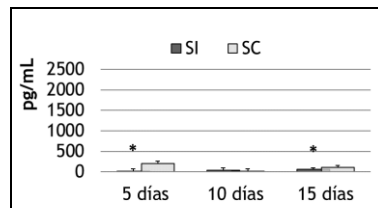


Fig. 4/MMP/6. Cultivos sanos. Indometacina (SI) y control (SC).

#### 4.1.3.1.4. Diclofenaco en cultivos artrósicos

Bajo tratamiento con diclofenaco, el aumento en la liberación de MMP-13 fue significativo a los 15 días respecto a los valores iniciales (Fig. 4/MMP/7). Frente a los valores basales, los niveles de enzima fueron menores bajo tratamiento, con diferencias significativas en el período de 15 días (Fig. 4/MMP/8).

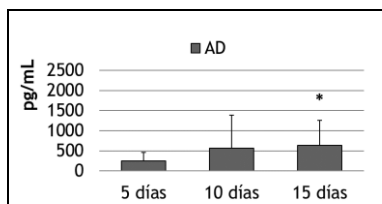


Fig. 4/MMP/7. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD).

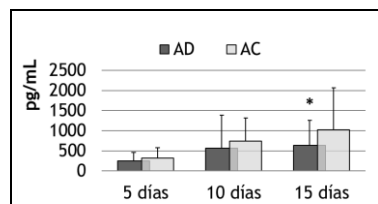


Fig. 4/MMP/8. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD) y control (AC).

El tratamiento no consiguió mejorar los niveles de MMP-13 frente al control sano. Con un nivel de significancia  $\alpha=0.05$ , el aumento en la liberación de esta metaloproteinasas fue significativo a 15 días (Fig. 4/MMP/9).

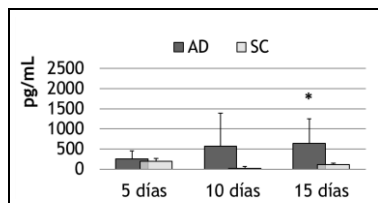


Fig. 4/MMP/9. Diclofenaco en cultivos artrósicos (AD) y control sano (SC).

#### 4.1.3.1.5. Diclofenaco en cultivos sanos

No se estimaron diferencias significativas en el tiempo durante el tratamiento con diclofenaco en cultivos sanos (Fig. 4/MMP/10). La liberación de MMP-13 bajo tratamiento con diclofenaco fue significativamente menor a 5 y 15 días frente a los valores basales (Fig. 4/MMP/11).

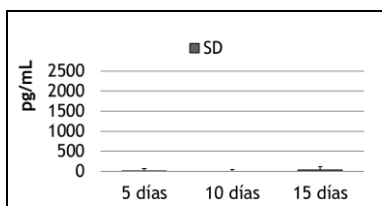


Fig. 4/MMP/10. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD).

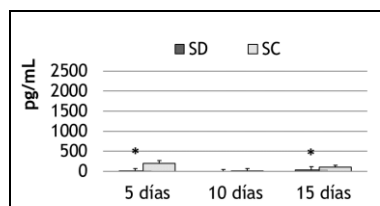


Fig. 4/MMP/11. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD) y control (SC).

#### 4.1.3.1.6. Celecoxib en cultivos artrósicos

No se observaron diferencias significativas en los niveles de MMP-13 durante el tratamiento con celecoxib en cultivos artrósicos (Fig. 4/MMP/12), obteniéndose concentraciones significativamente menores bajo tratamiento 5 y 15 días (Fig. 4/MMP/13).

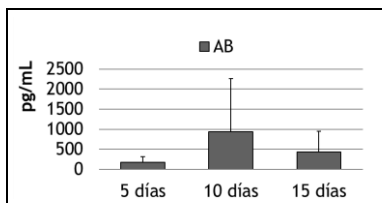


Fig. 4/MMP/12. Cultivos artrósicos. Celecoxib (AB).

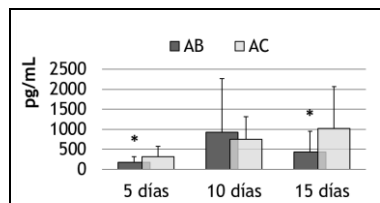


Fig. 4/MMP/13. Cultivos artrósicos. Celecoxib (AB) y control (AC).

Durante la comparación con el control sano, el programa no mostró diferencias significativas en los niveles de MMP-13 con el control sano en ninguno de los puntos de estudio (Fig. 4/MMP/14).

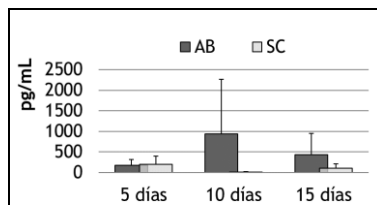


Fig. 4/MMP/14. Celecoxib en cultivos artrósicos (AB) y control sano (SC).

#### 4.1.3.1.7. Celecoxib en cultivos sanos

La cantidad de proteinasa liberada aumentó de forma significativa bajo tratamiento con celecoxib a los 15 días (Fig. 4/MMP/15), siendo significativamente inferior a 5 días frente a los niveles basales (Fig. 4/MMP/16).

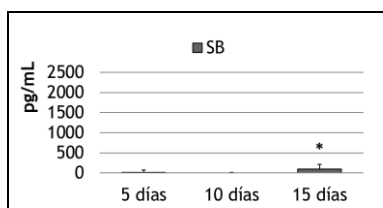


Fig. 4/MMP/15. Cultivos sanos. Celecoxib (SB).

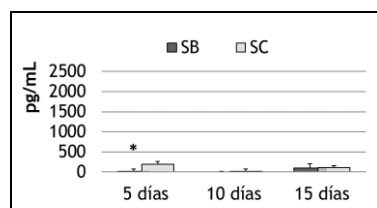


Fig. 4/MMP/16. Cultivos sanos. Celecoxib (SB) y control (SC).

#### 4.1.3.1.8. Comparación entre fármacos en cultivos artrósicos

Se apreciaron diferencias significativas a 15 días entre todos los tratamientos, siendo el celecoxib el fármaco que provocó una mayor disminución en la liberación de proteinasa, seguido por la indometacina (Figs. 4/MMP/17-19).

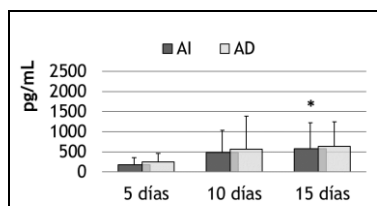


Fig. 4/MMP/17. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI) y diclofenaco (AD).

## Resultados: Efecto de Diferentes AINEs Sobre la Funcionalidad de los Condrocitos Humanos en Cultivo

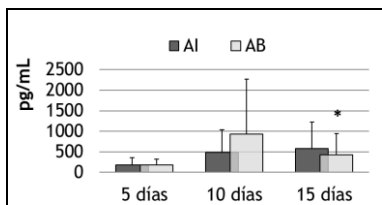


Fig. 4/MMP/18. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI) y celecoxib (AB).

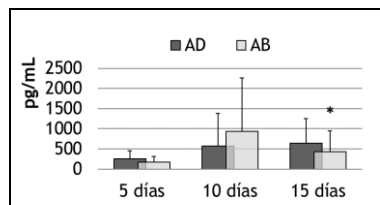


Fig. 4/MMP/19. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD) y celecoxib (AB).

### 4.1.3.1.9. Comparación entre fármacos en cultivos sanos

Solamente se encontraron diferencias significativas a 10 días, con un nivel de significancia  $\alpha=0'05$ , entre los tratamientos con indometacina y el coxib, fármaco con el que se obtuvieron menores valores en la liberación de MMP-13 (Figs. 4/MMP/20-22).

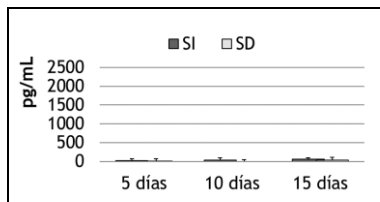


Fig. 4/MMP/20. Cultivos sanos. Indometacina (SI), diclofenaco (SD).

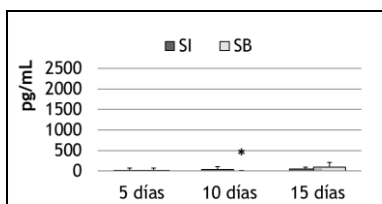


Fig. 4/MMP/21 Cultivos sanos. Indometacina (SI), celecoxib (SB).

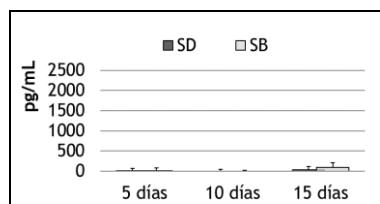


Fig. 4/MMP/22. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD), celecoxib (SB).

#### 4.1.3.1.10. Comparación del efecto de cada tratamiento entre las líneas celulares

Los valores de MMP-13 liberada fueron superiores en todos los cultivos artrósicos, siendo estadísticamente significativos en al menos dos puntos de análisis durante cada tratamiento (Fig. 4/MMP/23-25).

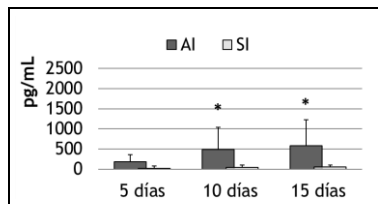


Fig. 4/MMP/23. Comparación tratamientos indometacina.

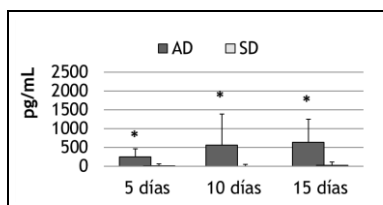


Fig. 4/MMP/24. Comparación tratamientos diclofenaco.

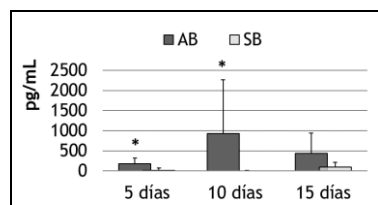


Fig. 4/MMP/25. Comparación tratamientos celecoxib.

#### 4.1.3.2. IL-1 $\beta$

##### 4.1.3.2.1. Comparación entre controles

Se calcularon diferencias significativas en los valores de IL-1 $\beta$  a 5 y 15 días entre cultivos control artrósicos y sanos (Fig. 4/IL1 $\beta$ /1a).

La cantidad de IL-1 $\beta$  en la línea artrósica fue significativamente superior a partir de los 10 días respecto a los valores iniciales (Fig. 4/IL1 $\beta$ /1b), mientras que en la línea sana los valores obtenidos a 10 días fueron significativamente inferiores a los de 5 días, y los obtenidos a 15 días lo fueron a su vez a los períodos anteriores (Fig. 4/IL1 $\beta$ /1c).

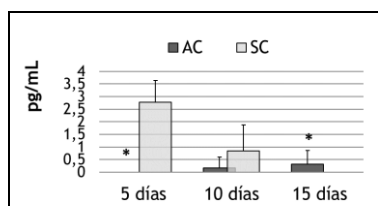


Fig. 4/IL1 $\beta$ /1a. Cultivos control artrósico (AC) y sano (SC).

## Resultados: Efecto de Diferentes AINEs Sobre la Funcionalidad de los Condrocitos Humanos en Cultivo

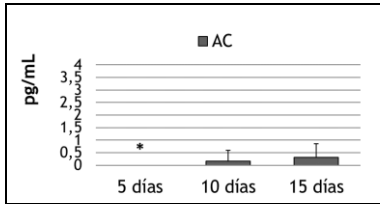


Fig. 4/ IL1B/1b. Cultivos control artrósico (AC).

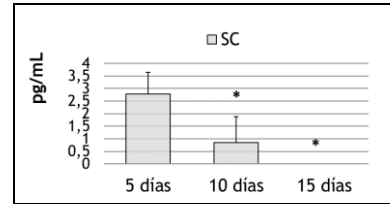


Fig. 4/ IL1B/1c. Cultivos control sano (SC).

### 4.1.3.2.2. Indometacina en cultivos artrósicos

El tratamiento con indometacina en las muestras artrósicas provocó un aumento significativo en los niveles de IL-1 $\beta$  a 15 días (Fig. 4/IL1 $\beta$ /2). Respecto a los niveles en cultivos artrósicos sin tratamiento, este aumento fue significativamente superior únicamente a los 5 días (Fig. 4/IL1 $\beta$ /3).

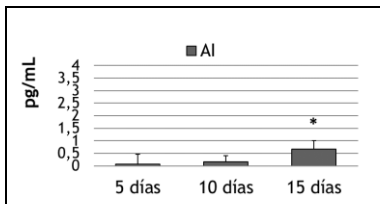


Fig. 4/IL1B/2. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI).

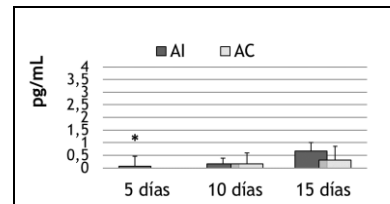


Fig. 4/IL1B/3. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI) y control (AC).

Respecto al control sano, las diferencias significativas encontradas se registraron a los 5 y 15 días (Fig. 4/IL1 $\beta$ /4), siendo solo al final del experimento cuando los valores bajo tratamiento fueron superiores al control.

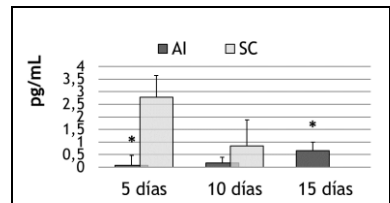


Fig. 4/IL1B/4. Indometacina en cultivos artrósicos (AI) y control sano (SC).

### 4.1.3.2.3. Indometacina en cultivos sanos

En cultivos sanos, con el nivel de significancia elegido  $\alpha=0.05$ , el

tratamiento con indometacina provocó una disminución a los 15 días en la cantidad de IL-1 $\beta$  frente a los períodos anteriores (Fig. 4/IL1 $\beta$ /5).

Respecto al control sano, se encontraron diferencias significativas a 5 y 15 días (Fig. 4/IL1 $\beta$ /6), siendo solo al final del experimento cuando los valores bajo tratamiento fueron superiores al control.

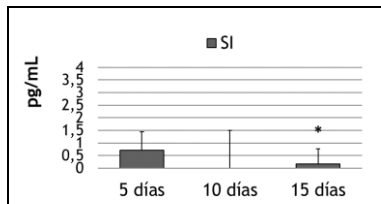


Fig. 4/IL1 $\beta$ /5. Cultivos sanos. Indometacina (SI).

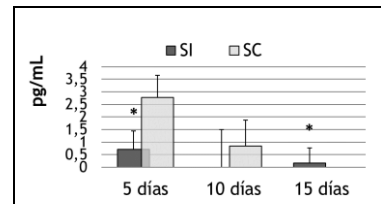


Fig. 4/IL1 $\beta$ /6. Cultivos sanos. Indometacina (SI) y control (SC).

#### 4.1.3.2.4. Diclofenaco en cultivos artrósicos

No se observaron diferencias significativas a lo largo del tiempo en el contenido de IL-1 $\beta$  tras el tratamiento con diclofenaco (Fig. 4/IL1 $\beta$ /7), ni entre períodos respecto a los niveles basales (Fig. 4/IL1 $\beta$ /8).

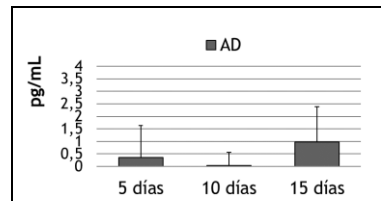


Fig. 4/IL1 $\beta$ /7. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD).

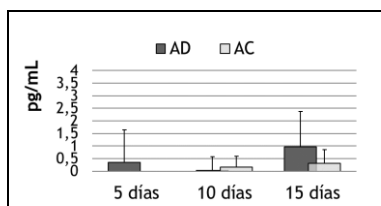


Fig. 4/IL1 $\beta$ /8. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD) y control (AC).

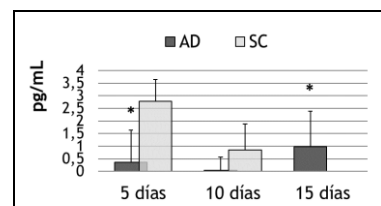


Fig. 4/IL1 $\beta$ /9. Diclofenaco en cultivos artrósicos (AD) y control sano (SC).

Respecto al control sano y de forma similar al tratamiento con indometacina (Fig. 4/IL1 $\beta$ /4), se encontraron diferencias significativas a 5 y 15 días (Fig. 4/IL1 $\beta$ /9), siendo solo al final del experimento

cuando los valores bajo tratamiento fueron superiores al control.

#### 4.1.3.2.5. Diclofenaco en cultivos sanos

No se observaron diferencias significativas entre períodos de tratamiento con diclofenaco (Fig. 4/IL1 $\beta$ /10), aunque el tratamiento provocó una liberación de IL-1 $\beta$  significativamente menor a 5 y 10 días respecto al control (Fig. 4/IL1 $\beta$ /11).

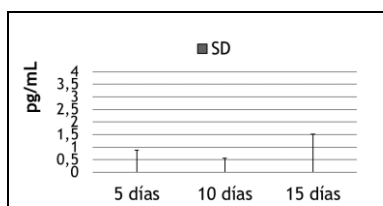


Fig. 4/IL1 $\beta$ /10. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD).

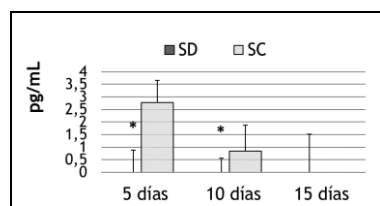


Fig. 4/IL1 $\beta$ /11. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD) y control (SC).

#### 4.1.3.2.6. Celecoxib en cultivos artrósicos

El tratamiento con celecoxib en cultivos artrósicos no provocó diferencias significativas en la liberación de interleucina en el tiempo (Fig. 4/IL1 $\beta$ /12).

Tampoco se detectaron diferencias significativas entre el tratamiento y su control (Fig. 4/IL1 $\beta$ /13).

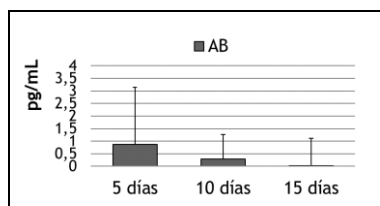


Fig. 4/IL1 $\beta$ /12. Cultivos artrósicos. Celecoxib (AB).

Por el contrario, sí se detectó un aumento significativo en la liberación de IL-1 $\beta$  a los 15 días bajo tratamiento en la línea artrósica respecto al control sano (Fig. 4/IL1 $\beta$ /14).

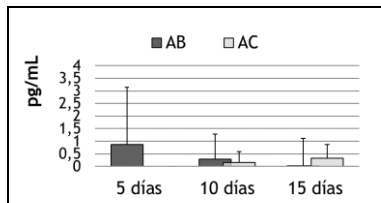


Fig. 4/IL1B/13. Cultivos artrósicos. Celecoxib (AB), control (AC).

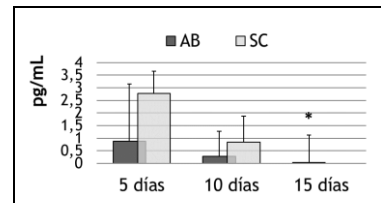


Fig. 4/IL1B/14. Celecoxib en cultivos artrósicos (AB), control sano (SC).

#### 4.1.3.2.7. Celecoxib en cultivos sanos

El tratamiento con el coxib provocó un aumento significativo de IL-1 $\beta$  a los 10 días (Fig. 4/IL1 $\beta$ /15), obteniéndose diferencias estadísticamente representativas a 5 y 15 días (Fig. 4/IL1 $\beta$ /16), siendo solo al final del experimento cuando los valores bajo tratamiento fueron superiores al control.

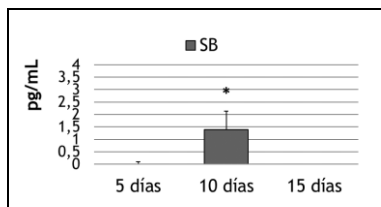


Fig. 4/IL1B/15. Cultivos sanos. Celecoxib (SB).

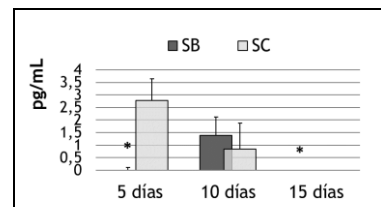


Fig. 4/IL1B/16. Cultivos sanos. Celecoxib (SB) y control (SC).

#### 4.1.3.2.8. Comparación entre fármacos en cultivos artrósicos

No se detectaron diferencias en la liberación de interleucina entre los tratamientos con indometacina y diclofenaco en cultivos artrósicos al nivel de significancia establecido (Fig. 4/IL1 $\beta$ /17).

Sin embargo, en los cultivos tratados con celecoxib, la liberación

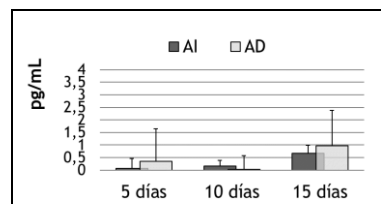


Fig. 4/IL1B/17. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI) y diclofenaco (AD).

fue significativamente menor a 15 días respecto a los otros dos fármacos (Fig. 4/IL1 $\beta$ /18-19).

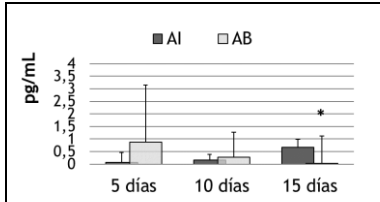


Fig. 4/IL1 $\beta$ /18. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI) y celecoxib (AB).

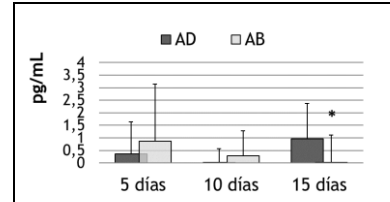


Fig. 4/IL1 $\beta$ /19. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD) y celecoxib (AB).

#### 4.1.3.2.9. Comparación entre fármacos en cultivos sanos

El análisis entre tratamientos con los diferentes fármacos en cultivos sanos proporcionó diferencias significativas en al menos un punto de estudio, detectándose mayores diferencias entre los tratamientos con indometacina y celecoxib. Al final del estudio, los niveles de IL-1 $\beta$  fueron similares, aunque significativamente superiores bajo tratamiento con indometacina respecto a los obtenidos bajo tratamiento con celecoxib (Fig. 4/IL1 $\beta$ /20-22).

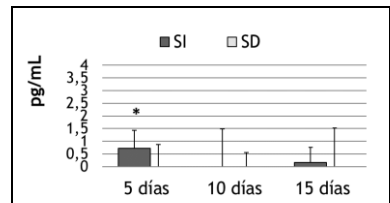


Fig. 4/IL1 $\beta$ /20. Cultivos sanos. Indometacina (SI) y diclofenaco (SD).

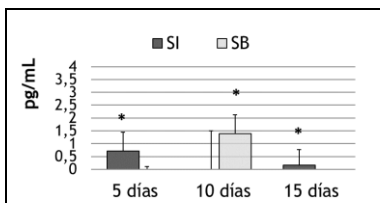


Fig. 4/IL1 $\beta$ /21. Cultivos sanos. Indometacina (SI), celecoxib (SB).

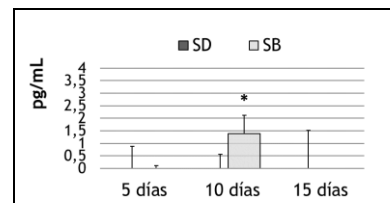


Fig. 4/IL1 $\beta$ /22. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD), celecoxib (SB).

#### 4.1.3.2.10. Comparación del efecto de cada tratamiento entre las líneas celulares

No se encontraron diferencias estadísticas entre ambas líneas tras el tratamiento con indometacina (Fig. 4/IL1 $\beta$ /23) o diclofenaco (Fig. 4/IL1 $\beta$ /24).

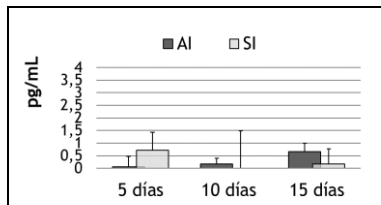


Fig. 4/IL1 $\beta$ /23. Comparación tratamientos indometacina.

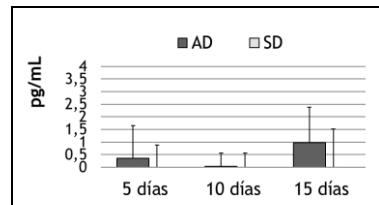


Fig. 4/IL1 $\beta$ /24. Comparación tratamientos diclofenaco.

Bajo tratamiento con celecoxib, se produjo un aumento significativo a 10 días en la liberación de interleucina en la línea sana frente a la artrósica (Fig. 4/IL1 $\beta$ /25).

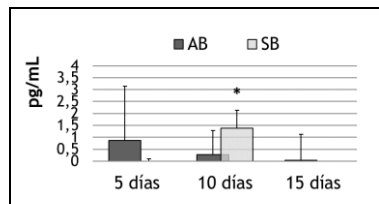


Fig. 4/IL1 $\beta$ /25. Comparación tratamientos celecoxib.

#### 4.1.3.3. TNF $\alpha$

##### 4.1.3.3.1. Comparación entre controles

Los valores de TNF $\alpha$  basales entre las líneas sana y artrósica fueron significativamente diferentes a los 5 y 10 días (Fig. 4/TNF $\alpha$ /1a).

Se encontraron diferencias significativas en ambas líneas entre los valores de TNF $\alpha$  a 5 días respecto a los puntos de estudio posteriores. En los

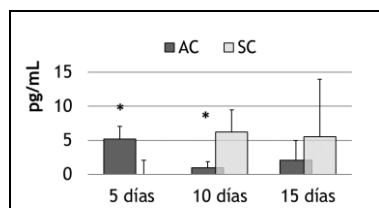


Fig. 4/TNF $\alpha$ /1a. Cultivos control artrósico (AC) y sano (SC).

controles artrósicos, los valores de la citoquina fueron significativamente inferiores a 10 y 15 días (Fig. 4/TNF $\alpha$ /1b) mientras que en los sanos fueron significativamente superiores (Fig. 4/TNF $\alpha$ /1c).

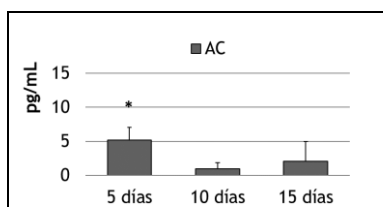


Fig. 4/TNF $\alpha$ /1b. Cultivos control artrósico (AC).

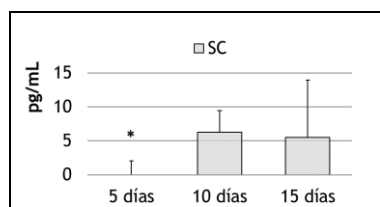


Fig. 4/TNF $\alpha$ /1c. Cultivos control sano (SC).

#### 4.1.3.3.2. Indometacina en cultivos artrósicos

La liberación de citoquina osciló significativamente a lo largo del estudio, a los 10 días frente a los 5, y a los 15 frente a los anteriores (4/TNF $\alpha$ /2). Respecto a los valores control, el tratamiento produjo un aumento significativo en la liberación de TNF $\alpha$  a lo largo del estudio (Fig. 4/TNF $\alpha$ /3). La comparación frente a los controles sanos solo mostró diferencias significativas a 5 y 10 días (Fig. 4/TNF $\alpha$ /4).

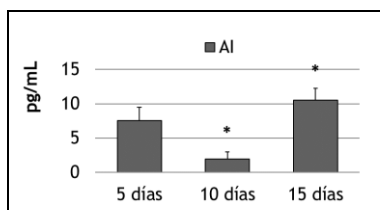


Fig. 4/TNF $\alpha$ /2. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI).

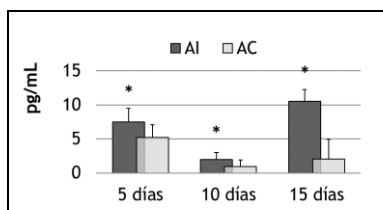


Fig. 4/TNF $\alpha$ /3. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI) y control (AC).

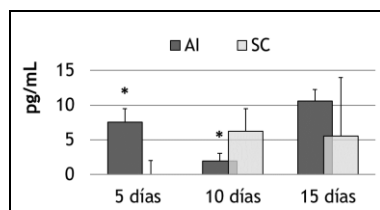


Fig. 4/TNF $\alpha$ /4. Indometacina en cultivos artrósicos (AI) y control sano (SC).

#### 4.1.3.3.3. Indometacina en cultivos sanos

En cultivos sanos, la liberación fue significativamente superior a los 15 días (Fig. 4/TNF $\alpha$ /5). Al comparar con su control, las diferencias fueron significativas durante en dos primeros períodos, sin detectarse discrepancias al final del estudio (Fig. 4/TNF $\alpha$ /6).

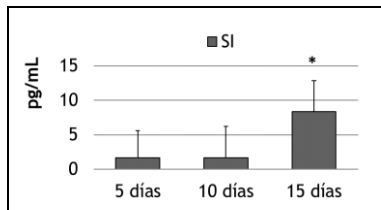


Fig. 4/TNF $\alpha$ /5. Cultivos sanos. Indometacina (SI).

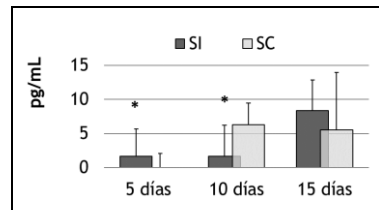


Fig. 4/TNF $\alpha$ /6. Cultivos sanos. Indometacina (SI) y control (SC).

#### 4.1.3.3.4. Diclofenaco en cultivos artrósicos

La liberación de TNF $\alpha$  fue homogénea a lo largo del tiempo en cultivos artrósicos bajo tratamiento (Fig. 4/TNF $\alpha$ /7), pero significativamente superior a su control, con el nivel de significancia establecido  $\alpha=0.05$ , a partir de los 10 días (Fig. 4/TNF $\alpha$ /8).

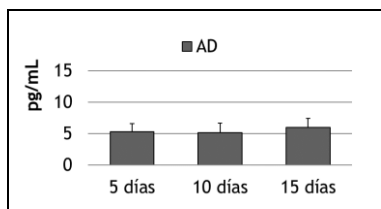


Fig. 4/TNF $\alpha$ /7. TNF $\alpha$ . Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD).

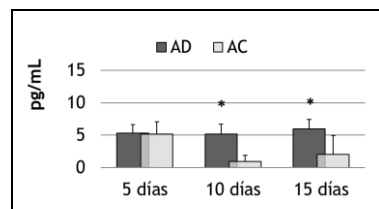


Fig. 4/TNF $\alpha$ /8. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD) y control (AC).

Respecto al control sano, solamente lo fue a 5 días (Fig. 4/TNF $\alpha$ /9).

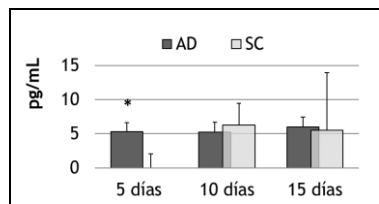


Fig. 4/TNF $\alpha$ /9. Diclofenaco en cultivos artrósicos (AD) y control sano (SC).

#### 4.1.3.3.5. Diclofenaco en cultivos sanos

No se detectaron diferencias significativas en el contenido de TNF $\alpha$  en los cultivos sanos (Fig. 4/TNF $\alpha$ /10). Respecto a su control, la liberación de citoquina solo se encontraron diferencias significativas entre los grupos a 5 días (Fig. 4/TNF $\alpha$ /11).

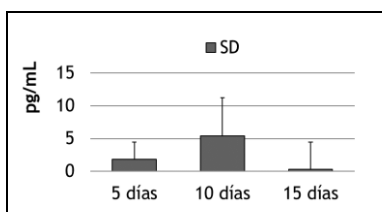


Fig. 4/TNF $\alpha$ /10. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD).

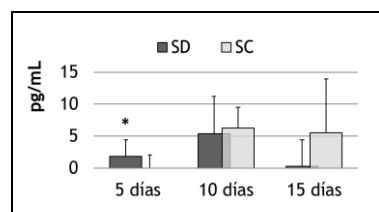


Fig. 4/TNF $\alpha$ /11. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD) y control (SC).

#### 4.1.3.3.6. Celecoxib en cultivos artrósicos

El tratamiento con celecoxib provocó un incremento significativo a los 15 días de incubación sobre la liberación de TNF $\alpha$  (Fig. 4/TNF $\alpha$ /12). Respecto a los valores obtenidos en los controles artrósicos se describieron diferencias significativas en todos los grupos, con valores inferiores a 5 y 10 días en los cultivos tratados y un claro aumento al final del estudio, superior a los valores control (Fig. 4/TNF $\alpha$ /13).

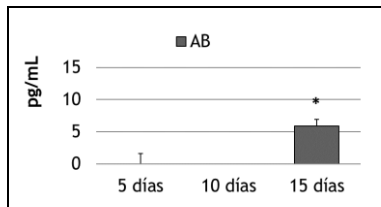


Fig. 4/TNFα/12. Cultivos artrósicos. Celecoxib (AB).

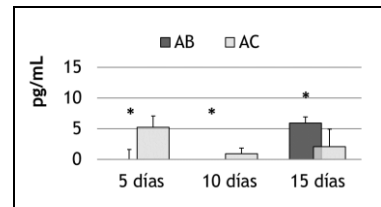


Fig. 4/TNFα/13. Cultivos artrósicos. Celecoxib (AB) y control (AC).

Respecto al control sano, las diferencias estadísticas se encontraron entre los grupos a 10 días, con una menor liberación de TNFα en la línea artrósica tratada con el coxib (Fig. 4/TNFα/14).

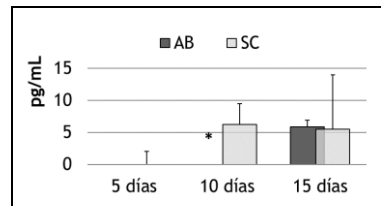


Fig. 4/TNFα/14. Celecoxib en cultivos artrósicos (AB) y control sano (SC).

#### 4.1.3.3.7. Celecoxib en cultivos sanos

En este caso, el aumento en la liberación de TNFα fue progresivo y únicamente significativo a 15 días sobre la concentración inicial (Fig. 4/TNFα/15).

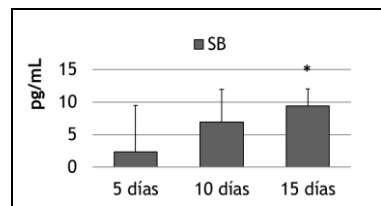


Fig. 4/TNFα/15. Cultivos sanos. Celecoxib (SB).

No se observaron diferencias significativas en los niveles de TNFα entre los cultivos control y el tratamiento con celecoxib (Fig. 4/TNFα/16).

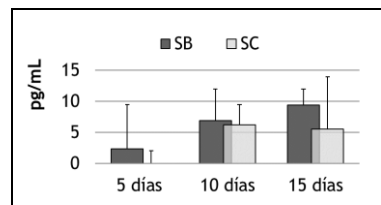


Fig. 4/TNFα/16. Cultivos sanos. Celecoxib (SB) y control (SC).

#### 4.1.3.3.8. Comparación entre fármacos en cultivos artrósicos

Los resultados mostraron que, de forma general, los valores de TNF $\alpha$  fueron significativamente superiores bajo tratamiento con indometacina tanto frente al diclofenaco (Fig. 4/TNF $\alpha$ /17) como al celecoxib (Fig. 4/TNF $\alpha$ /18).

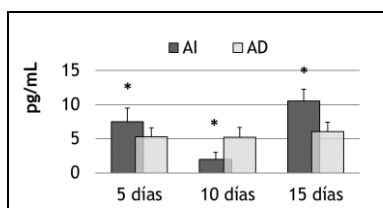


Fig. 4/TNF $\alpha$ /17. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI) y diclofenaco (AD).

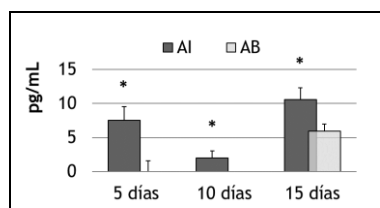


Fig. 4/TNF $\alpha$ /18. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI) y celecoxib (AB).

La liberación de TNF $\alpha$  bajo la influencia del celecoxib fue la menor de los tres fármacos durante los dos primeros puntos de estudio, sin señalarse diferencias a 15 días frente a los valores de liberación obtenidos bajo tratamiento con diclofenaco (Fig. 4/TNF $\alpha$ /19).

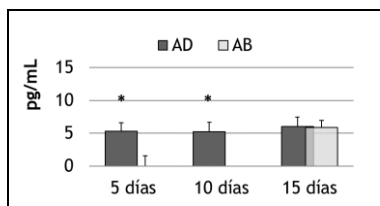


Fig. 4/TNF $\alpha$ /19. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD) y celecoxib (AB).

#### 4.1.3.3.9. Comparación entre fármacos en cultivos sanos

La liberación de TNF $\alpha$  en cultivos sanos varió significativamente al final del estudio entre indometacina y diclofenaco, y diclofenaco y celecoxib (Figs. 4/TNF $\alpha$ /20 y 22).

En el par indometacina/celecoxib solo se verificaron diferencias significativas a 10 días (Fig. 4/TNF $\alpha$ /21). Al final del estudio, el fármaco que menor liberación de TNF $\alpha$  produjo fue el diclofenaco.

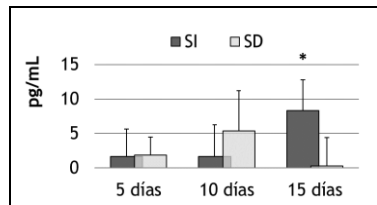


Fig. 4/TNF $\alpha$ /20. Cultivos sanos. Indometacina (SI) y diclofenaco (SD).

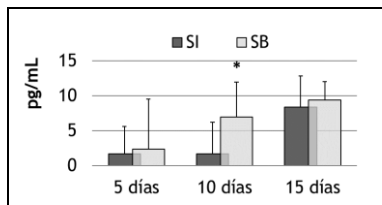


Fig. 4/TNF $\alpha$ /21. Cultivos sanos. Indometacina (SI) y celecoxib (SB).

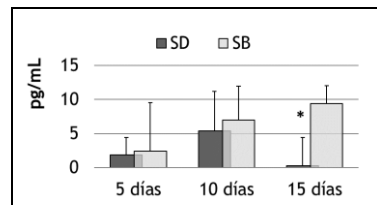


Fig. 4/TNF $\alpha$ /22. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD) y celecoxib (SB).

#### 4.1.3.3.10. Comparación del efecto de cada tratamiento entre las líneas celulares

El aumento en la liberación de TNF $\alpha$  al medio en los cultivos artrósicos frente a los sanos solo fue significativo a 5 días para el tratamiento con indometacina, y a 5 y a 15 para el tratamiento con diclofenaco (Figs. 4/TNF $\alpha$ /23-24).

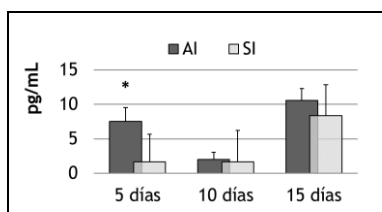


Fig. 4/TNF $\alpha$ /23. Comparación tratamientos indometacina.

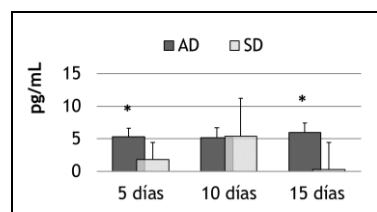


Fig. 4/TNF $\alpha$ /24. Comparación tratamientos diclofenaco.

Por el contrario, bajo tratamiento con celecoxib, la liberación de la citoquina fue significativamente menor a 10 y 15 días en los cultivos artrósicos frente a los sanos (Fig. 4/TNF $\alpha$ /25).

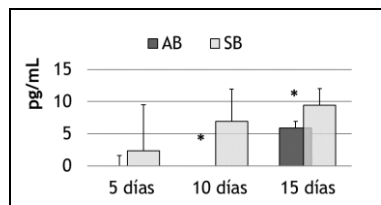


Fig. 4/TNF $\alpha$ /25. Comparación tratamientos celecoxib.

#### 4.1.3.4. IL-6

##### 4.1.3.4.1. Comparación entre controles

No se encontraron diferencias significativas entre valores basales de IL-6 de controles sanos y artrósicos (Fig. 4/IL6/1a). La liberación de esta citoquina fue similar durante el tiempo de estudio en los controles artrósicos (Fig. 4/IL6/1b), pero en los sanos se observó una disminución significativa al final del estudio respecto al período anterior (Fig. 4/IL6/1c).

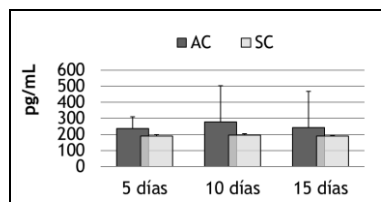


Fig. 4/IL6/1a. Cultivos control artrósico (AC) y sano (SC).

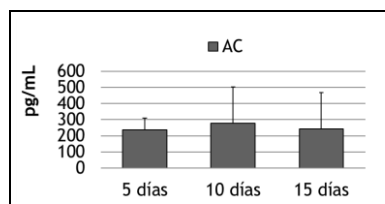


Fig. 4/IL6/1b. Cultivos control artrósico (AC).

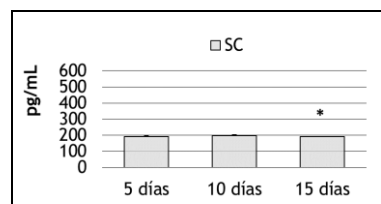


Fig. 4/ IL6/1c. Cultivos control sano (SC).

##### 4.1.3.4.2. Indometacina en cultivos artrósicos

Los valores de IL-6 no variaron a lo largo del tiempo bajo el tratamiento con indometacina (Fig. 4/IL6/2) ni fueron diferentes a los cuantificados en los cultivos artrósicos de control (Fig. 4/IL6/3).

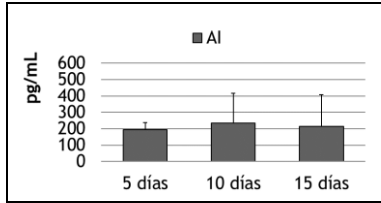


Fig. 4/IL6/2. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI).

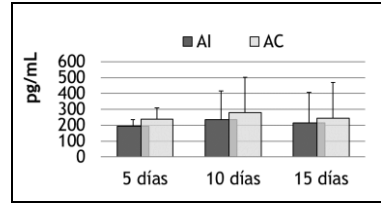


Fig. 4/IL6/3. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI) y control (AC).

Tampoco se apreciaron diferencias significativas respecto a los valores cuantificados en los cultivos control sanos (Fig. 4/IL6/4).

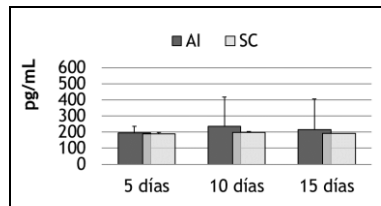


Fig. 4/IL6/4. Indometacina en cultivos artrósicos (AI) y control sano (SC).

#### 4.1.3.4.3. Indometacina en cultivos sanos

El contenido de IL-6 en los cultivos sanos bajo tratamiento con indometacina disminuyó significativamente a partir de los 5 días de cultivo (Fig. 4/IL6/5), siendo significativamente inferior en todos los puntos de estudio respecto al control sin tratamiento (Fig. 4/IL6/6).

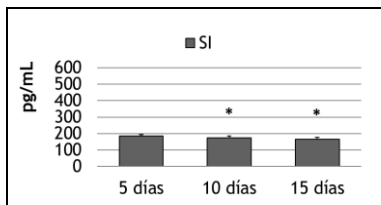


Fig. 4/IL6/5. Cultivos sanos. Indometacina (SI).

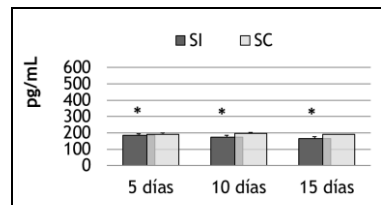


Fig. 4/IL6/6. Cultivos sanos. Indometacina (SI) y control (SC).

#### 4.1.3.4.4. Diclofenaco en cultivos artrósicos

En cultivos artrósicos, el tratamiento con diclofenaco produjo una disminución significativa en la concentración de IL-6 a los 15 días respecto al período anterior (Fig. 4/IL6/7). No se encontraron diferencias significativas en los valores de interleucina bajo tratamiento frente a ninguno de los controles (Fig. 4/IL6/8-9).

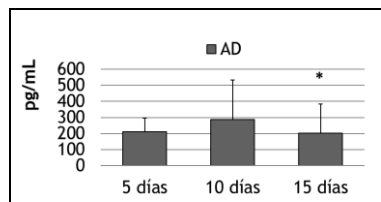


Fig. 4/IL6/7. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD).

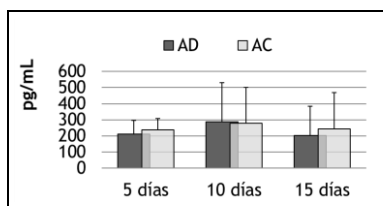


Fig. 4/IL6/8. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD) y control (AC).

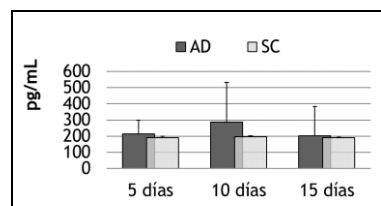


Fig. 4/IL6/9. Diclofenaco en cultivos artrósicos (AD) y control sano (SC).

#### 4.1.3.4.5. Diclofenaco en cultivos sanos

Bajo tratamiento con diclofenaco, la liberación de IL-6 fue estable a lo largo del estudio (Fig. 4/IL6/10), pero significativamente inferior a la del control sano a 5 y 10 días (Fig. 4/IL6/11).

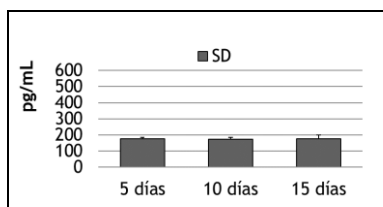


Fig. 4/IL6/10. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD).

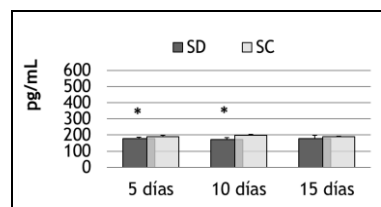


Fig. 4/IL6/11. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD) y control (SC).

4.1.3.4.6. *Celecoxib en cultivos artrósicos*

No se estimaron diferencias en la liberación de IL-6 en las muestras artrósicas tratadas con celecoxib a lo largo del estudio (Fig. 4/IL6/12).

Solamente se detectó una merma significativa en la liberación de IL-6, respecto a los controles artrósicos a los 5 días de incubación (Fig. 4/IL6/13), sin encontrarse diferencias frente a los controles sanos (Fig. 4/IL6/14).

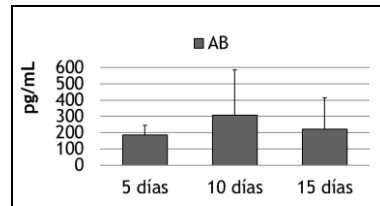


Fig. 4/IL6/12. Cultivos artrósicos. Celecoxib (AB).

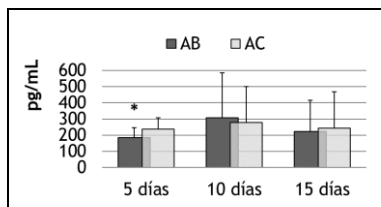


Fig. 4/IL6/13. Cultivos artrósicos. Celecoxib (AB) y control (AC).

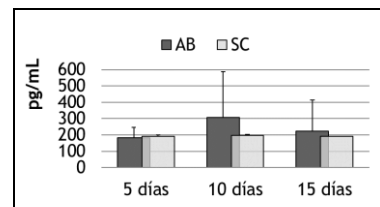


Fig. 4/IL6/14. Celecoxib en cultivos artrósicos (AB) y control sano (SC).

4.1.3.4.7. *Celecoxib en cultivos sanos*

En cultivos sanos se detectó un aumento en los valores de IL-6 a los 15 días, significativo frente a los períodos anteriores (Fig. 4/IL6/15). Respecto a su control, los niveles de IL-6 fueron significativamente menores hasta la mitad del experimento, aumentando significativamente al final del estudio (Fig. 4/IL6/16).

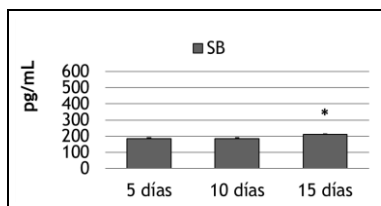


Fig. 4/IL6/15. Cultivos sanos. Celecoxib (SB).

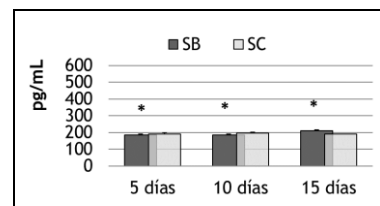


Fig. 4/IL6/16. Cultivos sanos. Celecoxib (SB) y control (SC).

#### 4.1.3.4.8. Comparación entre fármacos en cultivos artrósicos

Los tres fármacos ejercieron un efecto similar en la liberación de IL-6 sobre los cultivos artrósicos (Figs. 4/IL6/17-19).

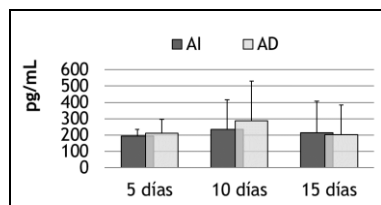


Fig. 4/IL6/17. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI) y diclofenaco (AD).

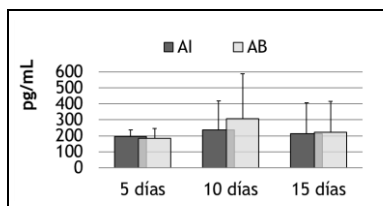


Fig. 4/IL6/18. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI) y celecoxib (AB).

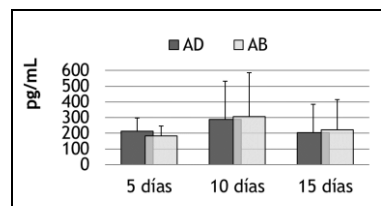


Fig. 4/IL6/19. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD) y celecoxib (AB).

#### 4.1.3.4.9. Comparación entre fármacos en cultivos sanos

En cultivos sanos, la liberación de IL-6 bajo tratamiento con indometacina o diclofenaco fue similar salvo a 5 días en que con indometacina fue significativamente superior (Fig. 4/IL6/20). Frente a estos dos AINE, el celecoxib provocó una liberación significativamente superior en al menos dos períodos de estudio respecto a cada fármaco (Fig. 4/IL6/21-22).

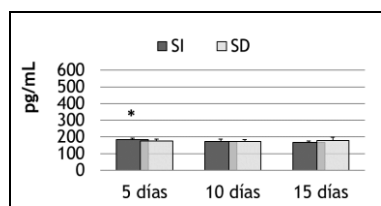


Fig. 4/IL6/20. Cultivos sanos. Indometacina (SI), diclofenaco (SD).

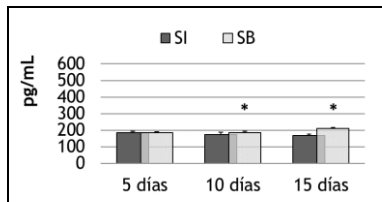


Fig. 4/IL6/21. Cultivos sanos. Indometacina (SI), celecoxib (SB).

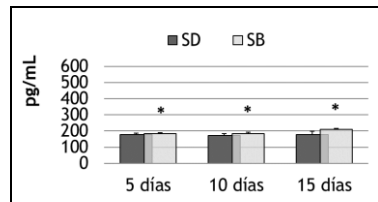


Fig. 4/IL6/22. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD), celecoxib (SB).

4.1.3.4.10. Comparación del efecto de cada tratamiento entre las líneas celulares

El efecto observado para cada tratamiento fue similar en ambos tipos de cultivo, sanos y artrósicos (Figs. 4/IL6/23-25).

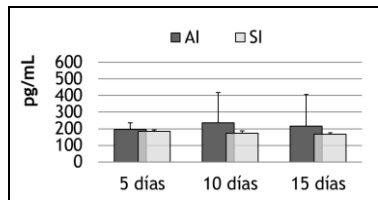


Fig. 4/IL6/23. Comparación tratamientos indometacina.

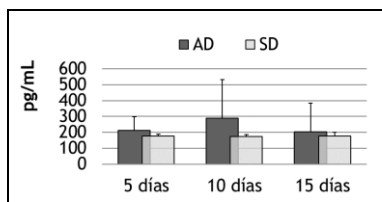


Fig. 4/IL6/24. Comparación tratamientos diclofenaco.

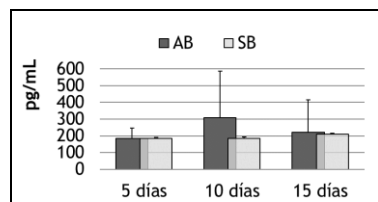


Fig. 4/IL6/25. Comparación tratamientos celecoxib.

#### 4.1.3.5. Caspasa-9

##### 4.1.3.5.1. Comparación entre controles

El estudio mostró diferencias significativas a 10 días entre los controles sanos y artrósicos, en los que la liberación de caspasa fue superior (Fig. 4/Casp/1a). Los controles artrósicos no presentaron diferencias entre períodos (Fig. 4/Casp/1b) y en los sanos el aumento fue significativo a 15 días respecto a los períodos anteriores (Fig. 4/Casp/1c).

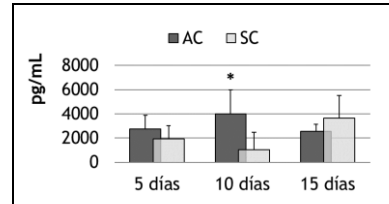


Fig. 4/Casp/1a. Cultivos control artrósico (AC) y sano (SC).

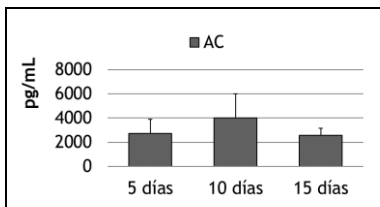


Fig. 4/Casp/1b. Cultivos control artrósico (AC).

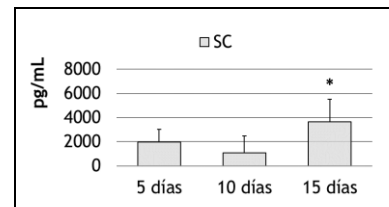


Fig. 4/Casp/1c. Cultivos control sano (SC).

##### 4.1.3.5.2. Indometacina en cultivos artrósicos

La liberación de caspasa-9 bajo tratamiento con indometacina fue similar en los tres períodos estudiados (Fig. 4/Casp/2), sin encontrarse diferencias significativas con los cultivos control (Fig. 4/Casp/3).

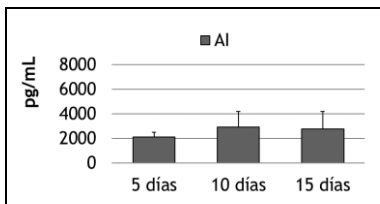


Fig. 4/Casp/2. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI).

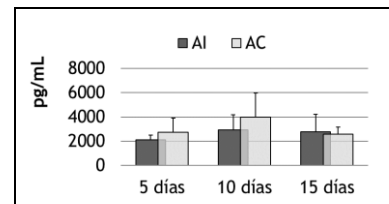


Fig. 4/Casp/3. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI) y control (AC).

Respecto al control sano, se detectó que los niveles de caspasa-9 solamente eran significativamente superiores a 10 días en los cultivos artrósicos tratados con el fármaco (Fig. 4/Casp/4).

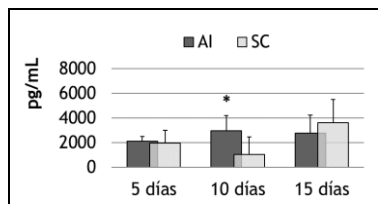


Fig. 4/Casp/4. Indometacina en cultivos artrósicos (AI) y control sano (SC).

#### 4.1.3.5.3. Indometacina en cultivos sanos

Bajo tratamiento, en los cultivos sanos se observó un aumento significativo en la liberación de caspasa-9 a los 15 días respecto al período anterior (Fig. 4/Casp/5). En ese mismo período, los valores resultaron ser significativamente menores a los obtenidos en el control sano (Fig. 4/Casp/6).

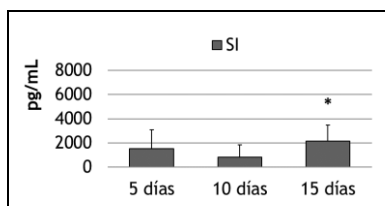


Fig. 4/Casp/5. Cultivos sanos. Indometacina (SI).

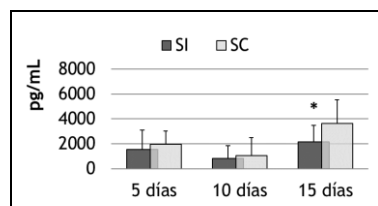


Fig. 4/Casp/6. Cultivos sanos. Indometacina (SI) y control (SC).

#### 4.1.3.5.4. Diclofenaco en cultivos artrósicos

El tratamiento en los cultivos artrósicos provocó un aumento significativo en la liberación de caspasa a los 15 días respecto al período anterior, sin establecerse diferencias con el inicio del experimento (Fig. 4/Casp/7).

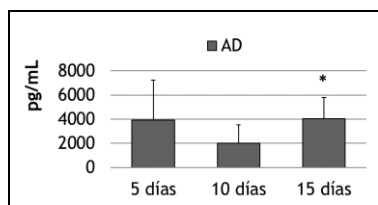


Fig. 4/Casp/7. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD).

Los niveles de caspasa fueron significativamente diferentes con el control artrósico a 10 y 15 días

(Fig. 4/Casp/8) pero no difirieron de los obtenidos en los controles sanos (Fig. 4/Casp/9).

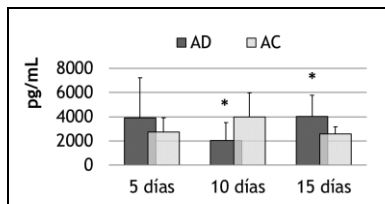


Fig. 4/Casp/8. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD) y control (AC).

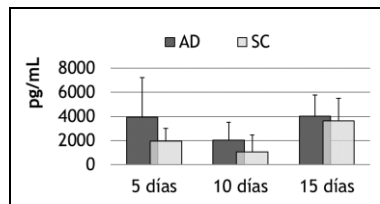


Fig. 4/Casp/9. Diclofenaco en cultivos artrósicos (AD) y control sano (SC).

#### 4.1.3.5.5. Diclofenaco en cultivos sanos

En cultivos sanos, se detectaron diferencias significativas en la liberación de caspasa a 10 días respecto al período inicial, y a 15 respecto a los dos anteriores (Fig. 4/Casp/10). No se detectaron diferencias significativas con los cultivos control (Fig. 4/Casp/11).

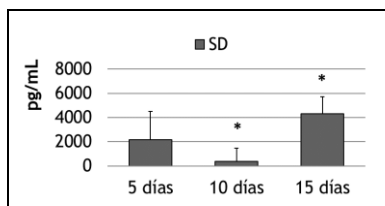


Fig. 4/Casp/10. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD).

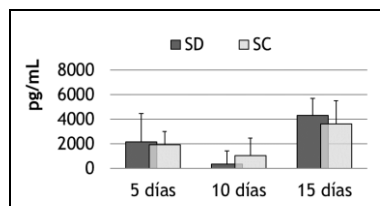


Fig. 4/Casp/11. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD) y control (SC).

#### 4.1.3.5.6. Celecoxib en cultivos artrósicos

En cultivos artrósicos bajo tratamiento con celecoxib nos topamos con una situación similar a la descrita bajo tratamiento con diclofenaco. El tratamiento en los cultivos artrósicos provocó un aumento significativo en la liberación

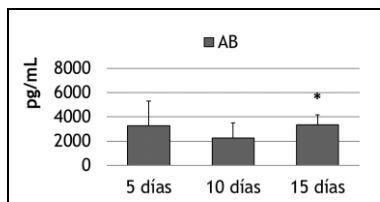


Fig. 4/Casp/12. Cultivos artrósicos. Celecoxib (AB).

de caspasa a los 15 días respecto al período anterior, sin apreciarse diferencias con el inicio del experimento (Fig. 4/Casp/12). Los niveles de caspasa fueron significativamente diferentes con el control artrósico a 10 y 15 días (Fig. 4/Casp/13) pero no difirieron de los obtenidos en los controles sanos (Fig. 4/Casp/14).

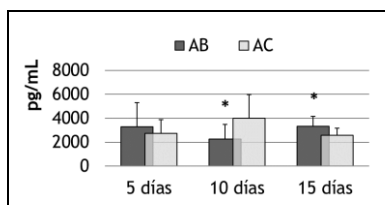


Fig. 4/Casp/13. Cultivos artrósicos. Celecoxib (AB) y control (AC).

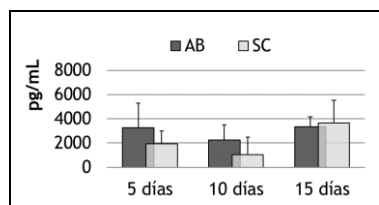


Fig. 4/Casp/14. Celecoxib en cultivos artrósicos (AB) y control sano (SC).

#### 4.1.3.5.7. Celecoxib en cultivos sanos

La liberación de caspasa fue significativamente menor a 10 días, respecto a la obtenida al inicio del estudio, en cultivos sanos tratados con el coxib (Fig. 4/Casp/15). Los valores obtenidos fueron significativamente menores a los del control a 10 y 15 días (Fig. 4/Casp/16).

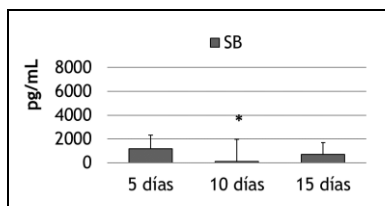


Fig. 4/Casp/15. Cultivos sanos. Celecoxib (SB).

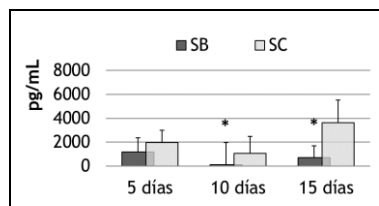


Fig. 4/Casp/16. Cultivos sanos. Celecoxib (SB) y control (SC).

#### 4.1.3.5.8. Comparación entre fármacos en cultivos artrósicos

Los niveles de caspasa en cultivos artrósicos fueron similares bajo tratamiento con cualquiera de los tres fármacos, salvo a 15 días entre indometacina y diclofenaco, en donde se observó que los valores con indometacina eran significativamente inferiores (Figs. 4/Casp/17-19).

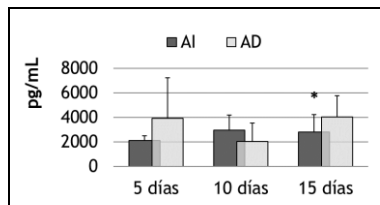


Fig. 4/Casp/17. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI) y diclofenaco (AD).

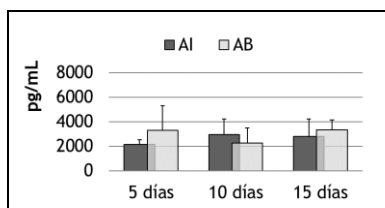


Fig. 4/Casp/18. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI) y celecoxib (AB).

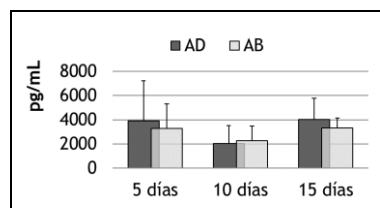


Fig. 4/Casp/19. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD) y celecoxib (AB).

#### 4.1.3.5.9. Comparación entre fármacos en cultivos sanos

En cultivos sanos se estimaron diferencias significativas a 10 días entre indometacina, con una mayor liberación de caspasa, y diclofenaco.

A 15 días la liberación fue significativamente diferente entre tratamientos, siendo el celecoxib el fármaco con el que obtuvieron menores valores de caspasa en este período (Figs. 4/Casp/20-22).

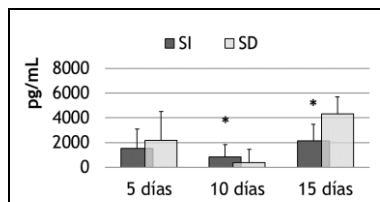


Fig. 4/Casp/20. Cultivos sanos. Indometacina (SI) y diclofenaco (SD).

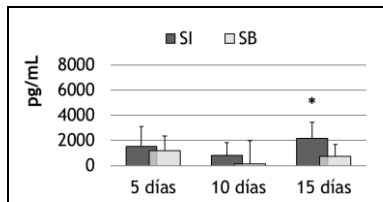


Fig. 4/Casp/21. Cultivos sanos. Indometacina (SI), celecoxib (SB).

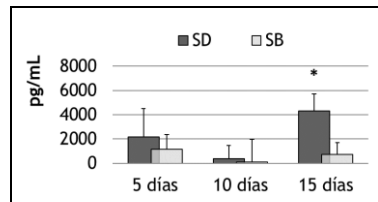


Fig. 4/Casp/22. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD), celecoxib (SB).

#### 4.1.3.5.10. Comparación del efecto de cada tratamiento entre las líneas celulares

En los cultivos tratados con indometacina (Fig. 4/Casp/23) o diclofenaco (Fig. 4/Casp/24), los niveles de caspasa-9 fueron significativamente superiores a 10 días en los cultivos artrósicos.

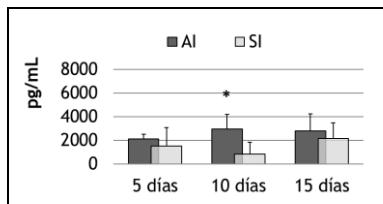


Fig. 4/Casp/23. Comparación tratamientos indometacina.

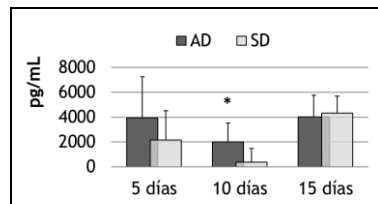


Fig. 4/Casp/24. Comparación tratamientos diclofenaco.

En los cultivos tratados con celecoxib, solo se hallaron diferencias significativas a 15 días, con una mayor liberación de caspasa por los cultivos artrósicos (Fig. 4/Casp/25).

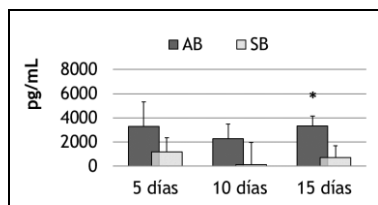


Fig. 4/Casp/25. Comparación tratamientos celecoxib.

#### 4.1.3.6. TRAIL

##### 4.1.3.6.1. Comparación entre controles

No se encontraron diferencias significativas en la liberación de TRAIL entre controles ni entre períodos en cada control (Fig. 4/TRAIL/1).

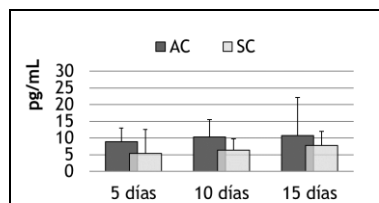


Fig. 4/TRAIL/1. Cultivos control artrósico (AC) y sano (SC).

##### 4.1.3.6.2. Indometacina en cultivos artrósicos

El tratamiento en los cultivos artrósicos provocó una disminución significativa en la liberación de TRAIL a los 15 días respecto a los períodos anteriores (Fig. 4/TRAIL/2). Mientras que esta disminución solo fue significativa respecto al control artrósico (Fig. 4/TRAIL/3), los valores obtenidos en los tres puntos de estudio fueron significativamente diferentes a los encontrados en la línea sana hasta situarse por debajo de ellos al final del estudio (Fig. 4/TRAIL/4).

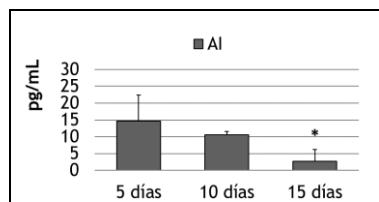


Fig. 4/TRAIL/2. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI).

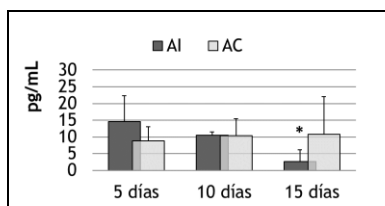


Fig. 4/TRAIL/3. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI) y control (AC).

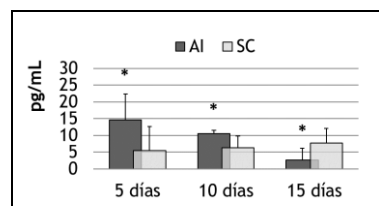


Fig. 4/TRAIL/4. Indometacina en cultivos artrósicos (AI) y control sano (SC).

#### 4.1.3.6.3. Indometacina en cultivos sanos

No se establecieron diferencias significativas en el contenido de TRAIL ni en los cultivos sanos bajo tratamiento a lo largo del tiempo (Fig. 4/TRAIL/5) ni respecto a los valores control (Fig. 4/TRAIL/6).

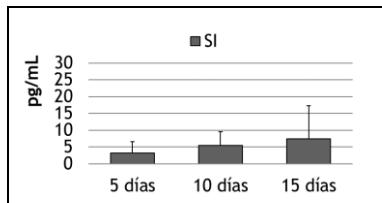


Fig. 4/TRAIL/5. Cultivos sanos. Indometacina (SI).

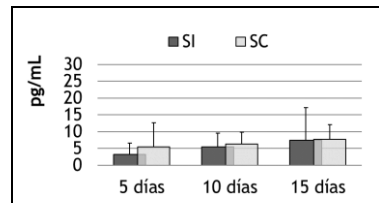


Fig. 4/TRAIL/6. Cultivos sanos. Indometacina (SI) y control (SC).

#### 4.1.3.6.4. Diclofenaco en cultivos artrósicos

Se observó una disminución significativa a los 15 días respecto a la concentración obtenida en el período inicial (Fig. 4/TRAIL/7), sin detectarse diferencias con los valores control artrósicos (Fig. 4/TRAIL/8).

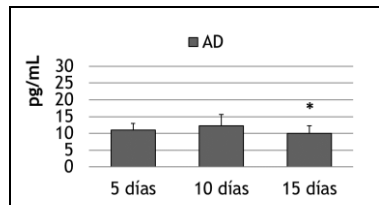


Fig. 4/TRAIL/7. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD).

Aunque todas las concentraciones alcanzadas bajo tratamiento fueron superiores a las obtenidas en los controles sanos, solo se calcularon diferencias estadísticas a 10 días (Fig. 4/TRAIL/9).

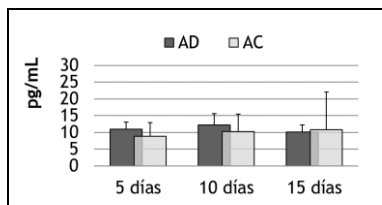


Fig. 4/TRAIL/8. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD), control (AC).

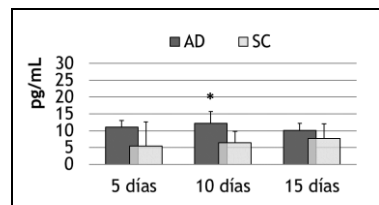


Fig. 4/TRAIL/9. Diclofenaco en cultivos artrósicos (AD), control sano (SC).

#### 4.1.3.6.5. Diclofenaco en cultivos sanos

Se apreció un aumento significativo en la liberación de TRAIL al final del experimento respecto al período inicial (Fig. 4/TRAIL/10), sin detectarse diferencias significativas respecto a los niveles basales control para cada período (Fig. 4/TRAIL/11).

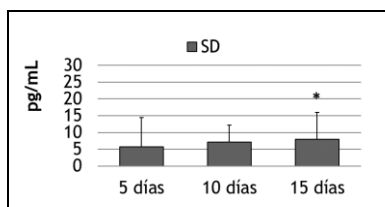


Fig. 4/TRAIL/10. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD).

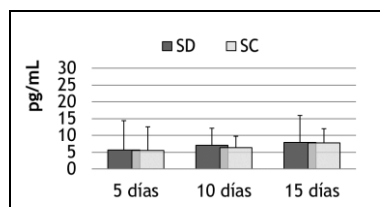


Fig. 4/TRAIL/11. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD) y control (SC).

#### 4.1.3.6.6. Celecoxib en cultivos artrósicos

Bajo tratamiento, se detectó una merma significativa a 10 días en el contenido de TRAIL respecto al período anterior (Fig. 4/TRAIL/12). El tratamiento con celecoxib provocó un aumento significativo a 5 días respecto a las dos líneas control, sana y artrósica (Figs. 4/TRAIL/13-14), sin encontrarse diferencias en ninguno de los casos en los períodos posteriores.

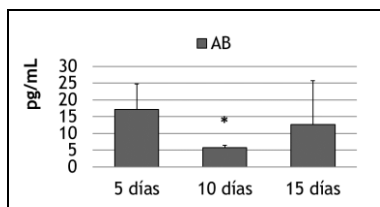


Fig. 4/TRAIL/12. Cultivos artrósicos. Celecoxib (AB).

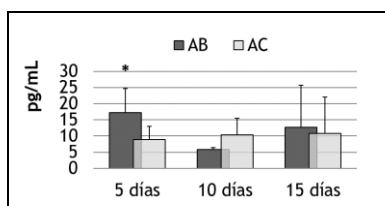


Fig. 4/TRAIL/13. Cultivos artrósicos. Celecoxib (AB) y control (AC).

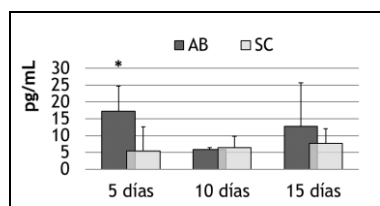


Fig. 4/TRAIL/14. Celecoxib en cultivos artrósicos (AB) y control sano (SC).

#### 4.1.3.6.7. Celecoxib en cultivos sanos

A 10 días, el contenido de TRAIL en los cultivos sanos tratados con celecoxib fue significativamente inferior, con el nivel de significancia  $\alpha=0'05$ , a los obtenidos en los períodos inicial y final (Fig. 4/TRAIL/15). Al comparar con el control sano, los niveles de TRAIL bajo tratamiento con el coxib solo serían significativamente inferiores a los 5 y 10 días de cultivo (Fig. 4/TRAIL/16).

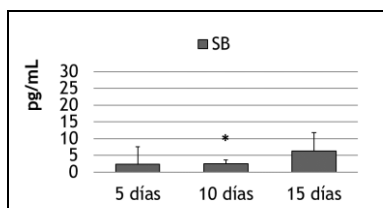


Fig. 4/TRAIL/15. Cultivos sanos. Celecoxib (SB).

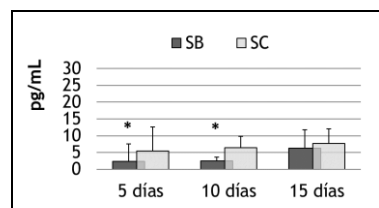


Fig. 4/TRAIL/16. Cultivos sanos. Celecoxib (SB) y control (SC).

#### 4.1.3.6.8. Comparación entre fármacos en cultivos artrósicos

En la línea artrósica se hallaron diferencias entre fármacos a 10 y 15 días. A 10 días se liberaron menores cantidades de TRAIL con celecoxib que con los otros fármacos mientras que, a 15 días, período final del estudio, fue el tratamiento con indometacina el que provocó una liberación de TRAIL significativamente menor (Figs. 4/TRAIL/17-19).

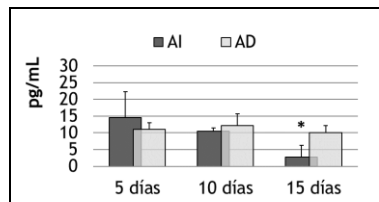


Fig. 4/TRAIL/17. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI) y diclofenaco (AD).

## Resultados: Efecto de Diferentes AINEs Sobre la Funcionalidad de los Condrocitos Humanos en Cultivo

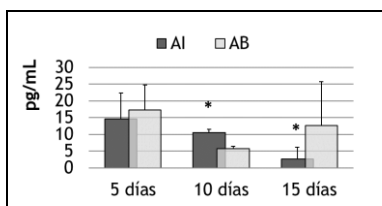


Fig. 4/TRAIL/18. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI) y celecoxib (AB).

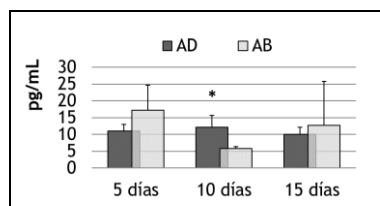


Fig. 4/TRAIL/19. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD) y celecoxib (AB).

### 4.1.3.6.9. Comparación entre fármacos en cultivos sanos

En la línea sana, el tratamiento con celecoxib a 5 y 10 días fue el que mostró valores de TRAIL significativamente menores que con los otros dos fármacos, teniendo la indometacina y el diclofenaco un efecto similar a lo largo del estudio. Al finalizar, la concentración de TRAIL fue similar para los tres tratamientos (Figs. 4/TRAIL/20-22).

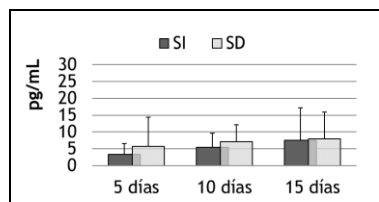


Fig. 4/TRAIL/20. Cultivos sanos. Indometacina (SI), diclofenaco (SD).

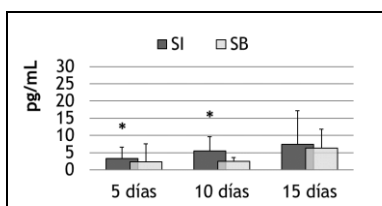


Fig. 4/TRAIL/21. Cultivos sanos. Indometacina (SI) y celecoxib (SB).

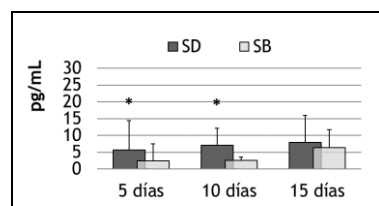


Fig. 4/TRAIL/22. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD) y celecoxib (SB).

### 4.1.3.6.10. Comparación del efecto de cada tratamiento entre las líneas celulares

El estudio estadístico mostró que los valores de TRAIL en muestras artrósicas tratadas con indometacina o celecoxib eran

significativamente superiores a 5 y 10 días al igual que con diclofenaco, pero solo a 10 días.

A 15 días no se obtuvieron diferencias con ninguno de los fármacos (Fig. 4/TRAIL/23-25).

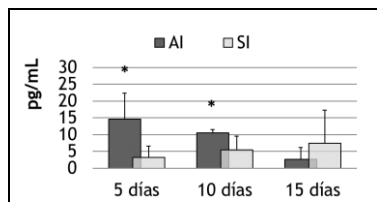


Fig. 4/TRAIL/23. Comparación tratamientos indometacina.

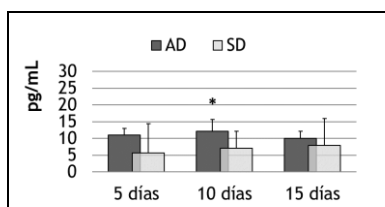


Fig. 4/TRAIL/24. Comparación tratamientos diclofenaco.

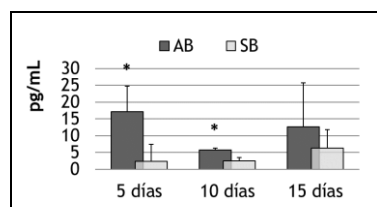


Fig. 4/TRAIL/25. Comparación tratamientos celecoxib.

#### 4.1.3.7. Fibronectina

##### 4.1.3.7.1. Comparación entre controles

La concentración de fibronectina fue significativamente menor en el control artrósico (Fig. 4/FN/1a). Analizando entre períodos, en los controles artrósicos se detectaron concentraciones significativamente menores de esta glucoproteína a los 10 días (Fig. 4/FN/1b), y a los 15 días en los sanos respecto a los puntos anteriores (Fig. 4/FN/1c).

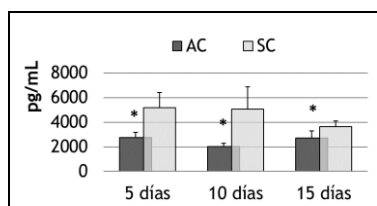


Fig. 4/FN/1a. Cultivos control artrósico (AC) y sano (SC).

## Resultados: Efecto de Diferentes AINEs Sobre la Funcionalidad de los Condrocitos Humanos en Cultivo

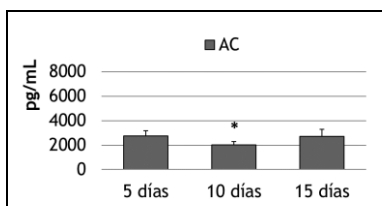


Fig. 4/FN/1b. Cultivos control artrósico (AC).

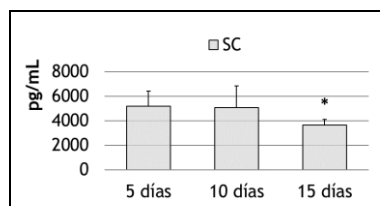


Fig. 4/FN/1c. Cultivos control sano (SC).

### 4.1.3.7.2. Indometacina en cultivos artrósicos

La merma en los niveles de fibronectina fue significativa a los 10 y 15 días de incubación con el fármaco frente al período inicial (Fig. 4/FN/2). El tratamiento con indometacina provocó un aumento en la concentración de fibronectina a 5 y 10 días respecto al control artrósico (Fig. 4/FN/3).

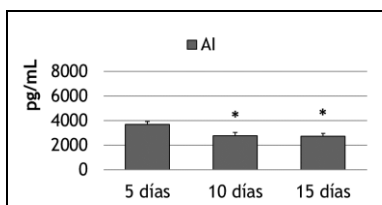


Fig. 4/FN/2. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI).

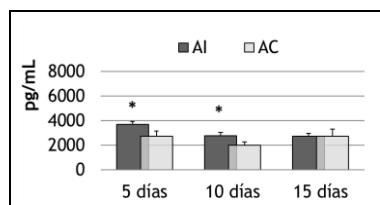


Fig. 4/FN/3. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI) y control (AC).

Sus niveles frente al control sano fueron significativamente menores a 10 y 15 días (Fig. 4/FN/4).

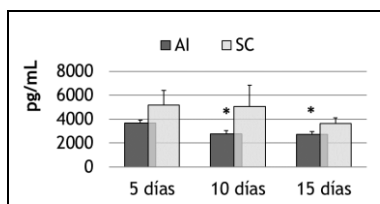


Fig. 4/FN/4. Indometacina en cultivos artrósicos (AI) y control sano (SC).

### 4.1.3.7.3. Indometacina en cultivos sanos

fibronectina a los 15 días respecto al período inicial (Fig. 4/FN/5). Aún así, los valores de fibronectina bajo tratamiento al final del ensayo fueron significativamente superiores a los basales (Fig. 4/FN/6).

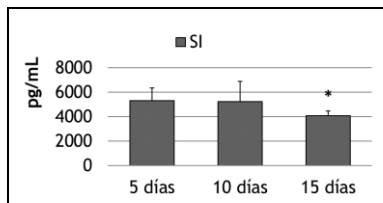


Fig. 4/FN/5. Cultivos sanos. Indometacina (SI).

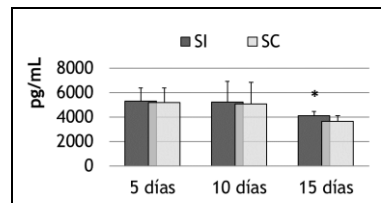


Fig. 4/FN/6. Cultivos sanos. Indometacina (SI) y control (SC).

#### 4.1.3.7.4. Diclofenaco en cultivos artrósicos

La cantidad de fibronectina descendió significativamente bajo tratamiento con el fármaco a 10 días frente a los valores iniciales y a 15 días frente a los dos períodos anteriores (Fig. 4/FN/7). El tratamiento provocó un aumento significativo de la liberación de la glicoproteína respecto a lo cuantificado en el control artrósico (Fig. 4/FN/8) pero significativamente inferior a 10 y 15 días a lo observado en el sano (Fig. 4/FN/9).

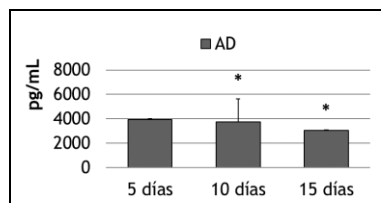


Fig. 4/FN/7. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD).

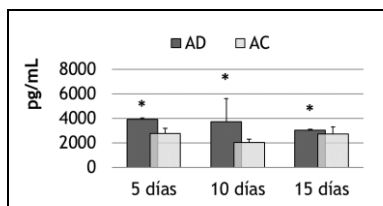


Fig. 4/FN/8. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD) y control (AC).

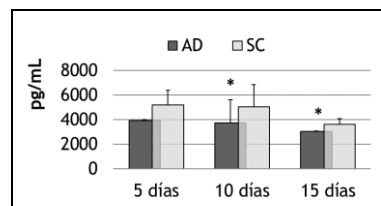


Fig. 4/FN/9. Diclofenaco en cultivos artrósicos (AD) y control sano (SC).

#### 4.1.3.7.5. Diclofenaco en cultivos sanos

Se apreció una disminución significativa en el contenido de fibronectina a los 15 días respecto al período inicial (Fig. 4/FN/10), sin detectarse diferencias frente a los valores basales (Fig. 4/FN/11).

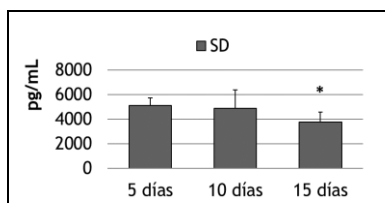


Fig. 4/FN/10. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD).

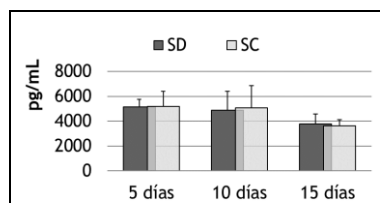


Fig. 4/FN/11. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD) y control (SC).

#### 4.1.3.7.6. Celecoxib en cultivos artrósicos

La cantidad de fibronectina bajo tratamiento con el fármaco descendió significativamente a 10 días respecto al primer período, siendo también significativamente diferente a los 15 días frente a los dos anteriores (Fig. 4/FN/12). Respecto al control artrósico, el tratamiento propició un aumento significativo de la concentración a los 5 y 10 días (Fig. 4/FN/13), obteniéndose valores significativamente inferiores a 10 y 15 días respecto a los obtenidos en el control sano (Fig. 4/FN/14).

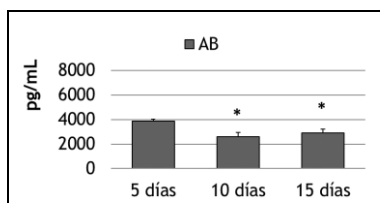


Fig. 4/FN/12. Cultivos artrósicos. Celecoxib (AB).

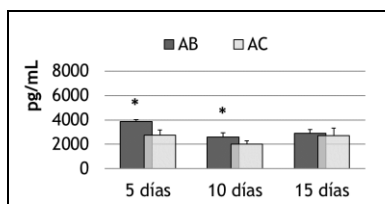


Fig. 4/FN/13. Cultivos artrósicos. Celecoxib (AB) y control (AC).

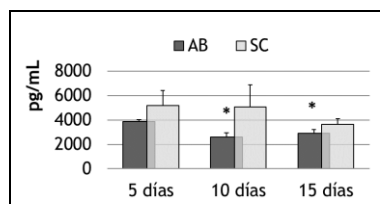


Fig. 4/FN/14. Celecoxib en cultivos artrósicos (AB) y control sano (SC).

#### 4.1.3.7.7. Celecoxib en cultivos sanos

Se detectó una disminución significativa en los valores de fibronectina a los 15 días de cultivo frente al período inicial, con una significancia de  $\alpha=0.05$  (Fig. 4/FN/15). De forma similar a lo observado bajo tratamiento con indometacina, la incubación con celecoxib en la línea sana produjo un aumento significativo en el contenido de fibronectina en el medio a los 15 días de tratamiento respecto a los niveles basales (Fig. 4/FN/16).

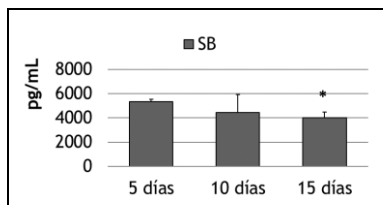


Fig. 4/FN/15. Cultivos sanos. Celecoxib (SB).

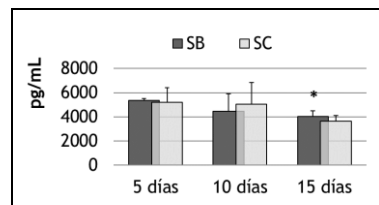


Fig. 4/FN/16. Cultivos sanos. Celecoxib (SB) y control (SC).

#### 4.1.3.7.8. Comparación entre fármacos en cultivos artrósicos

Los valores de fibronectina obtenidos en los cultivos tratados con diclofenaco fueron significativamente mayores a los cuantificados bajo tratamiento con indometacina a 5 y 15 días (Fig. 4/FN/17), y a los 10 días a los cuantificados bajo tratamiento con el coxib (Fig. 4/FN/19), no apreciándose diferencias entre el efecto de la indometacina y del coxib en ninguno de los puntos de estudio (Fig. 4/FN/18).

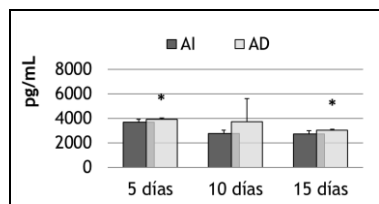


Fig. 4/FN/17. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI) y diclofenaco (AD).

## Resultados: Efecto de Diferentes AINEs Sobre la Funcionalidad de los Condrocitos Humanos en Cultivo

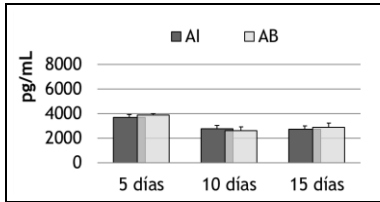


Fig. 4/FN/18. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI) y celecoxib (AB).

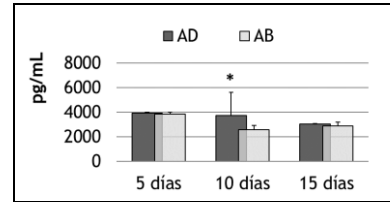


Fig. 4/FN/19. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD) y celecoxib (AB).

### 4.1.3.7.9. Comparación entre fármacos en cultivos sanos

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de fibronectina entre los fármacos diclofenaco e indometacina (Fig. 4/FN/20) o celecoxib (Fig. 4/FN/22) en ninguno de los períodos de estudio, pero sí en el efecto entre indometacina y el coxib, en donde a 10 días se obtuvo una cantidad significativamente mayor bajo tratamiento con indometacina (Fig. 4/FN/21).

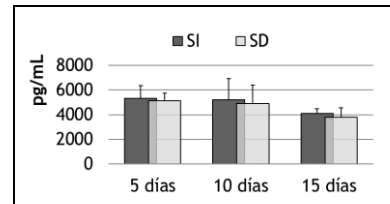


Fig. 4/FN/20. Cultivos sanos. Indometacina (SI) y diclofenaco (SD).

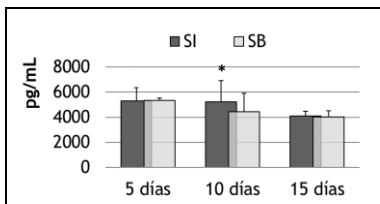


Fig. 4/FN/21. Cultivos sanos. Indometacina (SI) y celecoxib (SB).

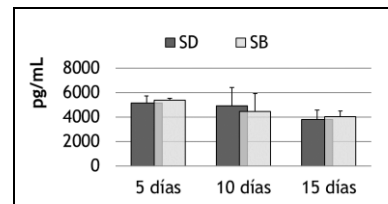


Fig. 4/FN/22. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD) y celecoxib (SB).

#### 4.1.3.7.10. Comparación del efecto de cada tratamiento entre las líneas celulares

El contenido de fibronectina bajo los diferentes fármacos resultó ser significativamente inferior en los cultivos artrósicos a lo largo del estudio, salvo a 15 días bajo tratamiento con diclofenaco, en que no se encontraron diferencias entre líneas (Fig. 4/FN/23-25).

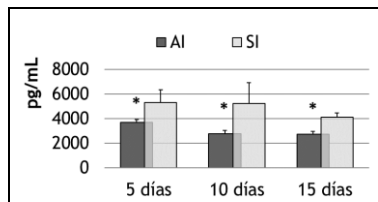


Fig. 4/FN/23. Comparación tratamientos indometacina.

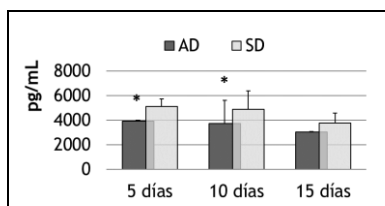


Fig. 4/FN/24. Comparación tratamientos diclofenaco.

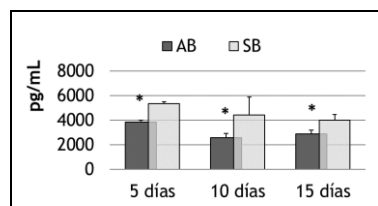


Fig. 4/FN/25. Comparación tratamientos celecoxib.

## 4.2. TÉCNICAS DE IMAGEN

### 4.2.1. Ensayo de cicatrización

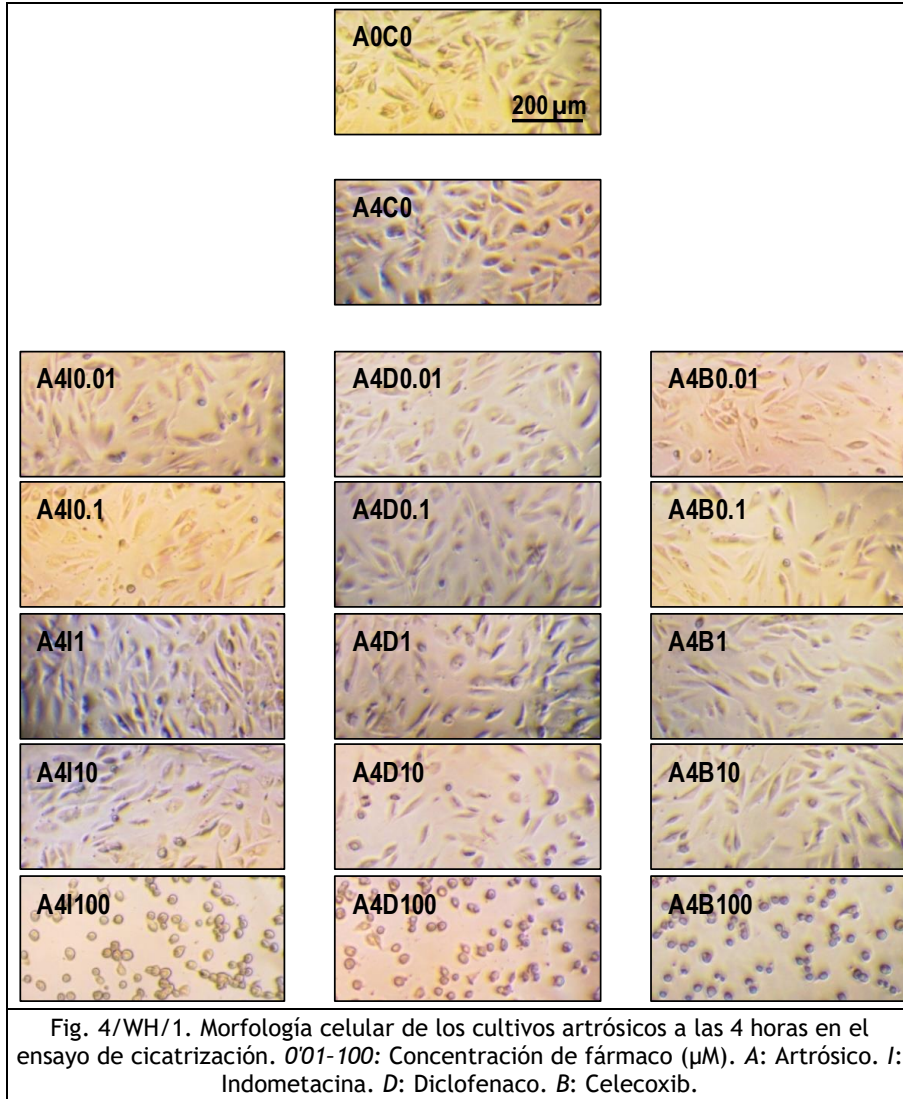
El análisis estadístico reveló las concentraciones a las que se produjeron cambios significativos en los porcentajes de superficie libre frente al control con el aumento de la dosis de fármaco (Tabla 4/3) en ambas líneas celulares.

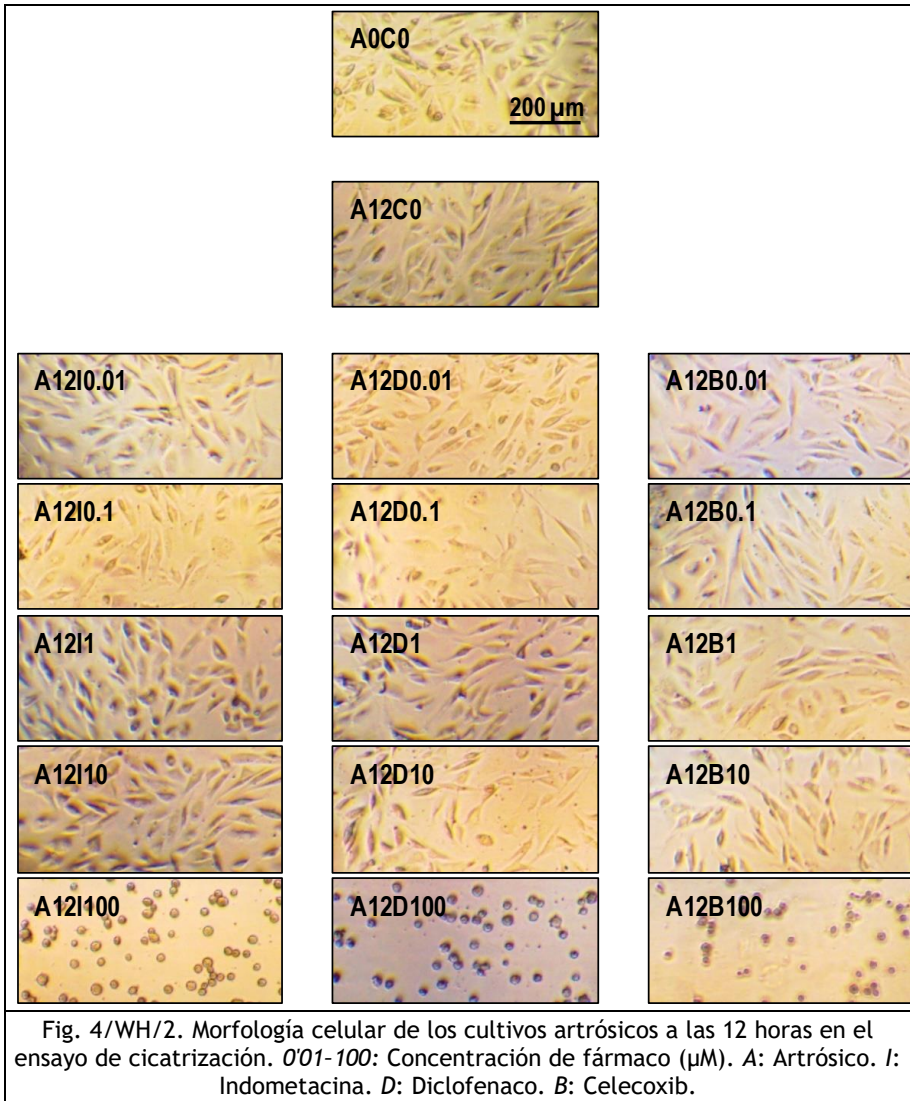
En las imágenes tomadas en todos los cultivos se distinguen claramente alteraciones morfológicas a medida que aumenta la concentración de fármaco (Figs. 4/WH/1-6).

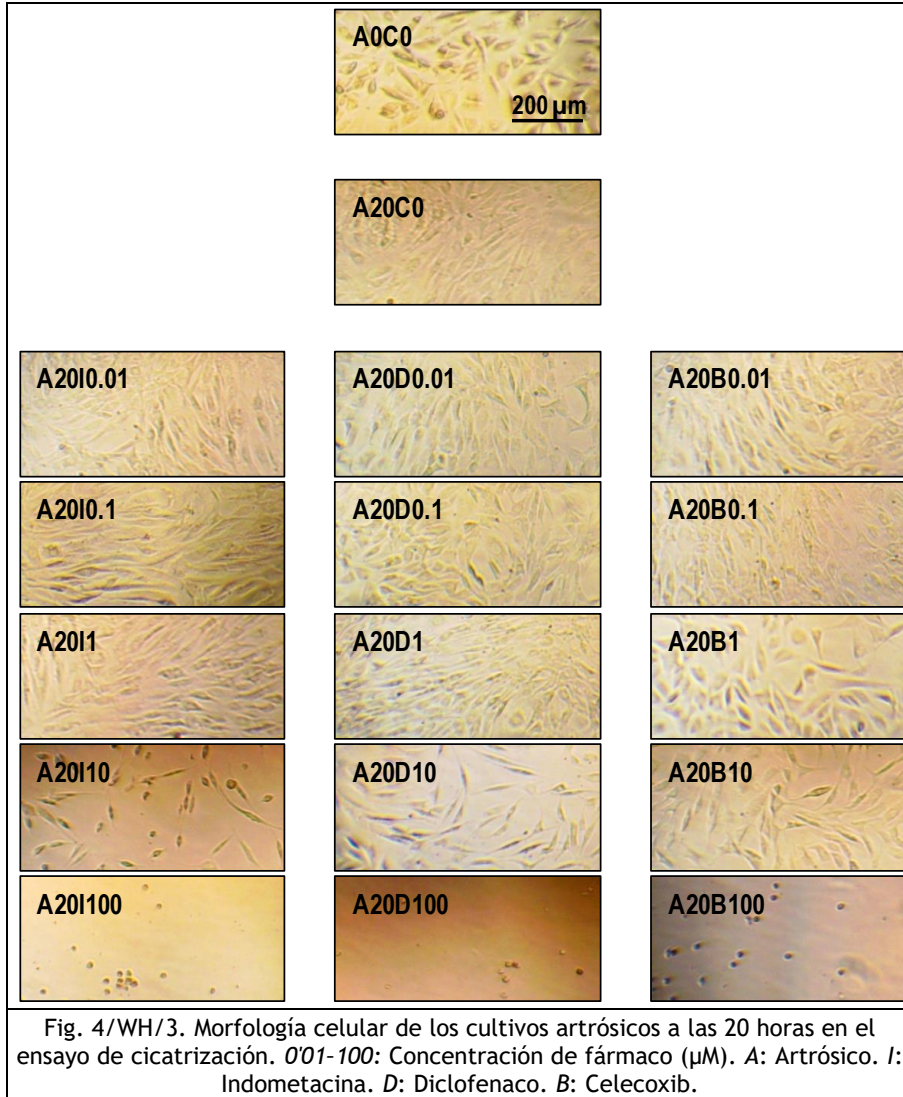
**Tabla 4/3. Concentraciones a las que se observan cambios significativos en la cicatrización de los cultivos respecto al control sin tratamiento.**

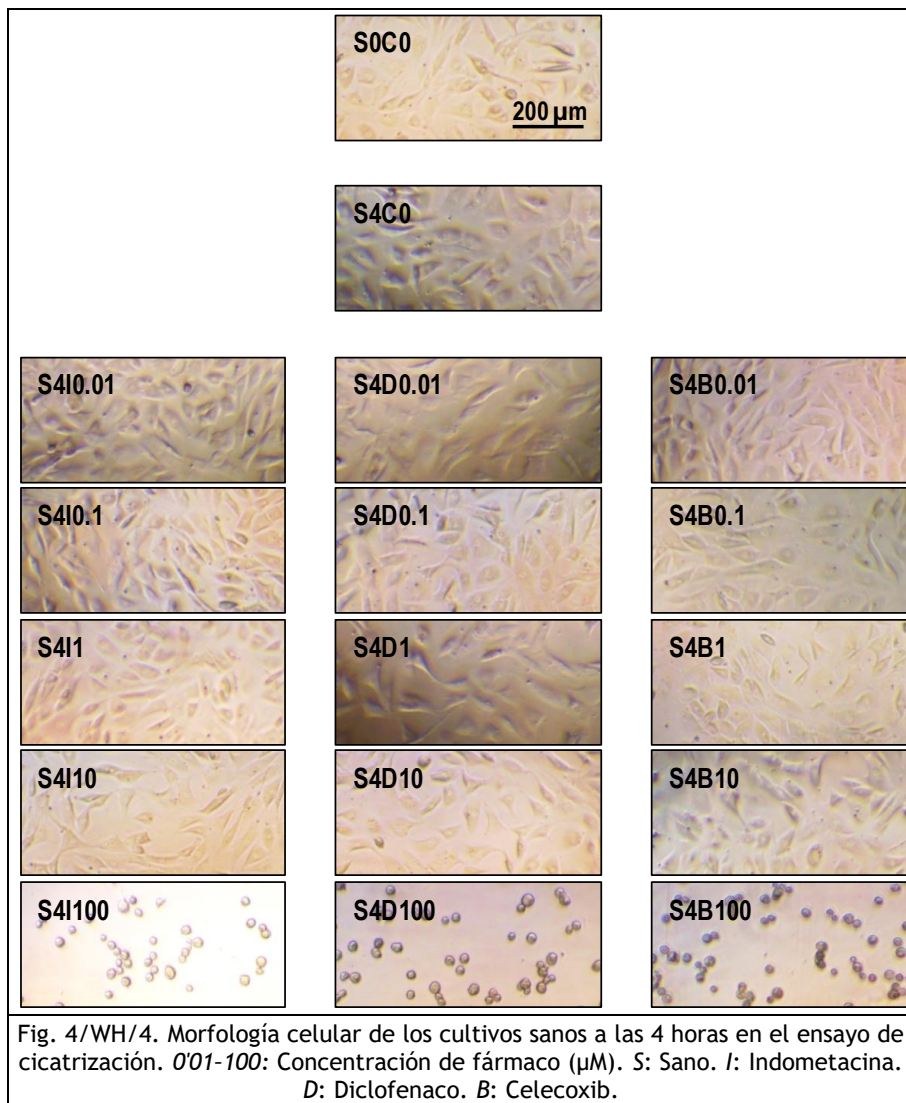
Fármaco	Cultivo	4 horas (control a t <sub>4</sub> )	12 horas (control a t <sub>12</sub> )	20 horas (control a t <sub>20</sub> )
Indometacina	Artrósico	100 µM	100 µM	10 µM
	Sano	(*)	100 µM	100 µM
Diclofenaco	Artrósico	0'1 µM	100 µM	10 µM
	Sano	(*)	100 µM	100 µM
Celecoxib	Artrósico	1 µM	100 µM	0'1 µM
	Sano	(*)	100 µM	100 µM

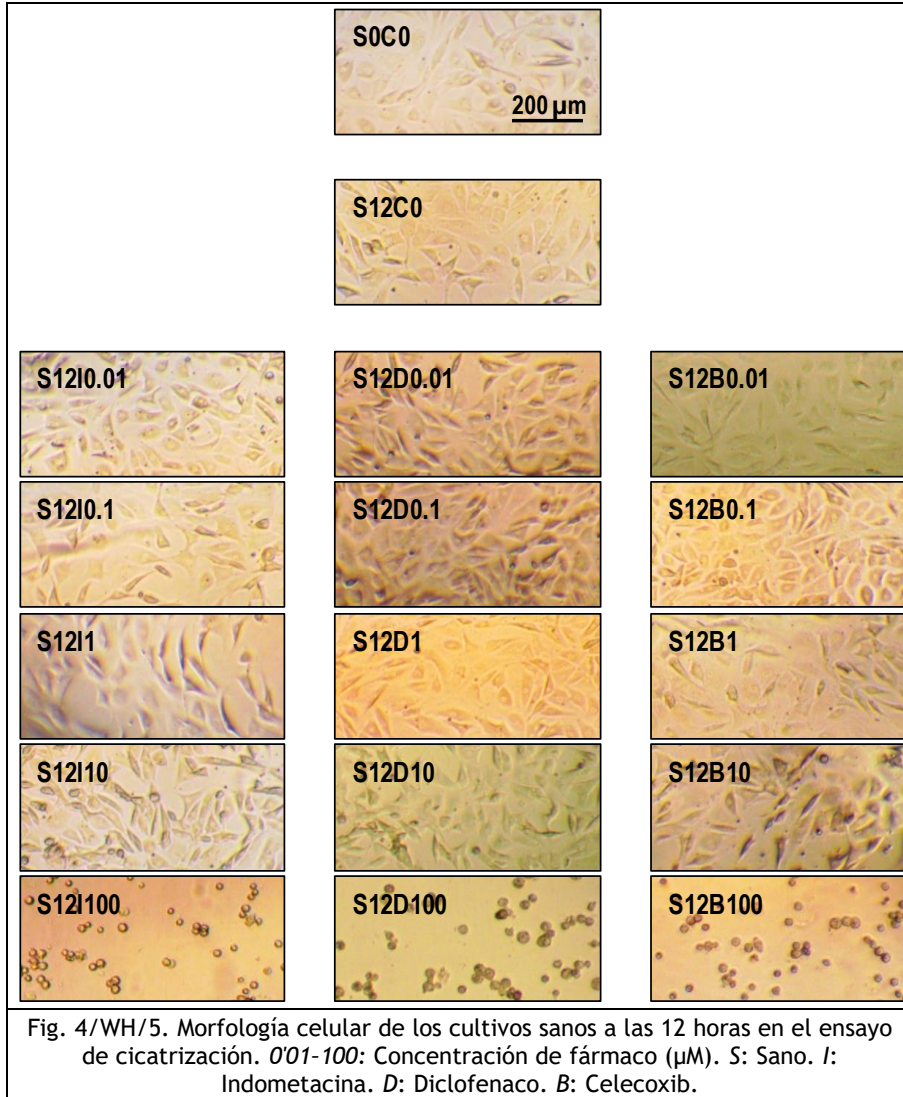
(\*): No existen diferencias significativas en el porcentaje de superficie libre entre el control y las diferentes concentraciones de fármaco.

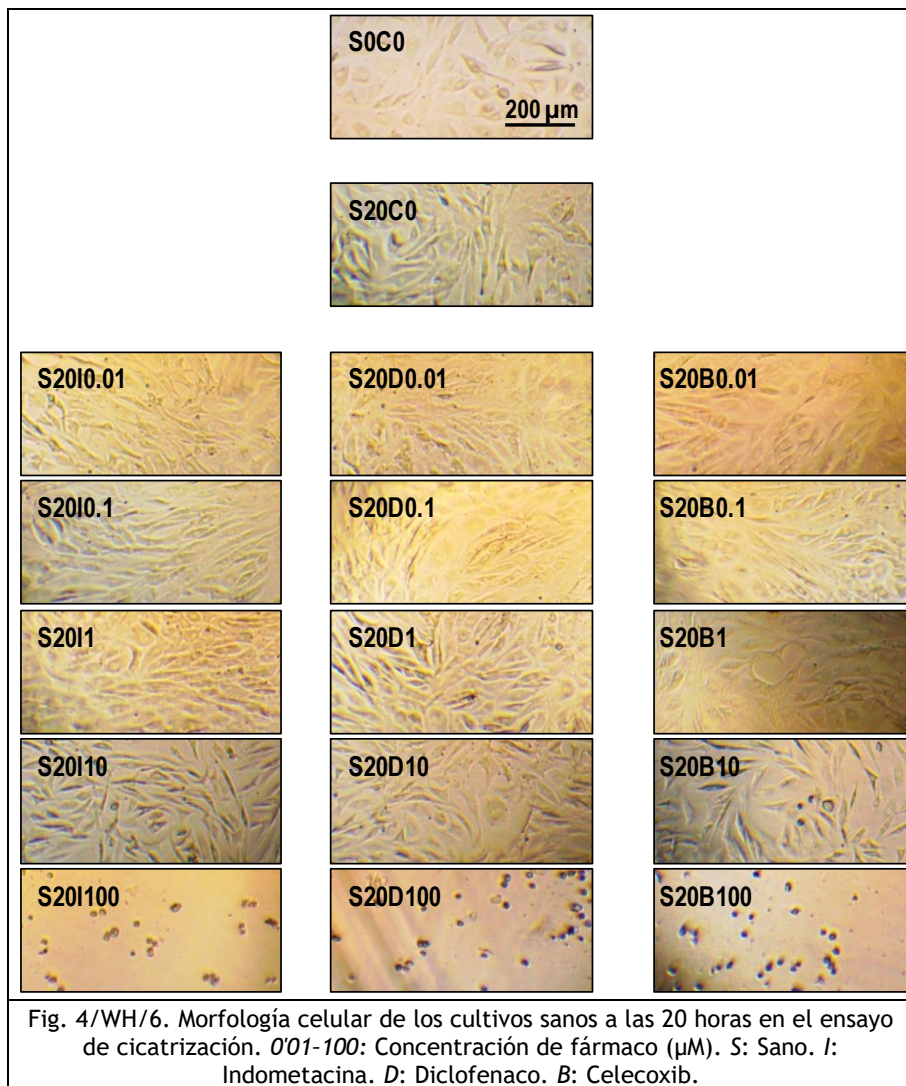












En las gráficas correspondientes a este ensayo (Fig. 4/WH/7) se representan los porcentajes de superficie libre, no colonizada. De estos datos se puede extrapolar la colonización de la herida por los condrocitos en crecimiento y migración.

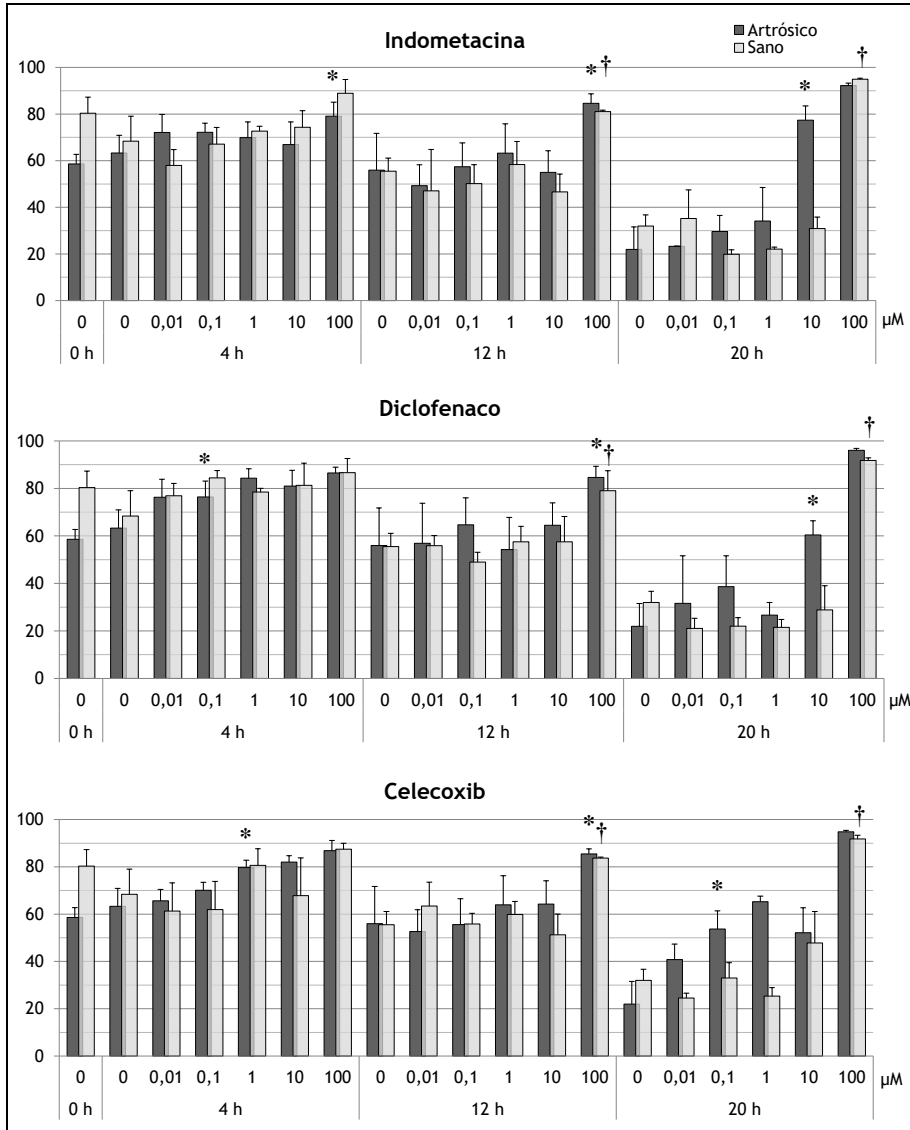


Fig. 4/WH/7. Porcentajes de superficie libre por fármaco en función del tiempo. Concentraciones a las que se observa un cambio significativo en la cicatrización respecto a las 0 horas: \*-cultivos artrósicos; †-cultivos sanos. Datos disponibles en Tabla 4/3.

Los estadísticos descriptivos para el ensayo de cicatrización a las concentraciones se recogen en el *Anexo* con la media, desviación estándar (SD), error estándar de la media (EE) y límites de los intervalos de confianza (IC) al 95% (Tablas 9/25–9/31). En el mismo 9. *Apéndice* se puede encontrar un esquema de las significaciones de las pruebas colorimétricas (Tablas 9/32–9/41).

A continuación, se recoge el análisis de los resultados para las concentraciones 0–1  $\mu\text{M}$  (Figs. 4/WH/8–29).

#### 4.2.1.1. Comparación entre controles

Al inicio del experimento ( $t_0$ ) la superficie libre fue significativamente menor en los controles artrósicos, sin detectarse diferencias entre ambos controles en los demás puntos de toma de imágenes (Fig. 4/WH/8a). Por separado, en ambos controles sano y artrósico, la colonización fue significativamente superior a las 20 horas ( $t_{20}$ ) frente a todos los anteriores tiempos de control (Figs. 4/WH/8b-c). Este aumento significativo ocurrió antes en los controles sanos (Fig. 4/WH/8c) que en los artrósicos, observándose a las 12 horas ( $t_{12}$ ) a partir de la lesión.

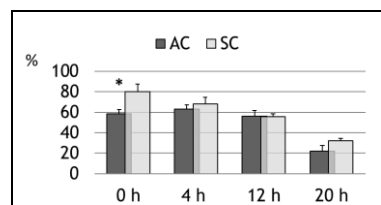


Fig. 4/WH/8a. Cultivos control artrósico (AC) y sano (SC).

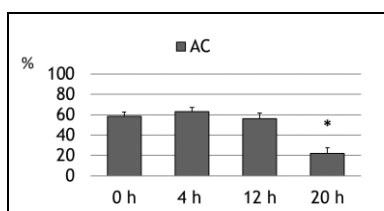


Fig. 4/WH/8b. Cultivos control artrósico (AC).

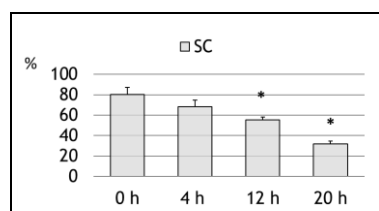


Fig. 4/WH/8c. Cultivos control sano (SC).

#### 4.2.1.2. Indometacina en cultivos artrósicos

En las primeras horas ( $t_4$ ) bajo tratamiento con indometacina se observó un aumento significativo en la superficie libre. La colonización

prosiguió hasta que en  $t_{20}$  se detectó una pérdida significativa en la superficie libre respecto al tiempo inicial  $t_0$ , lo que se corresponde con un aumento en la colonización del espacio disponible (Fig. 4/WH/9).

Con un  $\alpha=0.05$ , no se establecieron diferencias entre los puntos de toma de imágenes del control y el tratamiento con indometacina (Fig. 4/WH/10). Tampoco se encontraron diferencias a  $t_4$ ,  $t_{12}$  o  $t_{20}$  entre el tratamiento y el control sano (Fig. 4/WH/11).

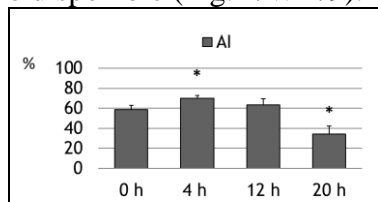


Fig. 4/WH/9. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI).

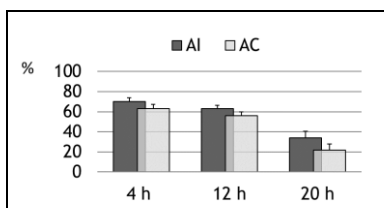


Fig. 4/WH/10. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI) y control (AC).

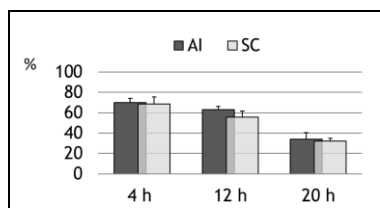


Fig. 4/WH/11. Indometacina en cultivos artrósicos (AI) y control sano (SC).

#### 4.2.1.3. Indometacina en cultivos sanos

A  $t_{12}$  se observó una pérdida significativa de superficie libre respecto a  $t_0$ . A  $t_{20}$ , esta pérdida fue significativa frente a todas las concentraciones anteriores, alcanzándose un alto grado de colonización celular (Fig. 4/WH/12). No se encontraron diferencias significativas entre el control y el tratamiento con indometacina (Fig. 4/WH/13).

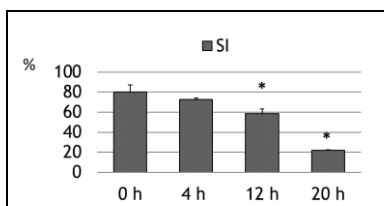


Fig. 4/WH/12 Cultivos sanos. Indometacina (SI).

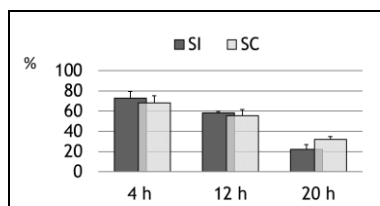


Fig. 4/WH/13. Cultivos sanos. Indometacina (SI), control (SC).

#### 4.2.1.4. Diclofenaco en cultivos artrósicos

Bajo tratamiento con diclofenaco, también se detectó a  $t_4$  un aumento de superficie libre, recuperado significativamente a  $t_{12}$ . Sin embargo, a  $t_{20}$  la pérdida de espacio libre fue significativamente superior a los períodos anteriores (Fig. 4/WH/14). En la comparación con el control artrósico, el porcentaje de superficie libre calculado fue significativamente mayor a  $t_4$  bajo el tratamiento con el fármaco (Fig. 4/WH/15). No se encontraron diferencias a  $t_4$ ,  $t_{12}$  y  $t_{20}$  entre el tratamiento y el control sano (Fig. 4/WH/16).

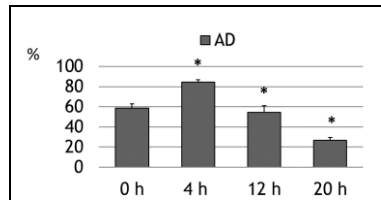


Fig. 4/WH/14. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD).

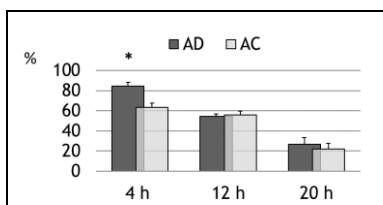


Fig. 4/WH/15. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD) y control (AC).

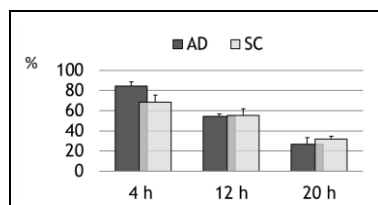


Fig. 4/WH/16. Diclofenaco en cultivos artrósicos (AD) y control sano (SC).

#### 4.2.1.5. Diclofenaco en cultivos sanos

Se aprecia una pérdida significativa de superficie libre frente a los períodos anteriores tanto a  $t_{12}$  como a  $t_{20}$  (Fig. 4/WH/17), sin encontrarse diferencias significativas entre el tratamiento y su control en ninguno de los tiempos estudiados (Fig. 4/WH/18).

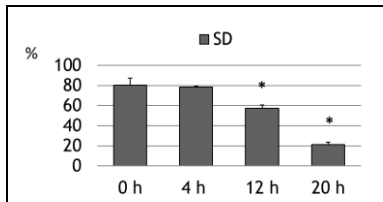


Fig. 4/WH/17. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD).

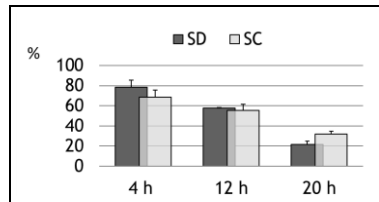


Fig. 4/WH/18. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD) y control (SC).

#### 4.2.1.6. Celecoxib en cultivos artrósicos

El tratamiento con celecoxib también provocó un aumento significativo en el porcentaje de superficie libre a  $t_4$ . Con un  $\alpha=0'05$  se vio que a  $t_{20}$  este porcentaje era significativamente menor que a  $t_4$ , pero no se observaron diferencias a los obtenidos a  $t_0$  y  $t_{12}$  (Fig. 4/WH/19).

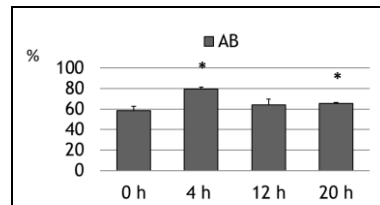


Fig. 4/WH/19. Cultivos artrósicos. Celecoxib (AB).

Respecto al control artrósico, el porcentaje de superficie libre a  $t_4$  y  $t_{20}$  fue significativamente menor (Fig. 4/WH/20); respecto al control sano, esta merma solo lo fue a  $t_{20}$  (Fig. 4/WH/21).

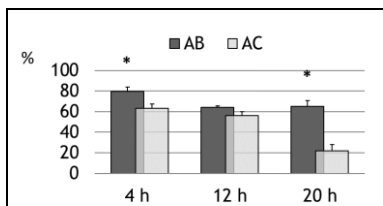


Fig. 4/WH/20. Cultivos artrósicos. Celecoxib (AB) y control (AC).

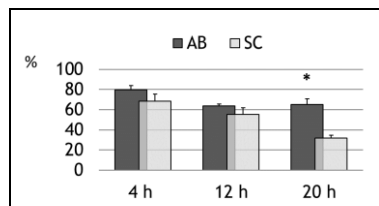


Fig. 4/WH/21. Celecoxib en cultivos artrósicos (AB) y control sano (SC).

#### 4.2.1.7. Celecoxib en cultivos sanos

Vimos una pérdida significativa de superficie libre frente a los períodos anteriores tanto a  $t_{12}$  como a  $t_{20}$  (Fig. 4/WH/22). No se encontraron diferencias con el control (Fig. 4/WH/23).

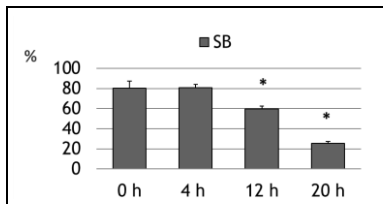


Fig. 4/WH/22. Cultivos sanos. Celecoxib (SB).

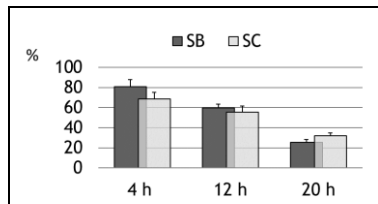


Fig. 4/WH/23. Cultivos sanos. Celecoxib (SB) y control (SC).

#### 4.2.1.8. Comparación entre fármacos en cultivos artrósicos

El porcentaje de superficie libre bajo tratamiento con indometacina fue significativamente inferior a  $t_4$  frente a los otros dos fármacos (Figs. 4/WH/24-25). Al comparar los tratamientos con diclofenaco y celecoxib, se encontraron diferencias significativas a  $t_{20}$ , existiendo un menor porcentaje de superficie libre, es decir, una mayor colonización, bajo el tratamiento con diclofenaco (Fig. 4/WH/26).

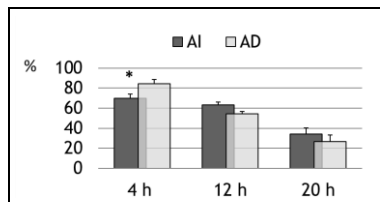


Fig. 4/WH/24. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI) y diclofenaco (AD).

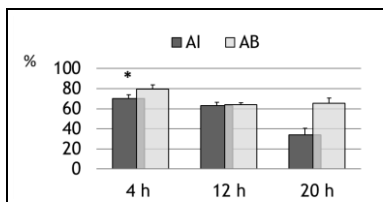


Fig. 4/WH/25. Cultivos artrósicos. Indometacina (AI) y celecoxib (AB).

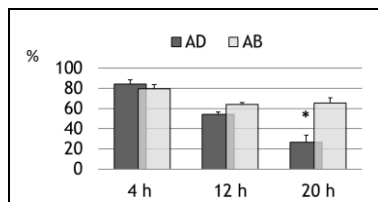


Fig. 4/WH/26. Cultivos artrósicos. Diclofenaco (AD) y celecoxib (AB).

#### 4.2.1.9. Comparación entre fármacos en cultivos sanos

Se observó que los tres fármacos ejercieron un efecto similar en el cierre de la herida (Figs. 4/WH/27-29), salvo a t<sub>4</sub> en que el tratamiento con indometacina disminuyó de forma significativa el porcentaje de superficie libre respecto al tratamiento con diclofenaco (Fig. 4/WH/27).

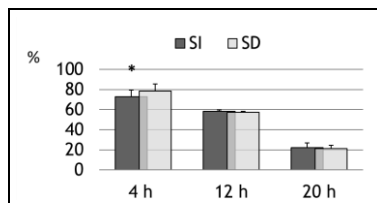


Fig. 4/WH/27. Cultivos sanos. Indometacina (SI), diclofenaco (SD).

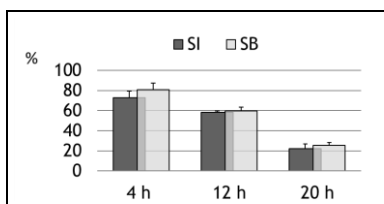


Fig. 4/WH/28. Cultivos sanos. Indometacina (SI), celecoxib (SB).

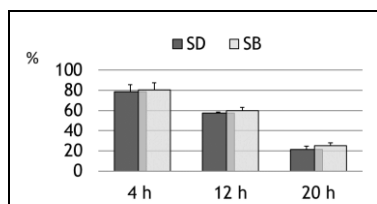


Fig. 4/WH/29. Cultivos sanos. Diclofenaco (SD), celecoxib (SB).

#### 4.2.1.10. Comparación del efecto de cada tratamiento entre las líneas celulares

No se computaron diferencias significativas bajo los tratamientos con indometacina (Fig. 4/WH/30) o diclofenaco (Fig. 4/WH/31) entre cultivos sanos y artrósicos.

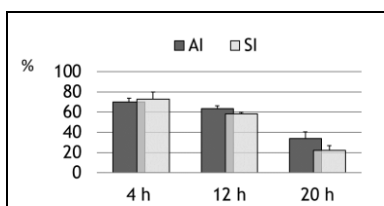


Fig. 4/WH/30. Comparación tratamientos indometacina.

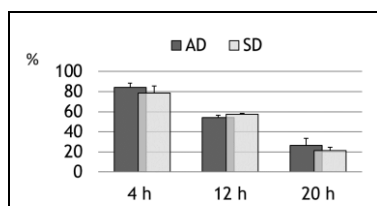


Fig. 4/WH/31. Comparación tratamientos diclofenaco.

Bajo tratamiento con celecoxib, el porcentaje de superficie libre fue significativamente superior a  $t_{20}$  en los cultivos artrósicos, cuantificándose una mayor colonización del espacio en los cultivos sanos (Fig. 4/WH/32).

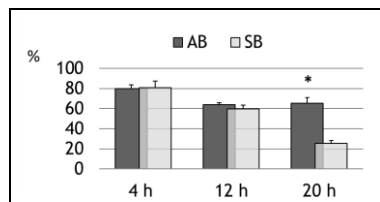


Fig. 4/WH/32. Comparación tratamientos celecoxib.

#### 4.2.2. Viabilidad por microscopía confocal

De las imágenes adquiridas a través de microscopía confocal se extraen indirectamente dos tipos de resultados: viabilidad y morfología celular, resultados que tienen que ser interpretados en conjunto con las demás pruebas cuantitativas.

En los grupos de imágenes (Fig. 4/MC/1–6) se representan las imágenes tomadas para este apartado, pudiéndose apreciar ambos parámetros entre las dos líneas, sana y artrósica, para los grupos control sin tratamiento y cultivos a 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$  de concentración de fármaco.

El número de células no viables, permeables a IP, fue ocasional en cualquiera de las imágenes, percibiéndose que la densidad celular fue mucho menor bajo tratamiento con celecoxib a 100  $\mu\text{M}$ , en cualquiera de los cultivos sanos o artrósicos.

Visualmente no se apreciaron diferencias entre los cultivos control y la concentración de fármaco a 1  $\mu\text{M}$ , pero se sí se observó que a altas concentraciones los cultivos muestran características de un fenotipo desdiferenciado, incluyendo células con morfología fibroblástica.

#### 4.2.2.1. Tratamientos con indometacina

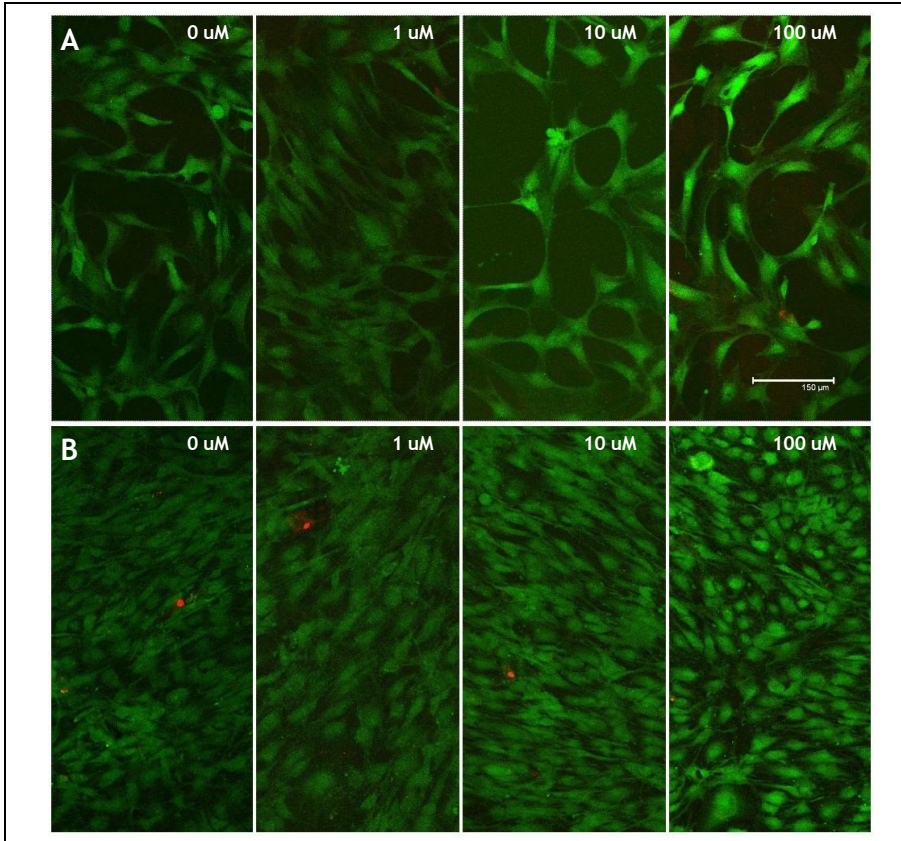


Fig. 4/MC/1. Efecto de las diferentes concentraciones de indometacina en cultivos artrósicos. A: 5 días. B: 15 días. Escala: 150 µm.

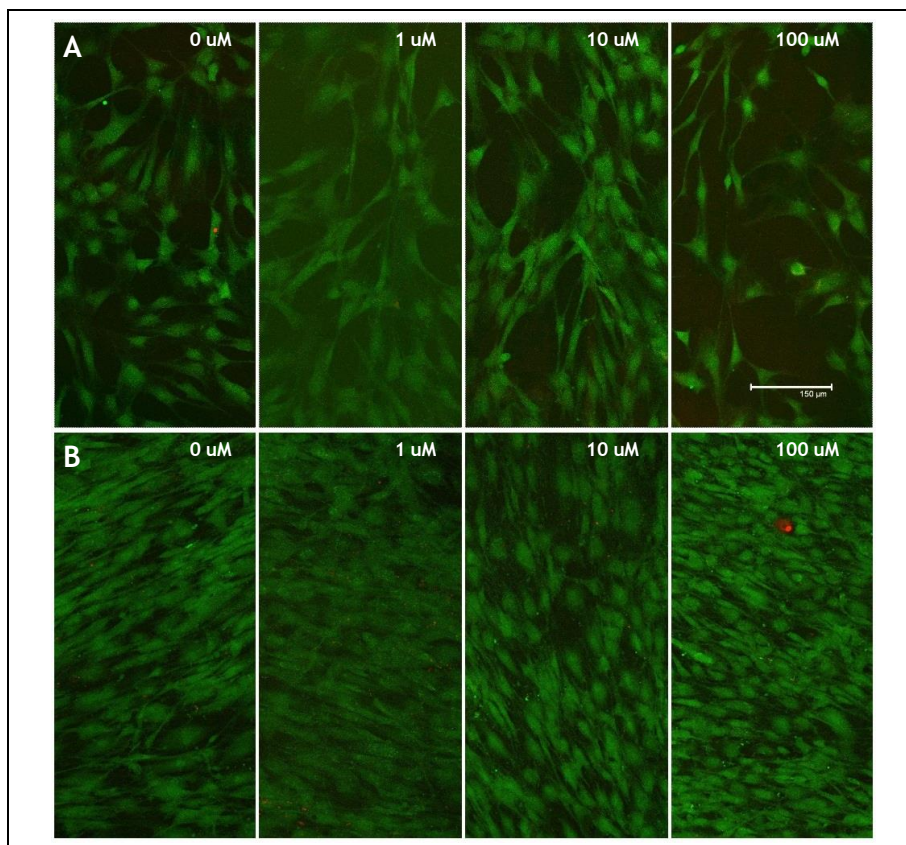


Fig. 4/MC/2. Efecto de las diferentes concentraciones de indometacina en cultivos sanos. A: 5 días. B: 15 días. Escala: 150 μm.

#### 4.2.2.2. Tratamientos con diclofenaco

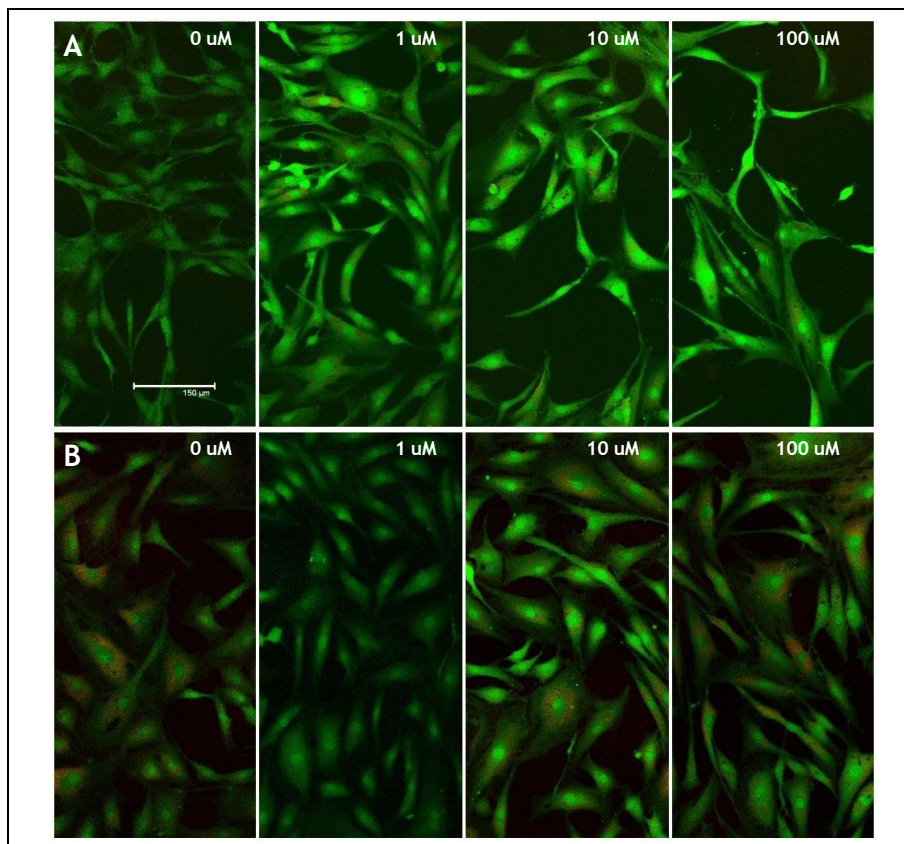


Fig. 4/MC/3. Efecto de las diferentes concentraciones de diclofenaco en cultivos artrósicos. A: 5 días. B: 15 días. Escala: 150 µm.

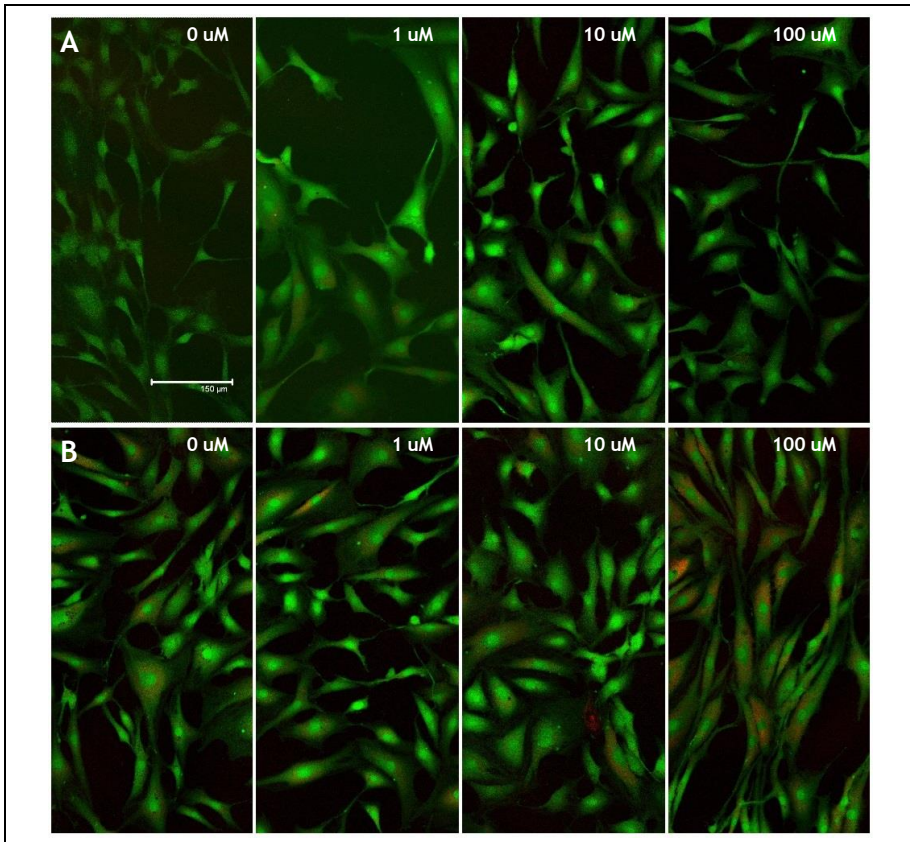


Fig. 4/MC/4. Efecto de las diferentes concentraciones de diclofenaco en cultivos sanos. A: 5 días. B. 15 días. Escala: 150 µm.

#### 4.2.2.3. Tratamientos con celecoxib

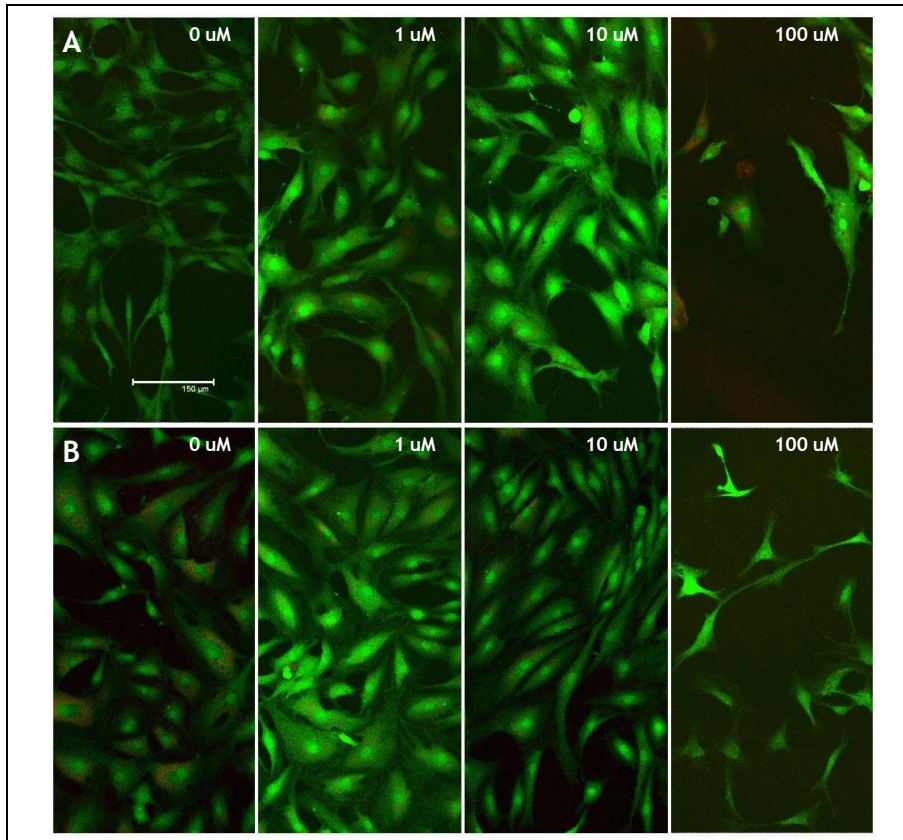


Fig. 4/MC/5. Efecto de las diferentes concentraciones de celecoxib en cultivos artrósicos. A: 5 días. B: 15 días. Escala: 150 µm.

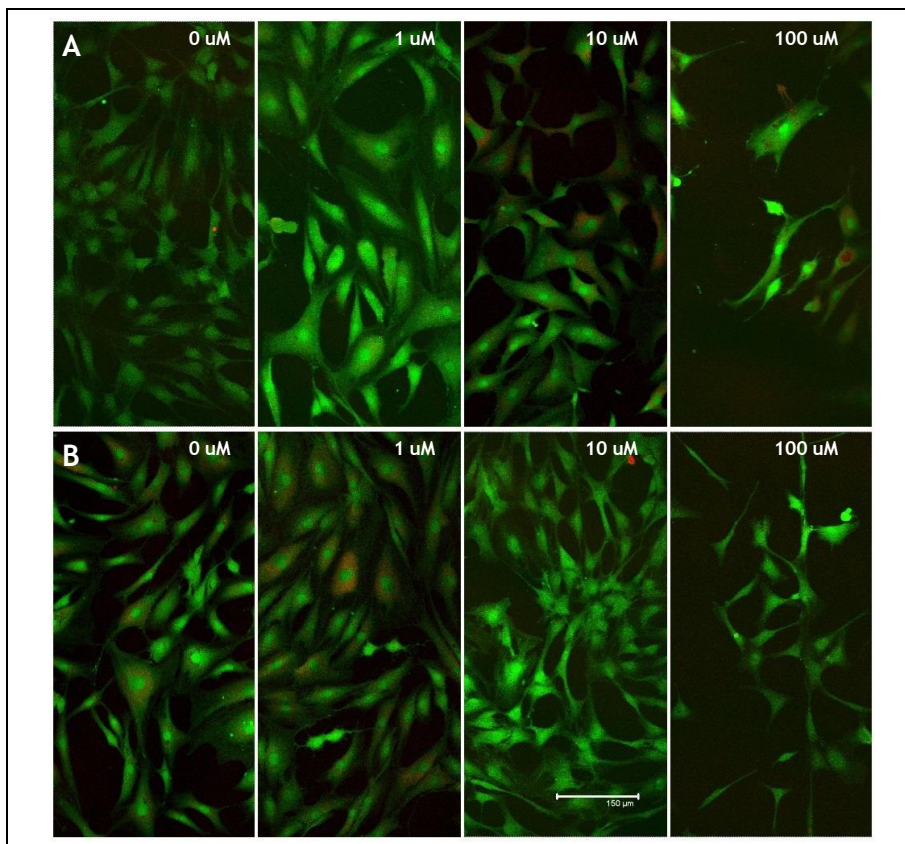


Fig. 4/MC/6. Efecto de las diferentes concentraciones de celecoxib en cultivos sanos. A: 5 días. B. 15 días. Escala: 150  $\mu$ m.

### 4.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR QPCR

En las figuras a continuación (Fig. 4/RQ/1-6) se representan los valores de  $\text{Log}_2\text{RQ}$  obtenidos con el programa *DataAssist* v3.01 para las muestras sanas (S) y artrósicas (A), a concentraciones control (C) sin tratamiento, y a  $1 \mu\text{M}$  de los fármacos indometacina (I), diclofenaco (D), y celecoxib (B), antes del tratamiento ( $t_0$ ) y al finalizar el período de 15 días ( $t_{15}$ ).

#### 4.3.1. *PGST-2*

Tomando como referencia la expresión del gen *PGST-2* en los cultivos control sanos a tiempo 0 (SC0), solamente las muestras control artrósicas sobreexpresaron el gen de COX-2, poniendo de manifiesto el componente inflamatorio. Todos los tratamientos, en ambas líneas, consiguieron reducir la expresión del gen por debajo de los niveles basales de sus respectivos controles (Fig. 4/RQ/1). A los 15 días se pudo observar una leve infraexpresión en ambos controles sano y artrósico.

El tratamiento farmacológico a la concentración de  $1 \mu\text{M}$  provocó en todos los casos la subexpresión del gen, verificándose un mayor efecto en las muestras artrósicas y acotándose este en un rango estrecho. En las sanas, el fármaco que provocó una mayor subexpresión del gen fue el celecoxib.

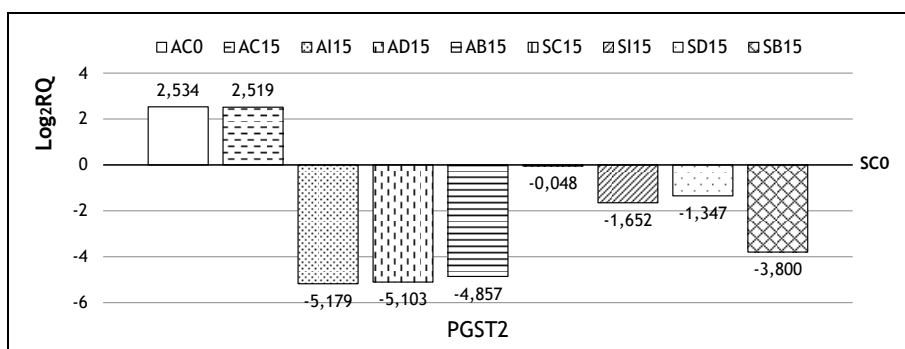


Fig. 4/RQ/1. Valores  $\text{Log}_2\text{RQ}$  para la expresión de COX-2, con referencia al control sano a  $t_0$  (SC0). A: Artrósico; S: Sano; C: Control; I: Indometacina; D: Diclofenaco; B: Celecoxib; 15: Días.

### 4.3.2. COL2A1

No se detectó amplificación del gen de colágeno tipo II en ninguna de las muestras artrósicas.

En las muestras sanas, su expresión disminuyó con el tiempo y respecto al tratamiento farmacológico, ninguno de los fármacos mejoró las condiciones basales, siendo el diclofenaco y el celecoxib los fármacos que más infraregularon el gen (Fig. 4/RQ/2).

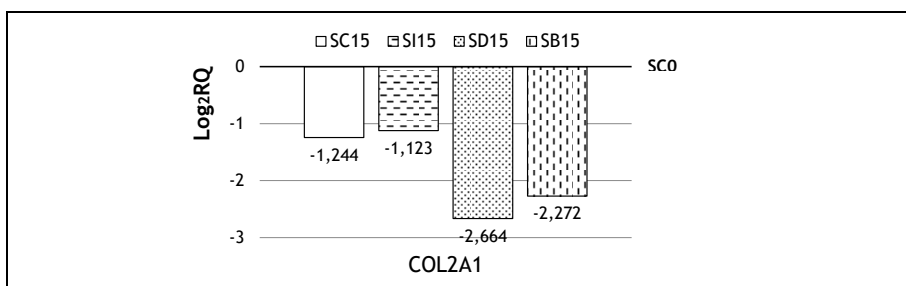


Fig. 4/RQ/2. Valores Log<sub>2</sub>RQ para la expresión de colágeno tipo II, con referencia al control sano a t<sub>0</sub>. (SC0). S: Sano; C: Control; I: Indometacina; D: Diclofenaco; B: Celecoxib; 15: Días.

### 4.3.3. COL10A1

No se detectó amplificación del gen de colágeno tipo X en ninguna de las muestras sanas.

En las muestras artrósicas, la expresión del colágeno tipo X aumentó con el tiempo y el tratamiento farmacológico apenas provocó una leve subexpresión del gen con respecto a los niveles basales a t<sub>15</sub> (Fig. 4/RQ/3).

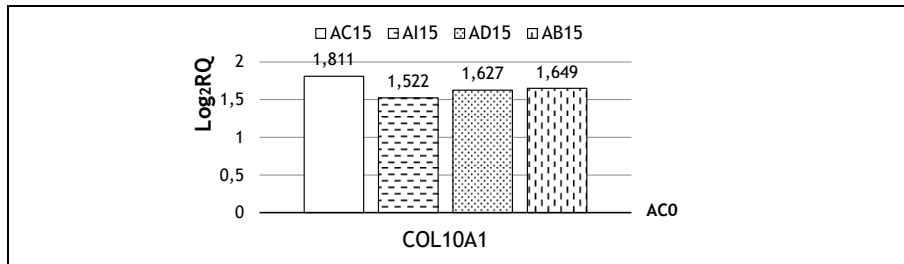


Fig. 4/RQ/3 Valores Log<sub>2</sub>RQ para la expresión de colágeno tipo X, con referencia al control artrósico a t<sub>0</sub>. (AC0). A: Artrósico; C: Control; I: Indometacina; D: Diclofenaco; B: Celecoxib; 15: Días.

#### 4.3.4. MATN1

El gen de matrilina-1 solamente fue expresado en las muestras artrósicas control a t<sub>15</sub> y cultivos artrósicos bajo tratamientos con indometacina y celecoxib. Ambos fármacos infraregularon la expresión del gen respecto al control a 15 días sin tratamiento (Fig. 4/RQ/4).

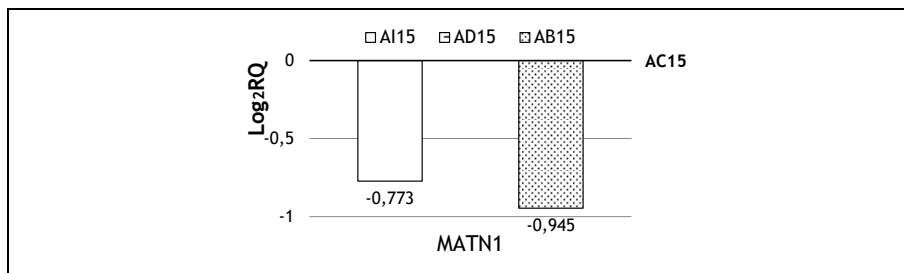


Fig. 4/RQ/4. Valores Log<sub>2</sub>RQ para la expresión de matrilina-1, con referencia al control artrósico a t<sub>15</sub>. (AC15). A: Artrósico; C: Control; I: Indometacina; D: Diclofenaco; B: Celecoxib; 15: Días.

#### 4.3.5. MATN3

La matrilina-3 se sobreexpresó únicamente en el control artrósico a los 15 días de cultivo. El tratamiento farmacológico produjo una disminución de la expresión del gen, mayor en los cultivos artrósicos (Fig. 4/RQ/5).

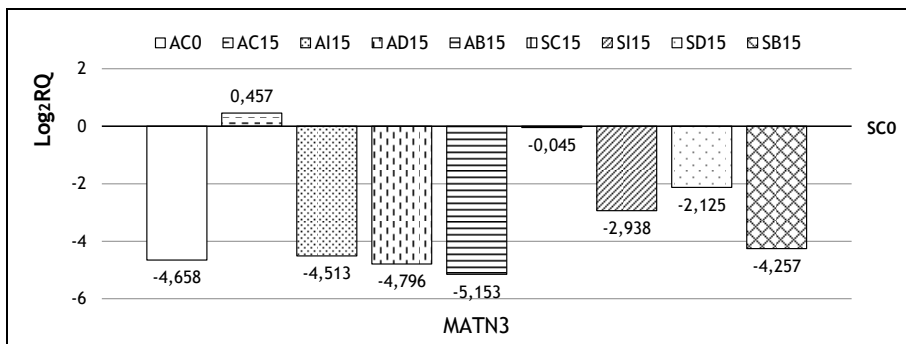


Fig. 4/RQ/5. Valores Log<sub>2</sub>RQ para la expresión de matrilina-3, con referencia al control sano a t<sub>0</sub>. (SC0). A: Artrósico; S: Sano; C: Control; I: Indometacina; D: Diclofenaco; B: Celecoxib; 5, 10, 15: Días.

#### 4.3.6. ACAN

El agrecano se subexpresó en todas las muestras analizadas respecto al control sano a t<sub>0</sub>. En las muestras artrósicas se observó un aumento de su expresión a t<sub>15</sub> respecto a sus niveles basales, aunque los tratamientos, en ambas líneas y con un mayor efecto sobre los cultivos artrósicos, causaron una mayor subexpresión del gen (Fig. 4/RQ/6).

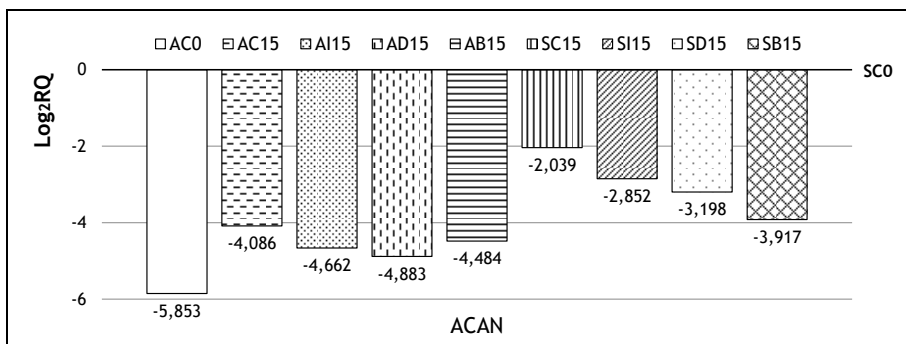


Fig. 4/RQ/6. Valores Log<sub>2</sub>RQ para la expresión de agrecano, con referencia al control sano a t<sub>0</sub>. (SC0). A: Artrósico; S: Sano; C: Control; I: Indometacina; D: Diclofenaco; B: Celecoxib; 15: Días.



## *5. DISCUSIÓN*



## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. EFECTO DE LOS FÁRMACOS

La desregularización de los procesos normales de los condrocitos va a provocar la desorganización de la matriz extracelular, desembocando en la pérdida progresiva de cartílago articular, que a nivel fisiológico se traduce en dolor, edema, inflamación y merma gradual de la movilidad de la articulación afectada.

La bibliografía existente en modelo humano, tanto en cultivo *in vitro* como en ensayo clínico, no permite establecer un marco de referencia para cada fármaco a dosis y tiempo de análisis concretos en el líquido sinovial en pacientes humanos, haciendo difícil predecir el rendimiento del fármaco en este fluido. En general, se ha establecido que las concentraciones terapéuticas de los AINEs no selectivos y de los inhibidores selectivos de COX-2 son respectivamente 10 y 1  $\mu\text{M}$  (53). En la literatura consultada se analizan los valores de fármaco en plasma o suero, pero la concentración de fármaco presente en estos fluidos no es la que se alcanza en el líquido sinovial. Al bañar el interior de la articulación, este es el fluido que entra en contacto con el cartílago y estructuras anejas, de ahí la importancia de escoger unas concentraciones de fármaco que sean representativas de las que aparecen en este líquido. La concentración de 1  $\mu\text{M}$  establecida para los tres fármacos pretende armonizar esta cuestión en el marco de este estudio según las referencias encontradas (Tabla 3/2).

El uso de AINEs no selectivos puede tener efectos deletéreos sobre el cartílago y que el uso de inhibidores selectivos de COX-2 podría tener efectos beneficiosos, aunque algunos resultados obtenidos tras el tratamiento con celecoxib puedan sugerir lo contrario (72).

Las discrepancias entre estudios preclínicos —en cultivos celulares y modelos animales— y ensayos clínicos pueden ser debidas a distintos factores que afectan a la articulación *in vivo* (254). En todo caso, se ha planteado que la progresión de la patología debida al uso de analgesia

tenga su origen en el incremento de la actividad física al disminuir el dolor en las zonas afectadas (93).

Existe un cierto consenso acerca del efecto global que producen los fármacos sobre la articulación y sobre la evolución de la patología. Se ha descrito que el tratamiento con indometacina provoca un efecto deletéreo, al inhibir significativamente el anabolismo de los condrocitos tanto en el cartílago sano como en el artrósico (71) en ambos modelos animal (101, 208) y humano (71-72, 75, 134, 219), provocando el aumento de la pérdida del espacio articular y aceleración de la artrosis. El efecto del diclofenaco sobre la articulación animal o humana parece ser controvertido. Por un lado, el tratamiento con este fármaco tendría un efecto negativo al provocar la pérdida del espacio articular y potenciar la artrosis tanto en las articulaciones afectadas como en las sanas (72, 101, 220), o nulo (71). Por otra parte, en modelo animal se habría conseguido mejorar los síntomas de la artrosis, pero sin llegar a una completa normalidad (176). El fármaco cuyo tratamiento genera los resultados más controvertidos es el celecoxib. Este parece provocar un efecto condroprotector, mejorando los parámetros artrósicos *in vitro* (72, 181, 295) y *ex vivo* (65), y describiéndose una reducción en los cambios histológicos y mejora en la eficiencia en el aparato locomotor en ensayos en paciente y en modelo animal (68, 207, 258). A pesar de estos resultados existen otros estudios en los que no se encuentran efectos claros sobre la artrosis *in vivo*, otorgando al tratamiento un efecto deletéreo o neutro, postulándose que el efecto positivo en los cultivos pueda verse contrarrestado por un aumento en la carga sobre la articulación debido a la analgesia, provocando con ello el agravamiento de la patología (64, 93, 183, 208).

## 5.2. PROLIFERACIÓN

Existe abundante literatura que describe el efecto antiproliferativo de indometacina, diclofenaco y celecoxib sobre cultivos de células tumorales, aunque las concentraciones utilizadas en estos ensayos resultan ser muy superiores a las terapéuticas descritas en los fluidos humanos (23-24, 132, 160, 164, 171, 210, 235, 251, 283, 288-289).

En la bibliografía se describe una actividad antiproliferativa pareja

entre los tres fármacos (53), estudiada a concentraciones a partir de 0'01  $\mu\text{M}$  en condrocitos sanos de origen animal. Esta información se corresponde con lo observado en nuestros cultivos sanos, donde los tres fármacos ejercieron un efecto deletéreo significativo sobre la capacidad proliferativa de los condrocitos. En los cultivos artrósicos los tratamientos con indometacina y diclofenaco ejercieron un efecto neutro pero el tratamiento con celecoxib provocó una merma significativa en la proliferación en los tres puntos de estudio.

En nuestros cultivos se evidenció que el tratamiento a 1  $\mu\text{M}$  no mejoró la capacidad proliferativa de las células llegando a provocar la merma del contenido celular, particularmente con celecoxib desde concentraciones inferiores a indometacina o diclofenaco.

### **5.3. APOPTOSIS, CASPASA-9 Y TRAIL**

Está asumido que la artrosis y la apoptosis están relacionadas; los condrocitos sometidos a la acción de  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$  tienen una mayor predisposición a un rápido envejecimiento y apoptosis, y está constatado que el número de condrocitos apoptóticos es mayor en el cartílago artrósico que en el cartílago sano, correlacionándose el número de células apoptóticas con la severidad de la lesión (31, 122, 163, 184, 194, 202, 284). No existe un consenso acerca de si la pérdida celular es la causa o la consecuencia de la degradación de la matriz (142).

En la literatura abundan referencias en las que se describe la capacidad apoptótica de los tres fármacos estudiados en diferentes tipos celulares tumorales (15, 52, 92, 132) y no tumorales (114), indicando que suprimen la proliferación e inducen la apoptosis alterando incluso el desarrollo del ciclo celular (24, 37, 265), aunque en estos estudios las concentraciones ensayadas también exceden con mucho las presentes en el líquido sinovial. En condrocitos sanos de origen animal, los tratamientos con indometacina y diclofenaco provocaron la supresión de la proliferación y de la muerte celular (53) en concentraciones de entre 0'01 y 100  $\mu\text{M}$ . En el mismo estudio, los efectos citotóxicos asociados al tratamiento con celecoxib se apreciaron a 100  $\mu\text{M}$ , una concentración muy superior a la terapéutica descrita para los

inhibidores selectivos de COX-2. En explantes de cartílago humano sano (141), el tratamiento con indometacina a 1  $\mu\text{M}$  provocó la reducción a la mitad del número de condrocitos apoptóticos y a un cuarto a 10  $\mu\text{M}$ , mientras que el celecoxib ejerció un efecto máximo a 0'1  $\mu\text{M}$ , sin diferencias significativas entre las demás dosis estudiadas.

Contradiendo a la literatura antes mencionada, también se ha descrito un efecto neutro —en línea con nuestros resultados— o inductor de la apoptosis con estos fármacos.

En modelo animal se demostró que el tratamiento con indometacina promovía la apoptosis de los condrocitos artrósicos (207), pero en cultivos celulares sanos de origen humano con el fármaco a la concentración de 100  $\mu\text{M}$  —muy superior a la terapéutica— no se detectaron diferencias en la viabilidad frente al control (249).

También en condrocitos humanos, sanos y artrósicos, se describe el efecto inductor de la apoptosis dosis-dependiente para diclofenaco y celecoxib (198) a concentraciones de entre 0'1 y 10  $\mu\text{M}$ , con un menor efecto inductor bajo tratamiento con celecoxib. Esta controversia con el celecoxib también se encuentra en la literatura al describirse su papel en la inducción de la apoptosis por mecanismos independientes a la inhibición de COX-2 (283) y en la activación de la cascada de caspasas a partir de concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  (171, 235, 255).

No existe una causa concreta que desencadene la apoptosis, si no que los diferentes componentes de la matriz juegan su papel en este proceso: el descenso en la producción de colágeno tipo II y de proteoglucanos promovería una diferenciación hipertrófica además de ejercer un efecto proapoptótico (142), precipitando los procesos de muerte celular programada; los fragmentos de fibronectina, que no inducen directamente la apoptosis, sí inducen una respuesta inflamatoria que provoca el aumento de la actividad de las proteasas, como puede ser la MMP-13 (117), correlacionándose la extensión de la apoptosis con la expresión de esta molécula (194); la literatura indica que la sobreexpresión de COX-2 se asocia a la resistencia a la apoptosis y su inhibición favorece los procesos de muerte celular (97, 202). La inducción de la apoptosis habría sido también observada en estudios *in vitro* de origen animal mediante PGE<sub>2</sub> y TNF $\alpha$  (6, 190) a pesar de que el TNF $\alpha$  por sí solo no tenga efecto sobre este proceso (194). La

prostaglandina PGE<sub>2</sub> por sí sola tampoco va a inducir la muerte celular (202) pero su síntesis, en colaboración con citoquinas y otros mediadores, va a promover la apoptosis de los condrocitos al alterar la función mitocondrial, causando una disminución en la población celular y disminuyendo el número de células que podrían colaborar en la compensación del daño (32, 202).

En cartílago se ha descrito la disminución de la muerte celular por parte de los tres fármacos. Si bien los métodos utilizados para cuantificar la existencia de procesos de muerte celular y la respuesta a unas mismas concentraciones de fármaco son variados en la literatura existente, nuestros resultados contribuyen a la discusión de cómo estos compuestos influyen en la apoptosis durante la patología artrósica.

En nuestros experimentos hubo un incremento significativo en la liberación de caspasa-9 al medio en los cultivos artrósicos, a los 10 días, bajo tratamiento con indometacina o diclofenaco y, a los 15 días, con celecoxib respecto a los valores detectados en los cultivos sanos bajo los mismos tratamientos. Los procesos de diferenciación terminal hipertrófica finalizarían con la apoptosis celular estimándose unos valores de caspasa-9 aumentados (266); sin embargo, los tratamientos en los cultivos artrósicos no provocaron diferencias significativas en las concentraciones de caspasa-9 respecto a lo observado en el estado ideal representado por los cultivos control sanos, sin tratamiento. Tampoco se estableció en los cultivos sanos tratada ninguna influencia negativa de los fármacos respecto a los cultivos control sanos. Esto sugiere que la ruta intrínseca o mitocondrial de la apoptosis no estaría activada antes de aplicar los tratamientos a la concentración de 1  $\mu$ M, ni se activó a causa de estos, salvo en los casos puntuales mencionados.

De TRAIL se ha descrito que su expresión aumenta durante la artrosis (163) y también la capacidad de los fármacos para potenciar su actividad apoptótica (97, 261), aunque las concentraciones de fármaco referidas en estos estudios superan ampliamente las descritas en el líquido sinovial. Según nuestros resultados, no se encontraron niveles de TRAIL significativamente diferentes entre los cultivos control sanos y artrósicos en ninguno de los puntos de estudio; y el tratamiento con cualquiera de los fármacos a 1  $\mu$ M, en ambas líneas, no potencia la liberación de TRAIL al medio a lo largo del tiempo. Esto nos lleva a

determinar que tampoco se puede hablar de la activación de procesos apoptóticos por la vía extrínseca.

#### **5.4. EXPERIMENTOS DE CICATRIZACIÓN**

En la bibliografía se describe cómo nuestros fármacos en estudio poseen la capacidad de reducir la migración de diversos tipos celulares (160, 164, 189, 251), aunque la mayoría se refieren a células tumorales y las concentraciones de fármaco utilizadas exceden las que se encuentran en el líquido sinovial. En lo que respecta a la artrosis, la reducción de la migración impediría a los condrocitos trasladarse a nuevas zonas y regenerar la matriz lesionada.

En todos los cultivos, tanto controles como bajo tratamiento con fármacos a concentraciones de 1  $\mu\text{M}$  y salvo aquellos artrósicos tratados con celecoxib, se cuantificó una pérdida significativa de superficie libre con el paso del tiempo, notable desde las 12 horas en cultivos sanos y a las 20 horas en artrósicos desde el momento inicial de toma de imágenes. Salvo en el caso mencionado del tratamiento con celecoxib en cultivos artrósicos, el tratamiento con los fármacos no muestra diferencias con la evolución de los controles ni diferencias en el efecto del tratamiento entre ellos o entre ambas líneas celulares.

#### **5.5. MORFOLOGÍA Y VIABILIDAD: CONFOCAL**

En el cartílago, los condrocitos presentan una estructura redondeada o poligonal, que puede ser aplanada o discoidal en la superficie de la articulación y en sus límites (111). Cuando son cultivados en laboratorio, los condrocitos acaban adoptando una morfología fusiforme o estrellada típica de los fibroblastos, debido a los fenómenos de desdiferenciación inherentes al cultivo *in vitro* (27, 291).

Este fenómeno de desdiferenciación y de cambios morfológicos hacia el fenotipo fibroblástico se pudo apreciar también en nuestros condrocitos en cultivo, siendo más evidentes con el paso del tiempo y con el aumento de la concentración de fármaco. Al mismo tiempo se pudo apreciar un escaso número de células no viables, y con el aumento de las concentraciones de fármaco una disminución en la densidad

celular.

## 5.6. COX-2

En el apartado 5.1. *Efecto de los Fármacos* ya hemos revisado que la inhibición de la actividad de COX-2 mediante el uso de analgesia no mejora eficazmente la destrucción del cartílago artrósico, sin embargo, tal como hemos visto en el apartado 1.5.1.1. *Ciclooxigenasa (COX)*, la inhibición de la síntesis de PGE<sub>2</sub> resultaría beneficiosa ya que su producción entra en sinergia con citoquinas que potencian la patología.

En el caso de la expresión de COX-2, esta es muy limitada en los condrocitos en reposo del cartílago normal. En el cartílago artrósico se la puede encontrar con un rango de expresión aumentado entre 10 a 80 veces, lo que a su vez conlleva un aumento en la producción de PGE<sub>2</sub> y con ella, el aumento de la sinergia anteriormente mencionada (17, 95).

*In vitro*, la expresión del gen *PGST-2* disminuye con el tiempo y con la desdiferenciación debida a cada pasaje, cuantificándose en mayores niveles en los condrocitos artrósicos (168).

Los tres fármacos en estudio, indometacina, diclofenaco y celecoxib, son inhibidores tiempo-dependientes de COX y a la concentración de 1  $\mu$ M serían capaces de inhibir a COX-2 en cartílago artrósico humano (11, 295). Existen datos que indican que diclofenaco y celecoxib a la concentración de 1  $\mu$ M no habrían conseguido modificar significativamente la síntesis de COX-2 en condrocitos artrósicos, no estimulados, respecto a las condiciones basales (10).

La sobreexpresión de *PGST-2* verificada en nuestros controles artrósicos es consistente con lo reportado en la bibliografía. También lo es la leve subexpresión observada en ambos controles sano y artrósico a los 15 días debido al paso del tiempo, y la disminución de la expresión del gen de COX-2 por parte de los tres fármacos. Según nuestros resultados, todos, a la concentración de 1  $\mu$ M sí provocaron la subexpresión del gen, que fue más evidente en los cultivos artrósicos. En los cultivos sanos el fármaco que mayor subexpresión provocó fue el celecoxib.

### 5.7. MMP-13

En el tejido sano adulto la expresión de MMP-13 es escasa o nula (230, 256), aumenta en el cartílago hipertrófico y también durante la artrosis proporcionalmente a la severidad de la lesión y la degradación de colágeno tipo II, sobreexpresándose hasta más de 40 veces, contribuyendo al desarrollo de la patología (266, 291, 294).

Se ha observado que, en el cultivo en monocapa, *in vitro*, su expresión puede aumentar (106) o disminuir (168, 173, 291) con el tiempo de cultivo y diferentes subcultivos.

En nuestros experimentos comprobamos que la concentración de MMP-13 es escasa en cultivos sanos, y que en cultivos artrósicos con o sin tratamiento los niveles de MMP-13 fueron significativamente superiores, particularmente a los 15 días, al finalizar el estudio.

En la literatura, los niveles de MMP-13 descritos en cultivos de condrocitos artrósicos, no estimulados y bajo tratamiento con los mismos fármacos a 1  $\mu\text{M}$ , no fueron significativamente diferentes a los niveles basales de la enzima, aunque el tiempo de incubación con los fármacos fue sustancialmente menor, de 1 hora (11). Salvando la diferencia en el tiempo de incubación, en nuestros experimentos el tratamiento en cultivos artrósicos causó una disminución significativa de los niveles de enzima a los 15 días respecto al control, siendo el diclofenaco el fármaco que provocó la mayor liberación de enzima al medio, y el celecoxib la menor. En los cultivos sanos, al final del experimento, ninguno de los fármacos ejerció un efecto significativamente diferente al resto.

A la concentración de 1  $\mu\text{M}$ , los tratamientos consiguieron hacer descender los niveles de MMP-13 liberados al medio en el período final de estudio, tanto en cultivos artrósicos como sanos, salvo en el caso de la incubación de condrocitos sanos con celecoxib, obteniéndose un efecto neutro sobre la liberación de la metaloproteinasa desde la mitad del período de experimentación.

El tratamiento con celecoxib en la literatura ofrece resultados contradictorios. En lo referente a condrocitos humanos no estimulados con citoquinas, puede ejercer un efecto neutro sobre la producción de MMP-13 en un rango de concentraciones de hasta 10  $\mu\text{M}$  tanto en

condrocitos sanos como artrósicos (198), lo que coincidiría con lo observado en nuestros experimentos; o aumentar la expresión génica de la enzima a concentraciones de 1  $\mu\text{M}$  en condrocitos artrósicos humanos en cultivo (11), siendo el nivel de expresión intermedio entre indometacina y diclofenaco.

### 5.8. IL-1 $\beta$

En la literatura podemos encontrar tanto que los niveles de esta interleucina y su expresión no estén demasiado elevados en el líquido sinovial en la articulación artrósica humana (147, 158, 175, 229) como que se encuentren incrementados en los tejidos y líquido sinovial de pacientes artrósicos (10), y su expresión sobrerregulada en el suero de estos pacientes (250). También se ha descrito que, en los cultivos *in vitro* y como parte de los procesos de desdiferenciación, los condrocitos artrósicos incrementan la secreción de IL-1 $\beta$  (142), referenciándose también la sobreexpresión de esta citoquina tanto en células sanas como artrósicas a medida que aumenta el número de subcultivos, sin diferencias significativas entre ambas líneas (168). Al final de nuestros experimentos, cualquier tratamiento generó una liberación mayor de interleucina al medio frente a lo que sería el estado ideal representado por los condrocitos control sanos, salvo tras el uso de diclofenaco en cultivos sanos en que no se apreciaron diferencias.

Los valores de IL-1 $\beta$  en líquido sinovial a los que se refiere la literatura consultada son similares independientemente de las muestras —sanas o artrósicas— oscilando entre los 2 y los 20 pg/ml. Aunque los niveles de citoquina indicados en la bibliografía han sido cuantificados en líquido sinovial y no son comparables a los obtenidos en nuestros cultivos, tampoco se detectaron variaciones al comparar el efecto de cada fármaco entre cultivos sanos y artrósicos, siendo este efecto similar para cada par de muestras.

Los ensayos clínicos con pacientes artrósicos y estudios en modelo animal mostraron que los tratamientos con indometacina y celecoxib fueron capaces de provocar un descenso en la liberación de IL-1 $\beta$  (10, 65, 143) aunque en el caso del celecoxib se encuentran resultados contradictorios cuando se describe un efecto neutro al no ofrecer

diferencias en la liberación de la molécula respecto al control en un ensayo similar (254). En ensayos en cultivo celular, la incubación de condrocitos artrósicos humanos con celecoxib o diclofenaco a 1  $\mu\text{M}$  ofrece resultados diferentes según se hayan estimulado o no los cultivos con IL-1 $\beta$ . En el caso de nuestros experimentos, no se detectaron modificaciones en la expresión génica de IL-1 $\beta$  respecto a las condiciones basales (10), sin estimulación. Con estas referencias (10, 254), concordarían los resultados obtenidos en nuestros experimentos en cultivos artrósicos, ya que el tratamiento con cualquiera de los fármacos no mostró diferencias en la liberación frente al control.

En nuestros resultados en cultivos sanos, sin embargo, comprobamos que el uso de indometacina y celecoxib sí provocó un ligero aumento en la liberación a los 15 días frente al control. En contraste, el uso de diclofenaco mantuvo esta liberación por debajo de los valores basales hasta el final del período de experimentación.

## 5.9. TNF $\alpha$

Se describe que la producción de TNF $\alpha$  es detectable a bajos niveles en el tejido artrósico, y es mayor en el líquido sinovial de la articulación artrósica, cartílago y estructuras asociadas (150, 231).

En la literatura se encuentran referencias a las concentraciones de TNF $\alpha$  en el líquido sinovial de la articulación artrósica entre 1 y 80 pg/ml (147, 175). En los sobrenadantes de nuestros cultivos celulares control sanos y artrósicos, los niveles de TNF $\alpha$  apenas sobrepasaron los 6 pg/ml, pero los tratamientos no consiguieron hacerlos descender por debajo de los valores ideales representados por las muestras control sanas.

El estudio en pacientes reveló que el tratamiento con indometacina vía oral no modificaba los niveles basales de TNF $\alpha$  en el tejido sinovial (65). Tampoco fueron alterados sus niveles en líquido sinovial bajo tratamiento con diclofenaco o celecoxib respecto al grupo control sin tratamiento (254) al igual que no se modificó su expresión génica en condrocitos artrósicos en cultivo tras el tratamiento con diclofenaco o celecoxib a 1  $\mu\text{M}$  (10). Estos resultados entran en conflicto con los obtenidos en el líquido sinovial de pacientes artrósicos y modelo animal

tratados con diclofenaco y celecoxib (96, 143) y sobre tejido sinovial de pacientes artrósicos tratados con celecoxib (65), en donde sí se observó disminución en la liberación de TNF $\alpha$ . Teniendo en cuenta que nuestros resultados provienen de cultivos celulares, no podemos extrapolarlos a lo descrito en los estudios sobre pacientes hallados en la literatura pero sí podemos complementar esta información. En nuestras muestras artrósicas, los niveles de TNF $\alpha$  se incrementaron al final del estudio debido a los diferentes tratamientos, aunque de los tres fármacos solo el celecoxib provocó este efecto en el último intervalo. En los cultivos sanos no se apreciaron diferencias significativas en este mismo período entre tratamientos y controles.

Podemos decir que los niveles de citoquina en las muestras artrósicas fueron mayores en los cultivos tratados con indometacina, y menores con celecoxib. En las sanas, bajo tratamiento con celecoxib se pudo apreciar una tendencia al aumento de la liberación de la citoquina en el tiempo, no significativa en ningún caso respecto al control. El efecto de la indometacina fue similar para los cultivos sanos y artrósicos; el diclofenaco potenció la liberación de TNF $\alpha$  en las muestras artrósicas, y el celecoxib provocó su aumento en las sanas.

### 5.10. IL-6

IL-6 aparece en concentraciones elevadas en el líquido sinovial de pacientes (156) o animales (3) afectados de artrosis, aunque no todos los pacientes artrósicos expresan los mismos niveles de IL-6 con lo que se pueden encontrar subgrupos en los que la producción puede ser más o menos abundante. Se intenta explicar la fluctuación de estos valores por el estadio de la patología o su duración (78, 192).

En general los condrocitos en cultivo producen menores cantidades de IL-6 que en un sistema *in vivo* (262). Los condrocitos sanos producen bajas concentraciones de IL-6 en ausencia de agentes estimulantes (174) y los artrósicos producen altas concentraciones durante la regeneración de la matriz (175, 262) aunque hay registros en que no se apreciaron diferencias en los niveles de IL-6 entre cultivos humanos sanos y artrósicos (125), en la línea de lo observado en nuestros resultados al no hallarse diferencias en los valores de citoquina entre

controles y tratamientos entre ambos tipos de cultivos.

Los valores de esta citoquina en la literatura se sitúan por encima de los 120 pg/ml (158, 175) alcanzando casi los 400 pg/ml (263) en el líquido sinovial de pacientes y entre 64 y 90 pg/ml en el de los sanos (158, 263). Aunque estos valores han sido medidos en el líquido sinovial, en nuestros cultivos, los niveles de IL-6 en el medio de cultivo de los condrocitos sanos se aproximaron más a los valores cuantificados en los cultivos artrósicos.

En los datos de estudios clínicos y ensayos en modelo animal artrósico en los que se refiere la disminución de los niveles de IL-6 bajo tratamiento con diclofenaco (3) o celecoxib (28), no se encontraron diferencias significativas en los niveles de IL-6 entre ambos fármacos (96). También localizamos referencias a cultivo de condrocitos artrósicos humanos tratados con indometacina a 5'6  $\mu$ M o con diclofenaco a 4'4  $\mu$ M en los que se logró reducir la producción basal de IL-6, efecto que no conseguido con celecoxib a la concentración de 1'8  $\mu$ M (228). Los resultados obtenidos en nuestros cultivos artrósicos coinciden parcialmente con lo descrito en la literatura, debido bien a que las concentraciones de fármaco ensayadas, superiores a las nuestras, o bien al modelo utilizado. Nuestros datos mostraron que la concentración de IL-6 cuantificada bajo tratamiento no difirió de los niveles basales durante el tiempo de estudio, salvo puntualmente a 5 días con el coxib, ni fue diferente entre fármacos, manteniéndose homogénea en términos generales a lo largo del tiempo.

Frente a lo anterior, en nuestros cultivos sanos los tres fármacos provocaron durante los primeros 10 días un descenso significativo en la concentración de IL-6 frente a los valores de referencia. Este descenso se mantuvo durante todo el ensayo bajo tratamiento con indometacina, y en el caso del tratamiento con celecoxib se originó un aumento en la liberación de la interleucina al finalizar el experimento. En estos cultivos, el celecoxib fue el fármaco que mayor liberación de IL-6 provocó de los tres.

Tal como hemos visto en el apartado 1.5.2.2.1. *Interleucina 6 (IL-6)*, esta citoquina modula al mismo tiempo actividades anabólicas y catabólicas. Su actividad está condicionada a su concentración y las sinergias que establezca con otras citoquinas y moléculas catabólicas.

Su disminución en cultivos artrósicos ejercería *a priori* un efecto positivo sobre la patología artrósica si no se alcanzase esta sinergia, que depende también de la propia liberación de esos compuestos, pero en nuestro caso el efecto de los tratamientos no muestra ninguna diferencia con lo ocurrido en los controles. Sin embargo, según los resultados obtenidos en los cultivos sanos, al disminuir la concentración de IL-6, los tratamientos ejercerían un efecto que podría alterar por lo menos la dinámica de GAG y proteoglucanos en la matriz del cartílago sano.

### 5.11. COLÁGENO TIPO II

El colágeno tipo II se expresa a altos niveles en el cartílago sano y su síntesis merma o finaliza durante la diferenciación hipertrófica de los condrocitos (27). En los procesos artrósicos su expresión se va reduciendo con la severidad de la lesión y a medida que la patología progresa (291, 293), aunque, al igual que ocurre con el agregano, su síntesis puede incrementarse en diferentes estadios de la enfermedad en respuesta a eventos degenerativos de la matriz en un intento de revertir el daño (42, 69, 111, 199). Estos fenómenos se describen también en modelo animal *in vivo*, obteniéndose resultados que describen primero la ausencia de diferencias significativas en la expresión de los niveles de colágeno tipo II entre cartílago sano y afectado (35), y más recientemente un aumento significativo en el control artrósico de estos valores con respecto al control normal (3).

En el cultivo *in vitro*, su expresión responde a la desdiferenciación, que disminuye con el tiempo y los subcultivos (168, 173, 291), sin diferencias significativas entre condrocitos sanos y artrósicos (168).

Como era de esperar, en nuestros análisis solamente se detectó expresión del gen *COL2A1* en las muestras sanas, apreciándose una disminución con el tiempo no amortiguada bajo tratamiento farmacológico a la concentración de 1  $\mu$ M. La literatura refiere que el tratamiento de condrocitos humanos sanos con indometacina (113) provocó la supresión de la expresión dosis-dependiente del colágeno tipo II en un rango de concentraciones; sin embargo, en nuestras muestras, la indometacina no modificó sustancialmente la expresión del gen respecto al control a  $t_{15}$ . En modelo animal, la literatura recoge que

el tratamiento con diclofenaco mejora la expresión del gen en animales artrósicos (176) hasta niveles encontrados en animales sanos, y que el tratamiento con celecoxib en cultivos sometidos a estrés mecánico produce una mejora de la expresión del gen a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  que, si bien no consiguió alcanzar los niveles basales, sí mejoró los niveles respecto a los cultivos sin tratamiento (136). Por el contrario, en nuestras muestras la incubación con ambos fármacos, diclofenaco y celecoxib, provocó a la concentración de 1  $\mu\text{M}$  una mayor subexpresión del gen respecto al control a 15 días y al tratamiento con indometacina, lo que no supone una mejora y que indica que además podría contribuir al desarrollo de procesos hipertróficos y de desdiferenciación.

### 5.12. COLÁGENO TIPO X

El colágeno tipo X no se expresa en condiciones normales en el cartílago sano adulto, pero aumenta como resultado de la hipertrofia de los condrocitos, de la calcificación del cartílago, y durante la artrosis al reiniciarse los procesos de osificación endocondral (139, 236, 266). Su expresión responde también a la desdiferenciación, incrementándose con el número de subcultivos (168). Su expresión es mayor en las zonas menos degeneradas (94), pero acaba disminuyendo a medida que aumenta la severidad de la lesión (291).

Diversos análisis en pacientes y modelo animal no han sido capaces de demostrar niveles elevados de colágeno tipo X en cartílago artrósico, lo que ha llevado a postular su expresión en función de las diferentes etapas de la enfermedad, de una zonación diferencial de su expresión, e incluso porque su expresión sólo pueda ser verificada en determinados subgrupos de la población (5, 12-13, 42). La búsqueda de literatura no ofreció resultados que relacionasen la expresión del gen en cultivos sanos o artrósicos bajo tratamiento con indometacina, diclofenaco o celecoxib. Sí se observó, en modelo animal, que el tratamiento con diclofenaco mejoraba la patología artrósica al infraregular la sobreexpresión de colágeno tipo X. El tratamiento, sin embargo, no lograba alcanzar los valores de expresión propios del cartílago sano (176).

En nuestros análisis, la expresión del gen COL10A1 se detectó

únicamente en las muestras artrósicas. Sus niveles aumentaron con el tiempo, y los tratamientos con los fármacos a 1  $\mu$ M apenas modificaron la expresión del gen respecto al control a t<sub>15</sub>, mostrándose inefectivos en la mejora de la condición artrósica para este parámetro.

### 5.13. FIBRONECTINA

Los niveles de fibronectina pueden elevarse hasta 10 veces por encima de los valores basales durante la artrosis, detectándose asimismo un aumento de su expresión en el líquido sinovial de los pacientes (244). La expresión de esta proteína también aumenta con los subcultivos durante la expansión *in vitro* de los condrocitos en respuesta a los procesos de dediferenciación, sin hallarse diferencias significativas en el contenido de fibronectina entre cultivos sanos y artrósicos (168).

No hemos encontrado referencias que estudien la concentración de fibronectina bajo la influencia de los fármacos seleccionados.

En nuestros experimentos, se detectó que el contenido de fibronectina era significativamente inferior en las muestras artrósicas, con o sin tratamiento, salvo el caso puntual a 15 días bajo tratamiento con diclofenaco en que no se apreciaron diferencias entre cultivos sanos o artrósicos.

En los cultivos artrósicos, los niveles de fibronectina cuantificados bajo tratamiento solo fueron significativamente superiores a los obtenidos en el control tanto a 5 como a 10 días. Este aumento se mantuvo hasta los 15 días únicamente bajo tratamiento con diclofenaco.

En los cultivos sanos con o sin tratamiento se cuantificó un descenso significativo de glucoproteína hacia el final del experimento, pero, aunque el tratamiento con diclofenaco no generó unos niveles de fibronectina diferentes a los obtenidos en los cultivos control, los tratamientos con indometacina o celecoxib sí provocaron un aumento en la liberación de la molécula a los 15 días de cultivo.

### 5.14. MATRILINA-1

La expresión de matrilina-1 es baja o nula en el cartílago humano

sano (217) y cesa a medida que los condrocitos inician la diferenciación hipertrófica (130). Se sobreexpresa en los procesos artrósicos (111, 206, 274) aunque también se describe la infraexpresión de matrilina-1 en el cartílago artrósico (42) hipotetizando con la posibilidad de que los cambios en la expresión de genes clave ocurran en toda la articulación y no estén únicamente restringidos a las zonas lesionadas, y que esos cambios sean los que predispongan el tejido al daño en vez de ser el daño el que cause la alteración de la expresión génica.

No hemos encontrado referencias a la expresión de *MATN1* en cultivos *in vitro* de condrocitos bajo el efecto de los fármacos estudiados.

Como era de esperar, el gen *MATN1* no amplificó en ninguna de nuestras muestras sanas. En los cultivos artrósicos no amplificó en el control a  $t_0$  ni bajo tratamiento con diclofenaco, pero sí amplificó en las muestras control  $t_{15}$  y bajo tratamiento con los fármacos indometacina y celecoxib. A pesar de no tener valores de cuantificación relativa respecto al control sano a tiempo cero (SC0), los resultados obtenidos se pudieron analizar bajo el control artrósico a 15 días (AC15), viendo que ambos tratamientos, con indometacina o celecoxib, disminuyeron la expresión del gen respecto a este control.

### 5.15. MATRILINA-3

La expresión de matrilina-3 es escasa en los condrocitos sanos (217) y débil o nula en los hipertróficos (154, 292). La sobreexpresión de este gen está ligada al desarrollo de la artrosis de forma proporcional al desarrollo de la patología (217, 274). La controversia que se genera con esta molécula es que, aunque sus valores sean elevados durante la artrosis, no existe una uniformidad entre pacientes (271).

No hemos encontrado referencias a la expresión de *MATN3* en cultivos de condrocitos *in vitro* bajo el efecto de los fármacos estudiados.

Tomando como referencia el control sano a  $t_0$  (SC0), en nuestras muestras se detectó la sobreexpresión del gen a  $t_{15}$  en los cultivos artrósicos, y el tratamiento farmacológico provocó a  $t_{15}$  la subexpresión del gen *MATN3* en las dos líneas celulares. Según los valores de

cuantificación relativa observados, el celecoxib fue el fármaco que mayor inhibición produjo sobre el gen en cada línea.

### 5.16. GLICOSAMINOGLUCANOS

El protocolo seguido en este ensayo lleva a la cuantificación de las concentraciones de GAG asociados a la matriz extracelular, excluyendo los GAG anclados a superficie. La reducción en el contenido de estas moléculas se debería a su liberación de la matriz, complicaciones en su incorporación y/o a una limitación en su síntesis. Está reconocido que la pérdida de GAG es un rasgo distintivo de la artrosis y un marcador de la degeneración del cartílago (133). Sin embargo, el contenido de GAG en nuestras muestras artrósicas sin tratamiento no difirió del cuantificado en los controles sanos.

Está descrito que la indometacina posee un efecto inhibitorio reconocido sobre la síntesis de GAG en condrocitos sanos y artrósicos (73-74, 76), aunque en explantes de cartílago sanos bajo carga, se describió que el tratamiento con indometacina a concentraciones hasta 10  $\mu\text{M}$  no producía ningún efecto en la liberación de GAG al medio (141). En nuestro caso, el tratamiento con indometacina en cultivos sanos y artrósicos a la concentración de 1  $\mu\text{M}$  no provocó diferencias, salvo una merma a 5 días en cultivos sanos equilibrada en períodos posteriores, en la liberación de GAG al medio respecto a los valores cuantificados en cada uno de los cultivos control.

El diclofenaco, de forma similar a lo observado con indometacina con una merma a los 10 días en cultivos sanos, ejerció también un efecto global neutro sobre ambos tipos de cultivo al no encontrarse diferencias con los valores basales sanos o artrósicos. Esto coincidiría con el efecto neutro o no significativo descrito en la literatura sobre la síntesis de GAG en condrocitos humanos tanto sanos como artrósicos (73).

El celecoxib es el único de los tres fármacos que podría ejercer un efecto positivo sobre la síntesis de los GAG ya que está recogido que mejora la síntesis y retención de los proteoglucanos, además de que existen evidencias de que el tratamiento con celecoxib logró revertir la

inhibición sobre la rotación de los GAG de forma dosis-dependiente<sup>20</sup>, cuando las muestras fueron sometidas a condiciones inflamatorias (182), aunque se ha descrito que en explantes y cultivos de condrocitos humanos sanos, el tratamiento con celecoxib a concentraciones entre 0'01 y 10  $\mu\text{M}$ , no modificó la rotación de los GAG en el cartílago articular humano normal (141, 180, 182). Coincidiendo más con esta bibliografía se encuentra el resultado de nuestros análisis, pues en nuestras muestras el coxib consiguió disminuir en el contenido de GAG libre en los cultivos artrósicos hasta los 10 días de cultivo; en cultivos sanos esta merma solo se detectó a los cinco días. En cualquier caso, al final del experimento, en ambas líneas celulares los valores de liberación de GAG no difirieron significativamente de sus respectivos controles, con lo que se le asumiría a este fármaco un efecto final neutro a la concentración de 1  $\mu\text{M}$ .

En términos generales, no se encontraron diferencias en el efecto de los fármacos sobre cada línea por separado. Por el contrario, al analizar el efecto de cada fármaco sobre ambas líneas, sí se apreció que el diclofenaco provocó una mayor liberación de GAG de la matriz al medio en los cultivos artrósicos, siempre dentro de los límites de lo encontrado en los cultivos control.

### 5.17. AGRECANO

El agrecano es uno de los componentes esenciales de la matriz extracelular y sabemos que su expresión merma durante la artrosis y la diferenciación hipertrófica (42, 224). El gen responde a los procesos de desdiferenciación y su expresión decrece con el tiempo (291) y con los subcultivos (168). En nuestros controles sanos, se observa la subexpresión del gen tras los 15 días de cultivo. No obstante, la tasa de síntesis puede aumentar en los primeros estadios de la artrosis al activarse los mecanismos de reparación en un intento de mantener la matriz en equilibrio (21), lo que podría explicar que en los cultivos artrósicos la expresión del gen sea superior a los 15 días respecto al control a  $t_0$ .

---

<sup>20</sup> Esta mención a cultivos estimulados es excepcional, para ilustrar la contraposición de los efectos del fármaco.

Se ha descrito ampliamente el efecto negativo de la indometacina sobre el metabolismo de los proteoglucanos del cartílago artrósico (65, 181, 208, 219, 295). En contradicción con estos datos, también se ha descrito el aumento significativo en el contenido de agregano a concentraciones de 5'5  $\mu\text{M}$  en condrocitos artrósicos humanos cultivados en perlas de alginato (228), además de obtenerse resultados discordantes en cartílago sano al describirse, por un lado, efectos deletéreos a 4  $\mu\text{M}$  (240), y por otro a partir de concentraciones superiores, de 28  $\mu\text{M}$  (58).

La literatura recoge que el uso de diclofenaco en el tratamiento de explantes o cultivos artrósicos humanos a concentraciones desde 1  $\mu\text{M}$  no alteró el contenido de proteoglucanos (34, 80, 198, 228), y tampoco lo hizo a concentraciones de hasta unos 31  $\mu\text{M}$  tanto en condrocitos sanos como artrósicos de origen animal (57). Enfrentándose a esta información, está descrito que este fármaco sí suprimió la síntesis en cultivo sano a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  (198).

Los resultados obtenidos bajo tratamiento con celecoxib no son del todo congruentes, ya que varios estudios en explantes de cartílago artrósico humano recogen un efecto estimulador de la síntesis y retención de los proteoglucanos entre las concentraciones de 0'1 a 26'5  $\mu\text{M}$  (80, 180, 181), de la misma forma que en diversos ensayos (65, 183, 208), en pacientes y modelo y cultivo animales *in vitro*, se describe un efecto favorable del celecoxib sobre el metabolismo de los proteoglucanos en cartílago artrósico. En contraposición, también se recoge que el tratamiento con celecoxib no tuvo un efecto significativo sobre los condrocitos artrósicos (198, 228) o en modelo animal *in vivo* (183). En cartílago sano también existe controversia en los resultados. Por un lado, se describe que el celecoxib no posee efectos en la rotación de los proteoglucanos del cartílago sano a menos de 10  $\mu\text{M}$  (180, 182), pero por otro se detectó la supresión de su síntesis en el rango de concentraciones estudiadas, entre 0'1 y 10  $\mu\text{M}$  (198), además de resultados que indican que en cultivo animal el celecoxib ejerce un efecto positivo a 10  $\mu\text{M}$  en la expresión del agregano tanto en condrocitos sanos (136).

La literatura (182) presume que la influencia del celecoxib sobre la rotación de los proteoglucanos es a través de la inhibición de la

actividad COX-2. Podríamos extender esta presunción a cualquiera de los fármacos capaces de inhibir la actividad ciclooxigenasa, puesto que sabemos que COX-2 está sobreexpresada en condiciones inflamatorias y con su inhibición se inhibiría la síntesis de PGE2. Como hemos revisado en el apartado 1.5.1.1.3. *Papel de la prostaglandina E2 (PGE2)*, esta molécula tiene un efecto dual y puede influir negativamente en la síntesis de proteoglucanos.

La gran mayoría de las concentraciones referidas en la literatura son superiores a la de 1  $\mu\text{M}$  establecida para la realización de nuestros experimentos y los resultados son heterogéneos. En nuestros experimentos, cualquiera de los tres fármacos a la concentración de 1  $\mu\text{M}$  produce la subexpresión del gen de agregano respecto al control sano escogido como referencia (SC0). Con los mismos datos podemos establecer que los tratamientos no suponen una mejora al cabo de los 15 días de tratamiento respecto a los controles sin tratar.

## **5.18. ADECUACIÓN DE LOS FÁRMACOS A LA MEJORA DE LA ARTROSIS**

Esta Tesis es un pequeño acercamiento a la vorágine de elementos que interactúan en el desarrollo y avance de la degeneración artrósica a través de una serie de marcadores característicos presentes en los condrocitos del cartílago articular.

Teniendo en cuenta que el fin último de los fármacos estudiados es la acción analgésica, desglosar la discusión en diferentes apartados nos ha permitido obtener una visión del efecto de indometacina, diclofenaco y celecoxib de forma particular sobre cada proceso celular, mediador inflamatorio y elemento constituyente de la matriz extracelular del cartílago estudiado, en condiciones sanas y degenerativas.

Debemos tener también en cuenta que cualquier tratamiento destinado a la terapia de esta patología va a afectar, por la propia farmacocinética del fármaco —esto es, los procesos de liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción de este por el organismo— a tejidos sanos, que podrían ver afectado su metabolismo, que en el más deseable y mejor de los escenarios sería de un modo positivo.

En cada uno de los apartados de esta Discusión hemos podido

comprobar que no existe una regla clara que nos indique cuál de los tres fármacos es el más idóneo para tratar en su conjunto los eventos que desencadenan la enfermedad, ya que un mismo compuesto puede llegar a ejercer un efecto en una línea celular pero un efecto completamente diferente en la otra, lo que podría hacernos cuestionar la relación beneficio-riesgo del tratamiento elegido. El mismo argumento se nos planteó al intentar localizar, en base a los resultados obtenidos, el fármaco que actúe positivamente sobre el mayor número de marcadores estudiados. La cuestión es compleja ya en el organismo *in vivo* las condiciones van a ser completamente diferentes a las controladas en un cultivo celular *in vitro* ya que fluctuarán debido a diferentes motivos, ya sean cambios en la carga mecánica de la articulación, edad del individuo, u otras causas clave, con lo que anteponer la mejora de ciertos marcadores por delante de otros podría hacer desencadenar, en último término, un perjuicio mayor que el beneficio que se pretende obtener.



## *6. CONCLUSIONES*



## **6. CONCLUSIONES**

### **6.1. PROLIFERACIÓN**

Ninguno de los fármacos ensayados, a la concentración de 1  $\mu$ M, mejora la proliferación de los condrocitos artrósicos, y en el caso del celecoxib la empeora significativamente.

En los cultivos sanos, a la misma concentración, el tratamiento farmacológico produciría un efecto general deletéreo y significativo sobre el estado ideal del cartílago.

### **6.2. APOPTOSIS, CASPASA-9 Y TRAIL**

Con el método de cuantificación utilizado podemos concluir un efecto neutro sobre la apoptosis en las muestras estudiadas con fármacos a la concentración de 1  $\mu$ M.

### **6.3. EXPERIMENTOS DE CICATRIZACIÓN**

De forma general, los fármacos ejercen un efecto neutro. La excepción es el tratamiento con celecoxib en condrocitos artrósicos, donde a las 20 horas no se cuantifica una pérdida significativa de espacio libre respecto al control sin tratamiento.

Los tratamientos, salvo el caso particular mencionado, no restringen la migración celular, la colonización del espacio libre disponible o el cierre de la herida.

### **6.4. MORFOLOGÍA Y VIABILIDAD: CONFOCAL**

Los condrocitos sufren procesos de desdiferenciación agravados por el tiempo en cultivo y el aumento de la concentración de fármacos.

Con las imágenes tomadas tras la tinción con calceína y yoduro de propidio y los resultados obtenidos en las pruebas de apoptosis

podemos sugerir que a la concentración de 1  $\mu\text{M}$  los fármacos no interfieren con la viabilidad.

El descenso comprobado en la densidad celular es debido a la inhibición de la proliferación en respuesta al tratamiento farmacológico.

### **6.5. COX-2**

El tratamiento farmacológico a la concentración de 1  $\mu\text{M}$  consigue disminuir la expresión del gen *PGST-2* en ambos tipos de líneas celulares, ejerciendo un mayor efecto sobre los condrocitos artrósicos. Este efecto sería beneficioso frente al avance de la patología al bloquearse la síntesis de  $\text{PGE}_2$ , evitando los procesos anabólicos relacionados con esta prostaglandina y su interacción con citoquinas proinflamatorias.

El fármaco celecoxib, que ejercería un efecto similar al de indometacina y diclofenaco en cultivos artrósicos, provocaría un mayor efecto inhibitorio en los cultivos sanos.

### **6.6. MMP-13**

Todos los tratamientos, a la concentración de 1  $\mu\text{M}$ , ejercen un efecto positivo sobre la protección de la matriz al conseguir disminuir la concentración de MMP-13 en el medio excepto bajo incubación con celecoxib, que en cultivos sanos parece ejercer un efecto neutro sobre la liberación de la enzima.

### **6.7. IL-1 $\beta$**

Los tratamientos en los cultivos artrósicos tuvieron un efecto neutro sobre la liberación de IL-1 $\beta$ . En estos cultivos, todos los fármacos a la concentración de 1  $\mu\text{M}$  ejercieron un efecto similar a lo largo del estudio salvo el celecoxib, que provocó una menor liberación a los 15 días significativa frente al mismo período con el uso de los otros dos fármacos.

En los cultivos sanos, únicamente el tratamiento con diclofenaco limitó o tuvo un efecto neutro sobre la liberación de IL-1 $\beta$  durante todo

el estudio. Al finalizar el experimento, los fármacos indometacina y celecoxib elevaron los niveles de IL-1 $\beta$  por encima de los valores de referencia, siendo el fármaco indometacina el que produjo la mayor liberación de citoquina en este período.

### **6.8. TNF $\alpha$**

Los fármacos no producen un efecto de mejora en la patología a través de la modulación de este parámetro, ya que ninguno de ellos fue capaz de provocar, a la concentración estudiada de 1  $\mu$ M, una liberación al medio de TNF $\alpha$  inferior a los valores de referencia.

En ambas líneas, ningún tratamiento fue capaz de disminuir los niveles de TNF $\alpha$  de forma estable por debajo de los valores ideales, representados por los cultivos control sanos.

Particularmente, el tratamiento farmacológico en cultivos artrósicos potenció la liberación de la citoquina hacia el final del experimento.

### **6.9. IL-6**

Los tres fármacos, a la concentración de 1  $\mu$ M, ejercen el mismo efecto neutro sobre la liberación de IL-6 en los cultivos artrósicos.

En cultivos sanos, los tres fármacos provocan una menor liberación de IL-6 al medio al menos hasta los 10 días de tratamiento. La incubación con celecoxib produce un incremento significativo de interleucina al final del período de experimentación, siendo el fármaco que, aun con valores por debajo de los niveles de referencia, mayor liberación de molécula produce de los tres.

### **6.10. COLÁGENO TIPO II**

En las muestras sanas la expresión del gen disminuye con el tiempo.

El tratamiento farmacológico es incapaz de compensar la disminución de la expresión del gen, que se acentúa bajo tratamiento con diclofenaco y celecoxib, agravando la patología artrósica.

### **6.11. COLÁGENO TIPO X**

En las muestras artrósicas la expresión del gen aumenta con el tiempo.

El tratamiento farmacológico es incapaz de compensar la sobreexpresión del gen, sin producir ningún beneficio en el desarrollo de la patología. Ningún fármaco destaca sobre los demás en la mejora de este parámetro.

### **6.12. FIBRONECTINA**

Cada línea responde de forma diferente al tratamiento farmacológico.

En los cultivos artrósicos los tratamientos provocan un aumento de la liberación de fibronectina respecto al control durante al menos los dos primeros tercios del estudio. Al finalizar este, el efecto es neutro bajo tratamiento con indometacina o celecoxib.

En los cultivos sanos el efecto es neutro hasta los 15 días de experimentación con diclofenaco, período en que solo los fármacos indometacina y celecoxib provocan un aumento en la liberación de fibronectina por encima de los niveles basales, lo que resultaría en un agravamiento de la enfermedad.

### **6.13. MATRILINA-1**

Solo se detecta su expresión en muestras artrósicas.

El tratamiento con diclofenaco 1  $\mu$ M bloquea la expresión del gen a los 15 días mientras que, a la misma concentración, los tratamientos con indometacina o celecoxib la disminuyen. El tratamiento farmacológico, al conseguir la subexpresión de la molécula, contribuye a la mejora de la patología.

### **6.14. MATRILINA-3**

Los tres fármacos a la concentración de 1  $\mu$ M provocan la

infraregulación del gen *MATN3* en ambas líneas celulares a los 15 días de tratamiento. Ya que la sobreexpresión de este gen está ligada al desarrollo artrósico, es de esperar que el tratamiento farmacológico contribuya a la mejora de la patología.

### **6.15. GLICOSAMINOGLUCANOS**

Los fármacos, a la concentración de 1  $\mu\text{M}$  ejercen un efecto global neutro a la finalización del experimento sobre la liberación de GAG desde la matriz al medio.

El tratamiento con diclofenaco en cultivos artrósicos provoca una liberación de GAG superior a la encontrada en cultivos sanos.

Ninguno de los fármacos destaca sobre los demás ejerciendo un efecto beneficioso sobre la patología.

### **6.16. AGRECANO**

Ninguno de los fármacos a la concentración de 1  $\mu\text{M}$  mejora la expresión del gen tras 15 días de tratamiento.

Con los datos obtenidos se puede concluir que en estas condiciones se ejerce un efecto negativo sobre el contenido de la molécula en la matriz, no se mejoraría la condición artrósica ni se prevendrían posibles procesos de desdiferenciación.

### **6.17. ADECUACIÓN DE LOS FÁRMACOS A LA MEJORA DE LA PATOLOGÍA**

La finalidad de los fármacos ensayados es fundamentalmente el alivio de los síntomas provocados por la enfermedad articular, pero, como describimos en este trabajo, algunos de ellos pueden interferir de forma positiva o negativa en la regeneración del cartílago.



## *7. ÍNDICE DE FIGURAS*



## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1/1. Articulación sana vs. artrósica. Cuerpos libres articulares. ....	32
Fig. 1/2. Principales articulaciones afectadas en la artrosis .....	34
Fig. 1/3. Esquema de las zonas del cartílago articular y la transición al tejido óseo .....	37
Fig. 1/4. Condrones .....	40
Fig. 1/5. Indometacina .....	48
Fig. 1/6. Diclofenaco .....	48
Fig. 1/7. Celecoxib .....	49
Fig. 1/8. Monómeros de COX1 y COX2.....	51
Fig. 1/9. Producción de PGH2.....	52
Fig. 1/10. Ruta de biosíntesis y acciones de los prostanoides (vía COX) .....	53
Fig. 1/11. Aminoácidos representativos para la interacción de los fármacos con COX. ....	56
Fig. 1/12. Riesgo de efectos adversos de los fármacos en estudio .....	58
Fig. 1/13. Estructura de la metaloproteinasa de matriz 13 (MMP-13).....	60
Fig. 1/14. Señalización y regulación mediada por citoquinas .....	62
Fig. 1/15. Estructura de la caspasa-9 .....	67
Fig. 1/16. Esquema de la vía intrínseca mediada por caspasa-9 .....	68
Fig. 1/17. Esquema de la vía extrínseca de la apoptosis mediada por TRAIL .....	70
Fig. 1/18. Colágeno. Esquema del homotrímero de la isoforma $\alpha 1$ .....	71
Fig. 1/19. Colágeno. Estructura de la cadena $\alpha 1$ (II).....	71
Fig. 1/20. Colágeno. Estructura de la cadena $\alpha 1$ (X). Malla hexagonal.....	72
Fig. 1/21. Estructura de la matrilina-1 .....	74

Fig. 1/22. Estructura de la matrilina-3 .....	75
Fig. 1/23. Estructura de la fibronectina.....	77
Fig. 1/24. Polimerización de fibronectina.....	78
Fig. 1/25. Ejemplos de glicosaminoglucanos .....	80
Fig. 1/26. Estructura del agregcano .....	82
Fig. 1/27. Esquema de un agregado de agregcano.....	83
Fig. 1/28. Proceso de la reducción del MTT a formazán.....	87
Fig. 1/29. Fases del crecimiento de un cultivo celular.....	90
Fig. 1/30. Esquema de un microscopio confocal espectral con escaneado láser.....	91
Fig. 1/31. Tinción confocal. Células vivas y muertas.....	92
Fig. 1/32. Cinética de la amplificación por qPCR .....	93
Fig. 3/1. Proceso del aislamiento de condrocitos.....	109
Fig. 3/2. Esquema de diluciones seriadas .....	113
Fig. 3/3. Depósitos de sGAG .....	120
Fig. 3/4. Esquema del principio de los dos tipos de ELISA sandwich utilizados .....	123
Fig. 3/5. Ensayo de cicatrización por raspado o scratching.....	124
Fig. 3/6. Puntos elegidos para la toma de imágenes en el ensayo de cicatrización .....	125
Fig. 3/7. Extracción de ARN. Precipitación del ARN con isopropanol.....	131
Fig. 4/MTT/1. Diagrama de barras para las medias del estudio de proliferación celular.....	144
Figs. 4/MTT/2-25. Diagramas de barras para el estudio estadístico de proliferación celular .....	145
Figs. 4/GAG/1-25. Diagramas de barras para el estudio estadístico de la cuantificación de sGAG .....	150
Figs. 4/MMP/1-25. Diagramas de barras para el estudio estadístico de la cuantificación de MMP-13.....	156
Figs. 4/IL1 $\beta$ /1-25. Diagramas de barras para el estudio estadístico de la cuantificación de IL-1 $\beta$ .....	162
Figs. 4/TNF/1-25. Diagramas de barras para el estudio estadístico de la cuantificación de TNF $\alpha$ .....	168
Figs. 4/IL6/1-25. Diagramas de barras para el estudio estadístico de la cuantificación de IL-6 .....	175

Figs. 4/Casp/1-25. Diagramas de barras para el estudio estadístico de la cuantificación de caspasa-9 .....	181
Figs. 4/TRAIL/1-25. Diagramas de barras para el estudio estadístico de la cuantificación de TRAIL .....	187
Figs. 4/FN/1-25. Diagramas de barras para el estudio estadístico de la cuantificación de fibronectina.....	192
Figs. 4/WH/1-6. Imágenes del ensayo de cicatrización .....	200
Fig. 4/WH/7. Diagrama de barras para las medias de superficie libre en el ensayo de cicatrización .....	206
Figs. 4/WH/8-32. Diagramas de barras para el estudio estadístico de la superficie libre en el ensayo de cicatrización .....	207
Figs. 4/MC/1-6. Imágenes del ensayo de viabilidad por microscopía confocal.....	214
Fig. 4/RQ/1. Valores Log2RQ para la expresión de COX-2.....	220
Fig. 4/RQ/2. Valores Log2RQ para la expresión de colágeno tipo II .....	221
Fig. 4/RQ/3 Valores Log2RQ para la expresión de colágeno tipo X.....	222
Fig. 4/RQ/4. Valores Log2RQ para la expresión de matrilina-1 .....	222
Fig. 4/RQ/5. Valores Log2RQ para la expresión de matrilina-3 .....	223
Fig. 4/RQ/6. Valores Log2RQ para la expresión de agrecano .....	223



## *8. ÍNDICE DE TABLAS*



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1/1. Clasificación de los AINE en estudio según su grupo químico.....	47
Tabla 1/2. Indometacina .....	48
Tabla 1/3. Diclofenaco sódico .....	49
Tabla 1/4. Celecoxib.....	50
Tabla 1/5. IC50 para COX-1 y COX-2 .....	57
Tabla 3/1. Resumen de las condiciones experimentales de los ensayos realizados .....	107
Tabla 3/2. Resultados de la búsqueda de concentraciones de los fármacos en líquido sinovial .....	114
Tabla 3/3. Longitudes de onda máximas de excitación y emisión .....	127
Tabla 3/4. Justificación estadística del tamaño muestral.....	139
Tabla 4/1. Valores IC50 a cinco días.....	142
Tabla 4/2. Concentraciones a las que se observan cambios significativos en la proliferación de los cultivos .....	143
Tabla 4/3. Concentraciones a las que se observan cambios significativos en la cicatrización de los cultivos .....	199
Tablas 9/1-6. Estadísticos descriptivos proliferación (MTT)....	269
Tabla 9/7. Estadísticos descriptivos sGAG ( $\mu\text{g/mL}$ ).....	275
Tabla 9/8. Estadísticos descriptivos MMP-13 ( $\text{pg/mL}$ ) .....	276
Tabla 9/9. Estadísticos descriptivos IL-1 $\beta$ ( $\text{pg/mL}$ ).....	277
Tabla 9/10. Estadísticos descriptivos TNF $\alpha$ ( $\text{pg/mL}$ ) .....	278
Tabla 9/11. Estadísticos descriptivos IL-6 ( $\text{pg/mL}$ ).....	279
Tabla 9/12. Estadísticos descriptivos caspasa-9 ( $\text{pg/mL}$ ).....	280
Tabla 9/13. Estadísticos descriptivos TRAIL ( $\text{pg/mL}$ ) .....	281
Tabla 9/14. Estadísticos descriptivos fibronectina ( $\text{pg/mL}$ ).....	282
Tablas 9/15-24. Cuadros resumen del análisis estadístico de las pruebas colorimétricas .....	283
Tablas 9/25-31. Estadísticos descriptivos para el ensayo de cicatrización.....	288

Tablas 9/32-41. Cuadros resumen del análisis estadístico del  
ensayo de cicatrización .....295

## 9. APÉNDICE



Tabla 9/1. Estadísticos descriptivos MTT: Indometacina en cultivos artrósicos.

5 días						
μM	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	100	95,77	93,14	95,26	83,911	64,137
SD	1,49	10,07	4,77	5,77	1,368	1,71
EE	0,863	5,82	2,75	3,33	0,79	0,987
IC inferior 95%	96,288	70,742	81,300	80,931	80,512	59,890
IC superior 95%	103,712	120,794	104,983	109,583	87,310	68,385
10 días						
μM	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	100	97,23	96,37	89,1	76,41	55,94
SD	3,68	7,56	11,55	9	2,87	5,78
EE	2,13	4,37	6,67	5,2	1,65	3,33
IC inferior 95%	90,853	78,445	67,686	66,731	69,294	41,593
IC superior 95%	109,147	116,019	125,047	111,470	83,532	70,288
15 días						
μM	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	100	95,05	82,46	91,06	70,22	58,87
SD	8,99	4,28	3,7	5,85	6,37	4,53
EE	5,19	2,47	2,14	3,38	3,68	2,62
IC inferior 95%	77,675	84,416	73,260	76,523	54,388	47,615
IC superior 95%	122,325	105,680	91,664	105,595	86,053	70,129
SD: desviación estándar; EE: error estándar; IC: intervalos de confianza.						

Tabla 9/2. Estadísticos descriptivos MTT: Diclofenaco en cultivos artrósicos.

5 días						
μM	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	100	104,16	99,31	95,55	83,11	69,97
SD	1,49	7,66	4,2	4,11	2,81	5,67
EE	0,863	4,42	2,43	2,38	1,62	3,27
IC inferior 95%	96,288	85,142	88,868	85,330	76,122	55,893
IC superior 95%	103,712	123,176	109,746	105,768	90,095	84,056
10 días						
μM	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	100	94,75	91,003	93,37	87,95	81,83
SD	3,68	6,51	1,651	5,7	5,7	10,27
EE	2,13	3,76	0,953	3,29	3,29	5,93
IC inferior 95%	90,853	78,571	86,902	79,202	73,781	56,324
IC superior 95%	109,147	110,932	95,104	107,534	102,113	107,343
15 días						
μM	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	100	88,102	92,92	82,53	79,16	67,26
SD	8,99	1,255	5,39	2,34	5,39	3,24
EE	5,19	0,725	3,11	1,35	3,11	1,87
IC inferior 95%	77,675	84,983	79,538	76,709	65,783	59,207
IC superior 95%	122,325	91,220	106,294	88,352	92,540	75,318
SD: desviación estándar; EE: error estándar; IC: intervalos de confianza.						

**Tabla 9/3. Estadísticos descriptivos MTT: Celecoxib en cultivos artrósicos.**

5 días						
µM	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	100	95,476	88,8	69,57	50,894	46,44
SD	1,49	0,829	2,23	1,86	1,078	5,44
EE	0,863	0,479	1,29	1,08	0,623	3,14
IC inferior 95%	96,288	93,416	83,252	64,941	48,215	32,919
IC superior 95%	103,712	97,536	94,347	74,206	53,572	59,967
10 días						
µM	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	100	94,12	93,08	65,8	55,36	45,963
SD	3,68	4,2	6	2,94	2,7	1,57
EE	2,13	2,42	3,47	1,7	1,56	0,906
IC inferior 95%	90,853	83,695	78,166	58,492	48,664	42,064
IC superior 95%	109,147	104,540	107,993	73,112	62,062	49,863
15 días						
µM	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	100	96,56	90,3	72,15	63,62	54,54
SD	8,99	6,87	3,31	3,63	5,06	1,98
EE	5,19	3,97	1,91	2,1	2,92	1,14
IC inferior 95%	77,675	79,500	82,081	63,117	51,039	49,614
IC superior 95%	122,325	113,623	98,524	81,175	76,197	59,464
SD: desviación estándar; EE: error estándar; IC: intervalos de confianza.						

Tabla 9/4. Estadísticos descriptivos MTT: Indometacina en cultivos sanos.

5 días						
$\mu\text{M}$	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	100	96,361	96,41	92,43	83,91	83,77
SD	1,57	2,302	3,59	4,11	3,91	8,19
EE	0,641	0,94	1,47	1,68	1,6	3,34
IC inferior 95%	98,354	93,946	92,638	88,110	79,811	75,173
IC superior 95%	101,647	98,777	100,182	96,741	88,013	92,368
10 días						
$\mu\text{M}$	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	100	95,66	89,094	85,31	77,21	66,03
SD	2,55	1,85	1,535	2,09	2,89	6,07
EE	1,47	1,07	0,886	1,21	1,67	3,5
IC inferior 95%	93,673	91,057	85,281	80,122	70,036	50,957
IC superior 95%	106,327	100,259	92,907	90,493	84,392	81,103
15 días						
$\mu\text{M}$	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	100	95,99	91	93,985	84,352	77,65
SD	4,28	3,01	2,78	0,694	0,962	3,48
EE	2,47	1,74	1,6	0,4	0,555	2,01
IC inferior 95%	89,361	88,502	84,104	92,262	81,962	68,996
IC superior 95%	110,638	103,479	97,901	95,708	86,742	86,310
SD: desviación estándar; EE: error estándar; IC: intervalos de confianza.						

**Tabla 9/5. Estadísticos descriptivos MTT: Diclofenaco en cultivos sanos.**

5 días						
$\mu\text{M}$	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	100	92,46	92,82	92,97	87,61	88,91
SD	1,82	3,73	1,92	6,51	3,44	2,43
EE	1,05	2,15	1,11	3,76	1,99	1,4
IC inferior 95%	95,481	83,189	88,066	76,796	79,065	82,885
IC superior 95%	104,520	101,723	97,584	109,138	96,148	94,937
10 días						
$\mu\text{M}$	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	100	94,44	85,45	80,722	73,5	72,52
SD	2,55	2,54	3,7	1,482	6,77	3,98
EE	1,47	1,47	2,14	0,856	3,91	2,3
IC inferior 95%	93,673	88,132	76,243	77,041	56,690	62,648
IC superior 95%	106,327	100,752	94,650	84,404	90,306	82,402
15 días						
$\mu\text{M}$	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	100	93,56	91,89	89,71	88,2	85,71
SD	1,83	4,75	1,77	3,46	2,54	5,09
EE	1,05	2,74	1,02	2	1,46	2,94
IC inferior 95%	95,461	81,762	87,487	81,114	81,904	73,059
IC superior 95%	104,539	105,349	96,297	98,304	94,500	98,355
SD: desviación estándar; EE: error estándar; IC: intervalos de confianza.						

**Tabla 9/6. Estadísticos descriptivos MTT: Celecoxib en cultivos sanos.**

5 días						
µM	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	100	95,43	95,64	95,27	90,84	54,99
SD	3,89	10,71	8,08	9,24	4,59	15,04
EE	1,74	4,79	3,61	4,13	2,05	6,73
IC inferior 95%	95,176	82,124	85,612	83,799	85,138	36,317
IC superior 95%	104,824	108,730	105,677	106,740	96,543	73,673
10 días						
µM	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	100	79,4	76,62	77,84	75,06	61,93
SD	3,05	4,93	3,76	5,11	6,65	3,82
EE	1,76	2,84	2,17	2,95	3,84	2,21
IC inferior 95%	92,426	67,162	67,275	65,155	58,533	52,433
IC superior 95%	107,574	91,643	85,973	90,524	91,588	71,430
15 días						
µM	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	100	88,71	86,75	79,19	62,49	37,75
SD	3,76	9,23	5,68	5,14	7,33	2,88
EE	2,17	5,33	3,28	2,97	4,23	1,66
IC inferior 95%	90,666	65,776	72,632	66,405	44,295	30,597
IC superior 95%	109,335	111,642	100,858	91,966	80,693	44,906
SD: desviación estándar; EE: error estándar; IC: intervalos de confianza.						

Apéndice: Efecto de Diferentes AINEs Sobre la Funcionalidad de los Condrocitos Humanos en Cultivo

Tabla 9/7. Estadísticos descriptivos GAG ( $\mu\text{g/mL}$ ).

5 días								
	Cultivos artrósicos				Cultivos sanos			
	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb
Media	0,134	0,068	0,068	0,049	0,115	0,046	0,094	0,050
SD	0,096	0,024	0,029	0,059	0,040	0,036	0,066	0,075
EE	0,032	0,008	0,010	0,020	0,013	0,012	0,022	0,025
IC inferior 95%	0,060	0,052	0,046	0,004	0,084	0,019	0,043	-0,008
IC superior 95%	0,208	0,086	0,090	0,094	0,146	0,074	0,144	0,108
10 días								
	Cultivos artrósicos				Cultivos sanos			
	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb
Media	0,100	0,102	0,102	0,033	0,172	0,095	0,036	0,077
SD	0,076	0,147	0,091	0,043	0,177	0,095	0,052	0,071
EE	0,020	0,038	0,023	0,011	0,046	0,025	0,013	0,018
IC inferior 95%	0,058	0,021	0,052	0,009	0,074	0,041	0,008	0,038
IC superior 95%	0,142	0,184	0,152	0,057	0,270	0,147	0,065	0,116
15 días								
	Cultivos artrósicos				Cultivos sanos			
	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb
Media	0,228	0,192	0,158	0,117	0,134	0,229	0,099	0,111
SD	0,171	0,138	0,109	0,066	0,102	0,203	0,082	0,085
EE	0,057	0,046	0,036	0,022	0,034	0,068	0,027	0,028
IC inferior 95%	0,096	0,086	0,074	0,067	0,056	0,074	0,036	0,046
IC superior 95%	0,336	0,299	0,242	0,168	0,212	0,385	0,162	0,176
<i>SD</i> : desviación estándar; <i>EE</i> : error estándar; <i>IC</i> : Intervalos de confianza.								

Tabla 9/8. Estadísticos descriptivos MMP-13 (pg/mL).

5 días								
	Cultivos artrósicos				Cultivos sanos			
	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb
Media	323,200	178,200	249,800	176,500	197,900	19,800	12,900	3,500
SD	250,100	183,000	207,000	140,800	67,700	52,600	52,100	73,100
EE	83,400	61,000	69,000	46,900	19,500	15,200	15,100	21,100
Inf.	130,884	37,530	90,682	68,288	154,880	-13,663	-20,256	-42,938
Sup.	515,449	318,804	408,984	284,712	240,870	53,163	46,006	49,938
10 días								
	Cultivos artrósicos				Cultivos sanos			
	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb
Media	748,000	486,000	568,000	933,000	14,100	37,900	-5,300	-22,100
SD	565,000	548,000	818,000	1330,000	56,100	64,100	51,100	38,600
EE	188,000	183,000	273,000	443,000	16,200	18,500	14,800	11,100
Inf.	313,550	65,325	-60,637	-89,167	-21,520	-2,831	-37,740	-46,632
Sup.	1182,780	907,675	1196,970	1955,500	49,770	78,581	27,240	2,382
15 días								
	Cultivos artrósicos				Cultivos sanos			
	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb
Media	1023,000	577,000	642,000	433,000	106,000	55,400	30,400	94,100
SD	1046,000	645,000	611,000	513,000	46,600	41,900	84,000	116,100
EE	349,000	215,000	204,000	171,000	13,500	12,100	24,200	33,500
Inf.	219,467	80,530	171,649	39,224	76,370	28,737	-22,981	20,350
Sup.	1826,870	1072,470	1111,350	827,109	135,630	82,013	83,731	167,900
SD: desviación estándar; EE: error estándar; Inf: Intervalo de Confianza inferior 95%, Sup: Intervalo de Confianza superior 95%.								

Apéndice: Efecto de Diferentes AINEs Sobre la Funcionalidad de los Condrocitos Humanos en Cultivo

Tabla 9/9. Estadísticos descriptivos IL-1B (pg/mL).

5 días								
	Cultivos artrósicos				Cultivos sanos			
	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb
Media	-0,392	0,069	0,358	0,877	2,780	0,715	-0,305	-0,703
SD	0,306	0,398	1,285	2,266	0,869	0,723	1,180	0,809
EE	0,088	0,115	0,371	0,654	0,290	0,241	0,393	0,270
Inf.	-0,587	-0,183	-0,459	-0,563	2,112	0,160	-1,211	-1,324
Sup.	-0,198	0,322	1,174	2,316	3,448	1,271	0,602	-0,081
10 días								
	Cultivos artrósicos				Cultivos sanos			
	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb
Media	0,165	0,165	0,033	0,281	0,840	-0,143	-0,218	1,387
SD	0,434	0,230	0,537	0,994	1,036	1,634	0,780	0,739
EE	0,125	0,066	0,155	0,287	0,345	0,545	0,260	0,246
Inf.	-0,110	0,019	-0,308	-0,351	0,044	-1,399	-0,817	0,819
Sup.	0,441	0,311	0,375	0,913	1,636	1,113	0,382	1,955
15 días								
	Cultivos artrósicos				Cultivos sanos			
	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb
Media	0,319	0,665	0,973	0,031	-1,076	0,168	-0,019	-0,628
SD	0,543	0,333	1,405	1,091	0,523	0,598	1,535	0,067
EE	0,157	0,096	0,406	0,315	0,174	0,199	0,512	0,022
Inf.	-0,026	0,454	0,081	-0,662	-1,478	-0,292	-1,199	-0,680
Sup.	0,664	0,877	1,866	0,724	-0,674	0,628	1,161	-0,576

SD: desviación estándar; EE: error estándar; Inf: Intervalo de Confianza inferior 95%, Sup: Intervalo de Confianza superior 95%.

Tabla 9/10. Estadísticos descriptivos TNF $\alpha$  (pg/mL).

5 días								
	Cultivos artrósicos				Cultivos sanos			
	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb
Media	5,202	7,525	5,303	-1,162	-2,000	1,680	1,860	2,390
SD	1,843	1,970	1,312	2,757	4,050	3,950	2,592	7,120
EE	0,614	0,657	0,437	0,919	1,350	1,320	0,864	2,370
Inf.	3,785	6,011	4,294	-3,281	-5,114	-1,350	-0,133	-3,091
Sup.	6,619	9,039	6,312	0,957	1,114	4,718	3,852	7,863
10 días								
	Cultivos artrósicos				Cultivos sanos			
	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb
Media	0,960	1,970	5,203	-1,970	6,250	1,680	5,370	6,950
SD	0,922	1,050	1,492	0,787	3,230	4,560	5,820	5,010
EE	0,307	0,350	0,497	0,262	1,080	1,520	1,940	1,670
Inf.	0,251	1,163	4,056	-2,257	3,760	-1,819	0,895	3,093
Sup.	1,668	2,777	6,349	-1,365	8,731	5,188	9,842	10,801
15 días								
	Cultivos artrósicos				Cultivos sanos			
	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb
Media	2,071	10,556	6,010	5,909	5,540	8,350	0,280	9,404
SD	2,891	1,707	1,445	1,050	8,410	4,470	4,140	2,592
EE	0,964	0,569	0,482	0,350	2,800	1,490	1,380	0,864
Inf.	-0,151	9,243	4,899	5,102	-0,920	4,912	-2,898	7,411
Sup.	4,297	22,868	7,121	6,716	12,007	11,790	3,460	11,396

SD: desviación estándar; EE: error estándar; Inf: Intervalo de Confianza inferior 95%, Sup: Intervalo de Confianza superior 95%.

Apéndice: Efecto de Diferentes AINEs Sobre la Funcionalidad de los Condrocitos Humanos en Cultivo

Tabla 9/11. Estadísticos descriptivos IL-6 (pg/mL).

5 días								
	Cultivos artrósicos				Cultivos sanos			
	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb
Media	236,800	195,000	212,500	184,300	190,350	185,380	176,900	184,420
SD	72,000	41,500	84,800	62,000	8,690	8,180	10,020	5,650
EE	20,800	12,000	24,500	17,900	2,900	2,730	3,340	1,880
Inf.	191,104	168,634	158,595	144,923	183,669	179,092	169,198	180,074
Sup.	282,570	221,344	266,383	223,751	197,031	191,665	184,610	188,762
10 días								
	Cultivos artrósicos				Cultivos sanos			
	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb
Media	278,100	235,300	287,700	307,500	197,020	174,020	173,340	184,470
SD	223,800	181,600	244,100	279,200	6,210	12,460	11,850	7,260
EE	64,600	52,400	70,500	80,600	2,070	4,150	3,950	2,420
Inf.	135,923	119,925	132,613	130,077	192,242	164,445	164,238	178,898
Sup.	420,251	350,705	442,800	484,901	201,792	183,601	182,451	190,051
15 días								
	Cultivos artrósicos				Cultivos sanos			
	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb
Media	243,800	214,600	203,000	222,000	190,580	166,680	177,690	211,030
SD	225,100	192,200	181,500	193,100	2,040	9,250	21,890	4,510
EE	65,000	55,500	52,400	55,700	0,680	3,080	7,300	1,500
Inf.	100,818	92,446	87,710	99,318	189,009	159,570	160,870	207,561
Sup.	386,878	336,663	318,355	344,682	192,144	173,786	194,520	214,495
SD: desviación estándar; EE: error estándar; Inf: Intervalo de Confianza inferior 95%, Sup: Intervalo de Confianza superior 95%.								

Tabla 9/12. Estadísticos descriptivos caspasa-9 (pg/mL).

5 días								
	Cultivos artrósicos				Cultivos sanos			
	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb
Media	2740,000	2128,000	3928,000	3278,000	1955,000	1522,000	2172,000	1172,000
SD	1161,000	383,000	3310,000	2028,000	1056,000	1568,000	2323,000	1178,000
EE	335,000	110,000	956,000	585,000	352,000	523,000	774,000	393,000
Inf.	2002,330	1884,380	1824,440	1989,110	1143,360	316,167	385,889	266,503
Sup.	3477,670	2370,620	6030,560	4565,890	2766,640	2727,170	3957,440	2076,830
10 días								
	Cultivos artrósicos				Cultivos sanos			
	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb
Media	4003,000	2953,000	2024,000	2265,000	1055,000	822,000	372,000	122,000
SD	1978,000	1245,000	1502,000	1230,000	1425,000	1008,000	1083,000	1845,000
EE	571,000	360,000	433,000	355,000	475,000	336,000	361,000	615,000
Inf.	2745,690	2161,220	1069,660	1483,660	-40,266	47,234	-460,416	-1296,710
Sup.	5259,310	3743,780	2977,840	3046,340	2150,270	1596,100	1203,750	1540,050
15 días								
	Cultivos artrósicos				Cultivos sanos			
	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb
Media	2578,000	2790,000	4028,000	3340,000	3638,000	2155,000	4305,000	722,000
SD	577,000	1429,000	1751,000	818,000	1881,000	1306,000	1403,000	961,000
EE	167,000	413,000	505,000	236,000	627,000	435,000	468,000	320,000
Inf.	2210,720	1881,750	2915,220	2820,370	2192,800	1151,470	3226,550	-16,737
Sup.	2944,280	3698,250	5139,780	3859,630	5083,870	3158,530	5383,450	1460,070
SD: desviación estándar; EE: error estándar; Inf: Intervalo de Confianza inferior 95%, Sup: Intervalo de Confianza superior 95%.								

Apéndice: Efecto de Diferentes AINES Sobre la Funcionalidad de los Condrocitos Humanos en Cultivo

Tabla 9/13. Estadísticos descriptivos TRAIL (pg/mL).

5 días								
	Cultivos artrósicos				Cultivos sanos			
	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb
Media	8,880	14,600	11,024	17,210	5,460	3,274	5,710	2,380
SD	4,120	7,730	1,988	7,500	7,140	3,326	8,670	5,140
EE	1,370	2,580	0,663	2,500	2,060	0,960	2,500	1,480
Inf.	5,715	8,650	9,495	11,449	0,921	1,161	0,207	-0,887
Sup.	12,047	20,540	12,552	22,979	9,991	5,387	11,222	5,649
10 días								
	Cultivos artrósicos				Cultivos sanos			
	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb
Media	10,310	10,548	12,210	5,786	6,389	5,420	7,080	2,520
SD	5,150	0,945	3,440	0,619	3,423	4,180	5,050	1,065
EE	1,720	0,315	1,150	0,206	0,988	1,210	1,460	0,307
Inf.	6,350	9,821	9,567	5,310	4,214	2,760	3,876	1,843
Sup.	14,269	11,274	14,862	6,261	8,564	8,074	10,291	3,196
15 días								
	Cultivos artrósicos				Cultivos sanos			
	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb
Media	10,790	2,690	10,071	12,690	7,740	7,480	7,960	6,310
SD	11,290	3,520	2,143	13,070	4,310	9,740	7,970	5,450
EE	3,760	1,170	0,714	4,360	1,240	2,810	2,300	1,570
Inf.	2,109	-0,013	8,424	2,645	4,998	1,290	2,894	2,846
Sup.	19,463	5,394	11,719	22,736	10,478	13,670	13,019	9,773

*SD*: desviación estándar; *EE*: error estándar; *Inf*: Intervalo de Confianza inferior 95%, *Sup*: Intervalo de Confianza superior 95%.

Tabla 9/14. Estadísticos descriptivos fibronectina (pg/mL).

5 días								
	Cultivos artrósicos				Cultivos sanos			
	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb
Media	2760,000	3686,900	3936,300	3865,000	5194,000	5313,000	5134,000	5352,300
SD	422,000	236,800	89,900	144,100	1203,000	1049,000	602,000	171,300
EE	122,000	68,400	26,000	41,600	401,000	350,000	201,000	57,100
Inf.	2491,640	3536,410	3879,100	3773,422	4268,950	4506,220	4671,140	5220,630
Sup.	3028,360	3837,340	3993,400	3956,580	6118,440	6118,950	5596,810	5483,980
10 días								
	Cultivos artrósicos				Cultivos sanos			
	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb
Media	2019,400	2776,300	3741,000	2601,300	5061,000	5228,000	4892,000	4444,000
SD	264,000	269,800	1886,000	331,600	1789,000	1691,000	1515,000	1472,000
EE	76,200	77,900	545,000	95,700	596,000	564,000	505,000	491,000
Inf.	1851,610	2604,820	2542,210	2390,570	3685,730	3927,700	3727,730	3312,130
Sup.	2187,140	2947,680	4939,420	2811,930	6436,660	6528,020	6056,880	5575,820
15 días								
	Cultivos artrósicos				Cultivos sanos			
	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb	Ctrl	Ind	Dcf	Cxb
Media	2725,000	2743,100	3040,000	2898,800	3631,000	4105,000	3792,000	4022,000
SD	583,000	233,900	61,500	310,800	477,000	366,000	776,000	469,000
EE	168,000	67,500	17,800	89,700	159,000	122,000	259,000	156,000
Inf.	2354,700	2594,530	3000,920	2701,290	3264,210	3823,710	3195,310	3661,370
Sup.	3095,300	2891,720	3079,080	3096,210	3998,180	4386,460	4388,740	4382,130
SD: desviación estándar; EE: error estándar; Inf: Intervalo de Confianza inferior 95%, Sup: Intervalo de Confianza superior 95%.								

**Tabla 9/15. Cuadro resumen del análisis estadístico de las pruebas colorimétricas. Controles y comparación entre controles.**

	MTT	sGAG	MMP13	IL1b	TNFa	IL6	Casp9	TRAIL	FN
AC5 - AC10									
AC5 - AC15									
AC10 - AC15									
SC5 - SC10									
SC5 - SC15									
SC10 - SC15									
AC5 - SC5									
AC10 - SC10									
AC15 - SC15									

*En gris: Existen diferencias significativas entre pares de muestras. 5, 10, 15: días. A: Artrósico. S: Sano. C: Control. I: Indometacina. D: Diclofenaco. B: Celecoxib.*

**Tabla 9/16. Cuadro resumen del análisis estadístico de las pruebas colorimétricas. Indometacina en cultivos artrósicos.**

	MTT	sGAG	MMP13	IL1b	TNFa	IL6	Casp9	TRAIL	FN
AI5 - AI10									
AI5 - AI15									
AI10 - AI15									
AC5 - AI5									
AC10 - AI10									
AC15 - AI15									
SC5 - AI5									
SC10 - AI10									
SC15 - AI15									

*En gris: Existen diferencias significativas entre pares de muestras. 5, 10, 15: días. A: Artrósico. S: Sano. C: Control. I: Indometacina. D: Diclofenaco. B: Celecoxib.*

**Tabla 9/17. Cuadro resumen del análisis estadístico de las pruebas colorimétricas. Indometacina en cultivos sanos.**

	MTT	sGAG	MMP13	IL1b	TNFa	IL6	Casp9	TRAIL	FN
S15 - S10									
S15 - S15									
S10 - S15									
SC5 - S15									
SC10 - S10									
SC15 - S15									

*En gris: Existen diferencias significativas entre pares de muestras. 5, 10, 15: días. A: Artrósico. S: Sano. C: Control. I: Indometacina. D: Diclofenaco. B: Celecoxib.*

**Tabla 9/18. Cuadro resumen del análisis estadístico de las pruebas colorimétricas. Diclofenaco en cultivos artrósicos.**

	MTT	sGAG	MMP13	IL1b	TNFa	IL6	Casp9	TRAIL	FN
AD5 - AD10									
AD5 - AD15									
AD10 - AD15									
AC5 - AD5									
AC10 - AD10									
AC15 - AD15									
SC5 - AD5									
SC10 - AD10									
SC15 - AD15									

*En gris: Existen diferencias significativas entre pares de muestras. 5, 10, 15: días. A: Artrósico. S: Sano. C: Control. I: Indometacina. D: Diclofenaco. B: Celecoxib.*

Apéndice: Efecto de Diferentes AINEs Sobre la Funcionalidad de los  
Condrocitos Humanos en Cultivo

**Tabla 9/19. Cuadro resumen del análisis estadístico de las pruebas colorimétricas. Diclofenaco en cultivos sanos.**

	MTT	sGAG	MMP13	IL1b	TNFa	IL6	Casp9	TRAIL	FN
SD5 - SD10									
SD5 - SD15									
SD10 - SD15									
SC5 - SD5									
SC10 - SD10									
SC15 - SD15									

*En gris: Existen diferencias significativas entre pares de muestras. 5, 10, 15: días.  
A: Artrósico. S: Sano. C: Control. I: Indometacina. D: Diclofenaco. B: Celecoxib.*

**Tabla 9/20. Cuadro resumen del análisis estadístico de las pruebas colorimétricas. Celecoxib en cultivos artrósicos.**

	MTT	sGAG	MMP13	IL1b	TNFa	IL6	Casp9	TRAIL	FN
AB5 - AB10									
AB5 - AB15									
AB10 - AB15									
AC5 - AB5									
AC10 - AB10									
AC15 - AB15									
SC5 - AB5									
SC10 - AB10									
SC15 - AB15									

*En gris: Existen diferencias significativas entre pares de muestras. 5, 10, 15: días.  
A: Artrósico. S: Sano. C: Control. I: Indometacina. D: Diclofenaco. B: Celecoxib.*

**Tabla 9/21. Cuadro resumen del análisis estadístico de las pruebas colorimétricas. Celecoxib en cultivos sanos.**

	MTT	sGAG	MMP13	IL1b	TNFa	IL6	Casp9	TRAIL	FN
SB5 - SB10									
SB5 - SB15									
SB10 - SB15									
SC5 - SB5									
SC10 - SB10									
SC15 - SB15									

*En gris: Existen diferencias significativas entre pares de muestras. 5, 10, 15: días.  
A: Artrósico. S: Sano. C: Control. I: Indometacina. D: Diclofenaco. B: Celecoxib.*

**Tabla 9/22. Cuadro resumen del análisis estadístico de las pruebas colorimétricas. Comparación entre fármacos en cultivos artrósicos.**

	MTT	sGAG	MMP13	IL1b	TNFa	IL6	Casp9	TRAIL	FN
AI5 - AD5									
AI10 - AD10									
AI15 - AD15									
AI5 - AB5									
AI10 - AB10									
AI15 - AB15									
AD5 - AB5									
AD10 - AB10									
AD15 - AB15									

*En gris: Existen diferencias significativas entre pares de muestras. 5, 10, 15: días.  
A: Artrósico. S: Sano. C: Control. I: Indometacina. D: Diclofenaco. B: Celecoxib.*

**Tabla 9/23. Cuadro resumen del análisis estadístico de las pruebas colorimétricas. Comparación entre fármacos en cultivos sanos.**

	MTT	sGAG	MMP13	IL1b	TNFa	IL6	Casp9	TRAIL	FN
SI5 - SD5									
SI10 - SD10									
SI15 - SD15									
SI5 - SB5									
SI10 - SB10									
SI15 - SB15									
SD5 - SB5									
SD10 - SB10									
SD15 - SB15									

*En gris: Existen diferencias significativas entre pares de muestras. 5, 10, 15: días. A: Artrósico. S: Sano. C: Control. I: Indometacina. D: Diclofenaco. B: Celecoxib.*

**Tabla 9/24. Cuadro resumen del análisis estadístico de las pruebas colorimétricas. Comparación entre controles y del efecto de cada tratamiento entre cultivos celulares sanos y artrósicos.**

	MTT	sGAG	MMP13	IL1b	TNFa	IL6	Casp9	TRAIL	FN
AC5 - SC5									
AC10 - SC10									
AC15 - SC15									
AI5 - SI5									
AI10 - SI10									
AI15 - SI15									
AD5 - SD5									
AD10 - SD10									
AD15 - SD15									
AB5 - SB5									
AB10 - SB10									
AB15 - SB15									

*En gris: Existen diferencias significativas entre pares de muestras. 5, 10, 15: días. A: Artrósico. S: Sano. C: Control. I: Indometacina. D: Diclofenaco. B: Celecoxib.*

**Tabla 9/25. Estadísticos descriptivos para el ensayo de cicatrización: Controles a tiempo cero.**

0 horas		
	0 $\mu$ M, Artrósico	0 $\mu$ M, Sano
Media	58,600	80,330
SD	4,120	6,970
EE	2,060	3,480
IC inferior 95%	52,039	69,248
IC superior 95%	65,152	91,417

*SD*: desviación estándar; *EE*: error estándar; *IC*: intervalos de confianza.

**Tabla 9/26. Estadísticos descriptivos para el ensayo de cicatrización:  
Indometacina en cultivos artrósicos.**

4 horas						
	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	63,280	72,090	72,170	69,880	66,910	79,080
SD	7,640	7,740	3,930	6,710	9,730	6,050
EE	3,820	3,460	1,760	3,000	3,970	2,140
IC inferior 95%	51,114	62,484	67,284	61,545	56,704	74,019
IC superior 95%	75,443	81,700	77,050	78,206	77,122	84,137
12 horas						
	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	55,960	49,310	57,400	63,260	54,980	84,590
SD	15,780	8,930	10,210	12,550	9,260	4,100
EE	5,960	4,470	4,570	6,280	4,630	2,370
IC inferior 95%	41,368	35,104	44,721	43,287	40,242	74,397
IC superior 95%	70,556	63,525	70,083	83,236	69,713	94,775
20 horas						
	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	21,970	23,273	29,640	34,110	77,370	92,229
SD	9,600	0,148	6,910	14,380	6,080	1,094
EE	5,540	0,086	2,820	8,300	3,510	0,631
IC inferior 95%	-1,889	22,906	22,387	-1,620	62,264	89,512
IC superior 95%	45,821	23,641	36,889	69,831	92,468	94,946
SD: desviación estándar; EE: error estándar; IC: intervalos de confianza.						

**Tabla 9/27. Estadísticos descriptivos para el ensayo de cicatrización: Diclofenaco en cultivos artrósicos.**

4 horas						
	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	63,280	76,290	76,420	84,280	80,960	86,510
SD	7,640	7,570	6,720	4,010	6,690	2,470
EE	3,820	3,780	3,360	2,320	3,350	1,230
IC inferior 95%	51,114	64,246	65,725	74,318	70,307	82,581
IC superior 95%	75,443	88,330	87,122	94,243	91,611	90,440
12 horas						
	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	55,960	56,890	64,660	54,260	64,490	84,610
SD	15,780	16,870	11,360	13,570	9,430	4,730
EE	5,960	8,440	5,680	6,780	4,220	2,370
IC inferior 95%	41,368	30,037	46,590	32,672	52,779	77,072
IC superior 95%	70,556	83,736	82,737	75,852	76,201	92,139
20 horas						
	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	21,970	31,600	38,610	26,630	60,420	96,056
SD	9,600	20,000	13,030	5,380	5,970	0,796
EE	5,540	11,500	7,530	3,110	3,450	0,460
IC inferior 95%	-1,889	-18,115	6,233	13,254	45,586	94,079
IC superior 95%	45,821	81,222	70,991	40,001	75,258	98,033
SD: desviación estándar; EE: error estándar; IC: intervalos de confianza.						

**Tabla 9/28. Estadísticos descriptivos para el ensayo de cicatrización: Celecoxib en cultivos artrósicos.**

4 horas						
	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	63,280	65,600	70,060	79,700	82,020	86,820
SD	7,640	4,870	3,430	3,120	2,670	4,360
EE	3,820	1,990	1,980	1,800	1,540	2,520
IC inferior 95%	51,114	60,489	61,549	71,955	75,376	75,979
IC superior 95%	75,443	70,708	78,575	87,439	88,662	97,657
12 horas						
	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	55,960	52,620	55,610	63,950	64,270	85,440
SD	15,780	9,270	10,910	12,310	9,800	2,140
EE	5,960	4,150	5,450	5,510	4,900	1,230
IC inferior 95%	41,368	41,108	38,255	48,660	48,684	80,132
IC superior 95%	70,556	64,131	72,968	79,233	79,862	90,757
20 horas						
	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	21,970	40,760	53,680	65,260	52,160	94,822
SD	9,600	6,590	7,710	2,360	10,510	0,592
EE	5,540	3,810	4,450	1,360	6,070	0,342
IC inferior 95%	-1,889	24,378	34,516	59,393	26,061	93,351
IC superior 95%	45,821	57,139	72,836	71,128	78,258	96,292
SD: desviación estándar; EE: error estándar; IC: intervalos de confianza.						

**Tabla 9/29. Estadísticos descriptivos para el ensayo de cicatrización: Indometacina en cultivos sanos.**

4 horas						
	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	68,360	57,990	67,120	72,680	74,320	88,910
SD	10,700	6,780	7,120	2,110	7,110	5,880
EE	6,180	3,910	3,190	1,220	4,110	3,390
IC inferior 95%	41,786	41,151	58,273	67,431	56,653	74,310
IC superior 95%	94,931	74,827	75,962	77,927	91,993	103,619
12 horas						
	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	55,500	47,070	50,150	58,320	46,620	81,075
SD	5,610	17,730	8,120	9,930	7,650	0,585
EE	2,800	8,870	4,060	4,970	2,890	0,338
IC inferior 95%	46,574	18,855	37,233	42,516	39,548	79,623
IC superior 95%	64,418	75,291	63,059	74,130	53,690	82,527
20 horas						
	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	31,980	35,180	19,880	22,097	30,880	94,962
SD	4,710	12,250	1,860	0,845	4,930	0,406
EE	2,720	7,070	1,080	0,488	2,850	0,235
IC inferior 95%	20,279	4,760	15,248	19,999	18,634	93,953
IC superior 95%	43,687	65,608	24,508	24,195	43,135	95,971
SD: desviación estándar; EE: error estándar; IC: intervalos de confianza.						

**Tabla 9/30. Estadísticos descriptivos para el ensayo de cicatrización:  
Diclofenaco en cultivos sanos.**

4 horas						
	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	68,360	76,930	84,410	78,466	81,300	86,640
SD	10,700	5,160	3,080	1,556	9,360	5,960
EE	6,180	2,580	1,540	0,898	5,400	3,440
IC inferior 95%	41,786	68,730	79,502	74,601	58,053	71,637
IC superior 95%	94,931	85,137	89,315	82,332	104,556	101,452
12 horas						
	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	55,500	55,900	49,000	57,510	57,540	79,040
SD	5,610	4,270	4,120	6,510	10,630	8,400
EE	2,800	1,910	2,060	3,260	5,320	4,850
IC inferior 95%	46,574	50,592	42,444	47,152	40,621	58,169
IC superior 95%	64,418	61,199	55,564	67,871	74,463	99,912
20 horas						
	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	31,980	21,080	22,030	21,490	28,840	91,786
SD	4,710	4,260	3,570	3,350	10,190	1,043
EE	2,720	2,460	2,060	1,930	5,880	0,602
IC inferior 95%	20,279	10,504	13,174	13,712	3,533	89,194
IC superior 95%	43,687	31,664	30,887	29,808	54,138	94,378
SD: desviación estándar; EE: error estándar; IC: intervalos de confianza.						

**Tabla 9/31. Estadísticos descriptivos para el ensayo de cicatrización: Celecoxib en cultivos sanos.**

4 horas						
	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	68,360	61,270	61,950	80,640	67,820	87,490
SD	10,700	11,920	11,880	7,010	15,920	2,460
EE	6,180	5,330	5,310	3,500	7,960	1,230
IC inferior 95%	41,786	46,471	47,206	69,486	42,484	83,580
IC superior 95%	94,931	76,063	76,699	91,786	93,156	91,399
12 horas						
	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	55,500	63,450	55,810	59,840	51,270	83,690
SD	5,610	10,080	4,540	5,510	8,760	0,469
EE	2,800	5,040	2,620	2,760	4,380	0,234
IC inferior 95%	46,574	47,408	44,547	51,072	37,335	82,944
IC superior 95%	64,418	79,486	67,081	68,617	65,209	84,436
20 horas						
	0	0.01	0.1	1	10	100
Media	31,980	24,520	33,020	25,350	47,790	91,782
SD	4,710	2,110	6,460	3,590	13,290	1,590
EE	2,720	1,050	3,730	2,070	7,670	0,918
IC inferior 95%	20,279	21,161	16,965	16,439	14,775	87,832
IC superior 95%	43,687	27,870	49,066	34,254	80,809	95,733
SD: desviación estándar; EE: error estándar; IC: intervalos de confianza.						

**Tabla 9/32. Cuadro resumen del análisis estadístico del ensayo de cicatrización. Controles y comparación entre controles.**

AC0-SC0		AC0-AC4		SC0-SC4	
AC4-SC4		AC0-AC12		SC0-SC12	
AC12-SC12		AC0-AC20		SC0-SC20	
AC20-SC20		AC4-AC12		SC4-SC12	
		AC4-AC20		SC4-SC20	
		AC12-AC20		SC12-SC20	

*En gris: Existen diferencias significativas entre pares de muestras.*  
A: Artrósico. S: Sano. C: Control. I: Indometacina. D: Diclofenaco. B: Celecoxib.  
0, 4, 12, 20: horas.

**Tabla 9/33. Cuadro resumen del análisis estadístico del ensayo de cicatrización. Indometacina en cultivos artrósicos.**

AC0-AI4		AC4-AI4		SC4-AI4	
AC0-AI12		AC12-AI12		SC12-AI12	
AC0-AI20		AC20-AI20		SC20-AI20	
AI4-AI12					
AI4-AI20					
AI12-AI20					

*En gris: Existen diferencias significativas entre pares de muestras.*  
A: Artrósico. S: Sano. C: Control. I: Indometacina. D: Diclofenaco. B: Celecoxib.  
0, 4, 12, 20: horas.

**Tabla 9/34. Cuadro resumen del análisis estadístico del ensayo de cicatrización. Indometacina en cultivos sanos.**

<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 50%;">SC0-SI4</td><td style="width: 50%;"></td></tr> <tr><td>SC0-SI12</td><td style="background-color: #cccccc;"></td></tr> <tr><td>SC0-SI20</td><td style="background-color: #cccccc;"></td></tr> <tr><td>SI4-SI12</td><td></td></tr> <tr><td>SI4-SI20</td><td style="background-color: #cccccc;"></td></tr> <tr><td>SI12-SI20</td><td style="background-color: #cccccc;"></td></tr> </table>	SC0-SI4		SC0-SI12		SC0-SI20		SI4-SI12		SI4-SI20		SI12-SI20		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 50%;">SC4-SI4</td><td style="width: 50%;"></td></tr> <tr><td>SC12-SI12</td><td></td></tr> <tr><td>SC20-SI20</td><td></td></tr> </table>	SC4-SI4		SC12-SI12		SC20-SI20	
SC0-SI4																			
SC0-SI12																			
SC0-SI20																			
SI4-SI12																			
SI4-SI20																			
SI12-SI20																			
SC4-SI4																			
SC12-SI12																			
SC20-SI20																			
<p><i>En gris:</i> Existen diferencias significativas entre pares de muestras.  A: Artrósico. S: Sano. C: Control. I: Indometacina. D: Diclofenaco. B: Celecoxib.  0, 4, 12, 20: horas.</p>																			

**Tabla 9/35. Cuadro resumen del análisis estadístico del ensayo de cicatrización. Diclofenaco en cultivos artrósicos.**

<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 50%;">AC0-AD4</td><td style="width: 50%;"></td></tr> <tr><td>AC0-AD12</td><td></td></tr> <tr><td>AC0-AD20</td><td style="background-color: #cccccc;"></td></tr> <tr><td>AD4-AD12</td><td style="background-color: #cccccc;"></td></tr> <tr><td>AD4-AD20</td><td style="background-color: #cccccc;"></td></tr> <tr><td>AD12-AD20</td><td style="background-color: #cccccc;"></td></tr> </table>	AC0-AD4		AC0-AD12		AC0-AD20		AD4-AD12		AD4-AD20		AD12-AD20		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 50%;">AC4-AD4</td><td style="width: 50%;"></td></tr> <tr><td>AC12-AD12</td><td></td></tr> <tr><td>AC20-AD20</td><td></td></tr> </table>	AC4-AD4		AC12-AD12		AC20-AD20		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 50%;">SC4-AD4</td><td style="width: 50%;"></td></tr> <tr><td>SC12-AD12</td><td></td></tr> <tr><td>SC20-AD20</td><td></td></tr> </table>	SC4-AD4		SC12-AD12		SC20-AD20	
AC0-AD4																										
AC0-AD12																										
AC0-AD20																										
AD4-AD12																										
AD4-AD20																										
AD12-AD20																										
AC4-AD4																										
AC12-AD12																										
AC20-AD20																										
SC4-AD4																										
SC12-AD12																										
SC20-AD20																										
<p><i>En gris:</i> Existen diferencias significativas entre pares de muestras.  A: Artrósico. S: Sano. C: Control. I: Indometacina. D: Diclofenaco. B: Celecoxib.  0, 4, 12, 20: horas.</p>																										

**Tabla 9/36. Cuadro resumen del análisis estadístico del ensayo de cicatrización. Diclofenaco en cultivos sanos.**

SC0-SD4		SC4-SD4	
SC0-SD12		SC12-SD12	
SC0-SD20		SC20-SD20	
SD4-SD12			
SD4-SD20			
SD12-SD20			

*En gris:* Existen diferencias significativas entre pares de muestras.  
A: Artrósico. S: Sano. C: Control. I: Indometacina. D: Diclofenaco. B: Celecoxib.  
0, 4, 12, 20: horas.

**Tabla 9/37. Cuadro resumen del análisis estadístico del ensayo de cicatrización. Celecoxib en cultivos artrósicos.**

AC0-AB4		AC4-AB4		SC4-AB4	
AC0-AB12		AC12-AB12		SC12-AB12	
AC0-AB20		AC20-AB20		SC20-AB20	
AB4-AB12					
AB4-AB20					
AB12-AB20					

*En gris:* Existen diferencias significativas entre pares de muestras.  
A: Artrósico. S: Sano. C: Control. I: Indometacina. D: Diclofenaco. B: Celecoxib.  
0, 4, 12, 20: horas.

**Tabla 9/38. Cuadro resumen del análisis estadístico del ensayo de cicatrización. Celecoxib en cultivos sanos.**

<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 50%;">SC0-SB4</td><td style="width: 50%;"></td></tr> <tr><td>SC0-SB12</td><td style="background-color: #cccccc;"></td></tr> <tr><td>SC0-SB20</td><td style="background-color: #cccccc;"></td></tr> <tr><td>SB4-SB12</td><td style="background-color: #cccccc;"></td></tr> <tr><td>SB4-SB20</td><td style="background-color: #cccccc;"></td></tr> <tr><td>SB12-SB20</td><td style="background-color: #cccccc;"></td></tr> </table>	SC0-SB4		SC0-SB12		SC0-SB20		SB4-SB12		SB4-SB20		SB12-SB20		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 50%;">SC4-SB4</td><td style="width: 50%;"></td></tr> <tr><td>SC12-SB12</td><td></td></tr> <tr><td>SC20-SB20</td><td></td></tr> </table>	SC4-SB4		SC12-SB12		SC20-SB20	
SC0-SB4																			
SC0-SB12																			
SC0-SB20																			
SB4-SB12																			
SB4-SB20																			
SB12-SB20																			
SC4-SB4																			
SC12-SB12																			
SC20-SB20																			
<p><i>En gris: Existen diferencias significativas entre pares de muestras.</i>                      A: Artrósico. S: Sano. C: Control. I: Indometacina. D: Diclofenaco. B: Celecoxib.                      0, 4, 12, 20: horas.</p>																			

**Tabla 9/39. Cuadro resumen del análisis estadístico del ensayo de cicatrización. Comparación entre fármacos en cultivos artrósicos.**

<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 50%;">AI4-AD4</td><td style="width: 50%;"></td></tr> <tr><td>AI12-AD12</td><td></td></tr> <tr><td>AI20-AD20</td><td></td></tr> </table>	AI4-AD4		AI12-AD12		AI20-AD20		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 50%;">AI4-AB4</td><td style="width: 50%;"></td></tr> <tr><td>AI12-AB12</td><td></td></tr> <tr><td>AI20-AB20</td><td></td></tr> </table>	AI4-AB4		AI12-AB12		AI20-AB20		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 50%;">AD4-AB4</td><td style="width: 50%;"></td></tr> <tr><td>AD12-AB12</td><td></td></tr> <tr><td>AD20-AB20</td><td style="background-color: #cccccc;"></td></tr> </table>	AD4-AB4		AD12-AB12		AD20-AB20	
AI4-AD4																				
AI12-AD12																				
AI20-AD20																				
AI4-AB4																				
AI12-AB12																				
AI20-AB20																				
AD4-AB4																				
AD12-AB12																				
AD20-AB20																				
<p><i>En gris: Existen diferencias significativas entre pares de muestras.</i>                      A: Artrósico. S: Sano. C: Control. I: Indometacina. D: Diclofenaco. B: Celecoxib.                      0, 4, 12, 20: horas.</p>																				

**Tabla 9/40. Cuadro resumen del análisis estadístico del ensayo de cicatrización. Comparación entre fármacos en cultivos sanos.**

<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 50%;">SI4-SD4</td><td style="width: 50%;"></td></tr> <tr><td>SI12-SD12</td><td></td></tr> <tr><td>SI20-SD20</td><td></td></tr> </table>	SI4-SD4		SI12-SD12		SI20-SD20		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 50%;">SI4-SB4</td><td style="width: 50%;"></td></tr> <tr><td>SI12-SB12</td><td></td></tr> <tr><td>SI20-SB20</td><td></td></tr> </table>	SI4-SB4		SI12-SB12		SI20-SB20		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 50%;">SD4-SB4</td><td style="width: 50%;"></td></tr> <tr><td>SD12-SB12</td><td></td></tr> <tr><td>SD20-SB20</td><td></td></tr> </table>	SD4-SB4		SD12-SB12		SD20-SB20	
SI4-SD4																				
SI12-SD12																				
SI20-SD20																				
SI4-SB4																				
SI12-SB12																				
SI20-SB20																				
SD4-SB4																				
SD12-SB12																				
SD20-SB20																				
<p><i>En gris: Existen diferencias significativas entre pares de muestras.</i>                      A: Artrósico. S: Sano. C: Control. I: Indometacina. D: Diclofenaco. B: Celecoxib.                      0, 4, 12, 20: horas.</p>																				

Tabla 9/41. Cuadro resumen del análisis estadístico del ensayo de cicatrización. Comparación del efecto de cada tratamiento entre las líneas celulares.

		AC0-SC0			
		AC4-SC4			
		AC12-SC12			
		AC20-SC20			
AI4-SI4		AD4-SD4		AB4-SB4	
AI12-SI12		AD12-SD12		AB12-SB12	
AI20-SI20		AD20-SD20		AB20-SB20	

*En gris:* Existen diferencias significativas entre pares de muestras.  
A: Artrósico. S: Sano. C: Control. I: Indometacina. D: Diclofenaco. B: Celecoxib.  
0, 4, 12, 20: horas.



## *10. BIBLIOGRAFÍA*



## 10.BIBLIOGRAFÍA

- (1) Abazari A, Jomha NM, Elliott JA, McGann LE. Cryopreservation of articular cartilage. *Cryobiology* 2013 Jun;66(3):201-209.
- (2) Abramson SB. Osteoarthritis and nitric oxide. *Osteoarthritis Cartilage* 2008;16 Suppl 2:S15-20.
- (3) Adeyemi WJ, Olayaki LA. Effects of single or combined administration of salmon calcitonin and omega-3 fatty acids vs. diclofenac sodium in sodium monoiodoacetate-induced knee osteoarthritis in male Wistar rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2017 Nov 27;28(6):573-582.
- (4) Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, AEMPS. Informe de utilización de medicamentos U/AIN/V1/11/09/2017. Utilización de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos en España durante el periodo 2013-2016. 2017; Available at: <https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/observatorio/docs/antiinflamatorios-AINEs-periodo-2013-2016.pdf?x58892>. Accessed 06/19, 2020.
- (5) Aigner T, Fundel K, Saas J, Gebhard PM, Haag J, Weiss T, et al. Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2006 Nov;54(11):3533-3544.
- (6) Aizawa T, Kon T, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Induction of apoptosis in chondrocytes by tumor necrosis factor-alpha. *J Orthop Res* 2001 Sep;19(5):785-796.
- (7) Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2011 Mar;127(3):701-21.e1-70.

(8) Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. The Extracellular Matrix of Animals. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26810/>.

(9) Allen KD, Golightly YM. State of the evidence. *Curr Opin Rheumatol* 2015 May;27(3):276-283.

(10) Alvarez-Soria MA, Herrero-Beaumont G, Moreno-Rubio J, Calvo E, Santillana J, Egido J, et al. Long-term NSAID treatment directly decreases COX-2 and mPGES-1 production in the articular cartilage of patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2008 Dec;16(12):1484-1493.

(11) Alvarez-Soria MA, Herrero-Beaumont G, Sánchez-Pernaute O, Bellido M, Largo R. Diacerein has a weak effect on the catabolic pathway of human osteoarthritis synovial fibroblast--comparison to its effects on osteoarthritic chondrocytes. *Rheumatology (Oxford)* 2008 May;47(5):627-633.

(12) Appleton CT, McErlain DD, Pitelka V, Schwartz N, Bernier SM, Henry JL, et al. Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2007;9(1):R13.

(13) Appleton CT, Pitelka V, Henry J, Beier F. Global analyses of gene expression in early experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2007 Jun;56(6):1854-1868.

(14) Arden N, Nevitt MC. Osteoarthritis: epidemiology. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006 Feb;20(1):3-25.

(15) Arisan ED, Ergul Z, Bozdogan G, Rencuzogullari O, Coker-Gurkan A, Obakan-Yerlikaya P, et al. Diclofenac induced apoptosis via altering PI3K/Akt/MAPK signaling axis in HCT 116 more efficiently compared to SW480 colon cancer cells. *Mol Biol Rep* 2018 Dec;45(6):2175-2184.

(16) Ashraf S, Cha BH, Kim JS, Ahn J, Han I, Park H, et al. Regulation of senescence associated signaling mechanisms in chondrocytes for cartilage tissue regeneration. *Osteoarthritis Cartilage* 2016 Feb;24(2):196-205.

- (17) Attur M, Al-Mussawir HE, Patel J, Kitay A, Dave M, Palmer G, et al. Prostaglandin E2 exerts catabolic effects in osteoarthritis cartilage: evidence for signaling via the EP4 receptor. *J Immunol* 2008 Oct 1;181(7):5082-5088.
- (18) Bar-Or D, Rael LT, Thomas GW, Brody EN. Inflammatory Pathways in Knee Osteoarthritis: Potential Targets for Treatment. *Curr Rheumatol Rev* 2015;11(1):50-58.
- (19) Barracchini A, Franceschini N, Minisola G, Pantaleoni GC, Di Giulio AD, Oratore A, et al. Meloxicam and indomethacin activity on human matrix metalloproteinases in synovial fluid. *Ann N Y Acad Sci* 1999 Jun 30;878:665-666.
- (20) Bassleer C, Gysen P, Foidart JM, Bassleer R, Franchimont P. Human chondrocytes in tridimensional culture. *In Vitro Cell Dev Biol* 1986 Mar;22(3 Pt 1):113-119.
- (21) Bastiaansen-Jenniskens YM, Koevoet W, Jansen KM, Verhaar JA, DeGroot J, VanOsch GJ. Inhibition of glycosaminoglycan incorporation influences collagen network formation during cartilage matrix production. *Biochem Biophys Res Commun* 2009 Feb 6;379(2):222-226.
- (22) Bastick AN, Runhaar J, Belo JN, Bierma-Zeinstra SM. Prognostic factors for progression of clinical osteoarthritis of the knee: a systematic review of observational studies. *Arthritis Res Ther* 2015 Jun 8;17:152-015-0670-x.
- (23) Bayer BM, Beaven MA. Evidence that indomethacin reversibly inhibits cell growth in the G1 phase of the cell cycle. *Biochem Pharmacol* 1979;28(3):441-443.
- (24) Bayer BM, Kruth HS, Vaughan M, Beaven MA. Arrest of cultured cells in the G1 phase of the cell cycle by indomethacin. *J Pharmacol Exp Ther* 1979 Jul;210(1):106-111.
- (25) Beekhuizen M, Bastiaansen-Jenniskens Y, Koevoet W, et al. Osteoarthritic synovial tissue inhibition of proteoglycan production in human osteoarthritic knee cartilage: establishment and characterization

of a long-term cartilage-synovium coculture. *Arthritis Rheum* 2011;63(7):1918-1927.

(26) Bella J. Collagen structure: new tricks from a very old dog. *Biochem J* 2016 Apr 15;473(8):1001-1025.

(27) Bertrand J, Cromme C, Umlauf D, Frank S, Pap T. Molecular mechanisms of cartilage remodelling in osteoarthritis. *Int J Biochem Cell Biol* 2010 Oct;42(10):1594-1601.

(28) Bianchi M, Brogгинi M, Balzarini P, Franchi S, Sacerdote P. Effects of nimesulide on pain and on synovial fluid concentrations of substance P, interleukin-6 and interleukin-8 in patients with knee osteoarthritis: comparison with celecoxib. *Int J Clin Pract* 2007 Aug;61(8):1270-1277.

(29) Bierbaum S, Scharnweber D. 2.208 - Artificial Extracellular Matrices to Functionalize Biomaterial Surfaces. In: Ducheyne P, editor. *Comprehensive Biomaterials Oxford: Elsevier; 2011. p. 127-153.*

(30) Blanco FJ, Guitian R, Moreno J, de Toro FJ, Galdo F. Effect of antiinflammatory drugs on COX-1 and COX-2 activity in human articular chondrocytes. *J Rheumatol* 1999 Jun;26(6):1366-1373.

(31) Blanco FJ, Guitian R, Vazquez-Martul E, de Toro FJ, Galdo F. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum* 1998 Feb;41(2):284-289.

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

(33) Blewis ME, Nugent-Derfus GE, Schmidt TA, Schumacher BL, Sah RL. A model of synovial fluid lubricant composition in normal and injured joints. *Eur Cell Mater* 2007 Mar 6;13:26-39.

(34) Blot L, Marcelis A, Devogelaer JP, Manicourt DH. Effects of diclofenac, aceclofenac and meloxicam on the metabolism of proteoglycans and hyaluronan in osteoarthritic human cartilage. *Br J Pharmacol* 2000 Dec;131(7):1413-1421.

(35) Bluteau G, Conrozier T, Mathieu P, Vignon E, Herbage D, Mallein-Gerin F. Matrix metalloproteinase-1, -3, -13 and aggrecanase-

1 and -2 are differentially expressed in experimental osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta* 2001 May 3;1526(2):147-158.

(36) Bock HC, Michaeli P, Bode C, Schultz W, Kresse H, Herken R, et al. The small proteoglycans decorin and biglycan in human articular cartilage of late-stage osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2001 Oct;9(7):654-663.

(37) Bock JM, Menon SG, Sinclair LL, Bedford NS, Goswami PC, Domann FE, et al. Celecoxib toxicity is cell cycle phase specific. *Cancer Res* 2007 Apr 15;67(8):3801-3808.

(38) Boehme KA, Rolauffs B. Onset and Progression of Human Osteoarthritis-Can Growth Factors, Inflammatory Cytokines, or Differential miRNA Expression Concomitantly Induce Proliferation, ECM Degradation, and Inflammation in Articular Cartilage? *Int J Mol Sci* 2018 Aug 3;19(8):2282. doi: 10.3390/ijms19082282.

(39) Borzi RM, Olivotto E, Pagani S, Vitellozzi R, Neri S, Battistelli M, et al. Matrix metalloproteinase 13 loss associated with impaired extracellular matrix remodeling disrupts chondrocyte differentiation by concerted effects on multiple regulatory factors. *Arthritis Rheum* 2010 Aug;62(8):2370-2381.

(40) Botting RM. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. *J Physiol Pharmacol* 2006 Nov;57 Suppl 5:113-124.

(41) Boudko SP, Engel J, Bachinger HP. The crucial role of trimerization domains in collagen folding. *Int J Biochem Cell Biol* 2012 Jan;44(1):21-32.

(42) Brew CJ, Clegg PD, Boot-Handford RP, Andrew JG, Hardingham T. Gene expression in human chondrocytes in late osteoarthritis is changed in both fibrillated and intact cartilage without evidence of generalised chondrocyte hypertrophy. *Ann Rheum Dis* 2010 Jan;69(1):234-240.

(43) Brittberg M, Imhoff A, Madry H, Mandelbaum B editors. *Cartilage Repair: Current Concepts*. 1<sup>a</sup> ed.: DJO Publications; 2010.

- (44) Brune K, Patrignani P. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Pain Res* 2015 Feb 20;8:105-118.
- (45) Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009 Apr;55(4):611-622.
- (46) Castellsague J, Riera-Guardia N, Calingaert B, Varas-Lorenzo C, Fourier-Reglat A, Nicotra F, et al. Individual NSAIDs and upper gastrointestinal complications: a systematic review and meta-analysis of observational studies (the SOS project). *Drug Saf* 2012 Dec 1;35(12):1127-1146.
- (47) Caterson B, Flannery CR, Hughes CE, Little CB. Mechanisms involved in cartilage proteoglycan catabolism. *Matrix Biol* 2000 Aug;19(4):333-344.
- (48) Center for Drug Evaluation and Research - CDER. NDA 20998/S007 Clinical pharmacology and biopharmaceutics review for Celebrex (celecoxib). 1999; Available at: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/99/21156-S007\\_Celebrex\\_biopharmr.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/99/21156-S007_Celebrex_biopharmr.pdf), 2020.
- (49) Chandran PL, Horkay F. Aggrecan, an unusual polyelectrolyte: review of solution behavior and physiological implications. *Acta Biomater* 2012 Jan;8(1):3-12.
- (50) Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Oct 15;99(21):13926-13931.
- (51) Chandrasekharan NV, Simmons DL. The cyclooxygenases. *Genome Biol* 2004;5(9):241-2004-5-9-241. Epub 2004 Aug 27.
- (52) Chang CY, Li JR, Wu CC, Wang JD, Yang CP, Chen WY, et al. Indomethacin induced glioma apoptosis involving ceramide signals. *Exp Cell Res* 2018 Apr 1;365(1):66-77.

- (53) Chang JK, Wu SC, Wang GJ, Cho MH, Ho ML. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on cell proliferation and death in cultured epiphyseal-articular chondrocytes of fetal rats. *Toxicology* 2006 Dec 7;228(2-3):111-123.
- (54) Charlier E, Relic B, Deroyer C, Malaise O, Neuville S, Collée J, et al. Insights on Molecular Mechanisms of Chondrocytes Death in Osteoarthritis. *Int J Mol Sci* 2016 Dec 20;17(12):2146. doi: 10.3390/ijms17122146.
- (55) Chen S, Fu P, Cong R, Wu H, Pei M. Strategies to minimize hypertrophy in cartilage engineering and regeneration. *Genes Dis* 2015 Mar 1;2(1):76-95.
- (56) Cheng DS, Visco CJ. Pharmaceutical therapy for osteoarthritis. *PM R* 2012 May;4(5 Suppl):S82-8.
- (57) Collier S, Ghosh P. Evaluation of the effect of antiarthritic drugs on the secretion of proteoglycans by lapine chondrocytes using a novel assay procedure. *Ann Rheum Dis* 1989 May;48(5):372-381.
- (58) Collier S, Ghosh P. Evaluation of the effect of antiarthritic drugs on the secretion of proteoglycans by lapine chondrocytes using a novel assay procedure. *Ann Rheum Dis* 1989 May;48(5):372-381.
- (59) Couceiro-Follente J, Carpintero Arias P, Silva Rivera MT. Cultivo de condrocitos. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol* 2002 Octubre 2002;Vol. 46(Núm. 5):436-443.
- (60) Crofford LJ. Chapter 59 - Biology and Therapeutic Targeting of Prostanoids. In: Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE, McInnes IB, O'Dell JR, editors. *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology*. 10ª ed.: Elsevier; 2017. p. 908-931.e4.
- (61) Crofford LJ. Use of NSAIDs in treating patients with arthritis. *Arthritis Res Ther* 2013;15 Suppl 3:S2.
- (62) Cucchiarini M, de Girolamo L, Filardo G, Oliveira JM, Orth P, Pape D, et al. Basic science of osteoarthritis. *J Exp Orthop* 2016 Dec;3(1):22-016-0060-6. Epub 2016 Sep 13.

(63) Davies NM, Anderson KE. Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls. *Clin Pharmacokinet* 1997 Sep;33(3):184-213.

(64) de Boer TN, Mastbergen SC, Huisman AM, Polak AA, Bijlsma JW, Lafeber FP. 328 Lack of disease modifying activity of celecoxib in end-stage osteoarthritis: a randomized controlled trial. *Osteoarthritis Cartil* 2010;18(Supplement 2):s145.

(65) de Boer TN, Huisman AM, Polak AA, Niehoff AG, van Rinsum AC, Saris D, et al. The chondroprotective effect of selective COX-2 inhibition in osteoarthritis: ex vivo evaluation of human cartilage tissue after in vivo treatment. *Osteoarthritis Cartilage* 2009 Apr;17(4):482-488.

(66) De Ceuninck F, Lesur C, Pastoureau P, Caliez A, Sabatini M. Culture of Chondrocytes in Alginate Beads. In: Sabatini M, Pastoureau P, De Ceuninck F, editors. *Cartilage and Osteoarthritis: Volume 1: Cellular and Molecular Tools* Totowa, NJ: Humana Press; 2004. p. 15-22.

(67) Deak F, Wagener R, Kiss I, Paulsson M. The matrilins: a novel family of oligomeric extracellular matrix proteins. *Matrix Biol* 1999 Feb;18(1):55-64.

(68) Detrembleur C, De Nayer J, van den Hecke A. Celecoxib improves the efficiency of the locomotor mechanism in patients with knee osteoarthritis. A randomised, placebo, double-blind and cross-over trial. *Osteoarthritis Cartilage* 2005 Mar;13(3):206-210.

(69) Di Cesare PE, Haudenschild DR, Samuels J, Abramson SB. Chapter 98 - Pathogenesis of Osteoarthritis. In: Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE, McInnes IB, O'Dell JR, editors. *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology*. 10<sup>a</sup> ed.: Elsevier; 2017. p. 1685-1704.e8.

(70) Diab SM, Kamal HM, Mansour AI, Fawzy RM, Azab BS. Clinical significance of Matrilin-3 gene polymorphism in Egyptian patients with primary knee osteoarthritis. *Eur J Rheumatol* 2017 Sep;4(3):200-204.

(71) Ding C. Do NSAIDs affect the progression of osteoarthritis? *Inflammation* 2002 Jun;26(3):139-142.

- (72) Ding C, Cicuttini F, Jones G. Do NSAIDs affect longitudinal changes in knee cartilage volume and knee cartilage defects in older adults? *Am J Med* 2009 Sep;122(9):836-842.
- (73) Dingle JT. Non-steroidal Anti-inflammatory Drug Administration in the Treatment of Osteoarthritis. . In: Reginster JY, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Herontin Y, editors. *Osteoarthritis. Clinical and Experimental Aspects.* . 1999th ed.: Springer; 1999. p. 370-387.
- (74) Dingle JT. The effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on human articular cartilage glycosaminoglycan synthesis. *Osteoarthritis Cartilage* 1999 May;7(3):313-314.
- (75) Dingle JT. The effects of NSAID on the matrix of human articular cartilages. *Z Rheumatol* 1999 Jun;58(3):125-129.
- (76) Dingle JT. Prostaglandins in human cartilage metabolism. *J Lipid Mediat* 1993 Mar-Apr;6(1-3):303-312.
- (77) Dong L, Vecchio AJ, Sharma NP, Jurban BJ, Malkowski MG, Smith WL. Human cyclooxygenase-2 is a sequence homodimer that functions as a conformational heterodimer. *J Biol Chem* 2011 May 27;286(21):19035-19046.
- (78) Doss F, Menard J, Hauschild M, Kreutzer HJ, Mittlmeier T, Muller-Steinhardt M, et al. Elevated IL-6 levels in the synovial fluid of osteoarthritis patients stem from plasma cells. *Scand J Rheumatol* 2007 Mar-Apr;36(2):136-139.
- (79) Dreier R. Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis Res Ther* 2010;12(5):216.
- (80) El Hajjaji H, Marcelis A, Devogelaer JP, Manicourt DH. Celecoxib has a positive effect on the overall metabolism of hyaluronan and proteoglycans in human osteoarthritic cartilage. *J Rheumatol* 2003 Nov;30(11):2444-2451.
- (81) Ellman MB, Yan D, Chen D, Im HJ. Biochemical Mediators Involved in Cartilage Degradation and the Induction of Pain in Osteoarthritis. In: Rothschild BM, editor. *Principles of Osteoarthritis -*

Its Definition, Character, Derivation and Modality-Related Recognition: InTech; 2012. p. 367-398.

(82) Emori HW, Champion GD, Bluestone R, Paulus HE. Simultaneous pharmacokinetics of indomethacin in serum and synovial fluid. *Ann Rheum Dis* 1973 Sep;32(5):433-435.

(83) Enna SJ, Bylund DB editors. *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference.* : Elsevier; 2008.

(84) Farley J, Dejica VM, Mort JS. Proteases and Cartilage Degradation in Osteoarthritis. In: Rothschild BM, editor. *Principles of Osteoarthritis - Its Definition, Character, Derivation and Modality-Related Recognition: InTech; 2012. p. 401-418.*

(85) Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta* 1986 Sep 4;883(2):173-177.

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

(87) Fibel KH, Hillstrom HJ, Halpern BC. State-of-the-Art management of knee osteoarthritis. *World J Clin Cases* 2015 Feb 16;3(2):89-101.

(88) FitzGerald GA, Patrono C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med* 2001 Aug 9;345(6):433-442.

(89) Fowler PD, Dawes PT, John VA, Shotton PA. Plasma and synovial fluid concentrations of diclofenac sodium and its hydroxylated metabolites during once-daily administration of a 100 mg slow-release formulation. *Eur J Clin Pharmacol* 1986;31(4):469-472.

(90) Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* 2010 Dec 15;123(Pt 24):4195-4200.

(91) Fuerst M, Bertrand J, Lammers L, Dreier R, Echtermeyer F, Nitschke Y, et al. Calcification of articular cartilage in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2009 Sep;60(9):2694-2703.

- (92) Fukada K, Takahashi-Yanaga F, Sakoguchi-Okada N, Shiraishi F, Miwa Y, Morimoto S, et al. Celecoxib induces apoptosis by inhibiting the expression of survivin in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007 Jun 15;357(4):1166-1171.
- (93) Fukai A, Kamekura S, Chikazu D, Nakagawa T, Hirata M, Saito T, et al. Lack of a chondroprotective effect of cyclooxygenase 2 inhibition in a surgically induced model of osteoarthritis in mice. *Arthritis Rheum* 2012 Jan;64(1):198-203.
- (94) Fukui N, Ikeda Y, Ohnuki T, Tanaka N, Hikita A, Mitomi H, et al. Regional differences in chondrocyte metabolism in osteoarthritis: a detailed analysis by laser capture microdissection. *Arthritis Rheum* 2008 Jan;58(1):154-163.
- (95) Fung HB, Kirschenbaum HL. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors for the treatment of arthritis. *Clin Ther* 1999 Jul;21(7):1131-1157.
- (96) Gallelli L, Galasso O, Falcone D, Southworth S, Greco M, Ventura V, et al. The effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on clinical outcomes, synovial fluid cytokine concentration and signal transduction pathways in knee osteoarthritis. A randomized open label trial. *Osteoarthritis Cartilage* 2013 Sep;21(9):1400-1408.
- (97) Gallouet AS, Travert M, Bresson-Bepoldin L, Guilloton F, Pangault C, Caulet-Maugendre S, et al. COX-2-independent effects of celecoxib sensitize lymphoma B cells to TRAIL-mediated apoptosis. *Clin Cancer Res* 2014 May 15;20(10):2663-2673.
- (98) Gandhi NS, Mancera RL. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem Biol Drug Des* 2008 Dec;72(6):455-482.
- (99) Gardiner BS, Woodhouse FG, Besier TF, Grodzinsky AJ, Lloyd DG, Zhang L, et al. Predicting Knee Osteoarthritis. *Ann Biomed Eng* 2016 Jan;44(1):222-233.
- (100) Garrido López BC, Navarro Sarabia F, Montero Martín EM. Antiinflamatorios no esteroideos: farmacodinámica, reacciones adversas e indicaciones en reumatología. *Medicine* 2011;10(92):6255.

(101) Gencosmanoglu BE, Eryavuz M, Dervisoglu S. Effects of some nonsteroidal anti-inflammatory drugs on articular cartilage of rats in an experimental model of osteoarthritis. *Res Exp Med (Berl)* 2001 Mar;200(3):215-226.

(102) Gerter R, Kruegel J, Miosge N. New insights into cartilage repair - the role of migratory progenitor cells in osteoarthritis. *Matrix Biol* 2012 Apr;31(3):206-213.

(103) Gerwin N, Hops C, Lucke A. Intraarticular drug delivery in osteoarthritis. *Adv Drug Deliv Rev* 2006 May 20;58(2):226-242.

(104) Gierse JK, Zhang Y, Hood WF, Walker MC, Trigg JS, Maziasz TJ, et al. Valdecoxib: assessment of cyclooxygenase-2 potency and selectivity. *J Pharmacol Exp Ther* 2005 Mar;312(3):1206-1212.

(105) Gika HG, Theodoridou A, Michopoulos F, Theodoridis G, Diza E, Settas L, et al. Determination of two COX-2 inhibitors in serum and synovial fluid of patients with inflammatory arthritis by ultra performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectroscopy and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2009 Apr 5;49(3):579-586.

(106) Goessler UR, Bieback K, Bugert P, Naim R, Schafer C, Sadick H, et al. Human chondrocytes differentially express matrix modulators during in vitro expansion for tissue engineering. *Int J Mol Med* 2005 Oct;16(4):509-515.

(107) Goldenberg MM. Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Ther* 1999 Sep;21(9):1497-513; discussion 1427-8.

(108) Goldring MB. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2012 Aug;4(4):269-285.

(109) Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2000 Sep;43(9):1916-1926.

(110) Goldring MB, Berenbaum F. The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric

oxide. *Clin Orthop Relat Res* 2004 Oct;(427 Suppl):S37-46. doi(427 Suppl):S37-46.

(111) Goldring MB, Culley KL, Wondimu E, Otero M. Chapter 3 - Cartilage and Chondrocytes. In: Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE, McInnes IB, O'Dell JR, editors. *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology*. 10<sup>a</sup> ed.: Elsevier; 2017. p. 34-59.e3.

(112) Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 2009;11(3):224.

(113) Goldring MB, Sohbat E, Elwell JM, Chang JY. Etodolac preserves cartilage-specific phenotype in human chondrocytes: effects on type II collagen synthesis and associated mRNA levels. *Eur J Rheumatol Inflamm* 1990;10(1):10-21.

(114) Gómez-Lechón MJ, Ponsoda X, O'Connor E, Donato T, Castell JV, Jover R. Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. *Biochem Pharmacol* 2003 Dec 1;66(11):2155-2167.

(115) Gong L, Thorn CF, Bertagnolli MM, Grosser T, Altman RB, Klein TE. Celecoxib pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics* 2012 Apr;22(4):310-318.

(116) Gosset M, Berenbaum F, Levy A, Pigenet A, Thirion S, Cavadias S, et al. Mechanical stress and prostaglandin E2 synthesis in cartilage. *Biorheology* 2008;45(3-4):301-320.

(117) Grogan SP, D'Lima DD. Joint aging and chondrocyte cell death. *Int J Clin Rheumatol* 2010 Apr;5(2):199-214.

(118) Grogan SP, Duffy SF, Pauli C, Koziol JA, Su AI, D'Lima DD, et al. Zone-specific gene expression patterns in articular cartilage. *Arthritis Rheum* 2013 Feb;65(2):418-428.

(119) Guilak F, Alexopoulos LG, Upton ML, Youn I, Choi JB, Cao L, et al. The pericellular matrix as a transducer of biomechanical and biochemical signals in articular cartilage. *Ann N Y Acad Sci* 2006 Apr;1068:498-512.

(120) Halper J. Proteoglycans and diseases of soft tissues. *Adv Exp Med Biol* 2014;802:49-58.

(121) Halper J, Kjaer M. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Adv Exp Med Biol* 2014;802:31-47.

(122) Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, Lotz M. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998 Sep;41(9):1632-1638.

(123) Hashimoto S, Ochs RL, Rosen F, Quach J, McCabe G, Solan J, et al. Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Mar 17;95(6):3094-3099.

(124) Hedbom E, Hauselmann HJ. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. *Cell Mol Life Sci* 2002 Jan;59(1):45-53.

(125) Henrotin Y, de Leval X, Mathy-Hartet M, Mouithys-Mickalad A, Deby-Dupont G, Dogné JM, et al. In vitro effects of aceclofenac and its metabolites on the production by chondrocytes of inflammatory mediators. *Inflamm Res* 2001 Aug;50(8):391-399.

(126) Herzog FA, Jacobs CR. 5.506 - Effects of Mechanical Stress on Cells. In: Ducheyne P, editor. *Comprehensive Biomaterials Oxford*: Elsevier; 2011. p. 73-80.

(127) Hinz B, Brune K. Cyclooxygenase-2--10 years later. *J Pharmacol Exp Ther* 2002 Feb;300(2):367-375.

(128) Hoemann CD. Molecular and biochemical assays of cartilage components. *Methods Mol Med* 2004;101:127-156.

(129) Holtzer H, Abbott J, Lash J, Holtzer S. The Loss of Phenotypic Traits by Differentiated Cells in Vitro, I. Dedifferentiation of Cartilage Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1960 Dec;46(12):1533-1542.

(130) Huang X, Birk DE, Goetinck PF. Mice lacking matrilin-1 (cartilage matrix protein) have alterations in type II collagen

fibrillogenesis and fibril organization. *Dev Dyn* 1999 Dec;216(4-5):434-441.

(131) Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepez S, Livingston EH. Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res* 2007 May 1;139(1):143-156.

(132) Hull MA, Gardner SH, Hawcroft G. Activity of the non-steroidal anti-inflammatory drug indomethacin against colorectal cancer. *Cancer Treat Rev* 2003 Aug;29(4):309-320.

(133) Huser CA, Peacock M, Davies ME. Inhibition of caspase-9 reduces chondrocyte apoptosis and proteoglycan loss following mechanical trauma. *Osteoarthritis Cartilage* 2006 Oct;14(10):1002-1010.

(134) Huskisson EC, Berry H, Gishen P, Jubb RW, Whitehead J. Effects of antiinflammatory drugs on the progression of osteoarthritis of the knee. LINK Study Group. Longitudinal Investigation of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs in Knee Osteoarthritis. *J Rheumatol* 1995 Oct;22(10):1941-1946.

(135) Hwang HS, Kim HA. Chondrocyte Apoptosis in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Int J Mol Sci* 2015 Oct 30;16(11):26035-26054.

(136) Iimoto S, Watanabe S, Takahashi T, Shimizu A, Yamamoto H. The influence of Celecoxib on matrix synthesis by chondrocytes under mechanical stress in vitro. *Int J Mol Med* 2005 Dec;16(6):1083-1088.

(137) Iyer JP, Srivastava PK, Dev R, Dastidar SG, Ray A. Prostaglandin E(2) synthase inhibition as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets* 2009 Jul;13(7):849-865.

(138) Jacques C, Sautet A, Moldovan M, Thomas B, Humbert L, Berenbaum F. Cyclooxygenase activity in chondrocytes from osteoarthritic and healthy cartilage. *Rev Rhum Engl Ed* 1999 Dec;66(12):701-704.

(139) Jayasuriya CT, Chen Q. Cartilage Extracellular Matrix Integrity and OA. In: Rothschild BM, editor. *Principles of Osteoarthritis - Its Definition, Character, Derivation and Modality-Related Recognition*. InTech; 2012. p. 337-366.

(140) Jayasuriya CT, Goldring MB, Terek R, Chen Q. Matrilin-3 induction of IL-1 receptor antagonist is required for up-regulating collagen II and aggrecan and down-regulating ADAMTS-5 gene expression. *Arthritis Res Ther* 2012 Sep 11;14(5):R197.

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

(142) Jenei-Lanzl Z, Meurer A, Zaucke F. Interleukin-1 $\beta$  signaling in osteoarthritis - chondrocytes in focus. *Cell Signal* 2019 Jan;53:212-223.

(143) Jiang D, Zou J, Huang L, Shi Q, Zhu X, Wang G, et al. Efficacy of intra-articular injection of celecoxib in a rabbit model of osteoarthritis. *Int J Mol Sci* 2010 Oct 21;11(10):4106-4113.

(144) Jin Y, Smith C, Hu L, Coutant DE, Whitehurst K, Phipps K, et al. LY3127760, a Selective Prostaglandin E4 (EP4) Receptor Antagonist, and Celecoxib: A Comparison of Pharmacological Profiles. *Clin Transl Sci* 2018 Jan;11(1):46-53.

(145) Kadler KE. Fell Muir Lecture: Collagen fibril formation in vitro and in vivo. *Int J Exp Pathol* 2017 Feb;98(1):4-16.

(146) Kadler KE, Hill A, Canty-Laird EG. Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr Opin Cell Biol* 2008 Oct;20(5):495-501.

(147) Kahle P, Saal JG, Schaudt K, Zacher J, Fritz P, Pawelec G. Determination of cytokines in synovial fluids: correlation with diagnosis and histomorphological characteristics of synovial tissue. *Ann Rheum Dis* 1992 Jun;51(6):731-734.

(148) Kanbe K, Yang X, Wei L, Sun C, Chen Q. Pericellular matrilins regulate activation of chondrocytes by cyclic load-induced matrix deformation. *J Bone Miner Res* 2007 Feb;22(2):318-328.

(149) Kang KB, Zhu C, Yong SK, Gao Q, Wong MC. Enhanced sensitivity of celecoxib in human glioblastoma cells: Induction of DNA damage leading to p53-dependent G1 cell cycle arrest and autophagy. *Mol Cancer* 2009 Aug 25;8:66-4598-8-66.

- (150) Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011 Jan;7(1):33-42.
- (151) Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB. Structure and function of aggrecan. *Cell Res* 2002 Mar;12(1):19-32.
- (152) Klatt AR, Becker AK, Neacsu CD, Paulsson M, Wagener R. The matrilins: modulators of extracellular matrix assembly. *Int J Biochem Cell Biol* 2011 Mar;43(3):320-330.
- (153) Klatt AR, Klinger G, Paul-Klausch B, Kühn G, Renno JH, Wagener R, et al. Matrilin-3 activates the expression of osteoarthritis-associated genes in primary human chondrocytes. *FEBS Lett* 2009 Nov 19;583(22):3611-3617.
- (154) Klatt AR, Nitsche DP, Kobbe B, Mörgelin M, Paulsson M, Wagener R. Molecular structure and tissue distribution of matrilin-3, a filament-forming extracellular matrix protein expressed during skeletal development. *J Biol Chem* 2000 Feb 11;275(6):3999-4006.
- (155) Klatt AR, Paul-Klausch B, Klinger G, Kuhn G, Renno JH, Banerjee M, et al. A critical role for collagen II in cartilage matrix degradation: collagen II induces pro-inflammatory cytokines and MMPs in primary human chondrocytes. *J Orthop Res* 2009 Jan;27(1):65-70.
- (156) Klatt AR, Zech D, Kuhn G, Paul-Klausch B, Klinger G, Renno JH, et al. Discoidin domain receptor 2 mediates the collagen II-dependent release of interleukin-6 in primary human chondrocytes. *J Pathol* 2009 Jun;218(2):241-247.
- (157) Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids* 2011 Jul;41(2):271-290.
- (158) Kokebie R, Aggarwal R, Lidder S, Hakimiyan AA, Rueger DC, Block JA, et al. The role of synovial fluid markers of catabolism and anabolism in osteoarthritis, rheumatoid arthritis and asymptomatic organ donors. *Arthritis Res Ther* 2011 Mar 24;13(2):R50.
- (159) Kosinska MK, Ludwig TE, Liebisch G, Zhang R, Siebert HC, Wilhelm J, et al. Articular Joint Lubricants during Osteoarthritis and

Rheumatoid Arthritis Display Altered Levels and Molecular Species. PLoS One 2015 May 1;10(5):e0125192.

(160) Kwak YE, Jeon NK, Kim J, Lee EJ. The cyclooxygenase-2 selective inhibitor celecoxib suppresses proliferation and invasiveness in the human oral squamous carcinoma. Ann N Y Acad Sci 2007 Jan;1095:99-112.

(161) Kwan AP, Cummings CE, Chapman JA, Grant ME. Macromolecular organization of chicken type X collagen in vitro. J Cell Biol 1991 Aug;114(3):597-604.

(162) Lee AS, Ellman MB, Yan D, Kroin JS, Cole BJ, van Wijnen AJ, et al. A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. Gene 2013 Sep 25;527(2):440-447.

(163) Lee SW, Lee HJ, Chung WT, Choi SM, Rhyu SH, Kim DK, et al. TRAIL induces apoptosis of chondrocytes and influences the pathogenesis of experimentally induced rat osteoarthritis. Arthritis Rheum 2004 Feb;50(2):534-542.

(164) Leidgens V, Seliger C, Jachnik B, Welz T, Leukel P, Vollmann-Zwerenz A, et al. Ibuprofen and Diclofenac Restrict Migration and Proliferation of Human Glioma Cells by Distinct Molecular Mechanisms. PLoS One 2015 Oct 20;10(10):e0140613.

(165) Li P, Zhou L, Zhao T, Liu X, Zhang P, Liu Y, et al. Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. Oncotarget 2017 Apr 4;8(14):23996-24008.

(166) Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Huang W, Dehnade F, Ahmad M, et al. Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-alpha is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kappaB transcription factors in articular chondrocytes. Exp Cell Res 2003 Aug 1;288(1):208-217.

(167) Lievens AM, Bierma-Zeinstra SM, Verhagen AP, Verhaar JA, Koes BW. Prognostic factors of progress of hip osteoarthritis: a systematic review. Arthritis Rheum 2002 Oct 15;47(5):556-562.

- (168) Lin Z, Fitzgerald JB, Xu J, Willers C, Wood D, Grodzinsky AJ, et al. Gene expression profiles of human chondrocytes during passaged monolayer cultivation. *J Orthop Res* 2008 Sep;26(9):1230-1237.
- (169) Lindahl U, Couchman J, Kimata K, et al. Chapter 17 Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 3rd ed.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015.
- (170) Liu E, Vega S, Treiser MD, Sung H-, Moghe PV. 3.317 - Fluorescence Imaging of Cell–Biomaterial Interactions. In: Ducheyne P, editor. *Comprehensive Biomaterials Oxford*: Elsevier; 2011. p. 291-303.
- (171) Liu M, Li CM, Chen ZF, Ji R, Guo QH, Li Q, et al. Celecoxib regulates apoptosis and autophagy via the PI3K/Akt signaling pathway in SGC-7901 gastric cancer cells. *Int J Mol Med* 2014 Jun;33(6):1451-1458.
- (172) Lotz M, Hashimoto S, Kühn K. Mechanisms of chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage* 1999 Jul;7(4):389-391.
- (173) Ma B, Leijten JC, Wu L, Kip M, van Blitterswijk CA, Post JN, et al. Gene expression profiling of dedifferentiated human articular chondrocytes in monolayer culture. *Osteoarthritis Cartilage* 2013 Apr;21(4):599-603.
- (174) Mabey T, Honsawek S. Cytokines as biochemical markers for knee osteoarthritis. *World J Orthop* 2015 Jan 18;6(1):95-105.
- (175) Mabey T, Honsawek S, Tanavalee A, Yuktanandana P, Wilairatana V, Poovorawan Y. Plasma and synovial fluid inflammatory cytokine profiles in primary knee osteoarthritis. *Biomarkers* 2016 Nov;21(7):639-644.
- (176) Madzuki IN, Lau SF, Abdullah R, Mohd Ishak NI, Mohamed S. *Vernonia amygdalina* inhibited osteoarthritis development by anti-inflammatory and anticollagenase pathways in cartilage explant and osteoarthritis-induced rat model. *Phytother Res* 2019 Jul;33(7):1784-1793.

(177) Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP, Roughley PJ. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008 Apr;22(2):351-384.

(178) Martel-Pelletier J, Wildi LM, Pelletier JP. Future therapeutics for osteoarthritis. *Bone* 2012 Aug;51(2):297-311.

(179) Martínez Figueroa R, Martínez Figueroa C, Calvo Rodriguez R, Figueroa Poblete D. Osteoarthritis (artrosis) de rodilla. *Rev Chil Ortop Traumatol* 2015;56(3):45-51.

(180) Mastbergen SC, Bijlsma JW, Lafeber FP. Selective COX-2 inhibition is favorable to human early and late-stage osteoarthritic cartilage: a human in vitro study. *Osteoarthritis Cartilage* 2005 Jun;13(6):519-526.

(181) Mastbergen SC, Jansen NW, Bijlsma JW, Lafeber FP. Differential direct effects of cyclo-oxygenase-1/2 inhibition on proteoglycan turnover of human osteoarthritic cartilage: an in vitro study. *Arthritis Res Ther* 2006;8(1):R2.

(182) Mastbergen SC, Lafeber FP, Bijlsma JW. Selective COX-2 inhibition prevents proinflammatory cytokine-induced cartilage damage. *Rheumatology (Oxford)* 2002 Jul;41(7):801-808.

(183) Mastbergen SC, Marijnissen AC, Vianen ME, Zoer B, van Roermund PM, Bijlsma JW, et al. Inhibition of COX-2 by celecoxib in the canine groove model of osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2006 Apr;45(4):405-413.

(184) Matsuo M, Nishida K, Yoshida A, Murakami T, Inoue H. Expression of caspase-3 and -9 relevant to cartilage destruction and chondrocyte apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Acta Med Okayama* 2001 Dec;55(6):333-340.

(185) McCormack PL. Celecoxib: a review of its use for symptomatic relief in the treatment of osteoarthritis, rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Drugs* 2011 Dec 24;71(18):2457-2489.

(186) McGettigan P, Henry D. Cardiovascular risk with non-steroidal anti-inflammatory drugs: systematic review of population-based controlled observational studies. *PLoS Med* 2011 Sep;8(9):e1001098.

- (187) McInnes IB. Chapter 26 - Cytokines. In: Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE, McInnes IB, O'Dell JR, editors. Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology. 10<sup>a</sup> ed.: Elsevier; 2017. p. 396-407.
- (188) Meini S, Cucchi P, Catalani C, Bellucci F, Giuliani S, Maggi CA. Bradykinin and B(2) receptor antagonism in rat and human articular chondrocytes. *Br J Pharmacol* 2011 Feb;162(3):611-622.
- (189) Menezes GB, Rezende RM, Pereira-Silva PE, Klein A, Cara DC, Francischi JN. Differential involvement of cyclooxygenase isoforms in neutrophil migration in vivo and in vitro. *Eur J Pharmacol* 2008 Nov 19;598(1-3):118-122.
- (190) Miwa M, Saura R, Hirata S, Hayashi Y, Mizuno K, Itoh H. Induction of apoptosis in bovine articular chondrocyte by prostaglandin E(2) through cAMP-dependent pathway. *Osteoarthritis Cartilage* 2000 Jan;8(1):17-24.
- (191) Miyatake S, Ichiyama H, Kondo E, Yasuda K. Randomized clinical comparisons of diclofenac concentration in the soft tissues and blood plasma between topical and oral applications. *Br J Clin Pharmacol* 2009 Jan;67(1):125-129.
- (192) Moktar NM, Yusof HM, Yahaya NH, Muhamad R, Das S. The transcript level of interleukin-6 in the cartilage of idiopathic osteoarthritis of knee. *Clin Ter* 2010;161(1):25-28.
- (193) Mueller MB, Tuan RS. Anabolic/Catabolic balance in pathogenesis of osteoarthritis: identifying molecular targets. *PM R* 2011 Jun;3(6 Suppl 1):S3-11.
- (194) Musumeci G, Castrogiovanni P, Trovato FM, Weinberg AM, Al-Wasiyah MK, Alqahtani MH, et al. Biomarkers of Chondrocyte Apoptosis and Autophagy in Osteoarthritis. *Int J Mol Sci* 2015 Aug 31;16(9):20560-20575.
- (195) Musumeci G, Loreto C, Carnazza ML, Martinez G. Characterization of apoptosis in articular cartilage derived from the knee joints of patients with osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2011 Feb;19(2):307-313.

(196) Muttigi MS, Han I, Park HK, Park H, Lee SH. Matrilin-3 Role in Cartilage Development and Osteoarthritis. *Int J Mol Sci* 2016 Apr 20;17(4):590. doi: 10.3390/ijms17040590.

(197) Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006 Feb 15;69(3):562-573.

(198) Nakamura H, Masuko K, Yudoh K, Kato T, Nishioka K. Effects of celecoxib on human chondrocytes--enhanced production of chemokines. *Clin Exp Rheumatol* 2007 Jan-Feb;25(1):11-16.

(199) Nelson F, Dahlberg L, Laverty S, Reiner A, Pidoux I, Ionescu M, et al. Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis. *J Clin Invest* 1998 Dec 15;102(12):2115-2125.

(200) Nicholson DW, Melino G. Caspases and Cell Death. In: Lennarz WJ, Lane MD, editors. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. 2<sup>a</sup> ed.: Academic Press; 2013. p. 388-396.

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

(202) Notoya K, Jovanovic DV, Reboul P, Martel-Pelletier J, Mineau F, Pelletier JP. The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E2 via the induction of cyclooxygenase-2. *J Immunol* 2000 Sep 15;165(6):3402-3410.

(203) O'Brien M, McCauley J, Cohen E. Indomethacin. *Analytical Profiles of Drug Substances*. Orlando, Florida 82887: Academic Press INC; 1984. p. 211-238.

(204) Ohno S, Murakami K, Tanimoto K, Sugiyama H, Makihira S, Shibata T, et al. Immunohistochemical study of matrilin-1 in arthritic articular cartilage of the mandibular condyle. *J Oral Pathol Med* 2003 Apr;32(4):237-242.

(205) Okada Y. Chapter 8 - Proteinases and Matrix Degradation. In: Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE, McInnes IB, O'Dell JR, editors.

Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology. 10<sup>a</sup> ed.: Elsevier; 2017. p. 106-125.

(206) Okimura A, Okada Y, Makihira S, Pan H, Yu L, Tanne K, et al. Enhancement of cartilage matrix protein synthesis in arthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 1997 Jun;40(6):1029-1036.

(207) Ou Y, Tan C, An H, Jiang D, Quan Z, Tang K, et al. Selective COX-2 inhibitor ameliorates osteoarthritis by repressing apoptosis of chondrocyte. *Med Sci Monit* 2012 Jun;18(6):BR247-52.

(208) Ou YS, Tan C, An H, Jiang DM, Quan ZX, Tang K, et al. The effects of NSAIDs on types I, II, and III collagen metabolism in a rat osteoarthritis model. *Rheumatol Int* 2012 Aug;32(8):2401-2405.

(209) Owen SG, Francis HW, Roberts MS. Disappearance kinetics of solutes from synovial fluid after intra-articular injection. *Br J Clin Pharmacol* 1994 Oct;38(4):349-355.

(210) Park SB, Jee BC, Kim SH, Cho YJ, Han M. Cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, inhibits leiomyoma cell proliferation through the nuclear factor kappaB pathway. *Reprod Sci* 2014 Sep;21(9):1187-1195.

(211) Patrono C, Rocca B. Nonsteroidal antiinflammatory drugs: past, present and future. *Pharmacol Res* 2009 May;59(5):285-289.

(212) Paulsson M, Wagener R. Chapter 23 - Matrilins. In: Mecham RP, editor. *Methods in Extracellular Matrix Biology*: Elsevier; 2018. p. 429-446.

(213) Pelletier JP. The influence of tissue cross-talking on OA progression: role of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Osteoarthritis Cartilage* 1999 Jul;7(4):374-376.

(214) Penning TD, Talley JJ, Bertenshaw SR, Carter JS, Collins PW, Docter S, et al. Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, celecoxib). *J Med Chem* 1997 Apr 25;40(9):1347-1365.

(215) Perazella MA, Tray K. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: a pattern of nephrotoxicity similar to traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 2001 Jul;111(1):64-67.

(216) Pettersen I, Figenschau Y, Olsen E, Bakkelund W, Smedsröd B, Sveinbjörnsson B. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces apoptosis in human articular chondrocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 Aug 23;296(3):671-676.

(217) Pullig O, Weseloh G, Klatt AR, Wagener R, Swoboda B. Matrilin-3 in human articular cartilage: increased expression in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2002 Apr;10(4):253-263.

(218) Rao P, Knaus EE. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J Pharm Pharm Sci* 2008 Sep 20;11(2):81s-110s.

(219) Rashad S, Revell P, Hemingway A, Low F, Rainsford K, Walker F. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the course of osteoarthritis. *Lancet* 1989 Sep 2;2(8662):519-522.

(220) Reijman M, Bierma-Zeinstra SM, Pols HA, Koes BW, Stricker BH, Hazes JM. Is there an association between the use of different types of nonsteroidal antiinflammatory drugs and radiologic progression of osteoarthritis? The Rotterdam Study. *Arthritis Rheum* 2005 Oct;52(10):3137-3142.

(221) Renatus M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC, Salvesen GS. Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Dec 4;98(25):14250-14255.

(222) Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011 Jan 1;3(1):a004978.

(223) Richmond SA, Fukuchi RK, Ezzat A, Schneider K, Schneider G, Emery CA. Are joint injury, sport activity, physical activity, obesity, or occupational activities predictors for osteoarthritis? A systematic review. *J Orthop Sports Phys Ther* 2013 Aug;43(8):515-B19.

(224) Rim YA, Nam Y, Ju JH. The Role of Chondrocyte Hypertrophy and Senescence in Osteoarthritis Initiation and Progression. *Int J Mol Sci* 2020 Mar 29;21(7):2358. doi: 10.3390/ijms21072358.

- (225) Roughley P, Martens D, Rantakokko J, Alini M, Mwale F, Antoniou J. The involvement of aggrecan polymorphism in degeneration of human intervertebral disc and articular cartilage. *Eur Cell Mater* 2006 Jan 18;11:1-7; discussion 7.
- (226) Rousseau JC, Garnero P. Biological markers in osteoarthritis. *Bone* 2012 8;51(2):265-277.
- (227) Rouzer CA, Marnett LJ. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J Lipid Res* 2009 Apr;50 Suppl:S29-34.
- (228) Sanchez C, Mateus MM, Defresne MP, Crielaard JM, Reginster JY, Henrotin YE. Metabolism of human articular chondrocytes cultured in alginate beads. Longterm effects of interleukin 1beta and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Rheumatol* 2002 Apr;29(4):772-782.
- (229) Sandy JD, Chan DD, Trevino RL, Wimmer MA, Plaas A. Human genome-wide expression analysis reorients the study of inflammatory mediators and biomechanics in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2015 Nov;23(11):1939-1945.
- (230) Sbardella D, Fasciglione GF, Gioia M, Ciaccio C, Tundo GR, Marini S, et al. Human matrix metalloproteinases: an ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes. *Mol Aspects Med* 2012 Apr;33(2):119-208.
- (231) Scanzello CR, Goldring SR. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone* 2012 Aug;51(2):249-257.
- (232) Schmidt TA, Gastelum NS, Nguyen QT, Schumacher BL, Sah RL. Boundary lubrication of articular cartilage: role of synovial fluid constituents. *Arthritis Rheum* 2007 Mar;56(3):882-891.
- (233) Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vecsei V, et al. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage* 2002 Jan;10(1):62-70.
- (234) Schulze-Tanzil G. Activation and dedifferentiation of chondrocytes: implications in cartilage injury and repair. *Ann Anat* 2009 Oct;191(4):325-338.

(235) Shao D, Kan M, Qiao P, Pan Y, Wang Z, Xiao X, et al. Celecoxib induces apoptosis via a mitochondria-dependent pathway in the H22 mouse hepatoma cell line. *Mol Med Rep* 2014 Oct;10(4):2093-2098.

(236) Shen G. The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. *Orthod Craniofac Res* 2005 Feb;8(1):11-17.

(237) Shi S, Klotz U. Clinical use and pharmacological properties of selective COX-2 inhibitors. *Eur J Clin Pharmacol* 2008 Mar;64(3):233-252.

(238) Shimpo H, Sakai T, Kondo S, Mishima S, Yoda M, Hiraiwa H, et al. Regulation of prostaglandin E(2) synthesis in cells derived from chondrocytes of patients with osteoarthritis. *J Orthop Sci* 2009 Sep;14(5):611-617.

(239) Shingleton WD. In vitro model of human articular cartilage degradation. *Methods Mol Biol* 2003;225:99-106.

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

(241) Smith WL, Murphy RC. Chapter 9 The Eicosanoids: Cyclooxygenase, Lipoxygenase and Epoxygenase Pathways. In: Ridgway ND, McLeod RS, editors. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 6<sup>a</sup> ed.: Elsevier Science; 2015. p. 259-296.

(242) Smith MD. The normal synovium. *Open Rheumatol J* 2011;5:100-106.

(243) Smith WL, Urade Y, Jakobsson PJ. Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis. *Chem Rev* 2011 Oct 12;111(10):5821-5865.

(244) Sofat N. Analysing the role of endogenous matrix molecules in the development of osteoarthritis. *Int J Exp Pathol* 2009 Oct;90(5):463-479.

- (245) Sofat N, Kuttapitiya A. Future directions for the management of pain in osteoarthritis. *Int J Clin Rheumtol* 2014 Apr;9(2):197-276.
- (246) Solomon MJ, Kogan M. Confocal Optical Microscopy. In: Wyder FBLL, editor. *Encyclopedia of Condensed Matter Physics* Oxford: Elsevier; 2005. p. 229-235.
- (247) Steinmeyer J, Konttinen YT. Oral treatment options for degenerative joint disease--presence and future. *Adv Drug Deliv Rev* 2006 May 20;58(2):168-211.
- (248) Stickens D, Behonick DJ, Ortega N, Heyer B, Hartenstein B, Yu Y, et al. Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development* 2004 Dec;131(23):5883-5895.
- (249) Sun F, Zhang Y, Li Q. Therapeutic mechanisms of ibuprofen, prednisone and betamethasone in osteoarthritis. *Mol Med Rep* 2017 Feb;15(2):981-987.
- (250) Sun HY, Hu KZ, Yin ZS. Inhibition of the p38-MAPK signaling pathway suppresses the apoptosis and expression of proinflammatory cytokines in human osteoarthritis chondrocytes. *Cytokine* 2017 Feb;90:135-143.
- (251) Sun L, Chen K, Jiang Z, Chen X, Ma J, Ma Q, et al. Indometacin inhibits the proliferation and activation of human pancreatic stellate cells through the downregulation of COX-2. *Oncol Rep* 2018 May;39(5):2243-2251.
- (252) Sun L, Wang X, Kaplan DL. A 3D cartilage - inflammatory cell culture system for the modeling of human osteoarthritis. *Biomaterials* 2011 Aug;32(24):5581-5589.
- (253) Sutton S, Clutterbuck A, Harris P, Gent T, Freeman S, Foster N, et al. The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *Vet J* 2009 Jan;179(1):10-24.
- (254) Takahashi D, Majima T, Onodera T, Kasahara Y, Inoue M, Irie T, et al. Celecoxib does not affect the release of hyaluronic acid in end stage osteoarthritic joints. *Mod Rheumatol* 2013 Sep;23(5):934-938.

(255) Takahashi T, Ogawa Y, Kitaoka K, Tani T, Uemura Y, Taguchi H, et al. Selective COX-2 inhibitor regulates the MAP kinase signaling pathway in human osteoarthritic chondrocytes after induction of nitric oxide. *Int J Mol Med* 2005 Feb;15(2):213-219.

(256) Takigawa M. CCN2: a master regulator of the genesis of bone and cartilage. *J Cell Commun Signal* 2013 Aug;7(3):191-201.

(257) Tchetina EV. Developmental mechanisms in articular cartilage degradation in osteoarthritis. *Arthritis* 2011;2011:683970.

(258) Tellegen AR, Rudnik-Jansen I, Pouran B, de Visser HM, Weinans HH, Thomas RE, et al. Controlled release of celecoxib inhibits inflammation, bone cysts and osteophyte formation in a preclinical model of osteoarthritis. *Drug Deliv* 2018 Nov;25(1):1438-1447.

(259) Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum* 2001 Mar;44(3):585-594.

(260) Tive L. Celecoxib clinical profile. *Rheumatology (Oxford)* 2000 Dec;39 Suppl 2:21-8; discussion 57-9.

(261) Tse AK, Cao HH, Cheng CY, Kwan HY, Yu H, Fong WF, et al. Indomethacin sensitizes TRAIL-resistant melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis through ROS-mediated upregulation of death receptor 5 and downregulation of survivin. *J Invest Dermatol* 2014 May;134(5):1397-1407.

(262) Tsuchida AI, Beekhuizen M, Rutgers M, van Osch GJ, Bekkers JE, Bot AG, et al. Interleukin-6 is elevated in synovial fluid of patients with focal cartilage defects and stimulates cartilage matrix production in an in vitro regeneration model. *Arthritis Res Ther* 2012 Dec 3;14(6):R262.

(263) Tsuchida AI, Beekhuizen M, 't Hart MC, Radstake TR, Dhert WJ, Saris DB, et al. Cytokine profiles in the joint depend on pathology, but are different between synovial fluid, cartilage tissue and cultured chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 2014 Sep 26;16(5):441-014-0441-0.

- (264) United Nations. Department of Economic and Social Affairs. Population Division. ST/ESA/SER.A/236 World Population to 2300. 2020; Available at: [https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/files/documents/2020/Jan/un\\_2002\\_world\\_population\\_to\\_2300.pdf](https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/files/documents/2020/Jan/un_2002_world_population_to_2300.pdf). Accessed 06/20, 2020.
- (265) Valle BL, D'Souza T, Becker KG, Wood WH, 3rd, Zhang Y, Wersto RP, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs decrease E2F1 expression and inhibit cell growth in ovarian cancer cells. *PLoS One* 2013 Apr 24;8(4):e61836.
- (266) van der Kraan PM, van den Berg WB. Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? *Osteoarthritis Cartilage* 2012 Mar;20(3):223-232.
- (267) van Leeuwen JS, Vermeulen NP, Vos JC. Involvement of the pleiotropic drug resistance response, protein kinase C signaling, and altered zinc homeostasis in resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to diclofenac. *Appl Environ Microbiol* 2011 Sep;77(17):5973-5980.
- (268) Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998;38:97-120.
- (269) Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Scand J Rheumatol Suppl* 1996;102:9-21.
- (270) Verma P, Dalal K. ADAMTS-4 and ADAMTS-5: key enzymes in osteoarthritis. *J Cell Biochem* 2011 Dec;112(12):3507-3514.
- (271) Vincourt JB, Etienne S, Grossin L, Cottet J, Bantsimba-Malanda C, Netter P, et al. Matrilin-3 switches from anti- to pro-anabolic upon integration to the extracellular matrix. *Matrix Biol* 2012 Jun;31(5):290-298.
- (272) von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Muller P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 1977 Jun 9;267(5611):531-532.
- (273) von der Mark K, Kirsch T, Nerlich A, Kuss A, Weseloh G, Glückert K, et al. Type X collagen synthesis in human osteoarthritic

cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Rheum* 1992 Jul;35(7):806-811.

(274) Wagener R, Ehlen HW, Ko YP, Kobbe B, Mann HH, Sengle G, et al. The matrilins--adaptor proteins in the extracellular matrix. *FEBS Lett* 2005 Jun 13;579(15):3323-3329.

(275) Walker MC, Kurumbail RG, Kiefer JR, Moreland KT, Koboldt CM, Isakson PC, et al. A three-step kinetic mechanism for selective inhibition of cyclo-oxygenase-2 by diarylheterocyclic inhibitors. *Biochem J* 2001 Aug 1;357(Pt 3):709-718.

(276) Wang JJ, Huan SK, Hsieh KH, Chou HC, Hsiao G, Jayakumar T, et al. Inhibitory effect of midazolam on MMP-9, MMP-1 and MMP-13 expression in PMA-stimulated human chondrocytes via recovery of NF-kappaB signaling. *Arch Med Sci* 2013 Apr 20;9(2):332-339.

(277) Wann AK, Mistry J, Blain EJ, Michael-Titus AT, Knight MM. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid reduce interleukin-1beta-mediated cartilage degradation. *Arthritis Res Ther* 2010;12(6):R207.

(278) Warner TD, Vojnovic I, Bishop-Bailey D, Mitchell JA. Influence of plasma protein on the potencies of inhibitors of cyclooxygenase-1 and -2. *FASEB J* 2006 Mar;20(3):542-544.

(279) Watt FM. Effect of seeding density on stability of the differentiated phenotype of pig articular chondrocytes in culture. *J Cell Sci* 1988 Mar;89(Pt 3):373-378.

(280) Whittaker CA, Hynes RO. Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell* 2002 Oct;13(10):3369-3387.

(281) Wiberg C, Klatt AR, Wagener R, Paulsson M, Bateman JF, Heinegård D, et al. Complexes of matrilin-1 and biglycan or decorin connect collagen VI microfibrils to both collagen II and aggrecan. *J Biol Chem* 2003 Sep 26;278(39):37698-37704.

(282) Wible DJ, Bratton SB. Apoptosis. In: McQueen C, editor. *Comprehensive Toxicology*. 3<sup>a</sup> ed.: Elsevier; 2018. p. 362-403.

- (283) Williams CS, Watson AJ, Sheng H, Helou R, Shao J, DuBois RN. Celecoxib prevents tumor growth in vivo without toxicity to normal gut: lack of correlation between in vitro and in vivo models. *Cancer Res* 2000 Nov 1;60(21):6045-6051.
- (284) Wojdasiewicz P, Poniatowski LA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm* 2014;2014:561459.
- (285) Wu JJ, Eyre DR. Matrilin-3 forms disulfide-linked oligomers with matrilin-1 in bovine epiphyseal cartilage. *J Biol Chem* 1998 Jul 10;273(28):17433-17438.
- (286) Wu QQ, Chen Q. Mechanoregulation of chondrocyte proliferation, maturation, and hypertrophy: ion-channel dependent transduction of matrix deformation signals. *Exp Cell Res* 2000 May 1;256(2):383-391.
- (287) Würstle ML, Laussmann MA, Rehm M. The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. *Exp Cell Res* 2012 Jul 1;318(11):1213-1220.
- (288) Xu MH, Zhang GY. Effect of indomethacin on cell cycle proteins in colon cancer cell lines. *World J Gastroenterol* 2005 Mar 21;11(11):1693-1696.
- (289) Xu XF, Xie CG, Wang XP, Liu J, Yu YC, Hu HL, et al. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses the growth of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *Tohoku J Exp Med* 2008 Jun;215(2):149-157.
- (290) Yang X, Trehan SK, Guan Y, Sun C, Moore DC, Jayasuriya CT, et al. Matrilin-3 inhibits chondrocyte hypertrophy as a bone morphogenetic protein-2 antagonist. *J Biol Chem* 2014 Dec 12;289(50):34768-34779.
- (291) Yin J, Yang Z, Cao YP, Ge ZG. Characterization of human primary chondrocytes of osteoarthritic cartilage at varying severity. *Chin Med J (Engl)* 2011 Dec;124(24):4245-4253.

(292) Zhang Y, Chen Q. Changes of matrilin forms during endochondral ossification. Molecular basis of oligomeric assembly. *J Biol Chem* 2000 Oct 20;275(42):32628-32634.

(293) Zhong L, Huang X, Karperien M, Post JN. Correlation between Gene Expression and Osteoarthritis Progression in Human. *Int J Mol Sci* 2016 Jul 14;17(7):1126. doi: 10.3390/ijms17071126.

(294) Zuscik MJ, Hilton MJ, Zhang X, Chen D, O'Keefe RJ. Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress. *J Clin Invest* 2008 Feb;118(2):429-438.

(295) Zweers MC, de Boer TN, van Roon J, Bijlsma JW, Lafeber FP, Mastbergen SC. Celecoxib: considerations regarding its potential disease-modifying properties in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2011;13(5):239.



La artrosis es la forma más común de artritis, una enfermedad crónica y degenerativa que involucra al cartílago articular y estructuras aledañas, cursando con dolor y ocasionando en última instancia la pérdida de la movilidad y la funcionalidad de la articulación afectada. En esta Tesis se ha estudiado el efecto de los fármacos indometacina, diclofenaco y celecoxib a la concentración de 1  $\mu\text{M}$  en cultivos celulares humanos artrósicos y sanos sobre diferentes procesos celulares, componentes de la matriz extracelular, y mediadores inflamatorios involucrados en la degeneración artrósica. Nuestros resultados contribuyen a la investigación sobre esta enfermedad incapacitante complementando la literatura existente y completando la ausencia de información en algunos apartados.