



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA (Q*) Facultat de Farmàcia

Programa de doctorado en BIOMEDICINA Y FARMACIA

**Estudio del secretoma de las células madre de
tejido adiposo y de péptidos PTHrP en células
articulares osteoartríticas**

Tesis Doctoral presentada por: Julia Platas Gil

Directores: María José Alcaraz Tormo

María Isabel Guillén Salazar

Valencia, 2016



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA

María José Alcaraz Tormo, Catedrática de la Universitat de València y
María Isabel Guillén Salazar, Profesora Titular de la Universidad CEU-Cardenal-
Herrera.

CERTIFICAN:

Que el trabajo presentado por la Licenciada Julia Platas Gil, titulado:
“Estudio del secretoma de las células madre de tejido adiposo y de péptidos PTHrP
en células articulares osteoartríticas” ha sido realizado en el *Departament de
Farmacologia* de la *Universitat de València*, bajo nuestra dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la
presentación de esta Tesis Doctoral para que sea juzgada por el Tribunal
correspondiente.

Valencia, a 8 de Julio de 2016

María José Alcaraz Tormo

María Isabel Guillén Salazar

La presente tesis doctoral ha sido financiada por las siguientes ayudas:

Proyecto SAF2010-22048 concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad: "Estrategias de protección frente a los procesos degradativos osteoarticulares"

Proyecto SAF2013-4874R concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad: "Mecanismos celulares reguladores de la respuesta inflamatoria en patologías inflamatorias crónicas"

Proyecto RETICEF RD07/0013/2001 concedido por el Instituto de Salud Carlos III: "Red de investigación en envejecimiento y fragilidad"

Proyecto RETICEF RD12/0043/0013 concedido por el Instituto de Salud Carlos III: "Red de investigación en envejecimiento y fragilidad"

Proyecto PROMETEO/2010/047 para grupos de investigación de excelencia concedido por la Generalitat Valenciana: "Mecanismos reguladores en procesos inflamatorios"

Proyecto PROMETEOII/2014/071 para grupos de investigación de excelencia concedido por la Generalitat Valenciana: "Estrategias de protección frente a procesos inflamatorios y degenerativos"

Beca predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (FPU) concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia.

A mis padres

A mi hermano

A mis tíos Jesús y Amelia

A Emilia

A Carlos

Quiero expresar mi agradecimiento a todos aquellos que me han ayudado a realizar mi Tesis Doctoral y a los que me han acompañado durante los años de doctorado:

A mis directoras, las doctoras María José Alcaraz e Isabel Guillén por permitirme formar parte de su grupo de investigación y darme la oportunidad de realizar esta Tesis, así como por su esfuerzo y dedicación durante estos años.

A los profesores del Departamento de Farmacología. A Marisa Ferrándiz, M^a Carmen Terencio, Carmen Montesinos y Miguel Payá por haberme ayudado tanto durante mi estancia en el departamento. A Pilar d'Ocon, Loles Ivorra y Marian Noguera por su cercanía y amabilidad, y a Salvador Máñez, por su apoyo y sus consejos.

A la doctora Edit Buzás por acogerme en su laboratorio en la Universidad de Semmelweis en Budapest y por tratarme como a un miembro más de su grupo. A Xabi, Andrea, Nickolett, Barbara, Kriszta, Tamás, Anikó, Eguzki y Juanjo por preocuparse tanto por mí durante mi estancia.

Al personal de secretaría, Mamen, Mati, Irene, Inés, Raquel, Carlos y Ángel, por toda la ayuda que he recibido de su parte durante este tiempo. A Ana y M^a Jesús del departamento de cultivos celulares, y a Mónica, Vicente y Óscar, por su amabilidad y simpatía.

A los miembros del tribunal y a los expertos evaluadores, por su esfuerzo en la lectura y valoración de la Tesis.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, con los que he compartido estos años. A Javier, Isabel y Victoria, por sus consejos y por haberme enseñado tanto. A Diana, Lidia, Rosa, Nuria, Nicla y Fermí, por el buen ambiente que han creado siempre en el laboratorio. A Rita, Anna, Jorge y Víctor por la amistad, la complicidad y las risas. A Cristina, con la que empecé y con la que he compartido la última etapa de la Tesis, por todo lo que aprendo de ella cada día y por querer siempre lo mejor para

mí. Y finalmente, a los que se quedan al cuidado del laboratorio: María, Andrea, Laura, Josep, Carmen y, en especial, a Miguel, por su ayuda durante los últimos meses.

Agradecer al doctor Eulogio Valentín permitirme realizar los trabajos de la beca de colaboración en su grupo y enseñarme a trabajar por primera vez en un laboratorio. A Sam, Leslie, Miguel, Teresa, Ruth, Antonio y Estela, por su paciencia y amistad.

A Anabel, Alex, Lucía y Elena, por vuestro cariño y por animarme tanto en esta última etapa de la Tesis. A Elsa, muchas gracias por tu amistad y por todo lo que me has ayudado estos años en los que hemos podido trabajar tan cerca. A mis amigos de siempre, por todo vuestro apoyo. A Rocío, Paco y David, también terminando la Tesis, gracias por vuestros consejos y por estar siempre dispuestos a echarme una mano. A mis futuros colegas de profesión, Delia y Ricardo. Y cómo no, gracias Guille, Dani, Ada, Dana, Laura, Eva y Javi, por todo vuestro cariño.

ABREVIATURAS

abs:	Absorbancia
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AP:	Proteína activadora
APC:	Aloficocianina
ARF:	<i>Alternate-reading frame</i>
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
ARNsi:	Ácido ribonucleico de interferencia de pequeño tamaño
ASC:	Células madre de tejido adiposo
ATP:	Adenin trifosfato
BDNF:	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BSA:	Albúmina bovina sérica
BMP:	Proteína morfogénica ósea
CD:	Clúster de diferenciación
CDK:	Cinasa dependiente de ciclinas
CNTF:	Factor neurotrófico ciliar
cols.:	Colaboradores
COX:	Ciclo-oxigenasa
cPGES:	Prostaglandina E sintasa citosólica
cpm:	Cuentas por minuto
Ct:	Ciclo umbral
Da:	Dalton
DAB:	Diaminobencidina
DAN:	2, 3- Diaminonaftaleno
DAPI:	4', 6-diamidino-2-fenilindol
DHR:	Dihidrorodamina
DMEM:	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DO:	Densidad óptica

DTT:	Ditiotreitol
EDTA:	Ácido tetramindiaminotetraacético
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico
ELC:	<i>EBI1 ligand chemokine</i>
ELISA:	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas
ENA:	<i>Epithelial neutrophil-activating protein</i>
ERK:	Cinasa regulada por señales extracelulares
ESC:	Célula madre embrionaria
EV:	Vesículas extracelulares
FGF:	Factor de crecimiento fibroblástico
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína
FRET:	Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia
FSC:	<i>Forward scatter</i>
GAPDH:	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GDNF:	Factor neurotrófico derivado de la línea glial
Gro:	<i>Growth-regulated protein</i>
HAT:	Histona acetiltransferasa
HDAC:	Histona desacetilasas
HDM2:	Human doble minute 2
HLA-DR:	Antígeno leucocitario humano- DR
4-HNE:	4-hidroxinonenal
HRP:	Peroxidasa de rábano
IGFBP:	Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina
IFN:	Interferón
IKK:	Cinasa IκB
Ig:	Inmunoglobulina
IL:	Interleucina
IP:	Yoduro de propidio
IPSC:	Célula madre pluripotente inducida
JNK:	Cinasa N-terminal de c-Jun
LARC:	<i>Liver activation regulated chemokine</i>
LBP:	Proteína de unión a lipopolisacárido
LPS:	Lipopolisacárido

M-CSF:	Factor estimulador de colonias de macrófagos
MA:	Medio acondicionado
MAPK:	Proteína cinasa activada por mitógenos, MAP cinasa
MCP:	Proteína quimiotáctica de monocitos
MIG:	Inmunoglobulina de membrana de linfocito B
MIP:	Proteína inflamatoria de macrófagos
MMP:	Metaloproteinasa de matriz, metaloproteasa de matriz
mPGES-1:	Prostaglandina E sintasa microsomal-1
MSC:	Célula madre mesenquimal
MTT:	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
MV:	Microvesículas
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NAP:	Proteína activadora de neutrófilos
NAT:	1-(H)-naftotriazol
NF-κB:	Factor nuclear κB
NO:	Óxido nítrico
NOS:	Sintasa de óxido nítrico
NOS-2/iNOS:	Sintasa de óxido nítrico inducible
NT:	Neurotrofina
OA:	Osteoartritis
PBS:	Tampón fosfato salino
PCNA:	Antígeno proliferante celular nuclear
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF:	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGE ₂ :	Prostaglandina E ₂
PE:	Ficoeritrina
PerCP:	Proteína clorofila peridina
pRb:	Proteína del retinoblastoma
PPAR:	Factor proliferador de peroxisomas
PTH:	Hormona paratiroidea
PTHr1:	Receptor de la hormona paratiroidea de tipo 1
PTHrP:	Proteína relacionada con la hormona paratiroidea
PVDF:	Polivinildeno difluoruro

RANKL:	Ligando del receptor activador del factor nuclear- κ B
RANTES:	Regulador de la activación de las células T normalmente secretadas y expresadas
RIA:	Radioinmunoensayo
ROS:	Especies reactivas del oxígeno
rpm:	Revoluciones por minuto
RT-PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa
Runx2:	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
SA- β -Gal:	β -galactosidasa asociada a senescencia
SAPK:	Proteín cinasa activada por estrés
SBF:	Suero bovino fetal
SCF:	Factor de células madre
SDF:	Factor derivado de células estromales
SDS:	Sodio dodecilsulfato
S.E.M:	Error estándar de la media
SIPS:	Senescencia prematura inducida por estrés
siRNA:	Pequeñas moléculas de ARN de interferencia
Smad:	<i>Small mothers against decapentaplegic</i>
SSC:	<i>Side scatter</i>
TGF:	Factor de crecimiento transformante
TIMP:	Inhibidor tisular de las metaloproteinasas
TLR4:	Receptor de tipo Toll
TMB:	Tetrametilbenzidina
TNF:	Factor de necrosis tumoral
UF:	Unidades de fluorescencia
VEGF:	Factor de crecimiento del endotelio vascular

ÍNDICE

Resumen/abstract.....	27
Introducción.....	37
1. Osteoartritis.....	37
1.1. Papel de la inflamación en el desarrollo de la OA.....	42
1.1.1. Citocinas.....	43
1.1.2. Quimiocinas.....	44
1.1.3. Prostaglandina E ₂	46
1.1.4. Estrés oxidativo y radicales libres.....	47
1.2. Vías de señalización implicadas en la patogénesis de la OA.....	49
1.2.1. Vía de las MAPKs.....	49
1.2.2. Factor nuclear- κ B.....	50
1.2.3. AP-1.....	51
2. Senescencia celular.....	52
2.1. Control de la senescencia.....	53
2.1.1. Vía de p53.....	54
2.1.2. Vía de p16-pRb.....	55
2.2. Sirtuínas.....	56
2.3. Caveolina-1.....	58
3. Células madre mesenquimales.....	60
3.1. Células madre de tejido adiposo.....	61
3.2. Aplicación clínica de las MSCs.....	62
3.3. Medio acondicionado de las MSCs.....	64
4. Proteína relacionada con la hormona paratiroidea.....	66
4.1. Acciones de PTH y PTHrP.....	67
4.2. Péptidos derivados de la PTHrP.....	69
Objetivos.....	73

Material y métodos.....	77
1. Cultivos celulares	77
1.1. Aislamiento y cultivo de ASCs	77
1.1.1. Caracterización de ASCs por citometría de flujo	78
1.1.2. Aislamiento de vesículas extracelulares	81
1.1.3. Cuantificación de vesículas extracelulares	83
1.1.4. Caracterización de microvesículas por citometría de flujo	84
1.2. Aislamiento y cultivo de monocitos.....	85
1.2.1. Caracterización de los monocitos por citometría de flujo.....	87
1.3. Aislamiento y cultivo de condrocitos.....	88
1.4. Aislamiento y cultivo de osteoblastos	90
2. Tratamiento de los cultivos celulares.....	92
2.1. Cultivos de ASCs	93
2.2. Cultivos de monocitos.....	93
2.3. Cultivos de condrocitos.....	93
2.3.1. Inhibición de la expresión génica mediante siARN.....	93
2.4. Cultivos de osteoblastos	94
3. Ensayo de MTT	94
4. Medida del estrés oxidativo con dihidrorodamina 123.....	96
5. Determinación de aductos proteicos de hidroxinonanal.....	96
6. Determinación de la producción de nitrato.....	97
7. Despolarización mitocondrial.....	98
8. Determinación de la actividad metaloproteinasas	98
9. Análisis de la expresión génica.....	100
9.1. Extracción y cuantificación del ARN.....	100
9.2. Transcripción inversa (RT)	101
9.3. PCR cuantitativa a tiempo real.....	101
10. Análisis de la expresión proteica	102
10.1. Extracción y cuantificación del contenido proteico	102
10.1.1. Obtención de sobrenadantes celulares y lisis total de las células.....	103
10.1.2. Obtención de la fracción nuclear	103
10.1.3. Cuantificación proteica	104
10.2. Western blot.....	104
10.3. ELISA	107

10.4. Radioinmunoensayo	109
10.5. <i>Array</i> de proteínas	110
10.6. Análisis inmunocitoquímico.....	111
10.6.1. Colágeno II.....	111
10.6.2. Ciclooxigenasa-2	112
10.7. Análisis inmunofluorescente	112
10.7.1. Colágeno II.....	113
10.7.2. γ H2A.X.....	113
10.7.3. F-actina	114
11. Estudio de la actividad β -galactosidasa	114
12. Estudio de mineralización ósea.....	115
13. Ensayo de migración-quimiotaxis.....	116
14. Fagocitosis	117
15. Análisis estadístico y expresión de resultados	118
Resultados	123
1. Estudio del MA de las ASCs	123
2. Efectos del MA de las ASCs sobre el estrés oxidativo y la inflamación en monocitos y macrófagos humanos.....	129
2.1. Efectos del MA sobre la viabilidad celular	129
2.2. Efectos del MA sobre el estrés oxidativo	130
2.3. Efectos del MA sobre el potencial de membrana mitocondrial.....	131
2.4. Efectos del MA sobre la producción de nitrito.....	131
2.5. Efectos del MA sobre la producción de PGE ₂	132
2.6. Efectos del MA sobre la migración celular	133
2.7. Efectos del MA sobre la fagocitosis	134
3. Efectos del MA de ASCs sobre la respuesta inflamatoria en cultivos primarios de condrocitos humanos osteoartríticos	139
3.1. Efectos del MA sobre la viabilidad celular	139
3.2. Efecto del MA sobre la expresión de colágeno II	141
3.3. Efecto del MA sobre las enzimas degradativas del cartílago	142
3.4. Efecto del MA sobre la producción de citocinas.....	144
3.5. Efecto del MA sobre la expresión de ARNm de α - y β quimiocinas	145

3.6. Efecto del MA sobre la producción de PGE ₂ y la expresión de ARNm de COX-2 y mPGEs-1.....	147
3.7. Efecto del MA sobre la producción de NO y la expresión de ARNm de iNOS.....	148
3.8. Efecto del MA sobre la activación de NF-κB.....	149
4. Efectos del MA de ASCs sobre la senescencia inducida por estrés en condrocitos humanos osteoartrotríticos.....	153
4.1. Efecto del MA sobre la SA-β-Gal.....	153
4.2. Efecto del MA sobre la acumulación de focos de γH2AX.....	155
4.3. Efecto del MA sobre la distribución de F-actina.....	156
4.4. Efecto del MA sobre el estrés oxidativo.....	157
4.5. Efecto del MA sobre caveolina-1, p53, p21 y p16.....	158
4.6. Efecto del MA sobre la producción de Sirt1.....	161
4.7. Efecto del MA sobre la activación de MAPKs.....	164
5. Efectos de los péptidos PTHrP sobre la senescencia celular inducida por estrés en osteoblastos.....	169
5.1. Efectos de los péptidos PTHrP sobre la viabilidad celular.....	169
5.2. Efecto de los péptidos PTHrP sobre la SA-β-Gal.....	170
5.3. Efecto de los péptidos PTHrP sobre la acumulación de focos de γH2AX.....	172
5.4. Efecto de los péptidos PTHrP sobre la expresión de ARNm de p53, p21, p16 y caveolina-1.....	174
5.5. Efecto de los péptidos PTHrP sobre la producción de citocinas.....	175
5.6. Efecto de los péptidos PTHrP sobre la producción de PGE ₂ y la expresión de ARNm de COX-2.....	177
5.7. Efecto de los péptidos PTHrP sobre la distribución de F-actina.....	180
5.8. Efecto de los péptidos PTHrP sobre la mineralización ósea.....	181
5.9. Efecto de los péptidos PTHrP sobre la expresión de ARNm de MMP-1 y MMP-3.....	182
5.10. Efecto de los péptidos PTHrP sobre la activación de NF-κB y AP-1.....	184
Discusión.....	187
Conclusiones.....	203

Referencias bibliográficas	207
Anexos	243

RESUMEN/ABSTRACT

La osteoartritis (OA) es la patología articular más frecuente y la causa más importante de discapacidad en personas de edad avanzada. Existe un gran interés en el estudio de nuevas dianas terapéuticas que puedan facilitar la prevención o tratamiento de la OA, ya que actualmente no existe ningún tratamiento eficaz. En este trabajo, se han abordado dos posibles nuevas estrategias: el medio acondicionado (MA) de las células madre del tejido adiposo (ASCs) y los péptidos derivados de la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP).

Las ASCs tienen un elevado potencial terapéutico. Numerosos estudios han mostrado que ejercen efectos beneficiosos en diferentes modelos de enfermedad a través de un aumento de la regeneración tisular debida, en parte, a su capacidad de diferenciación multipotencial. Sin embargo, estos beneficios también se deben a la disminución de las respuestas inmunitarias e inflamatorias, que parece depender de la actividad paracrina de las ASCs. Como resultado, se ha empezado a estudiar el secretoma de estas células para su posible empleo como terapia en la clínica. Este secretoma contiene factores solubles y vesículas extracelulares.

En nuestro estudio se ha analizado el efecto del MA de las ASCs en las células inflamatorias humanas monocitos y macrófagos. En monocitos estimulados con lipopolisacárido (LPS), el MA reduce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO), y normaliza el potencial de membrana mitocondrial, respecto a las células estimuladas con LPS. Además, el MA también disminuye significativamente los niveles de PGE₂ y las funciones celulares de migración celular de monocitos y la fagocitosis de macrófagos. Nuestros resultados sugieren que el MA podría utilizarse en el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos para enfermedades inflamatorias.

Varios estudios han mostrado los beneficios potenciales de las ASCs en la reparación del cartílago. En nuestro trabajo se ha puesto de manifiesto que el MA puede regular diferentes mediadores clave implicados en la degeneración del cartílago, en condrocitos osteoartríticos. Así, hemos observado que el MA aumenta la expresión de colágeno de tipo II en condrocitos osteoartríticos estimulados con interleucina(IL)-1 β . En estas condiciones, el MA disminuye la actividad metaloproteinasas (MMP) en sobrenadantes celulares, así como los niveles de proteínas y ARNm de MMP-3 y MMP-13. Además, el MA aumenta los niveles de IL-

10 y contrarresta los efectos de IL-1 β en la producción del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), IL-6, PGE₂, NO, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL19, CCL20, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5 y CXCL8. También reduce la expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2), prostaglandina E sintasa microsomal (mPGES)-1 y NO sintasa inducible (iNOS). Estos efectos pueden ser debidos a la inhibición de la activación del factor nuclear- κ B (NF- κ B).

El envejecimiento y la exposición a diferentes tipos de estrés determinan el fenotipo condrocítico en la OA. La exposición crónica a mediadores inflamatorios puede conducir a la senescencia inducida por estrés, que contribuye a la degeneración del cartílago en la OA. Este estudio ha demostrado que el MA de las ASCs puede regular la senescencia inducida por estrés en condrocitos osteoartríticos. Nuestros resultados indican que el MA disminuye la aparición de marcadores de senescencia inducidos por IL-1 β , como la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -Gal), la acumulación de focos de histona fosforilada H2AX (γ H2AX) y los cambios morfológicos con formación de fibras de estrés de actina. Estos efectos son el resultado de la reducción de diferentes mediadores y vías de señalización: el estrés oxidativo, la activación de protein-cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), la expresión de caveolina-1 y p21, y la acetilación de p53, la cual está relacionada con un aumento en la expresión de Sirt1. Consecuentemente, el MA puede ejercer efectos protectores en la degeneración de los tejidos articulares, contrarrestando la senescencia prematura de condrocitos osteoartríticos inducida por estrés inflamatorio.

La OA se ha asociado con un metabolismo alterado del hueso subcondral. Ello justifica nuestro interés en el estudio de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a la modificación del metabolismo óseo. Se han determinado los efectos de tres péptidos PTHrP: PTHrP (1-37) (N-terminal), PTHrP (107-111) y PTHrP (107-139) (C-terminales), sobre la producción de mediadores inflamatorios y degradativos, y la aparición de características senescentes inducidas por estrés inflamatorio en osteoblastos humanos osteoartríticos. La incubación con IL-1 β de estas células en cultivo primario conduce a un aumento en la expresión de los marcadores de senescencia SA- β -Gal, γ H2AX, p16, p21, p53 y caveolina-1, mientras que el tratamiento con PTHrP (107-111) o PTHrP (107-139) reduce

significativamente estos parámetros. Los tres péptidos favorecen la función osteoblástica, con una mayor eficacia de PTHrP (107–139). Además, los tres péptidos PTHrP disminuyen la expresión génica de MMP-1 y MMP-3, mientras que únicamente los C-terminal disminuyen la producción de IL-6, así como de PGE₂, que es consecuencia de una menor expresión de COX-2. PTHrP (107–139) reduce también la liberación de TNF- α . Estos efectos antiinflamatorios están relacionados con la reducción de la activación de NF- κ B por ambos péptidos, y de la proteína activadora-1 (AP-1) por parte de PTHrP (107–139). Nuestros resultados indican que la actividad antisenescente y antiinflamatoria de estos péptidos radica en la región C-terminal de PTHrP, y sugieren que estos fármacos podrían tener aplicaciones en enfermedades inflamatorias crónicas como la OA.

Palabras clave: osteoartritis, inflamación, senescencia, células madre de tejido adiposo, medio acondicionado, proteína relacionada con la hormona paratiroidea, interleucina-1 β , condrocitos, osteoblastos.

Osteoarthritis (OA) is the most frequent joint disorder and an important cause of disability in the elderly. There is great interest in the study of new therapeutic targets that may facilitate the prevention or treatment of OA, since there is currently no effective treatment. In this work, we have addressed two possible new strategies: conditioned medium (CM) from stem cells from adipose tissue (ASCs) and parathyroid hormone-related protein (PTHrP) derived peptides.

ASCs have a significant therapeutic potential. Numerous studies have shown that ASCs exert beneficial effects in various models of disease through the enhancement of tissue regeneration by their multipotential differentiation. However, these benefits are also due to the downregulation of immune and inflammation responses, which are thought to depend on their paracrine activity. As a result, there has been a growing interest in the study of the secretome from these cells for possible clinical use. This secretome contains soluble factors and also extracellular vesicles.

Our study has analyzed the effect of conditioned medium (CM) from ASCs in inflammatory cells, monocytes and macrophages. In monocytes stimulated with lipopolysaccharide (LPS), CM reduces the production of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and controls the mitochondrial membrane potential. Moreover, CM significantly reduces the levels of PGE₂ and cellular function of monocyte migration and phagocytosis by macrophages. Our results suggest that CM could be used in the development of therapeutical approaches for inflammatory diseases.

A number of studies have shown the potential benefits of ASCs for cartilage repair. Our study shows that CM may regulate a number of key mediators involved in cartilage degeneration in osteoarthritic chondrocytes. We have observed that CM enhances type II collagen expression in osteoarthritic chondrocytes stimulated with interleukin-1 β (IL-1 β). In these conditions, CM reduces matrix metalloproteinase (MMP) activity in cell supernatants as well as the levels of MMP-3 and MMP-13 protein and mRNA.

In addition, CM increases IL-10 levels and counteracts the stimulating effects of IL-1 β in the production of tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-6, PGE₂, NO,

CCL2, CCL-3, CCL-4, CCL-5, CCL-8, CCL-19, CCL20, CXCL-1, CXCL-2, CXCL-3, CXCL-5 and CXCL-8. It also reduces cyclooxygenase-2 (COX-2), microsomal prostaglandin E synthase (mPGES)-1 and inducible NO synthase (iNOS) expression. These effects may be due to the inhibition of nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation.

Aging and exposure to different stresses determine the chondrocyte phenotype in OA. Chronic exposure to inflammatory mediators might lead to stress-induced senescence that contributes to cartilage degeneration in OA. This study has demonstrated that CM from ASCs can regulate stress-induced senescence in osteoarthritic chondrocytes. Our results indicate that CM downregulates senescence markers induced by IL-1 β . Such markers include senescence-associated β -galactosidase activity (SA- β -Gal), accumulation of phosphorylated histone H2AX (γ H2AX) foci and morphological changes with formation of actin stress fibers. These effects are the result of a reduction in different mediators and signalling pathways: oxidative stress, mitogen-activated protein kinases (MAPKs) activation, caveolin-1 and p21 expression and p53 acetylation, which is related to an enhanced Sirt1 expression. Consequently, CM may exert protective effects in degenerative joint conditions tissue by countering the premature senescence of osteoarthritic chondrocytes induced by inflammatory stress.

OA is also associated with altered metabolism in subchondral bone. This justifies our interest in therapeutic strategies aimed at the modification of bone cell metabolism. We have investigated the effects of three PTHrP derived peptides: PTHrP (1-37) (N-terminal), PTHrP (107-111) and PTHrP (107-139) (C-terminal) on the production of inflammatory and catabolic mediators, and the appearance of senescent characteristics induced by inflammatory stress in human osteoarthritic osteoblasts. Incubation of these primary cells with IL-1 β leads to an increased expression of senescence markers SA- β -Gal activity, γ H2AX foci, p16, p21, p53 and caveolin-1. PTHrP (107-111) and PTHrP (107-139) significantly reduced all these parameters. These peptides improve osteoblastic function, PTHrP (107-139) showing a greater efficiency. All three PTHrP derived peptides reduce gene expression of MMP-1 and MMP3, while only C-terminal peptides decrease the production of IL-6 and PGE₂, which is the consequence of COX-2 downregulation.

PTHrP (107–139) also reduces TNF- α release. Such anti-inflammatory effects are related to the reduction of NF- κ B activation by both peptides and activator protein-1 (AP-1) by PTHrP (107–139). Our data support an anti-senescence and anti-inflammatory role for the C-terminal moiety of PTHrP with potential applications in chronic inflammatory conditions such as OA.

Keywords: osteoarthritis, inflammation, senescence, adipose stem cells, conditioned medium, parathyroid hormone-related protein, interleukin-1 β , chondrocytes, osteoblasts.

INTRODUCCIÓN

1. Osteoartritis

La osteoartritis (OA) o artrosis es una patología relacionada con los procesos de envejecimiento, que afecta a las articulaciones y se considera la principal causa de dolor e incapacidad física en personas de edad avanzada (Loeser y cols., 2016). Se caracteriza por una destrucción del cartílago articular acompañada de hipertrofia ósea con formación de osteofitos, esclerosis del hueso subcondral, inflamación crónica de la membrana sinovial y disminución del espacio articular (figura 1). Estos cambios estructurales se manifiestan con dolor, rigidez, deformación y limitación funcional de la articulación.

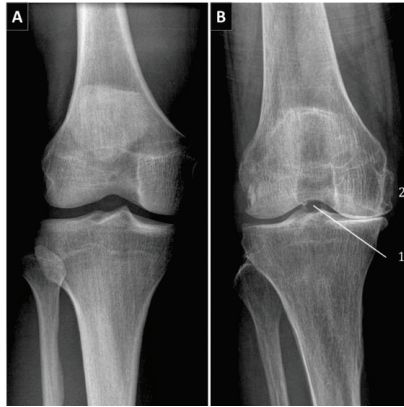


Figura 1. Radiografía de la articulación de una rodilla sana (A) y una articulación con OA (B).
1. Disminución de la cavidad articular. 2. Osteofitos. Imagen adaptada de Altman y Gold, 2007.

A pesar de que la etiología de la enfermedad no está completamente definida, se conocen determinados factores de riesgo que se relacionan con su aparición, como la edad y el sexo de los pacientes, las lesiones previas en la articulación, la obesidad, la predisposición genética y los factores mecánicos (Loeser, 2012). Según el estudio EPISER de prevalencia de enfermedades reumáticas en la población española (Carmona y cols., 2001), la artrosis de rodilla en España afecta a un tercio de la población de más de 60 años de edad, siendo más frecuente en mujeres que en hombres.

Las estrategias terapéuticas disponibles para el tratamiento de la OA están dirigidas a aliviar la sintomatología, por lo que se hace necesaria la investigación de nuevas dianas terapéuticas capaces de actuar a nivel de la destrucción articular (Martel-Pelletier y cols., 2012).

Las articulaciones sinoviales o diartrosis, y las anfiartrosis, pueden dar origen a una degeneración osteoartrítica, siendo las más afectadas las de las rodillas, las caderas, las articulaciones interfalángicas distales y proximales de los dedos de la mano y las apófisis posteriores de la columna vertebral.

Las articulaciones sinoviales constituyen la unión entre dos o más huesos separados y revestidos por una capa de cartílago. La unión de los elementos óseos está rodeada por una cápsula articular que se encuentra reforzada por los tendones de los músculos, los ligamentos intraarticulares y los meniscos. La cápsula articular encierra una cavidad revestida por una membrana sinovial que produce el fluido sinovial, el cual facilita el movimiento de la articulación y permite el transporte de nutrientes. En el cartílago articular se distinguen las zonas superficial, intermedia, profunda y calcificada, en contacto con el hueso subcondral (Ge y cols., 2006) (figura 2).

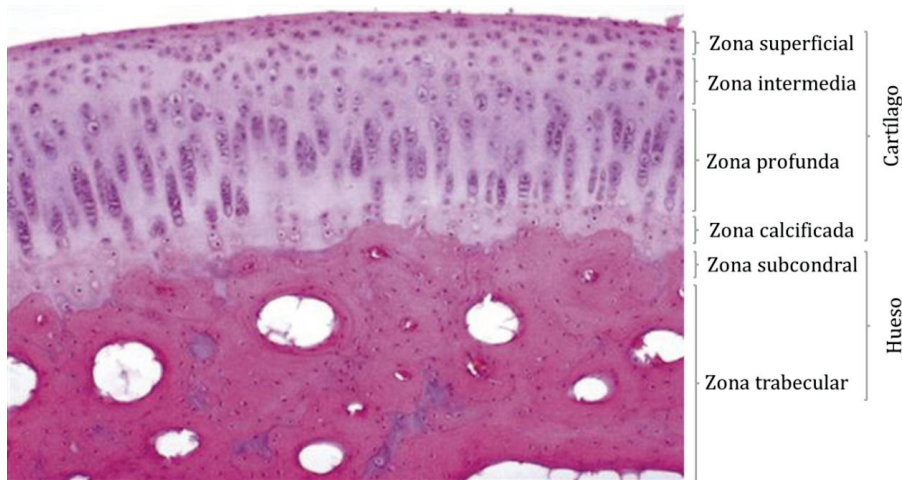


Figura 2. Corte histológico de cartílago y hueso subcondral. Imagen adaptada de Kerr, 1999.

El cartílago articular es un tipo de cartílago hialino que recubre las epífisis óseas de las articulaciones diartroidales confiriéndoles la capacidad de absorber impactos y mantener las fuerzas de cizalla. El cartílago hialino es un tejido avascular y recibe los nutrientes del líquido sinovial y de los vasos sanguíneos, localizados en el hueso subcondral que están en contacto directo con la zona

calcificada del cartílago. Está formado por un componente celular, los condrocitos, que constituyen el 1-2% del volumen total del cartílago y un componente acelular, la matriz extracelular. Los condrocitos, único elemento celular del cartílago, están especializados en la biosíntesis y el mantenimiento de los componentes de la matriz extracelular. Esta matriz está constituida en su mayoría por agua, en un 80%, y por colágeno, proteoglicanos y otras proteínas. El 90-95% del colágeno que compone la matriz es de tipo II, aunque también forman parte de la misma los colágenos de tipo VI, IX, XI, XII y XIV. Las fibras de colágeno dotan al cartílago de la rigidez y la resistencia a la tracción producida por el movimiento de la articulación. Por otra parte, los proteoglicanos son macromoléculas constituidas por un eje central lineal de naturaleza proteica a las que están conectadas, mediante enlaces covalentes, cadenas de glicosaminoglicanos representados por el condroitín sulfato, queratán sulfato y dermatán sulfato. El ácido hialurónico, un glicosaminoglicano producido por el condrocito, tiene la función de enlazar entre sí los diversos proteoglicanos a través de un enlace proteico (proteínas de unión), formando agregados voluminosos de proteoglicanos. Estos agregados ocupan los espacios entre las redes de fibrillas colágenas (Eyre, 2002; Martel-Pelletier y cols., 2008).

La degradación de las proteínas de la matriz extracelular se efectúa por medio de enzimas específicas, las proteasas, entre las que destacan las metaloproteinasas de matriz (MMPs) (tabla 1). Las MMPs son una familia de endopeptidasas dependientes de cinc que juegan un importante papel en el recambio de los componentes de la matriz extracelular. En los procesos fisiológicos su principal función es eliminar las proteínas dañadas y de esta manera permitir su reemplazo por proteínas nuevas (Page-McCaw y cols., 2007; Stamenkovic, 2003). Su secreción y actividad están reguladas de manera precisa para poder llevar a cabo sus funciones fisiológicas. Cuando la regulación fisiológica se altera, como ocurre en la OA, se produce un aumento en la secreción y activación de las MMPs, lo que puede desencadenar el proceso patológico (Troeborg y Nagase, 2012). En el cartílago afectado por OA se han detectado niveles elevados de MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 y MMP-13, que desempeñan un papel muy importante en la destrucción tisular (Tetlow y cols., 2001).

Nombre	Otros nombres	Sustrato
MMP-1	Colagenasa-1	Colágenos (I, II, III, VII, VIII y X), gelatina, agregano, proteínas de unión
MMP-8	Colagenasa-2	Colágenos (I, II, III, V, VII, VIII y X) gelatina, agregano
MMP-13	Colagenasa-3	Colágenos (I, II, III, IV, IX, X y XIV), gelatina, agregano
MMP-2	Gelatinasa A	Colágenos (I, IV, V, VII, X, XI y XIV), gelatina, agregano, proteínas de unión
MMP-9	Gelatinasa B	Colágenos (IV, V, VII, X y XIV), gelatina, agregano, proteínas de unión
MMP-3	Estromelisina-1	Colágenos (III, IV, V y IX), gelatina, agregano
MMP-10	Estromelisina-2	Colágenos (III, IV y V), gelatina, agregano, proteínas de unión
MMP-7	Matrilisina-1	Colágenos (I y IV), gelatina, agregano

Tabla 1. Clasificación de las principales MMPs. Adaptada de Visse y Nagase, 2003.

En el cartílago normal adulto en reposo, los condrocitos están presentes como células quiescentes y hay poco recambio de matriz extracelular. Sin embargo en el cartílago de las articulaciones afectadas de OA, los condrocitos se activan, lo que provoca el aumento de producción de enzimas degradativas de la matriz. Esto conduce al remodelado de la matriz, hipertrofia de los condrocitos y calcificación del cartílago. Los condrocitos en el cartílago OA expresan receptores de citocinas y quimiocinas, producen MMPs y activan un gran número de genes que aumentan o modulan las respuestas catabólicas e inflamatorias, incluyendo la COX-2, la prostaglandina E sintasa microsomal (mPGES)-1 y la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS). La activación de los condrocitos por estímulos mecánicos e inflamatorios ocurre principalmente a través del factor nuclear- κ B (NF- κ B) y las

vías de las proteín-quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) (Goldring y Marcu, 2009). Sin embargo, la edad avanzada es un factor de riesgo importante en la patogenia de la OA, y los cambios relacionados con la edad pueden contribuir a un aumento excesivo en la remodelación de la matriz extracelular. Estos cambios incluyen la aparición de un fenotipo secretor asociado a senescencia en condrocitos, que produce un aumento en la producción de citocinas, quimiocinas y MMPs por estas células (Loeser, 2009).

El tejido óseo está formado por una matriz ósea y células especializadas. La matriz ósea tiene un componente proteico, cuyo elemento principal es el colágeno tipo I que conforma el 85-90% del total de proteínas, aunque también contiene glicoproteínas de forma minoritaria, como la osteonectina, la osteocalcina y la osteopontina, y un componente mineral formado mayoritariamente por cristales de hidroxiapatita y, en menor medida, carbonato cálcico, sulfatos, fluoruros e hidróxido de magnesio. El hueso subcondral incluye el hueso laminar cortical y el hueso trabecular. El hueso laminar cortical es poco poroso y vascularizado, mientras que el hueso trabecular es más blando y actúa absorbiendo impactos y modificando las fuerzas compresivas a las que está sometido el cartílago articular (Goldring y Goldring, 2010).

Las principales enzimas responsables de la degradación del colágeno presente en el hueso, de tipo I, son MMP-1 y MMP-13, por lo que se consideran importantes factores en el catabolismo del hueso subcondral (Hayami y cols., 2008). En los estados iniciales de la OA se produce un aumento de la resorción ósea y conforme evoluciona la enfermedad se va produciendo la esclerosis del hueso (Kwan y cols., 2004).

En la edad adulta, la masa ósea está determinada principalmente por la remodelación del hueso. En condiciones fisiológicas, hay un equilibrio entre las fases de resorción y de formación de hueso, de manera que la masa ósea se mantiene. El mantenimiento de la masa ósea depende de la acción coordinada de los osteoclastos de resorción de la matriz ósea y las células formadoras de hueso, los osteoblastos y osteocitos. Este proceso se inicia con la acción de los osteoclastos, que actúan eliminando el hueso, y los osteoblastos, que continúan con

la formación de hueso para reemplazar al que ha sido reabsorbido (Khosla y cols., 2008).

El remodelado óseo se inicia con la activación de la resorción del hueso y continúa rellenando la cavidad del mismo con células de la línea osteoblástica. Al final de la formación de hueso la mayoría de los osteoblastos mueren por apoptosis, algunos se vuelven quiescentes en la nueva superficie de hueso, y otros quedan embebidos en la matriz como osteoblastos diferenciados: los osteocitos. Estas células están conectadas entre sí y también con otras células de la superficie y de la médula ósea por proyecciones citoplasmáticas en el interior de los canalículos rodeados de matriz ósea. A través de esta comunicación, los osteocitos secretan proteínas como la esclerostina, un inhibidor de la vía Wnt que inhibe la formación de hueso, y el RANKL (ligando del receptor activador del factor nuclear- κ B), que modula la remodelación de hueso mediante mecanismos autocrinos y paracrinos (Bonewald, 2011).

Las células de linajes osteoblástico y osteoclástico responden a varias hormonas sistémicas como son la hormona paratiroidea (PTH) y la 1,25-dihidroxitamina D_3 , y a factores locales, como las BMPs (proteínas morfogénicas óseas), que se encuentran bajo control hormonal. Muchos factores con control de la osteoblastogénesis y formación de hueso parecen actuar a través de vías de señalización comunes, las cuales incluyen BMPs, el factor de transcripción Smad, la vía de las MAPKs y la vía Wnt/ β -catenina, así como la activación de Runx2 (Esbrit y Alcaraz, 2013).

1.1. Papel de la inflamación en el desarrollo de la OA

La OA se ha definido tradicionalmente como una artropatía “no inflamatoria”. Sin embargo, actualmente se reconoce la implicación del componente inflamatorio que produce los síntomas de dolor, rigidez e hinchazón en la articulación, y que se justifica por la presencia de mediadores inflamatorios que contribuyen, en gran medida, a la progresión de la enfermedad.

1.1.1. Citocinas

Las citocinas son mediadores inflamatorios cruciales implicados en la inflamación y la destrucción del tejido articular en la OA. Entre ellas destacan la interleucina (IL)-1 β , el factor de necrosis tumoral (TNF)- α y la IL-6, que son consideradas las principales citocinas proinflamatorias implicadas en esta patología, aunque otras, como IL-15, IL-17, IL-18, IL-21 y un gran número de quimiocinas también están relacionadas con el desarrollo de la enfermedad (Kapoor y cols., 2011).

Tanto IL-1 β como TNF- α , que son producidas por condrocitos, células mononucleares, osteoblastos y sinoviocitos, inducen la producción de un gran número de factores inflamatorios y catabólicos. Estas citocinas se encuentran elevadas en el líquido sinovial, membrana sinovial, hueso subcondral y cartílago de pacientes con OA. Numerosos estudios demuestran que IL-1 β y TNF- α disminuyen la síntesis de los principales componentes de la matriz extracelular e inhiben las actividades anabólicas de los condrocitos (Kobayashi y cols., 2005). En cultivos celulares de condrocitos, el tratamiento con IL-1 β reduce la expresión de colágeno de tipo II y de agregano, y se ha observado que suprime la síntesis de proteoglicano (Dodge y Poole, 1989; Goldring, 2000a; Stöve y cols., 2001; van der Kraan y van der Berg, 2000). IL-1 β favorece la síntesis y actividad de distintas MMPs y agreganasas (Chevalier, 1997; Mengshol y cols, 2000), de otras citocinas proinflamatorias como IL-6 (Bender y cols, 1990) y de otros mediadores inflamatorios implicados en la patología de la OA. De hecho, el tratamiento de condrocitos con IL-1 β , aumenta la expresión de genes que codifican la iNOS, COX-2 y mPGES-1, y estimula además la liberación de óxido nítrico (NO) y PGE₂ (Hedbom y Häuselmann, 2002). IL-1 β y TNF- α inducen también la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), los cuales contribuyen a la degradación articular a través de diferentes mecanismos. Además, ambas citocinas disminuyen la expresión de enzimas antioxidantes, incluyendo la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa, acelerando así los efectos de los ROS sobre los tejidos articulares (Mathy-Hartert y cols., 2008). Estos cambios conducen a la reparación inadecuada de la matriz y, a su vez, a una mayor alteración del cartílago.

Otra citocina de gran importancia en la patogenia de la OA, es la IL-6. Los condrocitos producen niveles bajos de IL-6 en condiciones normales. Sin embargo, un gran número de citocinas y factores de crecimiento, tales como IL-1 β y el factor de crecimiento transformante (TGF)- β , estimulan directamente su producción (Bender y cols., 1990; Guerne y cols., 1990). En condrocitos humanos, la PGE₂ también induce la expresión de IL-6 a través de la activación del factor de transcripción NF- κ B (Wang y cols., 2010). En el líquido sinovial de pacientes con OA, los niveles de IL-6 están aumentados (Kaneko y cols., 2000). Además, IL-6 tiene un papel importante en la regulación del metabolismo del hueso subcondral, ya que dispara la diferenciación osteoclástica y la resorción de hueso (Steeve y cols., 2004). Este efecto es atribuible a una interacción indirecta entre osteoblastos y osteoclastos, ya que la producción local de IL-6 por los osteoblastos estimula la producción del RANKL, de NF- κ B, IL-1 β y PGE₂, y todo ello activa los osteoclastos. Otros estudios han mostrado que PGE₂ puede estimular a su vez la producción de IL-6 en osteoblastos (Liu y cols., 2005; Massicotte y cols., 2002).

Las citocinas antiinflamatorias IL-4, IL-10 e IL-13, que se producen en grandes cantidades en la membrana sinovial y en el cartílago OA, son capaces de disminuir la producción de IL-1 β , TNF- α y MMPs, de inhibir la liberación de PGE₂ y de aumentar la producción del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) y del inhibidor tisular de las metaloproteinasas (TIMP)-1 (Wojdasiewicz y cols., 2014). La citocina IL-10 en concreto, es capaz de estimular la expresión de colágeno de tipo II y de proteoglicanos, además de prevenir la apoptosis de los condrocitos (Schulze-Tanzil y cols., 2009).

1.1.2. Quimiocinas

Las quimiocinas representan una familia de pequeñas citocinas (6-14 KDa) que fueron inicialmente conocidas por inducir adhesión y migración direccional de tipos celulares específicos a los focos inflamatorios (Yoshie y cols., 2001). Se clasifican en 4 grupos en función de la posición de los residuos de cisteína del extremo N-terminal: C, C-C, C-X-C y C-X₃-C (Baggiolini y cols., 1997; Rollins, 1997). De entre ellos, los más importantes son los grupos C-C y C-X-C. Está bien establecido que estas últimas ejercen su papel, tanto fisiológico como patológico,

por su unión a los receptores CCR y CXCR acoplados a proteínas G (Lukacs y cols., 1999). Actualmente, se sabe que poseen, además, efectos proinflamatorios y proangiogénicos, capaces de influir negativamente en la homeostasis del cartílago articular (Borzì y cols., 2004).

Quimiocinas C-C		
Nombre	Otros nombres	Receptor
CCL2	MCP (<i>Monocyte Chemotactic Protein</i>)-1	CCR2
CCL3	MIP(<i>Macrophage Inflammatory Proteins</i>)-1 α	CCR1
CCL4	MIP-1 β	CCR1, CCR5
CCL5	RANTES (<i>Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted</i>)	CCR5
CCL8	MCP-2	CCR1, CCR5
CCL19	ELC (<i>EB1 Ligand Chemokine</i>)	CCR7
CCL20	LARC (<i>Liver Activation Regulated Chemokine</i>)	CCR6
Quimiocinas C-X-C		
CXCL1	Gro (<i>Growth-Regulated Protein</i>)- α , NAP (<i>Neutrophil-Activating Protein</i>)-3	CXCR2
CXCL2	Gro- β , MIP-2 α	CXCR2
CXCL3	MIP-2 β	CXCR2
CXCL5	ENA (<i>Epithelial Neutrophil-Activating protein</i>)-78	CXCR2
CXCL8	IL-8, NAP-1	CXCR1,

Tabla 2. Resumen de las principales quimiocinas de los grupos C-C y C-X-C.

En el contexto de la OA, se ha sugerido que las quimiocinas pueden tener un posible papel en el metabolismo del cartílago y del hueso (Vergunst y cols., 2005). A este respecto, se ha observado que las quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL1, CXCL8 están presentes en niveles altos en cultivos de condrocitos osteoartríticos (Borzì y cols., 1999; Pulsatelli y cols., 1999; Yuan y cols., 2001).

La relación de las quimiocinas con la destrucción del cartílago articular se ha estudiado empleando cultivos de condrocitos humanos. Así, se ha visto que la estimulación *in vitro* de condrocitos sanos y osteoartríticos con la citocina

proinflamatoria IL-1 β conduce a un aumento en la expresión de CCL5, lo que provoca a su vez un aumento en la producción de MMPs y la pérdida de proteoglicanos (Alaaeddine y cols., 2001). También se ha señalado que CCL2 es un mediador clave en el proceso inflamatorio que produce la liberación de MMP-3 y MMP-13 (Melgarejo y cols., 2009). Recientemente, se ha observado que esta quimiocina promueve la apoptosis e inhibe la proliferación en cultivos de condrocitos sanos y osteoartríticos (Xu y cols., 2015).

Bajo condiciones inflamatorias, los condrocitos osteoartríticos producen abundantes niveles de CCL20 en los que se ha observado que esta quimiocina produce un aumento en la producción de IL-1 β , lo que puede ayuda a mantener un entorno inflamatorio que puede conducir a la destrucción articular. Además, en condrocitos osteoartríticos estimulados con CCL20 aumenta la expresión de la desintegrina y metaloproteínasa con dominios de trombospondina-5 (ADAMTS-5), lo que produce una reducción de los niveles de agregano en el tejido cartilaginoso (Alaaeddine y cols., 2015).

Además, un estudio de la unión de las quimiocinas a sus receptores CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CXCR1 y CXCR2 en condrocitos, señala que inducen la liberación de MMP-3 y N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) (Borzì y cols., 2004).

1.1.3. Prostaglandina E₂

La PGE₂ es el mediador con mayor implicación en la generación de inflamación y dolor en la OA, y contribuye además a la degradación de los tejidos articulares mediante la producción de MMPs, provocando la apoptosis de los condrocitos y aumentando la resorción ósea (Martel-Pelletier y cols., 2003). La PGE₂ actúa en el hueso favoreciendo la resorción ósea mediante un aumento en la expresión de RANKL en los osteoblastos, que favorece la diferenciación de los osteoclastos (Li y cols., 2002). Además, la PGE₂ puede disminuir la expresión de osteoprotegerina, molécula inhibidora de RANKL en los osteoblastos, favoreciendo a su vez la osteoclastogénesis (Suda y cols., 2004). La PGE₂ tiene la capacidad de estimular la producción de mediadores inflamatorios como IL-1 β , amplificando así el proceso inflamatorio, y potencia además los efectos proinflamatorios de IL-1 β sobre la producción de NO e IL-6 (Li y cols., 2009).

La COX es la primera enzima que interviene la reacción de conversión del ácido araquidónico en prostaglandinas. Se han identificado dos isoformas de esta enzima en humanos: COX-1 y COX-2. La COX-1 se expresa de forma constitutiva en todos los tejidos, sin embargo COX-2 no se expresa en la mayoría de los tejidos en condiciones basales, pero es rápidamente inducida por citocinas proinflamatorias, oncogenes y factores de crecimiento. La sobreexpresión de COX-2 es un factor importante implicado en la patogenia de la OA (Lee y cols., 2013).

La prostaglandina E sintasa (PGES) es también una enzima implicada en la síntesis de prostaglandinas. Existen 3 isoformas caracterizadas, la PGES citosólica (cPGES), la mPGES-1 y la mPGES-2. La mPGES-1 es la isoforma más estudiada por ser inducida por estímulos proinflamatorios y por colaborar con la COX-2 en la producción de PGE₂. Hay que destacar que la mPGES-1 está implicada en la patogénesis de la OA y actúa como enzima inducible en la producción de PGE₂ en patologías artríticas (Trebino y cols., 2003).

1.1.4. Estrés oxidativo y radicales libres

El estrés oxidativo es el resultado de un desequilibrio entre la generación de ROS y la actividad de los sistemas celulares antioxidantes, como son la enzima superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión-peroxidasa y la glutatión-reductasa. El envejecimiento se relaciona con la acumulación de ROS debido a que en edades avanzadas hay una sobreproducción de ROS y una disminución de la capacidad de los sistemas encargados de reducir su exceso (De la Fuente y Miquel, 2009).

En condrocitos, las principales ROS presentes son el peroxinitrito (ONOO⁻) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), que resultan de la acción de la NOS y de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH)-oxidasa mitocondrial, respectivamente (Henrotin y cols., 2005). La enzima responsable de la producción por los condrocitos de niveles altos y sostenidos de NO en respuesta a factores patológicos, es la iNOS, que se expresa tras la activación celular por las citocinas o factores inflamatorios. En condrocitos osteoartríticos, diferentes estímulos inducen la activación de receptores de citocinas, lo que conduce a una sobreproducción de ROS y contribuye a la degradación del cartílago. Por otra parte, los condrocitos del cartílago muestran tasas metabólicas bajas, lo que les

hace altamente sensibles al estrés oxidativo (Yang y cols., 2005). Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que las modificaciones oxidativas de componentes intracelulares y extracelulares, incluyendo factores de transcripción, fosfolípidos de membrana y ácidos nucleicos, contribuyen a la destrucción del cartílago junto con la inhibición de la síntesis de glicosaminoglicanos y colágeno y la activación de MMPs y agreganasas (Alcaraz y cols., 2010). Los productos resultantes de la degradación del cartílago pueden, a su vez, inducir la producción de ROS mediante la activación de la expresión de la NADPH oxidasa mitocondrial y la iNOS, lo que agrava la degradación articular y resulta en la progresión de la OA (Mazzetti y cols., 2001). El estrés oxidativo participa en la respuesta inflamatoria activando el NF- κ B (Marcu y cols., 2010) y provoca la senescencia celular en condrocitos (Yudoh y cols., 2005). El estrés oxidativo también puede modificar la actividad de AP-1, un factor de transcripción que modula la expresión de las MMPs (Nelson y cols., 2006). Las MAPKs, como las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) y p38, son activadas por ROS en diferentes tipos celulares de la articulación. En condrocitos, la activación de estas cinasas conduce a su diferenciación hipertrófica (Morita y cols., 2007).

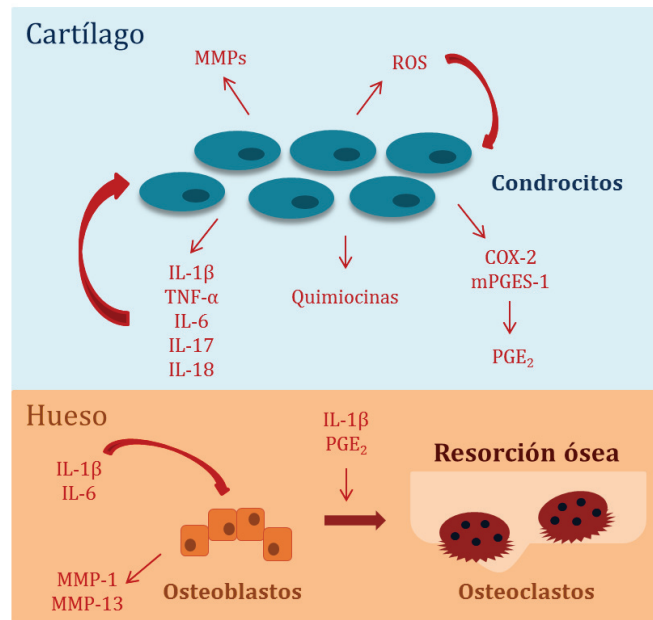


Figura 3. Procesos metabólicos e inflamatorios en la articulación osteoartrítica.

1.2. Vías de señalización implicadas en la patogénesis de la OA

En las células articulares se produce la activación de diferentes vías de señalización que regulan los procesos inflamatorios y degenerativos que se desarrollan en la OA.

1.2.1. Vía de las MAPKs

Las MAPKs son enzimas que regulan vías de señalización intracelulares y controlan procesos que incluyen proliferación, diferenciación, producción de citocinas y apoptosis, en respuesta a una gran variedad de estímulos. La activación de las MAPKs se induce por factores de crecimiento, citocinas, radiación ultravioleta y otros factores de estrés que producen daño en el ADN. Se conocen tres grandes familias de MAPKs, que incluyen las cinasas p38, las ERK y las cinasas N-terminales de C-Jun (JNK) (Malemud, 2004).

La cinasa p38 tiene varias formas homólogas: p38 α , p38 β , p38 β 2 y p38 γ . La vía de la p38 juega un papel esencial en la regulación de ciertos procesos como la inflamación, la diferenciación celular, el crecimiento celular y la apoptosis (Ono y Han, 2000). Además, esta vía está implicada en el desarrollo de la senescencia celular (Tivey y cols., 2013). La isoforma más estudiada es p38 α por su implicación en la inflamación, con su papel modulador de la expresión génica de COX-2 e iNOS; así como en el control de la producción de NO inducida por citocinas. Esta vía tiene un papel esencial en la OA por su regulación de las actividades metabólicas de los condrocitos articulares humanos (Fan y cols., 2006). La p38 está relacionada con la degeneración del cartílago y la aparición de dolor en la OA (Brown y cols., 2008). De hecho, la inducción de MMP-13 por IL-1 β requiere las vías de p38 y de NF- κ B (Mengshol y cols., 2000).

Las cinasas ERK tienen dos isoformas ERK1 y ERK2, p44 y p42 respectivamente. En la OA, la activación de las vías de señalización de ERK1 y ERK2 disminuye la proliferación de los condrocitos, con una disminución de la expresión de agregano y colágeno II (Fan y cols., 2006). Estas cinasas pueden estar implicadas en la generación de condrocitos hipertróficos y en el aumento de producción de MMP-13 por estas células (Prasadam y cols., 2013). Además, se ha

descrito que ambos subtipos pueden inducir la mPGES-1 en condrocitos humanos (Masuko-Hongo y cols., 2004).

La cinasa JNK, también conocida como proteína-cinasa activada por estrés (SAPK), presenta tres formas JNK1, JNK2 y JNK3. JNK1 y JNK2 se expresa en muchos tejidos, mientras que JNK3 se encuentra mayoritariamente en el cerebro. La importancia fisiológica de JNK reside en su capacidad de unirse y fosforilar a la proteína de unión al ADN c-Jun, componente del complejo AP-1, aumentando la actividad transcripcional del mismo (Plotnikov y cols., 2011).

1.2.2. Factor nuclear- κ B

El NF- κ B es un factor de transcripción implicado en la regulación de genes que codifican para mediadores de la respuesta inflamatoria. Este factor está compuesto por complejos homo- y heterodiméricos de miembros de la familia Rel (NF- κ B). Se han descrito cinco subunidades de la familia NF- κ B en mamíferos: p50, p52, p65 (RelA), c-Rel, y RelB. Estas proteínas poseen el dominio de homología Rel, que media la unión al ADN, la dimerización de la proteína y la localización nuclear. Este dominio es también una diana para las proteínas inhibidoras de NF- κ B (I κ B), que incluyen I κ B α , I κ B β , I κ B γ , Bcl-3, p105 y p100. Diferentes combinaciones de dímeros de las subunidades de NF- κ B tienen distinta especificidad de unión al ADN y podrían funcionar activando diferentes grupos de genes. Los heterodímeros p50/p65 y los homodímeros p50 son los más comunes. En la mayoría de células, el NF- κ B existe como una forma inactiva en el citoplasma, unido a las proteínas inhibidoras I κ B. El tratamiento de las células con diferentes inductores resulta en la fosforilación de I κ B por parte de la cinasa de I κ B (IKK), para su posterior ubiquitinación y degradación. Esto tiene como consecuencia la liberación de los dímeros de NF- κ B, que se desplazan al núcleo, donde activan a los genes diana correspondientes (Lawrence, 2009).

El NF- κ B puede ser activado por diferentes estímulos, como citocinas proinflamatorias (IL-1 β o TNF- α), LPS, ROS, RANKL, etc., lo que contribuye a la amplificación y persistencia de la respuesta inflamatoria. El NF- κ B puede estimular la expresión de enzimas como la iNOS, provocando la generación de NO y de la COX-2, que da lugar a prostanoídes (Yamamoto y Gaynor, 2001). Estos

metabolitos contribuyen al desarrollo del proceso inflamatorio, lo que relaciona a este factor con la patogénesis de la OA. Por otra parte, la activación de NF- κ B provoca la activación de MMPs, lo que implica la participación de este factor de transcripción en la degradación de proteínas de la matriz extracelular (Kracht y Saklatvala, 2002).

1.2.3. AP-1

El complejo AP-1 es un regulador transcripcional compuesto por homodímeros formados por miembros de la familias Jun o heterodímeros, miembros de la familia Jun (c-Jun, JunB y JunD) y Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra-2) (Zenz y Wagner, 2006). El factor AP-1 convierte las señales extracelulares procedentes de vías de señalización como la de las MAPKs o el TGF- β en cambios de la expresión de los genes diana correspondientes. La activación de AP-1 se induce por factores de crecimiento, citocinas, neurotransmisores, hormonas, etc. AP-1, tras su activación puede inducir la transcripción de varios genes implicados en múltiples funciones celulares, como la proliferación, la supervivencia, la diferenciación y la transformación (Shaulian y Karin, 2002).

Las proteínas Fos/Jun controlan la proliferación y la apoptosis por su capacidad de inducir la transcripción de ciclina D1 o de inhibir p53 y p16 (Zenz y cols., 2008). Este factor de transcripción es también un importante regulador de la proliferación de osteoblastos y de la formación ósea (Marie, 2008). Experimentos *in vivo* han demostrado que la sobreexpresión de Fra-1 promueve la diferenciación de los osteoblastos y, en consecuencia, el incremento de la masa ósea (Jochum y cols., 2000), mientras que la inhibición de Fra-1 o JunB tiene como consecuencia la reducción de la formación de masa ósea (Kenner y cols., 2004).

2. Senescencia celular

La senescencia celular representa una respuesta frente a diferentes tipos de estrés en la que las células abandonan el ciclo celular y pierden la capacidad de proliferar en respuesta a factores de crecimiento y mitógenos. A pesar de ello, en este estado, las células permanecen viables y metabólicamente activas por un largo periodo de tiempo (Ben-Porath y Weinberg, 2004).

En función de su origen se definen dos tipos de senescencia celular, la senescencia replicativa y la senescencia prematura inducida por estrés (SIPS). La aparición de la senescencia replicativa se relaciona con el acortamiento de los telómeros, consecuencia inevitable de la replicación génica y, por lo tanto, depende del número de divisiones celulares. Este tipo de senescencia ocurre de forma espontánea en las células somáticas. Sin embargo, la SIPS puede ser acelerada por factores de estrés como la activación de oncogenes, el daño al ADN, la presencia de moléculas citotóxicas y el estrés oxidativo. En este caso, es independiente del estado de los telómeros pero comparte muchas características moleculares y funcionales con la senescencia replicativa (Fridlyanskaya y cols. , 2015).

En general, las células senescentes se caracterizan por adquirir una morfología alargada y aplanada, por la disminución de su capacidad replicativa y por expresar una serie de marcadores reconocidos. Entre estos marcadores destacan la actividad de la β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal), la acumulación de estructuras de heterocromatina (focos de heterocromatina asociados a senescencia) y el aumento en la expresión de las proteínas p53, p21 y p16 (Carnero, 2013; Matjusaitis y cols., 2016; Rodier y Campisi, 2011).

El proceso de la senescencia celular está íntimamente relacionado con el envejecimiento. En los organismos jóvenes la presencia de células que expresan uno o más de los marcadores asociados a senescencia es muy baja, mientras que su número aumenta con la edad del organismo. La constante regeneración de los tejidos somáticos conduce a la acumulación de células senescentes, que limitan la renovación de estos tejidos. Además, se produce una alteración de la homeostasis tisular que se explica por la liberación de componentes inflamatorios por parte de dichas células, lo que se conoce como fenotipo secretor asociado a senescencia, y que las vincula al desarrollo de patologías relacionadas con la edad (López-Otín y

cols., 2013; Muñoz-Espín y Serrano, 2014; Salama y cols., 2014). La senescencia de los condrocitos está relacionada con el aumento de la prevalencia de la OA en edades avanzadas, contribuyendo a la disminución en la eficacia de la reparación del cartílago (Loeser, 2009). En la OA avanzada, el fallo en las respuestas de reparación debidas a la senescencia celular favorece la degeneración progresiva del cartílago (Ashraf y cols, 2016; Martin y Buckwalter, 2003). Además, la acumulación de células senescentes altera de forma severa la homeostasis del tejido óseo e interfiere con la osteogénesis y la regeneración del hueso (Loeser, 2013).

2.1. Control de la senescencia

Las señales que inducen senescencia celular activan, generalmente, la vía supresora de tumores de p53 o bien la vía de p16-pRb, aunque sólo algunas de estas señales activan ambas vías (Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007; van Deursen, 2014) (figura 4).

En las células senescentes se producen cambios en la expresión génica de conocidos inhibidores y activadores del ciclo celular. Es común que las células en este estado presenten un aumento de p21 y p16, dos inhibidores de ciclo celular. Ambos actúan como inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), impidiendo la fosforilación de la proteína de retinoblastoma (pRb) por parte de las estas enzimas. La pRb detiene la proliferación celular suprimiendo la actividad de E2F, un factor de transcripción que estimula la expresión de genes que se requieren para la progresión del ciclo celular. Por otra parte, E2F puede detener la proliferación celular induciendo la expresión de la proteína ARF (*Alternate-Reading Frame*), acoplando de esta manera la vía p16-pRb con la de p53 (Childs y cols., 2015).

La proteína ARF inhibe HDM2 (*Human Doble Minute 2*), lo que promueve una mayor actividad de p53. Una vez activa, la proteína p53 induce la expresión de p21 que, como inhibidor de CDKs, impide la fosforilación de pRb y, por lo tanto, lo inactiva (Rufini y cols., 2013).

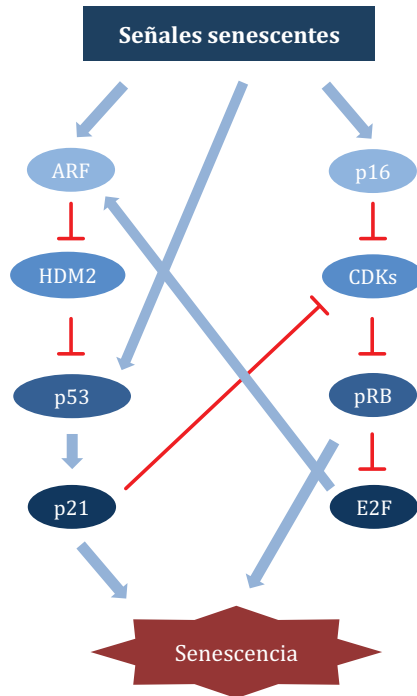


Figura 4. Senescencia celular controlada por las vías de p53 y p16-pRb. Adaptado de Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007.

Las células senescentes también reprimen genes que codifican proteínas que estimulan o facilitan la progresión del ciclo celular, por ejemplo, c-Fos, ciclina A, ciclina B y PCNA (antígeno proliferante celular nuclear). En algunas células senescentes, los genes diana de E2F están silenciados como consecuencia de la reorganización de la cromatina en focos de heterocromatina (Narita y cols., 2003).

2.1.1. Vía de p53

El gen TP53 se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13) y codifica un factor de transcripción nuclear, la proteína p53, que se expresa de manera ubicua en todos los tejidos. Las funciones de p53 como factor de transcripción están implicadas en el control del ciclo celular, reparación del ADN, apoptosis y respuestas al estrés celular. Por otra parte, la activación de p53

también participa en el desarrollo de la senescencia celular y en el envejecimiento del organismo (Nicolai y cols., 2015).

En células normales, el nivel de p53 es bajo porque se encuentra asociado a la proteína HDM2, que induce su ubiquitinación y destrucción por el proteasoma. HDM2 actúa directamente sobre p53 en el núcleo (por unión y enmascaramiento del dominio de activación transcripcional de p53) e indirectamente en el citoplasma (marcando p53 para su ubiquitinación y degradación). Por esta razón, en células sanas, p53 tiene una vida media corta. El daño en el ADN y otras señales de estrés pueden provocar la fosforilación de p53, lo que impide su unión a HDM2 y, por lo tanto, incrementa su concentración en las células y permite que realice su función como factor de transcripción (Rufini y cols., 2013).

Además de la ubiquitinación y la fosforilación, la actividad de p53 también se modula por acetilación. La acetilación por histonas acetiltransferasas (HATs) y la desacetilación por histonas desacetilasas (HDACs), como son las sirtuínas, se descubrió, inicialmente, por su función en la regulación del grado de acetilación de histonas, pero también juegan un papel crítico en la transcripción génica. p53 fue identificado como el primer sustrato no histona de HATs y HDACs. En respuesta al daño en el ADN se acetila p53, lo que lleva a mejorar la estabilidad de la unión de p53 al ADN y dependiendo de la lisina terminal que se acetile, p53 activa genes diana implicados en la detención del ciclo celular o en la apoptosis (Dai y Gu, 2010).

2.1.2. Vía de p16-pRb

La vía de p16-pRb se puede iniciar por un estímulo que produce daño en el ADN, pero normalmente esto ocurre de manera secundaria al inicio de la vía p53 (Jacobs y de Lange, 2004). El hecho de que la senescencia se induzca con o sin la participación de la vía de p53 depende de diferentes factores, entre ellos, el tipo celular parece tener relevancia en el tipo de vía empleada. Por ejemplo, se ha observado que las células epiteliales son más propensas que los fibroblastos a inducir la vía de p16. Algunos tipos celulares no presentan senescencia dependiente de p16 y presentan silenciado el gen que codifica este factor, a menudo por metilación (Brenner y cols., 1998; Huschtscha y cols., 1998). Por otra

parte, se ha observado que también hay diferencias entre especies, por ejemplo, la ruptura experimental de telómeros activa sobre todo la vía p53 en cultivos *in vitro* de células de ratón, pero en células humanas activa tanto p53 como p16-pRb (Smogorzewska y de Lange, 2002).

2.2. Sirtuínas

Las sirtuínas son proteínas que intervienen en el metabolismo celular mediante la regulación de la expresión de determinados genes, y actúan como coordinadoras de la respuesta a diferentes tipos de estrés metabólico o energético. Se encuentran en todas las células eucariotas y juegan un papel clave en la supervivencia celular y el envejecimiento, lo que las convierte en posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con la edad (Longo y Kennedy, 2006).

Originalmente fueron descritas en levaduras como una nueva clase de HDACs de tipo III. Las HDACs, forman parte de la maquinaria que regula las funciones asociadas a la cromatina a través de la eliminación de grupos acetilo de residuos clave de lisina, principalmente en la región N-terminal de las histonas H3 y H4. La desacetilación de histonas promueve una descompactación de estas regiones promotoras de los genes y por lo tanto, su expresión (Vaquero y cols., 2007). El gen Sir2 (*Silent Information Regulator 2*) se relacionó con un aumento en la esperanza de vida en levaduras, evitando la inestabilidad genómica, lo que llevó a relacionar este gen con un posible papel en la longevidad y el envejecimiento (Kaeberlein y cols., 1999).

En mamíferos, se han caracterizado siete isoformas de sirtuínas, de Sirt1 a Sirt7. La localización celular difiere dependiendo de la isoforma: para Sirt1, -6 y -7 es fundamentalmente nuclear, Sirt2 tiene una localización citoplásmica y Sirt3, -4 y -5 se encuentran en la mitocondria (Saunders y Verdin, 2007). El estado de estrés y el tipo celular pueden regular la localización celular de la sirtuína. En condrocitos osteoartríticos Sirt1 se exporta del núcleo al citoplasma tras el estímulo con TNF- α (Dvir-Ginzberg y cols., 2011).

La activación de las sirtuínas se produce en la mayoría de condiciones de estrés que implican un desequilibrio energético (estrés oxidativo, hipoxia, restricción calórica) o un daño en el genoma (estrés genotóxico) (Kwon y Ott, 2008). Se caracterizan por tener un centro catalítico altamente conservado y porque, a diferencia del resto de HDACs, requieren la presencia de una coenzima en su reacción específica, nicotinamida adenina dinucleótido (NAD)⁺ (Frye, 2000). La reacción de desacetilación de las histonas empieza con la escisión de la molécula NAD⁺, lo que provoca la formación de nicotinamida (NAM), 2'-O-Acetil-ADP Ribosa y el sustrato desacetilado (figura 5) (Gabay y Sanchez, 2012b).

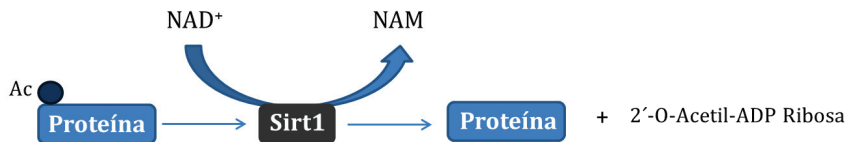


Figura 5. Desacetilación de proteínas por Sirt1. Ac: grupo acetilo. NAD⁺: nicotín adenín dinucleótido. NAM: nicotinamida.

La actividad de Sirt1 está dirigida principalmente a las histonas, y más específicamente a sus residuos de lisina acetilados, pero tiene otras dianas no-histonas (Yamamoto y cols., 2007), como enzimas (SUuv39h1, Ezh2, p300) o factores de transcripción (p53, NF-κB, FOXO, PGC-1α, Myc) (Vaquero y Reinberg, 2009).

Existe una amplia evidencia derivada de experimentos de manipulación genética en cultivos celulares que apoyan que la inhibición de Sirt1 lleva a la estabilización y activación del p53 (Tang y cols., 2008). Sirt1 desestabiliza p53 catalizando su desacetilación (figura 6) (Langley y cols., 2002; Luo y cols., 2001; Vaziri y cols., 2001). Esta desacetilación puede debilitar la unión de p53 al ADN, facilitar la ubiquitinación y la degradación en el proteasoma del p53 (Luo y cols., 2004). De esta manera, las células derivadas de ratones deficientes en Sirt1 así como células tratadas con ARNsi frente a Sirt1 muestran niveles elevados de p53 hiperacetilado (Cheng y cols., 2003).

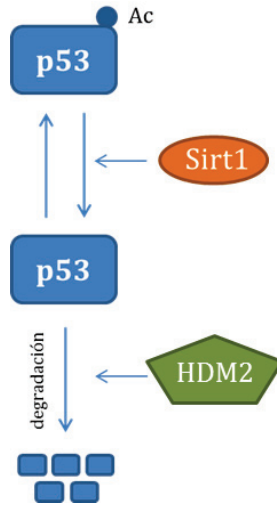


Figura 6. Desacetilación de p53 por Sirt1 y degradación por HDM2.

En el cartílago osteoartrítico se ha observado que la presencia de Sirt-1 es esencial para la supervivencia de los condrocitos (Gagarina y cols., 2010). Sirt-1 regula la apoptosis de condrocitos humanos y la expresión de genes específicos del cartílago tales como los del agregano, colágeno tipo II y tipo IX y otras proteínas de la matriz, vía la desacetilación de Sox9 e inhibe la expresión de ADAMTS-5 (Fujita y cols., 2011; Takayama y cols., 2009). Gabay y colaboradores refieren un aumento de apoptosis en los condrocitos del cartílago en ratones heterocigotos en Sirt-1, mientras que en ratones nulos para Sirt-1 se produce degradación del cartílago consecuencia de un aumento de apoptosis de condrocitos y una disminución de las proteínas de matriz (Gabay y cols., 2012a).

2.3. Caveolina-1

Las caveolas son invaginaciones de la membrana plasmática de unos 50 a 100 nm enriquecidas en colesterol y glucoesfingolípidos implicadas en la transducción de señales y en procesos de transporte vesicular. La caveolina es una proteína estructural de 21-24 kDa, principal componente de las caveolas. Se han descrito tres subtipos de caveolinas, de los cuales la caveolina-1 es la más

abundante y se encuentra en la mayoría de los tipos celulares; la caveolina-2 que tiene la misma distribución que la caveolina-1, y la caveolina-3 que se expresa predominantemente en células del músculo estriado (Tang Z y cols, 1996; Schwab y cols., 2000).

En células de cultivos primarios, la caveolina-1 induce la senescencia celular en respuesta a diversas condiciones de estrés como la radiación ultravioleta y el estrés oxidativo, y este fenotipo senescente se puede revertir reduciendo la expresión de caveolina-1 (Cho y cols., 2003). Muchos trabajos tanto con cultivos celulares como con modelos animales han mostrado que la caveolina-1 juega un papel importante en la SIPS. Niveles sub-citotóxicos de peróxido de hidrógeno aumentan la expresión de caveolina-1 endógena, induciendo SIPS. Estudios de enfisema pulmonar debido al humo del cigarrillo, aterosclerosis, OA, infecciones microbianas, degeneración de disco intervertebral humano, cicatrización de heridas y fibrosis han apoyado el papel crítico de la cavolina-1 en SIPS y patologías relacionadas con la edad (Zou y cols., 2011).

La senescencia de condrocitos osteoartríticos contribuye a aumentar la incidencia de la OA y, junto con la edad avanzada, las citocinas y el estrés oxidativo participan en la patogénesis de esta enfermedad (Martin y Buckwalter, 2001). Tanto la IL-1 β como el peróxido de hidrógeno aumentan el ARNm y la expresión proteica de caveolina-1 e inducen senescencia prematura en condrocitos articulares, mientras que la disminución de la expresión de caveolina-1 con oligonucleótidos antisentido previene el proceso de senescencia en condrocitos inducido por IL-1 β y peróxido de hidrógeno. Estos resultados sugieren que la caveolina-1 juega un papel en la patogenia de la OA a través de su influencia sobre la senescencia de los condrocitos (Dai y cols., 2006).

3. Células madre mesenquimales

Las células madre constituyen una población celular con una gran capacidad de autorenovación, que les permite dividirse de forma continua y casi ilimitada, y un alto grado de potencialidad, para diferenciarse en distintos tipos celulares. Estas características les confieren importantes posibilidades terapéuticas para su empleo en medicina regenerativa y terapia celular en el tratamiento de diversas patologías como enfermedades cardíacas, enfermedad de Crohn, Alzheimer, enfermedad de injerto contra huésped, etc.

Las células madre candidatas para su utilización en medicina regenerativa incluyen las ESCs (células madre embrionarias), las iPSCs (células madre pluripotentes inducidas) y las células madre adultas. Las ESCs tienen una gran capacidad de auto-renovación y expansión, son células pluripotentes y tienen la capacidad de diferenciarse en tejidos derivados de cualquiera de las tres capas embrionarias (Rossant, 2001). Las iPSCs son células transformadas que derivan de células diferenciadas y tienen características similares a las ESCs (Takahashi, 2007). A pesar del gran potencial terapéutico de las ESCs y de las iPSCs por la capacidad de auto-renovación y la pluripotencialidad, existen limitaciones en su uso. Las ESCs están sujetas a consideraciones legales y, al igual que ocurre con el trasplante de órganos, estas células también se enfrentan al problema de rechazo inmunológico, ya que no se trata de células autólogas. Además, tanto las ESCs como las iPSCs pueden dar lugar a teratomas cuando se trasplantan en un individuo adulto y estas últimas presentan dificultades en su manipulación genética (Ben-David y Benvenisty, 2011).

Sin embargo, el interés por las células madre procedentes de tejidos humanos adultos es cada vez mayor, ya que constituyen una posible fuente de células autólogas para su empleo en medicina regenerativa. Este tipo de células madre tienen la ventaja de que se pueden obtener del propio paciente y después de su expansión y cultivo volver a trasplantarlas sin riesgo de rechazo inmunitario (Körbling y Estrov, 2003).

Las células madre mesenquimales (MSCs) son células madre adultas que proliferan *in vitro* con capacidad de adherencia al plástico, de morfología fibroblástica y que pueden ser diferenciadas a células de linaje mesodérmico, como

son los adipocitos, los osteoblastos y los condrocitos. Estudios recientes señalan que las MSCs, bajo determinadas condiciones, pueden además diferenciarse a células del linaje endodérmico y ectodérmico mediante un proceso que se conoce como transdiferenciación (Uccelli y cols., 2008). Aunque las MSCs se aislaron originalmente de médula ósea (Friedenstein y cols., 1966), posteriormente se ha conocido que están presentes en múltiples tejidos, como el tejido adiposo (Zuk y cols., 2001), sangre periférica (Zvaifler y cols., 2000), piel (Belicchi y cols., 2004), músculo esquelético (Cerletti y cols., 2008) y cordón umbilical (Baksh y cols., 2007).

La carencia de un marcador único y específico para las MSCs complica el estudio de estas células, por lo que la Sociedad Internacional de Terapia Celular definió una serie de criterios que las caracterizan (Dominici y cols., 2006): las células se adhieren al plástico bajo condiciones estándar de cultivo, expresan los marcadores de superficie CD105, CD73 y CD90, pero no expresan los marcadores de superficie CD34, CD45, CD11a, CD19 y HLA-DR.

Se han descrito tres funciones principales de las MSCs que se han asociado con sus efectos terapéuticos como son el reemplazo de tejido por diferenciación multipotencial, los efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios, y la actividad paracrina con la secreción de moléculas que participan en la reparación de tejidos. Los primeros estudios se basaron en el potencial de estas células para diferenciarse en múltiples tipos de tejidos. Sin embargo, todo apunta a que la diferenciación multipotencial contribuye mínimamente a los efectos beneficiosos atribuidos a las MSCs mientras que la supresión inmunitaria e inflamatoria y la actividad paracrina jugarían un papel más significativo (Lavoie y Rosu Myles, 2013).

3.1. Células madre de tejido adiposo

De las MSCs, las células madre de tejido adiposo (ASCs) tienen especial importancia en medicina regenerativa. Comparado con células de otros orígenes, como la médula ósea, el tejido adiposo es más accesible y está disponible en mayores cantidades en el organismo, siendo el rendimiento en células madre

mucho mayor que en otros tejidos. Por cada gramo de grasa se pueden obtener unas 5000 células, mientras que por cada mililitro de médula ósea se obtienen de 100 a 1000 células (Strem y cols., 2005). Otra ventaja de las ASCs es que su capacidad de proliferación se considera mayor que la de las MSCs provenientes de la médula ósea, y esto permite que se pueda obtener un número de células apropiado para el trasplante sin necesidad de mantenerlas en cultivo durante largos periodos de tiempo (Zuk y cols., 2002).

A pesar de la existencia de marcadores comunes, se han observado diferencias en la expresión de proteínas de superficie entre las ASCs y el resto de MSCs. La glicoproteína CD34 está presente en ASCs humanas en pases iniciales, si bien se pierde rápidamente *in vitro* tras los primeros subcultivos (Maumus y cols., 2011). Por el contrario, CD34 no se ha encontrado en otros tipos de MSCs, ni siquiera en pases iniciales (McIntosh y cols., 2006).

3.2. Aplicación clínica de las MSCs

Diversos estudios han demostrado el potencial terapéutico de las MSCs en diferentes patologías. El tratamiento con MSCs provenientes de médula ósea, ha mostrado un efecto beneficioso en la regeneración cutánea y cicatrización de las heridas a través de la diferenciación celular y de los efectos paracrinos de los factores secretados por estas células (Wu y cols., 2007). Se han obtenido resultados similares empleando ASCs, que además de contribuir a la cicatrización del tejido se han relacionado con la formación de nuevos vasos sanguíneos en el tejido dañado (Nie y cols., 2011). También se están estudiando los efectos de la MSCs en enfermedades cardiovasculares, por la capacidad que tienen estas células para diferenciarse en cardiomiocitos (Toma y cols., 2002) y por la protección que ejercen los factores que segregan estas células, frente a la isquemia cardíaca (Kwak y Mach, 2005). Por otra parte, el potencial inmunomodulador de estas células las hace especialmente útiles en la prevención de la enfermedad de injerto contra huésped. Se ha mostrado la eficacia de las ASCs en el control de la enfermedad por sus propiedades inmunosupresoras (Yanez y cols., 2006). Estas células son eficaces también en el daño renal agudo, ya que contribuyen a reparar la estructura de los

túbulos renales y mejoran la función renal (Morigi y cols., 2004) y en el daño hepático por su contribución a la regeneración del hígado (Kuo y cols., 2008).

El valor terapéutico de las MSCs también se ha evaluado en enfermedades reumáticas como la OA, en concreto como posible terapia para los estadios más avanzados de esta enfermedad y, especialmente, en la regeneración del cartílago (Koelling y Miosge, 2009). La inyección local de MSCs de médula ósea o ASCs en la articulación podría tener diferentes efectos como la inhibición de la formación de osteofitos, la disminución de la inflamación sinovial, la reducción de la degeneración del cartílago, la estimulación de la proliferación de condrocitos y la síntesis de la matriz extracelular. De hecho, en un estudio con un modelo de OA inducida por colagenasa, una única inyección de ASCs en la rodilla de ratones inhibe la activación sinovial, la formación de osteofitos y la destrucción del cartílago (ter Huurne y cols., 2012). Otros modelos *in vivo* revelaron resultados similares, presentando una regeneración del cartílago tras la inyección de MSCs o ASCs en la articulación dañada (Al Faqeh y cols., 2012; Sato y cols., 2012; Toghraie y cols., 2012).

El interés clínico en las MSCs ha aumentado en estos últimos años, lo que se refleja en el gran número ensayos clínicos que están registrados en la base de datos pública www.clinicaltrials.org. En la actualidad están en marcha más de 200 ensayos clínicos en fase I que emplean MSCs, de los cuales en 64 se están empleando ASCs para el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fístulas relacionadas con la enfermedad de Crohn, infarto de miocardio, reconstrucción de pecho, disfunción eréctil, cirrosis hepática, esclerosis múltiple o diabetes tipo II. En ensayos clínicos que se han llevado a cabo para el tratamiento de OA de rodilla con MSCs, se han obtenido resultados positivos (Orozco y cols, 2014; Vega y cols, 2015). Se han completado dos ensayos clínicos empleando ASCs en artrosis de rodilla, para conocer la seguridad y eficacia de la inyección autóloga de ASCs de pacientes con OA, cuyos resultados no se encuentran todavía disponibles. Otros 13 estudios en los que se emplean ASCs en OA de rodilla continúan activos.

3.3. Medio acondicionado de las MSCs

Los efectos beneficiosos de las MSCs pueden deberse a la acción de factores solubles que secretan. Las células madre son capaces de secretar un amplio rango de mediadores tróficos que pueden ejercer efectos paracrinos en otros tipos celulares promoviendo angiogénesis, inmunomodulación y síntesis de matriz extracelular (Baraniak y McDevitt, 2010).

En co-cultivos de condrocitos humanos osteoartríticos y MSCs, los efectos paracrinos parecen ser responsables de las propiedades antiinflamatorias de las MSCs, si bien se desconocen el mecanismo de acción o los posibles mediadores implicados en estos procesos (Manferdini y cols., 2013). Asimismo, los factores secretados por las MSCs aumentan la producción de la matriz extracelular del cartílago por los condrocitos, independientemente de la fuente de obtención de las células (Wu y cols., 2012). Este efecto paracrino también se ha estudiado empleando co-cultivos de condrocitos y ASCs en los que se ha observado que las proteínas secretadas por las ASCs protegían a los condrocitos de la apoptosis y la degeneración hacia fenotipos hipertróficos y fibróticos (Maumus y cols., 2013).

El efecto paracrino de las MSCs también se ha estudiado empleando directamente el medio de cultivo que ha estado en contacto con estas células, denominado medio acondicionado (MA) de MSCs. De hecho, el MA de las células madre ha mostrado tener un gran potencial terapéutico en la regeneración miocárdica, neural y osteogénica, así como en la cicatrización de heridas (Baraniak y McDevitt, 2010). En estudios con condrocitos en cultivo a los que se añade este MA, se ha observado un aumento en la producción de matriz extracelular (Wu y cols., 2011). También se han realizado estudios empleando explantes de cartílago y membrana sinovial osteoartícticos humanos, en los que se han observado efectos antiinflamatorios tras su incubación con MA procedente de MSCs (Van Buul y cols., 2012).

En el medio acondicionado de las células, además de los factores solubles, se han aislado unas estructuras rodeadas de bicapa lipídica, denominadas vesículas extracelulares, que se consideran componentes básicos en la comunicación célula-célula (van der Pol y cols., 2012).

En la actualidad hay un gran interés en el estudio de estas vesículas, ya que parecen contribuir a la regeneración del tejido y probablemente son, en parte, responsables de la acción paracrina de las MSCs. Según su tamaño y origen, las vesículas extracelulares se dividen en tres grupos: exosomas, microvesículas (MVs) y cuerpos apoptóticos (figura 7). Los exosomas tienen un tamaño entre 50 y 100 nm y se liberan por exocitosis de cuerpos multivesiculares, las microvesículas miden entre 100 nm y 1µm de diámetro y se producen por extrusión de la membrana plasmática, mientras que los cuerpos apoptóticos, de un tamaño entre 1 y 5 µm, se producen por las células en la muerte celular programada (György y cols., 2011).

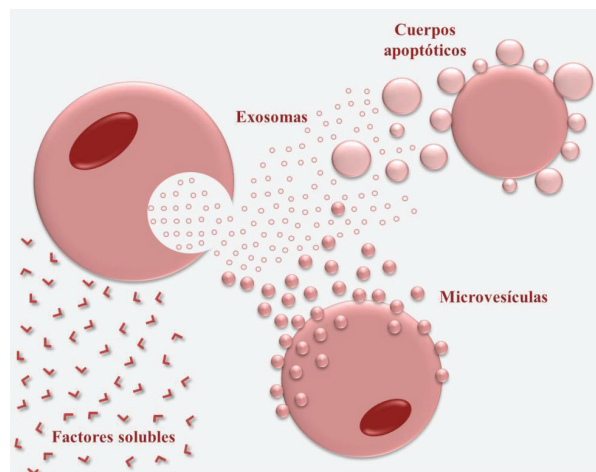


Figura 7. Esquema de la liberación de vesículas extracelulares y factores solubles por las células. Adaptado de György y cols., 2011.

Se ha descrito que las vesículas extracelulares de las MSCs favorecen la angiogénesis aumentando la proliferación celular endotelial y la formación de la red capilar tanto *in vitro* como *in vivo* (Zhang y cols., 2012a). Estas vesículas pueden paliar el daño agudo de riñón con la disminución de la apoptosis, la fibrosis, la infiltración linfocítica, la atrofia tubular y el aumento de la proliferación celular del epitelio tubular (Gatti y cols., 2011). Aunque las vesículas extracelulares derivadas de MSCs, todavía no han sido utilizadas en enfermedades reumáticas, se especula con la posibilidad de que puedan tener efectos beneficiosos en el tratamiento de la OA y la artritis reumatoide (Fierabracci y cols., 2015).

4. Proteína relacionada con la hormona paratiroidea

La PTH es un polipéptido de 84 aminoácidos secretado por las glándulas paratiroides que actúa como un importante regulador de calcio en el organismo a través de su acción en hueso y riñón. El papel atribuido tradicionalmente a esta hormona ha sido el de aumentar la reabsorción tubular de calcio a nivel renal y activar la resorción ósea. Sin embargo, las acciones de esta hormona a nivel óseo son complejas, y su efecto depende del patrón de administración empleado. Así, la administración continua de la hormona activa la resorción ósea debido a un aumento en el número y activación de los osteoclastos, mientras que una exposición intermitente conduce a un aumento de la formación de hueso debido a una mayor actividad y supervivencia osteoblástica (Jilka, 2007; Silva y cols., 2011). Las acciones de la PTH derivan de la unión a su receptor de tipo 1 (PTHr1) presente en las células especializadas del tejido óseo, osteoblastos y osteocitos (Gardella y Villardaga, 2015).

En la actualidad, la administración sistémica diaria de la hormona recombinante humana PTH y del péptido PTH (1-34) (teriparatida) constituye la única terapia de anabolismo óseo disponible para su uso clínico en el tratamiento de la osteoporosis en Europa. En ambos casos el tratamiento está limitado a 18-24 meses, momento a partir del cual se detiene el anabolismo del hueso (Moen y Scott, 2006; Silverman y Nasser, 2011).

Recientemente se han realizado estudios que han mostrado efectos beneficiosos del uso de la teriparatida como tratamiento en la OA, tanto a nivel de hueso subcondral como a nivel del cartílago. La teriparatida administrada vía subcutánea ha mostrado efectos protectores en el cartílago y en el mantenimiento de la microarquitectura del hueso en estudios *in vivo* realizados con cobayas (Dai y cols., 2016; Yan y cols., 2014). Por otra parte, la administración sistémica de esta molécula tiene efectos condroprotectores e induce la regeneración de la matriz cartilaginosa en ratones (Sampson y cols., 2011). En el tratamiento de los defectos osteocondrales, la teriparatida se considera una terapia prometedora, ya que su administración sistémica estimula la formación del cartílago articular y la reparación del hueso subcondral (Orth y cols., 2013). En un estudio experimental realizado con roedores en el que la teriparatida se administró en microesferas de

ácido poli (láctico-co-glicólico), este fármaco detuvo la progresión de la OA (Eswaramoorthy y cols., 2012).

La proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) fue identificada como principal factor causante de hipercalcemia maligna (Suva y cols., 1987), aunque posteriormente se demostró su expresión en tejidos normales. Mientras que la PTH se sintetiza y secreta en las glándulas paratiroideas, la PTHrP se sintetiza y expresa en varios tejidos, como la piel, los vasos sanguíneos, el músculo liso, cartílago, hueso, riñón y tejidos neuronales y gliales (McCauley y Martin, 2012).

La PTHrP muestra una homología estructural con la PTH en las secuencias 1-13 y 29-34. Esta homología parcial determina su interacción con el receptor PTHR1 con afinidades similares, por lo que comparte muchas acciones de la PTH en las células diana. La interacción del fragmento N-terminal de la PTHrP con el receptor PTHR1, a través del acoplamiento a proteínas G, activa las vías de adenilato ciclasa y fosfolipasa C en osteoblastos. Ambas vías de señalización confluyen en la activación de las MAPKs para modular la proliferación y diferenciación osteoblástica (Datta y Abou-Samra, 2009). Las secuencias primarias de PTH y PTHrP difieren completamente más allá de su región N-terminal, lo que sugiere que estas proteínas podrían ejercer diferentes acciones en la célula.

La supresión homocigótica del gen de la PTHrP genera condrodisplasia perinatal en el ratón, mientras que los animales con delección heterocigótica de este gen son viables con una reducción significativa de la masa ósea (Amizuka y cols., 1996). Estos hechos demuestran el requerimiento de PTHrP para el desarrollo normal del hueso. Además, la PTHrP ha mostrado efectos en la reparación del cartílago a través de la inhibición de la hipertrofia de los condrocitos (Zhang y cols., 2012b).

4.1. Acciones de PTH y PTHrP

La proliferación de los osteoblastos podría verse estimulada por PTH y por PTHrP. El aumento del número de osteoblastos observado tras los tratamientos con PTH o con PTHrP en modelos de osteoporosis en roedores, sugiere que la

proliferación podría estar inducida en parte por la inhibición de la adipogénesis en la médula ósea (Rickard y cols., 2006). Este hecho es particularmente relevante en la pérdida de hueso relacionada con la edad porque se acumulan factores adipogénicos como el receptor activado por el factor proliferador de peroxisomas (PPAR)- γ y disminuyen factores osteogénicos en el hueso (Portal-Núñez y cols., 2013).

En lo que respecta a la diferenciación celular de los osteoblastos, estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que la exposición transitoria a PTH o PTHrP aumentan la producción de Runx2 en osteoblastos (Lozano y cols., 2009; de Castro y cols., 2010). La expresión de PTHrP es mayor en osteoblastos maduros que en osteoblastos con menor grado de diferenciación, lo que sugiere una implicación de esta proteína en la diferenciación osteogénica (Suda y cols., 1996). La administración intermitente de PTH y los péptidos PTHrP aumenta la producción de osteocalcina, un factor de diferenciación de osteoblastos, el cual se ha detectado en plasma y se ha usado como marcador de formación de hueso (Horwitz y cols., 2003; Stewart y cols., 2000).

La inhibición de la apoptosis juega un papel muy importante en las acciones anabólicas de la PTH sobre el hueso. En estudios en los que se administraba PTH diariamente a ratones adultos, se observó una disminución de la apoptosis en osteoblastos de la metafisis femoral (Jilka y cols., 1999). Sin embargo, tras la administración sostenida de la PTH no se observó efecto en la apoptosis de los osteoblastos (Bellido y cols., 2003). En consonancia con estos descubrimientos, en experimentos *in vivo*, se ha observado que ambos, PTH y PTHrP, contrarrestan la acción adversa de los agentes pro-apoptóticos en diferentes preparaciones de células osteoblásticas (Alonso y cols., 2008; Jilka, 2007). Un factor que puede estar implicado en la inducción de la apoptosis de osteoblastos y osteocitos es el aumento del estrés oxidativo a largo plazo que se produce en edades avanzadas (Manolagas, 2010). A este respecto, la PTH protege frente al daño en el ADN inducido por estrés oxidativo a través de la activación de proteínas de reparación del ADN, como son el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y el factor de transcripción Foxo3a, mientras que reduce la expresión de proteínas de detención de la apoptosis y el daño del ADN (Schnoke y cols., 2009).

4.2. Péptidos derivados de la PTHrP

Por procesamiento transcripcional del gen de la PTHrP se generan tres tipos de ARNm que dan lugar a tres isoformas de PTHrP de 139, 141 y 173 aminoácidos. Como consecuencia de su procesamiento post-traduccional, la PTHrP puede generar diferentes fragmentos que se clasifican en función de la posición que ocupan en la PTHrP: fragmentos de la zona N-terminal, fragmentos de la zona media y fragmentos de la zona C-terminal. Entre los fragmentos de la zona N-terminal destaca el péptido PTHrP (1-36). En la zona media que incluye dominios de localización nuclear, se han identificado péptidos como los PTHrP (38-94), PTHrP (38-95) y PTHrP (38-101). Por último, de la zona C-terminal, que comienza en el aminoácido 107 y contiene el pentapéptido osteostatina [PTHrP (107-111)], se han descrito los fragmentos PTHrP (107-138) y PTHrP (109-138) (Wysolmerski, 2012) (figura 8).

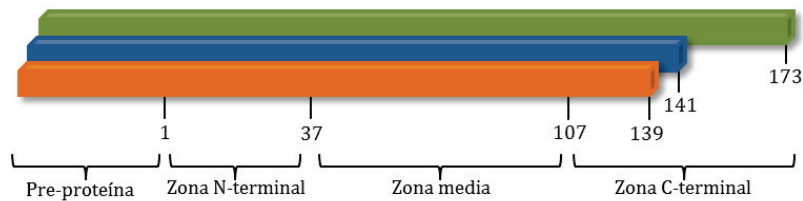


Figura 8. Isoformas proteicas de PTHrP y fragmentos generados por procesamiento post-traduccional.

Los péptidos derivados de la PTHrP se han estudiado por su posible acción como terapias anabólicas de hueso. Así, el análogo sintético de los 34 primeros aminoácidos de la región N-terminal de la PTHrP humana (abaloparatide) ha mostrado su efectividad al reducir el riesgo de fractura en ensayos clínicos en fase III (Miller y cols., 2015). Además, en estudios *in vivo* se ha observado que la administración intermitente del péptido N-terminal derivado de la PTHrP, el PTHrP (1-36), incrementa la masa ósea en varios modelos de osteoporosis en roedores (de Castro y cols., 2010; de Castro y cols., 2012). En un estudio con un pequeño grupo de mujeres postmenopáusicas testadas por un corto periodo de

tiempo (3 meses) también se ha observado el efecto anabólico en hueso (Horwith y cols., 2003).

Las acciones osteogénicas potenciales de PTHrP podrían no estar restringidas a su dominio N-terminal, similar a la PTH, sino también a su dominio C-terminal. Así, el fragmento C-terminal de la PTHrP, el PTHrP (107-139) administrado en inyecciones intermitentes subcutáneas por un corto período de tiempo (2-4 semanas), es capaz de enlentecer la pérdida de masa ósea en huesos largos, en ratones sometidos a tratamiento con glucocorticoides o tras ovariectomía (de Castro y cols., 2010; de Castro y cols., 2012). En un modelo animal de reparación de hueso, se ha demostrado que implantes realizados con el pentapéptido PTHrP (107-111) (osteostatina) cargado en biocerámicas, exhiben características osteoconductoras y osteoinductivas lo que concuerda con las características osteogénicas del péptido PTHrP (107-139) (Lozano y cols., 2014). Estas observaciones sugieren que los implantes cargados con osteostatina son una posible herramienta terapéutica para su aplicación en ingeniería de tejidos.

OBJETIVOS

En el capítulo anterior se han puesto de manifiesto las evidencias que apoyan los efectos beneficiosos del empleo de las ASCs en diferentes patologías, debidos principalmente a los efectos paracrinos de estas células. Por otra parte, los péptidos derivados de la PTHrP están siendo cada vez más estudiados por su posible acción como terapias anabólicas de hueso. A la vista de estos antecedentes, planteamos el estudio del MA de las ASCs y de los péptidos PTHrP (1-37), PTHrP (107-111) y PTHrP (107-139) como posibles terapias para el tratamiento de la OA. Por todo ello, los principales objetivos del presente trabajo han sido:

1. Estudiar los efectos del MA sobre el estrés oxidativo y la inflamación en cultivos primarios de monocitos y macrófagos.
2. Determinar las consecuencias del tratamiento con el MA sobre la producción de mediadores inflamatorios y degradativos en cultivos primarios de condrocitos humanos osteoartríticos.
3. Caracterizar los efectos del MA sobre la senescencia celular inducida por IL-1 β en cultivos primarios de condrocitos humanos osteoartríticos.
4. Determinar la influencia del tratamiento con los péptidos PTHrP (1-37), PTHrP (107-111) y PTHrP (107-139) sobre los marcadores de senescencia y la producción de mediadores inflamatorios y degradativos en cultivos de osteoblastos humanos osteoartríticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

El trabajo experimental se realizó empleando cultivos de células humanas procedentes de tejido articular (cartílago y hueso), tejido adiposo y sangre periférica. Las células aisladas se cultivaron en condiciones de esterilidad por lo que el procesamiento de las muestras y el tratamiento de los cultivos se realizaron en una cabina de flujo laminar que proporciona aire limpio y libre de partículas de hasta 0,1 μm en la zona de trabajo. Las células en cultivo se mantuvieron en un incubador celular en condiciones de atmósfera controlada a 37°C de temperatura, con un 5% de CO₂ y 95% de humedad y en oscuridad.

El diseño del trabajo fue aprobado por los Comités Éticos Institucionales (Universidad de Valencia y Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia). Los donantes firmaron un consentimiento escrito de acuerdo a la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 2013.

1.1. Aislamiento y cultivo de ASCs

Los cultivos de ASCs se realizaron a partir de muestras de tejido adiposo procedente de 22 donantes sanos que habían sido sometidos a una cirugía de lipectomía abdominal.

PROTOCOLO

Las muestras de tejido adiposo se lavaron tres veces con tampón fosfato salino (PBS) y se diseccionaron en condiciones de esterilidad. Posteriormente, se trataron enzimáticamente durante 1 hora a 37°C con una solución de colagenasa tipo IA a una concentración de 1,5 mg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) en DMEM/Ham's F-12 conteniendo penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (medio con antibióticos). A continuación, se filtró el producto de la digestión a través de un filtro de 100 μm (BD Biosciences, Durham, NC, EE.UU.). Al filtrado se le añadió medio completo y se centrifugó a 300 x g. Posteriormente, se realizó otro lavado con medio con antibióticos suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF) y se sembraron las células en frascos de cultivo T25, en medio con antibióticos suplementado con suero humano al 15%. A las 48 horas de la siembra, se recogió el medio de cultivo, definido como MA. Las células se

mantuvieron en cultivo hasta alcanzar la confluencia, momento en el que se realizaron subcultivos (figura 9).

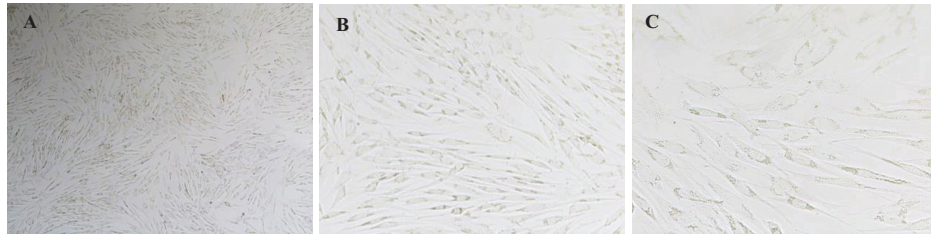


Figura 9. Imágenes representativas de un cultivo primario de ASCs. Las células se incubaron con DMEM/ HAM-F12 suplementado con 15% de suero humano. Aumentos: (a) x100 (b) x200; (c); x400.

Las ASCs se despegaron de la superficie del frasco con una solución de tripsina (0,25%)/ ácido tetramindiaminotetraacético (EDTA) (0,53 mM) (Sigma-Aldrich) y, posteriormente, se sembraron en frascos T175 a una densidad de 10^6 células/frasco. Finalmente, para confirmar la viabilidad de la suspensión celular, se realizó el test de exclusión de azul tripán.

1.1.1. Caracterización de ASCs por citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico que permite la medida simultánea de dispersión de luz y emisiones de fluorescencia al hacer pasar una suspensión de células u otras partículas, de una en una, por delante de un haz de luz láser. La detección de la dispersión de la luz nos informa de los parámetros de tamaño y complejidad celular relativos, mientras que la emisión de fluorescencia, debida al uso de anticuerpos conjugados con fluorocromos, permite la identificación de antígenos celulares. Para la caracterización de las células mesenquimales se emplearon anticuerpos conjugados a fluorocromos que reconocían los antígenos que expresan estas células en su membrana celular: CD90 y CD105, así como los que reconocían antígenos que no expresan estas células: CD34 y CD45 (Dominici y cols, 2006).

PROTOCOLO

Las ASCs se sembraron en frascos de T75, a razón de 5×10^5 células/frasco. Al alcanzar la confluencia, las células se lavaron con tampón PBS y se despegaron con una solución tripsina/EDTA. Tras varios lavados con tampón PBS, las células se distribuyeron en tubos de citómetro, añadiendo un mínimo de 1 millón de células por tubo suspendidas en 100 μ l de PBS. Uno de los tubos no se marcó con anticuerpos, y sirvió como control de autofluorescencia y el resto se incubó con cada uno de los anticuerpos conjugados con fluorocromos de la tabla 3 durante 30 minutos a 4°C. Para determinar la viabilidad celular las células se marcaron con yoduro de propidio (IP) (Sigma-Aldrich). Pasado el tiempo de incubación, se realizaron varios lavados con tampón PBS para eliminar el anticuerpo no unido a las células, y finalmente se resuspendieron en 1 ml de tampón PBS. Las muestras se midieron en un citómetro de flujo FACS-Canto II (BD Biosciences) y se analizaron empleando el software Flowjo (Ashland, OR, EE.UU.).

Anticuerpos	Dilución	Fabricante
Anti-CD90-PerCP-eFluor® 710	1/5	BD Biosciences
Anti- CD105- PE	1/10	eBioscience (San Diego, CA, EE.UU.)
Anti-CD34-APC	1/5	Inmunostep (Salamanca, España)
Anti-CD45-FITC	1/10	eBioscience

Tabla 3. Anticuerpos conjugados a fluorocromos empleados en citometría y condiciones de utilización. FITC: isotiocianato de fluoresceína. PE: ficoeritrina. APC: alofocianina. PerCP: proteína clorofila peridinina.

Como se observa en la figura 10A, la población celular de interés se identificó mediante un gráfico de dispersión que correlaciona los parámetros de dispersión frontal (*forward scatter*, FSC) y de dispersión lateral de la luz (*side scatter*, SSC). El análisis del tamaño y la granularidad celular mostró que el 82,9% de los eventos correspondían a un evento celular y no a restos celulares ni a agregados.

Para evaluar la viabilidad celular se tiñeron las células con IP, que no atraviesa la membrana plasmática y es excluido de las células vivas. El análisis del fenotipo celular mostró que únicamente un 3,37% de las células no eran viables (figura 10B). La cuantificación de la fluorescencia de los anticuerpos se realizó únicamente en la población de células vivas. De las células vivas un 97,5% eran positivas para CD90 (figura 10C), mientras que un 100% lo eran para CD105 (figura 10D).

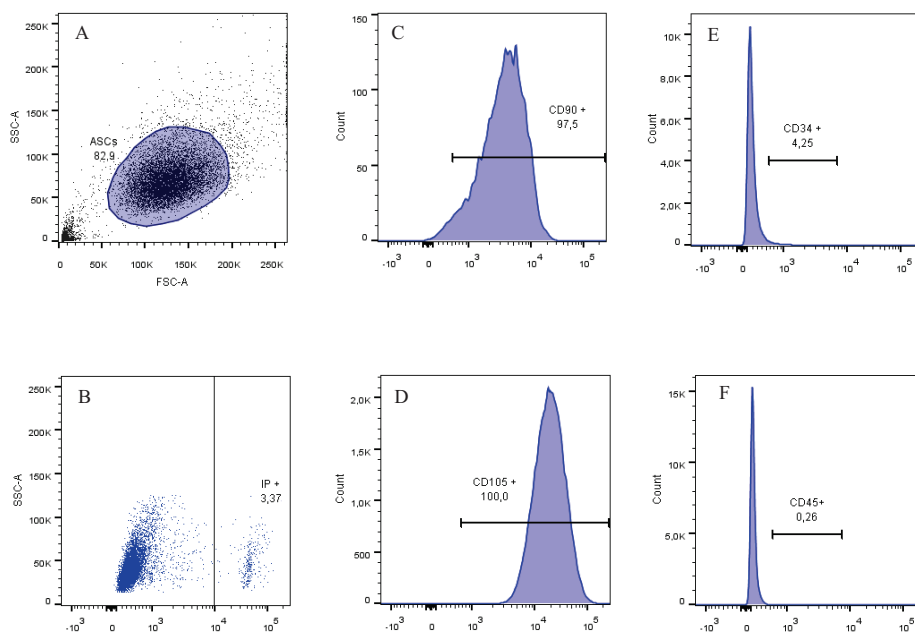


Figura 10. Caracterización por citometría de flujo de las ASCs. A. Selección de la población celular. B. Selección de las células viables con yoduro de propidio (IP). C-F. Gráficos biparamétricos de intensidad de fluorescencia. SSC: *side scatter*. FSC: *forward scatter*. FITC: isotiocianato de fluoresceína. APC: alofocianina. PE: ficoeritrina.

El antígeno CD34 se expresa en ASCs nativas y durante los primeros pases del cultivo, pero desaparece rápidamente tras la proliferación celular *in vitro* (Maumus y cols., 2011; Sengenés y cols., 2005). En nuestras condiciones de cultivo también se observó una desaparición de este marcador cuando se realizaron subcultivos, partiendo de un 4,25% de células positivas en pase 0 (figura 10E) que

desciente a menos de un 1% en pase 4 (datos no mostrados). El marcador de células hematopoyéticas CD45 estaba presente en menos de un 1% de los eventos celulares (figura 10F).

1.1.2. Aislamiento de vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares son estructuras rodeadas de una bicapa lipídica liberadas por las células al espacio extracelular. Contienen numerosas proteínas y lípidos así como micro ARNs responsables de la señalización intercelular. Según su tamaño y origen, las vesículas extracelulares se dividen en tres grupos: exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos (György y cols., 2011) (tabla 4).

Vesículas extracelulares	Tamaño
Cuerpos apoptóticos	1-5 μm
Microvesículas	100 nm-1 μm
Exosomas	50-100 nm

Tabla 4. Tipos de vesículas extracelulares y rango de tamaños.

La técnica de aislamiento de vesículas extracelulares empleada se basó en una combinación de centrifugaciones diferenciales y filtraciones a través de poros de diferente diámetro. Las vesículas se hacen pasar por los filtros por presión hidrostática para evitar su rotura. Con este protocolo se consiguieron aislar los tres subtipos de vesículas extracelulares (figura 11).

PROTOCOLO

Las ASCs se sembraron en 3 frascos T175 a una densidad de 10^6 células/frasco para cada extracción. Cuando se alcanzó la confluencia se lavaron las células 3 veces con tampón PBS para eliminar las microvesículas suspendidas en el sobrenadante, se añadieron 20 ml de medio con antibióticos, y se incubaron

las células durante 24 horas para permitir la producción de vesículas. Al añadir medio con antibióticos en lugar de medio completo, nos aseguramos de que las vesículas que aislamos son las producidas por las células y no las vesículas presentes en el suero. Posteriormente, se recogió el medio de cultivo y se centrifugaron a 300 x g durante 10 minutos con el fin de eliminar del medio células despegadas o trozos de células. A continuación, los sobrenadantes se filtraron a través de un filtro de 5 µm (Millipore, Budapest, Hungría) por presión hidrostática y se centrifugó el filtrado a 2000 x g durante 10 minutos. En el sobrenadante se encontraban las microvesículas y los exosomas, y en el pellet los cuerpos apoptóticos.

Para evitar resuspender el pellet, se recogieron los sobrenadantes empleando una jeringa con una aguja de 0,8 µm de diámetro. Una vez eliminado el sobrenadante, se lavó el pellet resuspendiéndolo en 600 µl de tampón PBS y, posteriormente, se centrifugó a 2000 x g durante 10 minutos. Finalmente, se resuspendió el pellet conteniendo los cuerpos apoptóticos en 15 µl de tampón PBS y se mantuvo a 4°C hasta su posterior análisis.

Para separar la fracción de microvesículas y la de exosomas contenidas en el sobrenadante, éste se filtró por presión hidrostática empleando filtros de 0,8 µm y posteriormente se centrifugó a 12600 x g durante 30 minutos. Se recogió el sobrenadante con ayuda de una jeringa y se filtró a través de filtros de 0,2 µm por presión hidrostática. El pellet, en el que se encontraban las microvesículas se lavó con tampón PBS, se resuspendió en 15 µl de tampón PBS y se mantuvo a 4°C hasta su posterior análisis.

Una vez filtrado el sobrenadante, se centrifugó en una ultracentrífuga Beckman Coulter Optima MAX-XP a 100000 x g durante 70 minutos. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en tampón PBS y se volvió a centrifugar a 100000 x g durante 70 minutos. Se eliminó el sobrenadante con ayuda de una jeringa y se resuspendió el pellet en 15 µl de tampón PBS. El pellet conteniendo los exosomas se mantuvo a 4°C hasta su posterior análisis.

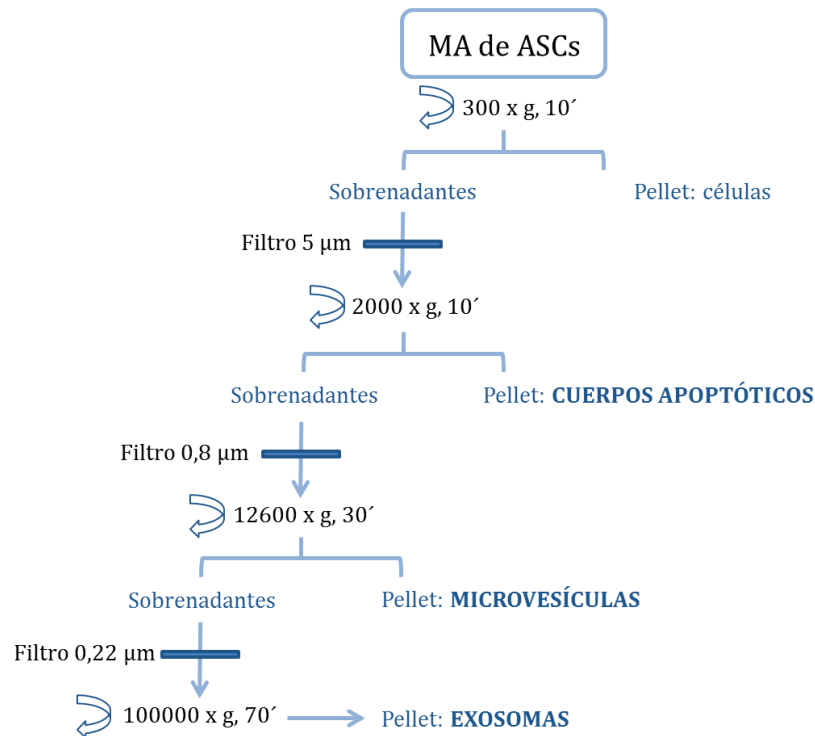


Figura 11. Esquema de aislamiento de los cuerpos apoptóticos, microvesículas y exosomas.

1.1.3. Cuantificación de vesículas extracelulares

La técnica qNANO (Izon, Oxford, Reino Unido) permite medir la concentración y la distribución de tamaño de las vesículas extracelulares. Esta técnica detecta, individualmente, las vesículas extracelulares que, al pasar a través de una membrana con nanoporos, provocan una disminución transitoria de la corriente iónica que informa tanto del número de vesículas como del tamaño de éstas.

PROTOCOLO

Como paso previo a la medida de las vesículas, se realizaron una serie de diluciones de nuestra muestra desde 1/10 a 1/1000, comenzando la cuantificación por la más diluida. Para diluir la muestra se empleó tampón PBS filtrado a través de un poro de 0,22 μm. Este tampón nos sirvió para diluir la muestra y las

partículas de calibración (Izon). Una vez diluida la muestra, se añadieron 10 µl de ésta a la membrana porosa. En función del tipo de vesícula extracelular que queramos cuantificar emplearemos una membrana con un tamaño de poro tal que permita pasar, de una en una, las vesículas, de manera que cada caída en la corriente eléctrica se deba a un evento vesicular.

1.1.4. Caracterización de microvesículas por citometría de flujo

Para la caracterización de las microvesículas se utilizó la técnica de citometría de flujo, empleando para el marcaje anticuerpos conjugados a fluorocromos. Sin embargo, debido a su pequeño tamaño, su caracterización requiere trabajar en determinadas condiciones, cercanas al límite de sensibilidad de los citómetros.

PROTOCOLO

Para la caracterización de las vesículas extracelulares, en primer lugar se realizó un control de agregación con una mezcla 1:1 de Anti-CD63-PE (Sigma-Aldrich) en tampón PBS. Para la tinción de las microvesículas con Anti-CD63-PE, se diluyeron 5 µl de la muestra en 45 µl de tampón PBS. A 25 µl de la muestra diluida se le añadieron 25 µl de tampón PBS como control, y a los otros 25 µl de muestra diluida se añadieron 25 µl de Anti-CD63. Se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad. Pasado ese tiempo se centrifugó a 12600 x g durante 30 minutos y se añadieron 550 µl de tampón PBS. Para su lectura en el citómetro FACS-Calibur flow cytometer (BD Biosciences), se emplearon 300 µl de esta dilución.

Para el marcaje con Anexina V-FITC (BD Biosciences), se añadieron 100 µl de tampón PBS a 5 µl de muestra y se centrifugaron a 12600 x g durante 30 minutos. El pellet se resuspendió en 50 µl de tampón de unión a anexina y se le añadió 1 µl de Anexina V-FITC (BD Biosciences). Se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad. Pasado este tiempo se centrifugó a 12600 x g durante 30 minutos y se resuspendió el pellet en 300 µl de tampón de unión a Anexina-V-FITC para su medición en el citómetro.

Para obtener la región de microvesículas, se empleó el reactivo Megamix-Plus SSC (Biocytex, Marsella, France) que nos permite determinar las regiones por tamaño de partícula que corresponderán a la regiones donde se encontraban las microvesículas que hemos aislado (figura 12). Las muestras se midieron en un citómetro de flujo FACS-Canto II (BD Biosciences) y se analizaron empleando el software Flowjo.

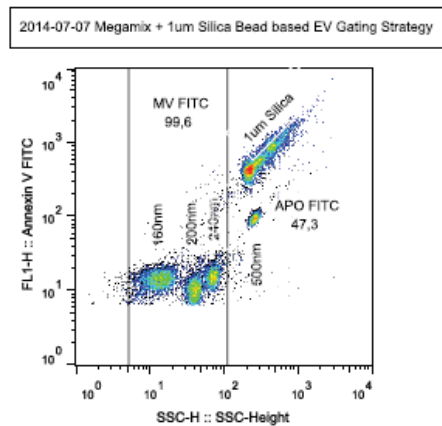


Figura 12. Gráfico biparamétrico de las partículas Megamix Plus con las regiones que corresponden al tamaño de las microvesículas (MV) y cuerpos apoptóticos (APO).

Con el fin de verificar la naturaleza vesicular de los eventos detectados, y para excluir la presencia de agregados de anticuerpos, se añadió 0,1% de Tritón X-100 a las muestras. Este paso se traduce en una desaparición inmediata de los eventos fluorescentes, lo que sugiere la presencia de estructuras membranosas en la región de las microvesículas.

1.2. Aislamiento y cultivo de monocitos

Los monocitos se aislaron a partir de muestras de sangre enriquecidas en leucocitos (“buffy coat”), que se obtuvieron de concentrados de sangre completa de varios donantes. Para el aislamiento se empleó Ficoll-Paque Premium 1,073 (GE Healthcare, Barcelona, España) y posteriormente, se aislaron selectivamente los monocitos por su capacidad de adherencia a la placa de cultivo.

PROTOCOLO

Las muestras de “buffy coat” se diluyeron, en condiciones de esterilidad, en un volumen igual de medio con antibióticos y se centrifugaron a 400 x g durante 15 minutos, a una temperatura de 18-20°C, para eliminar el máximo número posible de plaquetas. El sedimento celular obtenido se resuspendió en medio de cultivo y la suspensión celular se añadió lentamente a tubos que contenían Ficoll-Paque Premium, evitando que se mezclaran. Posteriormente, se centrifugó a 400 x g durante 40 minutos a una temperatura de 18-20°C, desactivando el freno de la centrífuga.

El Ficoll aglutina los eritrocitos, que sedimentan en el fondo. Los granulocitos también sedimentan por su tamaño y densidad, y por su tendencia a formar agregados. Sin embargo, las células mononucleares, por su menor densidad, se mantienen en la interfase entre el plasma y el medio.

Se eliminó la capa superior que contenía las plaquetas y se recogió la fina capa de células mononucleares, que se lavó con medio de cultivo. Se analizó la viabilidad celular con el test de exclusión de azul tripán y se sembraron en placas de cultivo a una densidad de 10^6 células/ml en medio con antibióticos suplementado con un 10% de suero humano. Las placas se mantuvieron 2 horas en el incubador celular. Transcurrido este tiempo, se lavó el cultivo con medio con antibióticos para eliminar las células no adheridas a la placa. Los cultivos de monocitos se mantuvieron en un incubador celular durante 24 horas. Para obtener macrófagos diferenciados, se mantuvo el cultivo durante 7 días en el mismo medio con antibióticos suplementado con un 10% de suero humano (Andreesen y cols., 1983; Musson, 1983), realizando cambios de medio en días alternos (figura 13).

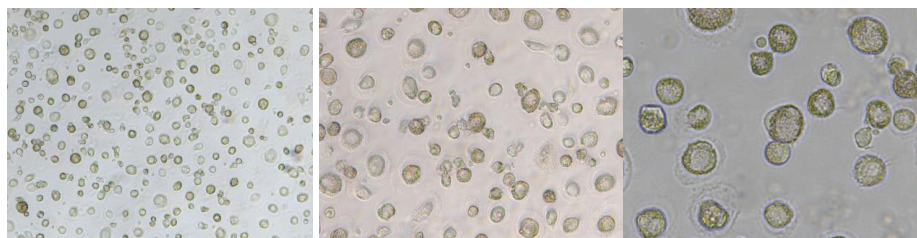


Figura 13. Cultivo primario de macrófagos. Las células se incubaron en medio con antibióticos suplementado con un 10% de suero humano durante 7 días. Aumentos: **A.** x100 **B.** x200; **C.** x400.

1.2.1. Caracterización de los monocitos por citometría de flujo

Los monocitos aislados del “buffy coat” se caracterizaron por citometría de flujo. Las células se sembraron en frascos de T75, a razón de 10^6 células/frasco. Al alcanzar la confluencia, las células se procesaron como se ha descrito en el apartado 1.1.1 y las suspensiones celulares obtenidas se incubaron con anticuerpos marcados con fluorocromos (tabla 5) durante 30 minutos a 4°C y con IP para determinar la viabilidad celular. Las muestras se midieron en un citómetro de flujo FACS-Canto II (BD Biosciences) y se analizaron empleando el software Flowjo.

Anticuerpos	Dilución	Fabricante
Anti-CD45-FITC	1/5	BD Biosciences
Anti-CD14-PE	1/10	eBioscience

Tabla 5. Anticuerpos conjugados a fluorocromos empleados en citometría y condiciones de utilización. FITC: isotiocianato de fluoresceína. PE: ficoeritrina.

El gráfico biparamétrico de SSC (*side scatter*) y FSC (*forward scatter*) nos permitió identificar la población de monocitos ya que el SSC nos informa de la granularidad celular, mientras que el FSC es relativo a su tamaño. De esta manera se pudo hacer una selección de las células, descartando los restos celulares, que tienen un menor SSC y FSC, y los agregados celulares que tendrán un elevado FSC. En esta selección se obtuvieron un 73% del total de los eventos, que corresponderían con la población celular de monocitos (figura 14A). El ensayo de viabilidad con IP mostró de que solo el 1,55% de los eventos celulares correspondían a células muertas (figura 14B). Por otra parte, los gráficos 14C y 14D, correspondientes al análisis de fluorescencia de los anticuerpos, mostraron que más de 98% de las células viables presentaban en su superficie los antígenos CD45 y CD14.

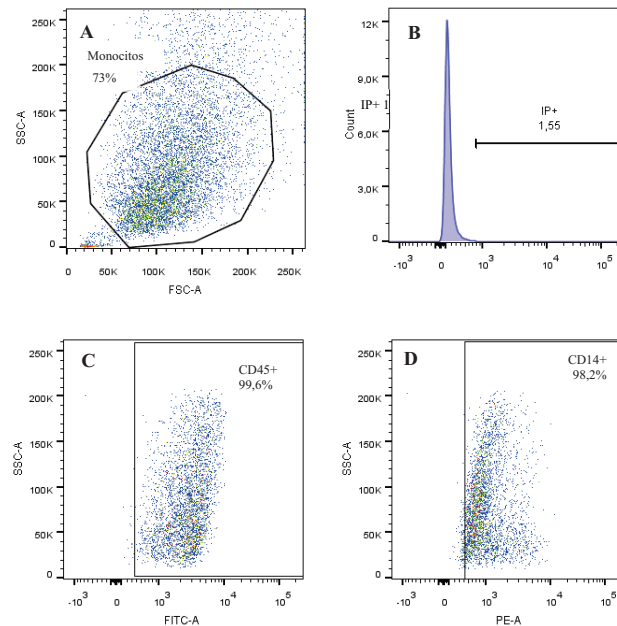


Figura 14. Caracterización por citometría de flujo de los monocitos. **A.** Selección de la población celular. **B.** Selección de las células viables con yoduro de propidio (IP). **C, D.** Gráficos biparamétricos de intensidad de fluorescencia. Los monocitos fueron positivos para los marcadores CD45, CD105 y CD14. SSC: *side scatter*. FSC: *forward Scatter*. FITC: isotiocianato de fluoresceína. APC: alofocianina. PE: ficoeritrina.

1.3. Aislamiento y cultivo de condrocitos

Los cultivos de condrocitos humanos osteoartríticos se obtuvieron a partir de muestras de cartílago procedentes de 85 pacientes con diagnóstico de OA avanzada (63 mujeres y 22 hombres con una edad media de $71,7 \pm 7,3$, media $\pm \epsilon$) que habían sido sometidos a cirugía para reemplazar la articulación de la rodilla por una prótesis. El diagnóstico se basó en una evaluación clínica, analítica y radiológica.

PROTOCOLO

Para realizar los cultivos primarios de condrocitos osteoartríticos nos basamos en trabajos previos realizados en nuestro grupo de investigación (Fernández y cols., 2003). El cartílago se diseccionó, en condiciones de esterilidad, de los

cóndilos femorales y del platillo tibial de la articulación de la rodilla (figura 15), y se cortó con bisturí, en pequeños fragmentos de 1mm^3 , aproximadamente.

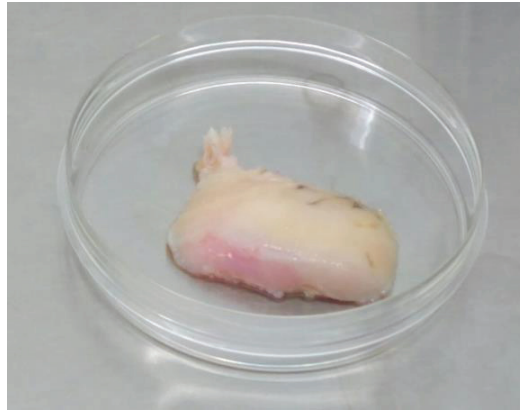


Figura 15. Muestras de cartílago articular procedentes de la articulación de la rodilla de pacientes con OA.

Con el fin de aislar los condrocitos localizados en los fragmentos de cartílago, se realizó una digestión enzimática secuencial, de manera que los fragmentos se trataron con hialuronidasa $0,1\text{ mg/ml}$ (Sigma-Aldrich) en medio con antibióticos durante 1 hora en el incubador celular a una temperatura de 37°C , atmósfera con 5% de CO_2 y 95% de humedad. A continuación, se substituyó el medio que contenía hialuronidasa por una solución de colagenasa IA (1 mg/ml) (Sigma Aldrich), en el mismo medio con antibióticos, durante 12-15 horas en incubador celular. La suspensión celular se pasó a través de un filtro de $70\ \mu\text{m}$ de diámetro de poro (BD Biosciences) para separar la fracción celular, a la que luego se añadió medio completo. Posteriormente, se recogieron las células mediante centrifugación, a una fuerza centrífuga relativa de $300\ \times\ g$, y se realizó un lavado con medio completo. La viabilidad celular se determinó por el test de exclusión de azul tripán (Sigma-Aldrich). Las células obtenidas se sembraron en las placas de cultivo, correspondientes a cada experimento, con medio completo, y se mantuvieron en un incubador celular hasta alcanzar la semiconfluencia, momento en el que se realizaron los estímulos (figura 16). Se realizaron cambios de medio de cultivo en días alternos.

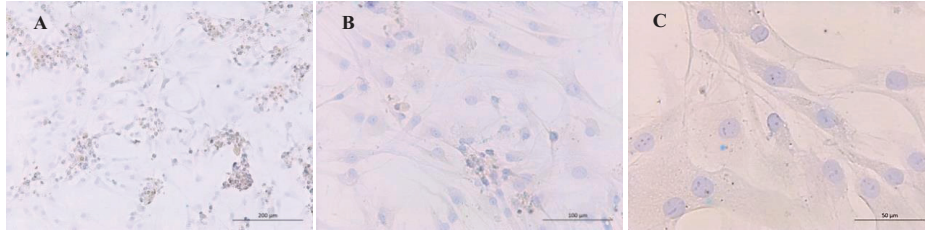


Figura 16. Cultivo primario de condrocitos osteoartríticos. Tinción de contraste con hematoxilina-eosina. Aumentos: (a) x100 (b) x200; (c); x400.

Los condrocitos se caracterizan por sintetizar una matriz de colágeno II, componente principal del cartílago. La caracterización de los condrocitos se realizó mediante un análisis inmunocitoquímico de la expresión de colágeno II (figura 17), como se indica en el apartado 10.6.1.

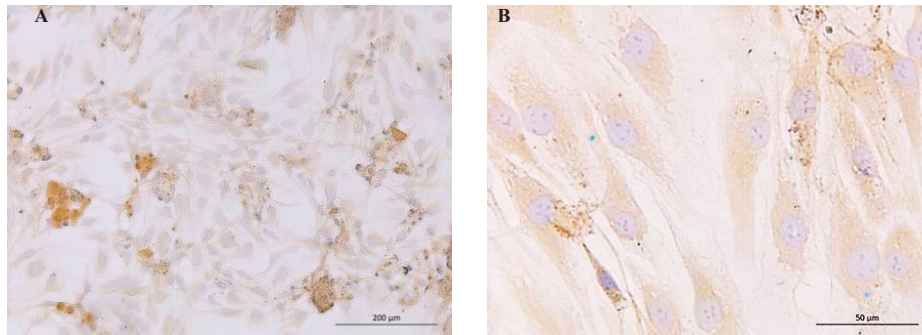


Figura 17. Análisis inmunocitoquímico de la expresión de colágeno II en cultivo primario de condrocitos osteoartríticos. Los condrocitos se fijaron y se trataron con un anticuerpo monoclonal frente a colágeno II humano. Aumentos: **A.** x100; **B.** x200.

1.4. Aislamiento y cultivo de osteoblastos

Los osteoblastos humanos osteoartríticos se aislaron a partir de muestras de hueso trabecular procedentes de rodillas de pacientes con un diagnóstico de OA avanzada (18 mujeres y 8 hombres con una media de edad $70,6 \pm 7,2$, media $\pm \epsilon$).

PROTOCOLO

El cultivo de osteoblastos osteoartríticos se realizó basándonos en estudios realizados previamente en nuestro laboratorio (Clérigues y cols., 2012). Se aislaron las células madre mesenquimales del hueso trabecular y se cultivaron empleando un medio osteogénico (Promocell, Labclinics S.A., Barcelona, España) para garantizar su diferenciación a osteoblastos.

En condiciones de esterilidad, se recogieron pequeñas piezas de hueso trabecular procedentes de los cóndilos femorales y de los platillos tibiales, tal y como se muestra en la figura 18.



Figura 18. Muestras de hueso subcondral procedentes de la articulación de la rodilla de pacientes con OA.

Posteriormente, se trituraron estas piezas de hueso y se sometieron a varios lavados con medio con antibióticos. A continuación, el hueso triturado se sometió a una digestión enzimática con colagenasa IA (1 mg/ml) disuelta en medio con antibióticos, durante 2 horas a 37°C en agitación. Tras varios lavados con medio completo, el producto de la digestión enzimática se sembró en placas de cultivo de 10 cm de diámetro, con medio osteogénico completo (Promocell) y se mantuvo en el incubador celular a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de humedad durante 7 días. Tras este tiempo se empezaron a observar células adheridas a la superficie de la placa de cultivo. Los siguientes cambios de medio se realizaron en días alternos. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 70%, se retiraron los fragmentos de hueso y se mantuvo el cultivo con medio osteogénico hasta la confluencia total.

Alcanzada la confluencia celular, se despegaron las células adheridas a las placas de cultivo con tripsina (0,25%)/ EDTA (0,53 mM) (Sigma-Aldrich) y se realizaron subcultivos empleando el mismo medio completo osteogénico. La viabilidad celular se evaluó mediante el test de exclusión de azul tripán.

Los osteoblastos se caracterizan por su capacidad para sintetizar activamente matriz ósea, la cual es posible visualizar empleando una tinción de rojo alizarina. En nuestro estudio, realizamos la tinción de las células en monocapa empleando el colorante como se describe en el apartado 12. Como se observa en la figura 19, las células cultivadas en pase 1 tienen la capacidad de formar una matriz mineralizada, lo que se considera un indicador de linaje osteoblástico.

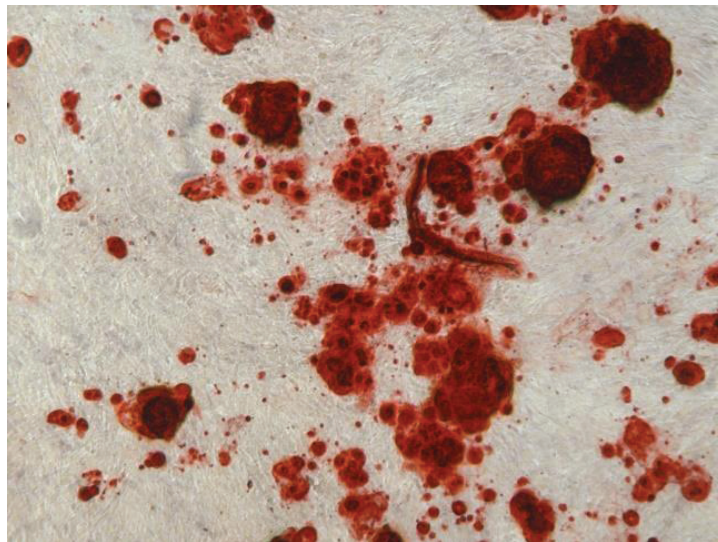


Figura 19. Tinción de rojo alizarina de un cultivo de osteoblastos OA. Imágenes representativas de 4 experimentos diferentes. Aumento: 40x.

2. Tratamiento de los cultivos celulares

Los cultivos celulares se trataron con diferentes productos y estímulos cuando alcanzaron la semiconfluencia, en función del tipo celular y de las condiciones del estudio, tal y como se describe a continuación.

2.1. Cultivos de ASCs

A partir de los cultivos de ASCs se obtuvo el MA que se empleó en los diferentes experimentos. Para su obtención, las células se sembraron en frascos de T25 a una densidad celular de 3×10^5 células/frasco, en medio con antibióticos suplementado con un 15% de suero humano. El MA de las células en pase 0 y pase 1, se recogió a las 48 horas, se centrifugó a $1000 \times g$ durante 10 minutos y se mantuvo a -80°C hasta su uso.

2.2. Cultivos de monocitos

A las 24 horas de la siembra de los monocitos, se incubaron a diferentes tiempos, en función del experimento, con medio con antibióticos, suplementado con un 10% de suero humano o con MA de ASCs, en presencia o ausencia de LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) (Sigma-Aldrich). Los macrófagos se incubaron 6 días después de la siembra, durante 24 horas en presencia o ausencia de LPS y/o MA.

2.3. Cultivos de condrocitos

Una vez alcanzada una confluencia cercana al 80%, se incubaron los condrocitos a diferentes tiempos, en función del experimento, con DMEM/Ham's F-12 conteniendo penicilina y estreptomina, suplementado con un 10% de suero humano o con MA de ASCs, en presencia o ausencia de IL-1 β (10 ng/ml) (Peprotech EC Ltd, Londres, Reino Unido). El suero humano se obtuvo de sangre de donantes de grupo sanguíneo de tipo AB siguiendo los criterios éticos del Centro de Transfusiones de Valencia.

2.3.1. Inhibición de la expresión génica mediante ARN silenciadores

Con el fin de inhibir la expresión de determinados genes, se emplearon moléculas de ARN de interferencia de pequeño tamaño o "silenciadores" (*small interfering RNA*, siRNA), fabricados por Ambion (Austin, Texas, EE.UU). Tras la transfección, los ARN silenciadores interaccionan con un complejo de proteínas que contiene nucleasas, el complejo de silenciamiento inducido por el ARN (RISC).

Tras la unión al ARN silenciador el RISC se activa, permitiendo que la hebra antisentido del ARN silenciador se una a la hebra complementaria del ARNm que se quiere silenciar, de manera que se induce la degradación enzimática de éste. De esta forma, con el uso de un ARN silenciador específico de Sirt1, se consiguió inhibir la expresión de este factor inducida por IL-1 β .

PROTOCOLO

Esta técnica se realizó en condrocitos osteoartríticos en cultivo primario sembrados a una densidad de 2×10^4 células/pocillo en microcámaras de 8 pocillos Lab-tek chambers (Thermo Scientific, Rochester, NY, EE.UU.).

Una vez que las células alcanzaron el 60% de la confluencia se transfectó el ARN silenciador específico de Sirt1 (siSirt1) (100 nM) o el ARN silenciador control (siCont) durante 24 horas antes del estímulo con IL-1 β (10 ng/ml) (Peprotech). El agente de transfección utilizado fue SiPORT™ Amine (Ambion). El complejo formado por el ARN silenciador y el SiPORT™ Amine se preparó en medio de cultivo no suplementado y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió a las células en cultivo y se incubó durante 24 horas en un incubador celular para aumentar el rendimiento de la transfección.

2.4. Cultivos de osteoblastos

Los osteoblastos se incubaron al alcanzar la semiconfluencia, a diferentes tiempos en función del ensayo con los péptidos derivados de la PTHrP: PHTrP (1-37), PHTrP (109-137) y PHTrP (109-111) (Bachem, Bubendorf, Suiza) (cada uno a 100 nM), en presencia o ausencia de IL-1 β (10 ng/ml).

3. Ensayo de MTT

El ensayo de MTT [Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazoilo] permite determinar la viabilidad de las células en cultivo. Esta técnica se basa en la capacidad celular de reducir el MTT, captado por las células, a formazán por acción de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial. La reducción del MTT a

formazán produce un cambio de coloración de amarillo a azul, que es posible cuantificar por colorimetría (figura 20).

PROTOCOLO

Los ensayos se realizaron en placas de 24 pocillos, donde se sembraron los condrocitos a una densidad de 8×10^4 células/ pocillo, los osteoblastos a razón de 4×10^4 células/ pocillo y los monocitos a 2×10^5 células/ pocillo. Cuando se alcanzó, en los cultivos, una semiconfluencia del 80%, las células se incubaron con los productos en estudio. Transcurrido el tiempo correspondiente a cada ensayo, se retiraron los sobrenadantes de los pocillos y se añadieron 200 μl /pocillo de una solución de MTT (0,5 mg/ml) y se incubaron durante 60 minutos a 37°C. Pasado ese tiempo, se eliminaron los sobrenadantes y se añadieron 150 μl de dimetilsulfóxido (DMSO) para producir la lisis celular y solubilizar el formazán. Finalmente, se determinó la absorbancia a 490 nm con la ayuda de un espectrofotómetro VICTOR 2™ V 1420 multilabel counter (Perkin Elmer, Madrid, España). El valor de la absorbancia es directamente proporcional al número de células viables. Los resultados se expresaron asignando el 100% de viabilidad al valor de absorbancia relativo a las células no estimuladas y en relación a éste se establecieron los diferentes porcentajes de viabilidad.

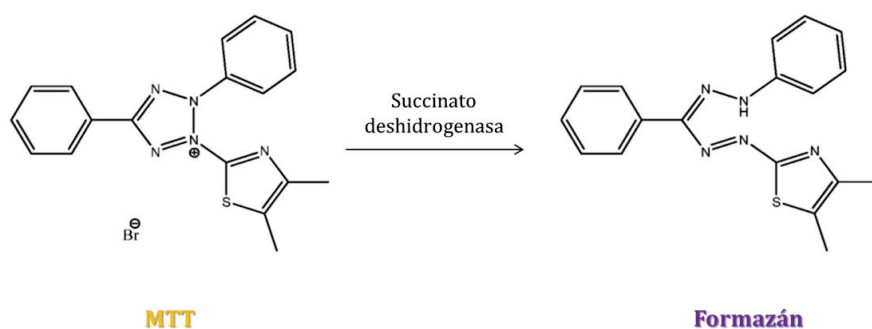


Figura 20. Reducción del MTT a formazán.

4. Medida del estrés oxidativo con dihidrorodamina 123

Para la medida del estrés oxidativo, se empleó la molécula dihidrorodamina 123 (DHR). La membrana celular es permeable a la DHR, que en el interior celular es oxidada a rodamina 123 en presencia de ROS. La molécula oxidada emite fluorescencia a 534 nm, de manera que la cantidad de fluorescencia detectada será proporcional a la cantidad de ROS producidas por las células.

PROTOCOLO

Los monocitos se sembraron en placas de 6 pocillos a razón de 10^6 células/pocillo. Una vez alcanzada una concentración celular próxima a la confluencia, se sustituyó el medio por MA, en el caso de los controles, con medio DMEM/Ham's F-12 conteniendo antibióticos y suero humano al 10%. Además, las células se estimularon con LPS (1 ng/ml) durante 30 minutos, excepto los controles con medio con suero humano o MA. A continuación, tras varios lavados con medio completo sin rojo fenol, se sustituyó el medio por una solución de DHR 5 μ M disuelta en medio sin rojo fenol y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Finalmente, se eliminó el sobrenadante, se realizaron varios lavados con tampón PBS y las células se distribuyeron en tubos de citómetro a razón de un mínimo de 10^6 de células por tubo suspendidas en 500 μ l de PBS. Se midió la fluorescencia de las muestras en un citómetro de flujo FACS-Canto II (BD Biosciences) a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 534 nm.

5. Determinación de aductos proteicos de hidroxinonal

Los lípidos son las biomoléculas más susceptibles de ser atacadas por radicales libres. De esta manera, la peroxidación lipídica puede dar lugar a la formación de un gran número de productos de oxidación, sobre todo aldehídos como el malondialdehído y el 4-hidroxinonal (4-HNE). Estos productos pueden formar aductos estables con proteínas (Yin y Porter, 2011).

PROTOCOLO

Para determinar la peroxidación lipídica en cultivos de condrocitos humanos osteoartríticos, se cuantificaron los aductos proteicos de HNE de los lisados

celulares empleando un kit de ELISA (ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas) (apartado 10.3) de Cell Biolabs (San Diego, CA, EE.UU.).

6. Determinación de la producción de nitrito

El ensayo de cuantificación de nitrito se basó en la reacción del ion nitrito con el 2, 3- diaminonaftaleno (DAN) que tiene como producto el 1-(H)-naftotriazol (NAT), el cual emite fluorescencia a 450 nm (figura 21). Por lo tanto, la intensidad de fluorescencia será proporcional a la cantidad de nitrito liberado por las células al medio de cultivo.

PROTOCOLO

Los monocitos y condrocitos se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad 3×10^5 células/pocillo en el caso de los condrocitos y 5×10^5 en el caso de los monocitos. Cuando la cantidad de células alcanzó un 80% de la confluencia, se estimularon las células a diferentes tiempos. Para esta técnica se utilizaron los sobrenadantes celulares. Se añadieron 10 μ l de sobrenadante en placas de fluorescencia opacas y se diluyeron con 90 μ l de suero fisiológico. Para realizar la recta patrón empleamos nitrito sódico diluido en suero fisiológico. Posteriormente, se añadieron a cada pocillo 10 μ l de una solución de DAN (50 μ g/ml) y se incubó la placa durante 7 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Trascurrido ese tiempo, se añadieron 10 μ l de NaOH (1,4 M) y se incubó la placa 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La fluorescencia fue cuantificada con un espectrofotómetro VICTOR 2™ V 1420 *multilabel counter* a 365 nm de longitud de onda de excitación y 450 nm de emisión.

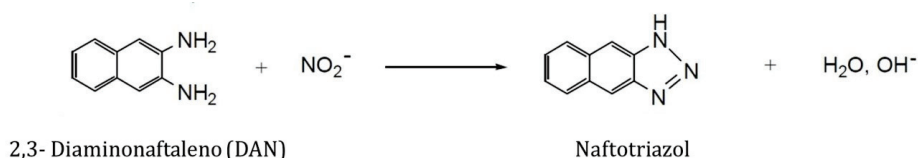


Figura 21. Reacción de DAN con nitrito y formación del producto fluorescente NAT.

7. Despolarización mitocondrial

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) es fundamental para mantener la función fisiológica de la cadena respiratoria. Una pérdida significativa de $\Delta\Psi_m$ puede provocar disfunción celular y conducir a la muerte celular por apoptosis o necrosis. Uno de los fluorocromos más empleados en la medida del $\Delta\Psi_m$ es el JC-1, que dependiendo de si está en forma de agregado o monómero emite fluorescencia a una longitud de onda diferente, de 585 nm o 530nm respectivamente. Un aumento de $\Delta\Psi_m$ permite la formación de agregados de JC-1, mientras que una pérdida de $\Delta\Psi_m$ mantiene el JC-1 en forma de monómeros (Ly y cols., 2003).

PROTOCOLO

Para estudiar los cambios en el $\Delta\Psi_m$ se utilizó el fluorocromo JC-1. Para ello, los monocitos se cultivaron en placas de 6 pocillos con 10^6 células/pocillo. Las células se trataron con MA durante 24 horas y se estimularon con LPS. Como control positivo, se trataron con valinomicina (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 1 $\mu\text{g/ml}$, durante 4 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, se despegaron con una solución tripsina (0,25%)/EDTA (0,53 mM) (Sigma-Aldrich). La tripsina se inactivó con medio completo y los monocitos se transfirieron a tubos de citómetro con un mínimo de un millón de células por tubo. Uno de los tubos se dejó sin marcar, como control negativo. El resto de tubos se tiñeron con JC-1 durante 10 minutos a 37°C. Después de varios lavados con tampón PBS, las células se resuspendieron en 1 ml de tampón PBS. Se midió la cantidad de monómeros de JC-1 (530 nm) y agregados de JC-1 (585 nm).

8. Determinación de la actividad metaloproteínasa

La actividad enzimática de distintas MMPs (MMP-1, 2, 3, 7, 8, 12 y 13) se determinó mediante una técnica fluorimétrica. Esta técnica se basa en la rotura del péptido QXL520TM- γ -Abu-Pro-Cha-Abu-Smc-His-Ala-Dab (5-FAM)-Ala-Lys-NH₂ (5-FAM/QXLTM520) (Anaspec Inc, San José, CA, EE.UU.) por parte de las MMPs. El péptido completo no emite fluorescencia debido a un fenómeno conocido como

FRET (Transferencia de energía de resonancia). Sin embargo, la rotura del péptido libera el fluoróforo QXL™520 que emite fluorescencia a 520 nm (figura 22).

El método empleado se diseñó en nuestro laboratorio (Guillen y cols., 2008) como una variante de la técnica fluorimétrica comercial del sistema EnzoLyte™ Profiling kit de Anaspec Inc.

PROTOCOLO

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 3×10^5 células/pocillo en el caso de los condrocitos y $2,5 \times 10^5$ células/pocillo en los osteoblastos. Se mantuvieron en cultivo hasta alcanzar una densidad celular cercana a la confluencia, momento en el que se incubaron las células con los diferentes tratamientos. Transcurrido el tiempo de estímulo correspondiente, se recogieron los sobrenadantes, en los que se midió la actividad metaloproteínasa de las MMPs liberadas al medio de cultivo. El primer paso fue activar las MMPs con el sustrato APMA (acetato p-aminofenil mercúrico). Para ello, a 100 μ l de cada sobrenadante se le añadió 1 μ l de una solución de 100 mM de APMA y se incubaron durante 6 horas a 37°C. A continuación, se transfirieron a una placa opaca de 96 pocillos. Finalmente, se añadió 1 μ l de una solución 1 μ g/ml del sustrato 5-FAM/QXL™520 y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Se midió la fluorescencia a 490 nm de excitación y 520 nm de emisión en un fluorímetro Víctor 2™ V 1420 *multilabel counter*.

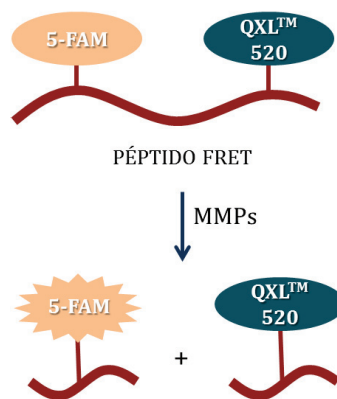


Figura 22. Rotura proteolítica de los péptidos FRET.

9. Análisis de la expresión génica

La expresión génica se estudió mediante la técnica de RT-qPCR. Esta técnica consta de una primera fase de transcripción inversa (RT), en la que se retrotranscribe el ARN, que previamente se ha extraído de la muestra, a ADN complementario (ADNc). Este ADNc se copiará en la fase de PCR cuantitativa, lo que permitirá, finalmente, cuantificar la cantidad de ARN presente en la muestra.

9.1. Extracción y cuantificación del ARN

Las células se sembraron en placas de Petri de 3,5 cm de diámetro a una densidad de 3×10^5 células/placa en los condrocitos y $2,5 \times 10^5$ células/placa en el caso de los osteoblastos. Cuando el cultivo estuvo cercano a la confluencia, se estimularon las células con los productos determinados de cada experimento, a diferentes tiempos. Posteriormente se lavaron las células con tampón PBS estéril y se extrajo el ARN total con la adición de 0,5 ml del reactivo TriPure (Roche Applied Science, Barcelona, España), según las instrucciones del fabricante. A continuación, con la ayuda de rascadores estériles planos, se lisaron las células. El lisado se transfirió a tubos *eppendorf* libres de ARN-asas y se añadieron 100 μ l de cloroformo para precipitar el ADN y las proteínas. Los tubos, con los lisados, se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y, posteriormente, se centrifugaron a $12000 \times g$ a 4°C . Se recogió el sobrenadante, que correspondía a la fase acuosa, y se le añadió el mismo volumen de isopropanol. La mezcla se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y a continuación, se centrifugó a $12000 \times g$, durante 10 minutos a 4°C . El ARN precipitado se lavó con etanol al 75% y se resuspendió en 30 μ l de agua libre en ARN-asas. La cuantificación del ARN se realizó midiendo la densidad óptica a 260 nm en un espectrofotómetro *GeneQuant* (GE Healthcare) con la utilización de capilares de cuarzo. Se consideró que un valor 1 de densidad óptica a esta longitud de onda, correspondía a una concentración de ARN de 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Para determinar la pureza de cada muestra se comprobó que la relación entre la densidad óptica a 260 nm y a 280 nm fue cercana a 2, lo que indica la ausencia de contaminación proteica.

9.2. Transcripción inversa (RT)

Para llevar a cabo esta reacción, en la que está implicada la enzima transcriptasa inversa, se empleó el kit comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche Applied Science). Para ello, a tubos eppendorf de 0,2 ml libres de ARNasas, se les añadió el volumen de las muestras correspondientes a 1 µg del ARN extraído en la fase anterior, 2 µl de *random hexamer primer* (cebador hexamérico aleatorio) (concentración final 60µM) y agua libre de ARNasas hasta un volumen final de 13 µl en cada muestra. Se añadieron 4 µl de tampón 5x específico de la retrotranscripción que contiene MgCl₂ (concentración final 8 mM de MgCl₂), 0,5 µl de inhibidor de las ARN-asas (concentración final 20U), 2 µl de una mezcla de deoxinucleótido (concentración 1 mM de cada uno) y finalmente, 0,5 µl de la enzima transcriptasa inversa (concentración final 10U).

Los tubos se introdujeron en un termociclador *iCycler Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad Laboratories, Madrid, España) y se inició la retrotranscripción con un ciclo de 10 minutos a 25°C seguido de un ciclo de 30 minutos a 55°C. Finalmente, se inactivó la enzima elevando la temperatura a 85° C durante 5 minutos. El ADNc se almacenó a -20°C para su posterior análisis.

9.3. PCR cuantitativa a tiempo real

Los ensayos de PCR se realizaron por duplicado en placas de 96 pocillos especiales para PCR usando el kit comercial SYBR Green PCR Master Mix (Bio-Rad Laboratories). Se añadieron 24 µl por pocillo de una mezcla que contenía SYBR Green 2x Supermix [100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8,4, 0,4mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 50 U/ml iTaqDNA polimerasa, 6 mM MgCl₂, 20 nM *SYBR green*, fluoresceína y agentes estabilizadores], cebadores sentido y antisentido del gen que se pretendía estudiar y agua libre de nucleasas.

Las secuencias de los cebadores empleados aparecen descritas en la bibliografía: MMP-3 y MMP-13 (Mietz y cols., 2003), COX-2 (Daouti y cols., 2005), mPGES-1 (Li y cols., 2005), (Wolff y cols., 2011), (Sawa y Tsuruga, 2008). La secuencia del gen de normalización β-actina en el trabajo de Thilakawardhana y cols., 2005. El resto de secuencias fueron registradas por SA Biosciences

Corporation (Tebu-Bio, Barcelona, España), por Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemania) y por Invitrogen (CA, EE.UU.).

Posteriormente, se le añadió 1 μ l/pocillo de ADNc obtenido en la transcripción inversa y se introdujo la placa en un termociclador *iCycler Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad Laboratories), donde se realizaron una serie de ciclos. La muestra, en un primer paso, se sometió a 95°C durante 10 minutos, activando la enzima ADN polimerasa, seguido de 36 ciclos que constan de una fase de desnaturalización del ADN de 15 segundos a 95°C, una fase de alineamiento en la que se consigue la hibridación del cebador con su secuencia complementaria de ADNc, de 45 segundos a 56°C, y una última fase de elongación en la que por acción de la ADN polimerasa se sintetiza el nuevo ADN, de 45 segundos a 72°C.

El análisis cuantitativo del producto se realizó mediante el análisis de la curva de amplificación, que consta de tres zonas o fases: fase de latencia, fase exponencial, donde la fluorescencia empieza a aumentar y fase de saturación, en la que tras varios ciclos la fluorescencia deja de aumentar y se estabiliza. De esta manera se calculó el ciclo umbral (Ct), que nos permite, mediante el método delta-delta Ct ($\Delta\Delta$ Ct) (Livak y Schmittgen, 2001), conocer el número de copias correspondientes al producto de la PCR. Para cada muestra se calcularon las diferencias en los valores de *threshold cycle* (Δ Ct) corrigiendo el Ct del gen de interés al Ct del gen de referencia β -actina. La expresión génica relativa se expresó como $2^{-\Delta\Delta$ Ct} respecto a las células no estimuladas.

10. Análisis de la expresión proteica

Las proteínas presentes en las células y en el medio de cultivo se estudiaron mediante las técnicas de Western-blot, ELISA, *array* de proteínas, inmunocitoquímica e inmunofluorescencia.

10.1. Extracción y cuantificación del contenido proteico

El análisis proteico se realizó empleando sobrenadantes celulares, donde se encuentran las proteínas liberadas al medio de cultivo, lisados celulares, que

contienen las proteínas celulares totales, y fracciones nucleares, con las proteínas que forman parte del núcleo. Previamente al análisis, se cuantificó el total de proteína en todos los tipos de muestra.

10.1.1. Obtención de sobrenadantes celulares y lisis total de las células

Los condrocitos y osteoblastos se sembraron en placas de 6 pocillos a 3×10^5 células/pocillo y $2,5 \times 10^5$ células/pocillo respectivamente, y se mantuvieron en crecimiento en un incubador celular hasta alcanzar un número de células cercano a la confluencia, momento en el que se estimularon las células. A continuación se recogieron los sobrenadantes obtenidos, conteniendo las proteínas solubles, se centrifugaron a $10000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C y se conservaron a -80°C hasta su utilización. Por otra parte, las células se lavaron tres veces con un tampón PBS estéril y, para obtener su lisis total, se añadieron $100\mu\text{l}$ de tampón de lisis (Tritón X-100 1%, ácido deoxicólico 1%, NaCl 20 mM y Tris 25 mM pH 7,4) a cada pocillo, y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se recogieron los lisados celulares empleando un rascador de células, se centrifugaron a $10000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C y se conservaron a -80°C para su posterior empleo en otras determinaciones.

10.1.2. Obtención de la fracción nuclear

Para el estudio de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, se extrajo la fracción proteica nuclear con la utilización del kit Nuclear Extract Kit (Active Motif, Carlsbad, CA, EE.UU.). Las células se sembraron en placas de 3,5 cm de diámetro, se cultivaron hasta la semiconfluencia y se estimularon de acuerdo a las condiciones experimentales. Pasado el tiempo de estímulo, se eliminaron los sobrenadantes y tras un lavado con tampón PBS conteniendo inhibidores de fosfatasa, las células se recogieron en 1,5 ml de esta misma solución y se transfirieron a tubos fríos. Las células se centrifugaron a $200 \times g$ durante 5 minutos a 4°C y, el pellet celular obtenido se resuspendió en un tampón hipotónico que debilita las membranas, se incubó 15 minutos en frío y se añadió un detergente. Se centrifugó durante 30 segundos a $14000 \times g$, lo que provoca la liberación de proteínas citosólicas al

sobrenadante. Se desechó la fracción citoplasmática y el pellet celular se resuspendió en un tampón de lisis suplementado con inhibidores de proteasas. Posteriormente, se incubaron durante 30 minutos en una plataforma oscilante para favorecer el lisado de los núcleos y la solubilización de las proteínas nucleares. Tras centrifugar estos lisados 10 minutos a 14000 x g, se recogieron las fracciones nucleares que se conservaron a -80°C hasta su utilización.

10.1.3. Cuantificación proteica

La concentración de proteína se determinó empleando el kit *DC protein assay* (Bio-Rad Laboratories) basado en el método de Lowry (Lowry y cols., 1951). Se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich) para establecer la curva estándar.

10.2. Western Blot

La técnica de Western Blot permite identificar proteínas específicas de una muestra que contiene una mezcla compleja de proteínas. Para ello, se separan las proteínas desnaturalizadas por electroforesis en un gel de acrilamida y bisacrilamida en función de su peso molecular y posteriormente, se transfieren a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). La especificidad de la técnica se logra mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo único de la proteína de interés adsorbida a la membrana. A continuación, se emplea un anticuerpo conjugado a un enzima que se une a ese primer anticuerpo y que nos permite visualizar la proteína en estudio al añadir un sustrato quimioluminiscente. De este modo se puede correlacionar de manera semicuantitativa la intensidad de la señal obtenida con la magnitud de la expresión proteica.

PROTOCOLO

Una vez obtenidos los lisados celulares y cuantificada la cantidad de proteína que contienen, se mezcló el volumen de lisado de cada variable conteniendo 20 µg de proteína con tampón de Laemmli 2x [154 mg de ditioneitol (DTT), 200 mg de

sodio dodecilsulfato (SDS), 0,8 ml de tampón Tris HCl 1M pH 6,8, 1 ml de glicerol, 0,2 ml de azul de bromofenol, hasta 5 ml de agua) con una relación de volúmenes 1:1. Finalmente, la mezcla se incubó durante 5 minutos a 90°C.

La separación de las proteínas por peso molecular se realizó mediante electroforesis húmeda utilizando geles de poliacrilamida al 12,5% conteniendo SDS (SDS-PAGE) en Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad Laboratories) y con tampón de electroforesis Tris-Glicina-SDS (25 mM Tris pH 8,3, 192 mM glicina y 0,1% SDS) a un voltaje de 140 V, con una fuente de alimentación de alta corriente PS2A200 (Hoefer, Holliston, MA, EE.UU.).

Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de PVDF (GE Healthcare) mediante un sistema de transferencia semiseco Hoefer TE 77 (Hoefer). Para ello se utilizó un tampón de transferencia (3 g/l de glicina, 0,6 g/l de trizma base y SDS al 0,01%) en el que se sumergieron tanto el gel como la membrana, que se mantuvieron durante 90 minutos fijando un amperaje constante de 125 mA en una fuente de alimentación de alta corriente Hoefer PS2A200 (Hoefer).

Las membranas con las proteínas adsorbidas en su superficie se bloquearon con leche en polvo al 3% (p/v) en tampón PBS pH 7; 0,1% Tween-20 durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras varios lavados con PBS-Tween se incubaron con los anticuerpos primarios (tabla 6) diluidos en PBS-Tween con BSA al 2%, durante toda la noche a 4°C. A continuación, se realizaron varios lavados y se incubaron las membranas con los anticuerpos secundarios correspondientes (tabla 7), diluidos en PBS-Tween con BSA, al 2%, y conjugados con peroxidasa durante 50 minutos a temperatura ambiente.

Las bandas de las proteínas se visualizaron mediante incubación con el reactivo quimioluminiscente ECL *Prime Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare) y empleando un transiluminador Autochemi™ System (UVP Inc., Upland, CA, EE.UU.), mediante el programa informático Labworks 4.6 (Ultra-Violet Products). La intensidad de las bandas obtenidas se determinó por densitometría utilizando el programa Image J (NCI, Bethesda, MD, EE.UU.). En el caso de las proteínas fosforiladas y no fosforiladas de ERK ½, JNK y p38 y en la proteína acetilada y no acetilada de p53, se utilizó la misma membrana, mediante el uso de

una solución de *stripping* (100 mM 2-mercaptoetanol, 22% SDS, 625 mM Tris-HCl a pH 6,7) que permite eliminar los anticuerpos primario y secundarios unidos a la membrana con el fin de poder volver a incubar con otros anticuerpos de similar peso molecular.

Anticuerpo	Dilución	Fabricante
ERK 1/2 total (policlonal)	1/ 750	Cell Signalling Technology Inc. (Beverly, MA, EE.UU.)
P-ERK 1/2 (policlonal)	1/1000	Cell Signalling Technology Inc.
JNK total (policlonal)	1/750	Cell Signalling Technology Inc.
P-JNK (policlonal)	1/1000	Cell Signalling Technology Inc.
p38 total (policlonal)	1/600	Cell Signalling Technology Inc.
P-p38 (policlonal)	1/750	Promega Corp. (Madison, WI, EE.UU.)
p53 (monoclonal)	1/750	Novus Biologicals (Littleton, CO, EE.UU.)
p53acetilado (policlonal)	1/750	Chemicon (Millipore Iberica, Madrid, Spain)

Tabla 6. Relación de anticuerpos primarios y condiciones de utilización.

Anticuerpo	Dilución	Fabricante
IgG conjugada con peroxidasa (monoclonal)	1/5000	Sigma-Aldrich
IgG conjugada con peroxidasa (policlonal)	1/5000	Dako (Copenhague, Dinamarca)

Tabla 7. Relación de anticuerpos secundarios y condiciones de utilización.

10.3. ELISA

La técnica de cuantificación de proteínas ELISA es un método inmunoenzimático que permite detectar inmunocomplejos empleando enzimas unidas a un antígeno o anticuerpo, uno de los cuales se encuentra adsorbido a un soporte sólido. En los kits ELISA utilizados hemos identificado antígenos presentes en sobrenadantes, lisados celulares y fracciones nucleares.

PROTOCOLO

La mayoría de los kits de ELISA se han realizado con sobrenadantes celulares. Sin embargo, en el caso de las proteínas p21 y Sirt-1 se emplearon lisados celulares. En el caso de la proteína p16, se lisaron las células por congelación-descongelación en tampón PBS. Con el fin de estudiar la unión al ADN de los factores de transcripción NF- κ B y el AP-1, se obtuvieron los extractos nucleares empleando el kit comercial Nuclear Extract Kit de Active Motif.

El protocolo de ELISA tipo sándwich se basa en incubar una placa de 96 pocillos con el anticuerpo de captura a 4°C, para que se adsorba a la superficie. Se añadieron las diluciones de la muestra patrón y las muestras a analizar y se incubaron durante el tiempo adecuado. Tras una serie de lavados con una solución PBS/Tween 0,1%, se incubó la placa con el anticuerpo primario de detección, que se unió a un epítipo diferente al de captura y, tras lavar nuevamente los pocillos, se incubó con el anticuerpo secundario marcado con estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HRP) y se unió al anticuerpo primario. Tras sucesivos lavados, se añadió una solución de tetrametilbenzidina (TMB). Este sustrato cromogénico es oxidado por la enzima dando lugar a la aparición de coloración

azul, pudiéndose medir la absorbancia a 620 nm. La adición de la solución de ácido sulfúrico 2N detiene la reacción y vira del color azul al amarillo (450 nm). La absorbancia se cuantificó empleando un espectrofotómetro Wallac 1420 VICTOR 2™ (Perkin Elmer). Los valores obtenidos se interpolaron en las rectas patrón.

Proteínas	Sensibilidad	Fabricante
AP-1	-	Active Motif
Caveolina-1	0,19 ng/ml	Elabscience (WuHan, China)
IL-6	2 pg/ml	eBioscience
IL-10	2 pg/ml	eBioscience
p16	2,24 ng/ml	YH Biosearch Laboratory (Shanghai, China)
p21	<5 pg/ml	Invitrogen
PGE₂	41.4 pg/ml	R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, EE.UU.)
SIRT-1	30 pg/ml	Abnova (Walnut, CA, EE.UU.)
TNF-α	4 pg/ml	eBioscience
MMP-3	0,008 ng/ml	eBioscience
MMP-13	0,18 ng/ml	eBioscience
NFκB	-	Active Motif

Tabla 8. Relación de kits de ELISA.

En el caso de los ELISAs competitivos se incubó la placa de 96 pocillos con el anticuerpo de captura y posteriormente, se añadieron las muestras. Al mismo tiempo se añadió la solución conteniendo el antígeno marcado con estreptavidina-HRP. Se incubó durante un tiempo determinado para permitir que se realizara la

unión antígeno-anticuerpo, y se añadió la solución conteniendo el antígeno marcado. Se mantuvo un tiempo en plataforma oscilante y se añadió una solución de TMB. La detección y cuantificación se realizó de la misma manera que en el ELISA tipo sándwich.

10.4. Radioinmunoensayo

La técnica de radioinmunoensayo (RIA del inglés *radioimmunoassay*) se empleó para determinar la cantidad de PGE₂ en sobrenadantes celulares de condrocitos y monocitos con el sustrato radiactivo [³H] PGE₂ (GE Healthcare). (Moroney y cols., 1988).

El RIA es un método radioinmunométrico basado en la competencia de unión a un anticuerpo específico entre la molécula a cuantificar y cantidades conocidas de la misma molécula marcada con un isótopo. Una vez realizada la unión antígeno-anticuerpo, se produce la precipitación con charcoal-dextrano de la fracción no unida, y se midió la radiactividad (emisión β) en cuentas por millón (cpm) de la fracción unida empleando un contador de centelleo beta.

PROTOCOLO

Los sobrenadantes y los patrones de una curva estándar de PGE₂ se pipetearon en tubos de ensayo de vidrio y se diluyeron con tampones específicos para RIA de PGE₂: tapón A1 [NaH₂PO₄ x 2H₂O 1,19 g/l, Na₂HPO₄ 4,6 g/l, BSA 0,1% y azida sódica 0,1%] y tampón B1 (tampón A1 con 9 g/l de NaCl). A continuación se añadió el anticuerpo anti-PGE₂ (Sigma-Aldrich) y la PGE₂ tritiada. Se agitaron los tubos y se incubaron durante 18 horas a 4°C. Transcurrido ese tiempo se añadió una suspensión de carbón activo-dextrano, se agitaron los tubos y se incubaron durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, se centrifugaron los tubos a 1000 x g durante 15 minutos a 4°C, de manera que precipitó la [³H]PGE₂ que no se ha unido al anticuerpo. Finalmente, se transfirió el sobrenadante obtenido, donde se encuentran los inmunocomplejos, a unos viales a los que previamente se había añadido líquido de centelleo Optiphase "Supermix" (Perkin Elmer) y se determinó la concentración de [³H]PGE₂ unida al anticuerpo utilizando el contador de centelleo Microbeta Trilux (Wallac, Turku, Finlandia). Para conocer la

concentración de PGE₂ presente en las muestras, se interpolaron las medidas de cpm en la curva estándar de PGE₂.

10.5. Array de proteínas

Los *arrays* de anticuerpos permiten determinar la presencia de un gran número de proteínas de una muestra biológica mediante inmunoensayos tipo sándwich.

Con la finalidad de detectar las proteínas contenidas en el MA empleado como tratamiento en cultivos primarios de condrocitos y monocitos, se utilizó *RayBio® Human Cytokine Antibody Array 6* (RayBiotech). Cada membrana tenía adsorbidos anticuerpos de captura que reconocen 60 proteínas. Este array reconoce: angiogenina, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), BLC/CXCL-13, proteína morfogénica de hueso (BMP)-4, BMP-6, CCL23, factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), Eotaxina-1, Eotaxina-2, Eotaxina-3, factor de crecimiento fibroblástico (FGF)-6, FGF-7, ligando de la tirosin kinasa relacionada con fms (Flt)-3, Fractalkina, GCP-2/CXCL-6, factor neurotrófico derivado de la línea glial (GDNF), factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), I-309, interferón (IFN)-gamma, proteína de unión al factor de crecimiento similar a insulina (IGFBP)-1, IGFBP-2, IGFBP-4, IGF-1, Interleucina (IL)-10, IL-13, IL-15, IL-16, IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, Leptina, LIGHT, MCP-1/CCL2, proteína quimioatrayente de monocitos humanos (MCP)-2/CCL8, MCP-3/CCL7, MCP-4/CCL13, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), quimiocina derivada de macrófagos (MDC), inmunoglobulina de membrana de linfocito B (MIG), proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1- δ /CCL3, MIP-3- α /CCL20, proteína activadora de neutrófilos (NAP)-2, neurotrofina (NT)-3, PARC/CCL18, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)BB, RANTES/CCL5, factor de células madre (SCF), factor derivado de células estromales (SDF)-1 α , TARC/CCL17, TGF- β 1, TGF- β 3, TNF- α y TNF- β .

PROTOCOLO

El primer paso consistió en incubar la membrana con una solución de bloqueo durante 30 minutos, se eliminó la solución de bloqueo y se añadió 1 ml de muestra a cada membrana. Se incubaron las membranas durante 2 horas a temperatura ambiente y se lavaron con Tween 0,1% en tampón PBS en agitación y se añadió la mezcla de anticuerpos anti-citocinas conjugados con biotina que se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron y se les añadió estreptavidina-HRP, durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas se lavaron y se les añadió la solución de detección que permitió medir la quimioluminiscencia a los 2 minutos, empleando un transiluminador Autochemi™ System (UVP Inc.), usando el programa informático Labworks 4.6 (UVP Inc.).

10.6. Análisis inmunocitoquímico

La inmunocitoquímica se basa en la utilización de anticuerpos que se unen específicamente a la proteína que se quiere identificar. La detección se lleva a cabo empleando anticuerpos asociados a enzimas que catalizan una reacción cromogénica.

PROTOCOLO

Para los estudios inmunocitoquímicos las células se sembraron en microcámaras de 8 pocillos Lab-tek (Thermo Scientific) a una concentración de 2×10^5 células/pocillo en monocitos, de 2×10^4 células/pocillo en condrocitos y 10^4 células/pocillo en osteoblastos. Cuando las células alcanzaron un 80% de la confluencia, se estimularon a diferentes tiempos.

10.6.1. Colágeno II

Transcurrido el tiempo de estímulo, se eliminaron los sobrenadantes y se fijaron las células con glutaraldehído al 2,5% en tampón PBS durante 30 minutos a 4°C y se detectó el colágeno II empleando el kit comercial de tinción de colágeno de tipo II de BD Biosciences. Se empleó el cromógeno diaminobencidina (DAB)

(Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.). Posteriormente, las células se tiñeron con hematoxilina/ eosina para permitir contar el número total de células y, finalmente, se le añadió líquido de montaje acuoso (Sigma-Aldrich). Las células colágeno II positivas se observaron con un microscopio Leica DM IL LED (Leica Microsystems) y se fotografiaron con una cámara Leica DFC450 C Digital Microscope Camera empleando el software Leica Application Suite. Para cuantificar las células teñidas, se empleó el software Image J usando el complemento Cell counter.

10.6.2. COX-2

En el análisis inmunocitoquímico para el estudio de la COX-2 las células se fijaron con para-formaldehído al 4% en PBS durante 15 minutos, una vez finalizado el tiempo de estímulo. Posteriormente, tras varios lavados con tampón PBS, se añadió una solución de bloqueo que fue una dilución al 5% de SBF en tampón PBS, y se mantuvo durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo frente a COX-2 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EE.UU.) durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron varias veces con tampón PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo-HRP (Dako), durante 2 horas. Finalmente, se realizaron varios lavados con tampón PBS y se incubaron con DAB (Vector). Se utilizó líquido de montaje ProLong® Gold con 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Molecular Probes; Invitrogen) para cuantificar los núcleos celulares. Las muestras se observaron bajo un microscopio Leica DM IL LED (Leica Microsystems) y se fotografiaron con una cámara Leica DFC450 C Digital Microscope Camera empleando el software Leica Application Suite. Para cuantificar las células teñidas, se empleó el software Image J usando el complemento Cell counter.

10.7. Análisis inmunofluorescente

Para el análisis inmunofluorescente se sembraron las células a la misma densidad que en el análisis inmunocitoquímico. La diferencia con la

inmunocitoquímica es que en la inmunofluorescencia se utilizan anticuerpos asociados a fluorocromos que se unen específicamente a la proteína que se quiere identificar.

10.7.1. Colágeno II

Una vez finalizado el tiempo de estímulo, se eliminaron los sobrenadantes, se fijaron las células con glutaraldehído al 2,5% en tampón PBS durante 30 minutos a 4°C y se incubaron con el anticuerpo policlonal colágeno tipo II (Chemicon/Millipore, Schwalbach, Germany). Tras varios lavados, los condrocitos se incubaron con el anticuerpo secundario inmunoglobulina (Ig)G-FITC (R&D Biosystems, Abingdon, UK). Posteriormente, se lavó la muestra 3 veces con tampón PBS. Se eliminó el tampón PBS y se añadió líquido de montaje ProLong® Gold antifade reagent with DAPI (Molecular Probes; Invitrogen). Las células colágeno II positivas se observaron con un microscopio de fluorescencia Leica DM IL LED (Leica Microsystems) y se fotografiaron con una cámara Leica DFC450 C Digital Microscope Camera empleando el software Leica Application Suite. Para cuantificar las células teñidas, se empleó el software Image J usando el complemento Cell counter.

10.7.2. γ H2A.X

Al finalizar el tiempo de estímulo, se fijaron las células con paraformaldehído al 4% en tampón PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras varios lavados con tampón PBS se añadió una solución con suero de cabra al 5% y tritón X-100 al 0,3% en tampón PBS durante 60 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, las células se incubaron con una dilución 1:400 del anticuerpo primario monoclonal histona H2A.X fosforilada (Ser139) (Cell Signalling Technology Inc.) en tampón PBS con 1% en BSA y con 0,3% en Tritón X-100 durante toda la noche a 4°C. Pasado este tiempo se lavaron 3 veces con tampón PBS y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad con una dilución 1:4000 del anticuerpo secundario IgG-Alexa Fluor® 546 (H+L) (Thermo Scientific) diluido en tampón PBS. Posteriormente, tras lavar la muestra 3

veces con tampón PBS, se eliminó el tampón PBS y se añadió líquido de montaje ProLong® Gold con DAPI (Molecular Probes; Invitrogen). Se fotografiaron las muestras con un microscopio de fluorescencia Leica DM IL LED (Leica Microsystems) y el microscopio confocal FV1000 Olympus (Tokio, Japón).

10.7.3. F-actina

Para el marcaje de la F-actina, transcurrido el tiempo de estímulo, se fijaron las células con para-formaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con tampón PBS y se bloqueó la placa con tampón PBS con 1% en BSA durante 20 minutos. Tras varios lavados con tampón PBS se añadieron 5 µl de la solución de faloidina Alexa Fluor 488 (Molecular Probes; Invitrogen) a la placa y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente la muestra se lavó 3 veces con tampón PBS y se añadió líquido de montaje ProLong® Gold con DAPI (Molecular Probes; Invitrogen). Se fotografiaron las muestras con el microscopio de fluorescencia Leica DM IL LED (Leica Microsystems) y el microscopio confocal Olympus FV1000.

11. Estudio de la actividad β-galactosidasa

Las células senescentes muestran un aumento en la expresión de SA-β-gal, que se puede detectar a pH 6.0. La enzima β-galactosidasa cataliza la hidrólisis de X-gal, lo que produce una coloración azul. El ensayo se realizó con el kit comercial *Cellular Senescence Assay Kit* (Cell Biolabs, Inc San Diego, CA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

PROTOCOLO

Las células se sembraron en microcámaras de 8 pocillos Lab-tek (Thermo Scientific) a una densidad en el caso de los condrocitos de 2×10^4 células/pocillo y 10^4 células/pocillo en osteoblastos. Cuando las células alcanzaron un 80% de la confluencia, se eliminaron los sobrenadantes y se lavaron con tampón PBS. Posteriormente se añadieron 400 µl por pocillo de una solución de fijación de glutaraldehído al 0,25% y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se retiró la solución de fijación y se lavaron los pocillos

con tampón PBS. Finalmente, se añadieron 400 µl por pocillo de la solución de tinción y se mantuvo durante toda la noche, en oscuridad, a 37°C. Pasado ese tiempo, se retiró la solución de tinción y se lavaron los pocillos, en los que se observaron zonas azuladas que corresponden a la actividad de la enzima β-galactosidasa. Las células senescentes teñidas de azul se observaron con un microscopio Leica DM IL LED (Leica Microsystems) y se fotografiaron con una cámara Leica DFC450 C Digital Microscope Camera empleando el software Leica Application Suite. Para cuantificar las células con SA-β-Gal, se empleó el software Image J usando el complemento Cell counter.

12. Estudio de mineralización ósea

El estudio de la mineralización ósea producida por los osteoblastos cultivados, se realizó empleando el colorante rojo alizarina, que tiñe los depósitos de calcio de color rojo.

PROTOCOLO

Los osteoblastos se sembraron en placas de 24 pocillos a razón de 4×10^4 células/pocillo con medio osteoblástico y posteriormente se mantuvieron con medio de mineralización (Promocell) durante 14 días, cambiando este medio cada 3 días. Los productos y estímulos se añadieron con el medio de mineralización, realizando así los re-estímulos cada 3 días. Posteriormente, se eliminaron los sobrenadantes y se realizaron varios lavados con tampón PBS. Las células se fijaron con para-formaldehído al 10% durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron varios lavados con agua destilada y se añadieron 400 µl de rojo alizarina (Chemicon/Millipore) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron con agua destilada y se fotografiaron las células teñidas con un microscopio Leica DM IL LED (Leica Microsystems) y una cámara Leica DFC450 C Digital Microscope Camera empleando el software Leica Application Suite.

Para cuantificar la tinción de rojo alizarina presente en la placa, se añadieron 400 µl de ácido acético al 1% a cada pocillo y se incubó la placa 30 minutos con agitación. Con un rascador celular se despegó la monocapa de células adheridas y

las células se transfirieron a tubos de 15 ml, manteniéndose a 85°C durante 10 minutos. Posteriormente, los tubos se incubaron en hielo durante 5 minutos y finalmente, se centrifugaron a 2000 x g durante 15 minutos. Se añadieron 150 µl de hidróxido de amonio 10x a 400 µl del sobrenadante. Se pipetearon 150 µl que se trasvasaron a una placa de 96 pocillos y se leyó la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro Wallac 1420 VICTOR 2™ (Perkin Elmer). Los valores obtenidos se interpolaron en la recta patrón.

13. Ensayo de migración-quimiotaxis

El ensayo de migración-quimiotaxis se basa en la capacidad de migración de las células de un compartimento a otro a través de una membrana porosa (figura 23). Este ensayo se realizó con el fin de determinar los cambios en la capacidad quimiotáctica de los monocitos en función de los diferentes estímulos y productos utilizados.

PROTOCOLO

El ensayo se llevó a cabo en placas de cultivo de 6 pocillos a las que se les añaden unos insertos porosos con poros de un diámetro de 8 µm (Thermo Scientific), de modo que se crean dos compartimentos por cada pocillo, uno superior y otro inferior. Se sembraron 10⁶ células en 1 ml de medio DMEM/HAM F12, suplementado con suero humano al 10% o en MA, en la membrana del inserto. En la parte inferior se añadió 1,5 ml de medio DMEM/HAM F12 con 10% de suero humano o MA, en presencia o ausencia de la quimiocina CCL2, a dos concentraciones diferentes: 50 ng/ml y 100 ng/ml. Las células en cultivo se mantuvieron en el incubador celular a 37°C con una atmósfera controlada al 5% de CO₂ y 95% de humedad, durante 72 horas. Transcurrido este tiempo, se separaron los insertos y tras varios lavados con tampón PBS se observaron las células con un microscopio Leica DM IL LED (Leica Microsystems), y se fotografiaron con una cámara Leica DFC450 C Digital Microscope Camera empleando el software Leica Application Suite. Para cuantificar las células se empleó el software Image J usando el complemento Cell counter.

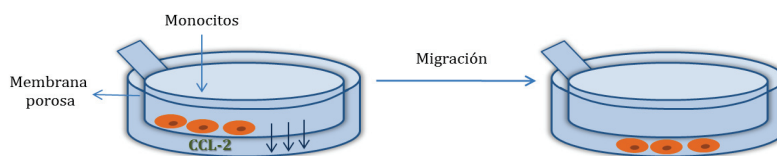


Figura 23. Migración celular a través de los insertos porosos.

14. Fagocitosis

Para determinar la capacidad fagocítica de los monocitos/macrófagos en diferentes condiciones de experimentación, se emplearon unas partículas fluorescentes (fluorosferas) que las células son capaces de incorporar a su citoplasma.

PROTOCOLO

Los monocitos se sembraron en placas de 6 pocillos, 10^6 células por pocillo y se trataron durante 24 horas con MA y se incubaron durante 3 horas a dos concentraciones (10^7 y 5×10^7 fluoroesferas/ml) de FluoSpheres® (Molecular Probes; Invitrogen). Como control se emplearon células a las que no se les añadieron fluoroesferas. Transcurrido ese tiempo, las células se lavaron varias veces con tampón PBS y se despegaron con una solución tripsina/EDTA (1 mM) al 0,25%. Finalmente, se distribuyeron en tubos de citometría con un mínimo de 10^6 células por tubo resuspendidas en 1 ml de tampón PBS.

Para el estudio de fagocitosis por microscopía confocal se sembraron los monocitos a razón de $1,2 \times 10^5$ células/pocillo en microcámaras de 8 pocillos Labtek (Thermo Scientific) y se incubaron con fluoroesferas como se ha descrito para el estudio citométrico. Posteriormente, la muestra se lavó 3 veces con tampón PBS y se añadió líquido de montaje ProLong® Gold con DAPI (Molecular Probes; Invitrogen). Se fotografiaron las muestras con el microscopio confocal Olympus FV1000.

15. Análisis estadístico y expresión de resultados

El estudio estadístico comparativo se realizó empleando el método ANOVA simple de una vía seguido del método de Bonferroni (1936). Para ello se ha utilizado el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Un valor de P menor de 0,05 indica que existen diferencias significativas. Se utilizó el símbolo (+) para representar la significatividad estadística respecto a las células no estimuladas ($+P<0,05$, $++P<0,01$); el símbolo (*) respecto a las células estimuladas con IL-1 β ($*P<0,05$, $**P<0,01$); el símbolo (#) se utilizó respecto a las células del grupo correspondiente a las células incubadas durante 24 horas en los experimentos con condrocitos frente a sus respectivos controles ($#P<0,05$, $##P<0,01$).

RESULTADOS

1. Estudio del MA de las ASCs

Las MSCs tienen una gran importancia en medicina regenerativa, y se ha descrito que muchos de sus efectos están mediados por los factores solubles que liberan al medio extracelular. Por ello, se ha sugerido que la administración directa de estos mediadores podría reemplazar, en algunas circunstancias, el uso de las propias células (Lavoie y Rosu-Myles, 2013; Prockop y Oh, 2012).

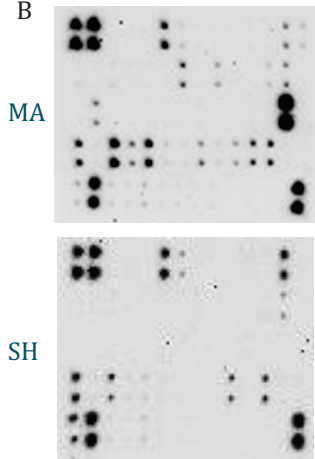
En la bibliografía se recogen múltiples estudios que analizan el contenido del MA de las ASCs. Sin embargo, estos trabajos difieren significativamente en el método de preparación y análisis. Además, muchos de ellos utilizan estímulos proinflamatorios o de diferenciación celular para estudiar las modificaciones que se producen en el secretoma de las células en diferentes condiciones (Kapur y Katz, 2013). Debido a la falta de uniformidad en estos estudios, hemos caracterizado de forma preliminar la composición del MA empleado en nuestro trabajo. Para ello, se utilizó un *array* de proteínas con el fin de determinar la presencia o ausencia de determinados péptidos en el MA, procedente de cultivos de ASCs de individuos sanos en ausencia de estímulo. Como muestra la figura 24, se analizó el contenido del MA de las ASCs, y como control se utilizó medio de cultivo suplementado con un 10% de suero humano.

Los *arrays* indican que varios factores están presentes únicamente en el MA, y no en el medio control. Este es el caso de los factores de crecimiento GCP-2 y GM-CSF, de las citocinas IL-6 e IL-10 y de las quimiocinas eotaxina-1, MCP-2, MCP-3, MDC y MIP-3 α . La quimiocina MCP-1 se detectó en el MA en mayor concentración que en el medio control, mientras que los factores de crecimiento BDNF, EGF y PDGF-B, así como las quimiocinas MIP-1 δ y RANTES, disminuyeron considerablemente en el MA respecto al control. Por otro lado, algunas proteínas como angiogenina, leptina, IGFBP-1 y la quimiocina NAP-2 se detectaron en niveles similares en ambos medios. En estos ensayos no se detectaron, en ninguno de los medios, los factores BLC, BMP-4, BMP-6, CCL23, CNTF, eotaxina-2, eotaxina-3, FGF-6, FGF-7, ligando de Flt-3, fractalquina, GDNF, I-309, IFN- γ , IGFBP-4, IGF-1, IL-13, IL-15, IL-16, IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, LIGHT, MCP-4, M-CSF, MIG, NT-3, PARC, SCF, SDF-1 α , TARC, TGF- β 1, TGF- β 2, TNF- α y TNF- β .

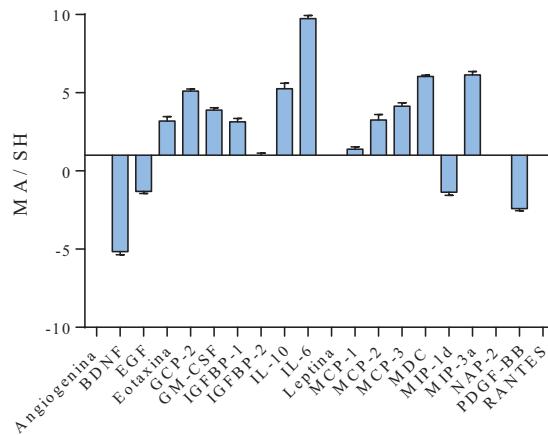
A

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	POS	POS	NEG	NEG	BLANK	ANG	BDNF	BLC	BMP 4	BMP 6	CCL23	CNTF	EGF	Eotaxin 1
2	POS	POS	NEG	NEG	BLANK	ANG	BDNF	BLC	BMP 4	BMP 6	CCL23	CNTF	EGF	Eotaxin 1
3	Eotaxin 2	Eotaxin 3	FGF-6	FGF-7	Flt-3 Ligand	Fractalkine	GCP-2	GDNF	GM CSF	I-309	IFN gamma	IGFBP 1	IGFBP 2	IGFBP 4
4	Eotaxin 2	Eotaxin 3	FGF-6	FGF-7	Flt-3 Ligand	Fractalkine	GCP-2	GDNF	GM CSF	I-309	IFN gamma	IGFBP 1	IGFBP 2	IGFBP 4
5	IGF-1	IL-10	IL-13	IL-15	IL-16	IL-1 alpha	IL-1 beta	IL-1ra	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7
6	IGF-1	IL-10	IL-13	IL-15	IL-16	IL-1 alpha	IL-1 beta	IL-1ra	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7
7	Leptin	LIGHT	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCP-4	M-CSF	MDC	MIG	MIP-1 delta	MIP-3 alpha	NAP-2	NT-3	PARC
8	Leptin	LIGHT	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCP-4	M-CSF	MDC	MIG	MIP-1 delta	MIP-3 alpha	NAP-2	NT-3	PARC
9	PDGF BB	RANTES	SCF	SDF-1 alpha	TARC	TGF beta 1	TGF beta 3	TNF alpha	TNF beta	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	POS
10	PDGF BB	RANTES	SCF	SDF-1 alpha	TARC	TGF beta 1	TGF beta 3	TNF alpha	TNF beta	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	POS

B



C



D

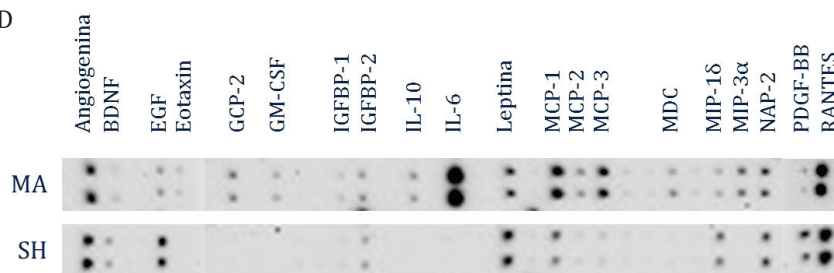


Figura 24. Proteínas secretadas por las ASCs. A. Esquema de los arrays. B. Detección de proteínas en una membrana incubada con MA o con medio suplementado con suero humano (SH). C. La expresión relativa de las bandas de proteína del MA y SH se calculó tras un análisis densitométrico. D. Resumen de las imágenes de puntos dobles positivos de cada membrana, alineados para mayor claridad visual. Imágenes representativas de 3 experimentos. POS: control positivo. NEG: control negativo. BLANK: blanco.

Diferentes estudios han señalado la posible implicación de las vesículas extracelulares en los efectos paracrinos de las ASCs. Por esta razón, se determinó la presencia o ausencia de los diferentes tipos de vesículas (cuerpos apoptóticos, microvesículas y exosomas), así como su concentración, en el MA de las ASCs que hemos empleado en este trabajo.

Como se observa en la figura 25, el MA de las ASCs tiene una concentración de $1,4 \times 10^9$ microvesículas/ml, con un diámetro medio de 400 nm. En el caso de los exosomas, la concentración detectada fue de 4×10^{10} /ml, con un diámetro medio de 130 nm. Además, se realizó el mismo estudio con la fracción de cuerpos apoptóticos, pero en este caso, la cantidad obtenida fue demasiado baja para poder ser detectada.

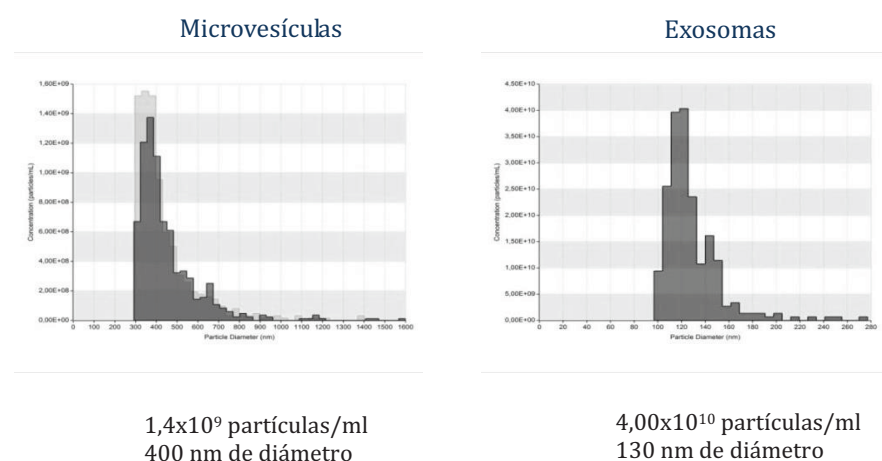


Figura 25. Vesículas extracelulares secretadas por las ASCs. Análisis por qNANO de la concentración y el tamaño de las microvesículas y exosomas aislados del MA de ASCs.

La citometría de flujo es un método de detección de microvesículas ampliamente utilizado. Sin embargo, hay que considerar que tiene ciertas limitaciones, ya que la citometría estándar detecta tamaños de partícula de aproximadamente 200 nm, por lo que los exosomas y las microvesículas de menor tamaño no pueden analizarse directamente por este método. La caracterización de las microvesículas se realizó con los marcadores CD63 y anexina V mediante dilución secuencial con detergente (figura 26). Se analizaron únicamente las

microvesículas, ya que no se obtuvo una cantidad suficiente de cuerpos apoptóticos en el aislamiento para realizar esta técnica, y el tamaño de los exosomas es inferior al límite de detección del citómetro.

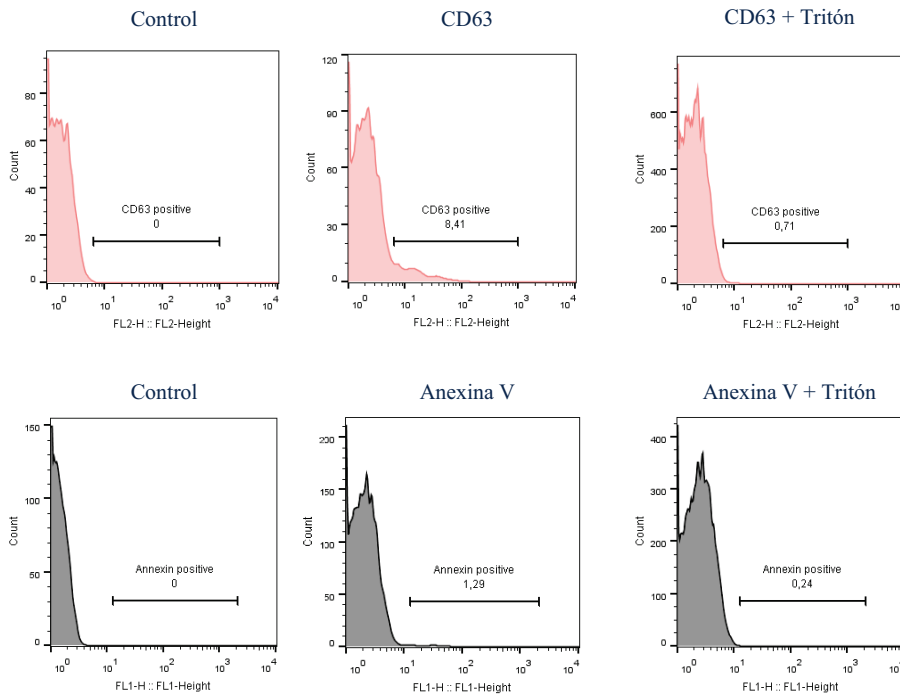


Figura 26. Imágenes representativas de un análisis de microvesículas por citometría de flujo.

El marcaje con anti-CD63-PE reveló que un 8,41% de los eventos eran positivos, mientras que solo un 0,71% se mantuvieron tras la rotura de las microvesículas con tritón, por lo que 7,7% de los eventos detectados correspondían a microvesículas que expresaban CD63. En el caso del marcaje con anexina V-FITC, se obtuvieron 1,29% de eventos positivos, y tras la adición de Tritón, 1,05% se consideraron microvesículas anexina V positivas.

2. Efectos del MA de las ASCs sobre el estrés oxidativo y la inflamación en monocitos y macrófagos humanos

En ensayos previos al estudio del MA de las ASCs sobre células articulares osteoartríticas, hemos determinado los posibles efectos en la respuesta al estrés oxidativo y la inflamación en cultivos de monocitos y macrófagos, células que juegan un importante papel en la respuesta inflamatoria. Además, se caracterizaron los efectos del MA sobre la migración celular de los monocitos y la capacidad fagocítica en macrófagos.

Como estímulo se empleó LPS, principal componente de la superficie externa de bacterias Gram negativas y un potente activador de monocitos y macrófagos. El reconocimiento del LPS ocurre tras una serie de interacciones con diferentes proteínas, incluyendo LBP (proteína de unión al LPS), CD14, MD-2 y TLR4 (receptor de tipo Toll 4). LBP es una proteína que se une directamente al LPS, facilitando su unión a CD14. Esta unión permite el reconocimiento de LPS por el complejo receptor TLR4/MD-2, que a través de diferentes vías de señalización puede activar los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, activando la transcripción de genes implicados en procesos inflamatorios y catabólicos (Lu y cols., 2008).

2.1. Efectos del MA sobre la viabilidad celular

Para determinar si el tratamiento de los cultivos primarios de monocitos con LPS, MA o su combinación afectaban a la viabilidad celular, se empleó el método de MTT.

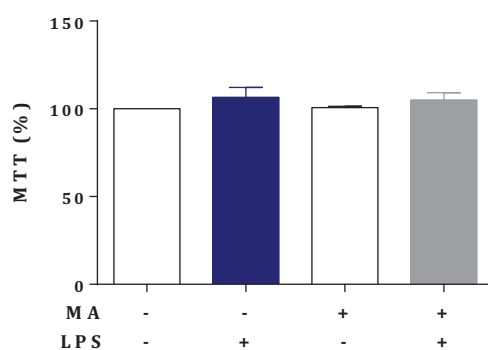


Figura 27. Efectos del MA sobre la viabilidad celular en monocitos. Las células se incubaron durante 24 horas en presencia o ausencia de LPS y/o MA. Los resultados se expresan como porcentaje respecto a las células no estimuladas. Resultados expresados como media \pm σ de cultivos independientes procedentes de 3 pacientes.

Como se muestra en la figura 27, no se observaron variaciones del porcentaje de viabilidad en los cultivos de monocitos estimulados con LPS, con MA o con ambos, respecto a las células sin tratar.

2.2. Efectos del MA sobre el estrés oxidativo

Para comprobar los efectos del LPS y del tratamiento con MA sobre el estrés oxidativo en los cultivos de monocitos, se midió la fluorescencia emitida tras la oxidación de la molécula DHR.

La producción de ROS es una de las primeras respuestas celulares que ocurren tras el reconocimiento de un patógeno (Torres y cols., 2006), por eso los cultivos de monocitos se trataron durante 24 horas con MA, pero se estimularon durante un tiempo corto con LPS, los últimos 30 minutos de tratamiento.

Tras la unión del LPS al receptor TLR4, este interacciona directamente con la NADPH-oxidasa 4 (Nox4), lo que promueve la generación de ROS (Park y cols., 2004a). En la figura 28, se observa que, en nuestros ensayos, el estímulo de los cultivos de monocitos con LPS disparó la generación de ROS, como era de esperar. Este efecto se contrarrestó tras el tratamiento con MA, ya que se detectó una disminución significativa en la producción de ROS respecto a las células estimuladas únicamente con LPS.

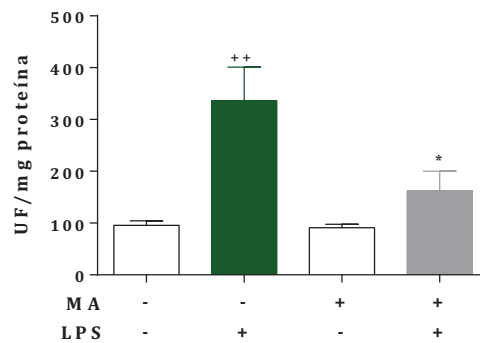


Fig. 28. Efectos del medio acondicionado sobre el estrés oxidativo en monocitos. Los niveles de ROS se expresan en UF/mg de proteína en células incubadas durante 24 horas en presencia o ausencia de MA y/o durante 30 minutos con LPS. Resultados expresados como media \pm σ de cultivos independientes procedentes de 6 pacientes. **P < 0,01 respecto a las células no estimuladas; *P < 0,05 respecto a las células estimuladas con LPS. UF: Unidades de Fluorescencia.

2.3. Efectos del MA sobre el potencial de membrana mitocondrial

Los cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) se observaron como cambios en la fluorescencia emitida en monocitos marcados con el fluorocromo JC-1, empleando la técnica de citometría de flujo. El color emitido por JC-1, tras su excitación con un láser de 488 nm, cambia reversiblemente de naranja a verde cuando se produce la despolarización mitocondrial.

Como se observa en la figura 29, tras el estímulo con LPS durante 30 minutos, el porcentaje de células con un bajo $\Delta\Psi_m$ aumentó respecto a los cultivos en estado basal. El tratamiento con el MA durante 24 horas, disminuyó significativamente el número de células con bajo $\Delta\Psi_m$, respecto a las células estimuladas únicamente con LPS.

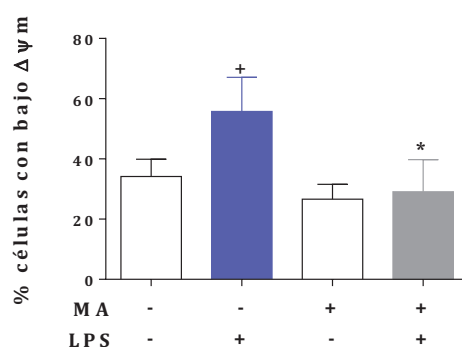


Figura 29. Efectos del MA sobre el potencial de membrana mitocondrial en monocitos. Los cambios en el $\Delta\Psi_m$ se determinaron en células incubadas durante 24 horas en presencia o ausencia de MA y/o estimuladas durante 30 minutos con LPS. Resultados expresados como media $\pm \sigma$ de cultivos independientes procedentes de 3 pacientes. FITC: isotiocianato de fluoresceína. PE: ficoeritrina.

2.4. Efectos del MA sobre la producción de nitrito

El NO reacciona con el anión superóxido formando peroxinitrito (ONOO^-), una especie reactiva de nitrógeno, que junto con las ROS contribuye al aumento del estrés celular con reacciones de oxidación, nitración o nitrosación, provocando alteraciones a nivel celular y generando toxicidad (Liaudet y cols., 2000).

El estímulo con LPS durante 24 horas provocó un incremento significativo de la producción de NO, medido como nitrito, en monocitos humanos, tal y como se muestra en la figura 30. En las células estimuladas con LPS e incubadas con MA durante 24 horas, se produjo una reducción significativa de NO que en las células estimuladas únicamente con LPS.

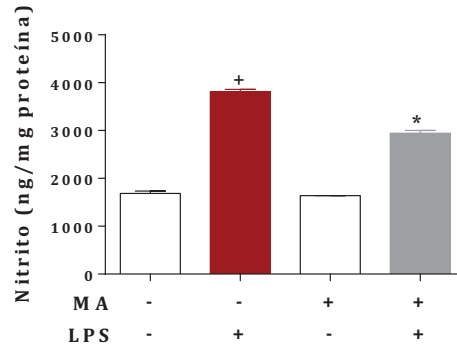


Figura 30. Efectos del MA sobre la producción de nitrito. Los niveles de nitrito se expresan como ng/mg de proteína en células incubadas durante 24 horas en presencia o ausencia de LPS y/o MA. Resultados expresados como media \pm σ de cultivos independientes procedentes de 4 pacientes. ⁺P < 0,05 respecto a las células no estimuladas; ^{*}P < 0,05 respecto a las células estimuladas con LPS.

2.5. Efectos del MA sobre la producción de PGE₂

Con el fin de conocer los efectos del MA sobre la producción de PGE₂ en los cultivos primarios de monocitos, se empleó la técnica de RIA. La exposición de los monocitos a LPS produce un aumento de liberación de PGE₂ por estas células (Schade y Rietschel, 1982).

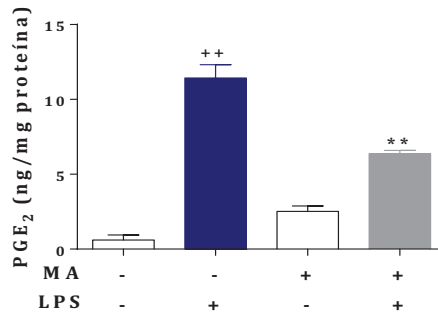


Figura 31. Efectos del MA sobre la producción de PGE₂ en monocitos. Los niveles de PGE₂, medidos por RIA, se expresan como ng/mg de proteína en células incubadas durante 24 horas en presencia o ausencia de LPS y/o MA. Resultados expresados como media \pm σ de cultivos independientes procedentes de 6 pacientes. ⁺⁺P < 0,01 respecto a las células no estimuladas; ^{**}P < 0,01 respecto a las células estimuladas con LPS.

Como se muestra en la figura 31, los niveles de PGE₂ aumentaron considerablemente tras el estímulo de los monocitos con LPS durante 24 horas respecto a las células sin estimular. Esta sobreproducción de PGE₂ se vio reducida significativamente en células estimuladas con LPS y tratadas con el MA.

2.6. Efectos del MA sobre la migración celular

En condiciones inflamatorias se secretan una gran cantidad de quimiocinas que, al ser reconocidas por los monocitos, direccionan la migración de estas células hacia los tejidos donde éstas se encuentran en mayor concentración (Deshmane y cols., 2009). Para conocer la posible modulación de la migración celular de los monocitos en cultivo primario por parte del MA, se realizó un ensayo quimiotáctico en placas *transwell*, en presencia o ausencia de MA y/o de la quimiocina CCL2/MCP-1 durante 24 horas. Los resultados muestran que el estímulo con CCL2 incrementó la migración de los monocitos con respecto a las células basales a las dos concentraciones de quimiocina ensayadas, 50 y 100 ng/ml. Sin embargo, en ambos casos, la migración celular disminuyó significativamente en las células tratadas con MA en presencia de la quimiocina (figura 32).

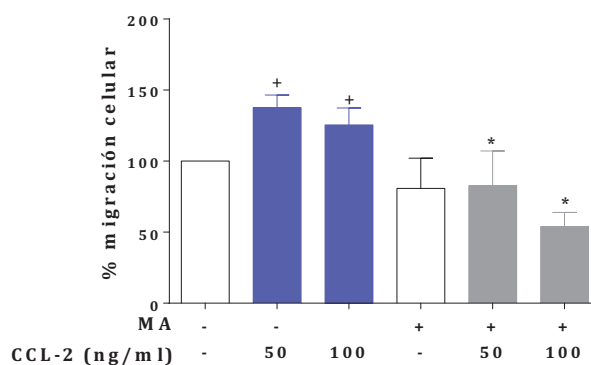


Figura 32. Efectos del MA sobre la migración celular en monocitos. El porcentaje de migración celular se determinó empleando insertos en las placas de cultivo en los que se incubaron las células en presencia o ausencia de MA y/o CCL2. Resultados expresados como media \pm σ de cultivos independientes procedentes de 4 pacientes. *P < 0,05 respecto a las células no estimuladas; *P < 0,05 respecto a las células estimuladas con la concentración correspondiente de CCL2.

2.7. Efectos del MA sobre la fagocitosis

Una de las principales características de los macrófagos es su capacidad de fagocitar los cuerpos extraños que se introducen en el organismo (Geissmann y cols., 2010). Se estudió el efecto del MA sobre la capacidad fagocítica de macrófagos empleando la técnica de citometría de flujo y la microscopía confocal.

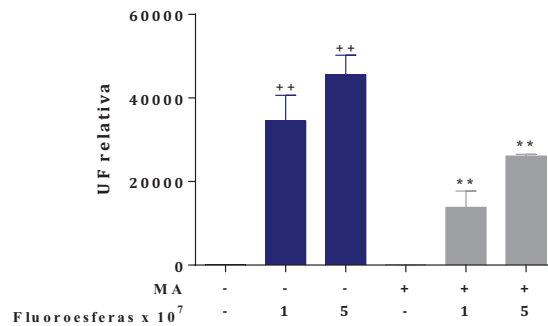


Figura 33. Efectos del MA sobre la fagocitosis en macrófagos. La capacidad fagocítica se determinó empleando la técnica de citometría de flujo en células incubadas en presencia o ausencia de MA y fluoroesferas. Resultados expresados como media $\pm \sigma$ de cultivos independientes procedentes de 4 pacientes. **P < 0,01 respecto a las células sin fluoroesferas; **P < 0,01 respecto a las células no tratadas con MA. UF: Unidades de Fluorescencia.

En el ensayo se emplearon dos concentraciones de partículas fluorescentes, 10^7 y 5×10^7 partículas/ml, que permitían su detección a 605 nm una vez fagocitadas por los macrófagos. Como se muestra en la figura 33, en los ensayos por citometría de flujo, se produjo un aumento en la emisión de fluorescencia de las células cultivadas en presencia de las partículas fluorescentes a las dos concentraciones ensayadas. La fagocitosis de las partículas disminuyó significativamente en macrófagos incubados con MA durante 24 horas, a ambas concentraciones. El porcentaje de células que habían fagocitado partículas fluorescentes fue muy inferior en las células tratadas con el MA durante 24 horas respecto a las células control.

Los efectos observados por citometría de flujo fueron comprobados por microscopía confocal mediante un análisis inmunofluorescente, empleando CD45-FITC para el marcaje de membrana, DAPI para el marcaje nuclear y las partículas fluorescentes utilizadas en el análisis por citometría de flujo (figura 34).

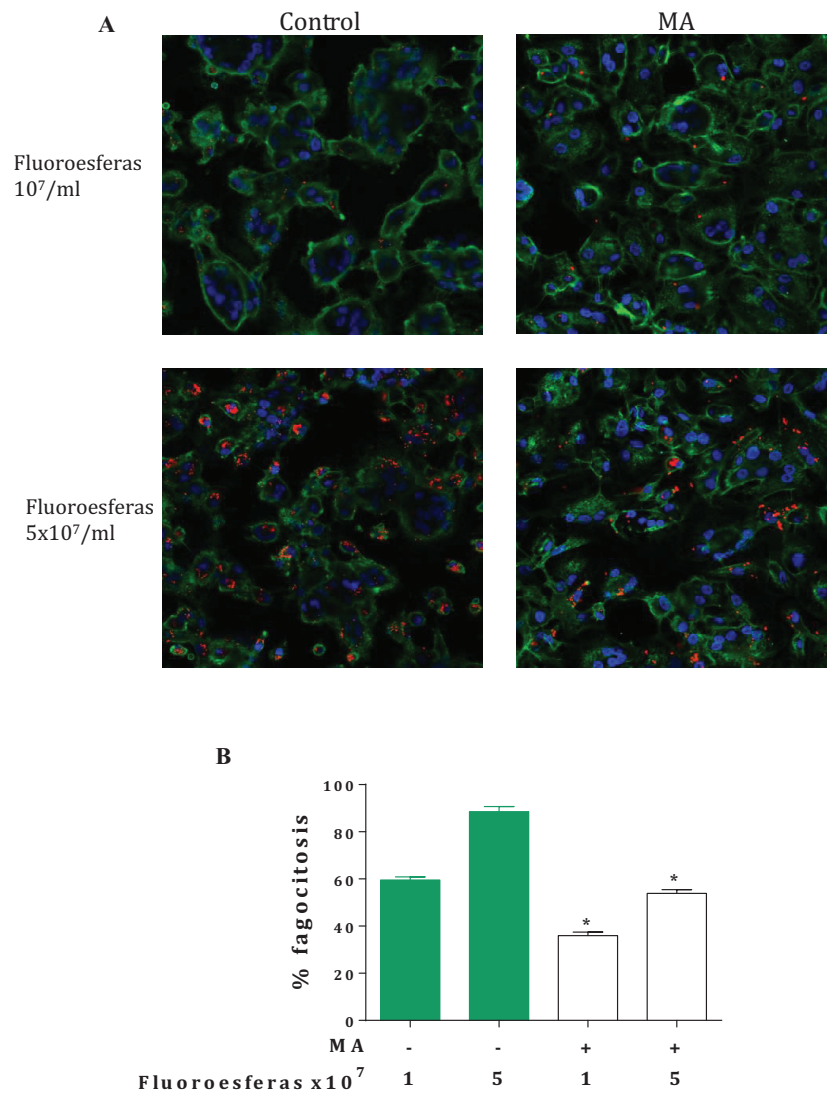


Figura 34. Efectos del MA sobre la fagocitosis en macrófagos. El porcentaje de fagocitosis se determinó en células incubadas en presencia o ausencia de MA y partículas fluorescentes. **A.** Imágenes representativas mostrando la expresión de CD45-FITC (verde), los núcleos celulares teñidos con DAPI (azul) y las partículas fluorescentes (rojo). Aumento original $\times 600$. **B.** El porcentaje de fagocitosis se expresa como número de células con partículas fagocitadas/número total de células $\times 100$. Resultados expresados como media $\pm \sigma$ de cultivos independientes procedentes de 4 pacientes. * $P < 0,05$ respecto a las células no tratadas con MA.

3. Efectos del MA de ASCs sobre la respuesta inflamatoria en cultivos primarios de condrocitos humanos osteoartóricos

En este estudio se ha examinado el potencial del MA de las ASCs en la regulación de la expresión de colágeno II y la producción de mediadores inflamatorios y catabólicos implicados en la degeneración del cartílago articular en la OA. Para ello, en esta serie de ensayos se emplearon condrocitos, únicas células presentes en el tejido cartilaginoso hialino articular. Los condrocitos se aislaron de cartílago humano osteoartítico y se trabajó con ellos en cultivo primario. Como estímulo se utilizó la IL-1 β , ya que es una citocina de gran relevancia tanto en la inducción de procesos relacionados con el catabolismo del cartílago (Dodge y Poole, 1989) como en los procesos inflamatorios que se desarrollan en la OA (Attur y cols., 1997). En estas condiciones de experimentación, se empleó el MA de las ASCs para examinar los posibles efectos protectores que ejerce sobre los condrocitos procedentes de pacientes con OA.

Por lo tanto, en esta serie de ensayos se estudiaron los efectos que IL-1 β y/o MA ejercían sobre diferentes mediadores inflamatorios y catabólicos en los cultivos primarios de condrocitos osteoartíticos. Para ello se incubaron las células durante diferentes tiempos, en función del experimento. En los cultivos incubados durante un tiempo superior a 72 horas se realizó un re-estímulo con IL-1 β a este tiempo, en el que además se renovó el medio de cultivo en las células control y el MA en las células tratadas.

3.1. Efectos del MA sobre la viabilidad celular

En primer lugar, se utilizó el método de MTT para determinar la viabilidad celular de los cultivos de condrocitos osteoartíticos incubados en presencia o ausencia de IL-1 β y/o MA a los diferentes tiempos de incubación empleados: 1, 3, 5 y 7 días.

Como se muestra en la figura 35, el estímulo con IL-1 β no afectó a la viabilidad celular, ya que no se produce una variación significativa de los valores de las células estimuladas respecto a las células basales a los diferentes tiempos de incubación estudiados.

Entre los tratamientos con el MA o la combinación de MA e IL-1 β y las células en estado basal tampoco se detectaron diferencias. Por lo tanto, podemos descartar variaciones en cuanto a la viabilidad celular de los cultivos tras la incubación con el estímulo de IL-1 β y/o el tratamiento con MA a los tiempos de incubación estudiados.

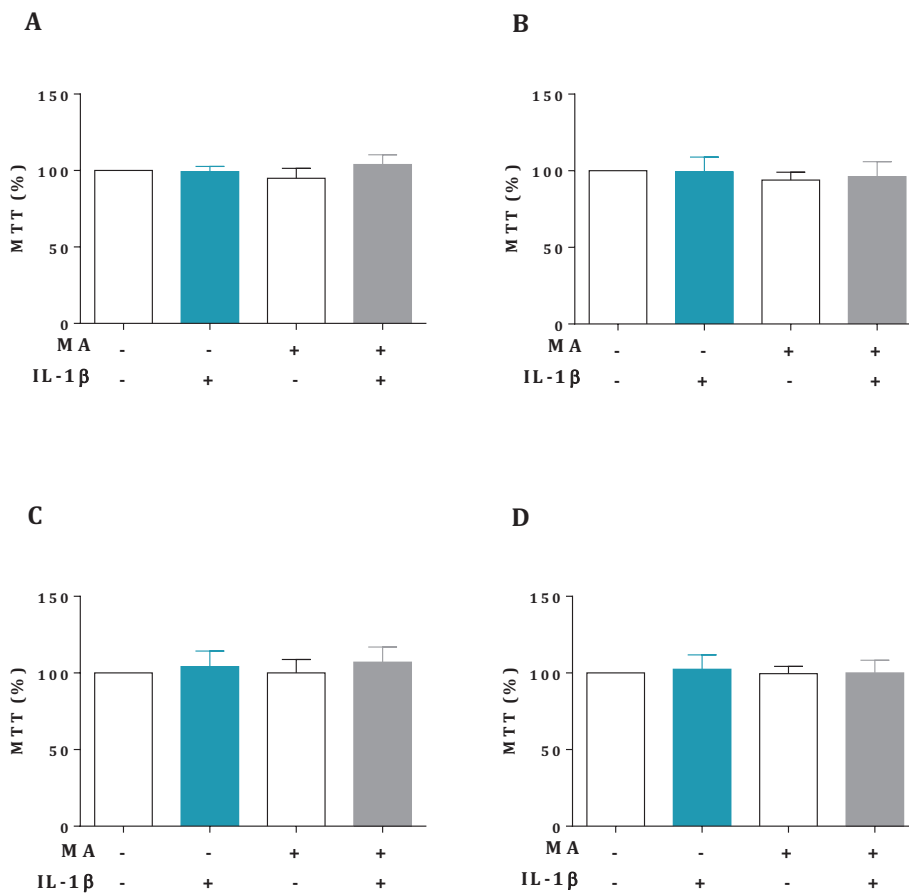


Figura 35. Efectos del MA sobre la viabilidad celular en condrocitos. Las células se incubaron durante 24 horas (A), 3 días (B), 5 días (C) y 7 días (D) en presencia o ausencia de IL-1 β y/o MA. Los resultados se expresan como porcentaje respecto a las células no estimuladas. Resultados expresados como media \pm σ de cultivos independientes procedentes de 3 pacientes.

3.2. Efecto del MA sobre la expresión de colágeno II

El colágeno II es el principal componente de la matriz extracelular del cartílago y se considera un marcador de funcionalidad del condrocito articular.

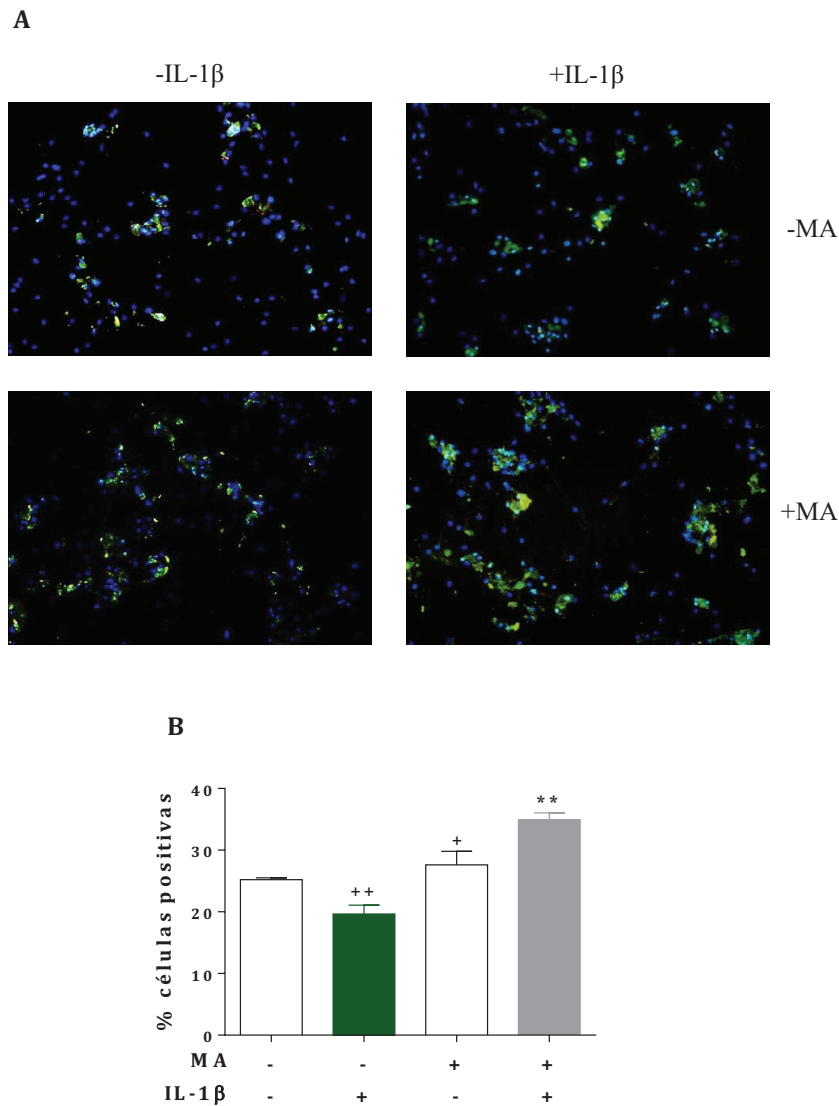


Figura 36. Efecto del MA sobre la expresión de colágeno II en condrocitos. La presencia de colágeno II se observó por inmunofluorescencia en células incubadas durante 5 días en presencia o ausencia de IL-1 β y/o MA. **A.** Imágenes representativas mostrando la expresión de colágeno II (verde) y los núcleos celulares teñidos con DAPI (azul). Aumento original x200. **B.** Porcentajes de células positivas en colágeno II con respecto al número de células totales. Resultados expresados como media \pm S.E.M. de cultivos independientes procedentes de 4 pacientes. +P < 0,05, ++P < 0,01 respecto a las células no estimuladas; **P < 0,01 respecto a las células estimuladas con IL-1 β .

Con la finalidad de determinar si el tratamiento con el MA podía modificar la producción de esta proteína, se realizó un análisis inmunofluorescente en células tratadas durante 5 días con IL-1 β , MA o su combinación (figura 36).

La presencia de IL-1 β produce una disminución en la producción de colágeno II en el cartílago (Goldring y cols., 1994a). Nuestros resultados indican que en los cultivos estimulados con IL-1 β existe una cantidad significativamente menor de colágeno II que en los cultivos sin estimular. Este efecto se revirtió al incubar los condrocitos con MA e IL-1 β , condiciones en las que se produjo un incremento de colágeno II con respecto a las células estimuladas únicamente con la citocina. Además, el MA aumentó la expresión de colágeno II en células no estimuladas con IL-1 β .

3.3. Efecto del MA sobre las enzimas degradativas del cartílago

Con el fin de caracterizar los efectos relativos a las MMPs en los cultivos de condrocitos osteoartrotríticos, se midió la actividad metaloproteinasas total en el medio de cultivo. Además, se evaluó la expresión de ARNm y los niveles proteicos de dos MMPs implicadas en la destrucción del cartílago osteoartrotrítico, MMP-3 y MMP-13.

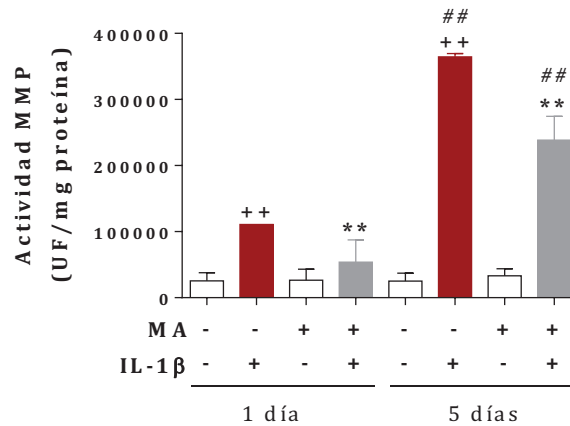


Figura 37. Efectos del MA sobre la actividad MMP en condrocitos. Las células se incubaron 24 horas y 5 días en presencia o ausencia de IL-1 β y/o MA. La actividad se expresa como unidades de fluorescencia (UF) por mg de proteína. Resultados expresados como media \pm S.E.M. de cultivos independientes procedentes de 4 pacientes. ++P < 0,01 respecto a las células no estimuladas; **P < 0,01 respecto a las células estimuladas con IL-1 β ; ## P < 0,01 respecto a las células tratadas durante 24 horas.

Los resultados indican que, en concordancia con la bibliografía existente (Mengshol y cols., 2000; Tetlow y cols., 2001), el estímulo con IL-1 β aumenta la actividad de las MMPs. En nuestro estudio, se produjo un aumento de la actividad de las MMPs tras 24 horas de incubación y, en mayor medida, tras 5 días de incubación (figura 37). A ambos tiempos, el tratamiento con el MA disminuyó significativamente los niveles de actividad MMP respecto a las células estimuladas exclusivamente con la citocina.

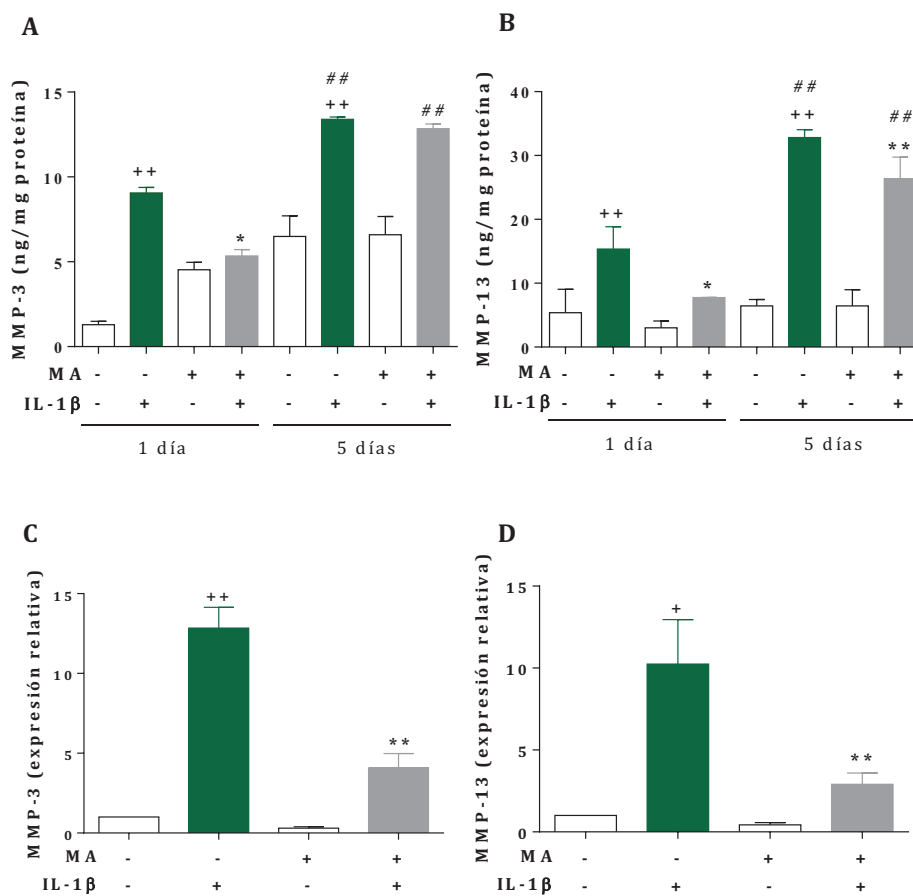


Figura 38. Efectos del MA sobre la expresión de proteína y ARNm de MMP-3 y MMP-13 en condrocitos. A, B. Los niveles de proteína medidos por ELISA se expresan en ng/mg de proteína en células incubadas durante 24 horas y 5 días en presencia o ausencia de IL-1 β y/o MA. C, D. La expresión de ARNm se determinó por PCR a tiempo real tras 24 horas de incubación y los resultados indican la expresión relativa respecto a las células no estimuladas. Resultados expresados como media \pm S.E.M. de cultivos independientes procedentes de 4 pacientes. *P < 0,05; **P < 0,01 respecto a las células no estimuladas; ++P < 0,01 respecto a las células estimuladas con IL-1 β ; ##P < 0,01 respecto a las células tratadas durante 24 horas.

Esta disminución en la actividad MMP tras el tratamiento con el MA se correlaciona con el estudio realizado de la expresión específica de las enzimas degradativas de matriz, MMP-3 y MMP-13 (figura 38). El tratamiento con el MA en células estimuladas a su vez con IL-1 β , redujo significativamente los niveles de proteína y de ARNm de ambas MMPs a las 24 horas de tratamiento en comparación con las células estimuladas únicamente con la citocina. Este efecto se mantuvo a los 5 días de tratamiento solo en el caso de la MMP-13 ya que los niveles de MMP-3 no se modificaron por el tratamiento con el MA a este tiempo.

3.4. Efecto del MA sobre la producción de citocinas

Las citocinas liberadas en el cartílago, en condiciones normales, se hallan a niveles bajos para mantener la homeostasis del tejido. Sin embargo en la OA este equilibrio se altera. Se ha descrito que las citocinas proinflamatorias, como IL-6 y TNF- α , son mediadores clave en la respuesta inflamatoria y se consideran factores importantes en la patogénesis de la OA. Sin embargo, las citocinas de carácter antiinflamatorio, como IL-10, contribuyen de frenar la propagación de la respuesta inflamatoria (Goldring, 2000a).

La presencia de IL-1 β produce un aumento en la producción de IL-6, TNF- α e IL-10 en el cartílago osteoartrítico (Attur y cols., 1997). En nuestro modelo *in vitro* de condrocitos humanos osteoartríticos, la IL-1 β produjo el aumento de los niveles de IL-6, tras 24 horas y 5 días de incubación, como puede observarse en la figura 39A, mientras que el MA disminuyó significativamente la producción de IL-6 a ambos tiempos en presencia de esta citocina. La figura 39B muestra que los niveles de TNF- α inducidos por IL-1 β se redujeron tras 24 horas de incubación combinada con IL-1 β y MA. En el caso de la citocina antiinflamatoria IL-10, su producción en células estimuladas con IL-1 β aumentó significativamente con el tratamiento con el MA, a ambos tiempos, en comparación con las células estimuladas únicamente con IL-1 β (figura 39C).

Los resultados en la expresión de ARNm mostraron un efecto paralelo al obtenido con los niveles de proteína. Se observó una reducción de la expresión de IL-6 y TNF- α , mientras que la expresión de ARNm de IL-10 aumentó

significativamente tras el tratamiento con el MA en condrocitos estimulados con IL-1 β (figura 39D, E, F).

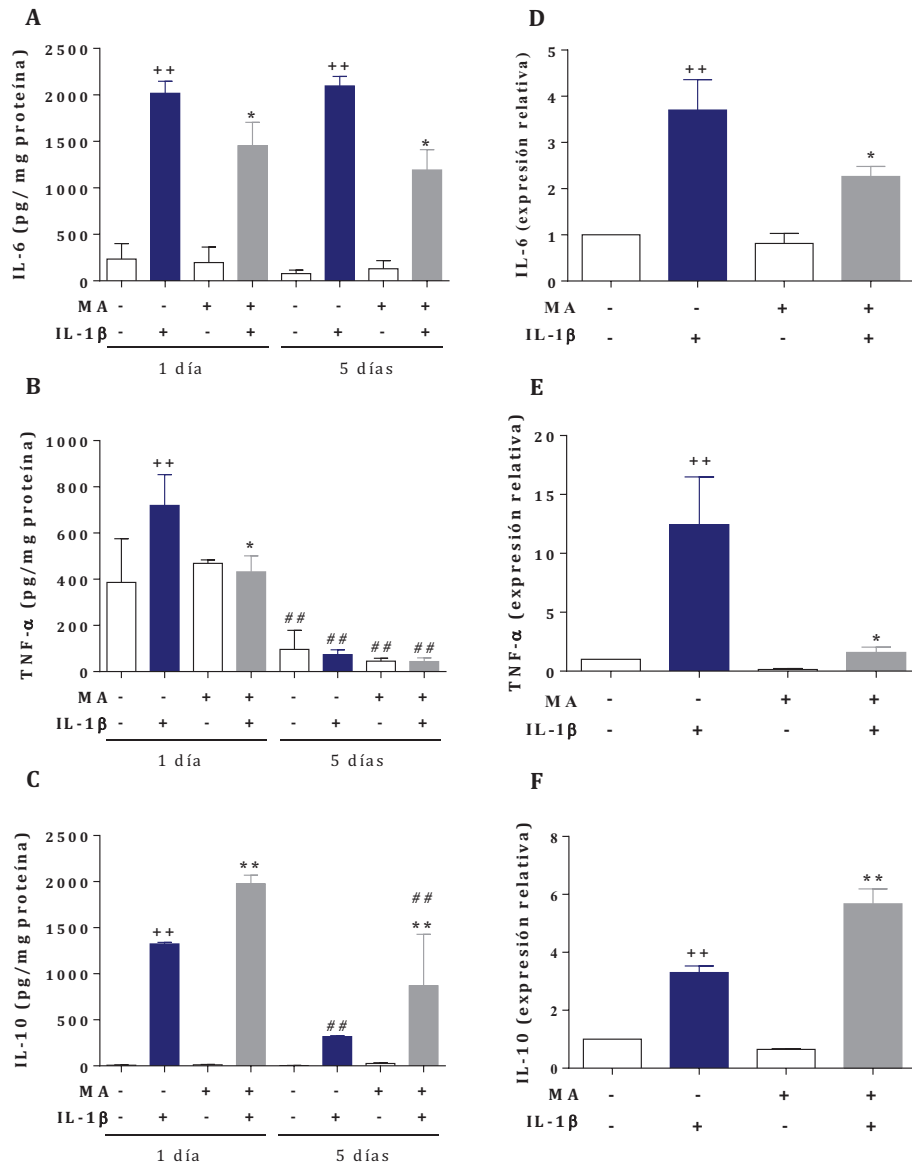


Figura 39. Efectos del MA sobre los niveles de proteína de IL-6 (A), TNF α (B) e IL-10 (C) y sobre la expresión de ARNm en condrocitos (D-F). A-C. Los niveles de proteína medidos por ELISA se expresan en pg/mg de proteína en células incubadas durante 24 horas y 5 días en presencia o ausencia de IL-1 β y/o MA. D-F. La expresión de ARNm se determinó por PCR a tiempo real tras 24 horas de incubación y los resultados indican la expresión relativa con respecto a las células no estimuladas. Resultados expresados como media \pm S.E.M. de cultivos independientes procedentes de 6 pacientes. ++P < 0,01 respecto a las células no estimuladas; *P < 0,05; **P < 0,01 respecto a las células estimuladas con IL-1 β ; ## P < 0,01 respecto a las células tratadas durante 24 horas.

3.5. Efecto del MA sobre la expresión de ARNm de α - y β quimiocinas

En la OA se produce un incremento en la producción de quimiocinas en condrocitos bajo la influencia de citocinas inflamatorias como la IL-1 β . Este incremento se ha relacionado con un aumento en la secreción de MMPs y la disminución de los niveles de proteoglicanos (Alaaeddine y cols., 2001).

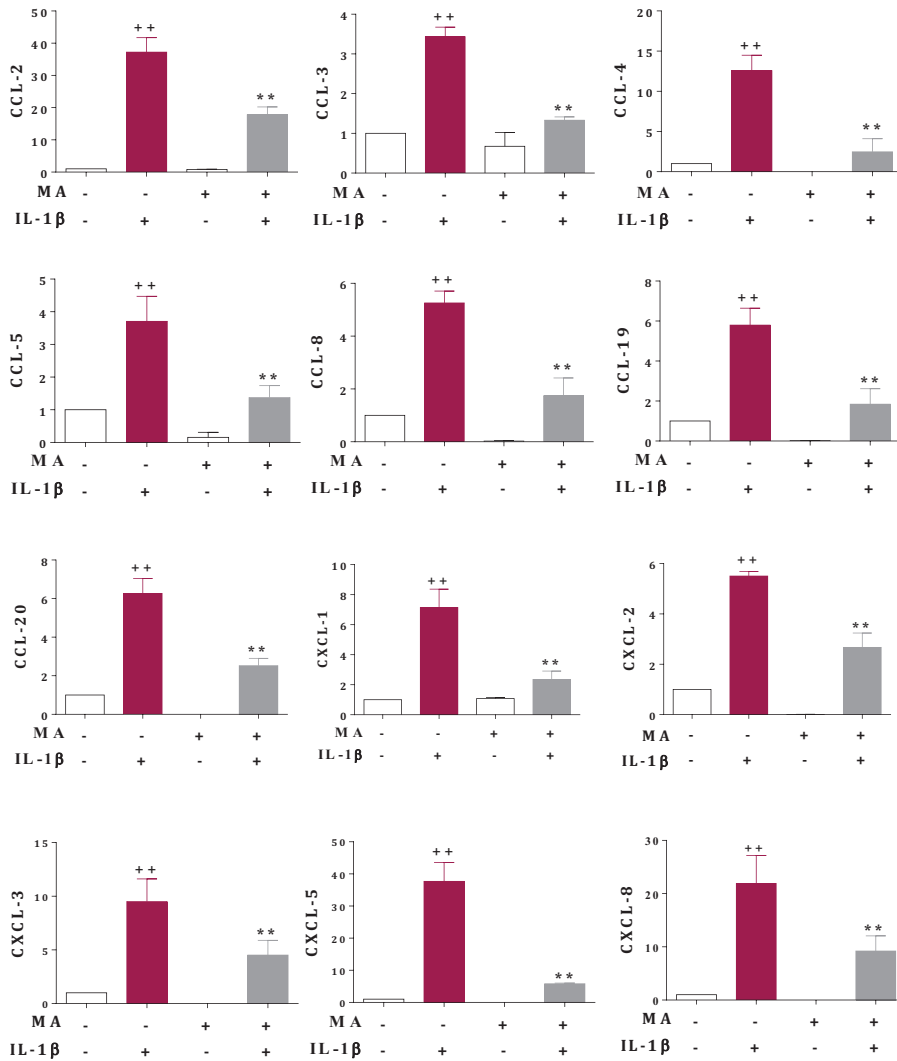


Figura 40. Efectos del MA sobre la expresión de ARNm de quimiocinas en condrocitos. La expresión relativa de ARNm se determinó por PCR a tiempo real tras 24 horas en presencia o ausencia de IL-1 β y/o MA. Los resultados indican la expresión relativa respecto a las células no estimuladas. Resultados expresados como media \pm S.E.M. de cultivos independientes procedentes de 4 pacientes. ++P < 0,01 respecto a las células no estimuladas; **P < 0,01 respecto a las células estimuladas con IL-1 β .

La figura 40 muestra el efecto del MA sobre la expresión de ARNm de las quimiocinas en condrocitos osteoartríticos. La adición de IL-1 β a los cultivos celulares provocó un aumento de la expresión de ARNm de todas las quimiocinas ensayadas tras 24 horas de incubación. Sin embargo, si el estímulo con IL-1 β se realizó en presencia de MA, se produjo una reducción significativa en la expresión de estas quimiocinas respecto a las células estimuladas únicamente con la IL-1 β .

3.6. Efecto del MA sobre la producción de PGE₂ y la expresión de ARNm de COX-2 y mPGES-1

La PGE₂ está implicada en los procesos patológicos de la OA y sus efectos sobre el cartílago articular están bien establecidos. Su presencia se ha relacionado con una disminución en la producción de colágeno II y un aumento de MMPs, así como con un incremento en la expresión de diferentes mediadores inflamatorios (Martel-Pelletier y cols., 2003).

La síntesis de PGE₂ se induce por la estimulación celular con citocinas, como la IL-1 β . Así, cuando estimulamos con esta citocina los cultivos de condrocitos, durante 24 horas o 5 días, se observa un aumento significativo en la producción de PGE₂, como se muestra en la figura 41A. Este efecto se revirtió, a ambos tiempos de incubación, al tratar las células con MA en presencia del estímulo inflamatorio respecto a las células estimuladas únicamente con IL-1 β .

Para determinar si los efectos del MA sobre la producción de PGE₂ eran consecuencia de una reducción en la expresión de COX-2 o mPGES-1, se midieron por PCR a tiempo real los niveles de ARNm de estas enzimas. Tal y como se muestra en la figura 41B y 41C, a las 24 horas del estímulo con IL-1 β , se produjo un aumento importante en la expresión de las dos enzimas. El tratamiento con MA redujo significativamente el efecto producido por la IL-1 β , lo que puede explicar los efectos inhibitorios del MA sobre la producción de PGE₂.

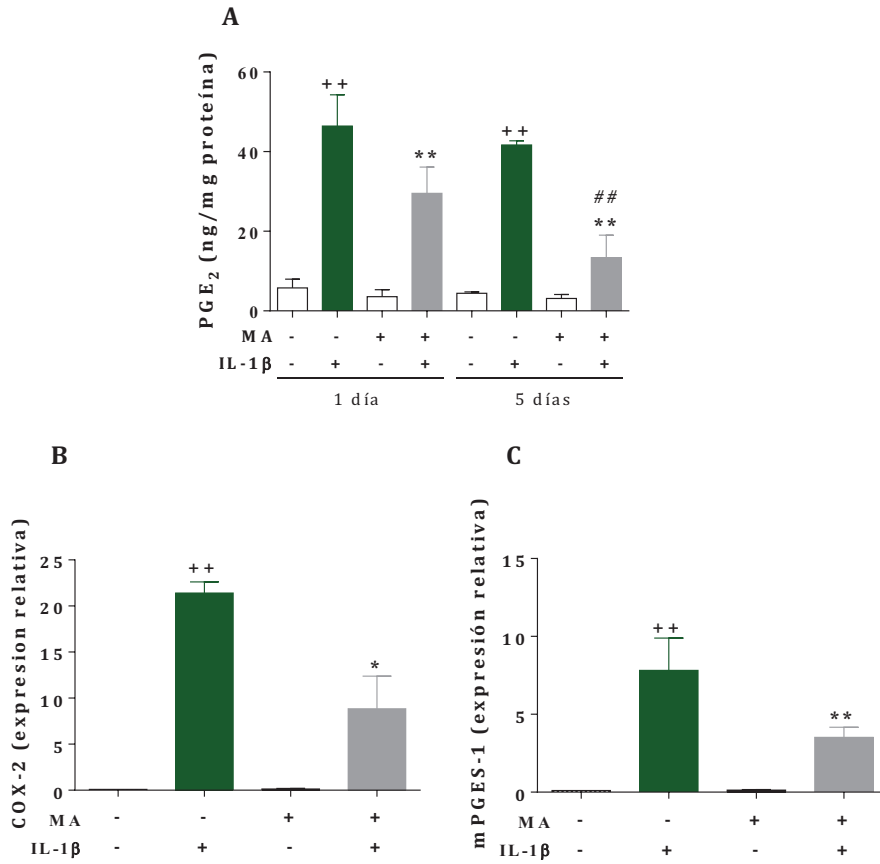


Figura 41. Efectos del MA sobre la producción de PGE₂ y la expresión de COX-2 y mPGES-1 en condrocitos. **A.** Los niveles de PGE₂, medidos por RIA, se expresan como ng/mg de proteína en células incubadas durante 24 horas y 5 días en presencia o ausencia de IL-1 β y/o MA. **B, C.** La expresión de ARNm se determinó por PCR a tiempo real en condrocitos tras 24 horas y los resultados indican la expresión relativa respecto a las células no estimuladas. Resultados expresados como media \pm S.E.M. de cultivos independientes procedentes de 6 (PGE₂) o 4 (ARNm) pacientes. ++P < 0,01 respecto a las células no estimuladas; *P < 0,05; **P < 0,01 respecto a las células estimuladas con IL-1 β ; ##P < 0,01 respecto a las células tratadas durante 24 horas.

3.7. Efecto del MA sobre la producción de NO y la expresión de ARNm de iNOS

Se ha descrito que la IL-1 β produce un aumento en la producción de NO, (Amin y Abramson, 1998). Así, en nuestro trabajo, el estímulo de los condrocitos durante 24 horas y 5 días con la citocina IL-1 β aumentó la producción de NO, medido como nitrito, tal y como se observa en la figura 42A. La presencia de MA en cultivos estimulados con la citocina proinflamatoria redujo considerablemente los niveles de nitrito a los dos tiempos ensayados.

Con el fin de determinar si la disminución de NO producida por el tratamiento con MA se debía a una menor expresión de la iNOS, se midió su expresión por PCR a tiempo real en cultivos de condrocitos estimulados con IL-1 β y/o MA durante 24 horas. La figura 42B muestra que el estímulo con IL-1 β produce un aumento en la expresión relativa del ARNm de iNOS en las células, mientras que en presencia de la citocina y el MA, los condrocitos mantienen unos niveles de expresión de enzima cercanos al basal.

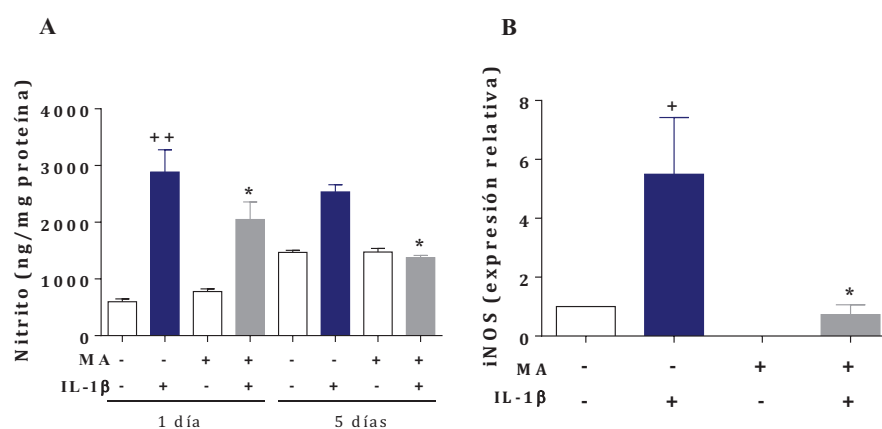


Figura 42. Efectos del MA sobre la producción de nitrito y la expresión de iNOS en condrocitos. **A.** Los niveles de nitrito se expresan como ng/mg de proteína en células incubadas durante 24 horas y 5 días en presencia o ausencia de IL-1 β y/o MA. **B.** La expresión de ARNm se determinó por PCR a tiempo real tras 24 horas y los resultados indican la expresión relativa respecto a las células no estimuladas. Resultados expresados como media \pm S.E.M. de cultivos independientes procedentes de 6 (NO) o 4 (ARNm) pacientes. ⁺⁺P < 0,01; ⁺P < 0,05 respecto a las células no estimuladas; ^{*}P < 0,05 respecto a las células estimuladas con IL-1 β .

3.8. Efecto del MA sobre la activación de NF- κ B

La inducción de mediadores inflamatorios por IL-1 β se asocia con la activación del factor NF- κ B (Barnes y Karin, 1997). Por ello y con el fin de conocer el mecanismo implicado en los efectos del MA sobre los mediadores inflamatorios y catabólicos, se estudió la posible regulación de estos por este factor de transcripción nuclear.

El estímulo con IL-1 β indujo rápidamente la translocación de NF- κ B al núcleo y su unión al ADN para activar la transcripción génica, mientras que la presencia de MA en las células estimuladas con IL-1 β disminuyó de forma significativa esta unión en comparación con las células tratadas exclusivamente con la citocina proinflamatoria (figura 43).

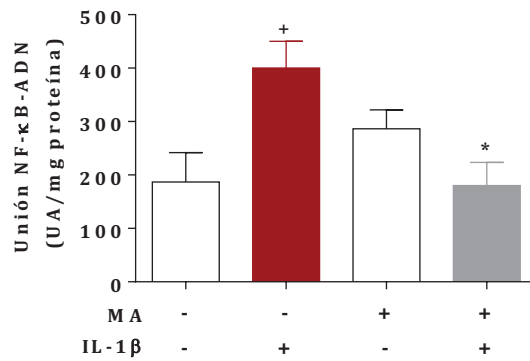


Figura 43. Efectos del MA sobre la activación del factor NF- κ B en condrocitos. La unión del factor NF- κ B al ADN, medida por ELISA en las fracciones nucleares, se expresa como UA/mg de proteína en células incubadas durante 1 hora en presencia o ausencia de IL-1 β y/o MA. Resultados expresados como media \pm S.E.M. de cultivos independientes procedentes de 4 pacientes. $^+P < 0,05$ respecto a las células no estimuladas; $*P < 0,05$ respecto a las células estimuladas con IL-1 β . UA: Unidades Arbitrarias.

4. Efectos del MA de ASCs sobre la senescencia inducida por estrés en condrocitos humanos osteoartríticos

La senescencia de los condrocitos osteoartríticos contribuye a aumentar la incidencia de la OA junto a otros factores conocidos que median la patogénesis de esta enfermedad como la edad avanzada, las citocinas y el estrés oxidativo (Martin y Buckwalter, 2003). En condrocitos osteoartríticos se ha descrito la presencia de signos de senescencia como es la expresión de SA- β -Gal o la disminución de la producción de componentes de la matriz extracelular (Martin y Buckwalter, 2001; Price y cols., 2002). La SIPS puede ser inducida por múltiples tipos de estrés, como el estrés oxidativo o las citocinas inflamatorias (Ben-Porath y Weinberg, 2005). En particular, citocinas como la IL-1 β podrían contribuir a un desequilibrio entre los mecanismos anabólicos y degradativos que podría resultar en la aparición de SIPS en los condrocitos articulares (Anderson y Loeser, 2010).

En esta serie de ensayos se estudió la capacidad del MA de las ASCs para regular la aparición de SIPS en cultivos de condrocitos humanos osteoartríticos, en los que se empleó la citocina IL-1 β como estímulo para la inducción de la senescencia. El tratamiento con el MA y el estímulo con la citocina se realizaron a tres tiempos de incubación diferentes: 24 horas, 3 días y 7 días. En este último, se realizó un re-estímulo con IL-1 β a las 72 horas, en el que además se renovaba el medio de cultivo en las células control y el MA en las células tratadas. Debido a la ausencia de un marcador único para determinar el estado senescente en las células, se evaluaron diferentes marcadores de senescencia en los condrocitos: SA- β -Gal, acumulación de focos de γ H2AX, distribución celular de las fibras de F-actina y la expresión de p53, p16, p21 y caveolina-1.

4.1. Efecto del MA sobre la SA- β -Gal

La actividad SA- β -Gal se considera un marcador de senescencia, ya que es característica de las células en este estado (Dimri y cols., 1995). En nuestro trabajo, se determinó la SA- β -Gal en cultivos de condrocitos osteoartríticos incubados durante 24 horas y 7 días en presencia o ausencia de IL-1 β y/o MA.

En la figura 44, el estímulo con IL-1 β aumentó la actividad SA- β -Gal en comparación con las células sin tratar a los dos tiempos ensayados, siendo el efecto mayor a 7 días que a 24 horas. El tratamiento con el MA de las células estimuladas

con esta citocina tuvo un efecto protector, ya que el porcentaje de condrocitos SA- β -Gal positivos disminuyó significativamente respecto a las células estimuladas únicamente con IL-1 β a 24 horas y 7 días.

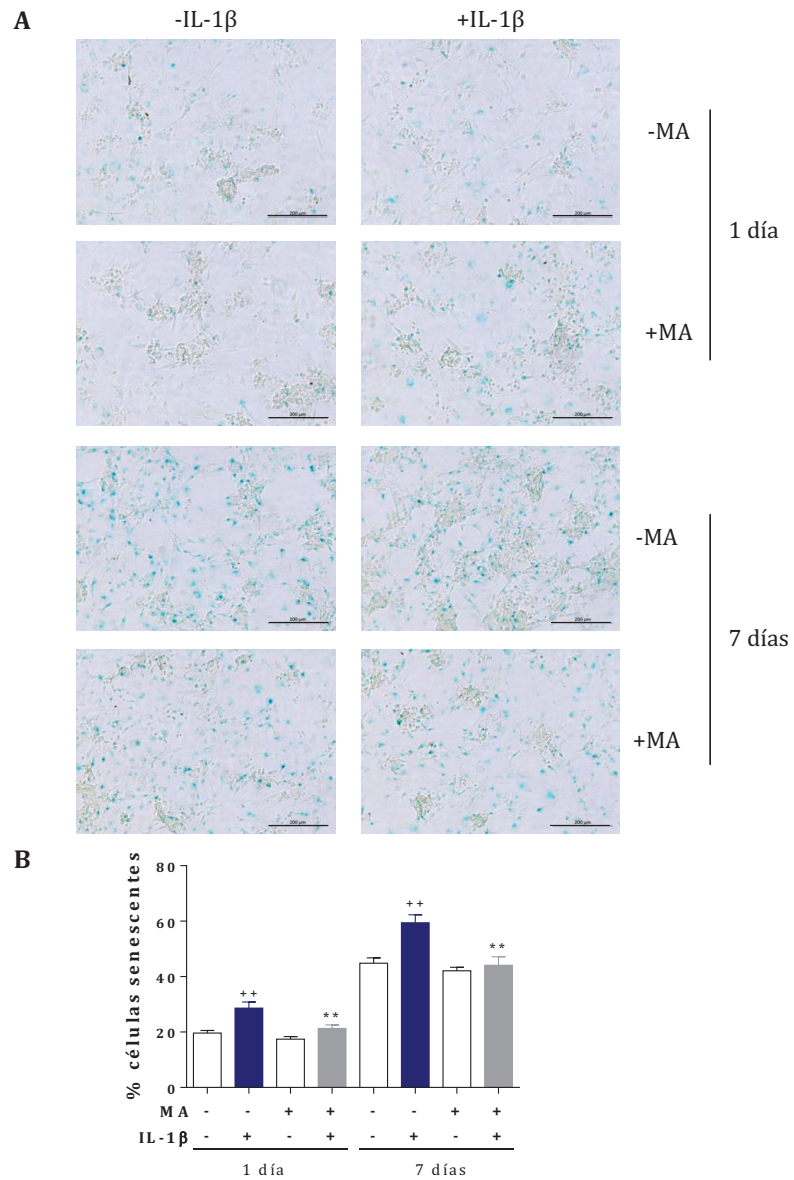


Figura 44. Estudio inmunocitoquímico de la SA- β -Gal en condrocitos. Las células se incubaron durante 24 horas y 7 días en presencia o ausencia de IL-1 β y/o MA. **A.** Imágenes representativas de la tinción del marcador senescente SA- β -Gal. Aumento original x200. Barras: 200 μ m. **B.** Porcentajes de células SA- β -Gal positivas. Resultados expresados como media \pm σ de cultivos independientes procedentes de 4 pacientes. ++P < 0,01 respecto a las células no estimuladas; **P < 0,01 respecto a las células estimuladas con IL-1 β .

4.2. Efecto del MA sobre la acumulación de focos de γ H2AX

Cuando se origina un daño en el ADN celular con roturas de la doble cadena, se produce la fosforilación de la histona H2AX en la Serina 139 (γ H2AX). Esta fosforilación es rápida, abundante y se correlaciona con cada rotura, por lo que se considera un marcador que se puede utilizar para examinar el daño en el ADN y la posterior reparación de las lesiones (Sharma y cols., 2012).

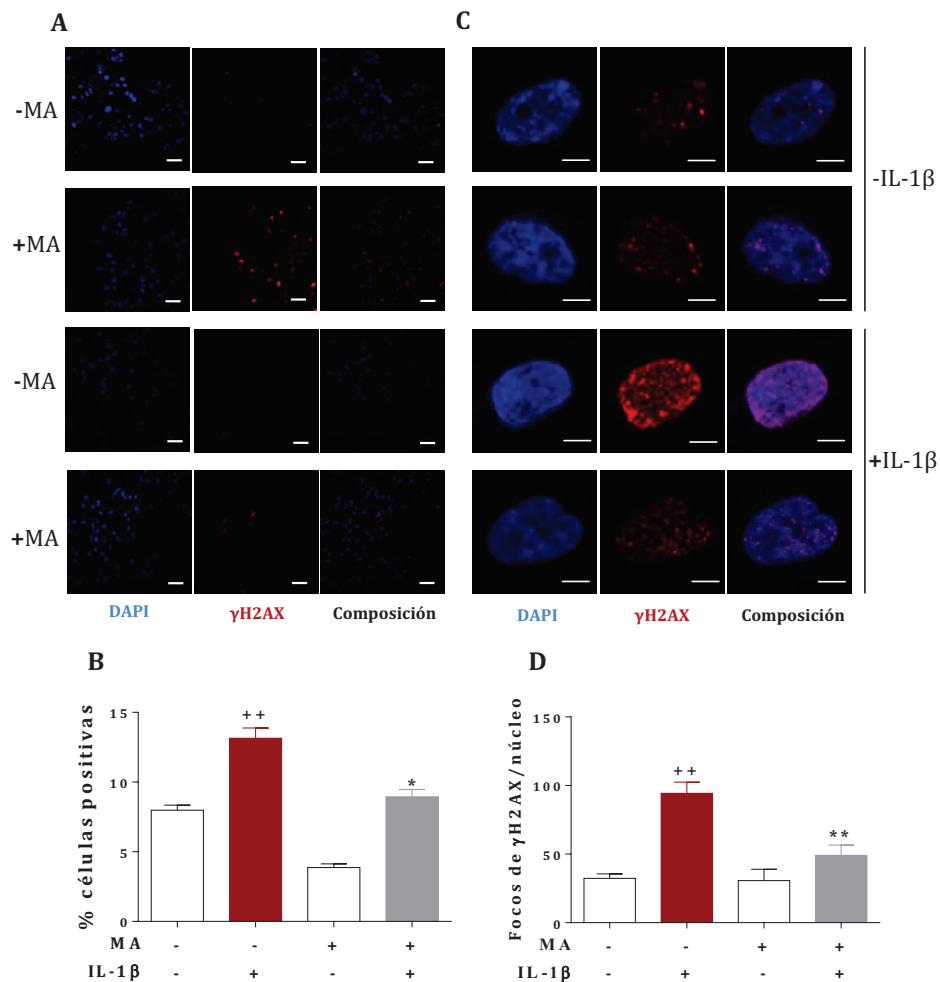


Figura 45. Estudio inmunofluorescente de los focos de γ H2AX en condrocitos. Las células se incubaron durante 3 días en presencia o ausencia de IL-1 β y/o MA. **A.** Imágenes representativas de la tinción de γ H2AX y DAPI. Aumento original $\times 600$. Barras: 50 μ m. **B.** Porcentaje de células γ H2AX positivas. **C.** Imágenes representativas de los focos de γ H2AX en el núcleo celular. Aumento original $\times 600$. Barras: 5 μ m. **D.** Número de focos de γ H2AX por célula. Resultados expresados como media $\pm \sigma$ de cultivos independientes procedentes de 4 pacientes. ⁺⁺P < 0,01 respecto a las células no estimuladas; ^{*}P < 0,05; ^{**}P < 0,05 respecto a las células estimuladas con IL-1 β .

El efecto del MA sobre el daño producido en el ADN se estudió realizando un análisis de inmunofluorescencia, que nos permitió detectar y cuantificar los focos de γ H2AX presentes en los núcleos celulares. Como se observa en la figura 45A-B, se produjo un incremento en el porcentaje de células que presentaban fosforilación de la histona H2AX en condrocitos estimulados con IL-1 β respecto a los no estimulados. El tratamiento con el MA de los cultivos estimulados con la citocina disminuyó significativamente este porcentaje.

Por otra parte, el análisis de los núcleos reveló que los condrocitos estimulados con IL-1 β presentaban un mayor número de focos de γ H2AX que las células control, mientras que el tratamiento con MA de las células estimuladas disminuía considerablemente el número de focos por núcleo (figura 45C-D).

4.3. Efecto del MA sobre la distribución de F-actina

Los cambios morfológicos son parámetros importantes en la senescencia celular. En las células senescentes aumenta el número de fibras de estrés de F-actina y su longitud, lo que se relaciona con la forma alargada que presentan estas células y a su incapacidad de replicación (Wang y Gundersen, 1984).

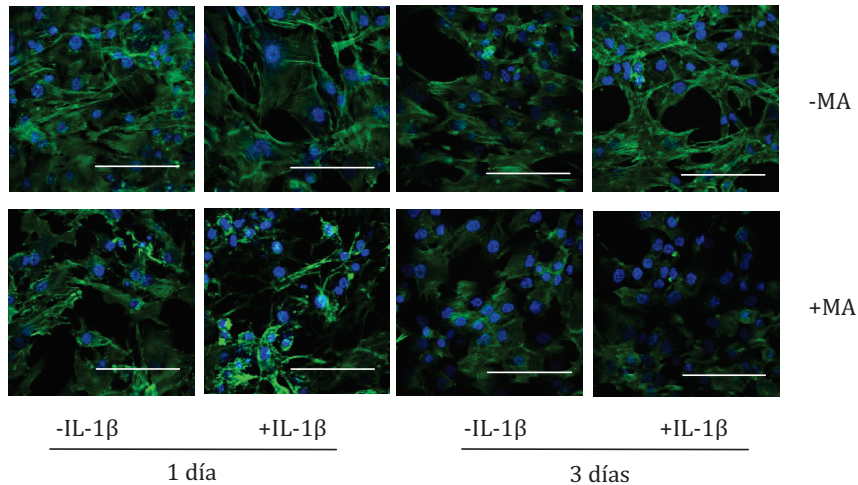


Figura 46. Análisis inmunofluorescente de los filamentos de F-actina en condrocitos. Las células se incubaron durante 24 horas y 3 días en presencia o ausencia de IL-1 β y/o MA. La tinción de las fibras de actina en las células se realizó con faloidina Alexa Fluor 488 (en verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (en azul). Imágenes representativas de la presencia de fibras de F-actina. Aumento original x600. Barras: 50 μ m.

Con el fin de ampliar el estudio de la SIPS en condrocitos osteoartríticos, realizamos un análisis de inmunofluorescencia para detectar posibles cambios en la formación de fibras de F-actina. Como puede observarse en la figura 46, el estímulo con IL-1 β en los condrocitos osteoartríticos produjo un alargamiento de las células con un aumento en la cantidad y longitud de las fibras de actina, tras 3 días de incubación. En contraste, las células tratadas de manera concomitante con MA e IL-1 β , mantuvieron su morfología normal y mostraron una menor formación de fibras de estrés.

4.4. Efecto del MA sobre el estrés oxidativo

La peroxidación de lípidos puede desempeñar un papel importante en los procesos que conducen a la disfunción de los condrocitos y la degeneración del cartílago (Tiku y cols., 2000). De hecho, en condrocitos humanos, el estrés oxidativo puede conducir al daño en el ADN y a la senescencia celular (Brandl y cols., 2011). Además, se sabe que la producción de ROS tiene un papel muy importante en la activación de vías de señalización activadas por IL-1 β en condrocitos humanos (Rousset y cols., 2015).

El estrés oxidativo se considera un proceso clave en la inducción y el mantenimiento de la senescencia. Por ello, se estudiaron los efectos del MA en la modificación proteica producida por los ROS. La peroxidación lipídica, relacionada con el estrés oxidativo, genera productos como el 4-HNE que puede unirse a las proteínas formando aductos estables que son fácilmente cuantificables.

Por todo ello, se estudió el posible efecto del tratamiento con el MA sobre la peroxidación lipídica, midiendo la cantidad de aductos de proteína 4-HNE. Como era de esperar, nuestros resultados indicaron que el estímulo con IL-1 β durante 30 minutos aumentó significativamente la generación de ROS, tal y como se aprecia en la figura 47, en la que se observa un aumento en la cantidad de aductos 4-HNE. Sin embargo, los niveles de este producto de la peroxidación lipídica disminuyeron significativamente, a los dos tiempos ensayados, en las células estimuladas con IL-1 β y tratadas con MA.

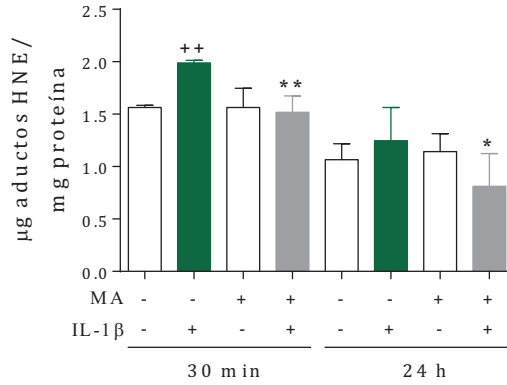


Figura 47. Efectos del MA sobre los niveles de aductos proteicos de HNE en condrocitos. Los niveles intracelulares de las proteínas modificadas-HNE, medidos por ELISA, en lisados celulares, se expresaron como µg de aductos de HNE/ mg de proteína en células incubadas durante 30 minutos y 24 horas en presencia o ausencia de IL-1β y/o MA. Resultados expresados como media ± σ de cultivos independientes procedentes de 6 pacientes. ++P < 0,01 respecto a las células no estimuladas; *P < 0,05; **P < 0,01 respecto a las células estimuladas con IL-1β.

4.5. Efecto del MA sobre caveolina-1, p53, p21 y p16

Con el fin de conocer los mecanismos protectores del MA frente a la senescencia celular inducida por IL-1β, se examinó si el MA afectaba a la expresión de mediadores asociados a la senescencia celular. Se emplearon las técnicas de ELISA y Western blot para determinar los niveles de proteína de caveolina-1, p53 y los inhibidores de CDKs, p16 y p21.

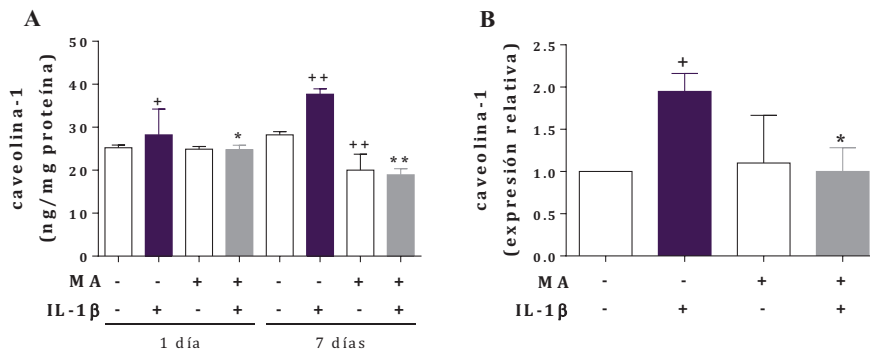


Figura 48. Efectos del MA sobre la expresión proteica y de ARNm de caveolina-1 en condrocitos. **A.** Los niveles de proteína medidos por ELISA en células incubadas durante 24 horas y 7 días en presencia o ausencia de IL-1β y/o MA. **B.** La expresión de ARNm se determinó por PCR a tiempo real tras 24 horas de incubación y los resultados indican la expresión relativa respecto a las células no estimuladas. Resultados expresados como media ± σ de cultivos independientes procedentes de 4 pacientes. +P < 0,05; ++P < 0,01 respecto a las células no estimuladas; *P < 0,05; **P < 0,01 respecto a las células estimuladas con IL-1β.

La caveolina-1 es un mediador de SIPS, que puede ser inducida por estrés oxidativo y citocinas, como la IL-1 β , en condrocitos articulares (Dai y cols., 2006). Como se muestra en la figura 48, el estímulo con IL-1 β aumentó los niveles de caveolina-1 tanto en la proteína como en el ARNm. El tratamiento con MA de las células estimuladas con IL-1 β revirtió los niveles de proteína de caveolina-1 a los dos tiempos ensayados, especialmente a 7 días, así como la expresión del ARNm.

En cuanto al estudio de p53, ni la expresión de proteína ni de ARNm sufrió modificaciones tras el estímulo con IL-1 β o con el MA (figura 49). Sin embargo, la acetilación de este factor aumentó tras el estímulo con IL-1 β durante 24 horas. El tratamiento con MA revirtió este efecto, disminuyendo significativamente los niveles de proteína acetilada inducidos por IL-1 β .

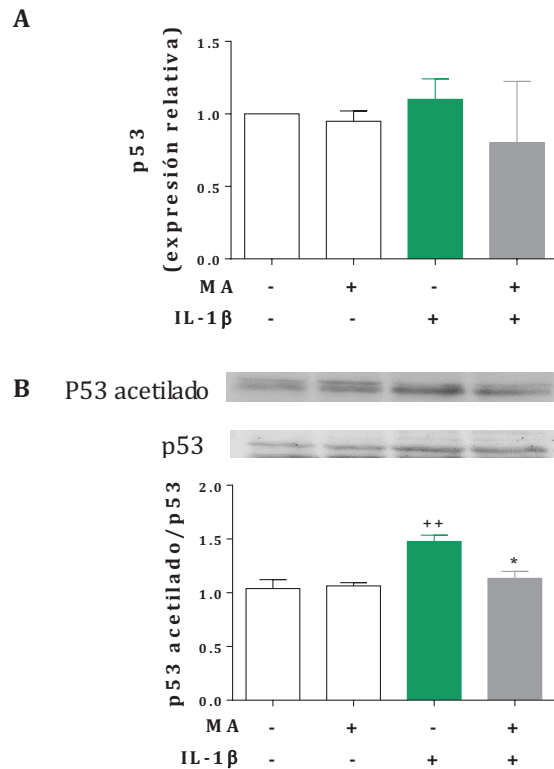


Figura 49. Efectos del MA sobre la expresión de ARNm y la acetilación de p53 en condrocitos. Las células en cultivo primario se incubaron durante 24 horas en presencia o ausencia de IL-1 β y/o MA. **A.** La expresión de ARNm se determinó por PCR a tiempo real y los resultados indican la expresión relativa respecto a las células no estimuladas. **B.** La expresión de p53 acetilado y total en lisados celulares se analizó por Western-Blot. La expresión relativa de las bandas de proteína acetilada y total se calculó tras un análisis densitométrico. Resultados expresados como media \pm σ de cultivos independientes procedentes de 4 pacientes. **P < 0,01 respecto a las células no estimuladas; *P < 0,05 respecto a las células estimuladas con IL-1 β .

La activación de p53 está relacionada con la inducción de la expresión de p21 (Rufini y cols., 2013). Por eso estudiamos el nivel de proteína y la expresión de ARNm de p21 en condrocitos estimulados en presencia o ausencia de IL-1 β y/o MA. En este caso, se observó un aumento significativo de la proteína p21 tras 7 días de incubación con IL-1 β (figura 50A), mientras que el tratamiento con el MA redujo los niveles de la proteína p21 a este tiempo. Además, se produjo una disminución significativa de los niveles de ARNm en las células tratadas con MA en presencia de IL-1 β (figura 50C).

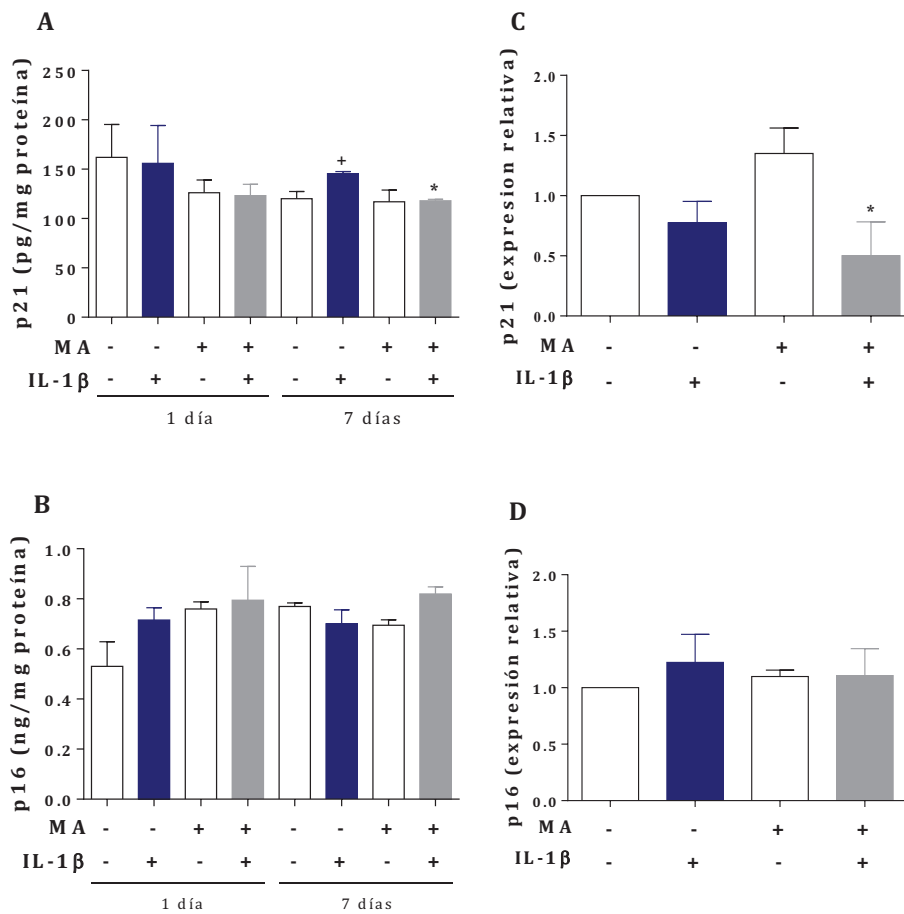


Figura 50. Efectos del MA sobre la expresión de ARNm y proteína de p21 y p16 en condrocitos. A, B. La determinación de los niveles de proteína se realizó por ELISA en células incubadas durante 24 horas y 7 días en presencia o ausencia de IL-1 β y/o MA. C, D. La expresión de ARNm se determinó por PCR a tiempo real tras 24 horas de incubación y los resultados indican la expresión relativa respecto a las células no estimuladas. Resultados expresados como media \pm σ de cultivos independientes procedentes de 6 pacientes. *P < 0,05 respecto a las células no estimuladas; *P < 0,05 respecto a las células estimuladas con IL-1 β .

En relación al factor p16, no se produjeron cambios importantes en los niveles de proteína y ARNm tras el estímulo con IL-1 β , tanto en presencia como en ausencia de MA (figura 50B, D).

4.6. Efecto del MA sobre la producción de Sirt1

Para comprender mejor cómo regula el MA la SIPS en condrocitos osteoartríticos, se estudió también la contribución de Sirt1 en la aparición de senescencia celular. El factor Sirt1 es necesario para mantener la homeostasis del cartílago y su expresión está reducida en células senescentes (Ota y cols., 2007). En la figura 51A se muestra que el estímulo con IL-1 β durante 24 horas redujo significativamente la expresión de la proteína Sirt1 a día 1, mientras que el tratamiento con MA e IL-1 β aumentó su producción con resultados significativos. Además, en las células tratadas con MA aumentó la expresión de ARNm de Sirt1 frente a las células control y también aumentó en las células tratadas con MA e IL-1 β frente a las células estimuladas únicamente con la citocina (figura 51B).

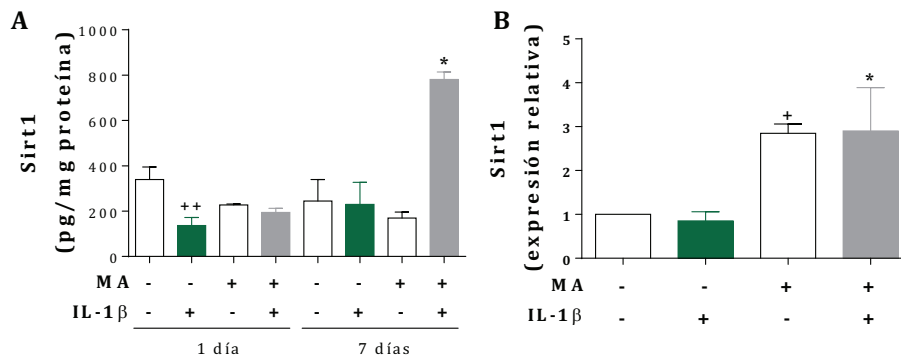


Figura 51. Efectos del MA sobre la expresión de proteína y ARNm de Sirt1 en condrocitos. A. Los niveles de proteína, medidos por ELISA en lisados celulares, se expresan en pg/mg de proteína en células incubadas durante 24 horas y 7 días en presencia o ausencia de IL-1 β y/o MA. **B.** La expresión de ARNm se determinó por PCR a tiempo real tras 24 horas de incubación y los resultados indican la expresión relativa respecto a las células no estimuladas. Resultados expresados como media \pm σ de cultivos independientes procedentes de 6 pacientes. *P < 0,05; **P < 0,01 respecto a las células no estimuladas; *P < 0,05; *P < 0,01 respecto a las células estimuladas con IL-1 β .

Para estudiar la posible implicación de Sirt1 en el daño producido en el ADN tras el estímulo con IL-1 β , se silenció el gen SIRT1 usando un siARN específico (siSirt1), y se realizó un análisis inmunofluorescente para determinar la cantidad de focos de γ H2AX.

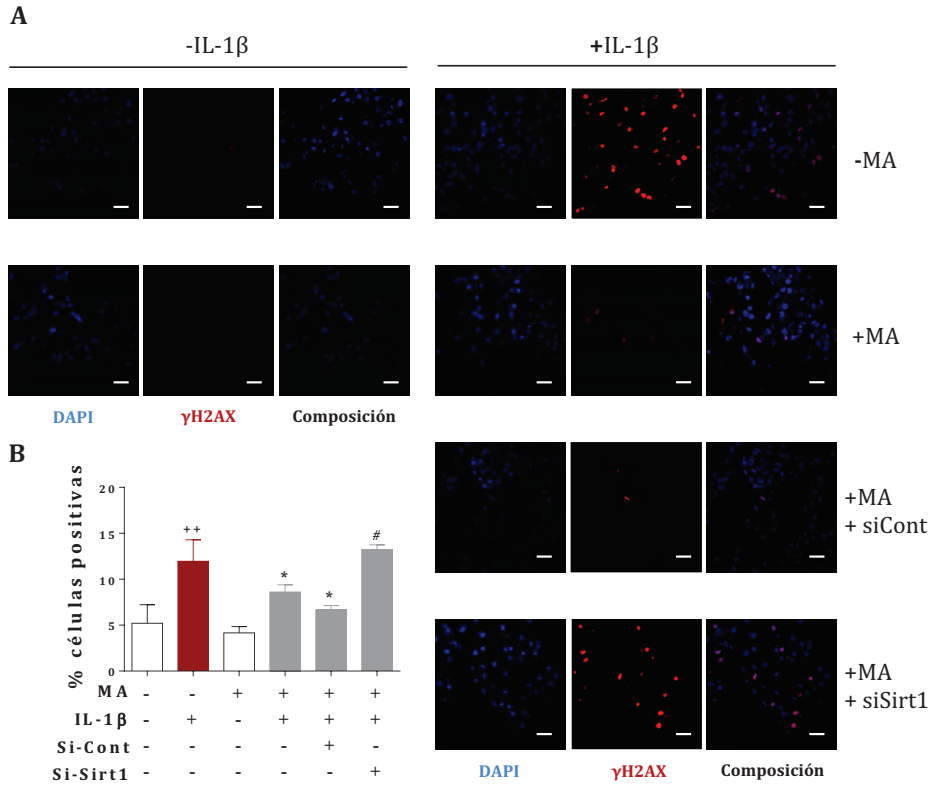


Figura 52. Estudio del porcentaje de condrocitos γ H2AX positivos. Las células en cultivo primario se incubaron durante 3 días en presencia o ausencia de IL-1 β y/o MA. **A.** Imágenes representativas mostrando la tinción de γ H2AX y DAPI. Aumento original x600. Barras: 50 μ m. **B.** Porcentaje de células γ H2AX positivas. Resultados expresados como media \pm σ de cultivos independientes procedentes de 4 pacientes. **P < 0,01 respecto a las células no estimuladas; *P < 0,05 respecto a las células estimuladas con IL-1 β ; #P < 0,05 respecto a las células tratadas IL-1 β +MA.

Como se observa en la figura 52, en condrocitos estimulados con IL-1 β aumentó el porcentaje de células que presentaban fosforilación de la histona H2AX, en comparación con los no estimulados. Este efecto se revirtió en células estimuladas con la citocina y tratadas con MA, así como en las células estimuladas con la citocina, tratadas con MA y transfectadas con ARNsi control (siCont). Sin embargo, el porcentaje de células positivas no se modificó respecto a las células transfectadas con siSirt1, estimuladas con IL-1 β y tratadas con MA.

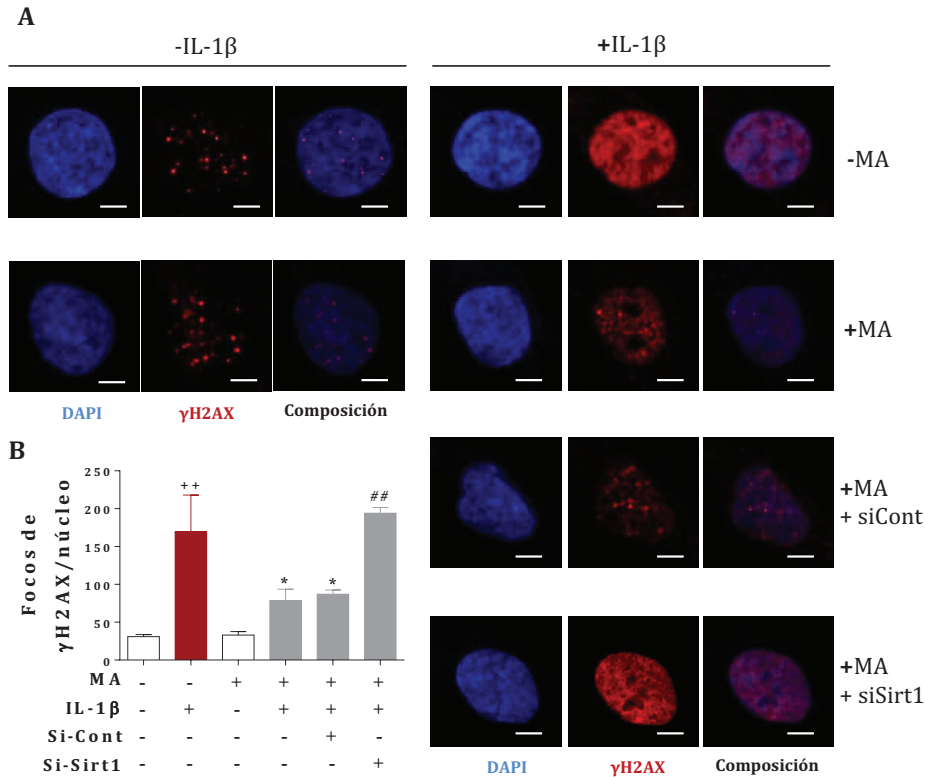


Figura 53. Estudio del número de focos γ H2AX por núcleo celular en condrocitos. Las células en cultivo primario se incubaron durante 3 días en presencia o ausencia de IL-1 β y/o MA. **A.** Imágenes representativas de los focos de γ H2AX en el núcleo celular. Aumento original x600. Barras: 5 μ m. **B.** Número de focos de γ H2AX por célula. Resultados expresados como media \pm σ de cultivos independientes procedentes de 4 pacientes. ⁺⁺P < 0,01 respecto a las células no estimuladas; ^{*}P < 0,05 respecto a las células estimuladas con IL-1 β ; ^{##}P < 0,01 respecto a las células tratadas IL-1 β +MA.

El análisis de los núcleos reveló que los condrocitos estimulados con IL-1 β presentaban un mayor número de focos de γ H2AX que las células control, mientras el tratamiento con MA de las células estimuladas disminuía considerablemente el número de focos por núcleo. Esta disminución se mantenía si las células tratadas se transfectaban con siCont, pero no se modificaba si se transfectaban con siSirt1 (figura 53).

4.7. Efecto del MA sobre la activación de MAPKs

Posteriormente, se estudió la activación de proteínas de señalización implicadas en la vía de respuesta al estrés oxidativo. La activación de las MAPKs producida por la IL-1 β juega un papel importante en los procesos anabólicos y catabólicos del cartílago (Fan y cols., 2007).

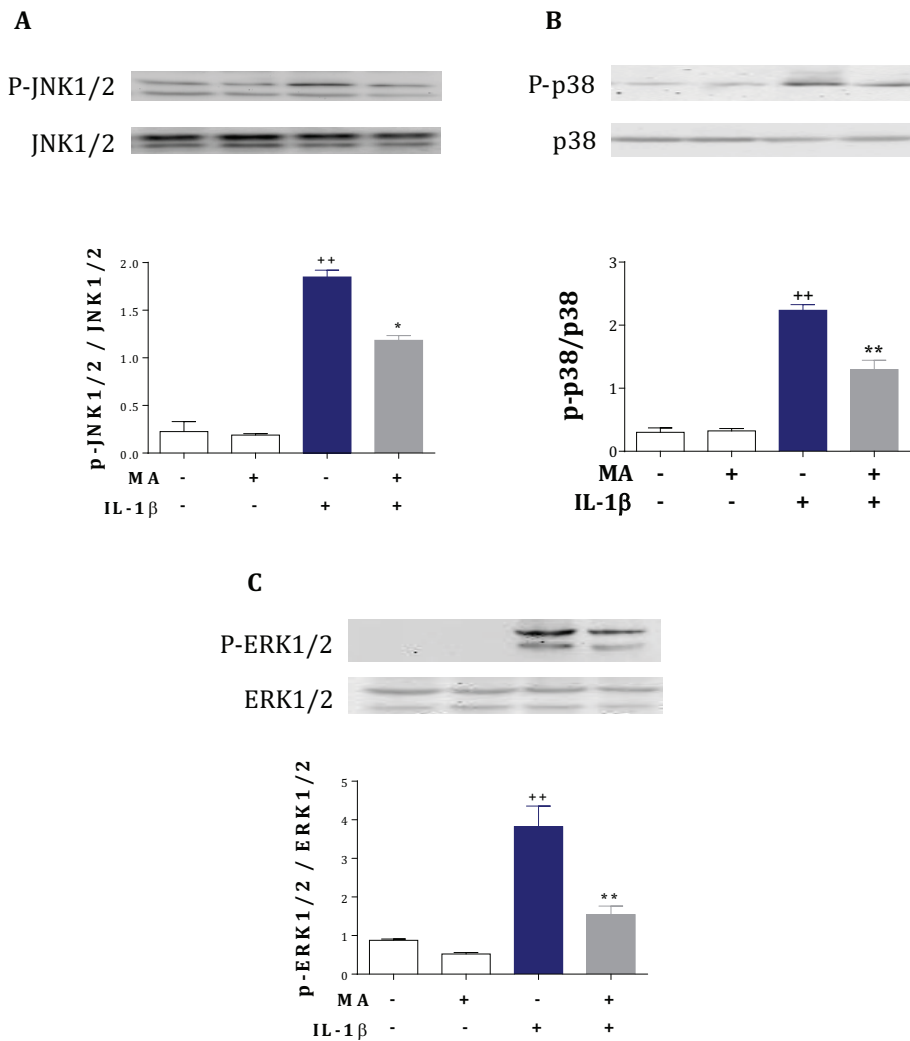


Figura 54. Efectos del MA sobre la fosforilación de MAPKs en condrocitos. La expresión de ERK1/2 (A), p38 (B), y JNK (C) fosforiladas y totales en lisados celulares se analizó por Western-Blot. Las células se incubaron durante 15 minutos en presencia o ausencia de IL-1 β y/o MA. La expresión relativa de las bandas de proteína fosforilada y total se calculó tras un análisis densitométrico. Resultados expresados como media \pm σ de cultivos independientes procedentes de 4 pacientes. **P < 0,01 respecto a las células no estimuladas; *P < 0,05 respecto a las células estimuladas con IL-1 β .

La posible modificación de esta vía por el tratamiento con el MA se analizó empleando la técnica de Western Blot. En la figura 54 se muestra como la estimulación de los condrocitos con IL-1 β produjo una rápida inducción de la fosforilación de ERK1/2, JNK1/2 y p38 a 15 minutos. El tratamiento con MA inhibió significativamente la fosforilación de las MAPKs en condrocitos estimulados con IL-1 β .

5. Efectos de los péptidos PTHrP sobre la senescencia celular inducida por estrés en osteoblastos osteoarthríticos

La secreción de proteínas de la matriz ósea por parte de los osteoblastos en pacientes con OA disminuye gradualmente conforme aumenta la edad. Esto conlleva una pérdida de masa ósea que se ha relacionado con un mayor número de osteoblastos senescentes y por lo tanto, un menor número de osteoblastos activos (Yudoh y cols., 2000).

En esta serie de ensayos se ha estudiado el papel de los péptidos PTHrP (1-37), PTHrP (107-111) y PTHrP (107-139) sobre la SIPS en cultivos de osteoblastos humanos osteoartríticos. Para ello se utilizó la IL-1 β , ya que en nuestro grupo de investigación se ha observado que esta citocina provoca una respuesta de estrés inflamatorio que conduce a la aparición de características senescentes en estas mismas células (Clérigues y cols., 2012). Una vez estimulados los cultivos, se determinaron diferentes marcadores de senescencia, como es la SA- β -Gal, la morfología de las fibras de F-actina, la presencia de focos de γ H2AX o los factores p53, p21, p16 y caveolina-1.

El tratamiento con los péptidos PTHrP y el estímulo con la citocina se realizaron a tres tiempos de incubación diferentes: 24 horas, 3 días y 7 días. En este último, se realizó un re-estímulo con IL-1 β y los péptidos PTHrP a las 72 horas y además se renovó el medio de cultivo.

5.1. Efectos de los péptidos PTHrP sobre la viabilidad celular

Mediante el método de MTT analizamos si el tratamiento de los cultivos de osteoblastos humanos osteoartríticos con la IL-1 β o los péptidos PTHrP: PTHrP (1-37), PTHrP (107-111) y PTHrP (107-139), a la concentración de 100 nM, afectaban a la viabilidad celular. También se realizó el ensayo incubando las células con la combinación de la citocina con cada uno de los péptidos por separado.

Como se observa en la figura 55, la viabilidad de las células en cultivo no disminuyó tras la estimulación con IL-1 β . El tratamiento con los péptidos PTHrP o la combinación de los péptidos PTHrP y la IL-1 β , tampoco produjeron modificaciones significativas respecto a las células en estado basal.

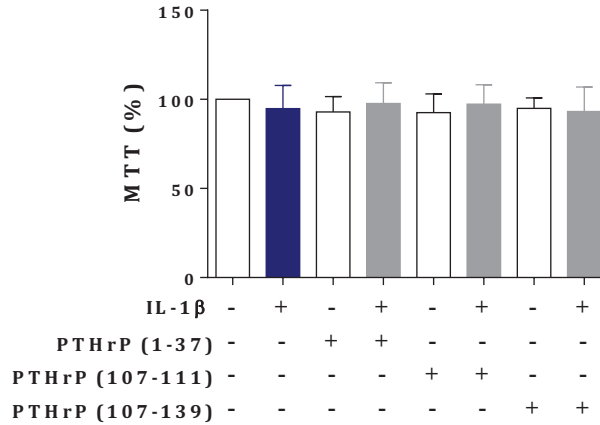


Figura 55. Efectos de los péptidos PTHrP sobre la viabilidad celular en osteoblastos. Las células se incubaron durante 7 días en presencia o ausencia de IL-1β y/o de los péptidos PTHrP. Los resultados se expresan como porcentaje respecto a las células no estimuladas. Resultados expresados como media ± σ de cultivos independientes procedentes de 3 pacientes.

5.2. Efecto de los péptidos PTHrP sobre la SA-β-Gal

Para el estudio del efecto de los péptidos PTHrP sobre la senescencia inducida por la citocina proinflamatoria IL-1β, se utilizó el biomarcador SA-β-Gal. Los cultivos de osteoblastos se incubaron durante 7 días con cada uno de los péptidos PTHrP: PTHrP (1-37), PTHrP (107-111) o PTHrP (107-139), en presencia o ausencia de IL-1β y, transcurrido este tiempo, se realizó la tinción de β-galactosidasa.

Como se muestra en la figura 56, el porcentaje de células que presentaban SA-β-Gal aumentó significativamente en osteoblastos que habían sido incubados con IL-1β respecto a los osteoblastos en estado basal. Sin embargo, en los cultivos estimulados con la citocina y tratados a su vez con uno de los péptidos PTHrP, se observó una disminución en el porcentaje de células positivas para SA-β-Gal, respecto a las células estimuladas con IL-1β. Esta disminución fue significativa únicamente en las células tratadas con los péptidos del extremo C-terminal de la PTHrP: PTHrP (107-111) y PTHrP (107-139), pero no en las tratadas con el péptido de la zona N-terminal: PTHrP (1-37)

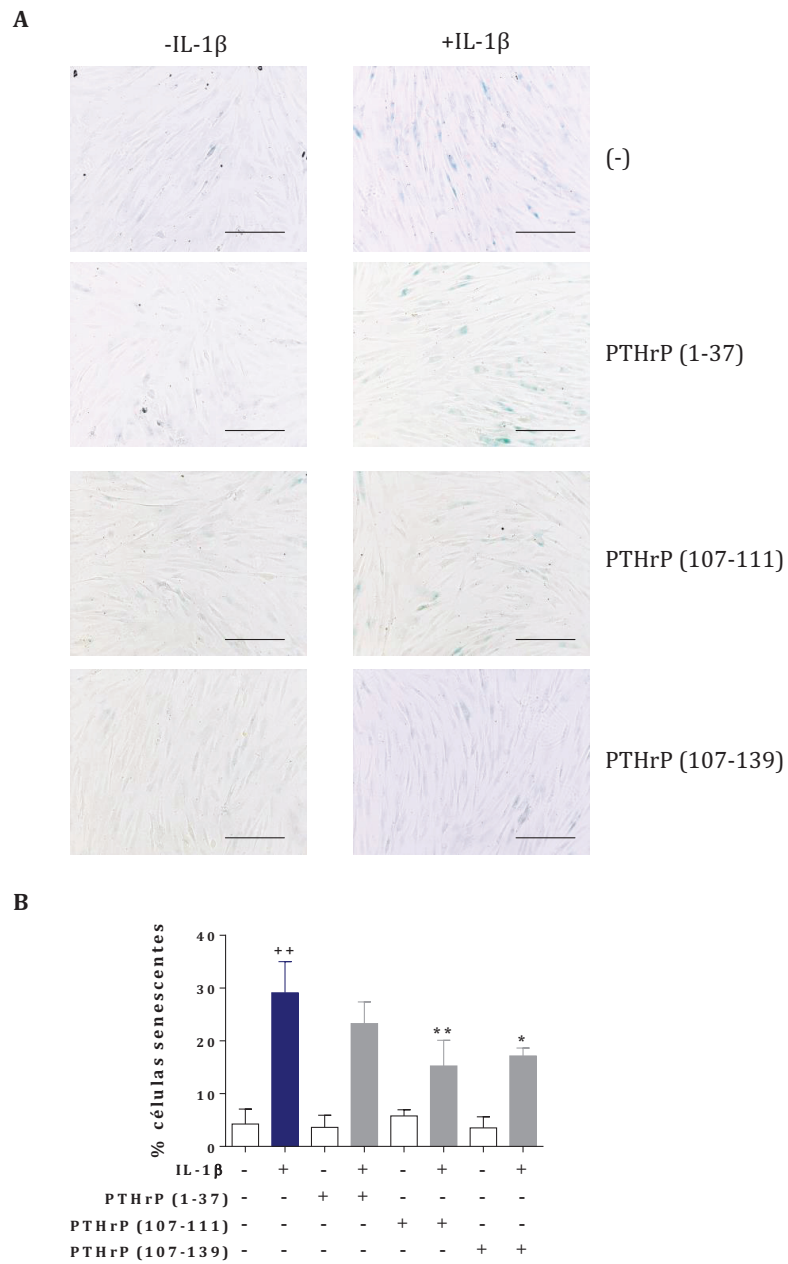


Figura 56. Estudio inmunocitoquímico de la actividad β -galactosidasa en osteoblastos. Las células se incubaron durante 7 días en presencia o ausencia de IL-1 β y/o los péptidos PTHrP. **A.** Imágenes representativas de la tinción del marcador senescente SA- β -Gal. Aumento original x200. Barras: 200 μ m. **B.** Porcentajes de células SA- β -Gal positivas con respecto al número de células totales. Resultados expresados como media \pm σ de cultivos independientes procedentes de 4 pacientes. **P < 0,01 respecto a las células no estimuladas; *P < 0,05; **P < 0,01 respecto a las células estimuladas con IL-1 β .

5.3. Efecto de los péptidos PTHrP sobre la acumulación de focos de γ H2AX

Con el fin de determinar el efecto de los péptidos PTHrP sobre el daño en el genoma, se examinó el efecto del tratamiento con estos péptidos durante dos tiempos de incubación, 24 horas (figura 57) y 7 días (figura 58), sobre la acumulación de focos de γ H2AX en los núcleos de osteoblastos osteoartríticos.

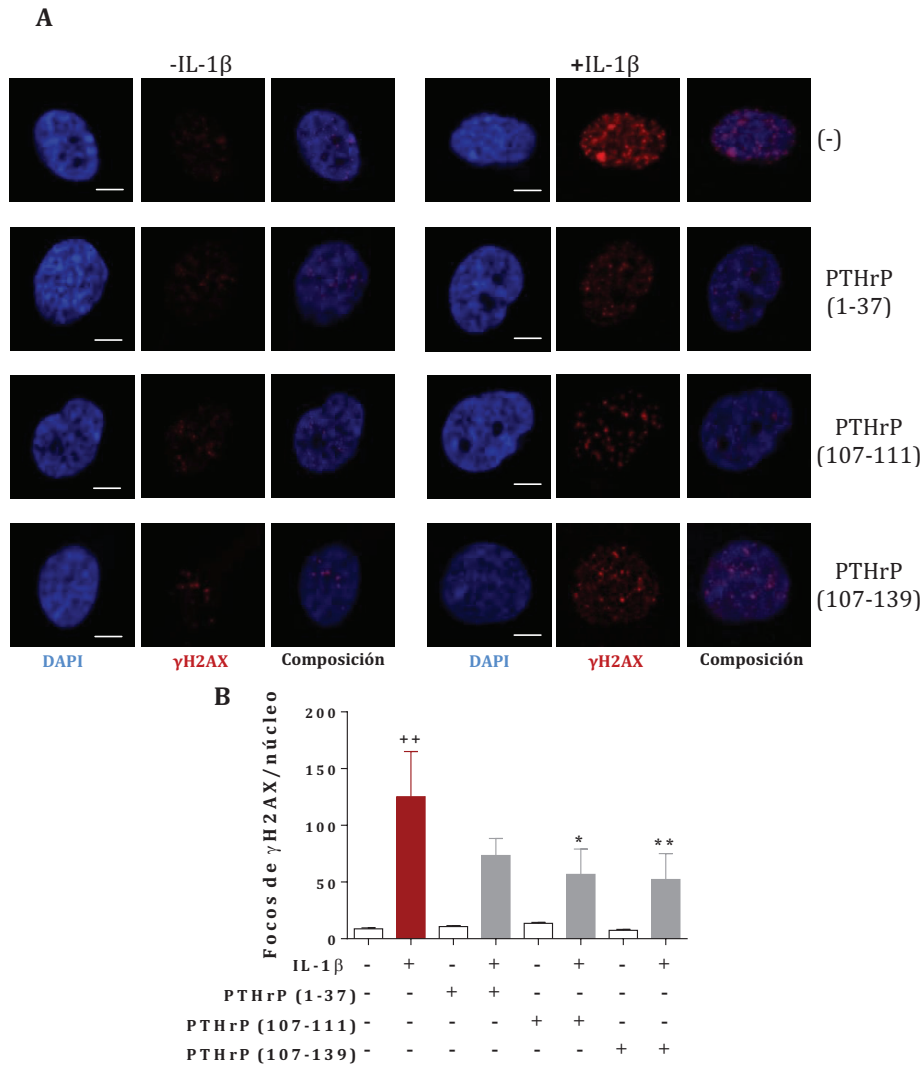


Figura 57. Estudio inmunofluorescente de los focos de γ H2AX en osteoblastos incubados durante 24 horas. Las células se incubaron durante 24 horas en presencia o ausencia de IL-1 β y/o los péptidos PTHrP. **A.** Imágenes representativas de los focos de γ H2AX en el núcleo celular. Aumento original x600. Barras: 5 μ m. **B.** Número de focos de γ H2AX por célula. Resultados expresados como media \pm σ de cultivos independientes procedentes de 4 pacientes. **P < 0,01 respecto a las células no estimuladas; *P < 0,05; **P < 0,01 respecto a las células estimuladas con IL-1 β .

La cuantificación de los focos nucleares de γ H2AX mostró un aumento significativo en el número de focos por núcleo tras el estímulo con IL-1 β durante 24 horas (figura 57B) y 7 días (figura 58B) respecto a las células basales.

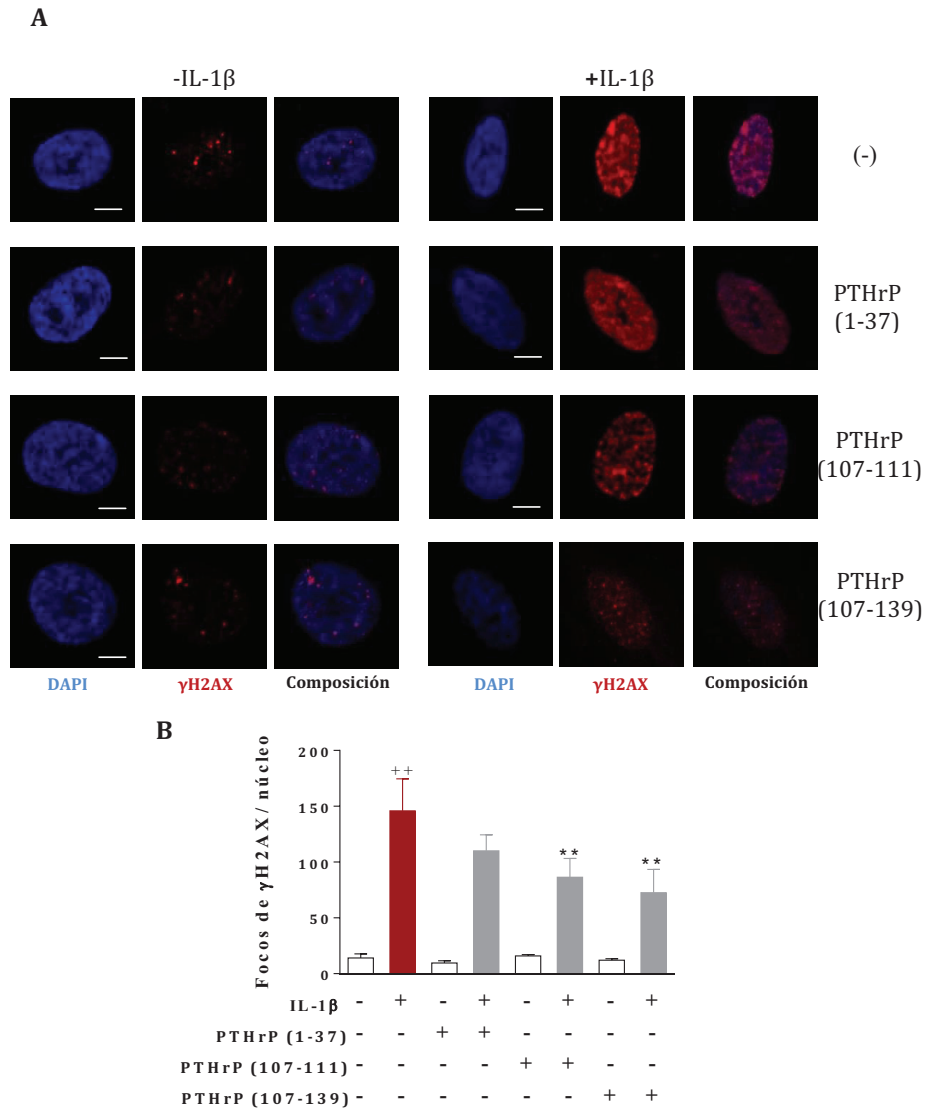


Figura 58. Estudio inmunofluorescente de los focos de γ H2AX en osteoblastos incubados durante 7 días. Las células se incubaron durante 7 días en presencia o ausencia de IL-1 β y/o los péptidos PTHrP. **A.** Imágenes representativas de los focos de γ H2AX en el núcleo celular. Aumento original x600. Barras: 5 μ m. **B.** Número de focos de γ H2AX por célula. Resultados expresados como media \pm σ de cultivos independientes procedentes de 4 pacientes. ⁺⁺P < 0,01 respecto a las células no estimuladas; ^{**}P < 0,01 respecto a las células estimuladas con IL-1 β .

El tratamiento de los cultivos con cada uno de los péptidos PTHrP por separado, no produjo ninguna variación en el número de focos de γ H2AX por núcleo, manteniendo valores similares a los obtenidos por las células basales a los dos tiempos ensayados. Sin embargo, si se comparan los focos de γ H2AX de los cultivos estimulados únicamente con IL-1 β con los de los cultivos estimulados con esta citocina y tratados con cada uno de los péptidos por separado, sí que se producen diferencias. En el caso del tratamiento de las células, estimuladas con IL-1 β , con el péptido N-terminal: PTHrP (1-37), se observa una ligera disminución en la cantidad de focos de γ H2AX, aunque esta variación no es significativa. Por otra parte, sí que se observó una disminución significativa en la cantidad de focos, tanto a 24 horas como a 7 días de incubación de las células estimuladas con IL-1 β , con los péptidos C-terminales: PTHrP (107-111) y PTHrP (107-139), respecto a las células estimuladas únicamente con esta citocina.

5.4. Efecto de los péptidos PTHrP sobre la expresión de ARNm de p53, p21, p16 y caveolina-1

A continuación, para confirmar los efectos positivos del tratamiento con los péptidos PTHrP sobre el marcador de senescencia SA- β -Gal y en la acumulación de focos de γ H2AX, se determinó, mediante PCR a tiempo real, la expresión génica de p53, p21, p16 y caveolina-1, considerados importantes marcadores de senescencia celular.

La expresión génica de todos estos marcadores se vio significativamente aumentada tras el estímulo de los cultivos de osteoblastos osteoartríticos con IL-1 β , como se muestra en la figura 59. Como era de esperar, este efecto fue contrarrestado de manera significativa con el tratamiento con los péptidos C-terminales de la PTHrP: PTHrP (107-111) y PTHrP (107-139), en presencia de IL-1 β . Cabe destacar que en el caso de la expresión génica de la caveolina-1, tanto el tratamiento con los péptidos C-terminales como con el péptido N-terminal PTHrP (1-37) redujeron significativamente la expresión de ARNm en presencia de IL-1 β .

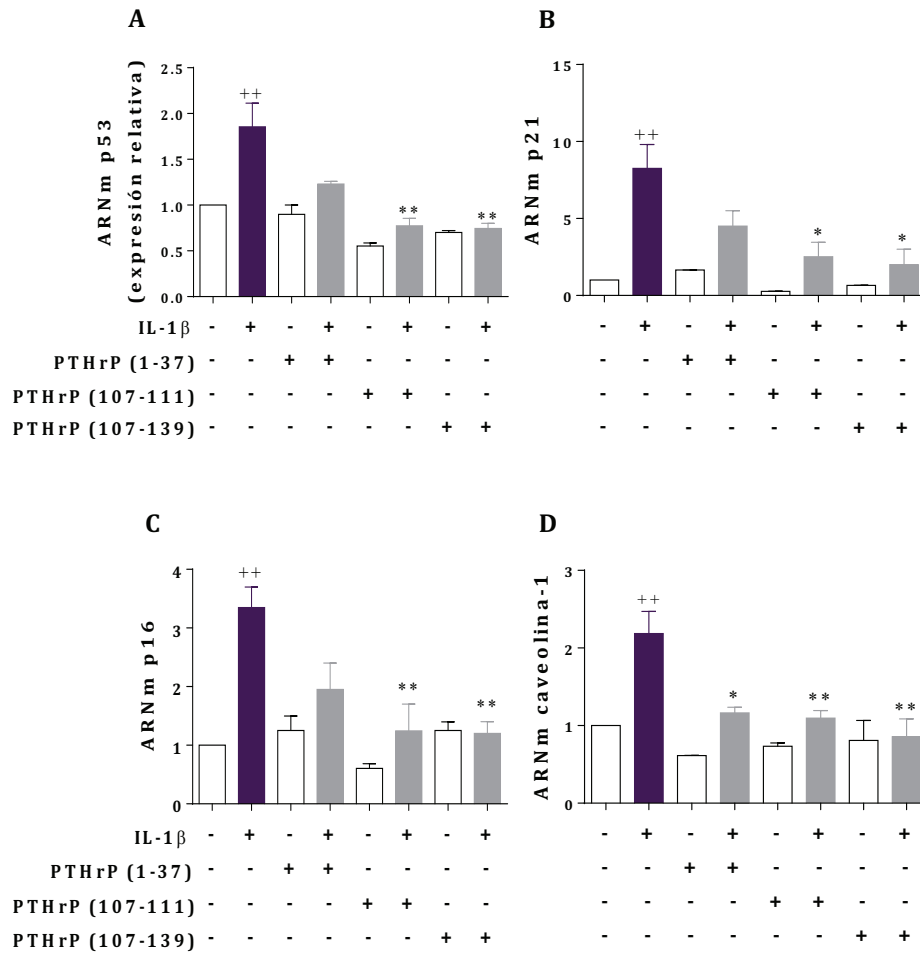


Figura 59. Efectos de los péptidos PTHrP sobre la expresión de ARNm de p53 (A), p21 (B), p16 (C) y caveolina-1 (D) en osteoblastos. La expresión de ARNm se determinó por PCR a tiempo real tras 24 horas de incubación y los resultados se indican la expresión relativa respecto a las células no estimuladas. Resultados expresados como media \pm σ de cultivos independientes procedentes de 6 pacientes. ⁺⁺P < 0,01 respecto a las células no estimuladas; ^{*}P < 0,05; ^{**}P < 0,01 respecto a las células estimuladas con IL-1 β .

5.5. Efecto de los péptidos PTHrP sobre la producción de citocinas

La producción de citocinas pro-inflamatorias está implicada en la OA y en la senescencia celular (Goldring y Goldring, 2010; Kapoor y cols., 2011). Se evaluaron mediante ELISA los efectos del tratamiento con los péptidos PTHrP sobre la producción de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-6 en sobrenadantes celulares de cultivos de osteoblastos OA incubados a diferentes tiempos.

La producción de IL-6 aumentó significativamente tras el estímulo con IL-1 β en los cultivos de osteoblastos osteoartríticos a los tres tiempos ensayados, 1, 3 y 7 días, alcanzando niveles máximos a los días 3 y 7 (figura 60). Tanto PTHrP (107-111) como PTHrP (107-139) redujeron significativamente los niveles de IL-6 a los 3 días de incubación en células estimuladas con IL-1 β , mientras que el péptido PTHrP (1-37) parece no ser efectivo en este caso.

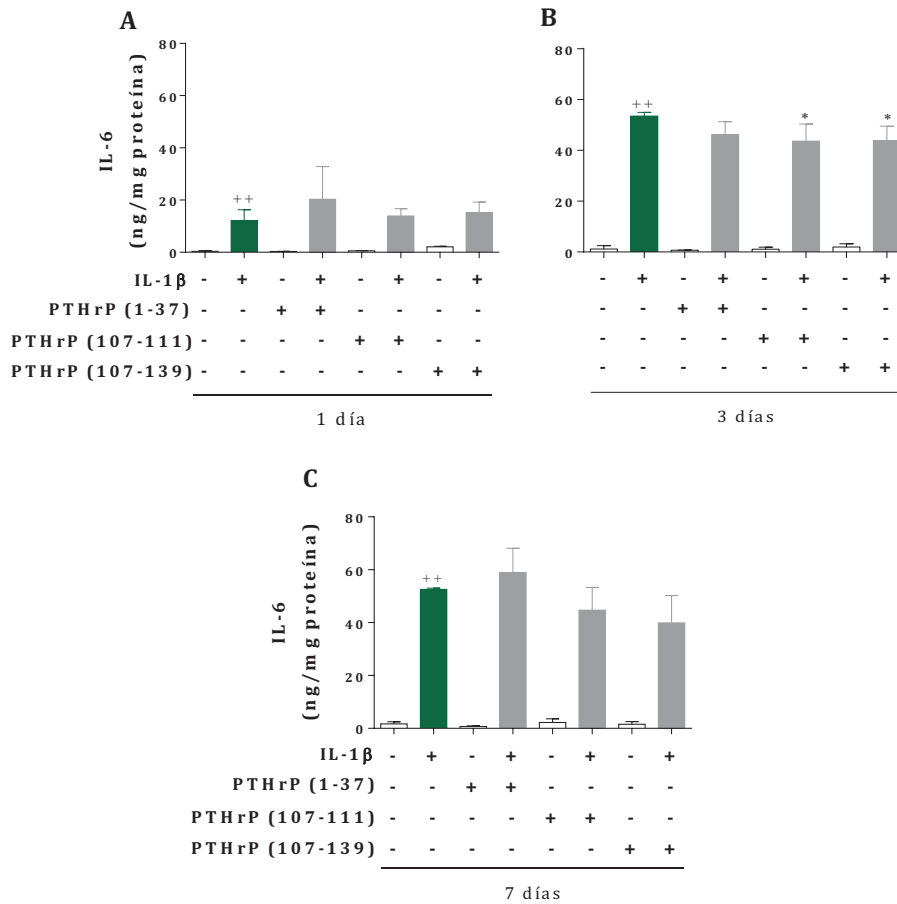


Figura 60. Efectos de los péptidos derivados PTHrP sobre los niveles de proteína de IL-6 en osteoblastos. Los niveles de proteína, medidos por ELISA, se expresan en ng/mg de proteína en células incubadas durante 1 (A), 3 (B) y 7 días (C) en presencia o ausencia de IL-1 β y/o de los péptidos PTHrP. Resultados expresados como media \pm σ de cultivos independientes procedentes de 6 pacientes. ++P < 0,01 respecto a las células no estimuladas; *P < 0,05 respecto a las células estimuladas con IL-1 β .

La IL-1 β indujo además la liberación de TNF- α tras 24 horas de estímulo, aunque los niveles de esta citocina se redujeron a 3 y 7 días de incubación. Solo el

tratamiento con PTHrP (107-139) provocó una disminución significativa de TNF- α en células estimuladas con IL-1 β a los días 1 y 3 (figura 61).

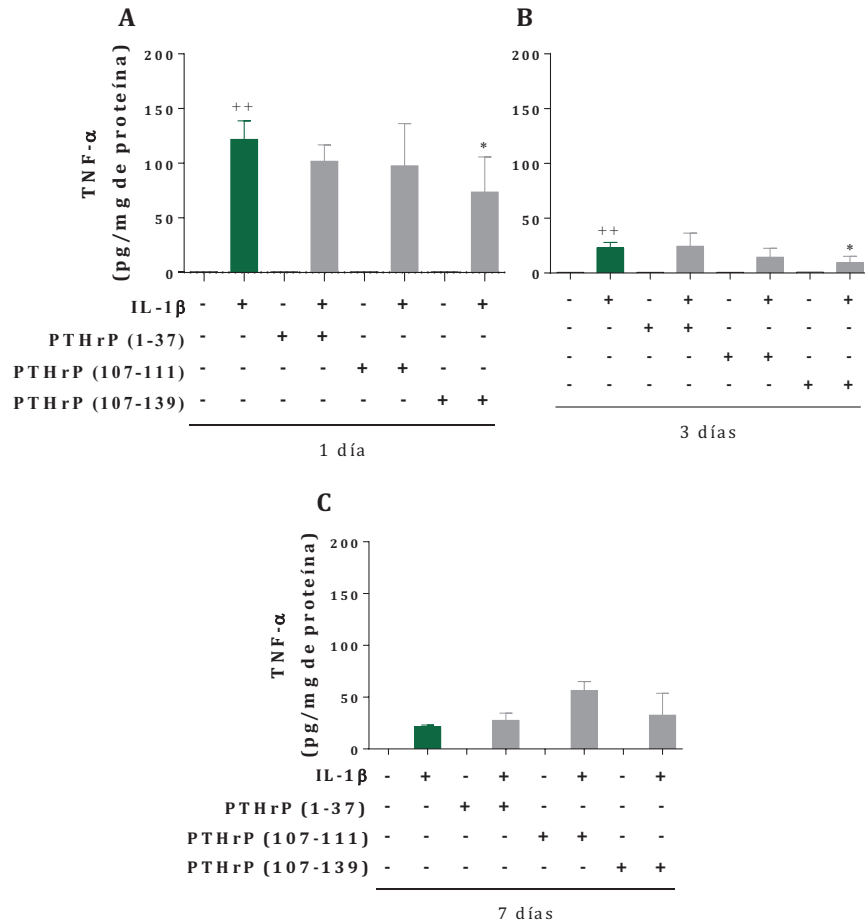


Figura 61. Efectos de los péptidos derivados PTHrP sobre los niveles de proteína de TNF α en osteoblastos. Los niveles de proteína, medidos por ELISA, se expresan en pg/mg de proteína en células incubadas durante 1 (A), 3 (B) y 7 días (C) en presencia o ausencia de IL-1 β y/o de los péptidos PTHrP. Resultados expresados como media \pm σ de cultivos independientes procedentes de 6 pacientes. ⁺⁺P < 0,01 respecto a las células no estimuladas; ^{*}P < 0,05 respecto a las células estimuladas con IL-1 β .

5.6. Efecto de los péptidos PTHrP sobre la producción de PGE₂ y la expresión de ARNm de COX-2

Muchos de los efectos de las citocinas proinflamatorias en osteoblastos están mediados por el aumento de la producción de los prostanoideos, principalmente de PGE₂ tras la inducción de COX-2 (Park y cols., 2004b). En la

figura 62 se observa que la incubación de los osteoblastos OA con IL-1 β produjo un aumento en la producción de este prostanoide a 24 horas, con un aumento mayor a 3 y 7 días. Sin embargo, la producción de PGE $_2$ inducida por IL-1 β se redujo significativamente por el tratamiento con PTHrP (107-111) y PTHrP (107-139) a 3 y 7 días. En contraste, el péptido PTHrP (1-37) no afectó a los niveles de PGE $_2$.

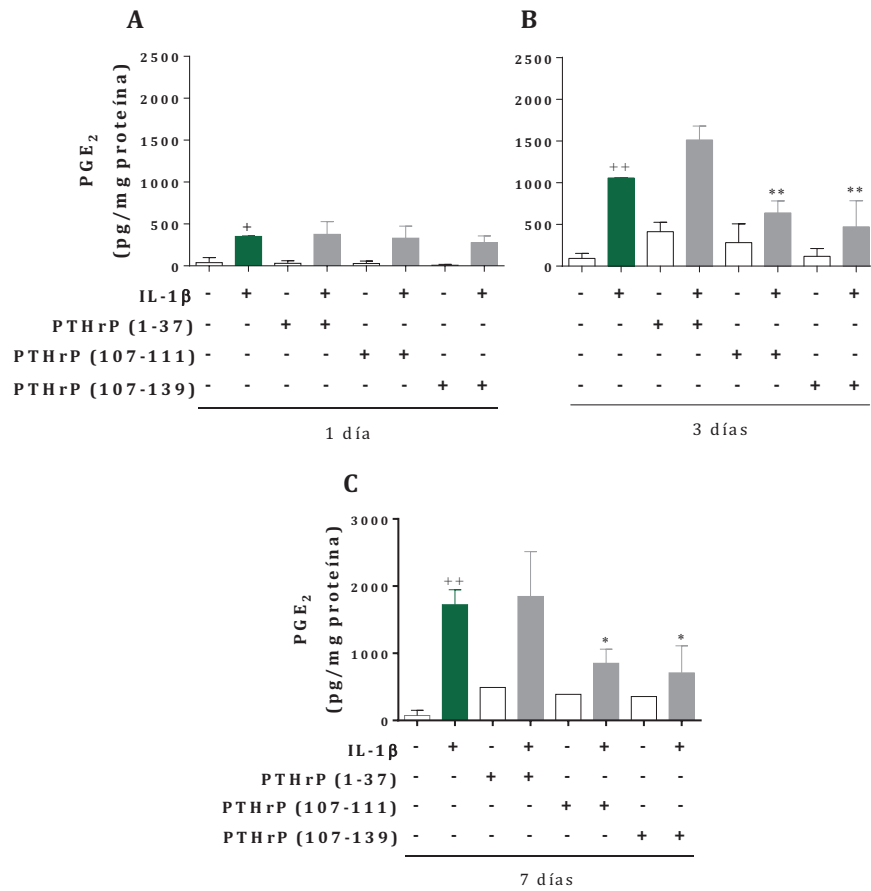


Fig. 62. Efectos de los péptidos derivados PTHrP sobre los niveles de PGE $_2$ en osteoblastos. Los niveles de PGE $_2$, medidos por RIA, se expresan en pg/mg de proteína en células incubadas durante 1 (A), 3 (B) y 7 días (C) en presencia o ausencia de IL-1 β y/o de los péptidos PTHrP. Resultados expresados como media \pm σ de cultivos independientes procedentes de 4 pacientes. ++P < 0.0 respecto a las células no estimuladas; *P < 0.05; **P < 0.01 respecto a las células estimuladas con IL-1 β .

Posteriormente, se realizó un estudio inmunocitoquímico para determinar los niveles de expresión de la principal enzima productora de PGE $_2$, la COX-2, en el cultivo de osteoblastos osteoartóricos a los 3 días de estímulo.

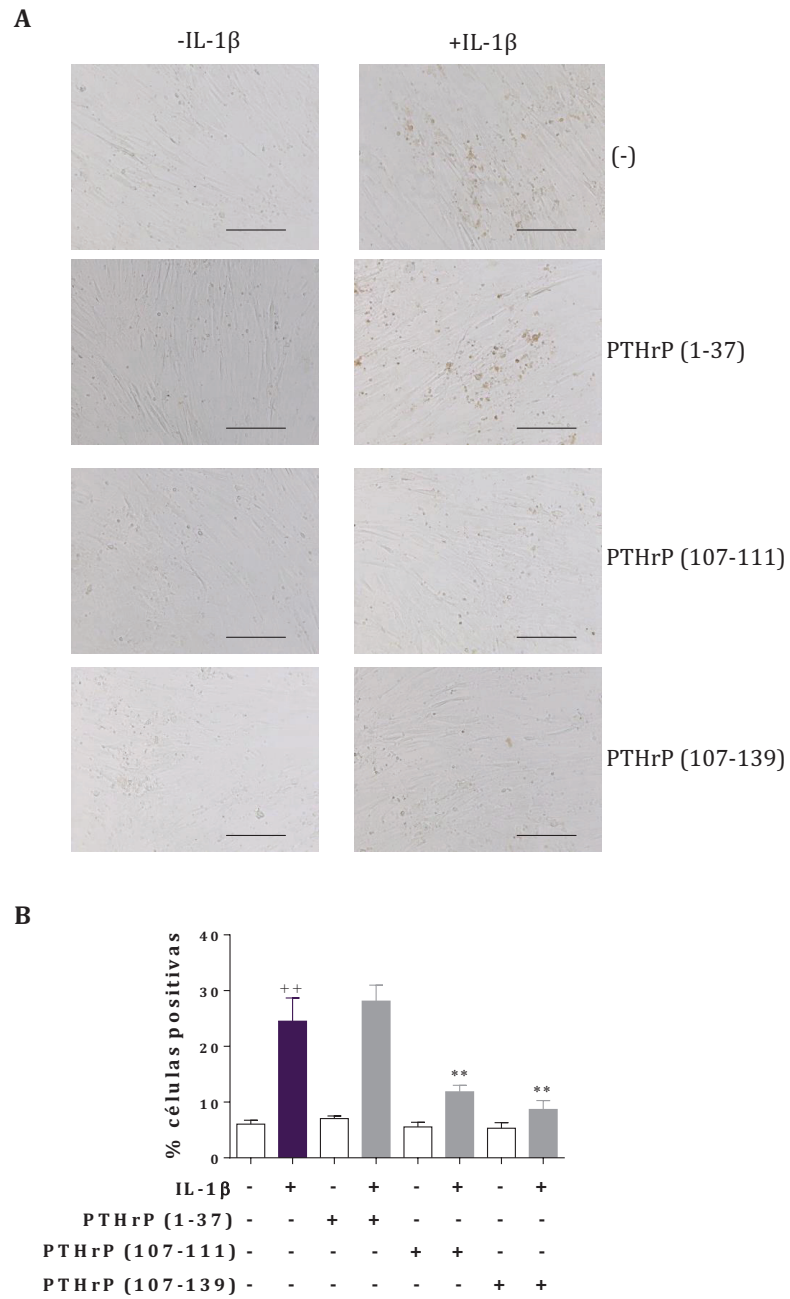


Figura 63. Análisis inmunocitoquímico de la expresión de COX-2 en osteoblastos. Las células se incubaron durante 3 días en presencia o ausencia de IL-1 β y/o de los péptidos PTHrP. **A.** Imágenes representativas de la tinción COX-2. Aumento original x600. Barras: 200 μ m. **B.** Porcentajes de células COX-2 positivas. Resultados expresados como media \pm σ de cultivos independientes procedentes de 4 pacientes. ⁺⁺P < 0.01 respecto a las células no estimuladas; ^{**}P < 0.01 respecto a las células estimuladas con IL-1 β .

Como se observa en la figura 63, el estímulo con IL-1 β provocó un aumento significativo del porcentaje de células que expresaban esta enzima, mientras que los péptidos PTHrP (107-111) y PTHrP (107-139) revirtieron este efecto.

Además, el estudio por PCR de la expresión de ARNm de COX-2 mostró efectos similares (figura 64). El estímulo con IL-1 β produjo un aumento en la expresión de COX-2, que fue únicamente revertido con el tratamiento de PTHrP (107-111) y PTHrP (107-139) en presencia de esta citocina.

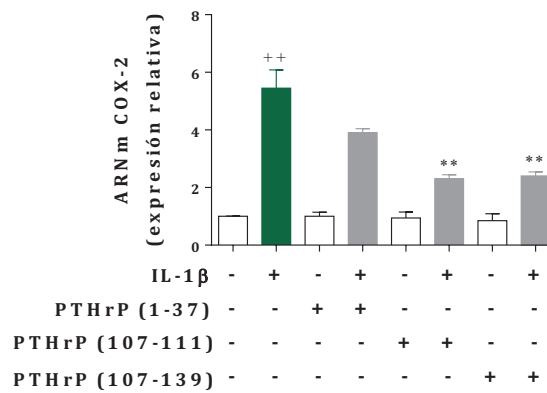


Figura 64. Efectos de los péptidos PTHrP sobre la expresión de ARNm de COX-2 en osteoblastos. La expresión de ARNm se determinó por PCR a tiempo real en células incubadas durante 24 horas en presencia o ausencia de IL-1 β y/o de los péptidos PTHrP y los resultados indican la expresión relativa respecto a las células no estimuladas. Resultados expresados como media \pm σ de cultivos independientes procedentes de 6 pacientes. **P < 0,01 respecto a las células no estimuladas; *P < 0,05; **P < 0,01 respecto a las células estimuladas con IL-1 β .

5.7. Efecto de los péptidos PTHrP sobre la distribución de F-actina

Posteriormente se estudiaron los efectos de los péptidos PTHrP en los cambios morfológicos de la organización del citoesqueleto en osteoblastos OA. La polimerización de las fibras de actina es una respuesta a estrés, y también promueve la adhesión y función osteoblástica (El-Amin y cols., 2003).

El análisis inmunofluorescente mostró que los osteoblastos formaban fibras finas de actina, mientras que en los cultivos celulares incubados en presencia de IL-1 β durante 3 días se produjo un aumento en los filamentos de la actina polimerizada (figura 65). En las células tratadas con PTHrP (107-111) y PTHrP

(107-139) se formaron largos filamentos de actina, y en menor medida con PTHrP (1-37), tanto en presencia como en ausencia de IL-1 β .

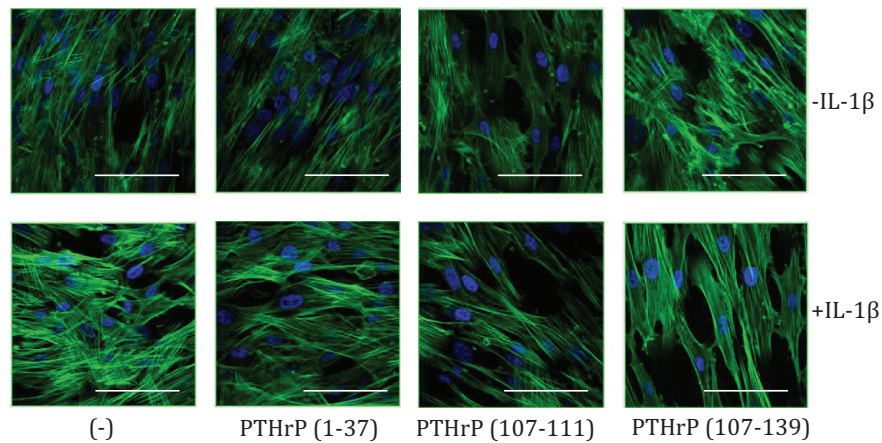


Figura 65. Análisis inmunofluorescente de F-actina en osteoblastos. Las células se incubaron durante 3 días en presencia o ausencia de IL-1 β y/o de los péptidos PTHrP. La tinción de las fibras de actina en las células se realizó con faloidina Alexa Fluor 488 (en verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (en azul). Imágenes representativas de la presencia de fibras de F-actina. Aumento original x600. Barras: 50 μ m.

5.8. Efecto de los péptidos PTHrP sobre la mineralización ósea

En estudios previos hemos observado que los péptidos PTHrP tienen la capacidad de aumentar la mineralización ósea (Esbrit y Alcaraz, 2013). El estudio de la formación de una matriz de mineralización ósea nos informa de la capacidad de formación de hueso por los osteoblastos. Con el fin de conocer el comportamiento de estos péptidos sobre la capacidad de sintetizar matriz ósea en los cultivos de osteoblastos osteoartríticos empleados en nuestros ensayos, se realizó una tinción de rojo alizarina para evaluar los depósitos ricos en calcio.

Como se muestra en la figura 66, el estímulo de las células con IL-1 β produjo un débil incremento de la mineralización comparado con las células no estimuladas. Las células estimuladas con IL-1 β y tratadas con cada uno de los péptidos estudiados aumentaron la mineralización de la matriz extracelular de manera significativa en todos los casos, especialmente PTHrP (107-139). Este

péptido produjo un aumento en la mineralización de la matriz extracelular en ausencia de estímulo pro-inflamatorio.

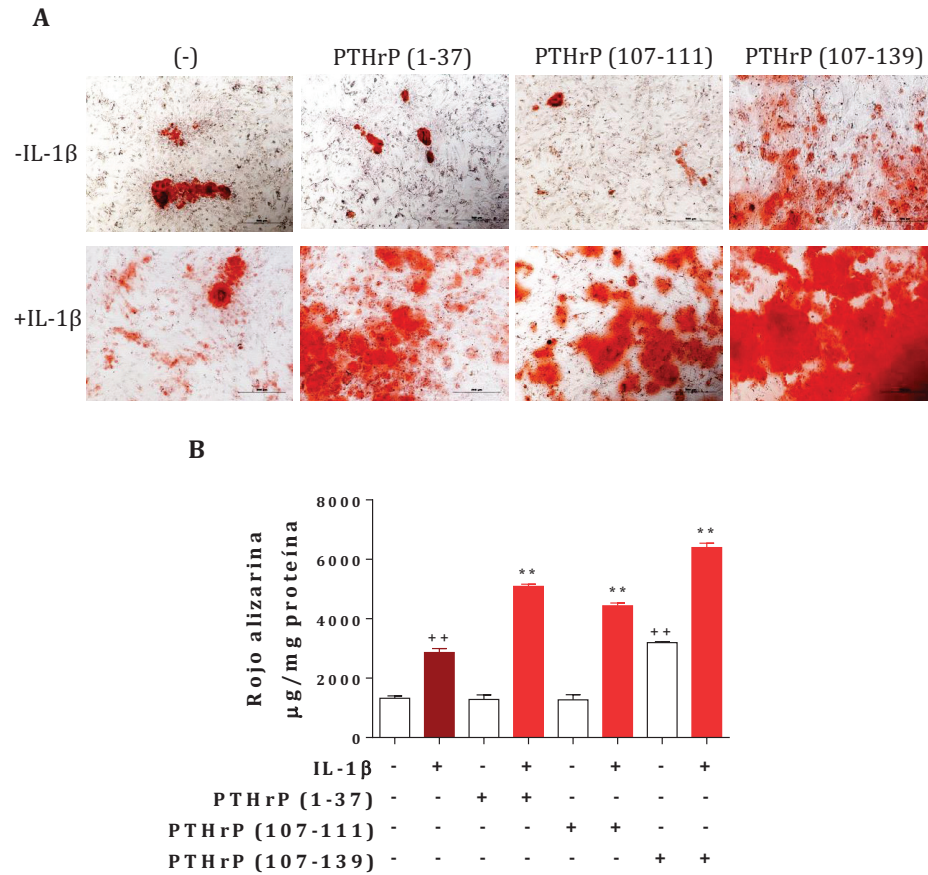


Figura 66. Efecto del tratamiento con los péptidos PTHrP sobre la mineralización en osteoblastos. Las células se incubaron con los péptidos durante 14 días en presencia o ausencia de IL-1 β y/o de los péptidos PTHrP. **A.** Imágenes representativas mostrando la tinción celular con rojo alizarina. Aumento original 40x. **B.** Cuantificación de la tinción con rojo alizarina. Resultados expresados como media \pm σ de cultivos independientes procedentes de 3 pacientes. ++P < 0.01 respecto a las células no estimuladas; **P < 0.01 respecto a las células estimuladas con IL-1 β .

5.9. Efecto de los péptidos PTHrP sobre la expresión de ARNm de MMP-1 y MMP-3

Con el fin de determinar si MMP-1 y MMP-3, enzimas implicadas en la degradación de la matriz extracelular en la OA, sufrían modificaciones tras el tratamiento con los péptidos PTHrP, se evaluó la expresión de ARNm por PCR a

tiempo real. Se observó un potente aumento en la expresión génica de ambas MMPs al estimular las células con IL-1 β (figura 67). El tratamiento con cada uno de los péptidos ensayados dio lugar a una significativa reducción de dichas MMPs en células estimuladas con la citocina IL-1 β .

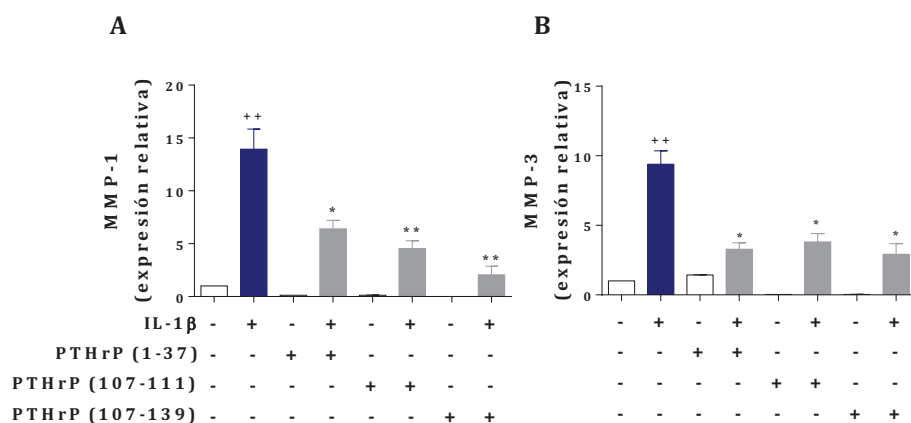


Figura 67. Efectos de los péptidos PTHrP sobre la expresión de ARNm de MMP-1 (A) y MMP-3 (B) en osteoblastos. La expresión de ARNm se determinó por PCR a tiempo real en células incubadas durante 24 horas en presencia o ausencia de IL-1 β y/o de los péptidos PTHrP y los resultados indican la expresión relativa respecto a las células no estimuladas. Resultados expresados como media \pm σ de cultivos independientes procedentes de 4 pacientes. ⁺⁺P < 0,01 respecto a las células no estimuladas; ^{*}P < 0,05; ^{**}P < 0,01 respecto a las células estimuladas con IL-1 β .

5.10. Efecto de los péptidos PTHrP sobre la activación de NF- κ B y AP-1

El factor de transcripción NF- κ B es un factor clave en la regulación de la expresión de mediadores de inflamación y senescencia (Barnes y Karin, 1997; Muñoz-Espín y Serrano, 2014). Se estudió la activación de los factores de transcripción implicados en la expresión de genes proinflamatorios y senescentes, NF- κ B y AP-1. Como se muestra en la figura 68, la adición de IL-1 β aumentó la unión del NF- κ B al ADN en los cultivos de osteoblastos tras 24 horas de estímulo, efecto que fue revertido en el caso de los péptidos C-terminales, PTHrP (107-111) y PTHrP (107-139).

Por otra parte, se ha descrito que el factor AP-1 se activa en presencia de la citocina IL-1 β (Schmucker y cols., 2012). En nuestro estudio, la unión AP-1-ADN aumentó en presencia de la citocina IL-1 β , mientras que el tratamiento con el

péptido PTHrP (107-111) condujo a una reducción significativa de esta activación en células estimuladas con la citocina proinflamatoria.

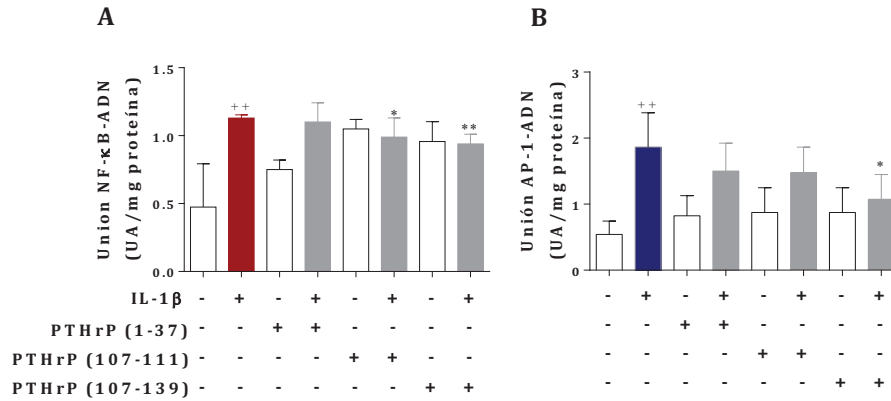


Figura 68. Efecto del tratamiento con péptidos derivados PTHrP sobre la activación de NF-κB (A) y AP-1 (B) en osteoblastos. La unión de NF-κB y AP-1 al ADN, medido por ELISA en extractos nucleares, se expresa en UA/mg de proteína en células incubadas durante 24 horas en presencia o ausencia de IL-1β y/o los péptidos PTHrP. Resultados expresados como media ± σ de cultivos independientes procedentes de 4 pacientes. ⁺⁺P < 0,01 respecto a las células no estimuladas; ^{*}P < 0,05; ^{**}P < 0,01 respecto a las células estimuladas con IL-1β.

DISCUSIÓN

1. Estudio de la composición del MA procedente de las ASCs

Las MSCs se consideran una terapia prometedora para el tratamiento de una gran variedad de patologías, incluyendo enfermedades cardiovasculares, degenerativas y autoinmunes (Salem y cols., 2010). El potencial terapéutico de las MSCs está asociado a sus propiedades como la capacidad de diferenciación multipotencial, los efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios, y la secreción de moléculas con actividad paracrina. La mayoría de los estudios apoyan la teoría de que la diferenciación multipotencial de estas células contribuye mínimamente a los efectos beneficiosos que se les atribuyen, mientras que la actividad paracrina puede desempeñar un papel más relevante tanto en la reparación tisular como en el control de proceso inflamatorios e inmunitarios (Lavoie y Rosu-Myles, 2013).

Los datos publicados sobre la composición proteica del secretoma de las MSCs indican que es muy variable y depende de numerosos factores, como el origen de las células, las condiciones de experimentación y los métodos de detección empleados (Kapur y Katz, 2013). Los efectos paracrinos de las MSCs podrían depender de la producción de diferentes tipos de mediadores como citocinas, PGE₂ o una sinergia de diversos mediadores (Nemeth y cols., 2009; Wei y cols., 2009; Manferdini y cols., 2013). Como una primera aproximación para determinar la composición del MA procedente de las ASCs utilizado en nuestro trabajo, se ha empleado un *array* que detecta 60 proteínas, incluyendo factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas. Nuestros resultados indican la presencia en el MA del factor de crecimiento GM-CSF y de las citocinas IL-6 e IL-10, que se han descrito como mediadores de los efectos inmunomoduladores de las MSCs, confirmando los resultados obtenidos en trabajos anteriores sobre el secretoma de las ASCs (Ivanova-Todorova y cols., 2009; Soleymanejadian y cols., 2012; Kapur y Katz, 2013). En el *array* del secretoma de las ASCs se observó también la presencia de diferentes quimiocinas: CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CCL7/MCP-3, CCL8/MCP-2, CCL11/eotaxina, CCL15/MIP-1 δ , CCL20/MIP-3 α , CCL22/MDC, CXCL6/GCP-2 y CXCL7/NAP-2. Estos resultados están en concordancia con varios estudios del secretoma de MSCs, que hallaron niveles elevados de factores quimiotácticos relacionados con la capacidad de reparación tisular de estas células (Heo y cols., 2011; Kapur y Katz, 2013). Por el contrario, el MA contiene EGF e IGFBP-1 y -2 en

cantidades menores al medio control y no se han detectado moléculas como IL-1Ra o TGF β 1, que se ha descrito que contribuyen en otros sistemas a las propiedades inmunomoduladoras de las MSCs (Kapur y Katz, 2013; Pers y cols., 2015).

Además de factores solubles, el MA de las ASCs contiene vesículas extracelulares. Las células secretan pequeñas vesículas que, según su tamaño, origen y modo de liberación, se clasifican en exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos. Estas vesículas contienen ARNm, micro-ARN, ADN, proteínas y lípidos, que pueden transferirse a otras células modificando su metabolismo (Nawaz y cols., 2015). Numerosos estudios apoyan la hipótesis de que la liberación de estas vesículas puede ser una respuesta celular adaptativa universal de comunicación intercelular (György y cols., 2011). Dado que estas vesículas pueden ejercer acciones paracrinas, es posible que participen en los efectos del MA observados en el presente trabajo.

Como una primera aproximación al estudio de las vesículas extracelulares producidas por las ASCs, hemos puesto a punto una técnica basada en el aislamiento secuencial de los tres tipos más importantes de vesículas, empleando la centrifugación diferencial y la filtración gravitacional. También se ha llevado a cabo la cuantificación de vesículas por el sistema qNANO. Estas vesículas son liberadas por todos los tipos celulares, aunque su composición varía en función de su origen (van der Pol y cols., 2012). Las ASCs empleadas en nuestro trabajo liberaron microvesículas y exosomas, y una mínima cantidad de cuerpos apoptóticos.

En la caracterización de las microvesículas por citometría de flujo empleamos los marcadores anexina-V y CD63. La anexina-V se considera un marcador común de microvesículas, por lo que se utiliza independientemente de su origen. Sin embargo, se ha sugerido la presencia de microvesículas negativas para anexina-V (Connor y cols., 2010; Ismail y cols., 2013), lo que estaría en concordancia con nuestros resultados, que mostraban una gran mayoría de microvesículas anexina-V negativas (98,7%). Por otra parte, un porcentaje muy bajo de microvesículas expresaban el marcador CD63 (7,7%). Esto puede indicar la presencia de diferentes subtipos de microvesículas en la muestra, aunque no se

puede excluir la contaminación de la fracción de microvesículas con agregados de exosomas, ya que CD63 es un marcador típico de estas vesículas de menor tamaño.

Dada la complejidad de la composición del MA de las ASCs, su estudio se está completando en la actualidad en nuestro grupo de investigación mediante técnicas como microscopía electrónica, transcriptómica y proteómica.

2. Efectos del MA sobre el estrés oxidativo y la inflamación en monocitos humanos

Como un ensayo previo a nuestro estudio de los efectos del MA en condrocitos articulares osteoartríticos, se han determinado los efectos del MA en monocitos y macrófagos humanos, células de fácil obtención y con un importante papel en la respuesta inflamatoria. Además, los monocitos están relacionados con la producción de mediadores inflamatorios y degradativos en el sinovio osteoartrítico (Bondeson y cols., 2006). La sinovitis que se produce durante la OA se caracteriza por hipertrofia e hiperplasia de la membrana sinovial y por la aparición de un infiltrado de células inflamatorias, principalmente monocitos, neutrófilos y linfocitos T, así como por un aumento en la angiogénesis (Haywood y cols., 2003). La estimulación de células mononucleares con LPS activa la cascada de señalización de TLR-4, dando lugar a la producción de estrés oxidativo y mediadores inflamatorios. A nivel del estrés oxidativo, se conoce que el LPS activa Nox4 y la generación de ROS (Park y cols., 2004a). También altera el potencial de membrana mitocondrial, lo que se considera un paso inicial en la producción de la muerte celular programada (Zamzami y cols., 1995), y se induce iNOS, determinando la producción de NO (Weinberg y cols., 1995). Se ha demostrado que las MSCs pueden disminuir el estrés oxidativo y la producción de NO en diferentes patologías (Lanza y cols., 2009; Tsubokawa y col., 2010; Chen y cols., 2011; van Buul y cols., 2012), lo que está en concordancia con nuestros resultados, ya que el tratamiento de las células con el MA de las ASCs previno los efectos del LPS sobre la disfunción mitocondrial y la producción de ROS y NO.

Los mediadores lipídicos, entre ellos la PGE₂, ejercen un papel importante en el desarrollo de procesos inflamatorios. Niveles elevados de este prostanoide se han relacionado con la patogénesis de la OA (Amin y cols., 2000). LPS induce COX-2

en diferentes tipos celulares, incluyendo monocitos humanos, lo que determina la producción de PGE₂ (Hempel y cols, 1994). Nuestro estudio ha demostrado que el aumento de la producción de PGE₂ inducida por LPS en monocitos humanos, es revertido por el tratamiento de las células con el MA.

La producción de quimiocinas, como CCL2, es necesaria para el reclutamiento de monocitos durante la inflamación, y son los propios macrófagos tisulares la fuente predominante de esta quimiocina (Koch y cols., 1992). En nuestro ensayo, se ha estudiado la migración de los monocitos en respuesta a CCL2 y se ha puesto de manifiesto que la presencia del MA disminuye la migración de los monocitos. El reclutamiento de las células mononucleares al foco inflamatorio se ha relacionado con el mantenimiento de la inflamación crónica (Deshmane y cols., 2009). Por otro lado, las quimiocinas pueden participar en la activación de las células articulares y la producción de mediadores degradativos como las MMPs (García-Vicuña y cols, 2004).

Cuando el monocito alcanza el tejido extravascular, se transforma en una célula fagocitaria de mayor tamaño, el macrófago. Nuestros resultados indican que el tratamiento con el MA puede regular el proceso de fagocitosis en macrófagos estimulados con LPS. Estas células contribuyen a la fase de resolución de la inflamación aguda mediante la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos. No obstante, el exceso de activación de los macrófagos ayuda a perpetuar un estado de inflamación crónica y tiene un importante papel en los procesos inflamatorios articulares (Kennedy y cols., 2011).

Por tanto, en esta parte inicial de nuestro trabajo se ha puesto de manifiesto que el MA de las ASCs reduce la producción de mediadores y modulan el desarrollo de procesos metabólicos que desempeñan un importante papel en la respuesta inflamatoria.

3. Efectos del MA de ASCs sobre la respuesta inflamatoria en cultivos primarios de condrocitos humanos osteoartroticos

Aunque no se conoce la etiología de la OA, se cree que la producción crónica de mediadores inflamatorios por los tejidos articulares contribuye a la

degradación tisular. Los niveles de citocinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF α están elevados en la membrana sinovial inflamada de pacientes con OA, existiendo también un aumento en la expresión de sus receptores. Estas citocinas median la destrucción del cartílago mediante la inducción de genes inflamatorios y catabólicos y la inhibición de factores antiinflamatorios y anabólicos en los condrocitos (Frazer y cols., 1994; Fernandes y cols., 2003). Así, se conoce que IL-1 β reduce la expresión de agregano y colágeno tipo II en el cartílago (Goldring y cols., 1994b) y aumenta la síntesis de MMPs (Mengshol y cols., 2000; Tetlow y cols., 2001), PGE₂, citocinas, quimiocinas, ROS, y NO, entre otros muchos factores que favorecen la degradación de la matriz extracelular del cartílago (Amin y Abramson, 1998; Attur y cols., 1998; Sellam y Berenbaum, 2010). Hemos utilizado un modelo *in vitro* de cultivo primario de condrocitos osteoartríticos estimulados con IL-1 β para estudiar los efectos del MA de las ASCs. Nuestros resultados indican que el MA tiene un papel protector en nuestras condiciones de experimentación, ya que ha sido capaz de aumentar la expresión de colágeno II en condrocitos no estimulados y también de contrarrestar los efectos catabólicos de IL-1 β . Este efecto es de interés puesto que las fibrillas de colágeno II son esenciales para el mantenimiento de la integridad del cartílago articular.

En el cartílago osteoartrítico existe una sobreexpresión de colagenasas como MMP-13, que representa la principal enzima catabólica para el colágeno II. MMP-13 inicia la desnaturalización de las fibrillas de esta proteína, contribuyendo en gran medida a la lesión articular (Billinghurst y cols., 1997). En este estudio se ha demostrado que el MA disminuye la expresión de enzimas catabólicas como MMP-13 y en menor grado, de MMP-3, que media la degradación de varios componentes de la matriz extracelular tanto de forma directa, como indirecta al activar a otras proteasas (Murphy y cols., 1987).

Las citocinas proinflamatorias activan a los condrocitos, provocando que sintetizen y liberen un amplio rango de mediadores inflamatorios. Nuestro estudio revela que el MA disminuye la producción de las citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF α por los condrocitos, pero aumenta la citocina antiinflamatoria IL-10. Estos efectos del MA serían relevantes para la progresión de la OA, ya que las citocinas proinflamatorias contribuyen a la pérdida del fenotipo del condrocito y a la

degeneración del cartílago (Fernandes y cols., 2002). Además, el efecto del MA sobre la IL-10 puede tener consecuencias positivas en el metabolismo del cartílago, ya que esta citocina coopera con otros factores para inhibir la destrucción del cartílago en la OA (Zhang y cols., 2004).

Los condrocitos pueden amplificar respuestas inflamatorias y catabólicas a través de la liberación de quimiocinas que promueven la inflamación, la angiogénesis sinovial (Ruth y cols., 2003; Pakozdi y cols., 2006), y la producción de mediadores catabólicos como MMPs en condrocitos osteoartóricos (Borzi y cols., 2000; Yuan y cols., 2001). Nuestros resultados indican que el MA reduce la expresión inducida por IL-1 β de varias quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL19, CCL20, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5 y CXCL8) relevantes en los procesos inflamatorios.

Los condrocitos son la fuente principal de NO en el tejido articular osteoartórico. La producción elevada de este mediador se relaciona con la degeneración articular (Studer y cols., 1999), al contribuir a la inhibición de la síntesis de la matriz extracelular, el aumento de la expresión de MMPs y a la activación de dichas enzimas (Lotz, 1999). Nuestros datos indican que el MA contrarresta el aumento en la producción de NO en condrocitos osteoartóricos estimulados con IL-1 β . Este efecto sería consecuencia de la disminución de la expresión de iNOS y podría contribuir al papel protector del MA en condrocitos osteoartóricos.

Además, el MA tiene un efecto inhibitor de la producción de PGE₂. Este eicosanoide puede contribuir a la degradación del cartílago, promoviendo la producción de MMPs e inhibiendo la síntesis de inhibidores de estas enzimas (Hardy y cols., 2002; Martel-Pelletier y cols., 2003). La COX-2 y la mPGES-1 están acopladas funcionalmente y se inducen por la acción de IL-1 β en condrocitos osteoartóricos, lo que conduce a un aumento en la síntesis de PGE₂ (Kojima y cols., 2004). Nuestro estudio ha demostrado que el efecto del MA sobre la producción de PGE₂ dependería de la reducción de la expresión de COX-2 y mPGES-1. La reducción de este mediador inflamatorio podría ser relevante para el mantenimiento de la homeostasis del cartílago.

La activación de NF- κ B juega un papel clave en la transcripción de iNOS, COX-2, MMPs, y diferentes citocinas y quimiocinas inflamatorias (Roman-Blas y Jimenez, 2006; Bondeson y cols., 2007). Para comprender el posible mecanismo por el que el MA reduce los niveles de estos mediadores, hemos estudiado los efectos del MA sobre la activación de NF- κ B. Nuestros resultados apuntan a que los efectos inhibitorios del MA sobre la expresión de moléculas catabólicas y proinflamatorias podrían depender de su capacidad para reducir la activación de NF- κ B en condrocitos osteoartríticos estimulados con IL-1 β .

4. Efectos del MA de las ASCs sobre la senescencia inducida por estrés en condrocitos osteoartríticos

En el cartílago osteoartrítico aparecen marcadores de senescencia y se cree que este proceso contribuye a la alteración de las respuestas reparadoras, con el resultado de una degeneración progresiva del cartílago (Martin y Buckwalter, 2003). La senescencia celular se clasifica en senescencia replicativa intrínseca dependiente de telómero y senescencia extrínseca independiente de telómero, la cual se induce por muchos tipos de estrés, como el estrés oxidativo o las citocinas proinflamatorias (Anderson y Loeser, 2010). El acortamiento de los telómeros debido a la repetida división celular no explica la senescencia en células quiescentes como los condrocitos, que estaría más relacionada con la senescencia inducida por estrés (Li y cols., 2013). En condrocitos, las citocinas proinflamatorias inducen una senescencia prematura o SIPS que contribuye a la alteración de la homeostasis en la articulación, disminuyendo la capacidad de las células de mantener y reparar los tejidos (Martin y Buckwalter, 2003; Anderson y Loeser, 2010).

En este estudio hemos empleado condrocitos articulares en cultivo primario para determinar los efectos del MA en la senescencia prematura inducida por IL-1 β . Nuestros resultados indican que el MA protege a los condrocitos de los cambios metabólicos y morfológicos relacionados con la senescencia, que son consecuencia del estrés inflamatorio. En los condrocitos osteoartríticos estimulados con IL-1 β se observan cambios morfológicos, con un agrandamiento de las células y una estructura aumentada de las fibras de actina. También aumenta la actividad SA- β -

gal y el marcador de acumulación de daño en el ADN, γ H2AX. Todas estas características senescentes se revirtieron por el tratamiento con MA.

Los efectos protectores del MA en la SIPS de los condrocitos osteoartríticos pueden depender, al menos en parte, de una disminución del estrés oxidativo. El estrés oxidativo podría inducir la disfunción telomérica en condrocitos, produciendo el envejecimiento del cartílago y el desarrollo de la OA a través de mecanismos que implican la aceleración de la senescencia (Yudoh y cols., 2005). Además, los ROS pueden potenciar los efectos nocivos de las fuerzas mecánicas y el envejecimiento del cartílago, lo que resulta en un estado proinflamatorio y en un desequilibrio de los factores catabólicos y anabólicos (Anderson y Loeser, 2010; Rousset y cols., 2015), que conduce a la degradación del cartílago (Goldring, 2000b; Mengshol y cols., 2000; Bau y cols., 2002), la inhibición de la síntesis de moléculas de la matriz extracelular y la reducción de la viabilidad de los condrocitos (Lotz, 1999).

Los resultados de este estudio sugieren que la modulación del estrés oxidativo por el MA puede estar implicada en los efectos sobre las MAPKs (Lo y cols., 1996). Así, en nuestro modelo de estrés inflamatorio por IL-1 β , el MA redujo la activación de la enzima p38, que está implicada en el desarrollo de senescencia en diferentes tipos celulares (Tivey y cols., 2013) y en condrocitos OA estimulados con IL-1 β (Dai y cols., 2006). Además, el MA redujo la fosforilación de ERK $\frac{1}{2}$ y en menor grado de JNK $\frac{1}{2}$, que también puede contribuir a la senescencia del condrocito (Ashraf y cols., 2016).

La caveolina-1 es un mediador de senescencia celular inducida por estrés, tal como la senescencia inducida por estrés oxidativo e IL-1 β en condrocitos articulares. Las regiones ricas en caveolina-1 de la membrana plasmática están asociadas a receptores y moléculas que participan en las vías degradativas, como la síntesis y activación de MMPs (Heathfield y cols., 2008). La sobreexpresión de caveolina-1 se relaciona con la senescencia celular en condrocitos, mientras que la reducción de los niveles de esta proteína podría modificar el fenotipo y revertir este efecto (Dai y cols., 2006). Nuestros datos indican que el MA contrarresta el aumento en la expresión de caveolina-1 inducida por IL-1 β . La caveolina-1 podría estar implicada en los cambios morfológicos de las células senescentes a través de

la regulación de la formación de fibras de estrés (Cho y cols., 2004). Así, nuestros resultados sugieren que la reducción en la expresión de caveolina-1 tras el tratamiento con el MA puede interferir con la formación de fibras de estrés de actina y los cambios morfológicos senescentes en condrocitos OA estimulados con IL-1 β .

La sobreexpresión de caveolina-1 lleva al aumento de la vía p53/p21, la cual media la senescencia prematura inducida por estrés en condrocitos OA (Dai y cols., 2006). Nuestros resultados indican que el MA redujo la activación de esta vía por IL-1 β , con una disminución en la acetilación de p53 y en la expresión de p21. Los niveles de p21 aumentan en los condrocitos senescentes articulares y en presencia de estrés oxidativo crónico. De hecho, p21 representa un marcador de daño acumulado en el ADN y senescencia en condrocitos (Rousset y cols., 2015). Además, p16 puede estar implicado en los procesos de envejecimiento condrocítico en la OA (Zhou y cols., 2004). En nuestro estudio, los niveles de p21 aumentaron con IL-1 β , mientras que los niveles de p16 no se modificaron significativamente, lo que sugiere que la primera vía podría tener una contribución más relevante en la respuesta de estrés inducida por IL-1 β en condrocitos osteoartríticos.

La proteína Sirt1 es necesaria para mantener la homeostasis del cartílago. Así, la deficiencia en Sirt1 conduce a un aumento en la degeneración del cartílago con la edad (Gabay y cols., 2013). Para mejorar la supervivencia de los condrocitos, Sirt1 aumenta la expresión de genes específicos del cartílago y modula NF- κ B para reprimir la síntesis de enzimas degradativas de la matriz extracelular inducidas por IL-1 β (Matsushita y cols., 2013). De hecho, los condrocitos osteoartríticos, osteoblastos subcondrales y otras células senescentes, presentan niveles bajos de Sirt1 (Fujita y cols., 2011; Abed y cols., 2014).

La inhibición de Sirt1 aumenta la acetilación de p53 e induce un fenotipo senescente prematuro en diferentes tipos celulares (Ota y cols., 2007). Por otro lado, Sirt-1 se une a p53 desacetilado, lo que impide la senescencia celular inducida por esta vía (Langley y cols., 2002). Además, Sirt1 regula el estrés oxidativo en diferentes tipos celulares y puede proteger frente a la senescencia prematura a través de p53, p21, FOXOs y moléculas implicadas en el daño del ADN y su

reparación (Hwang y cols., 2013). Sin embargo, la fosforilación de Sirt1 por JNK1/2 puede ser un mecanismo protector contra los efectos del estrés oxidativo en la viabilidad celular (Nasrin y cols., 2009), aunque este mecanismo puede no estar involucrado en los efectos del estrés oxidativo en condrocitos humanos osteoartríticos (Hong y cols., 2010). Por lo tanto, una reducción de Sirt1 inducida por el estrés oxidativo puede contribuir a la patogénesis de condiciones inflamatorias crónicas. Nuestros resultados indican que la IL-1 β reduce los niveles de Sirt1 en condrocitos osteoartríticos y aumenta la acetilación de p53. El tratamiento con el MA revierte la reducción de Sirt1, lo que se traduce en una menor presencia de características senescentes en estas células. La participación de Sirt1 en el efecto del MA se confirmó utilizando un siRNA de Sirt1.

La inflamación en la OA es un factor asociado con la progresión de la enfermedad, dolor y disfunción física. La carga mecánica excesiva de la articulación puede conducir a la senescencia inducida por estrés y aumentar la producción de mediadores proinflamatorios (Greene y Loeser, 2015). Así, la senescencia prematura en condrocitos hace que estas células no sean capaces de contrarrestar las agresiones que sufre el cartílago y que con el tiempo contribuirán a la iniciación y la progresión de la OA (Aigner y cols., 2004). Nuestro estudio sugiere que el MA puede tener potencial terapéutico en el tratamiento de las alteraciones degenerativas de las articulaciones ya que, además de la disminución de mediadores inflamatorios y catabólicos, el MA puede tener efectos protectores contrarrestando la senescencia prematura de condrocitos osteoartríticos inducida por estrés inflamatorio.

5. Efectos de los péptidos PTHrP sobre la senescencia celular inducida por estrés en osteoblastos osteoartríticos

Los cambios en el hueso subcondral contribuyen a la fisiopatología de la OA. Los osteoblastos subcondrales osteoartríticos presentan una elevada producción de citocinas proinflamatorias, factores proangiogénicos y MMPs (Henrotin y cols., 2012). Las enzimas degradativas y las citocinas proinflamatorias están implicadas en los diferentes procesos catabólicos que conducen a la degeneración del cartílago y del hueso subcondral en la OA. Además, un aumento en la producción

de mediadores inflamatorios es parte del fenotipo secretor asociado a senescencia (Greene and Loeser, 2015). En nuestro estudio, al estimular los osteoblastos osteoartríticos con IL-1 β aumentan los focos del γ H2AX, un marcador de daño en el ADN inducido por la inflamación y del envejecimiento (Mah y cols., 2010). Nuestros resultados sugieren que el daño en el ADN producido por la IL-1 β , puede inducir la senescencia en osteoblastos osteoartríticos, lo que provoca un aumento en la actividad SA- β -Gal y la expresión de otros marcadores. Los péptidos C-terminales estudiados son capaces de reducir estas características senescentes, mientras que los efectos del péptido N-terminal son menos evidentes. Por tanto, la región C-terminal de PTHrP tendría un papel inhibitor sobre la senescencia de los osteoblastos. Este resultado concuerda con los datos obtenidos en otros estudios con ratones que presentan una delección en la zona media y C-terminal del gen de la PTHrP (Miao y cols., 2008).

El tratamiento de los osteoblastos con IL-1 β activa los factores de transcripción clave implicados en la respuesta inflamatoria, NF- κ B y AP-1. En particular, NF- κ B se activa en la senescencia celular y produce un aumento de mediadores inflamatorios como TNF α e IL-6 (Matsusaka y cols., 1993). También incrementa la síntesis de PGE₂ como resultado de la inducción de COX-2 (Crofford y cols., 1997; Newton y cols., 1997). Los péptidos C-terminales estudiados disminuyen la activación de este factor de transcripción y en el caso de PTHrP (107-139), también reduce AP-1. Como consecuencia, dichos péptidos tendrían efectos protectores frente a las alteraciones óseas producidas en los procesos inflamatorios crónicos. Además de la degradación del cartílago, las citocinas proinflamatorias promueven la proliferación y función de los osteoblastos (Lange y cols., 2010), así como el desarrollo de osteoclastos, lo que conduce a la resorción del hueso en condiciones patológicas (Nguyen y cols., 1991). El TNF α suprime el reclutamiento de osteoblastos por células progenitoras, inhibiendo la expresión de genes de la matriz proteica, y estimulando la expresión de genes que amplifican la osteoclastogénesis (Nanes, 2003). En osteoblastos osteoartríticos, los péptidos C-terminales han reducido la producción de IL-6 y TNF α inducida por IL-1 β . En condiciones basales no se han obtenido resultados significativos en nuestro sistema experimental, aunque previamente se ha descrito una activación

transitoria de NF- κ B asociada a un aumento de IL-6 por los fragmentos N- y C-terminal (de Miguel y cols., 1999).

La COX-2 está aumentada durante las respuestas inflamatorias y la senescencia celular, lo que lleva a la producción de altos niveles de PGE₂. En particular, la COX-2 contribuye a establecer y mantener la senescencia de fibroblastos humanos normales a través de una vía dependiente de PGE₂ (Martien y cols., 2013). Los péptidos C-terminales reducen la expresión de COX-2, disminuyendo así la síntesis de PGE₂. Este mecanismo es relevante para el control de la senescencia celular en osteoblastos y de la pérdida ósea en condiciones inflamatorias. Aunque la COX-2 y las PGs juegan un papel en la diferenciación osteoblástica y la formación de hueso (Zhang y cols., 2002), un aumento en la señalización de PGE₂ en osteoblastos, induce la expresión de RANKL para dar lugar a la osteoclastogénesis (Lader y Flanagan, 1998; Suzawa y cols., 2000; Lee y cols., 2010), aumenta la producción de IL-6 (Massicotte y cols., 2002) y reduce la producción de osteoprotegerina (Liu y cols., 2005).

PTHrP tiene un importante papel en la diferenciación osteogénica (Martinez y cols., 2002; Suda y cols., 1996). La administración intermitente de PTHrP (1-36) en modelos animales de regeneración ósea, mejora la formación de nuevo hueso aumentando la función osteoblástica y la angiogénesis (de Castro y cols., 2010). Tras la administración del péptido PTHrP (107-139) se observan efectos osteogénicos similares (de Castro y cols., 2012). Nuestros resultados indican que los tres péptidos estudiados favorecen la capacidad de mineralización en osteoblastos osteoartríticos estimulados con IL-1 β , lo que en parte confirma los trabajos publicados *in vivo*.

Los resultados obtenidos muestran que la capacidad de controlar la producción de mediadores inflamatorios y la aparición de la senescencia reside principalmente en la mitad C-terminal de PTHrP. La estructura de la región C-terminal es diferente de la conformación adoptada por la región N-terminal, lo que llevó a predecir la existencia de un receptor específico para el dominio C-terminal de PTHrP (Cuthbertson et al., 1999).

La MMP con mayor implicación en la degradación de la red de colágeno I de la matriz ósea es MMP-1, cuya acción puede aumentar en presencia de MMP-3, que

es capaz de activar la pro-MMP-1 (Suzuki y cols., 1990; Breckon y cols., 1999). Nuestros resultados muestran que la IL-1 β incrementa considerablemente la expresión génica de MMP-1 y MMP-3. El tratamiento con cada uno de los péptidos PTHrP estudiados, tanto los de la zona N-terminal como con los de la zona C-terminal, disminuyen la expresión génica de estas MMPs, contrarrestando así el efecto de la IL-1 β . Por lo tanto, el tratamiento con estos péptidos evitaría el efecto degradativo que ejercen las MMPs sobre el hueso subcondral y sobre el cartílago articular.

Estudios previos han mostrado que PTH (1-34) (teriparatida) reduce la expresión de COX-2 y MMPs, así como la producción de mediadores inflamatorios en modelos animales de OA (Lugo y cols., 2012; Orth y cols., 2013). Nuestros resultados sugieren que los efectos antiinflamatorios de los péptidos PTHrP podrían ser beneficiosos en esta patología. Aunque son necesarios más estudios para confirmar esta hipótesis, nuestros datos también sugieren que los péptidos C-terminales podrían tener mayor actividad que los péptidos N-terminales.

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

1. El MA de las ASCs humanas contiene factores solubles, microvesículas y exosomas, y ha demostrado tener efectos antioxidantes y antiinflamatorios en monocitos y macrófagos estimulados con LPS.
2. En condrocitos humanos osteoartríticos en cultivo primario estimulados con IL-1 β , el MA ejerce efectos protectores que dependerían de la inhibición de la producción de mediadores inflamatorios y catabólicos. El mecanismo de acción del MA estaría relacionado con la inhibición de la activación de NF- κ B.
3. En estas mismas células, el MA reduce la senescencia inducida por estrés inflamatorio, actuando sobre los cambios morfológicos producidos por la polimerización de las fibras de F-actina, el aumento de la SA- β -Gal y la acumulación de focos de γ H2AX. También hemos demostrado que el MA regula mediadores y vías de señalización implicados en la senescencia celular, como son el estrés oxidativo, las MAPKs y la expresión de caveolina-1, p21, y p53, esta última relacionada con un aumento en la expresión de Sirt1.
4. En cultivo de osteoblastos humanos osteoartríticos, los péptidos C-terminal PTHrP (107-111) y PTHrP (107-139) son más activos que el péptido N-terminal PTHrP (1-37) sobre la senescencia inducida por IL-1 β y la producción de mediadores inflamatorios. Los efectos de los péptidos C-terminal serían consecuencia de la disminución de la activación de NF- κ B y en el caso de PTHrP (107-139), también de AP-1.

1. CM from human ASCs contains soluble factors, microvesicles and exosomes, and shows show anti-oxidative and anti-inflammatory effects in monocytes and macrophages stimulated with LPS.
2. In human osteoarthritic chondrocytes in primary culture stimulated with IL-1 β , CM exerts protective effects which would depend to the inhibited production of inflammatory and catabolic mediators. CM mechanism of action may be related with the inhibition of NF- κ B activation.
3. In these cells, CM downregulates senescence induced by inflammation stress and affects morphological changes related to F-actin polymerization, SA- β -Gal increase and the accumulation of γ H2AX foci. We have also demonstrate that CM regulates mediators and signalling pathways involved in cellular senescence, such as oxidative stress, MAPKs, caveolin-1, p21 and p53, which is related to an enhanced Sirt1 expression.
4. In human osteoarthritic osteoblasts, C-terminal peptides PTHrP (107-111) and PTHrP (107-139) have exhibited higher activity than N-terminal peptides PTHrP (1-37) on senescence induced by IL-1 β and the production of inflammatory mediators. C-terminal peptides effects might be the consequence of a lower NF- κ B activation, while the effect of PTHrP (107-139) also depends on a lower activation of AP-1.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abed É, Couchourel D, Delalandre A, Duval N, Pelletier J-P, Martel-Pelletier J y Lajeunesse D (2014) Low sirtuin 1 levels in human osteoarthritis subchondral osteoblasts lead to abnormal sclerostin expression which decreases Wnt/ β -catenin activity. *Bone* 59: 28-36.

Aigner T, Rose J, Martin J y Buckwalter J (2004) Aging theories of primary osteoarthritis: from epidemiology to molecular biology. *Rejuvenation Res* 7: 134-145.

Al Faqeh H, Hamdan BMYN, Chen HC, Aminuddin BS y Ruszymah BHI (2012) The potential of intra-articular injection of chondrogenic-induced bone marrow stem cells to retard the progression of osteoarthritis in a sheep model. *Exp Gerontol* 47: 458-464.

Alaaeddine N, Antoniou J, Moussa M, Hilal G, Kreichaty G, Ghanem I, Abouchedid W, Saghbi E y Di Battista JA (2015) The chemokine CCL20 induces proinflammatory and matrix degradative responses in cartilage. *Inflamm Res* 64: 721-731.

Alaaeddine N, Olee T, Hashimoto S, Creighton-Achermann L y Lotz M (2001) Production of the chemokine RANTES by articular chondrocytes and role in cartilage degradation. *Arthritis Rheum* 44: 1633-1643.

Alcaraz MJ, Megías J, García-Arnandis I, Clérigues V y Guillén MI (2010) New molecular targets for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol* 80: 13-21.

Alonso V, De Gortázar AR, Ardura JA, Andrade-Zapata I, Alvarez-Arroyo M y Esbrit P (2008) Parathyroid hormone-related protein (107-139) increases human osteoblastic cell survival by activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *J Cell Physiol* 217: 717-727.

Altman RD y Gold GE (2007) Atlas of individual radiographic features in osteoarthritis, revised. *Osteoarthritis Cartilage* 15: A1-A56.

Amin AR, Dave M, Attur M y Abramson SB (2000) COX-2, NO, and cartilage damage and repair. *Curr Rheumatol Rep* 2: 447-453.

Amin AR y Abramson SB (1998) The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 10: 263-268.

Amizuka N, Karaplis AC, Henderson JE, Warshawsky H, Lipman ML, Matsuki Y, Ejiri S, Tanaka M, Izumi N, Ozawa H y Goltzman D (1996) Haploinsufficiency of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) results in abnormal postnatal bone development. *Dev Biol* 175: 166-176.

Anderson AS y Loeser RF (2010) Why is osteoarthritis an age-related disease? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 24: 15-26.

Andreesen R, Osterholz J, Bross KJ, Schulz A, Luckenbach GA y Löhr GW (1983) Cytotoxic effector cell function at different stages of human monocyte-macrophage maturation. *Cancer Res* 43: 5931-5936.

Ashraf S, Cha B-H, Kim J-S, Ahn J, Han I, Park H y Lee S-H (2016) Regulation of senescence associated signaling mechanisms in chondrocytes for cartilage tissue regeneration. *Osteoarthritis Cartilage* 24(2): 196-205.

Attur MG, Patel R, DiCesare PE, Steiner GC, Abramson SB y Amin AR (1998) Regulation of nitric oxide production by salicylates and tenidap in human OA-affected cartilage, rat chondrosarcomas and bovine chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 6(4): 269-277.

Attur M, Patel I, Patel R, Abramson S y Amin A (1997) Autocrine production of IL-1 beta by human osteoarthritis-affected cartilage and differential regulation of endogenous nitric oxide, IL-6, prostaglandin E2, and IL-8. *Proc Assoc Am Physicians* 110: 65-72.

Baggiolini M, Dewald B y Moser B (1997) Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 15: 675-705.

Baksh D, Yao R y Tuan RS (2007) Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem cells* 25: 1384-1392.

Baraniak PR y McDevitt TC (2010) Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regen Med* 5: 121-143.

Barnes PJ y Karin M (1997) Nuclear factor- κ B: A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336: 1066-1071.

Bau B, Gebhard PM, Haag J, Knorr T, Bartnik E y Aigner T (2002) Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis Rheum* 46: 2648-2657.

Belicchi M, Pisati F, Lopa R, Porretti L, Fortunato F, Sironi M, Scalamogna M, Parati EA, Bresolin N y Torrente Y (2004) Human skin-derived stem cells migrate throughout forebrain and differentiate into astrocytes after injection into adult mouse brain. *J Neurosci Res* 77: 475-486.

Bellido T, Ali AA, Plotkin LI, Fu Q, Gubrij I, Roberson PK, Weinstein RS, O'Brien CA, Manolagas SC y Jilka RL (2003) Proteasomal degradation of Runx2 shortens parathyroid hormone-induced anti-apoptotic signaling in osteoblasts: a putative explanation for why intermittent administration is needed for bone anabolism. *J Biol Chem* 278:50259-72.

Ben-David U y Benvenisty N (2011) The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer* 11: 268-277.

Ben-Porath I y Weinberg RA (2005) The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 961-976.

Ben-Porath I y Weinberg RA (2004) When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J Clin Invest* 113(1), 8-13.

Bender S, Haubeck H-D, Van de Leur E, Dufhues G, Schiel X, Lauwerijns J, Greiling H y Heinrich PC (1990) Interleukin-1 β induces synthesis and secretion of interleukin-6 in human chondrocytes. *FEBS letters* 263(2): 321-324.

Billinghurst RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, Mitchell P, Hambor J, Diekmann O, Tschesche H, Chen J, Van Wart H y Poole AR (1997) Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest* 99: 1534-1545.

Bondeson J, Lauder S, Wainwright S, Amos N, Evans A, Hughes C, Feldmann M y Caterson B (2007) Adenoviral gene transfer of the endogenous inhibitor I κ B α into human osteoarthritis synovial fibroblasts demonstrates that several matrix metalloproteinases and aggrecanases are nuclear factor- κ B-dependent. *J Rheumatol Suppl* 34: 523-533.

Bondeson J, Wainwright SD, Lauder S, Amos N y Hughes CE (2006) The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving

aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 8: R187.

Bonferroni C (1936) Statistic theory of classes and calculation of probabilities. In Volume in Honor of Riccardo della Volta. *Florence: University of Florence*, 1-62.

Bonewald LF (2011) The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 26: 229-238.

Borzì RM, Mazzetti I, Marcu KB y Facchini A (2004) Chemokines in cartilage degradation. *Clin Orthop Relat Res* 427: S53-S61.

Borzì RM, Mazzetti I, Magagnoli G, Paoletti S, Ugucioni M, Gatti R, Orlandini G, Cattini L y Facchini A (2002) Growth-related oncogene α induction of apoptosis in osteoarthritis chondrocytes. *Arthritis Rheum* 46(12): 3201-3211.

Borzì RM, Mazzetti I, Cattini L, Ugucioni M, Baggiolini M y Facchini A (2000) Human chondrocytes express functional chemokine receptors and release matrix-degrading enzymes in response to C-X-C and C-C chemokines. *Arthritis Rheum* 43(8): 1734-1741.

Borzì RM, Mazzetti I, Macor S, Silvestri T, Bassi A, Cattini L y Facchini A (1999) Flow cytometric analysis of intracellular chemokines in chondrocytes in vivo: constitutive expression and enhancement in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *FEBS letters* 455: 238-242.

Brandl A, Meyer M, Bechmann V, Nerlich M y Angele P (2011) Oxidative stress induces senescence in human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 317: 1541-1547.

Breckon JJW, Papaioannou S, Kon LWM, Tumber A, Hembry RM, Murphy G, Reynolds JJ y Meikle MC (1999) Stromelysin (MMP-3) synthesis is up-regulated in estrogen-deficient mouse osteoblasts in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res* 14(11): 1880-1890.

Brenner AJ, Stampfer MR y Aldaz CM (1998) Increased p16 expression with first senescence arrest in human mammary epithelial cells and extended growth capacity with p16 inactivation. *Oncogene* 17: 199-205.

Brown KK, Heitmeyer SA, Hookfin EB, Hsieh L, Buchalova M, Taiwo YO y Janusz MJ (2008) P38 MAP kinase inhibitors as potential therapeutics for the treatment of

joint degeneration and pain associated with osteoarthritis. *J Inflamm (Lond)* 5: 22-29.

Campisi J y d'Adda di Fagagna F (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(9), 729-740.

Carmona L, Ballina J, Gabriel R y Laffon A (2001) The burden of musculoskeletal diseases in the general population of Spain: results from a national survey. *Ann Rheum Dis* 60: 1040-1045.

Carnero, A. (2013). Markers of cellular senescence. *Cell Senescence: Methods and Protocols* 63-81.

Cerletti M, Jurga S, Witczak CA, Hirshman MF, Shadrach JL, Goodyear LJ y Wagers AJ (2008) Highly efficient, functional engraftment of skeletal muscle stem cells in dystrophic muscles. *Cell* 134: 37-47.

Chen Y-T, Sun C-K, Lin Y-C, Chang LT, Chen Y-L, Tsai T-H, Chung S-Y, Chua S, Kao Y-H, Yen C-H, Shao P-I, Chang K-C, Leu S y Yip H-K (2011) Adipose-derived mesenchymal stem cell protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through suppressing oxidative stress and inflammatory reaction. *J Transl Med* 9: 51-63.

Cheng HL, Mostoslavsky R, Saito SI, Manis JP, Gu Y, Patel P, Bronson R, Appella E, Alt FW y Chua KF (2003) Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc Nat Acad Sci* 100(19): 10794-10799.

Chevalier X (1997) Upregulation of enzymatic activity by interleukin-1 in osteoarthritis. *Biomed Pharmacother* 51:58-62.

Childs BG, Durik M, Baker DJ y van Deursen JM (2015) Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat med* 21(12): 1424-1435.

Cho KA, Ryu SJ, Oh YS, Park JH, Lee JW, Kim H-P, Kim KT, Jang IS y Park SC (2004) Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status. *Journal of Biological Chemistry* 279(40): 42270-42278.

Cho KA, Ryu SJ, Park JS, Jang IS, Ahn JS, Kim KT y Park SC (2003) Senescent phenotype can be reversed by reduction of caveolin status. *J Biol Chem* 278: 27789-27795.

Clérigues V, Guillén MI, Castejón MA, Gomar F, Mirabet V y Alcaraz MJ (2012) Heme oxygenase-1 mediates protective effects on inflammatory, catabolic and senescence responses induced by interleukin-1 β in osteoarthritic osteoblasts. *Biochem Pharmacol* 83: 395-405.

Connor DE, Exner T, Ma DDF y Joseph JE (2010) The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb Haemost* 103: 1044-1052.

Crofford LJ, Tan B, McCarthy CJ y Hla T (1997) Involvement of nuclear factor kB in the regulation of cyclooxygenase-2 expression by interleukin-1 in rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Rheum* 40(2): 226-236.

Cuthbertson RM, Kemp BE y Barden JA (1999) Structure study of osteostatin PTHrP [Thr107](107-139). *Biochim Biophys Acta* 1432: 64-72.

Dai C y Gu W (2010) p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends Mol Med* 16(11): 528-536.

Dai M-W, Chu J-G, Tian F-M, Song H-P, Wang Y, Zhang Y-Z y Zhang L (2016) Parathyroid hormone (1-34) exhibits more comprehensive effects than celecoxib in cartilage metabolism and maintaining subchondral bone micro-architecture in meniscectomized guinea pigs. *Osteoarthritis Cartilage* 24(6), 1103-1112.

Dai S-M, Shan Z-Z, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K y Yudoh K (2006) Catabolic stress induces features of chondrocyte senescence through overexpression of caveolin 1: possible involvement of caveolin 1-induced down-regulation of articular chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 54(3): 818-831.

Daouti S, Latario B, Nagulapalli S, Buxton F, Uziel-Fusi S, Chirn G-W, Bodian D, Song C, Labow M, Lotz M, Quintavalla J y Kumar C (2005) Development of comprehensive functional genomic screens to identify novel mediators of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 13: 508-518.

Datta NS y Abou-Samra AB (2009) PTH and PTHrP signaling in osteoblasts. *Cell Signal* 21: 1245-1254.

de Castro LF, Lozano D, Portal-Núñez S, Maycas M, de la Fuente M, Caeiro JR y Esbrit P (2012) Comparison of the skeletal effects induced by daily administration of PTHrP (1-36) and PTHrP (107-139) to ovariectomized mice. *J Cell Physiol* 227: 1752-1760.

de Castro LF, Lozano D, Dapía S, Portal-Núñez S, Caeiro JR, Gómez-Barrena E y Esbrit P (2010) Role of the N-and C-terminal fragments of parathyroid-hormone-related protein as putative therapies to improve bone regeneration under high glucocorticoid treatment. *Tissue Eng Part A* 16(4): 1157-1168.

de la Fuente M y Miquel J (2009) An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr Pharm Des* 15: 3003-3026.

de Miguel F, Martinez-Fernandez P, Guillen C, Valin A, Rodrigo A, Martinez ME y Esbrit P (1999) Parathyroid hormone-related protein (107-139) stimulates interleukin-6 expression in human osteoblastic cells. *J Am Soc Nephrol* 10: 796-803.

Deshmane SL, Kremlev S, Amini S y Sawaya BE (2009) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res* 29(6): 313-326.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, Peacocke M y Campisi J (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 92: 9363-9367.

Dodge GR y Poole AR (1989) Immunohistochemical detection and immunochemical analysis of type II collagen degradation in human normal, rheumatoid, and osteoarthritic articular cartilages and in explants of bovine articular cartilage cultured with interleukin 1. *J Clin Invest* 83: 647-661.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ y Horwitz EM (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4): 315-317.

Dvir-Ginzberg M, Gagarina V, Lee EJ, Booth R, Gabay O y Hall DJ (2011) Tumor necrosis factor α -mediated cleavage and inactivation of SirT1 in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Rheum* 63(8): 2363-2373.

El-Amin S, Lu H, Khan Y, Burems J, Mitchell J, Tuan RS y Laurencin CT (2003) Extracellular matrix production by human osteoblasts cultured on biodegradable polymers applicable for tissue engineering. *Biomaterials* 24: 1213-1221.

Esbrit P y Alcaraz MJ (2013) Current perspectives on parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) as bone anabolic therapies. *Biochem Pharmacol* 85: 1417-1423.

Eswaramoorthy R, Chang C-C, Wu S-C, Wang G-J, Chang J-K y Ho M-L (2012) Sustained release of PTH (1-34) from PLGA microspheres suppresses osteoarthritis progression in rats. *Acta biomaterialia* 8: 2254-2262.

Eyre D (2002) Articular cartilage and changes in arthritis: collagen of articular cartilage. *Arthritis Res Ther* 4:30-35.

Fan Z, Söder S, Oehler S, Fundel K y Aigner T (2007) Activation of interleukin-1 signaling cascades in normal and osteoarthritic articular cartilage. *Am J Pathol* 171(3): 938-946.

Fan Z, Yang H, Bau B, Söder S y Aigner T (2006) Role of mitogen-activated protein kinases and NF κ B on IL-1 β -induced effects on collagen type II, MMP-1 and 13 mRNA expression in normal articular human chondrocytes. *Rheumatol Int* 26: 900-903.

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

Fernández P, Guillén MI, Gomar F y Alcaraz MJ (2003) Expression of heme oxygenase-1 and regulation by cytokines in human osteoarthritic chondrocytes. *Biochem Pharmacol* 66: 2049-2052.

Fierabracci A, del Fattore A, Luciano R, Muraca M, Teti A y Muraca M (2015) Recent advances in mesenchymal stem cell immunomodulation: The role of microvesicles. *Cell Ther Transplant* 24: 133-149.

Frazer A, Bunning RAD, Thavarajah M, Seid JM y Russell RGG (1994) Studies on type II collagen and aggrecan production in human articular chondrocytes in vitro and effects of transforming growth factor- β and interleukin-1 β . *Osteoarthritis Cartilage* 2: 235-245.

Fridlyanskaya I, Alekseenko L y Nikolsky N (2015) Senescence as a general cellular response to stress: A mini-review. *Exp Gerontol* 72: 124-128.

Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II y Petrakova KV (1966) Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Development* 16(3): 381-390.

Frye RA (2000) Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 793-798.

Fujita N, Matsushita T, Ishida K, Kubo S, Matsumoto T, Takayama K, Kurosaka M y Kuroda R (2011) Potential involvement of SIRT1 in the pathogenesis of osteoarthritis through the modulation of chondrocyte gene expressions. *J Orthop Res* 29: 511-515.

Gabay O, Sanchez C, Dvir-Ginzberg M, Gagarina V, Zaal KJ, Song Y, He XH y McBurney MW (2013) Sirtuin 1 enzymatic activity is required for cartilage homeostasis in vivo in a mouse model. *Arthritis Rheum* 65: 159-166.

Gabay O, Oppenheimer H, Meir H, Zaal K, Sanchez C y Dvir-Ginzberg M (2012) Increased apoptotic chondrocytes in articular cartilage from adult heterozygous SirT1 mice. *Ann Rheum Dis* 71(4): 613-616.

Gabay O y Sanchez C (2012) Epigenetics, sirtuins and osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 79: 570-573.

Gagarina V, Gabay O, Dvir-Ginzberg M, Lee EJ, Brady JK, Quon MJ y Hall DJ (2010) SirT1 enhances survival of human osteoarthritic chondrocytes by repressing protein tyrosine phosphatase 1B and activating the insulin-like growth factor receptor pathway. *Arthritis Rheum* 62(5): 1383-1392.

García-Vicuña R, Gómez-Gavero MV, Domínguez-Luis MJ, Pec MK, González-Alvaro I, Alvaro-Gracia JM y Díaz-González F (2004) CC and CXC chemokine receptors mediate migration, proliferation, and matrix metalloproteinase production by fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 50(12): 3866-3877.

Gardella TJ y Vilardaga JP (2015) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIII. The Parathyroid Hormone Receptors—Family BG Protein-Coupled Receptors. *Pharmacological reviews* 67(2): 310-337.

Gatti S, Bruno S, Deregibus MC, Sordi A, Cantaluppi V, Tetta C y Camussi G (2011) Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia–reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrol Dial Transplant* 26(5): 1474-1483.

Ge Z, Hu Y, Heng BC, Yang Z, Ouyang H, Lee EH y Cao T (2006). Osteoarthritis and therapy. *Arthritis Care Res* 55(3): 493-500.

Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M y Ley K (2010) Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327: 656-661.

Goldring MB y Goldring SR (2010) Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1192: 230-237.

Goldring MB y Marcu KB (2009) Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 11(3): 224-240.

Goldring MB (2000a) Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Curr Rheumatol Rep* 2: 459-465.

Goldring MB (2000b) The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 43(9): 1916-1926.

Goldring MB, Birkhead JR, Suen L-F, Yamin R, Mizuno S, Glowacki J, Arbiser JL y Apperley JF (1994a) Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin Invest* 94: 2307-2316.

Goldring MB, Fukuo K, Birkhead JR, Dudek E y Sandell LJ (1994b) Transcriptional suppression by interleukin-1 and interferon- γ of type II collagen gene expression in human chondrocytes. *J Cell Biochem* 54: 85-99.

Greene MA y Loeser RF (2015) Aging-related inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 23: 1966-1971.

Guerne P-A, Carson DA y Lotz M (1990) IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors, and hormones in vitro. *J Immunol* 144(2): 499-505.

Guillén M, Megías J, Gomar F y Alcaraz MJ (2008) Haem oxygenase-1 regulates catabolic and anabolic processes in osteoarthritic chondrocytes. *J Pathol* 214: 515-522.

György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falur A y Buzás EI (2011) Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 68: 2667-2688.

Hardy MM, Seibert K, Manning PT, Currie MG, Woerner BM, Edwards D, Koki A y Tripp CS (2002) Cyclooxygenase 2-dependent prostaglandin E₂ modulates cartilage proteoglycan degradation in human osteoarthritis explants. *Arthritis Rheum* 46(7): 1789-1803.

Hayami T, Kapila YL y Kapila S (2008) MMP-1 (collagenase-1) and MMP-13 (collagenase-3) differentially regulate markers of osteoblastic differentiation in osteogenic cells. *Matrix Biol* 27: 682-692.

Haywood L, McWilliams DF, Pearson CI, Gill SE, Ganesan A, Wilson D y Walsh DA (2003) Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 48(8): 2173-2177.

Heathfield SK, Le Maitre CL y Hoyland JA (2008) Caveolin-1 expression and stress-induced premature senescence in human intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther* 10: 87-96.

Hempel SL, Monick MM y Hunninghake GW (1994) Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 protein and mRNA in human alveolar macrophages and blood monocytes. *J Clin Invest* 93: 391-396.

Henrotin Y, Pesesse L y Sanchez C (2012). Subchondral bone and osteoarthritis: biological and cellular aspects. *Osteoporos Int* 23(8): 847-851.

Henrotin Y, Kurz B y Aigner T (2005) Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? *Osteoarthritis Cartilage* 13: 643-654.

Heo SC, Jeon ES, Lee IH, Kim HS, Kim MB y Kim JH (2011) Tumor necrosis factor- α -activated human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells accelerate cutaneous wound healing through paracrine mechanisms. *J Invest Dermatol* 131: 1559-1567.

Hong E-H, Lee S-J, Kim J-S, Lee K-H, Um H-D, Kim J-H, Kim S-J, Kim J-I y Hwang S-G (2010) Ionizing radiation induces cellular senescence of articular chondrocytes via negative regulation of SIRT1 by p38 kinase. *J Biol Chem* 285(2): 1283-1295.

Horwitz MJ, Tedesco MB, Gundberg C, Garcia-Ocana A y Stewart AF (2003) Short-term, high-dose parathyroid hormone-related protein as a skeletal anabolic agent for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 88(2): 569-575.

Huschtscha LI, Noble JR, Neumann AA, Moy EL, Barry P, Melki JR, Clark SJ y Reddel RR (1998) Loss of p16INK4 expression by methylation is associated with lifespan extension of human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 58: 3508-3512.

Hwang J-w, Yao H, Caito S, Sundar IK y Rahman I (2013) Redox regulation of SIRT1 in inflammation and cellular senescence. *Free Radic Biol Med* 61: 95-110.

Ismail N, Wang Y, Dakhllallah D, Moldovan L, Agarwal K, Batte K, Shah P, Wisler J, Eubank TD, Tridandapani S, Paulaitis ME, Piper MG y Marsh CB (2013) Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood* 121(6): 984-995.

Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev S, Tivchev P, Altunkova I y Kyurkchiev DS (2009) Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunol Lett* 126: 37-42.

Jacobs JJ y de Lange T (2004) Significant role for p16 INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr Biol* 14: 2302-2308.

Jilka RL (2007) Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone* 40: 1434-1446.

Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM y Manolagas SC (1999) Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest* 104(4):439-446.

Jochum W, David J-P, Elliott C, Wutz A, Plenk H, Matsuo K y Wagner EF (2000) Increased bone formation and osteosclerosis in mice overexpressing the transcription factor Fra-1. *Nature Med* 6: 980-984.

Kaeberlein M, McVey M y Guarente L (1999) The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev* 13: 2570-2580.

Kaneko S, Satoh T, Chiba J, Ju C, Inoue K y Kagawa J (2000) Interleukin-6 and interleukin-8 levels in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis. *Cytokines Cell Mol Ther* 6: 71-79.

Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier J-P y Fahmi H (2011) Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 7: 33-42.

Kapur SK y Katz AJ (2013) Review of the adipose derived stem cell secretome. *Biochimie* 95: 2222-2228.

Kennedy A, Fearon U, Veale DJ y Godson C (2011) Macrophages in synovial inflammation. *Front Immunol* 2: 43-51.

Kenner L, Hoebertz A, Beil FT, Keon N, Karreth F, Eferl R, Scheuch H, Szremska A, Amling M, Schorpp-Kistner M, Angel P y Wagner EF (2004) Mice lacking JunB are osteopenic due to cell-autonomous osteoblast and osteoclast defects. *J Cell Biol* 164(4): 613-623.

Kerr JB. (1999) *Atlas of Functional Histology* 182.

Khosla S, Westendorf JJ y Oursler MJ (2008) Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. *J Clin Invest* 118(2): 421-428.

Kobayashi M, Squires GR, Mousa A, Tanzer M, Zukor DJ, Antoniou J y Poole AR (2005) Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor α in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 52(1): 128-135.

Koch AE, Kunkel S, Harlow L, Johnson B, Evanoff H, Haines GK, Burdick M, Pope R y Strieter R (1992) Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 90: 772-779.

Koelling S y Miosge N (2009) Stem cell therapy for cartilage regeneration in osteoarthritis. *Expert Opin Biol Ther* 9(11): 1399-1405.

Kojima F, Naraba H, Miyamoto S, Beppu M, Aoki H y Kawai S (2004) Membrane-associated prostaglandin E synthase-1 is upregulated by proinflammatory cytokines in chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 6: 355-365.

Körbling M y Estrov Z (2003) Adult stem cells for tissue repair—a new therapeutic concept? *N Engl J Med*, 349(6): 570-582.

Kracht M y Saklatvala J (2002) Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation. *Cytokine* 20(3): 91-106.

Kuo TK, Hung SP, Chuang CH, Chen C-T, Shih Y-RV, Fang SCY, Yang VW y Lee OK (2008) Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells. *Gastroenterology* 134(7): 2111-2121.

Kwak BR y Mach F (2005) Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nature Med* 11(4): 367-378.

Kwan TS, Padrines M, Théoleyre S, Heymann D y Fortun Y (2004) IL-6, RANKL, TNF- α /IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 15: 49-60.

Kwon H-S y Ott M (2008) The ups and downs of SIRT1. *Trends Biochem Sci* 33(11): 517-525.

Lader C y Flanagan A (1998) Prostaglandin E₂, Interleukin 1 α , and Tumor Necrosis Factor- α Increase Human Osteoclast Formation and Bone Resorption in Vitro. *Endocrinology* 139(7): 3157-3164.

Lange J, Sapozhnikova A, Lu C, Hu D, Li X, Miclau T y Marcucio RS (2010) Action of IL-1 β during fracture healing. *J Orthop Res* 28: 778-784.

Langley E, Pearson M, Faretta M, Bauer UM, Frye RA, Minucci S, Pelicci PG y Kouzarides T (2002) Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J* 21(10): 2383-2396.

Lanza C, Morando S, Voci A, Canesi L, Principato MC, Serpero LD, Mancardi G, Uccelli A y Vergani L (2009) Neuroprotective mesenchymal stem cells are endowed with a potent antioxidant effect in vivo. *J Neurochem* 110: 1674-1684.

Lavoie JR y Rosu-Myles M (2013) Uncovering the secrets of mesenchymal stem cells. *Biochimie* 95: 2212-2221.

Lee AS, Ellman MB, Yan D, Kroin JS, Cole BJ, van Wijnen AJ y Im HJ (2013). A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. *Gene* 527(2), 440-447.

Lee Y-M, Fujikado N, Manaka H, Yasuda H y Iwakura Y (2010) IL-1 plays an important role in the bone metabolism under physiological conditions. *Int Immunol* 22(10): 805-816.

Li X, Ellman M, Muddasani P, Wang JH-C, Cs-Szabo G, van Wijnen AJ y Im H-J (2009) Prostaglandin E₂ and its cognate EP receptors control human adult articular cartilage homeostasis and are linked to the pathophysiology of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 60(2): 513-523.

Li X, Pilbeam C, Pan L, Breyer R y Raisz L (2002) Effects of prostaglandin E₂ on gene expression in primary osteoblastic cells from prostaglandin receptor knockout mice. *Bone* 30(4): 567-573.

Liaudet L, Soriano F y Szabo C (2000) Biology of nitric oxide signaling. *Critical care medicine* 28: 37-52.

Liu X-H, Kirschenbaum A, Yao S y Levine AC (2005) Cross-talk between the interleukin-6 and prostaglandin E₂ signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) ligand/RANK system. *Endocrinology* 146(4): 1991-1998.

Livak KJ y Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25(4): 402-408.

Lo YYC, Wong JMS y Cruz TF (1996) Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH₂-terminal kinases. *J Biol Chem* 271(26): 15703-15707.

Loeser RF, Collins JA y Diekman BO (2016) Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 12: 412-420.

Loeser RF (2013) Aging processes and the development of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 25(1): 108-113.

Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR y Goldring MB (2012) Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum* 64: 1697-1707.

Loeser RF (2009) Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthritis Cartilage* 17(8): 971-979.

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M y Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell* 153: 1194-1217.

Longo VD y Kennedy BK (2006) Sirtuins in aging and age-related disease. *Cell* 126: 257-268.

Lotz M (1999) The role of nitric oxide in articular cartilage damage. *Rheum Dis Clin North Am* 25(2): 269-282.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.

Lozano D, Sánchez-Salcedo S, Portal-Núñez S, Vila M, López-Herradón A, Ardura JA, Mulero F, Gómez-Barrena E, Vallet-Regí M y Esbrit P (2014) Parathyroid hormone-related protein (107-111) improves the bone regeneration potential of gelatin-glutaraldehyde biopolymer-coated hydroxyapatite. *Acta Biomater* 10: 3307-3316.

Lozano D, de Castro LF, Dapía S, Andrade-Zapata I, Manzarbeitia F, Alvarez- Arroyo MV, Gómez-Barrena E y Esbrit P (2009) Role of parathyroid hormone-related protein in the decreased osteoblast function in diabetes-related osteopenia. *Endocrinology* 150(5):2027-2035.

Lu Y-C, Yeh W-C y Ohashi PS (2008) LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42: 145-151.

Lugo L, Villalvilla A, Gómez R, Bellido M, Sánchez-Pernaute O, Largo R, Herrero-Beaumont G y Roman-Blas JA (2012) Effects of PTH [1-34] on synoviopathy in an experimental model of osteoarthritis preceded by osteoporosis. *Osteoarthritis Cartilage* 20: 1619-1630.

Lukacs NW, Hogabaom C, Campbell E y Kunkel SL (1999) Chemokines: function, regulation and alteration of inflammatory responses. *Chemokines* 72: 102-120.

Luo J, Li M, Tang Y, Laszkowska M, Roeder RG y Gu W (2004) Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci of the USA* 101(8): 2259-2264.

Luo J, Nikolaev AY, Imai S-i, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L y Gu W (2001) Negative control of p53 by Sir2 α promotes cell survival under stress. *Cell* 107: 137-148.

Ly JD, Grubb D y Lawen A (2003) The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in apoptosis; an update. *Apoptosis* 8(2): 115-128.

Mah L-J, El-Osta A y Karagiannis TC (2010) γ H2AX as a molecular marker of aging and disease. *Epigenetics* 5: 129-136.

Malemud CJ (2004) Protein kinases in chondrocyte signaling and osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res* 427: 145-151.

Manferdini C, Maumus M, Gabusi E, Piacentini A, Filardo G, Peyrafitte JA, Jorgensen C, Bourin P, Fleury-Cappellesso S, Facchini A, Noël D y Lisignoli G (2013) Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Exert Antiinflammatory Effects on Chondrocytes and Synoviocytes From Osteoarthritis Patients Through Prostaglandin E₂. *Arthritis Rheum* 65(5): 1271-1281.

Manolagas SC (2010) From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocr Rev* 31(3): 266-300.

Marcu KB, Otero M, Olivotto E, Borzì RM y Goldring MB (2010) NF- κ B signaling: multiple angles to target OA. *Curr Drug Targets* 11(5): 599-613.

Marie PJ (2008) Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys* 473: 98-105.

Martel-Pelletier J, Wildi LM y Pelletier JP (2012) Future therapeutics for osteoarthritis. *Bone* 51: 297-311.

Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP y Roughley PJ (2008) Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22(2): 351-384.

Martel-Pelletier J, Pelletier J-P y Fahmi H. (2003). *Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. Semin Arthritis Rheum* 33(3): 155-167

Martien S, Pluquet O, Vercamer C, Malaquin N, Martin N, Gosselin K, Pourtier A y Abbadie C (2013) Cellular senescence involves an intracrine prostaglandin E₂ pathway in human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1831: 1217-1227.

Martin JA y Buckwalter JA (2001) Telomere erosion and senescence in human articular cartilage chondrocytes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56(4): 172-179.

Martin JA y Buckwalter JA (2003) The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am* 85: 106-110.

Martínez P, Esbrit P, Rodrigo A, Alvarez-Arroyo M y Martínez M (2002) Age-related changes in parathyroid hormone-related protein and vascular endothelial growth factor in human osteoblastic cells. *Osteoporos Int* 13: 874-881.

Massicotte F, Lajeunesse D, Benderdour M, Pelletier J-P, Hilal G, Duval N y Martel-Pelletier J (2002) Can altered production of interleukin-1 β , interleukin-6, transforming growth factor- β and prostaglandin E₂ by isolated human subchondral osteoblasts identify two subgroups of osteoarthritic patients. *Osteoarthritis Cartilage* 10: 491-500.

Masuko-Hongo K, Berenbaum F, Humbert L, Salvat C, Goldring MB y Thirion S (2004) Up-regulation of microsomal prostaglandin E synthase 1 in osteoarthritic human cartilage: Critical roles of the ERK-1/2 and p38 signaling pathways. *Arthritis Rheum* 50(9): 2829-2838.

Mathy-Hartert M, Hogge L, Sanchez C, Deby-Dupont G, Crielaard J-M y Henrotin Y (2008) Interleukin-1 β and interleukin-6 disturb the antioxidant enzyme system in bovine chondrocytes: a possible explanation for oxidative stress generation. *Osteoarthritis Cartilage* 16(7): 756-763.

Matjusaitis M, Chin G, Sarnoski EA y Stolzing A (2016) Biomarkers to identify and isolate senescent cells. *Ageing Res Rev* 29: 1-12.

Matsusaka T, Fujikawa K, Nishio Y, Mukaida N, Matsushima K, Kishimoto T y Akira S (1993) Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci* 90: 10193-10197.

Matsushita T, Sasaki H, Takayama K, Ishida K, Matsumoto T, Kubo S, Matsuzaki T, Nishida K, Kurosaka M y Kuroda R (2013) The overexpression of SIRT1 inhibited osteoarthritic gene expression changes induced by interleukin-1 β in human chondrocytes. *J Orthop Res* 31: 531-537.

Maumus M, Manferdini C, Toupet K, Peyrafitte J-A, Ferreira R, Facchini A, Gabusi E, Bourin P, Jorgensen C, Lisignoli G y Noël (2013) Adipose mesenchymal stem cells protect chondrocytes from degeneration associated with osteoarthritis. *Stem Cell Res* 11: 834-844.

Maumus M, Peyrafitte J-A, D'Angelo R, Fournier-Wirth C, Bouloumié A, Casteilla L, Sengenès C y Bourin P (2011) Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. *Int J Obes* 35: 1141-1153.

Mazzetti I, Grigolo B, Pulsatelli L, Dolzani P, Silvestri T, Roseti L, Meliconi R y Facchini A (2001) Differential roles of nitric oxide and oxygen radicals in chondrocytes affected by osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Clin Sci* 101: 593-599.

McCauley LK y Martin TJ (2012) Twenty-five years of PTHrP progress: From cancer hormone to multifunctional cytokine. *J Bone Miner Res* 27(6): 1231-1239.

McIntosh K, Zvonice S, Garrett S, Mitchell JB, Floyd ZE, Hammill L, Kloster A, Di Halvorsen Y, Ting JP, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X y Gimble JM (2006) The immunogenicity of human adipose-derived cells: Temporal changes in vitro. *Stem cells* 24: 1246-1253.

Melgarejo E, Medina MÁ, Sánchez-Jiménez F y Urdiales JL (2009) Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 998-1001.

Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A y Brinckerhoff CE (2000) Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-jun N-terminal kinase, and nuclear factor κ B: Differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum* 43(4): 801-811.

Miao D, Su H, He B, Gao J, Xia Q, Zhu M, Gu Z, Goltzman D y Karaplis AC (2008) Severe growth retardation and early lethality in mice lacking the nuclear localization sequence and C-terminus of PTH-related protein. *Proc Natl Acad Sci* 105(51): 20309-20314.

Mietz H, Esser JM, Welsandt G, Kociok N, Hueber A, Jousen A, Esser P y Kriegelstein GnK (2003) Latanoprost stimulates secretion of matrix metalloproteinases in tenon fibroblasts both in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(12): 5182-5188.

Miller PD, Barlas S, Brenneman SK, Abbott TA, Chen Y-T, Barrett-Connor E y Siris ES (2004) An approach to identifying osteopenic women at increased short-term risk of fracture. *Arch Intern Med* 164: 1113-1120.

Moen MD y Scott LJ (2006) Recombinant full-length parathyroid hormone (1-84). *Drugs* 66(18): 2371-2381.

Morigi M, Imberti B, Zoja C, Corna D, Tomasoni S, Abbate M, Rottoli D, Angioletti S, Benigni A, Perico N, Alison M y Remuzzi G (2004) Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 15: 1794-1804.

Morita K, Miyamoto T, Fujita N, Kubota Y, Ito K, Takubo K, Miyamoto K, Ninomiya K, Suzuki T, Iwasaki R, Yagi M, Takaishi H, Toyama Y y Sucha T (2007) Reactive oxygen species induce chondrocyte hypertrophy in endochondral ossification. *J Exp Med* 204: 1613-1623.

Moroney MA, Alcaraz MJ, Forder RA, Carey F y Hoult JR (1988) Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *J Pharm Pharmacol* 40:787-792.

Muñoz-Espín D y Serrano M (2014) Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 482-496.

Murphy G, Cockett MI, Stephens P, Smith B y Docherty A (1987) Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. *Biochem J* 248: 265-268.

Musson RA (1983) Human serum induces maturation of human monocytes in vitro. Changes in cytolytic activity, intracellular lysosomal enzymes, and nonspecific esterase activity. *Am J Pathol* 111: 331-340.

Nanes MS (2003) Tumor necrosis factor- α : molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. *Gene* 321: 1-15.

Narita M, Nuñez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ y Lowe SW (2003) Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113: 703-716.

Nasrin N, Kaushik VK, Fortier E, Wall D, Pearson KJ, De Cabo R y Bordone L (2009) JNK1 phosphorylates SIRT1 and promotes its enzymatic activity. *PloS one* 4(12): 8414-8423.

Nawaz M, Fatima F, Vallabhaneni KC, Penfornis P, Valadi H, Ekström K, Kholia S, Whitt JD, Fernandes JD, Pochampally R, Squire JA y Camussi G (2015) Extracellular vesicles: evolving factors in stem cell biology. *Stem Cells Int* 2016:1-17.

Nelson KK, Subbaram S, Connor KM, Dasgupta J, Ha X-F, Meng T-C, Tonks NK y Melendez JA (2006) Redox-dependent matrix metalloproteinase-1 expression is regulated by JNK through Ets and AP-1 promoter motifs. *J Biol Chem* 281(20): 14100-14110.

Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, Hu X, Robey PG, Leelahavanichul K, Koller BH, Brown JM, Hu X, Jelinek I, Star RA y Mezey E (2009) Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E₂-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature Med* 15(1): 42-49.

Newton R, Kuitert LME, Bergmann M, Adcock IM y Barnes PJ (1997) Evidence for involvement of NF- κ B in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1 β . *Biochem Biophys Res Commun* 237: 28-32.

Nguyen L, Dewhirst F, Hauschka PV y Stashenko P (1991) Interleukin-1 beta stimulates bone resorption and inhibits bone formation in vivo. *Lymphokine Cytokine Res* 10: 15-21.

Nicolai S, Rossi A, Di Daniele N, Melino G Annicchiarico-Petruzzelli M y Raschellà G (2015) DNA repair and aging: the impact of the p53 family. *Aging* 7: 1050-1065.

Nie C, Yang D, Xu J, Si Z, Jin X y Zhang J (2011) Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis. *Cell Ther Transplant* 20: 205-216.

Ono K y Han J (2000) The p38 signal transduction pathway activation and function. *Cell Signal* 12: 1-13.

Orozco L, Munar A, Soler R, Alberca M, Soler F, Huguet M, Sentís J, Sánchez A y García-Sancho J (2014) Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: two-year follow-up results. *Transplantation* 97(11): 66-68.

Orth P, Cucchiari M, Zurakowski D, Menger M, Kohn D y Madry H (2013) Parathyroid hormone [1-34] improves articular cartilage surface architecture and integration and subchondral bone reconstitution in osteochondral defects in vivo. *Osteoarthritis Cartilage* 21: 614-624.

Ota H, Akishita M, Eto M, Iijima K, Kaneki M y Ouchi Y (2007) Sirt1 modulates premature senescence-like phenotype in human endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 43: 571-579.

Page-McCaw A, Ewald AJ y Werb Z (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 221-233.

Pakozdi A, Amin MA, Haas CS, Martinez RJ, Haines GK, Santos LL, Morand EF, David JR y Koch AE (2006) Macrophage migration inhibitory factor: a mediator of matrix metalloproteinase-2 production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 8: 132-146.

Park HS, Jung HY, Park EY, Kim J, Lee WJ y Bae YS (2004a) Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF- κ B. *J Immunol* 173: 3589-3593.

Park JY, Pillinger MH y Abramson SB (2006) Prostaglandin E₂ synthesis and secretion: the role of PGE₂ synthases. *Clinical immunology* 119: 229-240.

Park Y-G, Kang S-K, Kim W-J, Lee Y-C y Kim C-H (2004b) Effects of TGF- β , TNF- α , IL- β and IL-6 alone or in combination, and tyrosine kinase inhibitor on cyclooxygenase expression, prostaglandin E₂ production and bone resorption in mouse calvarial bone cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 2270-2280.

Pers Y-M, Ruiz M, Noel D y Jorgensen C (2015) Mesenchymal stem cells for the management of inflammation in osteoarthritis: state of the art and perspectives. *Osteoarthritis Cartilage* 23: 2027-2035.

Platas J, Guillén MI, del Caz MDP, Gomar F, Mirabet V y Alcaraz MJ (2013) Conditioned media from adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells downregulate degradative mediators induced by interleukin-1 β in osteoarthritic chondrocytes. *Mediators of inflammation* 2013:1-10.

Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S y Seger R (2011) The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta* 1813: 1619-1633.

Portal-Núñez S, Manassra R, Lozano D, Acitores A, Mulero F, Villanueva-Peñacarrillo ML, De la Fuente M y Esbrit P (2013) Characterization of skeletal alterations in a model of prematurely aging mice. *Age* 35: 383-393.

Prasadam I, Mao X, Shi W, Crawford R y Xiao Y (2013) Combination of MEK-ERK inhibitor and hyaluronic acid has a synergistic effect on anti-hypertrophic and pro-chondrogenic activities in osteoarthritis treatment. *J Mol Med* 91: 369-380.

Price JS, Waters JG, Darrah C, Pennington C, Edwards DR, Donell ST y Clark IM (2002) The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell* 1: 57-65.

Prockop DJ y Oh JY (2012) Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol Ther* 20(1): 14-20.

Pulsatelli L, Dolzani P, Piacentini A, Silvestri T, Ruggeri R, Gualtieri G, Meliconi R y Facchini A (1999) Chemokine production by human chondrocytes. *J Rheumatol Suppl* 26(9): 1992-2001.

Rickard DJ, Wang F-L, Rodriguez-Rojas A-M, Wu Z, Trice WJ, Hoffman SJ, Votta B, Stroup GB, Kumar S y Nuttall ME (2006) Intermittent treatment with parathyroid hormone (PTH) as well as a non-peptide small molecule agonist of the PTH1 receptor inhibits adipocyte differentiation in human bone marrow stromal cells. *Bone* 39: 1361-1372.

Rodier F y Campisi J (2011) Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 192(4): 547-556.

Rollins BJ (1997) Chemokines. *Blood* 90(3): 909-928.

Roman-Blas J y Jimenez S (2006) NF- κ B as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 14: 839-848.

Rossant J (2001) Stem cells from the mammalian blastocyst. *Stem cells* 19: 477-482.

Rousset F, Hazane-Puch F, Pinoso C, Nguyen M, Grange L, Soldini A, Rubens-Duval B, Dupuy C, Morel F y Lardy B (2015) IL-1beta mediates MMP secretion and IL-1beta neosynthesis via upregulation of p22 phox and NOX4 activity in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 23: 1972-1980.

Rufini A, Tucci P, Celardo I y Melino G (2013) Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene* 32: 5129-5143.

Ruth JH, Shahrara S, Park CC, Morel JC, Kumar P, Qin S y Koch AE (2003) Role of Macrophage Inflammatory Protein-3 α and its ligand CCR6 in rheumatoid arthritis. *Lab Invest* 83(4): 579-588.

Salama R, Sadaie M, Hoare M y Narita M (2014) Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev* 28(2): 99-114.

Salem HK y Thiemermann C (2010) Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem cells* 28: 585-596.

Sampson ER, Hilton MJ, Tian Y, Chen D, Schwarz EM, Mooney RA, Bukata SV, O'Keefe RJ, Awad H, Puzas JE, Rosier RN y Zuscik (2011) Teriparatide as a chondroregenerative therapy for injury-induced osteoarthritis. *Sci Transl Med* 3: 101-193.

Sato M, Uchida K, Nakajima H, Miyazaki T, Guerrero AR, Watanabe S, Roberts S y Baba H (2012) Direct transplantation of mesenchymal stem cells into the knee joints of Hartley strain guinea pigs with spontaneous osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 14: 31-40.

Saunders L y Verdin E (2007) Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene* 26: 5489-5504.

Sawa Y y Tsuruga E (2008) The expression of E-selectin and chemokines in the cultured human lymphatic endothelium with lipopolysaccharides. *J Anat* 212: 654-663.

Schade U y Rietschel ET (1982) The role of prostaglandins in endotoxic activities. *Klin Wochenschr* 60: 743-745.

Schmucker AC, Wright JB, Cole MD y Brinckerhoff CE (2012) Distal interleukin-1 β (IL-1 β) response element of human matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) binds activator protein 1 (AP-1) transcription factors and regulates gene expression. *J Biol Chem* 287(2): 1189-1197.

Schnoke M, Midura SB y Midura RJ (2009) Parathyroid hormone suppresses osteoblast apoptosis by augmenting DNA repair. *Bone* 45: 590-602.

Schulze-Tanzil G, Zreiqat H, Sabat R, Kohl B, Halder A, Muller RD y John T (2009) Interleukin-10 and articular cartilage: experimental therapeutical approaches in cartilage disorders. *Curr Gene Ther* 9(4): 306-315.

Schwab W, Kasper M, Gavlik JM, Schulze E, Funk RHW y Shakibaei M (2000) Characterization of caveolins from human knee joint cartilage: expression of caveolin-1,-2, and-3 in chondrocytes and association with integrin β_1 . *Histochem Cell Biol* 113: 221-225.

Sellam J y Berenbaum F (2010) The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 6: 625-635.

Sengenès C, Lolmède K, Zakaroff-Girard A, Busse R y Bouloumié A (2005) Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol* 205: 114-122.

Sharma A, Singh K y Almasan A (2012) Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. *Methods Mol Biol* 920: 613-626.

Shaulian E y Karin M (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4: 131-136.

Silva BC, Costa AG, Cusano NE, Kousteni S y Bilezikian JP (2011) Catabolic and anabolic actions of parathyroid hormone on the skeleton. *J Endocrinol Invest* 34: 801-810.

Silverman SL y Nasser K (2011) Teriparatide update. *Rheum Dis Clin North Am* 37: 471-477.

Smogorzewska A y de Lange T (2002) Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *EMBO J* 21: 4338-4348.

Stamenkovic I (2003) Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 200: 448-464.

Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H y Yannick F (2004) IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 15: 49-60.

Stewart AF, Cain RL, Burr DB, Jacob D, Turner CH y Hock JM (2000) Six-month daily administration of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein peptides to adult ovariectomized rats markedly enhances bone mass and biomechanical properties: a comparison of human parathyroid hormone 1-34, parathyroid hormone-related protein 1-36, and SDZ-parathyroid hormone 893. *J Bone Miner Res* 15(8):1517-25.

Stöve J, Huch K, Günther K-P y Scharf H-P (2001) Interleukin-1 β induces different gene expression of stromelysin, aggrecan and tumor-necrosis-factor-stimulated gene 6 in human osteoarthritic chondrocytes in vitro. *Pathobiology* 68: 144-149.

Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK y Hedrick MH (2005) Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 54: 132-141.

Studer R, Jaffurs D, Stefanovic-Racic M, Robbins PD y Evans CH (1999) Nitric oxide in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 7: 377-379.

Suda K, Udagawa N, Sato N, Takami M, Itoh K, Woo J-T, Takahashi N y Nagai K (2004) Suppression of osteoprotegerin expression by prostaglandin E₂ is crucially involved in lipopolysaccharide-induced osteoclast formation. *J Immunol* 172: 2504-2510.

Suda N, Gulespie MT, Traianedes K, Zhou H, Ho PW, Hards DK, Allan EH, Martin TJ y Moseley JM (1996) Expression of parathyroid hormone-related protein in cells of osteoblast lineage. *J Cell Physiol* 166: 94-104.

Suva L, Winslow G, Wettenhall R, Hammonds R, Moseley J, Diefenbach-Jagger H, Rodda C, Kemp B, Rodriguez H, Chen E, Hudson PJ, Martin TJ y Wood WI (1987) A

parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression. *Science* 237: 893-896.

Suzawa T, Miyaara C, Inada M, Maruyama T, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ichikawa A, Narumiya S y Suda T (2000) The role of prostaglandin E receptor subtypes (EP1, EP2, EP3, and EP4) in bone resorption: an analysis using specific agonists for the respective EPs. *Endocrinology* 141(4): 1554-1559.

Suzuki KO, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G y Nagase H (1990) Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry* 29(44): 10261-10270.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K y Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872.

Takayama K, Ishida K, Matsushita T, Fujita N, Hayashi S, Sasaki K, Tei K, Kubo S, Matsumoto T, Fujioka H, Kurosaka M y Kuroda R (2009) SIRT1 regulation of apoptosis of human chondrocytes. *Arthritis Rheum* 60(9): 2731-2740.

Tang Y, Zhao W, Chen Y, Zhao Y y Gu W (2008) Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell* 133: 612-626.

ter Huurne M, Schelbergen R, Blattes R, Blom A, de Munter W, Grevers LC, Jeanson J, Noël D, Casteilla L, Jorgensen C, van den Berg W y van Lent P (2012) Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 64(11): 3604-3613.

Tetlow LC, Adlam DJ y Woolley DE (2001) Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum* 44(3): 585-594.

Thilakawardhana S, Everett DM, Murdock PR, Dingwall C y Owen JS (2005) Quantification of apolipoprotein E receptors in human brain-derived cell lines by real-time polymerase chain reaction. *Neurobiol Aging* 26: 813-823.

Tiku ML, Shah R y Allison GT (2000) Evidence linking chondrocyte lipid peroxidation to cartilage matrix protein degradation possible role in cartilage aging and the pathogenesis of osteoarthritis. *J Biol Chem* 275(26): 20069-20076.

Tivey HS, Rokicki MJ, Barnacle JR, Rogers MJ, Bagley MC, Kipling D y Davis T (2013) Small molecule inhibition of p38 MAP kinase extends the replicative life span of human ATR-Seckel syndrome fibroblasts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 68(9): 1001-1009.

Toghraie F, Razmkhah M, Gholipour MA, Faghieh Z, Chenari N, Nezhad ST, Nazhvani S y Ghaderi A (2012) Scaffold-free adipose-derived stem cells (ASCs) improve experimentally induced osteoarthritis in rabbits. *Arch Iran Med* 15: 495-499.

Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ y Kessler PD (2002) Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105: 93-98.

Torres MA, Jones JD y Dangl JL (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol* 141: 373-378.

Trebino CE, Stock JL, Gibbons CP, Naiman BM, Wachtmann TS, Umland JP, Pandher K, Lapointe J-M, Saha S, Roach ML, Carter D, Thomas NA, Dustschi BA, McNeish JP, Hambor JE, Jakobson P-J, Carty TJ, Perez JR y Audoly LP (2003) Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. *Proc Natl Acad Sci* 100: 9044-9049.

Troeberg L y Nagase H (2012) Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta* 1824: 133-145.

Tsubokawa T, Yagi K, Nakanishi C, Zuka M, Nohara A, Ino H, Fujino N, Konno T, Kawashiri M-a, Ishibashi-Ueda H, Nagaya N y Yamagishi M (2010) Impact of anti-apoptotic and anti-oxidative effects of bone marrow mesenchymal stem cells with transient overexpression of heme oxygenase-1 on myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: 1320-1329.

Uccelli A, Moretta L y Pistoia V (2008) Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 8: 726-736.

Van Buul GM, Villafuertes E, Bos PK, Waarsing JH, Kops N, Narcisi R, Weinans H, Verhaar JAN, Bernsen MR y Van Osch GJVM (2012) Mesenchymal stem cells secrete factors that inhibit inflammatory processes in short-term osteoarthritic synovium and cartilage explant culture. *Osteoarthritis Cartilage* 20: 1186-1196.

van der Kraan PM y van den Berg WB (2000) Anabolic and destructive mediators in osteoarthritis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 3:205-211.

van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A y Nieuwland R (2012) Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev* 64(3): 676-705.

van Deursen JM (2014) The role of senescent cells in ageing. *Nature* 509: 439-446.

Vaquero A y Reinberg D (2009) Calorie restriction and the exercise of chromatin. *Genes Dev* 23: 1849-1869.

Vaquero A, Sternglanz R y Reinberg D (2007) NAD⁺-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs. *Oncogene* 26: 5505-5520.

Vaziri H, Dessain SK, Eaton EN, Imai S-I, Frye RA, Pandita TK, Guarente L y Weinberg RA (2001) hSIR2/SIRT1 functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 107: 149-159.

Vega A, Martín-Ferrero MA, Del Canto F, Alberca M, García V, Munar A, Orozco L, Soler R, Fuertes JJ, Huguet M, Sánchez A y García-Sancho J (2015) Treatment of knee osteoarthritis with allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells: a randomized controlled trial. *Transplantation* 99(8):1681-1690.

Vergunst C, van de Sande M, Lebre M y Tak P (2005) The role of chemokines in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Scand J Rheumatol* 34: 415-425.

Wang E y Gundersen D (1984) Increased organization of cytoskeleton accompanying the aging of human fibroblasts in vitro. *Exp Cell Res* 154: 191-202.

Wang P, Zhu F y Konstantopoulos K (2010) Prostaglandin E₂ induces interleukin-6 expression in human chondrocytes via cAMP/protein kinase A-and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF- κ B activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 298: 1445-1456.

Wei X, Du Z, Zhao L, Feng D, Wei G, He Y, Tan J, Lee W-H, Hampel H, Dodel R, Johnstone BH, March KL, Faslow MR y Du Y (2009) IFATS collection: The conditioned media of adipose stromal cells protect against hypoxia-ischemia-induced brain damage in neonatal rats. *Stem cells* 27:478-488.

Weinberg JB, Misukonis MA, Sami PJ, Mason SN, Sauls DL, Dittman WA, Wood ER, Smith GK, McDonald B, Bachus KE, Haney AF y Granger DL (1995) Human

mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood* 86: 1184-1195.

Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA y Szukiewicz D (2014) The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm* 2014: 1-19.

Wolff HA, Rolke D, Rave-Fränk M, Schirmer M, Eicheler W, Doerfler A, Hille A, Hess CF, Matthias C y Rödel RM (2011) Analysis of chemokine and chemokine receptor expression in squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) cell lines. *Radiat Environ Biophys* 50: 145-154.

Wu L, Prins HJ, Helder MN, van Blitterswijk CA y Karperien M (2012) Trophic effects of mesenchymal stem cells in chondrocyte co-cultures are independent of culture conditions and cell sources. *Tissue Eng Part A* 18(15-16): 1542-1551.

Wu L, Leijten JC, Georgi N, Post JN, van Blitterswijk CA y Karperien M (2011) Trophic effects of mesenchymal stem cells increase chondrocyte proliferation and matrix formation. *Tissue Eng Part A* 17: 1425-1436.

Wu Y, Chen L, Scott PG y Tredget EE (2007) Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem cells* 25: 2648-2659.

Wysolmerski JJ (2012) Parathyroid hormone-related protein: an update. *J Clin Endocrinol Metab* 97: 2947-2956.

Xu Y-k, Ke Y, Wang B y Lin J-h (2015) The role of MCP-1-CCR2 ligand-receptor axis in chondrocyte degradation and disease progress in knee osteoarthritis. *Biol Res* 48: 64-72.

Yamamoto H, Schoonjans K y Auwerx J (2007) Sirtuin functions in health and disease. *Mol Endocrinol* 21(8): 1745-1755.

Yamamoto Y y Gaynor RB (2001) Role of the NF- κ B pathway in the pathogenesis of human disease states. *Current molecular medicine* 1: 287-296.

Yan J-y, Tian F-m, Wang W-Y, Cheng Y, Song H-P, Zhang Y-Z y Zhang L (2014) Parathyroid hormone (1-34) prevents cartilage degradation and preserves subchondral bone micro-architecture in guinea pigs with spontaneous osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 22: 1869-1877.

Yanez R, Lamana ML, García-Castro J, Colmenero I, Ramirez M y Bueren JA (2006) Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem cells* 24: 2582-2591.

Yang L, Carlson SG, McBurney D y Horton WE (2005) Multiple signals induce endoplasmic reticulum stress in both primary and immortalized chondrocytes resulting in loss of differentiation, impaired cell growth, and apoptosis. *J Biol Chem* 280: 31156-31165.

Yin H, Xu L y Porter NA (2011) Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev* 111(10): 5944-5972.

Yoshie O, Imai T y Nomiyama H (2001) Chemokines in immunity. *Adv Immunol* 78: 57-110.

Yuan GH, Masuko-Hongo K, Sakata M, Tsuruha JI, Onuma H, Nakamura H, Aoki H, Kato T y Nishioka K (2001) The role of C-C chemokines and their receptors in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 44(5): 1056-1070.

Yudoh K, Matsuno H, Osada R, Nakazawa F, Katayama R y Kimura T (2000) Decreased cellular activity and replicative capacity of osteoblastic cells isolated from the periarticular bone of rheumatoid arthritis patients compared with osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum* 43(10): 2178-2188.

Yudoh K, van Trieu N, Nakamura H, Hongo-Masuko K, Kato T y Nishioka K (2005) Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Res Ther* 7: 380-391.

Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Zanin C, Vayssiere J-L, Petit PX y Kroemer G (1995) Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J Exp Med* 181: 1661-1672.

Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, Redlich K, Smolen J, Schonhaler HB, Kenner L, Tschachler E y Wagner EF (2008) Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Res Ther* 10: 201-210.

Zenz R y Wagner EF (2006) Jun signalling in the epidermis: From developmental defects to psoriasis and skin tumors. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 1043-1049.

Zhang H-C, Liu X-B, Huang S, Bi X-Y, Wang H-X, Xie L-X, Wang Y-Q, Cao X-F, Lv J, Xiao F-J, Yang Y y Guo Z-K (2012a) Microvesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells stimulated by hypoxia promote angiogenesis both in vitro and in vivo. *Stem Cells Dev* 21: 3289-3297.

Zhang X, Mao Z y Yu C (2004) Suppression of early experimental osteoarthritis by gene transfer of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-10. *J Orthop Res* 22: 742-750.

Zhang X, Schwarz EM, Young DA, Puzas JE, Rosier RN y O'Keefe RJ (2002) Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *J Clin Invest* 109: 1405-1415.

Zhang W, Chen J, Zhang S y Ouyang HW (2012b) Inhibitory function of parathyroid hormone-related protein on chondrocyte hypertrophy: the implication for articular cartilage repair. *Arthritis Res Ther* 14: 221-231.

Zhou H, Lou S y Zhang K (2004) Recovery of function in osteoarthritic chondrocytes induced by p16INK4a-specific siRNA in vitro. *Rheumatology* 43: 555-568.

Zou H, Stoppani E, Volonte D y Galbiati F (2011) Caveolin-1, cellular senescence and age-related diseases. *Mech Ageing Dev* 132: 533-542.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P y Hedrick MH (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell* 13: 4279-4295.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP y Hedrick MH (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering* 7(2): 211-228.

Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA y Maini RN (2000) Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis research* 2: 477-488.

ANEXOS

Artículos publicados durante el desarrollo de la presente tesis doctoral:

Paracrine effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells in inflammatory stress-induced senescence features of osteoarthritic chondrocytes

Autores: Platas J, Guillén MI, Pérez del Caz MD, Gomar F, Mirabet V, Alcaraz MJ

Revista: Aging (2016)

Anti-senescence and Anti-inflammatory Effects of the C-terminal Moiety of PTHrP Peptides in OA Osteoblasts

Autores: Platas J, Guillén MI, Gomar F, Castejón MA, Esbrit P, Alcaraz MJ

Revista: J Gerontol A Biol Sci Med Sci (2016)

Conditioned Media from Adipose-Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Downregulate Degradative Mediators Induced by Interleukin-1 β in Osteoarthritic Chondrocytes

Autores: Platas J, Guillén MI, Pérez del Caz MD, Gomar F, Mirabet V, Alcaraz MJ

Revista: Mediators Inflamm (2013)



**INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA DEL HOSPITAL CLINIC
UNIVERSITARI DE VALENCIA**

D. Manuel Labiós Gómez, Secretario del Comité, Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínic
Universitari de Valencia

CERTIFICA

Que en este Comité, en su reunión de comisión ordinaria de fecha 26 de enero de 2010, y según consta en el acta de la misma, se han analizado los aspectos éticos y científicos relacionados con el proyecto de investigación que lleva por título:

Estrategias de protección frente a procesos degradativos osteoarticulares

Que será llevado a cabo en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia y cuyo investigador principal es la Dra. M^a José Alcaraz Tormo, acordando que reúne las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación médica y biomédica establecidos en la **Declaración de Helsinki** (Junio 1964, Helsinki, Finlandia) de la Asamblea Médica Mundial, y sus revisiones (Octubre 1975, Tokio, Japón), (Octubre 1983, Venecia, Italia), (Septiembre 1989, Hong Kong), (Octubre 1996, Somerset West, Sudáfrica) y (Octubre 2000, Edimburgo) en la **Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos del Hombre de la UNESCO** y los acuerdos del **Protocolo Adicional del Consejo de Europa para la protección de los Derechos del Hombre y de la dignidad del ser humano frente a la aplicaciones de la biología y de la medicina** (París 12-1-1998, ratificado el 23-7-1999).

Lo que certifico a efectos oportunos.

Valencia, 26 de enero de 2010

Fdo. : Dr. D. Manuel Labiós Gómez
Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica

D. Fernando A. Verdú Pascual, Profesor Titular de Medicina Legal y Forense, y Secretario del Comité Ético de Investigación en Humanos de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València.

CERTIFICA:

Que el Comité Ético de Investigación en Humanos, en la reunión celebrada el día 10 de febrero de 2014, una vez estudiado el proyecto de investigación titulado:

“Mecanismos celulares reguladores de la respuesta inflamatoria en patologías articulares crónicas”, número de procedimiento H1389967869063,

cuya investigadora responsable es Dña. M^a José Alcaraz Tormo, ha acordado informar favorablemente el mismo dado que se respetan los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y cumple los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Valencia, a once de febrero de dos mil catorce.

FERNANDO
ALEJO|VERDU|
PASCUAL
2014.02.11
11:26:13 +01'00'



DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Don Serafín Rodríguez Capellán, Secretario del Comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe,

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado en su sesión de fecha **6 de mayo de 2014**, el Proyecto de Investigación titulado **"MECANISMOS CELULARES REGULADORES DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN PATOLOGÍAS ARTICULARES CRÓNICAS."**, con nº de registro **2014/0054**.

Que dicho proyecto se ajusta a las normativas éticas sobre investigación biomédica con sujetos humanos y es viable en cuanto al planteamiento científico, objetivos, material y métodos, etc, descritos en la solicitud, así como la Hoja de Información al Paciente y el Consentimiento Informado.

En consecuencia este Comité acuerda emitir **INFORME FAVORABLE** de dicho Proyecto de Investigación que será realizado en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe por el/la **Dr. / Dra. M^a JOSE ALCARAZ TORMO** del servicio de **UNIVERSIDAD DE VALENCIA** como Investigador Principal.

Miembros del CEIB:

Presidente:

Dr. JUAN SALOM SANVALERO (Unidad de Circulación Cerebral Experimental)

Vicepresidente:

Dr. JOSE VICENTE CERVERA ZAMORA (Hematología)

Secretario:

D. SERAFIN RODRIGUEZ CAPELLAN (Asesor jurídico)

Miembros:

Dr. SALVADOR ALIÑO PELLICER (Catedrático Farmacólogo Clínico)

Dra. BELEN BELTRAN NICLOS (Medicina Digestiva)

Dra. INMACULADA CALVO PENADES (Reumatología Pediátrica)

Dr. JOSE VICENTE CASTELL RIPOLL (Director de Investigación)

Dra. REMEDIOS CLEMENTE GARCIA ((Medicina Intensiva) (Miembro CBA))

Dra. MARIA JOSE GOMEZ-LECHON MOLINER (Investigadora del Grupo Acreditado en Hepatología Experimental)

Dr. RAMIRO JOVER ATIENZA (Doctor en biología-Universidad de Valencia- Unidad de Bioquímica y Biología Molecular)

Dr. JAVIER PEMAN GARCIA (Investigador del Grupo Acreditado multidisciplinar para el estudio de la Infección Grave)

Dr. ALFREDO PERALES MARIN (Jefe de Servicio - Obstetricia)

Dr. JOSE LUIS PONCE MARCO ((Unidad de Cirugía Endocrino Metabólica)

Dr. JOSE LUIS VICENTE SANCHEZ (Jefe de sección-Unidad de Reanimación)

Dra. PILAR SAENZ GONZALEZ (Neonatología)

Dr. MELCHOR HOYOS GARCIA (Gerente del Departamento de salud nº 7-La Fe)

D. Fernando A. Verdú Pascual, Profesor Titular de Medicina Legal y Forense, y Secretario del Comité Ético de Investigación en Humanos de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que el Comité Ético de Investigación en Humanos, en la reunión celebrada el día 10 de febrero de 2014, una vez estudiado el proyecto de investigación titulado:

"Mecanismos celulares reguladores de la respuesta inflamatoria en patologías articulares crónicas", número de procedimiento HI389967869063,

cuya investigadora responsable es Dña. M^a José Alcaraz Tormo, ha acordado informar favorablemente el mismo dado que se respetan los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y cumple los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Valencia, a once de febrero de dos mil catorce.

FERNANDO
ALEJO|VERDU|
PASCUAL
2014.02.11
11:26:13 +01'00'

