



Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia
Institut de Biotecnologia i Biomedicina

**Avaluació de la resposta “in vitro” de condrocits
humans tractats amb plasma ric en plaquetes
(PRP), en presència de LPS o en condicions
d’estrés oxidatiu**

Tesi per optar al grau de Doctora en Immunologia

Laia Viñals Galí

Dirigida per:

Dra. Paz Martínez Ramírez

Dr. Antoni Iborra Obiols

Bellaterra, 2011



A aquells que la volien

A vegades sembla que la Tesi sols sigui una excusa per lluitar i indagar. Indagar en la biologia, però també en la vida en general; obrir-se camí per un recorregut inèdit, sempre amb la sorpresa d'on s'arribarà. És un camí llarg, en el meu cas, diria que massa llarg. Però és un gust mirar endarrere i adonar-se amb gratitud que la noieta que començava un dia, queda lluny de la que escriu avui el punt i final.

Més satisfactori és reconèixer la quantitat de gent que ha fet camí amb mi durant aquest temps, aquella gent que m'ha alimentat a molts nivells, la que m'ha qüestionat, la que m'ha meravellat, els que m'han sostingut i els que m'han deixat anar... no seria qui ara sóc sense tots vosaltres. Heu estat molts més, però sol en mencionaré uns pocs:

Agrair a la Dra. Paz Martínez el donar-me l'oportunitat de formar part del seu grup i embarcar-me sota la seva direcció en aquesta aventura que és la recerca; al Dr. Antoni Iborra per codirigir el treball i ser un bon mestre en el dia a dia del laboratori. Agrair al grup del Dr. Jordi Monfort la facilitat per obtenir les biòpsies de cartílag i a la Dra. Marta Prades per iniciar-me en el món dels concentrats de plaquetes.

Amb un gust molt especial vull mencionar a l'Araís, el Roger i la Susanna, companys i amics durant tot aquest temps. Tota paraula per dir-vos es queda curta, moltes gràcies! El Carlos, el Hans i la resta de companys de l'IBB que sempre provocàveu una bona ocasió per somriure.

Les companyes d'aquest últim temps d'estar al Clínic: la Mireia, per donar força als somnis i acompanyar-me de ben a prop en aquest curs tan intens, no saps quant se pot aprendre de la teva alegria i la teva empenta. La Merche, la Sue, la Gemma, la Parti, la Raquel... cada una amb aquella característica tan especial vostra, que ha significat un gran regal per mi, i un gust treballar amb i per vosaltres. Us trobaré a faltar!

Però si arribo a dia d'avui, el mèrit majoritari és pels tossuts i pesats que m'heu posat massa difícil abandonar. En especial el pare i la mare que sempre heu estat allà, entenent o no entenent, però sempre estimant. Gràcies! I perdó per si a vegades no us ho he posat gaire fàcil.

AGRAÏMENTS

Molt importants han estat també el Joan i la Clara. El Joan per portar-me a pedalar i, aprendre amb la Cannondale, que quan sembla que no hi han forces encara en queden més! I la Clara, per posar sempre música a la vida, a la meva i a la de tants altres! I no únicament amb la veu i els instruments... Gràcies germanets!

A l'Enric, al Pau, als de RdV, al Marc i a l'Anna, als de Bon Pastor, als de la Barceloneta i als de Cantera: bona terra heu estat durant tot aquest "pelegrinatge". Gràcies per compartir amb mi les vostres vides i el vostre saber.

I ara m'aturo i miro on sóc. Conscient del camí fet, reposo. Agafo aire i diviso cap a on vull continuar, sense pressa. Oloro el perfum del Sol i la Lluna que el Bernat un dia va destapar, i agraeixo que encara hi hagin testimonis vius d'allò que anhele. El Javier, l'Alegria, el Toni, el Marc, la Claudia, la Maria... bombolletes de llum que aporten la il·lusió d'una vida ben viscuda. Gràcies!!

Em trec les sabates i, descalça, continuo...

ÍNDEX

RESUM.....ix

ABREVIATURES.....xiii

INTRODUCCIÓ

1. L'ARTICULACIÓ SINOVIAL.....3

1.1. EL CARTÍLAG ARTICULAR.....4

1.1.1. Composició del cartílag articular.....4

1.1.1.1. Fracció cel·lular del cartílag: els condrocits.....4

1.1.1.2. La matriu extracel·lular cartilaginosa.....7

1.1.1.2.1. Composició de la matriu cartilaginosa.....7

1.1.1.2.1.1. Proteïnes: els col·làgens.....7

1.1.1.2.1.2. Glucosaminoglicans: l'àcid hialurònic.....9

1.1.1.2.1.3. Proteoglicans: l'agrecan.....9

1.1.1.2.2. Estructura de la matriu cartilaginosa.....11

1.1.1.2.3. Funcions de la matriu cartilaginosa.....11

1.1.1.3. Fracció inorgànica del cartílag: l'aigua.....11

1.1.2. Estructura del cartílag.....12

1.1.3. Metabolisme del cartílag.....13

1.1.3.1. Canvis del cartílag associats a l'edat.....14

1.2. ARTROPATIES.....16

1.2.1. Osteoartritis (Artrosi).....17

1.2.2. Artritis reumatoide.....19

1.3. TERÀPIA DE LES ARTROPATIES QUE AFECTEN AL CARTÍLAG.....23

2. PLASMA RIC EN PLAQUETES (PRP)	25
2.1. <i>COMPOSICIÓ CEL·LULAR DEL PRP</i>	26
2.1.1. Les plaquetes.....	26
2.1.1.1. Origen i estructura de les plaquetes.....	27
2.1.1.2. Activació de les plaquetes.....	30
2.2. <i>FACTORS SOLUBLES DEL PRP</i>	31
2.2.1. El Transforming Growth Factor $-\beta$ (TGF- β).....	31
2.2.1.1. Estructura del TGF- β	32
2.3. <i>APLICACIONS DEL PRP</i>	33
3. RESPOSTA IMMUNOLÒGICA	36
3.1. <i>LES CÈL·LULES T EFECTORES</i>	36
3.2. <i>LES CÈL·LULES T REGULADORES</i>	37
3.3. <i>PAPER DEL TGF-β EN LA RESPOSTA IMMUNOLÒGICA</i>	38
HIPÒTESI	43
OBJECTIUS	47
MATERIALS I MÈTODES	
4. OBTENCIÓ DE LES MOSTRES	51
4.1. <i>BIÒPSIES DE CARTÍLAG ARTICULAR I CULTIU PRIMARI</i> <i>DE CONDRÒCITS</i>	51
4.1.1. Processament de biòpsies de cartílag articular per a la realització de cultiu primari de condrocits.....	52
4.1.2. Descongelació de condrocits.....	54

4.1.3.	Càlcul de la concentració i vitalitat de condrocits.....	54
4.1.4.	Tripsinització cel·lular.....	57
4.2.	<i>OBTENCIÓ DE PLASMA RIC EN PLAQUETES (PRP)</i>	58
4.2.1.	Activació de les plaquetes amb CaCl ₂	59
4.2.2.	Anàlisi de l'activació plaquetar	60
	a) Marcatge CD61/CD62P per l'anàlisi amb citometria de flux.....	60
	b) Determinació de la concentració de TGF-β.....	61
4.2.3.	Anàlisi del contingut de GAGs i citocines en el PRP.....	63
	a) Determinació de la concentració de GAGs.....	64
	b) Quantificació de IL-12p70, TNF-α, IL-10, IL-6, IL-1β i IL-8.....	65
5. DISSENY EXPERIMENTAL. TRACTAMENT		
DELS CONDRÒCITS		
5.1. ESTABLIMENT DEL MODEL IN VITRO DE DANY		
CEL·LULAR: ESTIMULACIÓ AMB LPS I OXIDACIÓ AMB		
H₂O₂ DEL CULTIU		
5.1.1. Determinació de la citotoxicitat del LPS i de		
l'H₂O₂ sobre cultiu primari de condrocits		
5.1.2. Determinació del temps de tractament amb		
LPS i amb H₂O₂ per l'establiment del model de dany cel·lular		
5.2. ACTIVITAT SINTÈTICA DELS CONDRÒCITS EN		
CULTIU TRACTATS AMB LPS O AMB H₂O₂		
5.3. AVALUACIÓ DE L'EFECTE DEL PRP EN CONDRÒCITS		
TRACTATS AMB LPS O H₂O₂		
5.3.1. Determinació de la concentració de glicosaminoglicans		
en sobrenadant de cultiu		

5.3.2.	Quantificació de IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β i IL-8 en sobrenadant de cultiu.....	73
5.3.3.	Quantificació de TGF- β en sobrenadant de cultiu.....	73

RESULTATS

6.	OBTENCIÓ DE MOSTRES I REALITZACIÓ DE CULTIU PRIMARI DE CONDRÒCITS.....	77
-----------	---	-----------

6.1.	<i>REALITZACIÓ DEL CULTIU PRIMARI A PARTIR DE BIÒPSIA DE CARTÍLAG ARTICULAR.....</i>	<i>77</i>
6.1.1.	Col·lagenasa: Tipus, concentració i temps d'incubació.....	78
6.1.2.	Digestió enzimàtica seqüencial: hialuronidasa, pronasa, col·lagenasa.....	78
6.2.	<i>REALITZACIÓ DEL CULTIU PRIMARI A PARTIR DE CONDRÒCITS CONGELATS.....</i>	<i>81</i>

7.	ESTABLIMENT DEL MODEL IN VITRO DE DANY CEL·LULAR: TRACTAMENT AMB LPS O AMB AGENTS OXIDANTS.....	85
-----------	--	-----------

7.1.	<i>TRACTAMENT DE CULTIUS DE CONDRÒCITS AMB LPS.....</i>	<i>85</i>
7.1.1.	Anàlisi de la citotoxicitat del LPS.....	85
7.1.2.	Avaluació dels efectes del LPS sobre l'activitat metabòlica dels condrocits.....	87
7.1.3.	Caracterització del model d'estímul amb LPS segons el perfil de citocines.....	89
7.2.	<i>TRACTAMENT DE CULTIU DE CONDRÒCITS AMB H₂O₂.....</i>	<i>93</i>
7.2.1.	Anàlisi de la citotoxicitat de l'H ₂ O ₂	94

7.2.2.	Avaluació dels efectes de l'H ₂ O ₂ sobre l'activitat metabòlica dels condrocits.....	96
7.2.3.	Caracterització del model d'oxidació segons el perfil de citocines.....	97
8.	TRACTAMENT DEL MODEL DE DANY CEL·LULAR AMB PLASMA RIC EN PLAQUETES.....	101
8.1.	<i>OBTENCIÓ DE PLASMA RIC EN PLAQUETES (PRP).....</i>	<i>101</i>
8.1.1.	Valoració de la velocitat de centrifugació per a l'obtenció de PRP.....	101
8.1.2.	Valoració de la concentració de CaCl ₂ per a l'activació de les plaquetes.....	102
8.1.3.	Valoració del temps d'activació de les plaquetes amb CaCl ₂	103
8.2.	<i>TRACTAMENT DE CONDRÒCITS AMB PRP.....</i>	<i>105</i>
8.2.1.	Control de l'efecte del CaCl ₂ sobre el cultiu de condrocits.....	105
8.2.2.	Control del contingut en TGF-β, GAGs i citocines en els concentrats de plaquetes.....	107
8.3.	<i>TRACTAMENT AMB PRP DELS MODELS IN VITRO DE DANY CEL·LULAR.....</i>	<i>109</i>
8.3.1.	Efecte del PRP sobre la capacitat de síntesis de matriu.....	111
8.3.2.	Efecte del PRP sobre el perfil de citocines.....	112
	DISCUSSIÓ.....	123
	CONCLUSIONS.....	143
	BIBLIOGRAFIA.....	147

RESUM

INTRODUCCIÓ: En les patologies articulars que afecten el cartílag existeix una relació bidireccional entre la degradació del teixit i la resposta inflamatòria. El plasma ric en plaquetes conté factors moduladors de la inflamació i promotors de la regeneració. Aquests factors podrien actuar sobre els condrocits modificant-ne l'expressió de citocines i molècules de la matriu cartilaginosa, de forma que es generaria un entorn favorable per la recuperació del dany.

OBJECTIUS: Establir models in vitro de condrocits tractats amb LPS i de condrocits tractats amb agents oxidants i avaluar l'efecte del plasma ric en plaquetes sobre aquests models cel·lulars.

MATERIAL I MÈTODES: S'han establert cultius primaris de condrocits a partir de biòpsies de cartílag articular i s'han tractat amb LPS (100 µg/ml) o amb H₂O₂ (1mM) durant 24 h. S'ha valorat l'activitat metabòlica dels condrocits mitjançant la quantificació de glicosaminoglicans (GAGs) en els sobrenadants dels cultius i també s'ha valorat el patró de citocines i factors de creixement (IL-12p70, TNF-α, IL-10, IL-6, IL-1β, IL-8 i TGF-β) alliberats pels condrocits en el sobrenadant, mitjançant citometria de flux o ELISA. S'ha generat plasma ric en plaquetes a partir de sang sencera i se n'ha valorat el contingut en TGF-β. S'han tractat els cultius de condrocits amb PRP (25% i 50%) i s'ha valorat l'activitat metabòlica i el perfil de citocines dels condrocits.

RESULTATS: El tractament dels condrocits amb LPS provoca un increment de GAGs i de les citocines TNF-α, IL-6, IL-8 i IL-10 en els sobrenadant, mentre que disminueixen els nivells de TGF-β. A l'afegir PRP ric en TGF-β al cultiu, el TNF-α i la IL-10 del sobrenadant disminueixen. L'oxidació dels condrocits amb H₂O₂ provoca la disminució de GAGs en el sobrenadant però no altera el perfil de citocines. L'efecte del PRP sobre el cultiu de condrocits en condicions d'oxidació genera un increment de la IL-8 i un lleuger augment de la IL-6.

CONCLUSIONS: Els condrocits participen de forma activa en la resposta inflamatòria ja que quan estan en presència d'un agent com el LPS canvien el perfil de citocines inflamatòries i reguladores que sintetitzen. El PRP, ric en TGF-β, modifica el patró de citocines cap a un perfil menys inflamatori i pot promoure la proliferació dels condrocits. El tractament amb PRP de condrocits en un entorn oxidatiu provoca uns

RESUM

efectes similars als del tractament amb PRP sobre cultius normals, però en menor intensitat.

ABREVIATURES

ADP	difosfat d'adenosina
AGE	advanced glycation end products (productes de glicosilació avançada)
ALK5	receptor tipus I del factor de creixement transformador
APC	cèl·lules presentadores d'antigen
AR	artritis reumatoide
ATP	trifosfat d'adenosina
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CaCl₂	clorur càlcic
CBA	Cytometric Bead Array
CD44	receptor de l'àcid hialurònic
CO₂	diòxid de carboni
CS	Condroitin Sulfat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM:F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DMMB	Dimethylmethylen blue
DMSO	Dimetilsulfòxid
DNA	àcid desoxiribonucleic
DTS	Dense Tubular System (sistema tubular dens)
EGF	Epidermal Growth Factor (factor de creixement epidèrmic)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (assaig per immunoabsorció lligat a enzims)
FCS	Fetal Calf Serum (Sèrum fetal boví)
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FR	factor reumatoide
GAG	glicosaminoglican
H₂SO₄	àcid sulfúric
HEPES	Àcid N-2-Hidroxiètilpiperacina-N'-2'-Etanesulfònic
HLA	Human Leukocyte Antigen (antigen leucocitari humà)
IGF	insulin growth factor (factor de creixement tipus insulina)
IgG	immunoglobulina G
Ihh	proteïna Indian Hedgehog
IL	interleucina
iT_{reg} (cèl·lula)	cèl·lula T reguladora induïda
KS	queratan sulfat
LAP	latency-associated peptide (pèptid associat a latència)
LIF	Leukocyte Inhibitor Factor (factor inhibidor de leucòcits)
LPS	lipopolisacàrid
LTBP	Latent TGF-β Binding Protein (proteïna d'unió al factor de creixement transformador beta latent)
MMP	metal·loproteasa
MSC (cèl·lula)	Mesenchymal Stem Cell (cèl·lula mare mesenquimal)
MTT	bromur de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil-tetrazol
NaOH	hidròxid sòdic
nT_{reg} (cèl·lula)	cèl·lula T reguladora natural

ABREVIATURES

OA	osteoartritis
OCS	sistema canicular obert
OPD	ortho-phenyl diamine
P/S	Penicil·lina / Estreptomicina
PBS	Phosphate buffered saline (tampó fosfat salí)
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor (factor de creixement derivat de plaquetes)
PE	phycoerythrin
PG	proteoglicà
PGE₂	prostaglandina E2
PG-M	versican
PPP	plasma pobre en plaquetes
PRP	plasma ric en plaquetes
PTHrP	proteïna relacionada amb l'hormona paratiroidea
RAGE	receptor de productes de glicosilació avançada Receptor activator of nuclear factor k B (receptor activador del factor nuclear k B)
RANK	
ROS	Reactive Oxygen Species (espècies reactives d'oxigen)
sTNFR	receptor soluble de TNF
TGF-β	Transforming Growth Factor- β (factor de creixement transformador β)
Th (cèl·lula)	cèl·lula T col·laboradora Tissue inhibitor of metalloproteinases (Inhibidor tissular de metal·loproteases)
TIMP	
TLR	receptor toll-like
TNF-α	factor de necrosi tumoral α
T_{reg} (cèl·lula)	cèl·lula T reguladora
TSP-1	trombospondina
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (factor de creixement de l'endoteli vascular)
CD61	integrina-β3
CD62P	P-selectina
H₂O₂	aigua oxigenada
C-4-SO₄	condroitin 4-sulfat
H₂O	aigua
iNOS	Inducible nitric oxide synthase (òxid nítric sintasa induïble)
COX-2	ciclooxigenasa 2
NF-κB	factor nuclear kB

INTRODUCCIÓ

1. L'ARTICULACIÓ SINOVIAL

L'articulació sinovial, com per exemple n'és el genoll, és un sistema complex tant des del punt de vista mecànic, com des de l'estructura de teixits. Ha de permetre el moviment, per tant ha de ser "flexible", però a la vegada ha de ser resistent a importants forces de compressió, tensió i de cisallament a la que es veu sotmesa. Per a dur a terme de manera correcta la seva funció es necessari el bon estat de cadascuna de les seves parts: l'os, el cartílag articular, la membrana sinovial, el líquid sinovial, la càpsula articular fibrosa i els lligaments, que es situen anatòmicament tal com mostra la Figura 1.

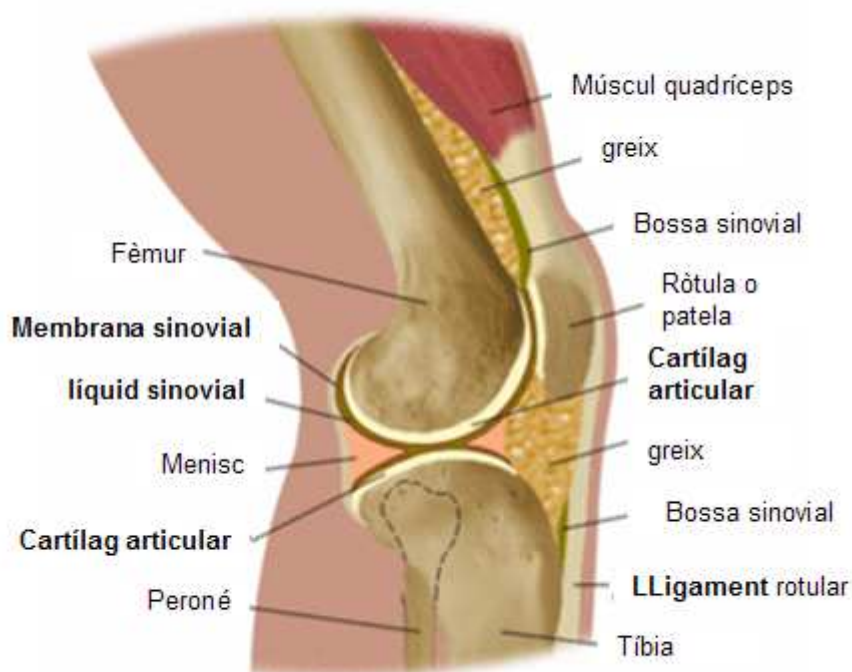


Figura 1. Anatomia del genoll.

Modificació de la imatge publicada per la Federació Mexicana de Voleibol.

El **cartílag articular** recobreix les superfícies dels ossos que estan en contacte amb l'articulació i proporciona una superfície fina de molt baixa fricció, amb capacitat d'amortir les forces i disminuir així l'impacte sobre els ossos. La **membrana sinovial** recobreix tot el perímetre cartilaginós, dóna estabilitat a l'articulació, proporciona la cavitat per al líquid sinovial i desenvolupa una important activitat sintètica de molècules que participen en el metabolisme del teixit articular. El **líquid sinovial** actua de

lubricant, evita el contacte entre les superfícies, aporta nutrients a les cèl·lules del cartílag i elimina productes de rebuig. Els **lligaments** i la **càpsula** articular són els principals responsables de l'estabilitat mecànica articular.

Moltes patologies articulars, siguin d'origen mecànic o fisiològic, deriven en l'afectació del cartílag. Quan aquest queda malmès, tota l'articulació en rep les conseqüències i la funcionalitat de l'articulació queda disminuïda. El dolor associat és una característica d'aquest tipus de patologies, que juntament amb la limitació de la mobilitat de l'individu, provoquen una reducció important de la qualitat de vida de qui les pateix. És important, doncs, mantenir el cartílag sa i desenvolupar diferents estratègies terapèutiques que permetin retornar les característiques que li confereixen aquesta capacitat amortidora i de baixa fricció que protegeix els ossos i la mecànica general de l'articulació.

1.1. EL CARTÍLAG ARTICULAR

El cartílag articular és el teixit situat a la superfície de la zona dels ossos que entren en contacte en una articulació sinovial. Macroscòpicament forma una superfície suau i d'aspecte cristal·lí. Aquesta característica és el que dóna nom de cartílag hialí (del grec hyálinos, “de cristall”) al cartílag articular. Té un gruix d'uns 1-2mm [1] i és de color entre blanc opac o groguenc, segons l'edat. Per a un major aprofundiment es pot revisar el treball de Bhosale et.al. [2].

1.1.1. COMPOSICIÓ DEL CARTÍLAG ARTICULAR

El cartílag es compon d'una part **cel·lular**, **matriu extracel·lular**, i d'una part **inorgànica**. Aquesta composició i l'estructura en la que es disposa confereixen al cartílag la seva capacitat amortidora i de protecció dels ossos.

1.1.1.1. Fracció cel·lular del cartílag: Els condrocits

En el cartílag articular només hi ha un tipus cel·lular, els condrocits. Tal com s'aprecia a la Figura 2, la proporció cel·lular en aquest teixit és característicament petita, ja que només representa el 5% del volum total del teixit [3]. Els condrocits són cèl·lules esfèriques (13 µm de diàmetre mig), però en funció de l'entorn poden prendre morfologies més allargades en determinades zones del cartílag [4].

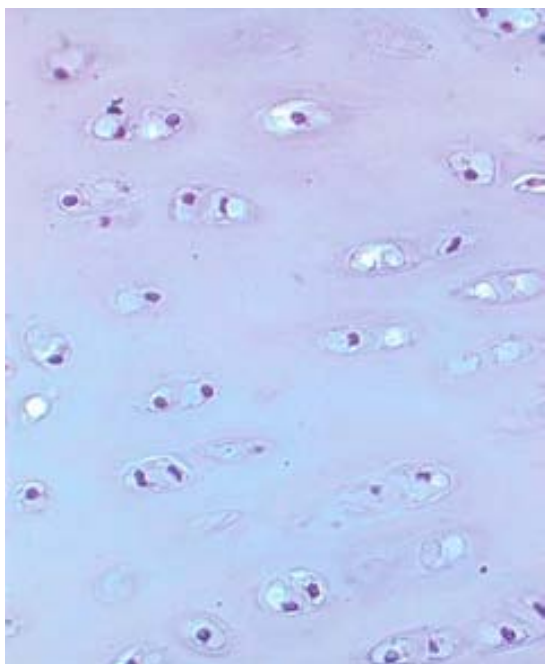


Figura 2. Condròcits. Tall histològic de cartílag hialí. S'observa la zona transicional del cartílag on el condròcits se situen en "lacunes". *Cartilage, Bone & Joints, Bone Formation (Department of Anatomy and Cell Biology of Indiana University)* (<http://anatomy.iupui.edu/>)

Els condròcits s'alimenten per difusió dels nutrients que aporta el líquid sinovial a través de la matriu [5]. La falta d'irrigació sanguínia en aquest teixit genera un entorn amb una tensió baixa d'oxigen, la qual cosa obliga als condròcits a utilitzar majoritàriament el metabolisme anaeròbic. L'activitat metabòlica individual d'aquest tipus cel·lular és elevada però, a causa del poc volum que representa en el cartílag, l'activitat metabòlica total del teixit és baixa.

Els condròcits sintetitzen tots els components de la matriu extracel·lular. També enzims catalítics, com metal·loproteases (MMPs) i els seus inhibidors tissulars (TIMPs, de l'anglès Tissue Inhibitor of Metalloproteinases), factors de creixement (TGF- β), citocines inflammatòries i anti-inflamatòries (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10) [6-8], òxid nítric. En la superfície cel·lular expressen receptors per a respondre de forma autocrina o paracrina als diferents factors de creixement i citocines, així com també receptors TLR [9]. Els receptors TLR (de l'anglès toll-like receptor) són receptors conservats filogenèticament involucrats en la resposta immunitària innata, que reconeixen patrons moleculars associats a patògens [10]. Un exemple d'aquests patrons moleculars són els lipopolisacàrids (LPS) presents en la membrana externa de bacteris Gram negatius. Els condròcits expressen TLRs en la seva superfície [9-11] i per tant, responen al tractament amb LPS desencadenant tota una cascada de senyalització que resulta amb la síntesi de citocines i altres molècules, originàriament com a resposta a la invasió pel patògen. El

LPS serà una de les molècules que s'introduiran en aquest estudi tal com posteriorment es veurà.

Però els condrocits, a part de respondre a senyals bioquímics, també responen a estímuls mecànics. Les forces de càrrega a les quals es veu sotmès el cartílag a causa del moviment de les articulacions provoquen certa deformació puntual dels condrocits amb la consegüent reorganització del citoesquelet cel·lular. Aquest moviment del citoesquelet modula l'activitat anabòlica dels condrocits [12]. De fet, el citoesquelet suposa una interfase física entre els condrocits i la matriu, que comunica els estímuls mecànics i la resposta biosintètica. Quan els condrocits s'aïllen del teixit i es cultiven en monocapa perden fàcilment la seva morfologia i consegüentment el seu fenotip queda alterat observant-se una pèrdua en la capacitat de síntesi de col·lagen tipus II.

Certes citocines (la IL-1 β n'és un exemple) regulen l'expressió de proteïnes relacionades amb el citoesquelet, la qual cosa provoca efectes sobre la síntesi de molècules de la matriu [12]. Per tant, un entorn d'inflamació suposa en el condrocit un canvi en la seva activitat metabòlica, repercutint per diferents vies a l'estabilitat de la matriu.

Origen dels condrocits, maduració i diferenciació:

Els condrocits deriven de cèl·lules pluripotents mesenquimals. El procés de diferenciació està guiat per diverses citocines i factors de creixement on la família del TGF- β , BMP (bone morphogenetic protein), cartilage-derived morphogenetic protein, FGFs (fibroblast growth factor) i IGF (insulin growth factor) juguen un paper essencial [13]. La maduració dels condrocits acaba prenent camins diferents en funció de si formen part de cartílag articular o del cartílag de les plaques de creixement. En el primer cas, el procés de maduració es va alentint fins a quedar aturat en un estat postmitòtic [14]. Es perd la capacitat de divisió cel·lular i la cèl·lula es manté durant anys en un estat de cert "standby" metabòlic. En el segon cas, el condrocit madura passant per un procés d'hipertrofia fins assolir una diferenciació terminal o osteòcit [15].

1.1.1.2. La matriu extracel·lular cartilaginosa

La matriu cartilaginosa és el que dóna estructura al teixit. Està formada per feixos de proteïnes estructurals que formen macroestructures amb agregats de proteoglicans, àcid hialurònic i vàries proteïnes d'unió.

1.1.1.2.1. COMPOSICIÓ DE LA MATRIU CARTILAGINOSA:

1.1.1.2.1.1 Proteïnes: Els col·làgens

El col·lagen suposa 2/3 del pes en sec del cartílag articular adult [16]. És la proteïna estructural majoritària de la matriu extracel·lular cartilaginosa i la sintetitzen els condrocits. La majoria del col·lagen del cartílag, el 90-95% del total, és del tipus **II** [2]. En una proporció molt menor es troba col·lagen del tipus **VI, IX, X i XI**. Recentment s'ha detectat col·lagen del tipus **III** co-localitzant amb col·lagen del tipus **II** [17]. S'especula que els condrocits sintetitzen aquest tipus de col·lagen, que fins ara només s'havia relacionat amb el col·lagen **I**, com a resposta al dany en la matriu [16].

El **Col·lagen del tipus II** és una molècula formada per tres cadenes iguals, $\alpha_1(\text{II})$, que s'estructuren en *fibres* de triple hèlix. Estructuralment es caracteritza per tenir un contingut elevat de residus glucosil i galactosil, i de residus d'hidroxilisina, que permeten la interacció amb els proteoglicans [18]. Per a la reacció d'hidroxilació dels residus de lisina es necessari el cofactor àcid ascòrbic (vitamina C) i s'ha pogut observar que, quan per un dèficit d'àcid ascòrbic es sintetitza el procol·lagen insuficientment hidroxilat, aquest es degrada a l'interior cel·lular.

El **Col·lagen IX** es classifica dins els col·làgens associats a fibres (FACIT, de l'anglès fibril-associated collagens) [18]. Estructuralment es caracteritza per tenir varis dominis no col·lagenosos que interrompen l'estructura de triple hèlix, actuant de zones frontissa. Forma ponts covalents entre diferents fibres de col·lagen.

El **Col·lagen XI** forma part dels col·làgens formadors de fibres. És un col·lagen que està íntimament copolimeritzat amb el col·lagen tipus **II**. En la seva estructura hi ha punts d'unió d'elevada afinitat pels glucosaminoglicans heparan i heparin sulfat [16].

El **Col·lagen X** és un dels col·làgens de cadena curta [18] que, in vitro, forma xarxes hexagonals. Es relaciona amb cartílag hipertròfic i amb la zona de cartílag calcificat en la interfase amb l'os subcondral.

El **Col·lagen VI** es classifica dins els microfibrilars ja que forma xarxes filamentoses [18]. Es troba de manera predominant en teixit fibrocartilaginós i en la zona pericel·lular de la matriu.

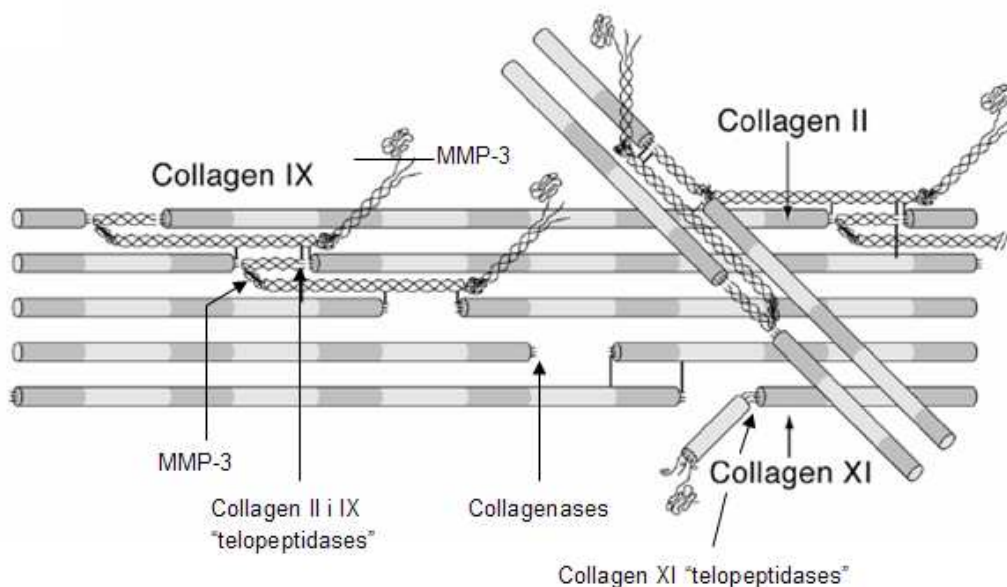


Figura 3. Heterofibra de col·lagen II/IX/XI. Modificació d'Eyre et al. 2006 [17]. Model d'interacció entre diferents tipus de col·lagen (II, IX i XI) en la matriu extracel·lular. En la imatge també s'indiquen els punts de tall hipotètics o coneguts de l'heterofibra de col·lagen per la degradació o pel creixement lateral de les fibres.

La regulació de l'activitat de transcripció del gen que codifica per al col·lagen està regulat per diferents factors de creixement i citocines. Existeix splicing alternatiu que dóna diverses variants d'una molècula a partir d'un mateix gen [18, 19].

En el cartílag, els col·làgens II, IX i XI estan íntimament relacionats, formant una única estructura. A la Figura 3 es mostra un model de la interacció de les diferents fibres de col·lagen en la matriu extracel·lular. El col·lagen de tipus II, component principal de la macrofibra, aporta en el cartílag la capacitat de resistència a forces de compressió i tensió, mentre que el IX i XI actuarien limitant el diàmetre de les fibres connectant i enllaçant unes fibres amb unes altres. El col·lagen X dóna suport estructural i ajuda en la mineralització del cartílag i el VI, manté el condrocit subjectat a la matriu. És la conjunció de tots ells, però, la que dóna al cartílag la gran capacitat de resistència a les diferents forces [18].

Factors de creixement i citocines es poden unir de manera reversible al col·lagen. Quan es troben unides a aquesta proteïna de la matriu extracel·lular, els factors de creixement i les citocines no presenten activitat; es troben en una conformació inactiva. Quan la matriu es degrada i es trenquen les fibres de col·lagen, els factors de creixement i citocines tornen a quedar lliures i recuperen la seva activitat, podent exercir la seva funció sobre els condrocits. Per això es considera que el col·lagen actua com un reservori de factors de creixement i citocines extracel·lular disponibles per a quan el teixit ho requereixi [20].

1.1.1.2.1.2 Glicosaminoglicans: L'àcid hialurònic

Els glicosaminoglicans (GAGs) són llargs polímers lineals repetitius de disacàrids específics, generalment de sucres amb residus sulfats. Per a una major comprensió es pot revisar el treball de Bastow et al. [21].

L'àcid hialurònic, o hialuronan és el GAG més simple i en el cartílag és sintetitzat pels condrocits. És un polisacàrid lineal, de càrrega negativa, immensament llarg, sense grups sulfat i amb gran nombre de residus hidrofílics a la seva superfície, cosa que fa que uneixi gran quantitat d'aigua i formi, inclús a baixes concentracions, un gel viscos i hidratat. En el cartílag articular es troba formant enormes agregats multimoleculars mitjançant unions no covalents amb diverses molècules de proteoglicans i proteïnes d'unió.

1.1.1.2.1.3. Proteoglicans: l'agrecan

Els proteoglicans representen el 20-40% del pes sec del cartílag. Els proteoglicans (PGs) de la matriu cartilaginosa són molècules sintetitzades pels condrocits amb una vida mitja de 7-200 dies [22]. L'estructura es basa en una proteïna nuclear central a la qual s'hi uneixen covalentment un o més glicosaminoglicans, tal com s'esquematitza a la Figura 4. Per a un major aprofundiment es pot revisar els treballs de Kiani et al. [23] i de Funderburgh et al. [24].

En el cartílag es troben dos grans grups de PG: la família dels **agrecans**, que formen llargues cadenes - agrecan, versican (PG-M), neurocan, brevican, CD44 (receptor de superfície cel·lular de l'àcid hialurònic) - i els proteoglicans petits, com el **decorin**,

biglican o la **fibromodulina**. La majoria de PG, en la matriu cartilaginosa, es troben com a grans agregats formats per la unió no covalent amb altres molècules de la matriu.

L'agrecan és el proteoglicà majoritari i més característic del cartílag articular. El 90% de la seva massa correspon a les cadenes de GAGs. En el nucli proteic de l'agrecan s'hi troben dos tipus de GAGs units: el queratan sulfat (KS) i el condroitin sulfat (CS). Existeixen dos tipus de condroitin sulfat, el tipus 6 (condroitin 6-sulfat) i el tipus 4 (condroitin 4-sulfat). El tipus 6 es manté en quantitat constant al llarg de la vida, mentre que la quantitat de tipus 4 disminueix amb l'edat.

La distribució de PG no és homogènia en tota la matriu cartilaginosa. La mida, la composició de GAGs i la concentració varien en funció de l'estat maduratiu del cartílag i de les forces de càrrega que es rep en cada zona del cartílag.

Els proteoglicans són molècules d'elevat pes molecular i contenen molts grups sulfatats i carboxil carregats negativament que atreuen molècules de càrrega positiva. Això provoca un augment de la pressió osmòtica en el cartílag, superior a la dels teixits del voltant, que fa que entri aigua en el teixit. Aquesta hidratació genera una pressió hidràulica que s'equilibra amb la força de resistència que aporta la xarxa de col·làgens. Aquest equilibri entre PG hidratats i col·lagen és fonamental per a la resistència del cartílag a les forces compressives.

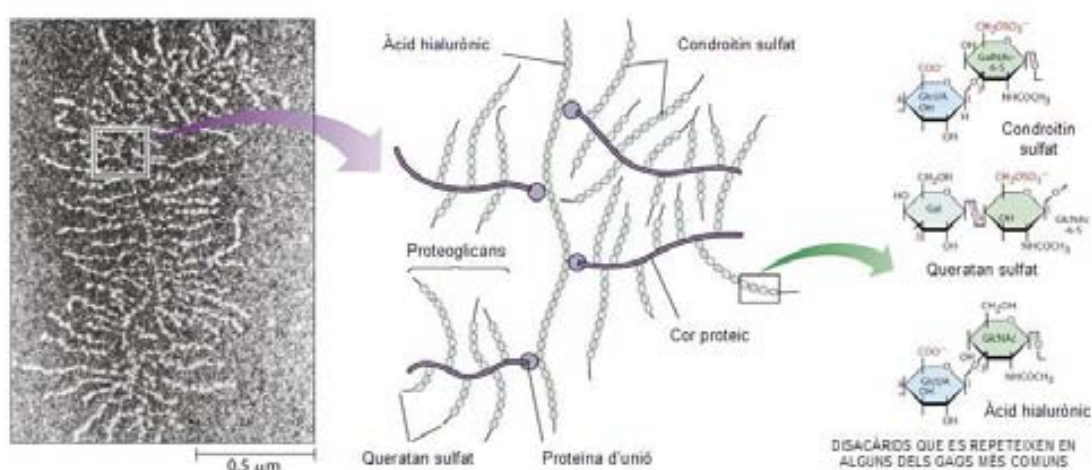


Figura 4. Estructura dels proteoglicans. (Pearson Education, Inc.) En el cartílag articular els proteoglicans formen agregats multimoleculars mitjançant unions no covalents amb molècules d'àcid hialurònic i proteïnes d'unió. Els proteoglicans estan compostos per un cor proteic i moltes molècules de glicosaminoglicans (GAGs). Els GAGs són llargs polímers lineals repetitius de disacàrids específics.

1.1.1.2.2. ESTRUCTURA DE LA Matriu Cartilaginosa

En el cartílag la matriu extracel·lular s'organitza en funció de la relació que té amb els condrocits:

- La **matriu pericel·lular** és la que està en íntim contacte amb els condrocits gràcies a la interacció directa de molècules de la matriu amb la membrana plasmàtica. És una regió rica en PG del tipus decorin i de col·lagen de tipus VI.
- La **matriu territorial** rodeja la zona pericel·lular de condrocits individuals o de grups de condrocits i gràcies a l'estructura de cistella fibril·lar que formen les molècules de col·lagen, els condrocits queden protegits dels impactes mecànics.
- La **matriu inter- territorial** és la que ocupa més volum en el cartílag. Està constituïda per les fibres de col·lagen de diàmetre més gran i es disposen amb una distribució concreta en funció de la profunditat del teixit.

1.1.1.2.3. FUNCIONS DE LA Matriu Cartilaginosa

Recollint el que s'ha dit fins ara, es pot ressaltar el paper de la matriu extracel·lular en la biologia del cartílag ja que:

- Protegeix els condrocits de les càrregues mecàniques ajudant-los a mantenir el seu fenotip.
- Serveix de magatzem de citocines i factors de creixement necessaris per als condrocits.
- Determina el tipus, concentració i ràtio de difusió de nutrients cap als condrocits.
- A l'estar en contacte amb els condrocits, participa en la senyalització cel·lular.

1.1.1.3. Fracció inorgànica del cartílag: L'aigua

L'aigua és de gran importància en la biologia i funcionalitat del cartílag articular. Representa del 65-80% del pes total del teixit i es distribueix de forma diferencial segons la profunditat del cartílag, donant-se un decreixement del contingut hídric des de la superfície fins a les zones més profundes [2].

El moviment articular genera ritmes de compressió- descompressió del cartílag, fet que provoca una entrada i una sortida constant d'aigua en el teixit. Aquest moviment

hídric és cabdal per a l'amortiment de les forces a les que es veu sotmesa l'articulació, per a la nutrició del teixit i per a la capacitat de lubricació del cartílag.

1.1.2. ESTRUCTURA DEL CARTÍLAG

El cartílag articular és un teixit amb característiques especials que el diferencien de la majoria de teixits, ja que no està vascularitzat, és aneuronal, no està proveït de xarxa limfàtica i el contingut en cèl·lules és molt baix. L'activitat funcional del teixit rau especialment en l'estructura i composició de la matriu extracel·lular a diferència de la majoria dels teixits d'òrgans parenquimals on les cèl·lules prenen el paper principal [25].

En el cartílag es poden distingir 4 zones amb una composició i distribució de condrocits, col·lagen i proteoglicans diferent, tal com es mostra a la Figura 5:

- Zona superficial (o tangencial): És la zona més prima, que correspon al 10-20% del volum del teixit. Els condrocits prenen una forma el·lipsoïdal aplanada i estan disposats de manera paral·lela a la superfície articular, igualment que les fibres de col·lagen. És la zona on hi ha més contingut hídric i menys proteoglicans.

Aquesta zona del cartílag actua de filtre per a moltes macromolècules. A la superfície existeixen uns porus que permeten la lliure circulació de molècules petites però no les molècules més grans. Això permet mantenir el teixit lliure de productes tòxics o molècules que poguessin danyar els condrocits o la matriu. De la mateixa manera el teixit queda aïllat del sistema immunitari.

- Zona intermitja (o transicional): És la zona majoritària del cartílag, representa el 40-60% del teixit, i on la densitat cel·lular és més baixa. Els condrocits es troben aïllats uns dels altres enmig d'una abundant matriu extracel·lular. Presenten una forma majoritàriament esfèrica. Les fibres de col·lagen tenen un diàmetre superior a les del cartílag superficial i se situen aleatòriament, sense cap tipus d'ordre aparent. La concentració d'agrecan augmenta.

- Zona profunda (o radial): Aquesta zona representa el 30% del cartílag. Els condrocits mantenen la forma esfèrica i se situen ordenats perpendicularment a la

superfície, formant columnes. És la zona on les fibres de col·lagen tenen major diàmetre i on la concentració de proteoglicans és més elevada, contràriament a l'aigua.

- Zona de cartílag calcificat: És una zona on hi ha molt poc volum de cèl·lules i on els condrocits, envoltats per una matriu calcificada, presenten un fenotip hipertròfic, amb poca activitat metabòlica i síntesi de col·lagen X. En aquesta zona no es troben proteoglicans.

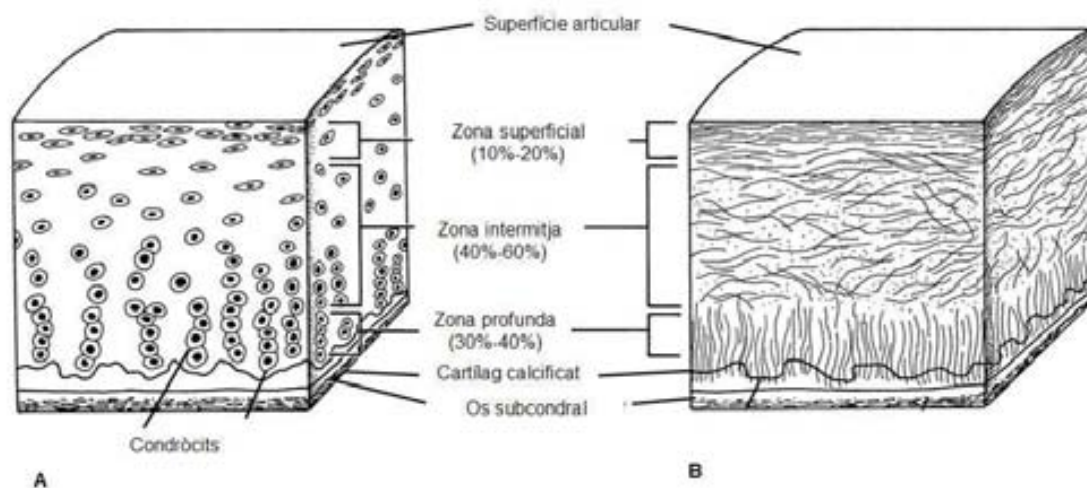


Figura 5. Estructura del cartílag articular. Imatge extreta de *The American Journal of Sports Medicine*. Disposició dels condrocits (A) i de les fibres de col·lagen (B) en les diferents zones del cartílag articular.

1.1.3. METABOLISME DEL CARTÍLAG

El cartílag, al ser un teixit sense vasos sanguinis, no es pot nodrir com la majoria de teixits. Tots els nutrients els proporciona el líquid sinovial i arriben als condrocits per difusió a través de la matriu. El flux hídric d'entrada i sortida d'aigua del teixit provocat pel moviment articular permet l'accés dels nutrients als condrocits i l'eliminació dels productes de rebuig del metabolisme. De totes maneres, els mecanismes de nutrició passiva depenen de la mida dels porus de la zona superficial de la matriu, de l'estructura de les molècules, de la seva càrrega elèctrica i del gruix del cartílag.

Com que el cartílag no té vasos sanguinis, el sistema immunitari no hi té accés com en altres teixits. Quan hi ha un dany amb afectació única del cartílag l'organisme no pot respondre amb una reacció reparadora com en qualsevol altre teixit. És la pròpia matriu extracel·lular la que emmagatzema citocines i factors de creixement per quan el teixit els requereixi. Els factors mecànics participen també en la regulació del metabolisme del teixit, ja que les forces de compressió repercuteixen en la síntesi de

citocines, metal·loproteases, proteïnes i proteoglicans de la matriu per part dels condrocits.

El manteniment de la matriu es caracteritza per un equilibri dinàmic entre síntesi i degradació, essent els condrocits els màxims reguladors. Normalment el recanvi de la matriu és relativament baix i els condrocits són capaços de sintetitzar els proteoglicans, col·lagen, fibronectines i altres components necessaris per a mantenir l'homeòstasi i la integritat articular. Amb l'edat, aquesta capacitat dels condrocits disminueix i cada vegada costa més mantenir l'equilibri, el qual es va desplaçant cap a la degradació. Qualsevol agressió al teixit causada per algun tipus de trauma, excés de càrrega o patologia accelera aquest desplaçament de l'equilibri cap a la catàlisi.

És important, doncs, entendre des del punt de vista maduratiu (evolutiu) del cartílag com canvien certes propietats del cartílag articular que el tornen més fràgil i vulnerable a qualsevol tipus d'agressió, sigui física, mecànica o biològica.

1.1.3.1. Canvis del cartílag associats a l'edat:

En l'organisme es troba cartílag temporal i cartílag permanent [14]. El cartílag temporal correspon al cartílag de les plaques de creixement la finalitat del qual és acabar reemplaçant-se per os. El cartílag permanent és el que es coneix com cartílag articular, la finalitat del qual és protegir les articulacions durant tota la vida i per tant el seu manteniment és necessari fins a la mort de l'individu. Aquests objectius diferents porten als condrocits a evolucionar també de manera diferent al llarg del temps. Els condrocits del cartílag temporal maduren cap a una diferenciació terminal a osteòcit. Aquesta diferenciació passa per un estat d'hipertrofia del condrocit amb síntesi de col·lagen X [15] i un augment en la síntesi de metal·loproteases (bàsicament MMP-13) [14], entre altres canvis, que sovint el porta a la mort cel·lular.

Els condrocits del cartílag permanent tenen bloquejada aquesta última diferenciació i es troben aturats en un fenotip diferenciat (postmitòtic). Aquest "standby" en l'estat metabòlic dels condrocits adults permet que hi hagi un nombre estable de condrocits que vagin mantenint la matriu i compensar l'absència de reclusió de nous condrocits en el teixit. Es postula [14] que amb l'edat es perd la capacitat activa de "bloqueig" d'aquesta última diferenciació i, quan això succeeix, el condrocit reprèn

la maduració fins acabar assolint un fenotip hipertròfic que implica la síntesi de molècules de la matriu extracel·lular diferents, i que, en la majoria dels casos, mena el condrocit a l'apoptosi.

El bloqueig de la maduració dels condrocits del cartílag articular que comporta la pèrdua de divisió cel·lular i l'absència de reclusió local de noves cèl·lules progenitores, fa que aquests condrocits tinguin una vida mitjana llarga. A diferència de la majoria de teixits on hi ha una constant i periòdica renovació cel·lular, els condrocits del cartílag articular són els mateixos durant anys. Això fa que acumulin més danys i alteracions generades bàsicament per estrès oxidatiu i de càrrega. Les espècies reactives d'oxigen (ROS) actuen directament sobre proteïnes, lípids i DNA i provoquen escurçament de telòmers semblant al que s'observa en la senescència replicativa, però també regulen vies de senyalització que promouen també la senescència [26]. El fenotip senescent secretor es caracteritza per un augment en la producció de citocines (IL-6 i IL-1), MMPs i factors de creixement [26].

Un altre factor que es relaciona amb l'edat és la disminució de la capacitat de resposta dels condrocits a factors de creixement. Disminueix la resposta a IGF amb la conseqüent disminució dels processos anabòlics del condrocit. També queda afectada la resposta al TGF- β , així com la seva quantitat en el teixit [14, 26]. Es relaciona el TGF- β amb la inhibició de la diferenciació terminal dels condrocits via receptors ALK5 [14].

Els proteoglicans que sintetitzen els condrocits varien en composició, forma i estructura al llarg dels anys. Amb l'edat es sintetitzen molècules de PG més petites que en el cartílag jove, disminueix el contingut de condroitin sulfat mentre augmenta el de queratan [14]. Els agregats que es formen també prenen dimensions més petites i tenen proporcions diferents de les molècules que els conformen [14, 26]. Com a conseqüència el cartílag perd capacitat d'hidratació i, per tant, també capacitat de resistir les càrregues.

Tots els canvis quantitius i qualitius en les cadenes dels glicosaminoglicans fan que els condrocits estiguin menys fermament lligats a la matriu, cosa que els fa perdre un dels aspectes fonamentals per al manteniment del fenotip i la regulació del metabolisme.

En la matriu s'acumulen AGEs (de l'anglès advanced glycation end products). Els AGEs són productes de glicosilacions no enzimàtiques que es produeixen entre una molècula de sucre reduït i un grup amino lliure d'una proteïna, lípid o àcid nucleic [27]. La formació d'AGEs en el col·lagen porta a incrementar els entrecreuaments entre les diferents molècules fent més rígida i fràgil la matriu [26]. Mitjançant l'activació dels receptors RAGE, els AGEs estimulen les vies catalítiques en els condrocits, la formació de ROS i indueixen una resposta inflamatòria a la cèl·lula [26, 27].

Amb el moviment i la càrrega constant sobre l'articulació durant anys es produeix desgast en la matriu i acumulació de petits traumes asimptomàtics que de mica en mica van debilitant el teixit. Tot això, sumat a les característiques que pren el cartílag en la vellesa que el tornen més fràgil, fa que sovint no sigui capaç de suportar nivells de càrrega normals i que les lesions augmentin.

Així és pot observar com la pròpia evolució del teixit du, amb l'edat, a un debilitament del cartílag que suposa menys capacitat d'amortir, més fragilitat i menys capacitat de reparació. Per aquest motiu, patologies articulars degeneratives, com l'osteoartritis, es relacionen amb l'edat perquè les facilita, però tampoc s'ha de considerar un fet inevitable. L'edat i la OA estan interrelacionades però no són interdependents [26].

1.2. ARTROPATIES:

Existeix una gran varietat de patologies que afecten l'aparell locomotor i en concret les articulacions. La naturalesa d'aquestes patologies és ben diversa: les que situen el seu origen en una lesió traumàtica, les que són fruit de desordres sistèmics, com autoimmunitats o problemes neurològics, les que són provocades per un agent infecció o aquelles en les que no s'hi distingeix cap causa aparent. En moltes d'elles existeix afectació del cartílag articular, amb degradació de la matriu cartilaginosa i inflamació.

Per la seva incidència i afectació en la població, en aquest treball ens centrarem, bàsicament, en l'osteoartritis (artrosi) i l'artritis reumatoide com a patologies articulars degeneratives. Malgrat que l'etiologia d'una i altra encara sigui discutida, les dues

patologies cursen en un trencament de la homeòstasi de la matriu, diferenciant-se una de l'altra en el lloc i en l'origen de la pèrdua en la capacitat de regulació [28].

1.2.1. OSTEOARTRITIS (ARTROSI)

L'osteoartritis (o artrosi) és un dels problemes de salut més freqüents dels individus de mitjana i avançada edat. Es defineix com una patologia articular degenerativa no inflamatòria i es caracteritza per la degeneració del cartílag, esclerosi de l'os subcondral, formació d'osteòcits i canvis en la membrana sinovial [29, 30].

L'osteoartritis (OA) pot aparèixer sense cap causa aparent; és el que es coneix com osteoartritis idiopàtica o primària. Quan apareix com a resultat de la degradació articular causada per algun tipus de lesió, alguna causa hereditària, inflamatòria, del desenvolupament, metabòlica o neurològica és coneix com a osteoartritis secundària.

L'osteoartritis afecta individus de totes les ètnies i de totes les localitzacions geogràfiques, a homes i amb més freqüència, a dones. A partir dels 40 anys la incidència augmenta molt ràpid en cada dècada, essent la segona causa, després de les cardiopaties isquèmiques, d'invalidesa laboral en homes majors de 50 anys. A partir dels 65 anys, entre el 60 i 90% dels individus pateixen osteoartritis en diferents graus [30].

L'edat és el major factor de risc en l'osteoartritis, però, a més, també s'ha de considerar l'obesitat, la predisposició genètica, el fet de ser dona, tenir una major densitat òssia o una articulació laxa i tots els desordres associats a les múltiples formes de OA secundària. Les càrregues mecàniques excessives, superiors al que el propi teixit tingui la capacitat d'amortir, és un altre factor de risc.

Simptomàticament l'osteoartritis es distingeix per dolor en l'articulació (dolors crònics o associats a l'activitat) i restricció del moviment lliure de l'articulació. En funció del grau de la patologia, aquesta simptomatologia pot condicionar, limitar o fins i tot impedir la realització de tasques quotidianes i laborals, afectant sempre de manera negativa la qualitat de vida del pacient.

El factor concret desencadenant de la patologia és de difícil identificació. S'accepta que és la interacció d'una gran varietat de factors el que porta a desplaçar l'equilibri síntesi – catàlisis del cartílag articular cap a la degradació del teixit. En aquest aspecte, alteracions en el fenotip dels condrocits, la síntesi de molècules que no permeten una bona estructuració de la matriu i l'augment d'enzims catalítics hi juguen un paper important. Amb l'acceleració dels processos degradatius s'alliberen importants quantitats de components de la matriu cartilaginosa i de partícules de rebuig la qual cosa promou una reacció inflamatòria al sinòvium amb importants infiltrats de limfòcits T i de monòcits. Això suposa una cronificació de l'estat d'inflamació- degradació [30]. A la Figura 6 es mostren de forma esquematitzada els principals factors implicats en la biologia cel·lular de l'osteoartritis.

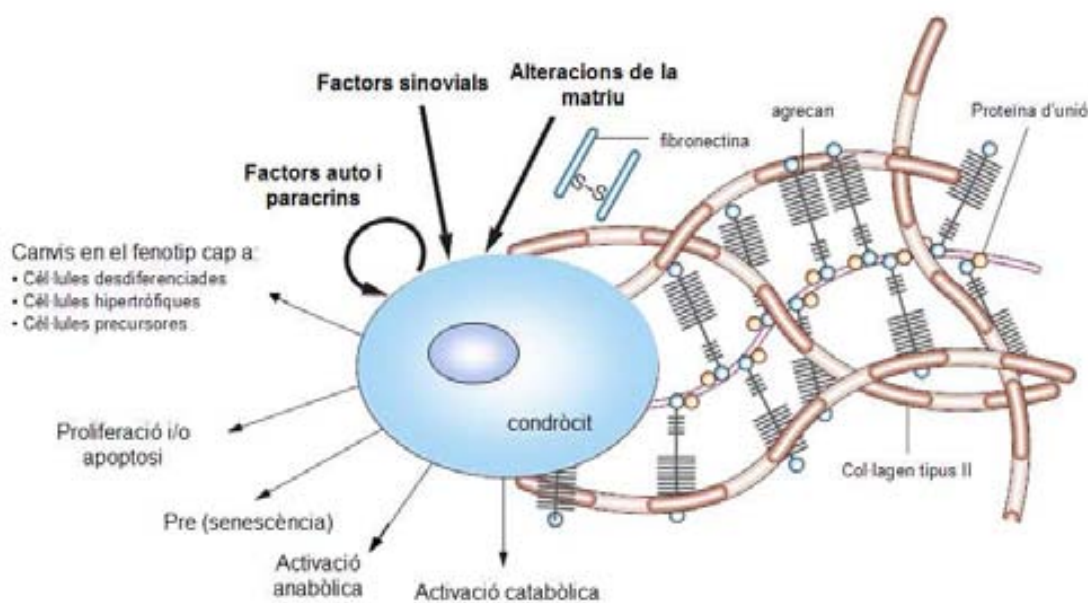


Figura 6. Biologia cel·lular de l'osteoartritis (Aigner et al. 2007 [31]). Els condrocits OA estan exposats a estímuls extracel·lulars anormals, que inclouen factors auto i paracrins, factors sinovials i constituents alterats de la matriu, els que indueixen una excessiva resposta cel·lular anormal que implica canvis en l'anabolisme, el catabolisme i el fenotip. El nombre de condrocits també es veu alterat com a fruit de la proliferació i/o de l'apoptosi. A més a més, les cèl·lules, en un estat pre-senescent, perden moltes de les funcions característiques del cartílag. En aquest esquema, un condrocit osteoartrític es troba envoltat d'una matriu extracel·lular cartilaginosa de col·lagen tipus II, agrecan i fibronectina (per simplificar). Altres col·làgens, proteoglicans i proteïnes no col·lagenoses també es troben presents en diferents nivells [31].

En l'articulació osteoartrítica es detecten importants citocines inflamatòries (IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-17), antiinflamatòries o reguladores (IL-4, IL-10, IL-13), citocines com IL-11, LIF [32, 33] i altres molècules, com òxid nítric, PGE2, antagonistes de certes citocines (IL-1a) i una gran varietat d'enzims degradatius

(MMPs-2, 3, 8,13) [31, 32, 34]. A la Taula 1 es sintetitza l'efecte d'algunes citocines i factors de creixement sobre els condrocits.

Taula 1. Classificació de les interaccions condrocit-citoquina. (Goldring et al. 2004 [33])

Catabòlic	Modulador	Anti – catabòlic	Anabòlic
IL-1	IL-6	IL-4	IGF-1
TNF- α	LIF	IL-10	TGF- β 1,2,3
IL-17	IL-11	IL-13	BMP-2,4,6,7,9,13
IL-18		IL-1ra	
OSM			

La IL-1 i el TNF- α són citocines proinflamàtòries característiques de la OA i participen directament de l'erosió/degradació del cartílag. Activen la síntesi d'altres citocines inflamàtòries (IL-6, IL-17, IL-8...), activen la síntesi d'enzims catalítics (MMPs), i inhibeixen la síntesi de col·lagen tipus II i proteoglicans [32, 33]. Segons Goldring et al. [33], la IL-6 sembla tenir un doble paper incrementant la funció de les cèl·lules immunitàries i la inflamació, a la vegada que estimula la producció de molècules que participen en l'atenuació de la inflamació, com IL-1ra, receptor soluble de TNF (sTNFR) i d'inhibidors tissulars de metal·loproteases (TIMPs).

En cartílag OA s'observa un increment de la freqüència de condrocits apoptòtics en relació amb el cartílag no OA. L'existència de cèl·lules apoptòtiques impedeixen el manteniment, la integritat i la homeòstasi del teixit i, per tant, deriva a la deterioració del cartílag. Existeix una clara correlació entre la freqüència de condrocits apoptòtics i la severitat de l'osteoartritis [35].

1.2.2. ARTRITIS REUMATOIDE

L'artritis reumatoide (AR) és una malaltia autoimmunitària sistèmica inflamatòria. Es caracteritza per l'afectació de les articulacions mòbils, la hipertròfia de la membrana sinovial, la destrucció osteocartilaginosa, la formació del factor reumatoide i la deformació articular. En un 30% dels pacients els resulta una malaltia multisistèmica, amb l'afectació de qualsevol altre òrgan.

A nivell global, existeix una prevalença promig d'1% de la població, amb una major freqüència entre els 40 i 60 anys, tot i que la malaltia pot aparèixer en qualsevol edat. La AR afecta tres vegades més en dones que en homes.

A nivell simptomatològic es caracteritza per la inflamació d'articulacions perifèriques amb distribució simètrica, que provoca rigidesa i dolor en l'articulació limitant-ne el moviment. L'AR quasi sempre afecta a més d'una articulació. Mans, peus i columna cervical són les més freqüents, encara que articulacions grans com el genoll i l'espatlla no queden exemptes d'estar afectades. En estadis avançats de la malaltia les articulacions acaben patint deformacions. A la Figura 7 es mostra de manera simplificada la fisiopatologia de l'artritis reumatoide i alguna de les seves principals conseqüències clíniques.

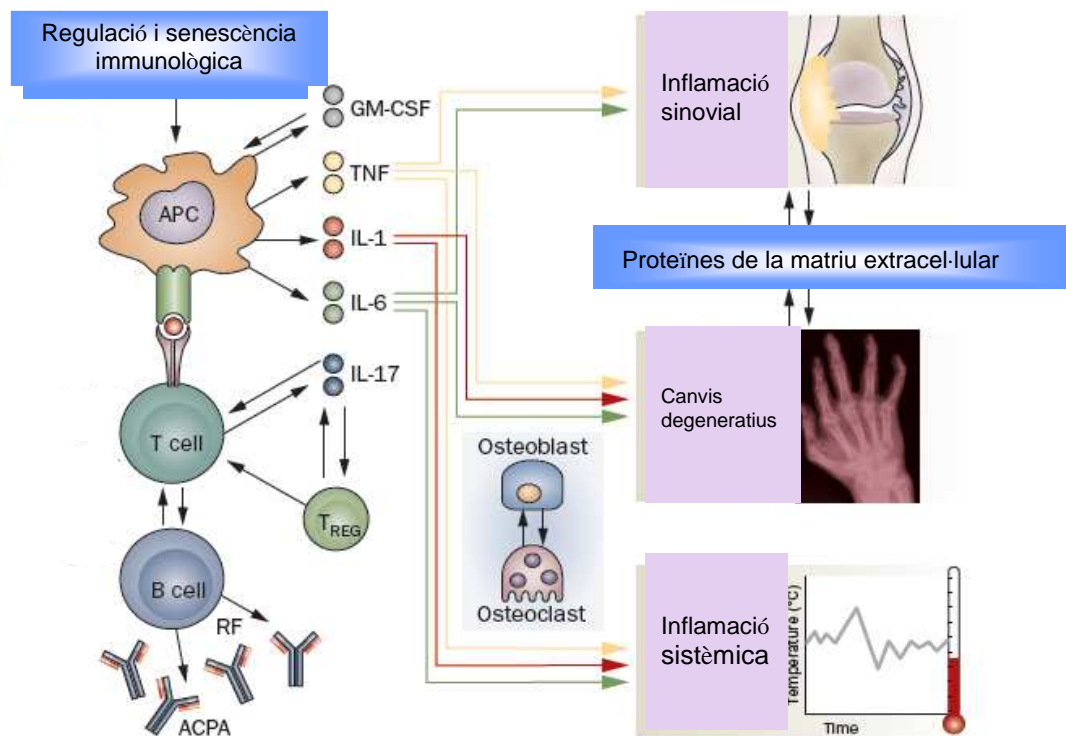


Figura 7. Fisiopatologia de l'artritis reumatoide. (Imatge modificada de Van Vollenhoven 2009 [36]). Esquema on es mostra de forma simplificada la fisiopatologia de l'artritis reumatoide i les seves principals conseqüències clíniques. ACPA: anticossos anti-CCP; APC: cèl·lules presentadores d'antigen; GM-CSF: factor estimulador de colònies de granulòcits i macròfags; IL: interleucina; RF: factor reumatoide; TNF: factor de necrosis tumoral; T_{REG}: cèl·lula T reguladora.

Diversos factors de risc s'associen amb l'artritis reumatoide: certa predisposició genètica lligada a HLA, més tota una varietat de factors ambientals (nivells d'estrògens, tabaquisme, infeccions bacterianes o víriques, etc) [37].

L'artritis reumatoide és una malaltia d'etiologia desconeguda, però que es caracteritza per la important infiltració de limfòcits T al teixit sinovial i per la producció d'autoanticossos contra la regió Fc de les IgG que formen complexos, coneguts com a factor reumatoide (FR). Els complexos IgG-IgM són el tipus majoritari de FR que es troba en els pacients amb AR, tot i que també es troben complexos IgG-IgG [38]. Són produïts localment per cèl·lules B presents en els fol·licles limfoides i centres germinals que es troben en la membrana sinovial inflamada. Es reconeixen com autoantígens en la AR components de la matriu cartilaginosa, proteïnes d'estrès, enzims, proteïnes nuclears i "citrullinated proteins" [39].

Els limfòcits T que accedeixen a la membrana sinovial activen als sinoviòcits tipus A (macròfag) i es desencadena tota una resposta inflamatòria amb la característica síntesi de citocines. En el teixit sinovial inflamat s'han identificat importants nivells de TNF- α , IL-1 β , IL-17, IL-6, IL-22, IL-23, IFN- γ i IL-15, així com també s'ha observat l'expressió de TGF- β , IL-4 i IL-12 [40]. Aquest perfil proteic ha revelat que no únicament una resposta Th1 és responsable de les lesions en la AR, sinó que en el transcurs d'aquesta patologia els limfòcits Th17 prenen un paper molt important.

Les cèl·lules Th17 són una població de limfòcits T efectors altament proinflamatòries i que promouen la degradació del teixit [41]. Es caracteritzen principalment per la síntesi de proteïnes de la família de les IL-17 (IL-17A-F). La IL-17 és capaç d'induir la producció de citocines inflamatòries, com el TNF- α i la IL-1, estimular l'expressió del lligand de RANK, de MMPs i la reabsorció òssia [42]. Tot i que el distintiu de la AR és la inflamació de l'articulació, els pacients amb AR també presenten evidències d'inflamació sistèmica, observat per la presència d'autoanticossos com el factor reumatoide o l'anti-CCP (de l'anglès Cyclic citrullinated peptide). La capacitat de les cèl·lules Th17 per a produir IL-21 pot jugar un paper important en aquest aspecte de la fisiopatologia, ja que la IL-21, a més a més d'augmentar la producció de IL-17, és una citocina reguladora de la producció de IgG en la resposta humoral [42]. La persistent resposta inflamatòria i erosiva que s'associa amb la presència de Th17 a les articulacions, mostra ser dependent de TLR-4. El receptor TLR-4 presumiblement s'activa amb la unió de molècules endògenes, alliberades com a conseqüència del dany tissular, amb la capacitat d'activar receptors TLR [42].

Receptors per a la IL-17 s'expressen de manera molt generalitzada en diferents tipus cel·lulars: monòcits, macròfags, condrocits, osteoblastos, fibroblastos, que com a conseqüència de la interacció amb el seu lligand, indueixen en la cèl·lula l'expressió de TNF- α , IL-1 β , IL-6 i IL-23, actors principals de la perpetuació de la inflamació i degradació del teixit. De fet, en l'artritis reumatoide, tant cèl·lules immunitàries (macròfags, limfòcits T i B, etc.), com del propi teixit (sinoviòcits, osteoblastos, condrocits) actuen activament i amb interrelació en la síntesi de citocines inflamatòries (també antiinflamatòries i reguladores), òxid nítric, metal·loproteases, autoanticossos, etc. amb el resultat d'un context crònic d'inflamació que du a la degradació del teixit cartilaginós i ossi i a la supressió de l'activitat sintètica per part dels condrocits, generant un dany irreversible a l'articulació [43].

El sistema immunitari consta de diferents mecanismes per a poder controlar la seva acció. És important que pugui protegir l'organisme d'invasors patògens, però, a la vegada, que no ataqüi de manera desmesurada el propi organisme, ni aquelles substàncies necessàries per al desenvolupament de l'individu i el manteniment de l'espècie (ingesta, reproducció). Amb aquesta finalitat el sistema immunitari compta amb diferents estratègies que van des de la selecció de cèl·lules T en el timus, la generació de tolerància perifèrica mitjançant cèl·lules reguladores, fins a un complex entramat de citocines que promouen/inhibeixen la resposta de les cèl·lules efectores o fins i tot l'apoptosi.

En l'artritis reumatoide s'ha observat que les cèl·lules reguladores no desenvolupen correctament la seva funció, en especial les cèl·lules T reguladores induïdes (iTreg). Les iTreg són una població cel·lular que s'origina a partir de cèl·lules perifèriques T CD4⁺ naïve que, sota l'acció del TGF- β , expressen el factor de transcripció Foxp3 i que inhibeixen les respostes Th1 i Th2. Cèl·lules Treg del líquid sinovial d'individus amb AR són incapaces d'inhibir la producció de IFN- γ i TNF- α en cèl·lules T efectores, ni en monòcits, la qual cosa comporta la perpetuació de la proliferació de les cèl·lules T efectores [44]. El TNF- α , que es troba en quantitats importants en articulacions AR, estimula un increment del receptor tipus II per TNF- α en la superfície de les cèl·lules T reguladores i la inhibició de l'expressió de Foxp3. Aquesta disminució de Foxp3 afecta de manera negativa la capacitat de supressió de la proliferació de les cèl·lules T efectores i la secreció de citoquines.

Les cèl·lules T CD4⁺naïve, quan es troben en presència de IL-6 conjuntament amb TGF-β, es diferencien a cèl·lules Th17, amb la qual cosa es mostra que el balanç entre cèl·lules T reguladores i cèl·lules Th17 és crític en casos de AR [45, 46].

1.3. TERÀPIA DE LES ARTROPATIES QUE AFECTEN AL CARTÍLAG

Com ja s'ha comentat anteriorment, moltes artropaties afecten el cartílag articular provocant la degradació del teixit en un entorn d'inflamació. Des del punt de vista simptomatològic és destacable el dolor, sigui en repòs o associat al moviment, factor que en alguns casos limita de manera molt considerable l'activitat quotidiana dels individus que pateixen la patologia. El principal objectiu de les teràpies, sobretot en les patologies d'etiologia desconeguda, és millorar la qualitat de vida del pacient i estan adreçades a pal·liar el dolor, disminuir la inflamació i aturar i/o reparar el dany en el teixit per a recuperar al màxim la funcionalitat de l'articulació.

Els analgèsics orals són el recurs més generalitzat per calmar el dolor, però quan aquests no són suficients s'obtenen bons resultats amb injeccions intra-articulars de corticoides o d'àcid hialurònic que, a més a més, aporten beneficis antiinflamatoris. En alguns casos es necessari l'ús d'opiacis o narcòtics [47]. Les drogues antiinflamatòries no esteroïdals (AINEs) són molt eficaces terapèuticament, però el seu ús pot comportar efectes adversos i riscos gastrointestinals i cardiovasculars, cosa que fa que s'intenti evitar el seu ús, en la mesura que sigui possible.

En la línia de la preservació del teixit o de disminuir-ne l'impacte mecànic s'utilitza estratègies d'osteotomia per a realinear l'articulació de forma que disminueixi la càrrega a les zones més malmeses de la superfície articular o per a corregir mals alineaments que acceleren el dany articular [30]. En casos d'articulació molt malmesa es recomana el reemplaçament total per mitjà d'una pròtesis.

Una altra estratègia és intentar recuperar i regenerar el teixit danyat. Entenem com a regeneració la formació de nou teixit indistingible del normal [30]. En aquesta línia el primer que s'ha posat en pràctica ha estat la **estimulació de la medul·la òssia**. S'utilitzen diferents tècniques per a accedir a l'os i estimular la medul·la òssia: l'artroscòpia abrasiva, microfractures i perforacions de Pridie.

Aquestes tècniques són efectives des del punt de vista de cost/benefici i clínicament útils ja que disminueixen el dolor al pacient i, per tant, li suposa una millora en la qualitat de vida. Però l'ús d'aquestes tècniques únicament aconseguixen la síntesi de fibrocartílag, d'unes característiques mecàniques i bioquímiques de qualitat molt menor que el cartílag hialí, i amb el temps, el dany sempre deriva a osteoartritis.

Perseguint la fita de la formació *de novo* de cartílag hialí o d'unes característiques físico-químiques semblants, s'ha dut a terme **transplantament de teixits o de cèl·lules**. S'han fet empelts de periosti, pericondri, de cartílag que en un període curt de temps presenten resultats positius, però incerts a llarg termini. Transplantament de condrocits autòlegs, sols o integrats en una matriu tridimensional. Però amb totes aquestes tècniques encara no s'ha aconseguit la recuperació del cartílag i només es queden amb la pal·liació del dolor [48].

En teràpia articular, s'ha utilitzat en els últims anys cèl·lules mare mesenquimals (MSC) [49-51]. Aquestes cèl·lules multipotents no hematopoiètiques es troben en diversos teixits adults i tenen la capacitat de diferenciar-se a condrocits, adipòcits i osteoblasts. A més a més, es caracteritzen per ser d'aïllament fàcil i de ràpida expansió *in vitro* sense perdre el potencial de diferenciació, cosa que les fa ser unes bones candidates per a teràpia cel·lular de patologies com l'osteoartritis i artritis reumatoide. Altres resultats mostren un potent efecte immunosupressor i antiinflamatori d'aquestes cèl·lules, fet que dona més suport al seu ús per a l'artritis reumatoide [51].

Mitjançant **enginyeria de teixits** s'està intentant generar cartílag *in vitro* per a utilitzar-lo d'empelt *in vivo*. La seva obtenció requereix digestions enzimàtiques, cultius sobre suports tridimensionals i enriquiment del medi amb citocines i factors de creixement [52, 53].

A partir dels avenços en el coneixement de la reparació tissular i en el progrés de les patologies degeneratives del cartílag es planteja incidir directament sobre qualsevol ruta de senyalització que porti directament o indirecta a la regeneració del teixit. Des de la teràpia gènica o tècniques de proteïnes recombinants s'està posant especial interès en gens i factors de transcripció que promouen diferenciació; factors de creixement que

promouen la síntesi de la matriu; inhibidors d'osteogènesi o de diferenciació hipertròfica o antagonistes que inhibeixen l'apoptosi, senescència o la resposta a citocines catabòliques [48].

Sovint, però, l'ús de proteïnes recombinants comporta problemes associats (reaccions immunitàries no desitjades, activitats alterades conseqüència de la síntesi en bacteris, etc) i la teràpia gènica presenta moltes vegades dificultats tècniques importants si es vol que sigui una teràpia eficient.

Una alternativa a aquestes teràpies és l'ús de concentrats autòlegs de plaquetes. L'ús de teràpies basades en l'aplicació local de **plasma ric en plaquetes (PRP)**, que representen ser una font important de factors de creixement [54], cada vegada s'està generalitzant més. A les plaquetes sempre se'ls ha reconegut el paper en els processos de homeòstasi i de formació de coàguls, però no ha estat fins fa pocs anys que se'ls reconeix també un paper important en processos d'inflamació, immunitat innata, neoangiogènesi i metàstasi tumoral, gràcies a l'augment de coneixement existent en relació als receptors i molècules que contenen les plaquetes [55].

2. PLASMA RIC EN PLAQUETES (PRP)

El plasma ric en plaquetes (PRP) és el concentrat de plaquetes provinent de sang que s'utilitza en clínica humana i veterinària de forma autòloga per a diverses finalitats. S'han descrit diferents protocols per a la seva obtenció, habitualment per separació cel·lular [56-58] o per centrifugació de sang sencera [59-62]. L'objectiu és obtenir una solució autòloga de plaquetes - i les molècules per elles sintetitzades - que, reintroduïdes in vivo, participin de forma terapèutica en el dany sobre el qual es vulgui influir.

2.1. COMPOSICIÓ CEL·LULAR DEL PRP

En funció de la metodologia que s'utilitzi per a obtenir els concentrats de plaquetes, els PRP poden variar en la seva composició. Amb el mateix nom de concentrats de plaquetes pot haver-hi preparacions amb més o menys plaquetes, leucòcits o eritròcits, fet que pot condicionar la seva efectivitat clínica [63, 64]. Tot i així, les plaquetes són el component característic i majoritari dels PRP i les que aporten la capacitat terapèutica.

2.1.1. LES PLAQUETES

Les plaquetes són el segon glòbul sanguini més nombrós. En circulació solen haver-hi $150-450 \times 10^6$ plaquetes/ml i tenen una vida mitja de 10 dies [65]. Són “cèl·lules” sense nucli, molt petites ($3\mu\text{m}$), amb forma de disc biconvex quan estan en repòs (Figura 8a) i que canvien la seva morfologia quan s'activen (Figura 8b). Contenen diferents tipus d'òrgànuls on s'hi emmagatzemen tot de compostos i proteïnes específiques que es transporten per tot l'organisme com a resposta a diferents estímuls [66].

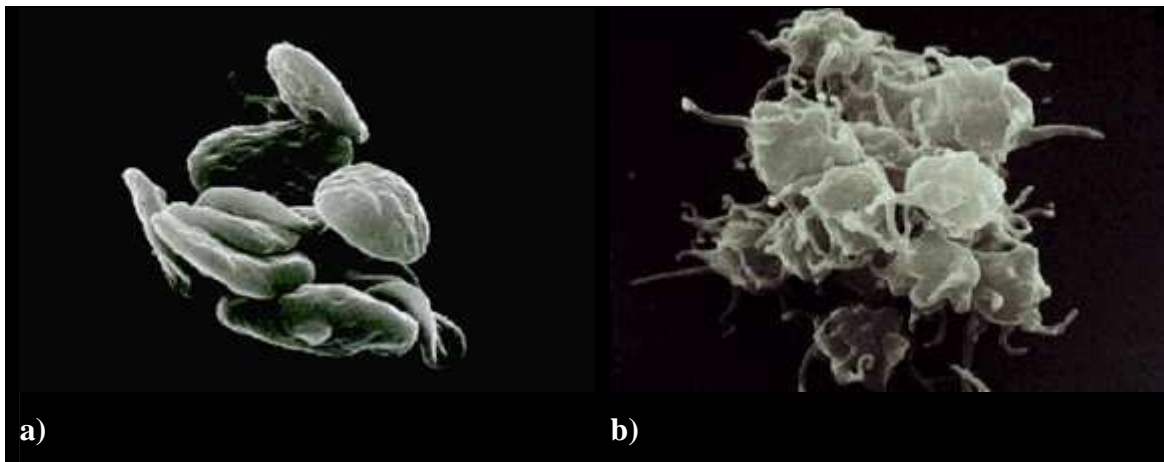


Figura 8. Plaquetes no activades (a) i plaquetes activades (b). Imatges obtingudes per microscòpia electrònica. (Rozman i Bolta, 2007 [67])

2.1.1.1. Origen i estructura de les plaquetes

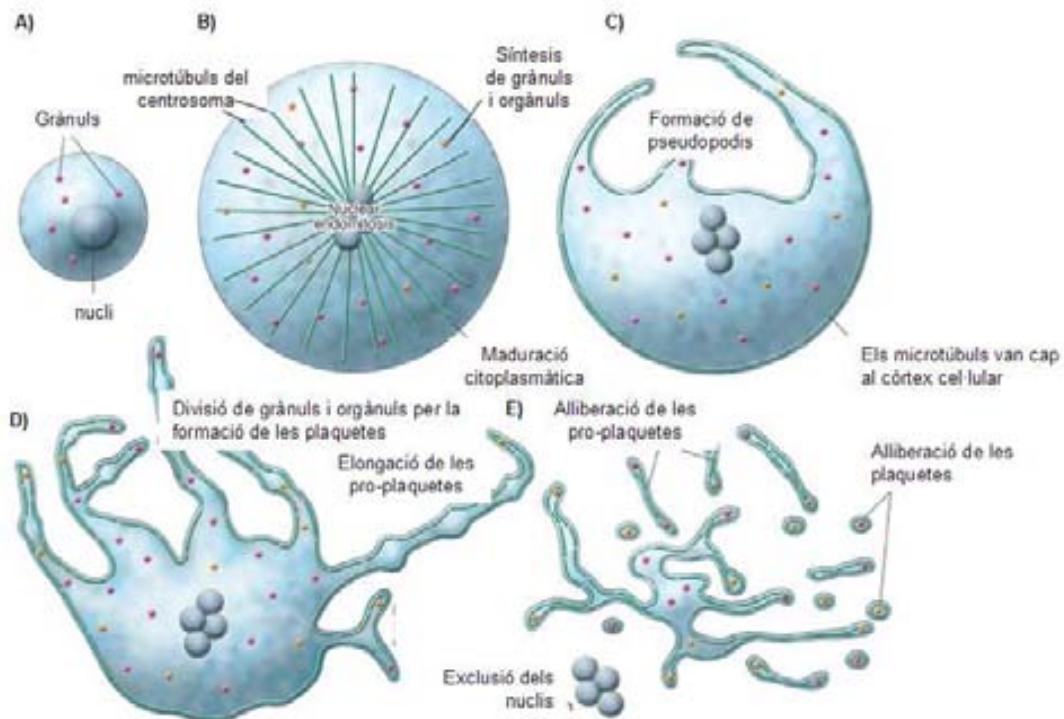


Figura 9. Morfogènesi de les plaquetes. (Patel et al. 2005 [68]). A partir d'un megacariòcit immadur (A) es produeixen tot un seguit de fets fins que s'alliberen les plaquetes (E). El nucli del megacariòcit realitza endomitosi cel·lular, síntesi d'òrgànuls, maduració i expansió important del citoplasma. S'estableix una col·lecció de microtúbuls procedents del centrosoma (B). Els centrosomes es dissocien i els microtúbuls transloquen cap al còrtex cel·lular. La formació de les pro-plaquetes comença amb el desenvolupament de pseudopodis molt prims (C). Elongació de les pro-plaquetes i divisió de grànuls i òrgànuls al final de les plaquetes (D). El citoplasma del megacariòcit es converteix en una massa de pro-plaquetes, que s'alliberen de la cèl·lula. Els nuclis queden exclosos i les plaquetes s'alliberen de l'extrem de les pro-plaquetes (E).

Les plaquetes s'originen a partir dels megacariòcits, cèl·lules mieloides que es troben en el moll de l'ós, pulmons i sang perifèrica. Els megacariòcits són poliploides i adapten el seu citoplasma i membranes per a la biogènesi de les plaquetes. Desenvolupen tot un sistema de membranes internes que es el que permetrà la síntesi de milers de plaquetes a partir d'un sol megacariòcit, gràcies a la formació de pseudopodis molt llargs i prims, estadi que es coneix com a proplaqueta (veure Figura 9). El megacariòcit té una activitat biosintètica molt elevada, sintetitza totes les proteïnes plaquetars i en ell s'originen tots els òrgànuls i grànuls que constituïran les plaquetes. També incorporen via endocitosi i/o pinocitosi proteïnes del plasma.

Les plaquetes es caracteritzen per ser importants reservoris de gran quantitat de molècules, tant d'origen proteic com no proteic, que participen en l'homeòstasi de l'organisme. S'organitzen i estan compostes per tot un sistema d'òrgànuls:

- **Mitocondris:** proporcionen tota l'energia necessària per a la reactivitat de les plaquetes.
- **Sistema tubular dens (DTS de l'anglès Dense Tubular System):** És un sistema endomembranós que emmagatzema calci i enzims importants per a l'activació de les plaquetes. El 30% del calci de tota la plaqueta es troba en aquest òrgànul, i quan el contingut s'allibera al citoplasma s'activen nombrosos enzims calci dependents que produeixen l'activació de les plaquetes [66]. El DTS presenta activitat peroxidasa i és el principal òrgànul relacionat amb el metabolisme de l'àcid araquidònic. Les plaquetes sintetitzen prostaglandines E involucrades en la formació d'edemes i en el dolor.
- **Sistema canicular obert (OCS de l'anglès Open Canicular System):** És un sistema endomembranós semblant al DTS, però amb obertura a l'exterior. Serveix de reservori de membrana per quan, com en l'activació, és necessari incrementar en un espai molt curt de temps l'àrea de superfície de la membrana. Proporciona tot de conductes que comuniquen el citosol amb l'espai extracel·lular de la plaqueta. Aquests conductes membranosos participen tant en processos d'endocitosi, com d'exocitosi, sigui de material particulat o de pèptids. Les plaquetes tenen la capacitat d'interioritzar a través d'aquests conductes bacteris i altres patògens, així com proteïnes del plasma sanguini que emmagatzema en els grànuls- α .
- **Grànuls densos:** Són els òrgànuls més petits de les plaquetes. Contenen molècules petites no proteiques que se secreten per reclutar més plaquetes, com serotonina, dopamina, histamina, ADP, ATP, etc. La serotonina s'incorpora a un elevat gradient de concentració, cosa que fa que es mantingui de manera estable i es trobi a una concentració fins a 1000 vegades superior a la del plasma.

Conté una elevada concentració de calci no ionitzat, que no es mobilitza per l'activació de les plaquetes i confereix alta estabilitat a l'òrgànul.

- **Grànuls - α :** És el major reservori de proteïnes d'adhesió i pèptids inflamatoris. És l'òrgànul més gran i el que es troba en major quantitat. Una plaqueta conté uns 35 α -òrgànuls que poden ocupar del 6 al 15% del volum total de la plaqueta. Són grànuls amb un contingut molt més heterogeni que la resta d'òrgànuls. Les proteïnes que s'hi emmagatzemen es poden haver sintetitzat en el megacariòcit, o poden haver estat incorporades del plasma per endocitosi, tant a nivell de megacariòcit, com de plaqueta. Les proteïnes que es troben en el grànul - α en concentració menor a la que es troben en el plasma entren per endocitosi de manera passiva, mentre que les que s'emmagatzemen en concentració més elevada de la que es troben al plasma, entren per un procés d'endocitosi mediat per receptor [69].

Els grànuls- α contenen un elevat nombre de proteïnes que participen en processos d'homeòstasi, d'inflamació, de reparació de ferides i en la interacció cèl·lula-matriu (veure Taula 2). Una d'aquestes proteïnes emmagatzemades en els grànuls- α de les plaquetes és el TGF- β (veure apartat 2.2.1)

Les proteïnes de membrana del grànul- α queden externalitzades a la membrana plasmàtica quan la plaqueta s'activa.

Taula 2. Molècules emmagatzemades en les plaquetes. (modificació de Rendu et al. 2001[66]). Les plaquetes emmagatzemen en els seus grànuls i òrgànuls, una gran varietat de molècules d'origen proteic i no proteic que participen en l'homeòstasi de l'organisme.

Grànuls densos	Grànuls - α	Lisosomes
Nucleòtids: <ul style="list-style-type: none"> • Adenines: ATP, ADP • Guanines: GTP, GDP Amines: <ul style="list-style-type: none"> • Serotonina • Histamina Cations bivalents <ul style="list-style-type: none"> • Calci • Magnesi 	Proteoglicans: <ul style="list-style-type: none"> • Específics de plaquetes: PF4 • Serglicin Glicoproteïnes d'adhesió: <ul style="list-style-type: none"> • Fibronectina, trombospondina Factors i cofactors de homeòstasi: <ul style="list-style-type: none"> • Fibrinogen, Factor V, VII, XI i XIII • Plasminogen Miogens cel·lulars: <ul style="list-style-type: none"> • PDGF, TGF -β, VEGF, EGF, etc. Inhibidors de proteases:	Proteases àcides: <ul style="list-style-type: none"> • Catepsina D, E • Carboxipeptidases (A, B) • Col·lagenases Glicohidrolases: <ul style="list-style-type: none"> • Heparinasa • Acetil-glucosaminidasa, glucosidasa, arabinosidasa, etc.
Altres:	<ul style="list-style-type: none"> • Immunoglobulines: IgG, IgA, IgM • Albúmina 	

- **Lisosomes:** Contenen enzims digestius, actius a pHs àcids: glicosidases, proteases (col·lagenasa, elastasa) i proteïnes amb activitat bactericida. Molts d'aquests enzims participen en l'eliminació dels agregats de plaquetes i tot el material que s'hi queda atrapat.

2.1.1.2. Activació de les plaquetes

L'activació de les plaquetes s'inicia com a resposta a un estímul i acaba amb el buidat del contingut dels diferents grànuls. Des del punt de vista morfològic, l'activació provoca en la plaqueta la formació de molts pseudopodis (Figura 8.b), incrementant en un període curt de temps la superfície i les molècules de membrana.

Es transmet, via receptor de membrana, la senyal fins al sistema tubular dens (DTS) que, de manera molt ràpida, aboca tot el contingut de calci emmagatzemat al citosol on s'activen molts enzims dependents de calci. El DTS pateix un canvi estructural important. D'una morfologia allargassada i prima, passa a ser una vesícula arrodonida. Tots els grànuls passen a entrar en contacte amb les invaginacions del sistema canicular obert i, mitjançant un procés dependent d'energia i la formació de complexos proteics de fusió, la membrana dels grànuls i la plasmàtica es fusionen, deixant alliberat a l'exterior tot el contingut emmagatzemat als grànuls. En conseqüència al procés de fusió, proteïnes de membrana que es troben en els orgànuls quan la plaqueta està inactivada, passen a ser molècules de superfície. Aquesta característica s'utilitza per a mesurar mitjançant citometria de flux el grau d'activació de les plaquetes [66]. Per exemple, el *granulophysm* serveix de marcador de grànuls densos en la superfície plaquetar quan aquestes estan activades, el CD62P-selectina per als grànuls- α i el CD63 per als lisosomes. D'aquesta manera, és possible realitzar estudis cinètics d'activació de les plaquetes i s'ha pogut observar que el primer tipus de grànuls que allibera el seu contingut a l'exterior són els grànuls densos, seguits dels grànuls- α i finalment els lisosomes [66]. Els grànuls densos i α alliberen el 100% del seu contingut, mentre que els lisosomes sembla que facin una alliberació incompleta, alliberant com a màxim el 60% del seu contingut.

2.2. FACTORS SOLUBLES DEL PRP

El plasma ric en plaquetes també és ric en factors de creixement, ja que, tal com s'ha explicat anteriorment, les plaquetes alliberen al plasma el contingut dels diferents grànuls quan són activades. El PRP conté proteïnes i factors de creixement d'importància en processos normals de regeneració, com el factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF), el factor de creixement epidèrmic (EGF), el factor de creixement transformador (TGF), el factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF), factors de coagulació, serotonina, histamina i enzims hidrolítics [58].

En aquest treball volem considerar de manera especial el TGF- β per la doble activitat que exerceix: d'una part, com a factor de creixement i d'una altra, com a important regulador de la resposta immunitària.

2.2.1. EL TRANSFORMING GROWTH FACTOR $-\beta$ (TGF- β)

El factor de creixement transformador (TGF- β de l'anglès transforming growth factor) és una molècula cabdal en molts processos cel·lulars que vetllen per a la homeòstasi del teixit. Participa de manera molt important durant l'embriogènesi i en l'evolució dels teixits madurs, participant tant en processos de **diferenciació cel·lular**, com en l'equilibri entre **proliferació cel·lular**, **supervivència** i **mort cel·lular** [70].

En la condrogènesi el TGF- β actua com un factor diferenciador estimulante l'expressió de Sox9 i de col·lagen tipus II, entre altres gens [71]. També regula la maduració dels condrocits i el seu estat d'hipertròfia a través de PTHrP [72-74]. El TGF- β activa el PTHrP (que inhibeix la diferenciació dels condrocits a un estat hipertròfic), a la vegada que inhibeix la Ihh que activa la proliferació dels condrocits. [75]. El TGF- β estimula la síntesi de PTHrP [74]. En la regulació del cicle cel·lular en condrocits i en altres cèl·lules (epiteliales, hematopoètiques, limfoides, etc.) in vivo, el TGF- β és inhibidor del cicle cel·lular, mentre que in vitro provoca la proliferació dels condrocits i la formació de matriu extracel·lular [70, 76].

Una desregulació de l'apoptosi, quan és per excés, es relaciona amb patologies degeneratives cròniques i amb immunodeficiències; en canvi, en casos d'apoptosi insuficient es pot originar càncers o autoimmunitats. En el sistema immunològic, l'apoptosi és un procés crític en la selecció de cèl·lules T [77].

El TGF- β també juga un paper clau en la regulació de la **resposta immunològica**, qüestió que es comentarà amb més detall en l'apartat 3.

El TGF- β presenta una estructura tridimensional que es mostra a la Figura 10. Es produeix localment per molts tipus cel·lulars i pot actuar de forma paracrina i autocrina. Aquest factor de creixement se sintetitza i s'allibera de forma inactiva, de manera que quedi impossibilitada la interacció amb el receptor diana. És una molècula que, a través dels seus receptors, activa i participa en moltes rutes de senyalització, raó per la qual és important que l'activitat del TGF- β es reguli molt acuradament i que només sigui actiu quan la cèl·lula, l'entorn o el teixit, el requereixin.

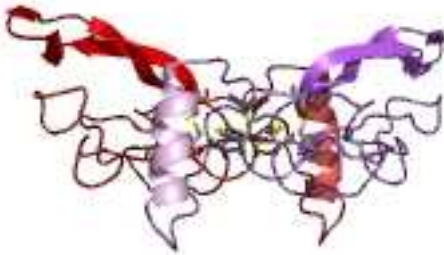


Figura 10. Estructura tridimensional del TGF- β 1 en solució. (A.P.Hinck et al. (1996))

2.2.1.1. Estructura del TGF - β

El cDNA del TGF- β codifica per un polipèptid que consta d'un propèptid LAP (de l'anglès latency-associated peptide) i del pèptid "bioactiu" TGF- β . Durant el procés de maduració el polipèptid s'estructura en forma de dímer i es produeix un tall proteolític entre el propèptid LAP i el pèptid amb activitat TGF- β , mantenint-se units per interaccions no covalents (Figura 11). Durant els procés de secreció el TGF- β latent s'uneix amb la proteïna LTBP (de l'anglès latent TGF- β binding protein) a través de ponts disulfurs entre el LAP i la proteïna LTBP formant un complex més gran. La LTBP té punts d'unió a la matriu extracel·lular; per aquest motiu, el complex latent

TGF- β que és secretat s'emmagatzema a la matriu extracel·lular, quedant-s'hi unida. Existeixen diferents LTBP com a producte de *splicing* alternatiu amb distintes distribucions tissulars, cosa que provoca que la biodisponibilitat de les diverses isoformes de TGF- β pugui estar regulada, en part, per la formació de diferents complexos latents de TGF- β . El TGF- β que alliberen les plaquetes no s'uneix a la matriu extracel·lular ja que a la LTBP-1 associada li manca el domini d'unió a la matriu.

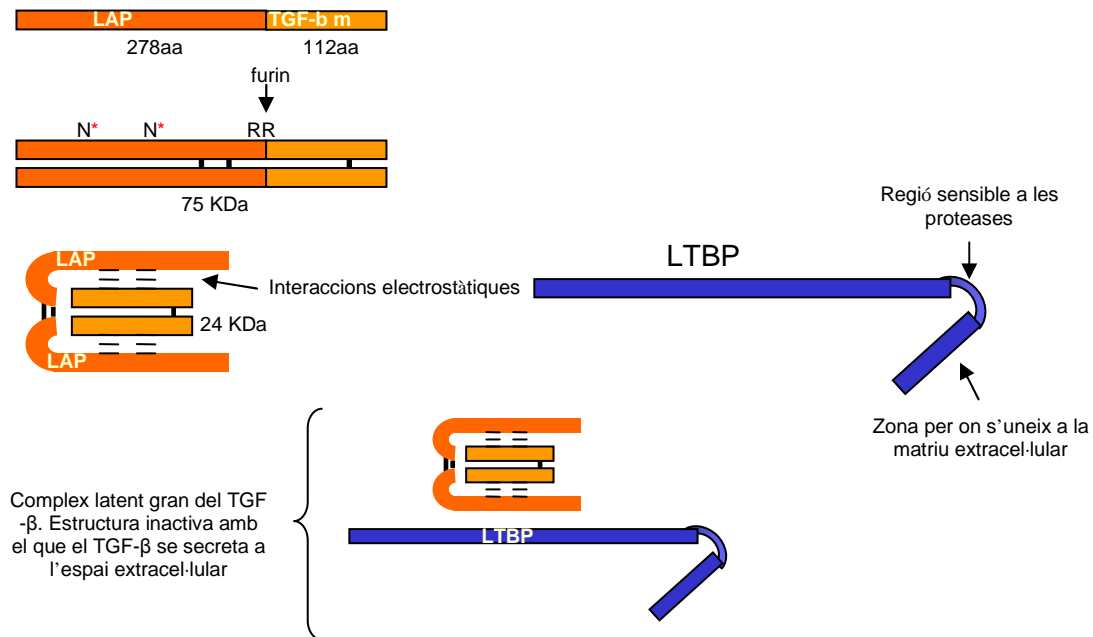


Figura 11. Esquema de la síntesi i estructura del complex latent TGF- β . El cDNA codifica per un polipèptid que consta del propèptid LAP (de l'anglès latency-associated peptide) i del pèptid amb activitat TGF- β . Es forma un homodímer unit amb ponts disulfur i es produeix un tall proteolític entre el LAP i el TGF- β . Els dos pèptids es mantenen units per interaccions electrostàtiques de manera que el LAP evita la interacció del TGF- β amb el seu receptor diana. En el procés de secreció del TGF- β latent, aquest s'uneix amb la proteïna LTBP (de l'anglès latent binding TGF- β protein) formant el complex latent TGF- β mitjançant el qual s'uneix a la matriu extracel·lular.

2.3. APLICACIONS DEL PRP

L'ús de preparacions de plaquetes per al tractament de ferides ja s'havia dut a terme el 1985, tal com documenta la bibliografia [78]. En els anys 90 es va començar a utilitzar PRP en cirurgia maxil·lofacial i plàstica [79]. Actualment, les seves aplicacions en clínica s'han estès, tal com recull la Taula 3, i bàsicament s'utilitzen amb l'objectiu d'estimular la reparació de teixits: acceleració de la cicatrització, l'acceptació d'empelts, recuperació de lesions musculars, tendinoses i òssies, o per a guarir ferides cròniques.

El primer estudi clínic en el que s'utilitza PRP per a reconstrucció òssia (Marx et al. 1998) es realitza en 88 pacients amb defectes mandibulars. En tots ells se'ls aplica empelts d'os esponjós amb o sense PRP i se'n segueix l'evolució mitjançant anàlisis radiogràfics i histomorfomètrics. Els empelts tractats amb PRP presenten una major densitat òssia (74.0% +/- 11%) que els que no s'han tractat amb PRP (55.1% +/- 8%; p = 0.005) [80]. Oyama et al., en un estudi en el 2004 amb 12 pacients, observen que l'ús de PRP en reconstruccions òssies augmenta un 16,5% la densitat òssia en comparació a quan no s'aplica PRP [81].

Taula 3. Recull bibliogràfic dels usos en clínica del plasma ric en plaquetes.

APLICACIONS DEL PRP	AUTOR, ANY DE PUBLICACIÓ
Cirurgia maxil·lofacial	Marx, et al., 1998 [80] Anitua, et al, 2001[82] Oyama, et al., 2004 [81] Nilolidakis, et al, 2008
Cirurgia plàstica	Bhanot, et al 2002 [83]
Cirurgia cardiovascular	Englert, et al., 2005[84] Wehberg, et al. 2009 [85]
Perforació del timpà	Erkilet, et al., 2009 [86]
Lesions o defectes ossis	Smarke, et al, 2007 [87] Roussy, et al., 2007 [88]
Lesions tendinoses	Mishra, et al., 2006[89] Sánchez, et al., 2007 [90]
Lesions musculars	Sánchez, et al., 2009[91]
Úlceres i ferides cròniques	Magolis, et al., 2001[92] Crovetti, et al., 2004 [57] Montón, et al., 2007 [93] Anitua, et al., 2008 [94]
Osteoartritis	Sánchez, M., et al., 2008 Saito, M., et al., 2009
Inflamació crònica de l'os	Szypula, J., et al., 2009
Cartílag	Sánchez, et al, 2003 [95]

En l'ús de PRP per al tractament de ferides cròniques, Montón et al. recullen la seva experiència clínica: d'un conjunt de 151 pacients (60 úlceres vasculars, 32 peus diabètics, 18 lesions causades per radiacions, 24 amb pèrdua de substància post traumàtica i 17 casos complexos i reconstruccions mamàries), el 72% experimenten una reducció important del temps de curació (2,6 mesos enfront dels 11,9 mesos de quan no es tracta amb PRP) [93]. En un estudi pilot per al tractament d'úlceres cutànies cròniques, realitzat per Anitua et. al (2008) [94], s'observa que a les 8 setmanes de

tractament amb PRP el $72,94\% \pm 22,25\%$ de la superfície ulcerosa s'ha curat, en comparació amb el $21,48\% \pm 33,56\%$ de les ferides control.

Quan s'aplica PRP en lesions tendinoses, un estudi de Mishra et al. (2006) realitzat sobre 140 pacients, revela que el 93% dels pacients experimenten una reducció important del dolor [89]. Atletes amb lesions al tendó d'Aquilles tractats amb PRP (n=6) recuperen el grau de moviment i poden tornar a córrer abans que els que no han estat tractats amb PRP (n=6) [90].

Per tant, aquest i altres estudis posen de manifest que l'ús del PRP es relaciona principalment amb una millor i més ràpida reparació de teixits tous i ossi, amb una disminució de la taxa d'infecció post operatòria i amb una disminució del dolor i de pèrdues hemàtiques [96].

Tot i existint diferents estudis preclínic amb resultats prometedors, n'hi ha pocs a la literatura que expliquin el mecanisme d'acció dels PRPs. Per a poder resoldre aquest interrogant són necessaris, i de gran importància, els estudis in vitro. És bàsic conèixer amb detall la naturalesa i comportament dels diferents agents que es troben implicats en el problema i poder-los estudiar de manera focalitzada i acotada. La reparació de teixit danyat és un procés complex que inclou 4 fases: homeòstasi, inflamació, proliferació i remodelació [97]. Per tant, per a poder augmentar els coneixements sobre com el PRP participa en la millora clínica dels pacients és necessari desenvolupar treballs in vitro en els que s'avaluïn els efectes del PRP sobre les diferents fases de la reparació dels teixits.

Tots els estudis que avaluen l'efecte del PRP sobre cultius cel·lulars són molt recents. S'han datat més tard de l'any 2000 i la majoria d'ells s'han publicat al llarg dels darrers tres anys. Molts d'aquests estudis presenten resultats que avaluen l'efecte del PRP sobre la **proliferació cel·lular** [98-104] i el **metabolisme biosintètic** [100, 105-107] en cultius de fibroblastos de diferents orígens (dermis, tendons, geniva, membrana sinovial, membrana fetal, aorta), osteoblastos i algun, de forma excepcional, sobre cultiu de condrocits. També s'han realitzat estudis sobre l'efecte del PRP in vitro sobre el **fenotip** [102, 103, 107, 108] i la **diferenciació cel·lular** [109-111] de cèl·lules pluripotents mesenquimals o del moll de l'ós a diferents tipus cel·lulars, bàsicament

osteoblasts i condrocits. Els estudis que avaluen l'efecte del PRP sobre la **inflamació** són molt minoritaris i s'han fet sobre monòcits aïllats de sang perifèrica [112] o sobre la línia cel·lular HL-60 [97].

Manquen estudis que avaluin la capacitat dels condrocits d'actuar com una cèl·lula activa en la resposta inflamatòria/anti-inflamatòria. Tots els estudis realitzats in vitro sobre condrocits s'adrecen bàsicament a avaluar l'efecte de diferents molècules, factors de creixement, compostos, etc. sobre la diferenciació/desdiferenciació, els processos degradatius i la síntesi de matriu. També existeix una pràctica molt generalitzada de cultius de condrocits en el camp de l'enginyeria de teixits, per exemple en l'assaig de nous (bio)materials [53].

3. RESPOSTA IMMUNOLÒGICA:

El sistema immunitari ha de mantenir un equilibri entre la immunitat i la tolerància. D'una banda, ha de ser prou agressiu per a poder eliminar la presència de patògens o de qualsevol cèl·lula en mal estat que posi en risc el bon funcionament del teixit/sistema/organisme. Però de l'altra, ha d'evitar que l'agressió afecti de manera aberrant sobre teixit sa i ha de permetre la presència d'antígens exògens, com poden ser els que s'incorporen amb la ingesta o en el cas de l'embaràs. En el primer cas, juguen un paper fonamental les **cèl·lules T efectores**; en el segon, les **cèl·lules T reguladores**.

3.1. LES CÈL·LULES T EFECTORES

Existeixen diferent tipus de cèl·lules efectores:

- **Cèl·lules T citotòxiques CD8⁺**: reconeixen pèptids endògens o de patògens que es multipliquen en el citosol i són presentats per molècules de MHC de tipus I. Aquestes cèl·lules, després del seu reconeixement específic, maten la cèl·lula diana.
- **Cèl·lules T CD4⁺**: s'activen a l'unir-se amb l'antigen presentat per molècules de MHC de tipus II de cèl·lules presentadores, i es diferencien, segons el microambient de citocines que les envolten, en cèl·lules efectores que secreten un perfil de citocines característic: Th1, Th2, Th17 i altres.

Cèl·lules Th1: En el focus inflamatori activen les propietats microbicides dels macròfags a través de la producció de quantitats importants de IFN- γ . Una altra funció efectora que es produeix en els centres germinals és generar un microambient de citocines que afavoreix el canvi a diferents isoptips de IgG produïts durant la resposta immunitària.

Cèl·lules Th2: Son les cèl·lules que proporcionen la segona senyal d'activació al limfòcit B activat. Una altra funció efectora, després de migrar al centre germinal, consisteix en produir un microambient de les citocines IL-4, IL-5, IL-13, favorables al canvi d'isotip de les immunoglobulines, per dur a terme un resposta humoral més efectiva.

Cèl·lules Th17: Es caracteritzen bàsicament per la síntesi de citocina IL-17 en el focus inflamatori. També sintetitzen IL-21 i IL-22. Totes aquestes citocines poden modificar el microambient durant la resposta immunitària.

3.2. LES CÈL·LULES T REGULADORES

Existeix diferents tipus de cèl·lules T reguladores, en funció dels marcadors de superfície que expressin, del perfil de citocines que sintetitzin i del seu mecanisme d'acció.

Les cèl·lules que es coneixen com a cèl·lules **T reguladores naturals** (nTreg) es generen al timus, són CD4⁺ i CD25⁺ i expressen constitutivament Foxp3. En els darrers anys es creu que aquestes cèl·lules també puguin derivar de cèl·lules memòria perifèriques [113]. L'expressió de Foxp3 és imprescindible per al desenvolupament i funció de CD4⁺CD25⁺ Treg, ja que bloqueja els factors de transcripció NFAT (de l'anglès Nuclear Factor of Activated T cells) i NF- κ B i per tant queda inhibida la síntesi de IL-2, IL-4 i IFN- γ (les cèl·lules perden la capacitat d'estimulació immunològica).

També hi ha les **cèl·lules T induïbles** (iTreg). Aquestes s'originen a partir de cèl·lules T naïve i se'n diferencien dos tipus en funció de si expressen IL-10 o TGF- β . Les cèl·lules T reguladores de tipus 1 (**Tr1**) són CD4⁺ i expressen elevats nivells de IL-10, moderada IL-5, IFN- γ i TGF- β , i no expressen IL-2, ni IL-4. Les cèl·lules T reguladores "helper"3 (**Th3**) expressen elevats nivells de TGF- β [113]. Les iTreg supprimeixen l'expressió Th1 i Th2.

Cèl·lules Treg amb la funció alterada es relacionen amb moltes patologies autoimmunitàries. L'artritis reumatoide n'és un exemple clar. Tot i que el nombre de cèl·lules Treg en sang perifèrica o en el líquid sinovial pugui ser molt variable, la funció de les cèl·lules Treg en pacients amb artritis reumatoide sempre es troba danyada. Presenten baixa expressió de Foxp3, cosa que afecta de manera negativa la capacitat de supressió de la proliferació de les cèl·lules T efectores i la secreció de les citocines IFN- α i TNF- α per part de les cèl·lules T efectores. En el grau de gravetat de l'artritis reumatoide és crític el balanç cèl·lules Treg/cèl·lules Th17 [44].

3.3. PAPER DEL TGF- β EN LA RESPOSTA IMMUNOLÒGICA

El TGF- β és una de les molècules més importants amb capacitat de regulació de la resposta immunològica i actua a diferents nivells:

- Durant la maduració dels limfòcits, el TGF- β contribueix a l'apoptosi de cèl·lules autoreactives i al manteniment de la tolerància, prevenint el desenvolupament d'autoimmunitats [114].
- Bloqueja la diferenciació Th1 i Th2 i inhibeix directament la proliferació de cèl·lules T [114].
- Està implicat en la conversió de cèl·lules T naïve CD4⁺CD25⁻ a cèl·lules CD4⁺CD25⁺ mitjançant la inducció de Foxp3, de fet, el TGF- β és necessari tant per a l'expansió, com per a la capacitat immunosupressora de les cèl·lules CD4⁺CD25⁺. Diverses patologies autoimmunitàries com, per exemple, l'artritis reumatoide i la diabetis, es produeixen de manera espontània quan s'eliminen les cèl·lules nTreg CD4⁺ CD25⁺(Foxp3) [114].
- En presència de TGF- β i IL-6, les cèl·lules T naïve CD4⁺ es diferencien a Th17 [41] (Figura 12) i adquireixen un fenotip que sintetitza elevats nivells de IL-10 i baixes quantitats de IL-22. Li et. al [115] suggereixen que l'estimulació de cèl·lules Th17 amb TGF- β du a la diferenciació de Th17 a un estat amb activitat reguladora (rTh17), mentre que l'estimulació i expansió de rTh17 amb IL-23 i en absència de TGF- β du a l'adquisició d'un fenotip efector Th17. Una estimulació constant de les Th17 amb TGF- β és necessària per a mantenir-se en un estat no patològic [115], qüestió important en patologies com l'artritis reumatoide.

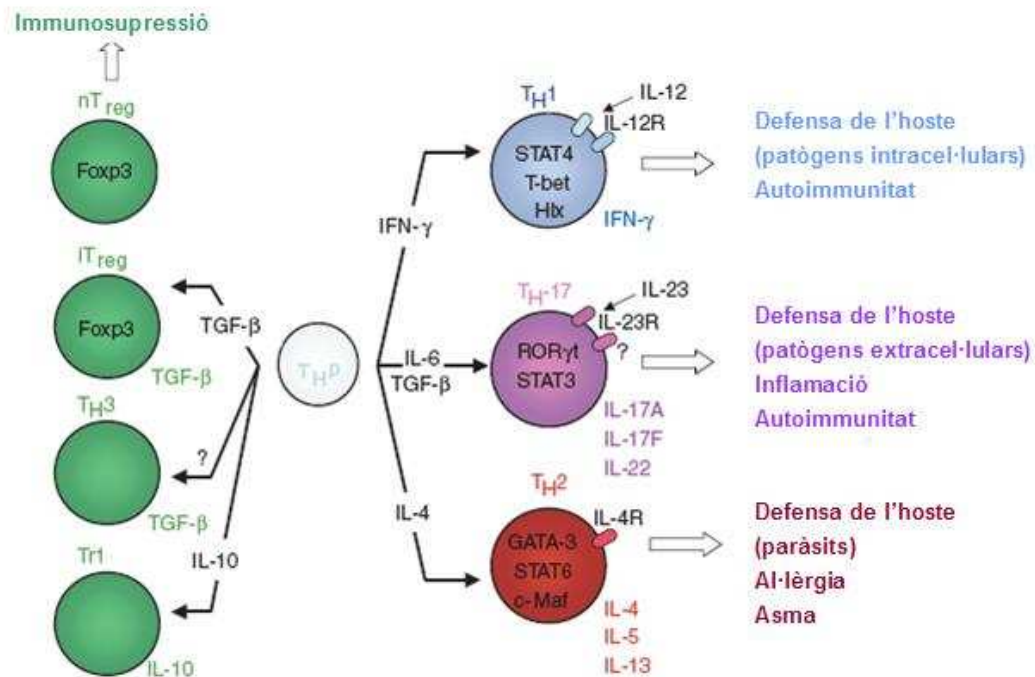


Figura 12: Diferenciació de poblacions cel·lulars T CD4⁺. (Bettelli et al. 2007 [41]) Cèl·lules precursors Tnaïve CD⁺ perifèriques (T_{HP}) es poden diferenciar en tres poblacions de cèl·lules T efectores (T_{H1}, T_{H2} i T_{H17}) i en diverses cèl·lules T reguladores (T_{reg}), incloent les cèl·lules T_{reg} induïbles (iT_{reg}) Tr1 i les T_{H3}. Les cèl·lules T reguladores naturals (nT_{reg}) es generen a partir de precursors CD4⁺ al timus. La diferenciació d'aquestes poblacions cel·lulars es regula per citocines i factors de transcripció específics, i la funció també és específica per cada tipus cel·lular.

HIPÒTESI

Moltes patologies articulars estan relacionades amb dany en el cartílag. En aquest tipus de patologies s'observa una associació entre degradació del teixit i resposta inflamatòria, ja que fragments de la matriu extracel·lular, productes de la degradació del teixit, estimulen una resposta inflamatòria local en l'articulació. D'altra banda, tota resposta inflamatòria és causa de dany, la qual cosa comporta la generació d'una dinàmica cíclica inflamació- dany, amb situacions d'inflamació crònica i la perpetuació de la degradació del teixit.

Per fer possible la recuperació del dany articular seria necessari regular la resposta inflamatòria, aturar la degradació del teixit i potenciar els processos de regeneració. Les citocines i factors de creixement tenen un paper clau en la regulació de la resposta inflamatòria i també participen del metabolisme dels condrocits de forma auto i paracrina. Especialment el TGF- β té una important capacitat de regulació de la resposta inflamatòria, així com un paper clau en la condrogènesi.

En els darrers anys s'estan aplicant, tant en clínica humana com veterinària, nous tractaments basats en concentrats de plaquetes, obtenint bons resultats clínics. Tot i que amb aquesta pràctica s'aconsegueix una millor i més ràpida recuperació de teixits tous i ossis, no es coneix amb detall els mecanismes que ho fan possible. Les plaquetes són una font rica en factors de creixement, especialment TGF- β , PDGF, EGF i VEGF, cosa que facilita poder obtenir de forma autòloga preparacions de plasma riques en aquests factors de creixement.

En aquest context ens plantegem generar un model cel·lular in vitro de condrocits oxidats o estimulats amb LPS per poder veure l'efecte del plasma ric en plaquetes (PRP) sobre aquestes cèl·lules. Amb això pretenem ampliar el coneixement sobre l'acció que puguin generar els PRPs sobre els condrocits en situacions d'agressió, així com ajudar a entendre millor per quins mecanismes els PRP poden afavorir la millora clínica d'una articulació danyada.

Per tant, la hipòtesi que ens plantegem en aquests treball és:

El plasma ric en plaquetes conté factors moduladors de la inflamació i promotors de la regeneració. Aquests factors podrien actuar sobre els condrocits modificant-ne l'expressió de citocines i molècules de la matriu cartilaginosa, de forma que es generaria un entorn favorable per la recuperació del dany.

OBJECTIUS

Els objectius plantejats en aquest treball són:

1. Establir cultius primaris de condrocits a partir de biòpsies de cartílag articular procedents de pacients amb artrosi.
2. Estandarditzar la metodologia per obtenir plasma ric en plaquetes (PRP) a partir de sang humana, per la seva utilització com a font exògena de factors de creixement.
3. Analitzar l'efecte del plasma ric en plaquetes sobre cultius primaris de condrocits.
4. Avaluar l'efecte del plasma ric en plaquetes en cultius primaris de condrocits tractats amb LPS.
5. Valorar l'efecte del plasma ric en plaquetes sobre la funció dels condrocits en presència d'un agent oxidant.

MATERIALS I MÈTODES

4. OBTENCIÓ DE LES MOSTRES:

4.1. Biòpsies de cartílag articular i cultiu primari de condrocits

Totes les biòpsies de cartílag articular utilitzades en aquest estudi s'han obtingut en col·laboració amb el Dr. Jordi Monfort de la Unitat d'Investigació en Fisiopatologia Òssia i Articular (URFOA) de l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM) de l'Hospital del Mar (Barcelona). En tots els casos s'havia obtingut el consentiment informat de pacients sotmesos a cirurgia de reemplaçament.

Els cultius primaris inclosos en l'estudi s'han realitzat a partir de condrocits obtinguts d'11 biòpsies de cartílag articular de ròtula i de còndil lateral de fèmur procedents de 4 homes i 7 dones, d'edats compreses entre els 71 i 90 anys. Les biòpsies que s'extreuen en la cirurgia de reemplaçament per a la col·locació de pròtesis de genoll es mantenen en medi DMEM (Ref. 31966-047, Gibco, Invitrogen, Barcelona, Espanya) suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví (FCS) (ref.10499044, Invitrogen, Barcelona, Espanya) a 4°C fins el seu processament en el nostre laboratori.

En aquest estudi, tal com s'esquematitza a la Figura 13, també s'han realitzat cultius primaris a partir de condrocits congelats. Aquests condrocits provenien de biòpsies de cartílag articular de cap de fèmur, de ròtula i de còndil lateral de fèmur extretes en cirurgia de reemplaçament de pròtesis de maluc i de genoll respectivament. Les biòpsies s'havien processat i disgregat en el grup del Dr. Jordi Monfort i els condrocits s'havien criopreservat en nitrogen líquid.

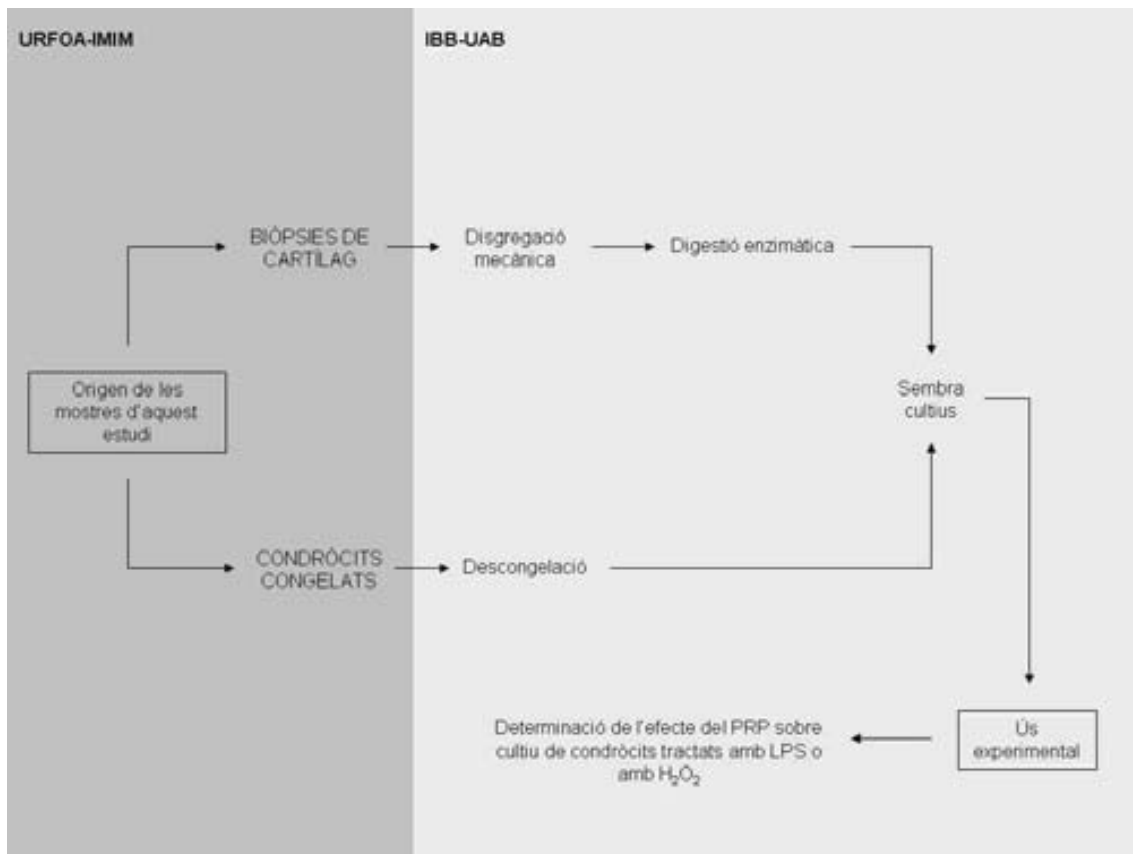


Figura 13. Esquema de l'origen i ús experimental de les mostres en aquest estudi. URFOA- IMIM: Unitat d'Investigació en Fisiopatologia Òssia i Articular de l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica de l'Hospital del Mar (Barcelona). IBB-UAB: Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la Universitat Autònoma de Barcelona (Bellaterra)

4.1.1. Processament de biòpsies de cartílag articular per a la realització de cultiu primari de condrocits

Les biòpsies de genoll es processen sempre en cabina de seguretat biològica classe II NUAIRE (Ref. NU-437-300E, Nirco, Barcelona, Espanya) per a l'obtenció dels condrocits, seguint el següent protocol:

- a) Es netegen els trossos de genoll obtinguts de la cirurgia amb tampó fosfat salí (PBS) (ref. 14190169, Gibco, Invitrogen, Barcelona, Espanya) temperat a 37°C per a extreure'n residus de líquid sinovial i de sang.
- b) Amb un bisturí (Ref. 143.0015, Rubilabor, Espanya) es separen làmines de cartílag hialí de les zones menys danyades i es dipositen en un contenidor estèril amb 20 ml de PBS.
- c) Es realitza un altre rentat amb 10-20 ml de PBS per tal d'eliminar del tot les restes de líquid sinovial i de sang.

- d) S'agafen les làmines de cartílag una a una i es trosseja el cartílag en trossos d'1 mm³ aproximadament en placa de petri (Ref. 353003, Becton Dickinson) amb l'ajut d'un bisturí i/o unes tisores de punta fina.
- e) Es dipositen els trossos de cartílag en un matràs i s'hi afegeixen 10 ml de solució de hialuronidasa (0,5 mg/ml hialuronidasa testicular bovina tipus IV-S, ref.H3884, Sigma, Barcelona, Espanya) en medi DMEM:F12 (Ref.31331093, Gibco, Invitrogen, Espanya) suplementat amb penicil·lina (P)/estreptomicina (S) (Ref. 15140122, Invitrogen, Espanya) i L-glutamina (Ref. 25030024, Invitrogen, Espanya). S'incuba a 37°C durant 30 min en un bany amb agitació (LAUDA – E100, Thermo, Barcelona, Espanya).
- f) S'elimina la solució de hialuronidasa i s'hi afegeixen 10 ml de la solució de pronasa (1 mg/ml pronasa (Ref. 53702, Calbiochem, Merck, Barcelona, Espanya) en medi DMEM:F12 suplementat amb P/S i L-glutamina). S'incuba a 37°C durant 1 h amb agitació.
- g) S'elimina la solució de pronasa i es realitzen 3 rentats amb 15 ml de medi DMEM:F12 per a eliminar bé la pronasa, ja que en cas contrari podria degradar la col·lagenasa.
- h) S'afegeixen 20 ml de la solució col·lagenasa (0,5 mg/ml col·lagenasa tipus II (Ref. 1710-015, Invitrogen, Barcelona, Espanya) en medi DMEM:F12 suplementat amb P/S i L-glutamina). S'incuba a 37°C durant 18-22 h en un bany amb agitació.
- i) Es filtra la solució de col·lagenasa a través d'un filtre de 70 µm (Ref. 352350, BD Falcon, BD Bioscience, Madrid, Espanya) El filtrat, que conté els condrocits, es traspasa en un tub de 50 ml i es centrifuga (SORVALL- TC6, Thermo, Barcelona, Espanya) a 1200 rpm durant 5 min.
- j) Es resuspèn el botó cel·lular amb 20 ml de medi DMEM:F12 suplementat amb 10% de FCS. Se centrifuga a 1200 rpm durant 5 min. (Aquest pas es repeteix dues vegades més).
- k) Es resuspèn el botó cel·lular en 10 ml de medi de cultiu complet (DMEM:F12 10% FCS, 0,05 mg/ml d'àcid ascòrbic (Ref. A4403, Sigma, Barcelona, Espanya), 1% d'antibiòtics) i es realitza recompte cel·lular. (veure apartat 4.1.3)
- l) Si s'obté més de 2×10^6 cèl·lules es sembren en flascons T75 (Ref. 156499, Nunc, Labclínic, Barcelona, Espanya) a una densitat de $2-3 \times 10^6$ cèl·lules/flascó. Si

s'obtenen menys cèl·lules es sembren en flascons T25 (Ref. 156367, Nunc, Labclínic, Barcelona, Espanya)

- m) Les cèl·lules s'incuben a 37°C amb 5% CO₂ durant 5 dies com a màxim per a deixar temps a què els condrocits s'adhereixin a la superfície del flascó.
- n) S'elimina el medi amb totes les cèl·lules mortes o que han perdut la capacitat d'adhesió. Es renta el flascó amb 15 ml de PBS i, després d'aspirar el PBS, s'afegeix 15 ml de medi de cultiu complet.
- o) Es manté el cultiu a 37°C i 5% CO₂ fins abans d'arribar a confluència.

4.1.2. Descongelació de condrocits.

El protocol de descongelació que s'ha seguit per al cultiu primari de condrocits a partir de les mostres que arriben congelades al nostre laboratori, ha estat el següent:

- a) Es tempera medi de cultiu a 37°C, mantenint una part en fred a 4°C.
- b) Es posa el criotub amb els condrocits congelats al bany maria durant 1 min. Afegim medi a 4°C per a recollir les cèl·lules i per a diluir la concentració de DMSO. Cal recordar que el DMSO amb el qual es congelen les cèl·lules és tòxic a 37°C, per tant és important que mentre les cèl·lules estiguin amb DMSO es treballi en medi fred.
- c) Es centrifuga a 1200 rpm durant 5 min.
- d) Es descarta el sobrenadant i es resuspèn el pèl·let en 5 o 10 ml de medi temperat segons la grandària del pèl·let.
- e) Es realitza recompte cel·lular amb blau de tripà i es calcula la vitalitat dels condrocits (veure apartat següent). Si la vitalitat és superior al 60%, els condrocits es sembren en un flascó T75; si és inferior, es descarten i no s'utilitzen per a l'estudi.
- f) S'incuba a 37°C i 5% CO₂ com a màxim durant 5 dies abans de fer-ne un canvi de medi i eliminar-ne totes les cèl·lules mortes.

4.1.3. Càlcul de la concentració i vitalitat de condrocits.

Per a realitzar els diferents procediments experimentals ens interessa conèixer tant la seva concentració, com el percentatge de cèl·lules viables del cultiu. Per a conèixer aquests paràmetres s'ha utilitzat un hemocitòmetre (Cambra de Neubauer)

(Ref. 166546002/ N, Sudelab, Barcelona, Espanya) seguint el protocol descrit a continuació.

El blau de tripà és un colorant vital que penetra a totes les cèl·lules a través de la membrana per difusió passiva. Les cèl·lules vives són capaces d'expulsar-lo de forma activa, motiu pel qual s'observen refringents i no tenyides de blau en el microscopi de contrast de fase. Les cèl·lules mortes no poden expulsar del seu interior el blau de tripà i per aquest motiu es distingeixen blaves i no refringents en el microscopi.

Recompte cel·lular:

- Assegurar-se que l'hemocitòmetre està net amb etanol 70%.
- Col·locar amb compte el cobreobjectes sobre la zona quadrículada de l'hemocitòmetre (Figura 14).
- Assegurar-nos que la suspensió cel·lular està ben barrejada. Ajudar-se, si cal, d'una pipeta serològica per a resuspendre amb suavitat el contingut cel·lular.

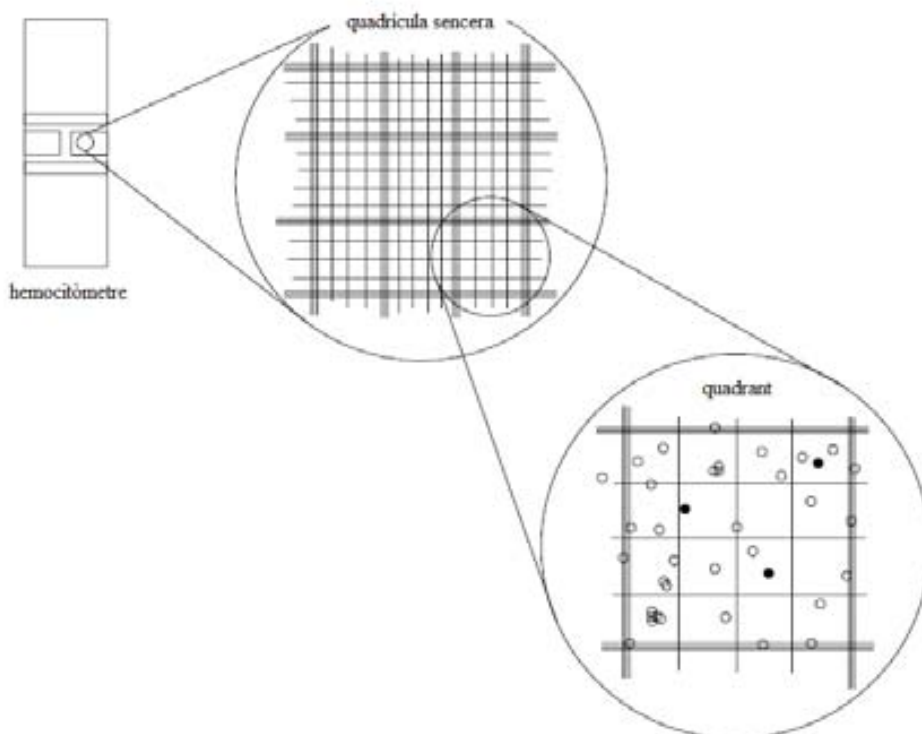


Figura 14. Representació d'un hemocitòmetre (Càmbra de Neubauer). En els cercles es mostra les quadrícules que s'observen al microscopi en realitzar un recompte amb la càmbra de Neubauer: Una quadrícula sencera dividida en 9 quadrants i cada un d'aquests quadrants dividit en 16 quadrats més. Les boletes blanques representen les cèl·lules vives, mentre que els punts negres representen les cèl·lules mortes.

- d) Agafar amb una micropipeta 10 μ l de la suspensió cel·lular de l'ependorf i barrejar-ho bé amb 10 μ l del colorant vital blau de tripà (Ref. T8154, Sigma, Barcelona, Espanya) (dilució 1:1). Realitzar aquest pas en el moment de fer el recompte, ja que si es deixa un temps excessiu d'incubació algunes cèl·lules vives podrien quedar marcades com mortes i donar un percentatge de vitalitat no ajustat a l'estat real del nostre cultiu. Amb una micropipeta agafar 10 μ l de la barreja cel·lular amb el blau de tripà i carregar l'hemocitòmetre. Es deixa reposar la punta de la pipeta just a l'extrem del cobreobjectes de l'hemocitòmetre i amb molt de compte es carrega la cambra. Per capil·laritat, la barreja cel·lular amb el colorant es difon únicament pels solcs de la cambra.
- e) Es col·loca l'hemocitòmetre al microscopi i amb l'augment 10x s'enfoca la quadrícula sencera (Figura 14). S'enfoca una de les quadrícules (subdividida en 16 quadrats) i es compten, seguint algun criteri d'exclusió, les cèl·lules vives (s'observen refringents i no tenyides de color blau). En el mateix quadrant es compten, seguint el mateix criteri d'exclusió, les cèl·lules mortes, que s'observen blaves i no són refringents.
- f) Es mou l'hemocitòmetre per a enfocar un altre quadrant de 16 quadrets i es compten de la mateixa manera les cèl·lules vives i les cèl·lules mortes. Es realitza el mateix en 2 quadrants més per tal d'haver comptat finalment un total de 4 quadrants de 16 quadrets.

Càlcul de la concentració cel·lular:

L'hemocitòmetre està dissenyat de manera que el nombre de cèl·lules en un quadrant de 16 quadrets equival al nombre de cèl·lules $\times 10^4$ /ml.

El càlcul de la concentració cel·lular en la suspensió de cèl·lules es realitza seguint la fórmula següent:

Cèl·lules vives:

$$\frac{Q_1 + Q_2 + Q_3 + Q_4}{4} \times 2 \times 10^4 = \text{cèl·lules /ml}$$

Cèl·lules mortes:

$$\frac{q_1 + q_2 + q_3 + q_4}{4} \times 2 \times 10^4 = \text{cèl·lules /ml}$$

Essent Q_n el nombre de cèl·lules vives i q_n cèl·lules mortes en cada quadrant comptat i 2, el factor de dilució amb el que s'han diluït les cèl·lules en barrejar-les amb el blau de tripà (dilució 1:1)

Càlcul de la vitalitat cel·lular:

El càlcul de la vitalitat cel·lular es realitza a partir del càlcul de les concentracions de cèl·lules vives i de cèl·lules mortes, segons la fórmula:

$$[\text{Cèl·lules vives}] / ([\text{Cèl·lules vives}] + [\text{Cèl·lules mortes}]) \times 100 = \% \text{ vitalitat cel·lular}$$

4.1.4. Tripsinització cel·lular

Els cultius primaris realitzats en flascons amb els condrocits obtinguts de la biòpsia de cartílag o amb els condrocits congelats, abans que arribin a confluència, es tripsinitzen i es sembren en placa en funció de les necessitats experimentals, seguint el següent protocol:

- a) S'elimina el medi del flascó cel·lular.
- b) Es fa un rentat amb 15 ml de PBS temperat a 37 °C per a eliminar totes les restes de sèrum fetal present en el medi, ja que les proteïnes del sèrum fetal inhibeixen l'acció de la tripsina.
- c) S'afegeixen 5 ml de tripsina a 37°C en un flascó T75 i es deixa incubant a 37°C durant 3-5 minuts. Es colpeja el flascó per a ajudar que les cèl·lules es desprenguin del plàstic. En un microscopi invertit (Ref. 090-122.012, Leitz) es comprova que els condrocits estiguin en suspensió.
- d) S'afegeixen 15 ml de medi de cultiu complet, amb sèrum fetal, per a inhibir l'acció de la tripsina. Amb l'ajuda de la pipeta s'intenta disgregar suaument els "grumolls" de cèl·lules que s'hagin pogut formar.
- e) Es traspassa el contingut en un tub net i es centrifuga a 1200 rpm durant 5 min.

- f) Es resuspèn el pèl·let amb 10 ml medi de cultiu complet i es torna a centrifugar a 1200 rpm durant 5 min. (aquest pas es realitza dues vegades).
- g) Una vegada s'ha eliminat tota la tripsina residual que hagués pogut quedar, les cèl·lules es resuspenen en 10 ml de medi de cultiu complet (si s'observa un pèl·let cel·lular petit, es resuspèn en un volum de 5 ml).
- h) Es realitza recompte cel·lular amb blau de tripà i es sembra segons l'ús que es vulgui fer del cultiu:
 - a) 20.000 cèl·lules/pou per placa de 96 pous
 - b) 100.000 cèl·lules/pou per placa de 24 pous
 - c) Pel al manteniment del cultiu es reparteix en dos flascons T75
- i) S'incuba a 37°C en un incubador al 5 % de CO₂.

Per al manteniment del cultiu, el medi de cultiu es renova cada 2-3 dies en funció de la densitat cel·lular. Per a un mateix cultiu, provinent d'una mateixa biòpsia, no es realitzen més de 3 passes per a l'ús experimental del cultiu. Periòdicament es segueix l'evolució del cultiu, observant-ne el medi i la morfologia cel·lular amb microscopi invertit (Ref. 090-122.012, Leitz, Espanya).

4.2. Obtenció de Plasma Ric en Plaquetes (PRP)

L'objectiu de l'obtenció de plasma ric en plaquetes és aconseguir una font rica en factors de creixement, especialment TGF- β , per a la posterior aplicació en el cultiu primari de condrocits. Els concentrats de plaquetes es realitzen a partir de sang humana i tota la seva manipulació es realitza en condicions asèptiques i d'esterilitat en cabina de flux laminar de seguretat biològica. La sang s'ha extret, amb el consentiment informat, a 3 persones voluntàries en el Servei Assistencial de Salut del Campus universitari de Bellaterra (Universitat Autònoma de Barcelona). A la Figura 15 es mostra un esquema del procés d'obtenció del plasma ric en plaquetes (PRP).

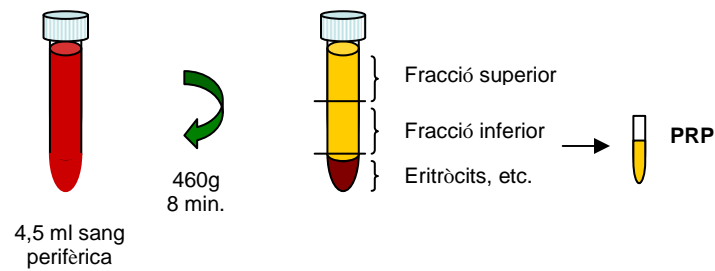


Figura 15. Esquema de l'obtenció de plasma ric en plaquetes. Se centrifuga sang sencera a 460 g durant 8 min. La fracció de plasma per sobre de la fracció vermella (eritròcits) és el que es considera plasma ric en plaquetes (PRP). La fracció superior del plasma obtingut es centrifuga una segona vegada (9000 rpm, 10 min) per a obtenir plasma pobre en plaquetes (PPP).

- S'obtenen 20 ml de sang perifèrica en una xeringa sense anticoagulant. Immediatament es reparteixen en 4 tubs amb citrat sòdic (4,5 ml sang/ 0,5 ml citrat sòdic; Ref.vt050 sbcs, SULAB, Terrassa, Espanya). S'inverteixen els tubs amb suavitat unes quantes vegades per a assegurar-nos que la sang s'ha barrejat bé amb l'anticoagulant.
- Es centrifuguen els tubs a 460 g durant 8 min (Heraeus Megafuge 2.0.R, Thermo, Barcelona, Espanya)
- S'introdueix una xeringa amb una agulla de 21G (Ref. NN2138R, Neolus®, Monlab, Espanya) just per sobre de la fracció vermella (eritròcits). Amb molt de compte de no trencar la interfase s'aspira amb la xeringa 1,5 ml de plasma i es dipositen en 3 tubs eppendorfs (Ref. 711.1500, Rubilabor S.L., Barcelona, Espanya) (0,5 ml plasma/eppendorf). Aquest plasma de la fracció inferior (veure Figura 15) és el que es considera plasma ric en plaquetes.

4.2.1. Activació de les plaquetes amb CaCl₂

L'activació de les plaquetes provoca el buidat del contingut dels grànuls de les plaquetes, com per exemple TGF- β . L'activació de les plaquetes s'indueix in vitro amb clorur càlcic (CaCl₂). En el nostre cas s'ha seguit el següent protocol:

- S'esterilitza mitjançant filtració per un filtre de 0,22 μ m (Ref. SA/SLG 503355, Millipore Iberica, Espanya) 10 ml de solució CaCl₂ 0,5 M (Ref.21107, Fluka, Sigma, Barcelona, Espanya). Aquesta solució és reutilitzable sempre que s'utilitzi dins d'una cabina de flux laminar i es mantinguin les condicions d'esterilitat .

- b) S'afegeixen 45 µl de la solució CaCl₂ 0,5 M a 450 µl de PRP (o de PPP en cas que es vulgui activar el PPP) i es barreja bé.
- c) S'incuba a 37°C durant 60-90 min.
- d) Es centrifuga a 9000 rpm durant 10 min per a eliminar els coàguls i fibres de fibrina.
- e) Es recull el sobrenadant i s'emmagatzema a -20°C fins el seu ús.

4.2.2. Anàlisi de l'activació plaquetar

Com que el TGF-β present en el PRP és fruit de l'activació de les plaquetes, s'ha avaluat el grau d'activació de les plaquetes en diferents moments del protocol d'obtenció del PRP. L'anàlisi de l'activació plaquetar s'ha realitzat mitjançant el marcatge de les proteïnes de membrana integrina-β3 (CD61) i P-selectina (CD62P) per citometria de flux i quantificant el TGF-β alliberat mitjançant ELISA. A la Figura 16 es mostra un esquema del protocol seguit per a l'anàlisi de l'activació plaquetar.

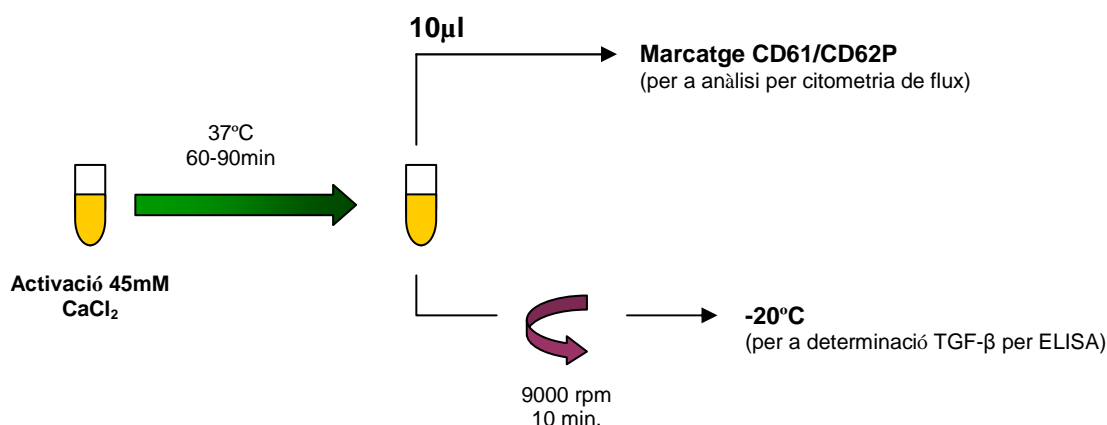


Figura 16. Esquema del protocol seguit per a l'activació de les plaquetes. S'activen les plaquetes amb CaCl₂ (45 mM) durant 60-90min (37°C). Per a l'anàlisi de l'activació plaquetar mitjançant citometria s'utilitzen 10 µl de la mostra. La resta es centrifuga (9000 rpm, 10min) i es congela el sobrenadant per a la posterior quantificació del TGF-β alliberat mitjançant ELISA.

a) Marcatge CD61/CD62P per l'anàlisi amb citometria de flux

El marcatge CD61⁺ és indicatiu de plaqueta, ja que la glicoproteïna CD61 és una integrina-β3 constitutiva en la membrana de les plaquetes. El marcatge CD62P⁺ és marcador de plaqueta activada ja que és una molècula d'adhesió P-selectina que es troba en la membrana dels grànuls-α i només s'expressa en la superfície cel·lular quan en l'activació de les plaquetes s'allibera el contingut dels grànuls-α i les membranes dels orgànuls i la membrana plasmàtica queden fusionades.

Per a realitzar el marcatge CD61/CD62P de les plaquetes s'ha seguit el següent protocol:

- 1- Es prepara PRP segons el protocol d'obtenció de plasma ric en plaquetes (apartat 4.2).
- 2- S'activen les plaquetes tal com s'especifica en l'apartat 4.2.1. Es realitza un control negatiu d'activació afegint 45 µl de PBS a 450 µl de PRP.
- 3- En tubs de citometria (Ref. 17-5653 G, Nirco, Espanya) es barregen 10 µl de PRP amb anticossos anti-CD61-FITC (Ref. 21330613, Immuno Tools, Oldenburg, Alemanya) i anti-CD62P-PE (Ref. 21330624, Immuno Tools, Oldenburg, Alemanya) tal com s'indica a la Taula 4.

Taula 4. Marcatge CD61/CD62P de plaquetes per al seu anàlisi per citometria de flux. Preparació de les mostres de PRP per a l'anàlisi de l'activació plaquetar mitjançant citometria de flux.

MOSTRA	PRP (µl)	PBS – FBS 2% (µl)	antiCD61 (FITC) (µl)	antiCD62P (PE) (µl)
Control doble negatiu	10	40	-	-
Control FITC	10	25	15	-
Control PE	10	25	-	15
Mostra PRP	10	10	15	15

- 4- S'incuba la barreja protegida de la llum, a temperatura ambient durant 20 minuts.
- 5- Es realitza un rentat amb 1 ml/tub de PBS i es resuspèn la mostra amb 0,5 ml de PBS per a ser analitzades en un citòmetre de flux FACScalibur® (Becton Dickinson, Espanya) .
- 6- Els resultats s'analitzen amb el programa informàtic FACScan® (Becton Dickinson, Espanya) .

b) Determinació de la concentració de TGF-β.

Quan les plaquetes s'activen, aboquen el contingut dels seus grànuls al plasma, i els grànuls-α són rics en TGF-β. Per tant, la concentració de TGF-β alliberat és un indicador de l'activació de les plaquetes.

La quantificació de TGF-β en el plasma s'ha realitzat mitjançant ELISA tipus sandvitx. S'han utilitzat els anticossos comercials de R&D Systems (DuoSet ref. DY240, R&D Systems). Com a anticòs de captura s'ha utilitzat un anticòs de ratolí

específic del TGF- β 1 humà, i com a anticòs de detecció, un anticòs de pollastre específic del TGF- β 1 humà que es troba biotinilat. També s'han utilitzat estàndards de TGF- β 1 recombinant humà per a fer la recta patró.

Per a quantificar el TGF- β 1 mitjançant ELISA requereix deslliurar-lo prèviament dels propèptids amino-terminals (latency-associated peptides) i de la proteïna d'unió amb la qual està unit per ponts disulfur, amb els que forma el complex de TGF- β inactiu que secreten les cèl·lules. Aquesta activació del TGF- β es realitza in vitro afegint 100 μ l de tampó d'activació - àcid acètic 2.5N (Ref. 010520, Probus, Espanya), urea 10M (Ref. U-5128, Sigma, Barcelona, Espanya) - en el mateix volum de plasma humà, es barreja bé i es deixa incubar a temperatura ambient durant 10 min. El pH de la mostra es neutralitza amb 100 μ l de tampó de neutralització - NaOH 2.7M (Ref. 141687.1211 Panreac, Espanya), HEPES 1M (Ref. H3375, Sigma-Aldrich, Barcelona, Espanya) -.

Tot i que el procés d'activació del TGF- β ja implica una dilució 1/3 del plasma, per a la quantificació del factor de creixement mitjançant ELISA es realitza una dilució 1/2 i 1/4 de la mostra activada amb tampó de dilució - albúmina sèrica bovina 1,4% (Ref. 10735078001, Roche, Espanya), Tween₂₀ 0,05% (Ref. 170-6531, Bio-Rad, Espanya), en PBS -.

Es carreguen per duplicat 100 μ l/pou de la fracció activada a la placa. Per tal de quantificar el TGF- β 1 de les mostres es realitza una recta patró per duplicat directament a la placa: s'inicia amb una concentració de 2000 pg/ml i es fan 6 dilucions seriades 1/2 amb tampó de dilució fins a una concentració mínima de 31,2 pg/ml.

El protocol seguit per l'ELISA és el següent:

- 1- Adsorció en una placa MaxiSorp (Nunc 442404, Labclínic, Barcelona) de l'anticòs de captura a una concentració de 2 μ g/ml. Es posen 100 μ l/pou de l'anticòs diluït 180 vegades en PBS 1x. Al blanc es posa 100 μ l/pou de PBS 1x. Es deixa incubar a temperatura ambient durant tota la nit.
- 2- Es renten els pous dues vegades amb 300 μ l/pou de PBS 0.05% Tween₂₀.

- 3- Es bloqueja la placa amb 300 µl/pou de tampó de bloqueig - Tween₂₀ 5%, NaN₃ 0,05% (Ref. 142712, Panreac, Espanya), en PBS - i es deixa incubant a temperatura ambient durant 1 h.
- 4- Es renta 3 vegades la placa amb 300 µl/pou de PBS 0.05% Tween₂₀.
- 5- Es carrega la recta patró per duplicat a la placa en un volum final de 100 µl/pou. S'afegeixen també per duplicat 100 µg/pou de les diferents mostres a les que prèviament s'ha activat el TGF-β. Es deixa incubant a 37°C dins una cambra humida durant 1 h .
- 6- Es renta la placa com en el punt 4.
- 7- S'incuba amb 100 µl/pou de l'anticòs secundari a una concentració de 300 ng/ml (dilució 1/180 de l'anticòs en tampó de dilució). S'incuba a 37°C en una cambra humida i evitant la llum durant 1 h.
- 8- Es renta la placa com en el punt 4.
- 9- S'afegeixen 100 µl/pou d'estreptavidina conjugada a peroxidasa subministrada en el DuoSet comercial (ref. DY240, R&D Systems) en una dilució 1/200 en tampó de dilució i es deixa a les fosques i a temperatura ambient durant 20 min.
- 10- Es renta com en el punt 4.
- 11- Es prepara el substrat Fast OPD (P 9187, Sigma, Barcelona Espanya). En el moment de revelar es desfà una pastilla de o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) i una d'urea i peròxid d'hidrogen en 20 ml d'aigua milliQ. S'afegeixen 200 µl/pou i es deixa reaccionar a temperatura ambient 30 min sense que hi toqui la llum. La reacció s'atura amb 50 µl/pou d'H₂SO₄ 2M (Ref. 410306, Erba Reagent, Barcelona, Espanya).
- 12- Es llegeix l'absorbància a 492 nm en un lector de plaques Victor³ (PerkinElmer,)

4.2.3. Anàlisi del contingut de GAGs i citocines en el PRP

L'obtenció de concentrats de plaquetes en aquest estudi es realitza perquè es volen utilitzar in vitro sobre condrocits en cultiu tractats amb LPS o amb H₂O₂ per tal d'avaluar-ne els efectes sobre la capacitat de síntesi de GAGs i de citocines principalment. És necessari doncs, caracteritzar els PRPs que s'afegiran al cultiu per tal de tenir el control dels nivells de GAGs i citocines inflammatòries/antiinflammatòries que s'afegeixen de forma exògena amb l'aplicació del PRP al cultiu.

a) Determinació de la concentració de GAGs

Per a la determinació de la concentració de GAGs en els sobrenadants dels cultius, s'ha realitzat l'assaig colorimètric amb Dimethylmethylen blue (DMMB). Aquest assaig es basa en la reacció entre la molècula colorant i la molècula de GAGs sulfatats (polianions) que produeix una única espècie metacromàtica per la pertorbació iònica del cromòfor. La complexació DMMB/GAG provoca un canvi en les propietats d'absorció del dimethylmethylen blue respecte quan la molècula colorant es troba lliure ($\lambda_{\max}=649\text{nm}$) (font: Sigma-Aldrich, Barcelona, Espanya).

En la posta a punt de la tècnica s'ha adaptat el protocol descrit per de Jong et al. [116] per a realitzar l'anàlisi en placa de 96 pous. D'aquesta manera es requereix menys volum de mostra i es poden analitzar més sobrenadants en un mateix assaig. També s'ha estandaritzat el temps de lectura de l'absorbància del complex DMMB/GAG, ja que un punt dèbil d'aquesta tècnica és la inestabilitat del complex DMMB/GAG [117].

Per a l'assaig quantitatiu s'ha seguit els següent protocol:

- 1- Es prepara la recta patró a partir d'una dilució 1/10 de l'estoc de condroitin sulfat (Ref. C4384-1G, Sigma-Aldrich, Barcelona, Espanya) (1 mg/ml). Per a realitzar la recta patró es fa una primera dilució 1/10 de l'estoc de condroitin sulfat (1 mg/ml) en medi de cultiu (500 μl estoc + 4,5 ml de medi) i es realitza un banc de dilucions tal com s'indica a la Taula 5.
- 2- Es descongelen els sobrenadants i es barregen bé.
- 3- En una placa de 96 pous sense tractar (Ref: 260836, Nunc, Labclinics, S.A., Barcelona, Espanya) es carreguen per duplicat 50 μl /pou dels estàndards i de les diferents mostres a analitzar.
- 4- S'afegeixen 200 μl /pou de la solució de DMMB - 11 mg DMMB (Ref. 341088, Sigma, Barcelona, Espanya) en 1 L sodi acetat 0,05 mM, pH 4,74 (Ref. 71190, Sigma-Aldrich, Barcelona, Espanya) -.
- 5- Després de 5 min es mesura l'absorbància a $\lambda=531\text{ nm}$ en un lector de plaques (Victor³, PerkinElmer).

Taula 5. Banc de dilucions per a la realització de la recta patró per a la quantificació de GAGs en sobrenadant de cultiu mitjançant la tècnica del DMMB.

[C-4-SO₄] (µg/mL)	Volum medi (ml)	Volum de 0,1mg/ml C-4- SO₄ (ml)
0	2	0
2,5	1,95	0,05
5	1,9	0,1
7,5	1,85	0,15
10	1,8	0,2
15	1,7	0,3
20	1,6	0,4
30	1,4	0,6
40	1,2	0,8
50	1,0	1

Aquest mateix procediment s'utilitza per a la quantificació dels GAGs en els sobrenadants dels cultius tal com es descriurà més endavant.

b) Quantificació de IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β i IL-8.

La determinació d'IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β , IL-8 en els sobrenadants s'ha realitzat per citometria de flux mitjançant l'assaig comercial Human Inflammation Cytometric Bead Array (CBA) System (Ref. 551811, BD Biosciences, San Diego, CA). Aquest sistema permet la quantificació de les diferents citocines en poc volum d'una mateixa mostra a partir d'estàndards de concentració coneguda.

Es barregen 25 µl del sobrenadant (o dels estàndards facilitats per la casa comercial) amb 25 µl de la barreja d'anticossos conjugats a les boles (beads) i 25 µl del reactiu de detecció (barreja d'anticossos específics per a cada citoquina conjugats a PE). Es deixa incubar la barreja, protegida de la llum, a temperatura ambient durant 3 h. Passat el temps d'incubació es fa un rentat de les mostres amb tampó de rentat i es resuspenen amb 300 µl d'aquest mateix tampó per a ser analitzades en un citòmetre de flux

FACScalibur® (BD Biosciences). Els resultats s'analitzen mitjançant el programa informàtic CBA (BD PharMingen).

Aquest mateix procediment també s'utilitza per a la quantificació de citocines en els sobrenadants dels cultius tal com es descriurà més endavant.

5. DISSENY EXPERIMENTAL. TRACTAMENT DELS CONDRÒCITS

5.1. Establiment del model in vitro de dany cel·lular: estimulació amb LPS i oxidació amb H₂O₂ del cultiu

Per a avaluar l'efecte dels concentrats de plaquetes en la inflamació i regeneració articular s'estableix un model in vitro que simuli un estat danyat dels condrocits. D'una banda, s'estableix un model on s'activa la resposta "inflamatòria" via els receptors TLR (de l'anglès toll-like receptors) per l'activació dels condrocits amb LPS (lipopolisacàrid de la membrana externa dels bacteris gram negatius); d'una altra, s'estableix un model d'un estat oxidatiu mitjançant el tractament dels condrocits amb H₂O₂.

Per a l'establiment dels diferents models de dany cel·lular cal determinar les condicions de concentració i temps d'incubació del LPS i H₂O₂, que no siguin citotòxiques per als condrocits en cultiu. La citotoxicitat cel·lular s'ha avaluat mitjançant la determinació de l'activitat mitocondrial dels condrocits. Es considera que l'efecte citotòxic implica una disminució de l'activitat mitocondrial, factor que en el nostre cas es determina mitjançant l'assaig MTT. Per a l'estandardització de les condicions de treball utilitzem diferents cultius cel·lulars, en passe 2, sembrats en placa de 96 pous (Ref. 167008, Nunc, Labclínics, Barcelona, Espanya) a una densitat de 20.000 cèl·lules/pou. L'experiment es realitza sempre entre el 3r i 5è dia després de la sembra, quan en el microscopi s'observen les cèl·lules adherides al plàstic i amb un recobriment homogeni en tots els pous.

5.1.1. Determinació de la citotoxicitat del LPS i de l'H₂O₂ sobre cultiu primari de condrocits

Per a determinar la citotoxicitat del LPS i de l'H₂O₂ es segueixen els següents protocols:

LPS	H ₂ O ₂
1- Per a l'estímul del cultiu amb LPS es prepara medi de cultiu complet (DMEM:F12, 10% FCS, 0,05 mg/ml d'àcid ascòrbic, 1% d'antibiòtics) amb 10, 50, 80 i 100 µg/ml de LPS d' <i>Escherichia coli</i> (0111:B4, Sigma, Barcelona, Espanya) a partir d'un estoc de 1000 µg/ml LPS.	1- Per a l'oxidació del cultiu amb H ₂ O ₂ es prepara medi de cultiu complet (DMEM:F12, 10% FCS, 0,05 mg/ml d'àcid ascòrbic, 1% d'antibiòtics) amb 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 4, 5 o 10 mM H ₂ O ₂ a partir d'un estoc d' H ₂ O ₂ 100 mM (Ref. 141076, Panreac, Barcelona, Espanya). L'estoc s'esterilitza prèviament al seu ús per filtració en filtre de 0,22 µm.
2- S'elimina el sobrenadant del cultiu tenint en compte no malmetre el fons cel·lular i es renta amb 200 µl/pou amb PBS temperat a 37°C.	
3- S'afegeixen per quintuplicat 100 µl/pou de cada concentració de LPS o H ₂ O ₂ . Als pous buits s'hi posen 200 µl de PBS per a evitar l'evaporació dels pous cultivats	
4- S'incuba la placa a 37°C durant 24 h en un incubador 5% CO ₂ .	
5- Es recullen els sobrenadants i es congelen a -20°C per al seu posterior anàlisi.	
6- Es determina l'activitat mitocondrial dels condrocits mitjançant l'assaig MTT tal com es descriu a continuació.	

ASSAIG MTT PER A AVALUAR L'ACTIVITAT MITOCONDRIAL DELS CONDRÒCITS:

Aquest mètode es basa en la capacitat de les cèl·lules viables per a metabolitzar la sal de tetrazoli (o MTT) mitjançant l'enzim mitocondrial succinat deshidrogenasa. Aquest enzim catalitza la conversió del MTT a un formazan intracel·lular de color

púrpura, insoluble en H₂O. La mesura de l'absorbància obtinguda és directament proporcional al nombre de cèl·lules vives que són metabòlicament actives.

Per a avaluar l'activitat mitocondrial mitjançant l'assaig MTT s'ha seguit el següent protocol:

- 1- Després d'haver recollit els sobrenadants del cultiu, es realitzen 2 o 3 rentats amb 200 µl/pou PBS tenint cura de no malmetre la capa cel·lular.
- 2- S'afegeixen a cada pou 100 µl de medi DMEM:F12 0,5 mg/ml de MTT (Ref. M2128- 1G, Sigma-Aldrich, Barcelona, Espanya).
- 3- Es deixa a l'incubador a 37°C durant 3 h.
- 4- S'elimina el sobrenadant i s'afegeixen 100 µl/pou de dimetilsulfòxid (DMSO) (Ref. D2650, Sigma-Aldrich, Barcelona, Espanya). Es colpeja lateralment la placa per a facilitar la resuspensió del formazan.
- 5- Després de 10 min, quan la resuspensió del formazan ja és completa, es llegeix la placa en el lector de plaques Victor³ (PerkinElmer) a 492 nm. Es consideren citotòxiques condicions de treball que generin activitats mitocondrials inferiors al 80% de l'activitat mitocondrial dels condrocits control. Per tant, per a establir els models in vitro s'escullen aquelles concentracions de LPS o H₂O₂ i temps d'incubació que mantinguin, com a mínim, el 80% de l'activitat mitocondrial dels condrocits en cultiu.

5.1.2. Determinació del temps de tractament amb LPS i amb H₂O₂ per l'establiment del model de dany cel·lular

Una vegada s'ha escollit una concentració de treball per a LPS i H₂O₂ i per tal de determinar l'efecte del LPS i de l'H₂O₂ al llarg del temps se segueix el següent protocol:

LPS	H ₂ O ₂
1- Es prepara medi complet amb 100 µg/ml LPS	1- Es prepara medi complet amb 1 mM H ₂ O ₂ .
2- S'elimina el sobrenadant del cultiu vigilant no malmetre el fons cel·lular i es renta amb 200 µl/pou amb PBS temperat a 37°C.	
3- S'afegeixen 100 µl/pou del medi amb LPS així com de medi complet per als controls.	3- S'afegeixen 100 µl/pou del medi amb H ₂ O ₂ , així com de medi complet per als controls.
4- S'incuba la placa a 37°C i 5% CO ₂ .	
5- A les 2 h d'incubació es recull el sobrenadant de 5 pous del cultiu estimulat amb LPS i també de pous de cultiu sense estimular (control) i es guarda a -20°C fins al seu posterior anàlisi.	5- A les 2 h d'incubació es recull el sobrenadant de 5 pous del cultiu estimulat amb H ₂ O ₂ , i també de pous de cultiu sense estimular (control) i es guarda a -20°C fins al seu posterior anàlisi.
6- S'afegeixen en els pous on s'ha recollit el sobrenadant en el punt 5, 100 µl/pou de medi complet. La placa s'incuba a 37°C.	
7- Es realitza el mateix procediment que en el punt 5 a les 4, 6, 8, 12, 24, 48 i 72 h d'incubació dels cultius amb LPS	7- Es realitza el mateix procediment que en el punt 5 a les 4, 6, 8, 12, 24, 48 i 72 h d'incubació dels cultius amb H ₂ O ₂ .

5.2. Activitat sintètica dels condrocits en cultiu tractats amb LPS o amb H₂O₂.

Per a establir els diferents models in vitro de dany articular s'ha avaluat l'activitat sintètica dels condrocits en les condicions d'estímul amb LPS i d'oxidació amb H₂O₂. És necessari descriure l'activitat sintètica de matriu extracel·lular i el perfil de citocines inflammatòries/antiinflamatòries en els diferents models per a poder avaluar després l'efecte que hi provoca l'addició de plasma ric en plaquetes en els cultius.

L'activitat sintètica de matriu extracel·lular s'ha avaluat mitjançant la determinació de la concentració de GAGs en els sobrenadants dels cultius estimulats amb 25, 50 i 100

$\mu\text{g/ml}$ LPS i dels cultius oxidats amb 0,5 i 1 mM H_2O_2 durant 24 h. També en els sobrenadants del cultiu estimulats 2, 4, 6, 8, 12 i 24, 48 i 72 h amb LPS (apartat 5.1.2) i 2, 4, 6, 8, 12 i 24 h amb H_2O_2 . S'ha determinat també en cultius de condrocits sense estimular (control). En tots els casos la determinació de GAGs s'ha realitzat mitjançant assaig colorimètric dimethylmethylene blue (DMMB) tal com es descriu a l'apartat 4.2.3.a .

El perfil de citocines inflamatòries/antiinflamatòries s'ha avaluat mitjançant la quantificació de d'IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β i IL-8 en els sobrenadants anteriorment esmentats mitjançant citometria de flux (tècnica CBA). El protocol utilitzat es descriu a l'apartat 4.2.3.b. S'ha quantificat també el factor de creixement TGF- β que sintetitzen els condrocits tant en condicions de dany (estímul amb LPS i oxidació amb H_2O_2), com en condicions control, ja que és un factor de creixement amb capacitats reguladores importants i que posteriorment s'incorporarà de forma exògena amb l'addició als cultius de PRP. La quantificació de TGF- β en els sobrenadants s'ha realitzat mitjançant ELISA, seguint el protocol descrit a l'apartat 5.3.3.

5.3. Avaluació de l'efecte del PRP en condrocits tractats amb LPS o H_2O_2 .

Els PRP amb els que es tracten els cultius de condrocits s'activen amb 45 mM CaCl_2 . Prèviament a la incubació dels cultius amb PRP, s'ha volgut determinar si el CaCl_2 té algun efecte sobre els condrocits que pugui interferir en els resultats del nostre estudi. Amb aquest objectiu s'han avaluat els efectes citotòxics del CaCl_2 determinant, mitjançant assaig MTT, l'activitat mitocondrial dels condrocits en cultiu després d'haver estat incubats durant 24 h amb diferents concentracions de CaCl_2 . També s'ha valorat si el CaCl_2 té algun efecte sobre la capacitat de síntesi de TGF- β en condrocits en cultiu determinant, mitjançant ELISA, la concentració de TGF- β en els diferents sobrenadants.

- 1- En placa de 24 pous se sembren condrocits a una densitat de 80.000 cèl·lules/pou.
- 2- Al cap de 5 dies, s'eliminen els sobrenadants vigilant de no malmetre el fons cel·lular i s'afegeix, per duplicat, 1 ml/pou de medi complet amb 100, 50, 25,

12,5 o 6,25 mM CaCl₂. Dos pous, en els quals s'hi afegeix medi de cultiu complet sense CaCl₂, es reserven per als controls.

- 3- S'incuba el cultiu a 37°C durant 24 h en un incubador 5% CO₂.
- 4- Es recullen els sobrenadants vigilant no malmetre el fons cel·lular i es guarden a -20°C pel posterior anàlisi de la concentració de TGF-β mitjançant ELISA (tal com es descriu en l'apartat 5.3.3).
- 5- Es renta el cultiu amb 2 ml/pou de PBS vigilant no danyar les cèl·lules i immediatament es determina la seva activitat mitocondrial mitjançant l'assaig MTT, tal com es descriu en l'apartat 5.1.1.

Una vegada s'han establert els models in vitro de dany articular, concentració de l'estímul i temps d'incubació, s'avalua l'efecte dels concentrats de plaquetes sobre condrocits en un context de "salut", és a dir, sense estímul, i en els contextos de dany establerts amb estímul de LPS i amb oxidació amb H₂O₂.

LPS	H₂O₂
1- En cultius sembrats en placa de 24 pous, sense estimular i estimulats amb LPS tal com es descriu en els apartats anteriors, s'afegeix per duplicat 0,5 ml/pou de medi complet (control) o 0,5 ml/pou de medi complet 25% o 50% PRP	1- En cultius sembrats en placa de 24 pous, sense estimular i estimulats amb H ₂ O ₂ tal com es descriu en els apartats anteriors, s'afegeix per duplicat 0,5 ml/pou de medi complet (control) o 0,5 ml/pou de medi complet 25% o 50% PRP
2- La placa s'incuba a 37°C i 5% CO ₂ durant 24 h.	
3- Es recullen els sobrenadants i es guarden a -20°C fins el seu posterior anàlisi.	

Per a poder determinar que els efectes observats sobre l'activitat sintètica de GAGs i en el perfil de citocines siguin provocats pel PRP i no per l'absència de l'estímul, es realitza un assaig incubant el cultiu amb LPS i PRP simultàniament:

- 1- Es sembra en placa de 24 pous condrocits amb una densitat de 80.000 cèl·lules/pou.
- 2- Passats 5 dies després de la seva sembra s'elimina el sobrenadant i s'afegeix 0,5 ml/pou de medi amb 100 µg/ml LPS i 25% o 50% de PRP.
- 3- S'incuba el cultiu a 37°C durant 24 h.

- 4- Es recullen els sobrenadants i es guarden a -20°C fins el seu posterior anàlisi de GAGs i citocines.

5.3.1. Determinació de la concentració de GAGs en sobrenadant de cultiu.

Per a la determinació de la concentració de GAGs en els sobrenadants dels cultius s'ha realitzat l'assaig colorimètric amb Dimethylmethylen blue (DMMB) descrit amb anterioritat a l'apartat 4.2.3.a.

5.3.2. Quantificació de IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β i IL-8 en sobrenadant de cultiu.

La quantificació de IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β i IL-8 en els sobrenadants dels cultius procedents dels diferents experiments s'ha realitzat mitjançant citometria de flux tal com es descriu en l'apartat 4.2.3.b.

5.3.3. Quantificació de TGF- β en sobrenadant de cultiu.

La quantificació del TGF- β 1 dels sobrenadants de cultiu s'ha realitzat mitjançant el mateix ELISA descrit en l'apartat 4.2.2.b. L'activació del TGF- β present en sobrenadant de cultiu cel·lular requereix d'un protocol lleugerament diferent al recomanat per la quantificació de TGF- β en mostres de plasma. En sobrenadants l'activació del TGF- β es realitza de la següent manera:

- 1- S'afegeixen 50 μ l de solució d'àcid clorhídric 1 M (Ref. 131020, Panreac, Barcelona, Espanya) en 250 μ l de sobrenadant de cultiu i es barreja bé.
- 2- La barreja s'incuba a temperatura ambient durant 10 min.
- 3- Es neutralitza el pH de la mostra afegint-hi 50 μ l de solució NaOH 1,2 N/ HEPES 0,5 M.

En el cas de mostres de sobrenadant de cultiu, a diferència de les de plasma, no es dilueixen amb tampó de dilució per a poder ser quantificades.

RESULTATS

6. OBTENCIÓ DE MOSTRES I REALITZACIÓ DE CULTIU PRIMARI DE CONDRÒCITS.

Per avaluar in vitro l'efecte dels concentrats de plaquetes sobre un entorn d'agressió articular s'estableixen dos models cel·lulars: 1) d'estímul amb LPS i 2) un model d'oxidació. Ambdós models cel·lulars in vitro es realitzen amb cultius primaris de condrocits humans.

Els cultius primaris s'han realitzat a partir de condrocits provinents de biòpsies de cartílag articular. Per determinar si per a aquests models a estudiar era indistint treballar amb condrocits congelats o amb condrocits frescos provinents de biòpsies disgregades al laboratori, s'ha avaluat, mitjançant l'anàlisi de diferents paràmetres, el comportament de condrocits en cultiu que havien estat prèviament congelats i de condrocits frescos.

6.1. Realització del cultiu primari a partir de biòpsia de cartílag articular

Per a la realització dels cultius primaris s'han obtingut biòpsies de cartílag articular de ròtula i de còndil lateral de fèmur, procedents d'homes i dones d'edats compreses entre 71 i 90 anys. Les biòpsies s'han digerit mecànicament en trossos d'aproximadament d'1 mm³, s'han digerit enzimàticament per l'obtenció dels condrocits i després de determinar la vitalitat dels condrocits obtinguts mitjançant recompte cel·lular amb blau de tripà, s'han sembrat en flascons de cultiu.

La quantitat de cèl·lules obtingudes del teixit és un factor limitant a l'hora de realitzar un cultiu primari i condiciona el disseny dels assajos posteriors. Per aquest motiu s'ha optimitzat les condicions de la digestió enzimàtica per tal d'obtenir el màxim rendiment d'obtenció de condrocits a partir de les biòpsies de cartílag. En l'optimització de les condicions de la digestió enzimàtica s'han valorat els següents paràmetres:

- Tipus de col·lagenasa
- Concentració de col·lagenasa
- Temps d'incubació amb col·lagenasa
- Digestió enzimàtica seqüencial amb hialuronidasa, pronasa, col·lagenasa

La valoració de les diferents condicions s'ha realitzat en funció del rendiment i vitalitat aconseguits en l'obtenció de condrocits. El rendiment s'ha definit com nº de cèl·lules/g de cartílag; i la vitalitat, com el percentatge de cèl·lules vives respecte les cèl·lules totals (cèl·lules vives/cèl·lules totals)x100).

6.1.1. Col·lagenasa: Tipus, concentració i temps d'incubació.

Per a dur a terme la digestió enzimàtica s'han testat col·lagenasa D (Ref. 11088858001, Roche, Espanya) i col·lagenasa II (Ref. 17101, Gibco, Invitrogen, Espanya). Per a escollir quina de les dues és més adient per a obtenir condrocits del cartílag articular s'han realitzat digestions del teixit amb diferents concentracions de col·lagenasa (0,3, 1 i 3 mg/ml) durant 4 h o durant tota la nit.

Amb totes les concentracions de col·lagenasa assajades, quan les digestions es realitzaven durant tota la nit s'obtenia més cèl·lules que en les digestions de 4 h. Es va observar, però, que per un mateix temps, entre 1 i 3 mg/ml de col·lagenasa, la concentració més elevada no sempre suposava un rendiment més alt. Amb la concentració 0,3 mg/ml pràcticament no s'obtenien cèl·lules.

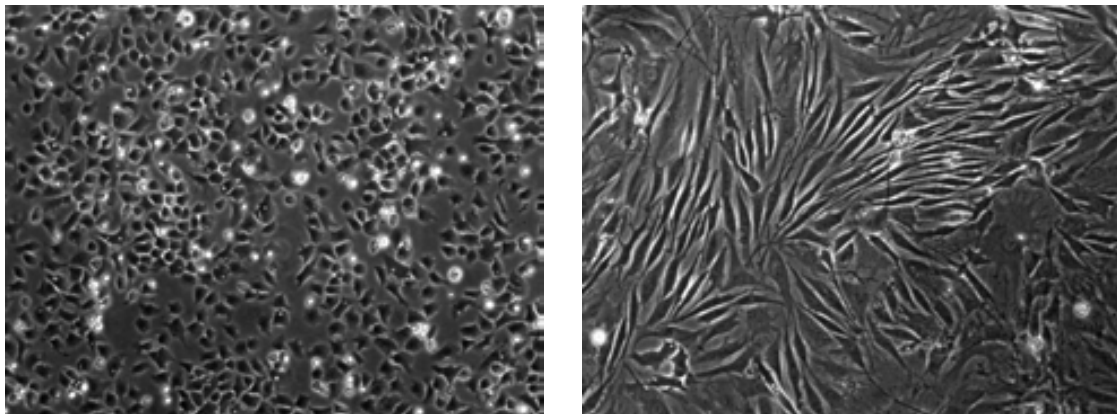
En valorar la vitalitat dels condrocits no es va observar una relació entre la vitalitat i la concentració de col·lagenasa utilitzada. En les diferents digestions es van obtenir vitalitats del 75% al 98% i en canvi, sí es va observar que en el nostre cas les vitalitats més baixes coincidien amb l'ús de la col·lagenasa D de Roche. Per aquest motiu es va escollir la col·lagenasa II per seguir els assaigs.

6.1.2. Digestió enzimàtica seqüencial: hialuronidasa, pronasa, col·lagenasa.

Tenint en compte que el cartílag el compona tota una estructura entrelaçada de molècules estructurals com l'àcid hialurònic, el col·lagen tipus II i altres proteïnes d'unió que envolten als condrocits, s'ha realitzat una digestió enzimàtica seqüencial amb hialuronidasa 0,5 mg/ml, pronasa 1 mg/ml i col·lagenasa II 0,5 mg/ml a fi de millorar el rendiment de l'obtenció de condrocits a partir de les biòpsies de cartílag. Mitjançant la digestió enzimàtica seqüencial s'han obtinguts rendiments del $0,52 \times 10^6$ - $3,44 \times 10^6$ cèl·lules/g de cartílag.

Per tal de poder escollir a priori les biòpsies més adients per a la realització de cultius primaris, es va valorar si el sexe i/o l'edat es relacionaven amb un millor o pitjor rendiment en l'obtenció de condrocits a partir de cartílag articular. Valorant 13 biòpsies, el 38,5% procedents d'homes i el 61,5% de dones, en una franja d'edat de 71-90 anys, es va observar que ni el sexe, ni l'edat estan relacionades amb un millor o pitjor rendiment en l'obtenció de condrocits (aquestes dades no es mostren). Per tant, en obtenir una biòpsia, no es descartava a priori cap mostra. En finalitzar la disgregació, es descartaven per a la realització dels experiments, aquelles mostres amb un rendiment inferior a 1×10^6 cèl·lules/g de cartílag, concretament, 2 de 13 mostres digerides.

Els condrocits, quan s'adhereixen al plàstic de la placa, o del flascó de cultius, perden la seva morfologia esfèrica característica i com que no es troben en el seu entorn cartilaginós es desdiferencien amb molta facilitat i acaben adquirint en pocs dies un fenotip semblant als fibroblasts (Figura 17.b).



a.
Figura 17. Morfologia cel·lular del cultiu primari de condrocits en funció dels passes i dies de cultiu. (a) Cultiu en passe 1, al segon dia després de la sembra: morfologia de condrocits (x20); (b) Cultiu en passe 2, al desè dia després de la sembra, morfologia de fibroblast (x20).

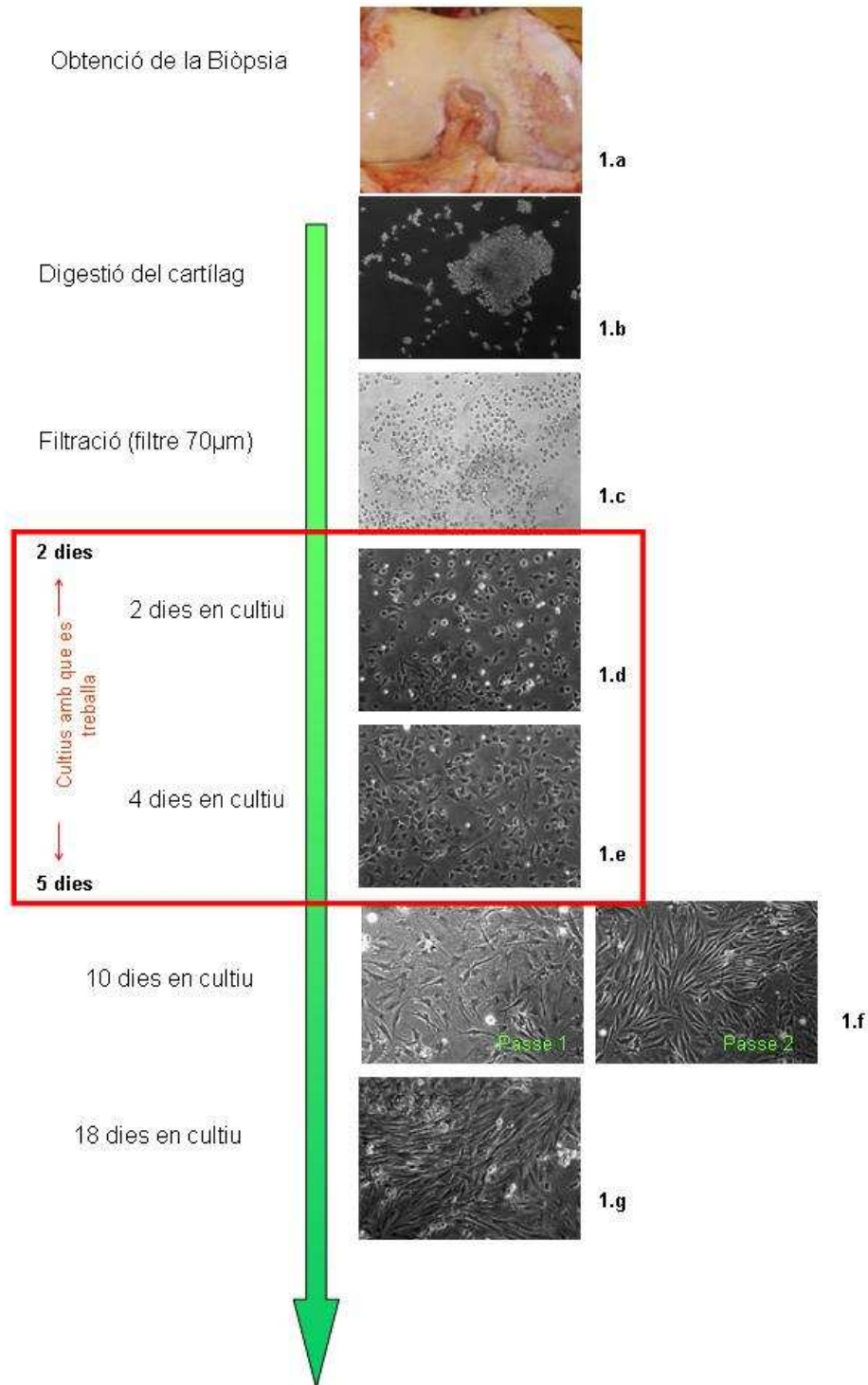


Figura 18. Procés de realització de cultiu primari de condrocits per a l'establiment d'un model in vitro de dany articular. Esquema del protocol seguit per a la realització de cultiu primari de condrocits a partir de cartílag articular humà: (1.a) Obtenció de biòpsia de genoll; (1.b) final del procés de digestió del cartílag, després d'haver-se realitzat una digestió mecànica i una digestió enzimàtica seqüencial amb hialuronidasa, pronasa i col-lagenasa II; (1.c) eliminació de les restes de la digestió i obtenció dels condrocits per filtració en una malla de 70 µm; (1.d i 1.e) cultiu primari de condrocits als 2 i 4 dies de la seva sembra; (1.f) cultiu primari de condrocits als 10 dies de la seva sembra, en passe 1 i passe 2; (1.g) cultiu primari de condrocits als 18 dies de la sembra. Per a l'establiment del model in vitro de dany articular només s'han utilitzat cultius entre els 2 i 5 dies de la seva sembra.

S'ha seguit l'evolució de la morfologia dels condrocits en cultiu al llarg del temps i en diferents passes. Tal com es mostra a la Figura 18, entre els 2 i 4 dies de cultiu els condrocits adherits al plàstic adquireixen una morfologia pentagonal i de mica en mica van desenvolupant prolongacions filamentoses. A mesura que augmenten els passes i dies de cultiu, la morfologia de les cèl·lules es torna més estirada, tal com es mostra a la Figura 17. En aquest punt es considera que s'ha perdut el fenotip de condrocit.

Per tal d'estar segurs que totes les cèl·lules en cultiu mantenen el fenotip de condrocit, tots els experiments s'han realitzat entre els 2 i 5 dies després de la sembra i mai després del 2n o 3r passe.

6.2. Realització del cultiu primari a partir de condrocits congelats.

Part d'aquest treball s'ha realitzat a partir de mostres de condrocits congelats procedents de cartílag articular de maluc (cap de fèmur) o de genoll (ròtula i còndil lateral de fèmur). Després del protocol de descongelació cel·lular, s'ha determinat la vitalitat dels condrocits realitzant un recompte cel·lular amb blau de tripà per avaluar si la congelació/descongelació afecta de forma diferencial a condrocits provinents de cartílag d'articulacions diferents.

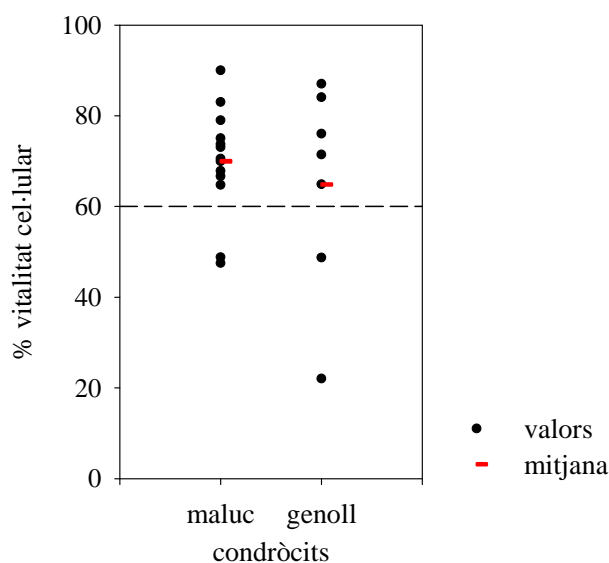


Figura 19. Anàlisi de l'efecte de la congelació en condrocits de diferent origen. Vitalitat cel·lular de condrocits de maluc i de genoll posterior a la descongelació cel·lular. La vitalitat s'expressa com a percentatge de cèl·lules vives respecte les cèl·lules totals descongelades. S'ha determinat mitjançant recompte cel·lular amb colorant vital blau de tripà. En el gràfic es mostren amb un punt els valors individuals de cada mostra ($n_{\text{maluc}}=13$, $n_{\text{genoll}}=7$) i en vermell les diferents mitjanes. Amb línia discontinua s'indica la vitalitat cel·lular mínima acceptada al descongelar condrocits per realitzar els cultius primaris en aquest treball.

RESULTATS

Tal com es mostra a la Figura 19, no s'han observat diferències significatives al descongelar condrocits provinents de cartílag de genoll (vitalitat del $64,86 \pm 22,8$ %) o cartílag de maluc (vitalitat del $69,96 \pm 11,9$ %); per tant, considerem que la congelació no afecta de forma diferencial a condrocits de diferent origen.

Dels cultius realitzats amb condrocits congelats de maluc, tot i que provenien d'unes cèl·lules que representaven un $69,96 \pm 11,9$ % de vitalitat després de la descongelació, el 7,7% dels cultius no han resultat viables. Si ens fixem en els condrocits congelats de genoll, el 28,6% dels cultius no han resultat viables. Per tant, tot i tenir percentatges de vitalitat similars després de la descongelació, els cultius de condrocits de maluc han resultat una millor font de condrocits que els provinents de condrocits de genoll congelats. Per a dur a terme aquest treball s'han descartat d'entrada totes aquelles mostres que al ser descongelades presentessin una vitalitat inferior al 60% i que a més, una vegada posades en cultiu, no resultessin en cèl·lules adherides al plàstic amb la morfologia típica dels condrocits.

Comparant els cultius viables realitzats amb condrocits de cartílag de genoll fresc o realitzats amb condrocits congelats de genoll, s'observa a la Figura 20, que el 91% dels cultius realitzats amb condrocits frescos són viables. De tots els cultius realitzats a partir dels condrocits congelats de genoll únicament persisteixen el 71%.

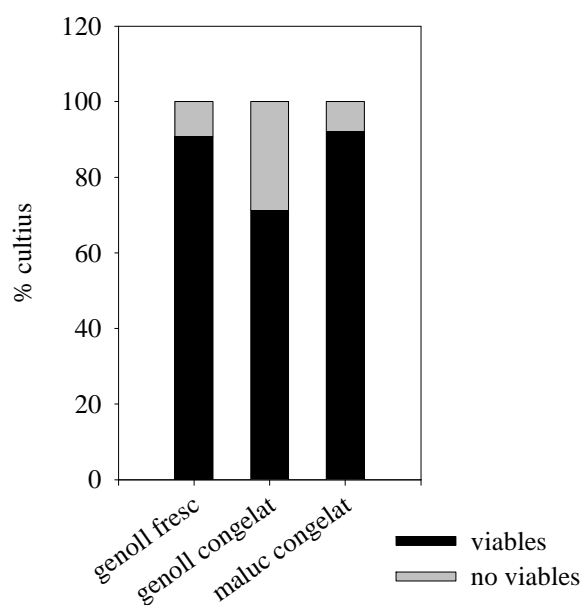


Figura 20. Anàlisi de la viabilitat dels cultius en funció del tipus de mostra. Percentatge de cultius realitzats que han estat viables (fracció negra) i dels que han resultat inviables (fracció grisa). Els cultius s'han realitzat amb condrocits frescos de genoll (n=11), amb condrocits congelats de genoll (n=7) i amb condrocits congelats de maluc (n=13).

Els paràmetres que s'han avaluat per a determinar si és indistint realitzar els cultius primaris amb condrocits frescos o condrocits que han estat congelats han estat la capacitat de síntesi de glicosaminoglicans (GAGs) i de diferents citocines (IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β , IL-8). Aquests paràmetres són els que s'estudiaran amb posterioritat per a determinar l'efecte dels PRP sobre els diferents models in vitro d'agressió articular; per tant és necessari determinar si les cèl·lules amb les que s'estableixen els models in vitro mostren un mateix comportament.

La Figura 21 mostra com la síntesi de GAGs no difereix entre condrocits frescos i condrocits congelats en cultiu. De forma semblant, tal com mostra la Figura 22, passa amb la concentració de les citocines IL-12p70, IL-10, IL-6 i IL-8 a diferència de la concentració de TNF- α i IL-1 β que sembla ser lleugerament superior, tot i no estadísticament significatiu, en els sobrenadants dels cultius provinents de cèl·lules que no han estat congelades.

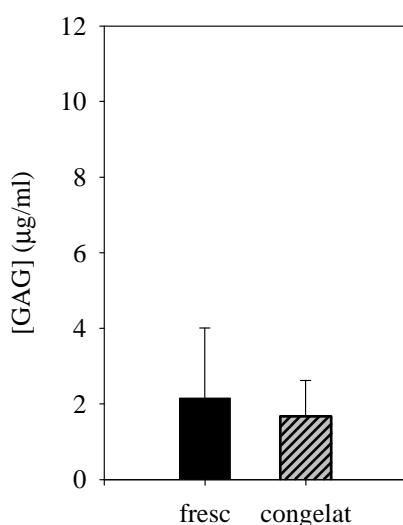


Figura 21. Efecte de la congelació de condrocits sobre la síntesi de glicosaminoglicans (GAGs). Concentració de GAGs, determinada per l'assaig DMMB, en sobrenadants de cultius realitzats amb condrocits frescos (n=10) o realitzats amb condrocits que havien estat congelats (n=10).

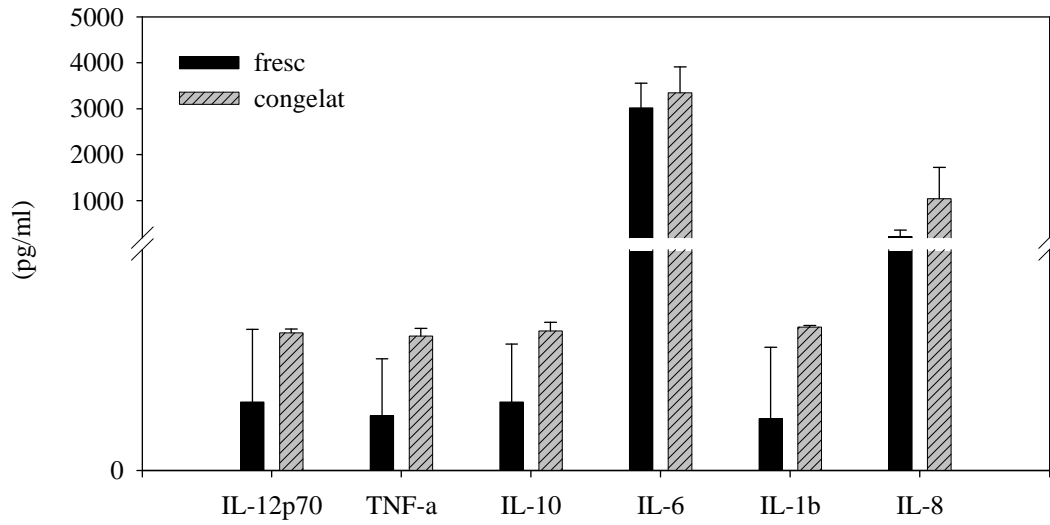


Figura 22. Efecte de la congelació de condrocits sobre la producció de citocines. Quantificació de IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β i IL-8 mitjançant assaig CBA-kit en sobrenadants de cultius realitzats amb condrocits frescos (n=5) i amb condrocits congelats (n=2).

Tenint en compte aquests resultats es va considerar que era indistint treballar amb cèl·lules congelades o no congelades, de cartílag articular de genoll o de cap de fèmur.

7. ESTABLIMENT DEL MODEL IN VITRO DE DANY CEL·LULAR: TRACTAMENT AMB LPS O AMB AGENTS OXIDANTS

7.1. Tractament de cultiu de condrocits amb LPS.

S'ha establert un model in vitro de dany articular mitjançant l'estímul de condrocits en cultiu amb LPS. El LPS és un lipopolisacàrid de la membrana externa bacteriana que activa la resposta cel·lular via receptors TLR (de l'anglès toll-like receptors). En l'establiment del model, primer s'han determinat les condicions de concentració de LPS i de temps d'incubació que no ocasionin efectes citotòxics, però que en canvi, produeixin alguna modificació metabòlica en el condrocit. Posteriorment s'ha caracteritzat el model avaluant la resposta dels condrocits a l'estímul amb LPS des del punt de vista de síntesi de citocines inflamatòries/antiinflamatòries i de molècules reguladores (TGF- β).

Els efectes citotòxics del LPS s'han avaluat mitjançant la determinació de l'activitat mitocondrial dels condrocits posterior al tractament del cultiu amb diferents concentracions de LPS i diferents temps d'incubació. L'activitat mitocondrial és un indicador de la vitalitat cel·lular i s'ha determinat mitjançant l'assaig MTT.

Per a avaluar les condicions de tractament amb LPS que provoquen algun canvi metabòlic en els condrocits s'ha determinat la concentració de glicosaminoglicans (GAGs). Una de les funcions biològiques dels condrocits és la síntesi de matriu extracel·lular i per aquest motiu s'ha escollit en aquest estudi la capacitat de síntesi de glicosaminoglicans (GAGs) com a indicador del metabolisme del condrocit.

7.1.1. Anàlisi de la citotoxicitat del LPS.

Per a l'anàlisi de la citotoxicitat del LPS sobre cultiu de condrocits, s'han incubat concentracions de 0 fins a 100 $\mu\text{g/ml}$ de LPS durant 24, 48 i 72 h i s'ha determinat l'activitat mitocondrial mitjançant assaig MTT. Els resultats s'expressen com a % de la vitalitat respecte el control: (activitat mitocondrial de les cèl·lules tractades amb LPS/activitat mitocondrial de les cèl·lules sense tractar) x 100.

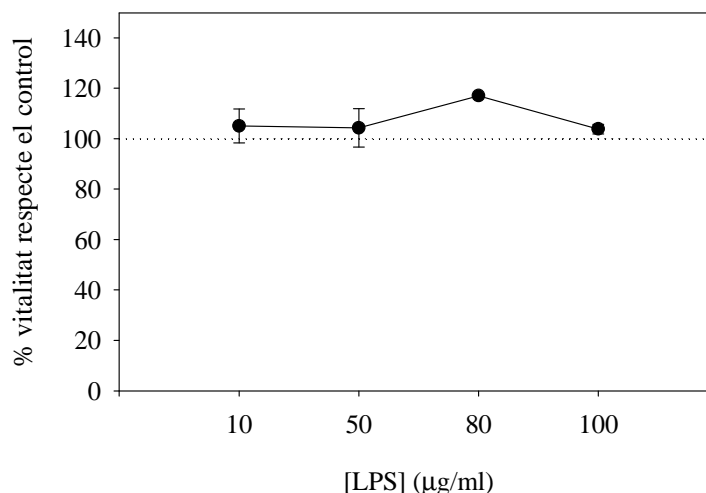


Figura 23. Anàlisi de la citotoxicitat del LPS sobre cultiu de condrocits. Valoració de l'efecte del LPS (0-100 µg/ml) sobre la vitalitat de condrocits en cultiu mesurada mitjançant l'assaig MTT després de la incubació dels cultius amb LPS durant 24 h. Els resultats s'expressen com a percentatge respecte la vitalitat dels condrocits control: (activitat mitocondrial de cèl·lules tractades amb LPS/activitat mitocondrial de cèl·lules control)x100 (n=2 experiments)

La Figura 23 mostra com de les concentracions de LPS avaluades (0-100 µg/ml) cap provoca disminució en la vitalitat dels condrocits durant 24 h d'incubació. Valorant els efectes citotòxics del LPS al llarg del temps, a la Figura 24 podem observar com la concentració de 10 µg/ml de LPS no causa disminució de l'activitat mitocondrial del cultiu de condrocits ni a les 24, ni a les 48, ni a les 72 h d'incubació. Quan el cultiu s'incuba amb 100 µg/ml, només després de 72 h d'incubació els condrocits presenten una lleugera disminució de la seva activitat mitocondrial, que representa un 78,3% de la vitalitat de les cèl·lules sense tractar. S'ha determinat també l'efecte del LPS (100 µg/ml) a temps inferiors a 24 h, però en cap cas s'han observat efectes citotòxics. (Aquestes dades no es mostren en els gràfics).

Per tant, segons aquests resultats, el LPS en les condicions estudiades, no és citotòxic pels condrocits.

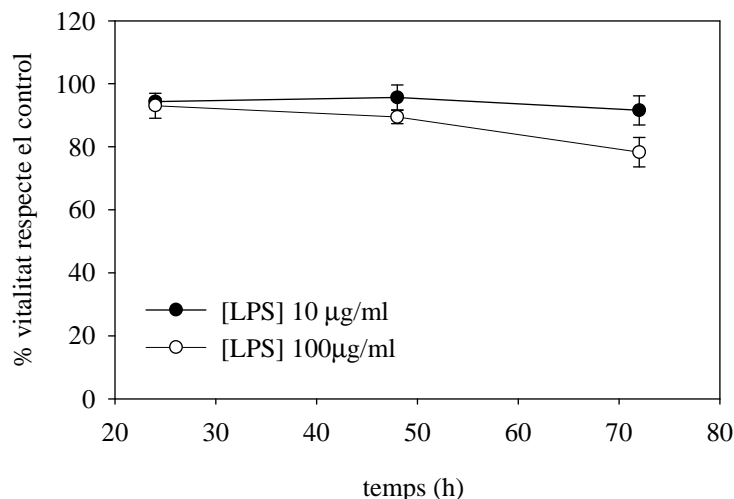


Figura 24. Anàlisi de la citotoxicitat del LPS al llarg del temps. Valoració de l'efecte del LPS (10 i 100 µg/ml) durant 24, 48 i 72 h d'incubació sobre la vitalitat de condrocits en cultiu mesurada mitjançant l'assaig MTT. Els resultats s'expressen com a percentatge de vitalitat respecte el control: (activitat mitocondrial de condrocits tractats amb LPS/activitat mitocondrial de condrocits control)x100. (n=2)

7.1.2. Avaluació dels efectes del LPS sobre l'activitat metabòlica dels condrocits

Per a avaluar les condicions de tractament amb LPS que provoquen algun canvi metabòlic en els condrocits, s'han incubat cultius amb diferents concentracions de LPS (25, 50 i 100 µg/ml) i s'ha quantificat la concentració de GAGs en el sobrenadant cel·lular per l'assaig DMMB a les 24 h postincubació. S'ha valorat també la resposta dels condrocits a l'estímul de LPS al llarg del temps.

Els resultats de la concentració de GAGs en els sobrenadants de cultius tractats amb diferents concentracions de LPS s'expressen com a increment de la concentració respecte la síntesi de GAGs en els cultius control: (concentració de GAGs en el cultiu tractat amb LPS/concentració de GAGs en cultiu sense tractar). Tal com es mostra a la Figura 25, el LPS no causa una pèrdua de capacitat dels condrocits a secretar GAGs. Al contrari, els resultats mostren un augment dosi dependent en la concentració de GAGs en el sobrenadant. Amb un estímul de 50 µg/ml LPS durant 24 h es pot doblar la concentració de GAGs en el sobrenadant mentre que amb 100 µg/ml LPS la mitjana de l'increment arriba fins a les 8 vegades respecte el control.

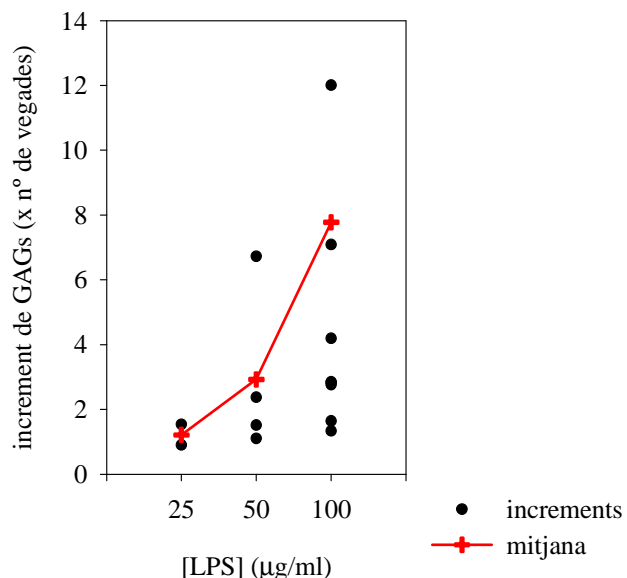


Figura 25. Efecte del LPS sobre l'activitat metabòlica dels condrocits.

L'activitat metabòlica dels condrocits s'ha mesurat mitjançant la determinació de glicosaminoglicans (GAGs) en els sobrenadants de cultius tractats amb LPS (25, 50 i 100 µg/ml) durant 24 h mitjançant l'assaig DMMB i s'expressa com a increment respecte el control: (concentració de GAGs en sobrenadants de cultius tractats amb LPS/concentració de GAG en sobrenadants de cultius control). Es mostra els valors individuals de cada assaig (negre) i les mitjanes de cada grup (vermell).

Valorant la síntesi de GAGs al llarg del temps, s'observa a la Figura 26 que en les cèl·lules control els nivells de GAGs en el sobrenadant no són quantificables fins a les 12 h de cultiu, mentre que a les cèl·lules tractades amb LPS ja es detecten GAGs a les 2 h de cultiu. D'aquesta manera es pot veure com el tractament amb LPS provoca al cultiu una acceleració en la síntesi de GAGs. L'increment de la concentració de GAGs que ja s'observa a les 2 h d'incubació del cultiu amb 100 µg/ml de LPS es manté amb una concentració superior al control durant les 24, 48 i 72 h d'estímul (LPS) present en el medi. A les 24 i 48 h de cultiu és quan s'observen més diferències entre la concentració de GAGs entre les cèl·lules tractades amb LPS i les cèl·lules control, diferència que a les 72 h és menys significativa.

S'ha estimulat el cultiu de condrocits amb 10 µg/ml de LPS durant 24, 48 i 72 h i els condrocits han mostrat un comportament molt similar als condrocits control. (Aquestes dades no es mostren als gràfics)

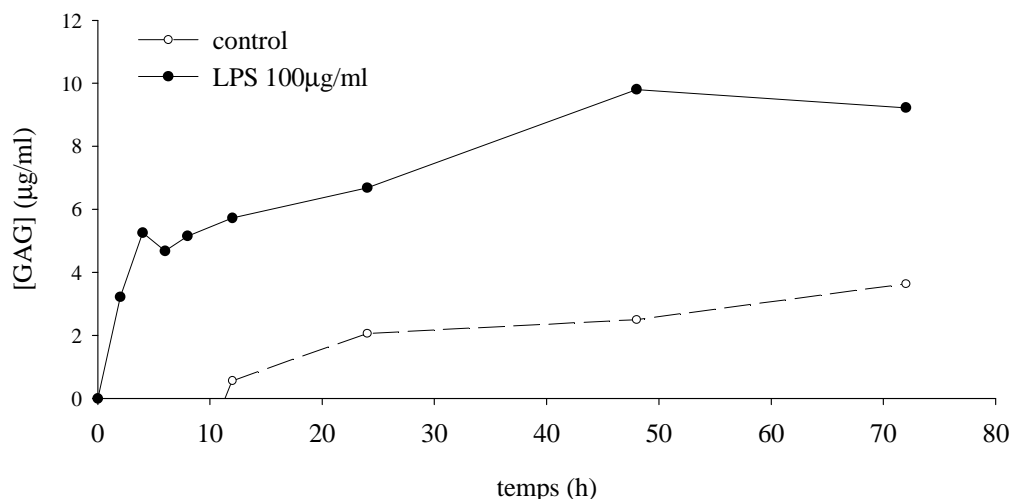


Figura 26. Efecte del LPS sobre la síntesi de glicosaminoglicans (GAGs) al llarg del temps. Anàlisi de la concentració de GAGs en sobrenadants de cultiu tractats amb LPS (100 µg/ml) durant 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 i 72 h (línia contínua). La concentració de GAGs en els sobrenadants dels cultiu control es mostra en el gràfic en línia discontinua.

7.1.3. Caracterització del model d'estímul amb LPS segons el perfil de citocines

En aquest treball es vol avaluar l'efecte del plasma ric en plaquetes sobre un model *in vitro* de dany articular. Quan existeix dany en un teixit es genera com a causa o conseqüència un estat d'inflamació. Per tant, és necessari poder definir en el model *in vitro* que s'estableix per realitzar l'estudi, el perfil de citocines inflamatòries i antiinflamatòries existent, així com el del factor de creixement TGF- β , ja que és una molècula amb importants capacitats reguladores de tota resposta inflamatòria.

Dels assajos anteriors s'ha determinat que unes condicions de tractament del cultiu amb 100 µg/ml LPS durant 24 h no causen efectes citotòxics en els condrocits i que, en canvi, sí provoquen canvis significatius en l'activitat metabòlica mesurada com a capacitat de síntesi de GAGs. Per tant, ha estat en aquestes mateixes condicions que s'ha estudiat el perfil de citocines i de TGF- β . S'ha analitzat la presència de IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β i IL-8 en sobrenadants de cultius tractats i no tractats amb LPS mitjançant citometria de flux amb l'assaig CBA-kit. La presència de TGF- β s'ha analitzat per ELISA.

Les citocines són molècules que actuen de forma paracrina i autocrina, adquirint una funció estimuladora o inhibidora en funció del context (perfil de citocines) en què

es trobin. Per a poder entendre millor l'efecte del LPS sobre els condrocits en cultiu tenint en compte la interrelació que es pugui produir entre les diferents citocines, es va avaluar la cinètica de síntesi IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β i IL-8 abans de les 24h, resultats que es descriuen més endavant i es resumeixen a la Figura 29.

Els resultats de la determinació de IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β , IL-8 i TGF- β en els sobrenadants de cultius tractats amb 100 μ g/ml durant 24 h s'expressen com a increment dels nivells de cada citocina en el cultiu tractat respecte els nivells de la mateixa citocina en el cultiu control. A la Figura 27 es mostra com en el cultiu de condrocits incubat amb LPS es produeix un increment molt important d'IL-8 (fins unes 443 vegades més) respecte el control. També s'observa un increment de IL-6 (unes 15 vegades), de IL-10 (unes 10 vegades) i més lleugerament de TNF- α (4,6 vegades). De IL-12p70 i IL-1 β sol se'n detecta traces amb el sistema utilitzat i no s'observa cap variació amb l'addició de LPS. Els resultats de l'ELISA per a determinar la concentració de TGF- β mostren que la incubació del cultiu amb LPS fa disminuir la concentració de TGF- β fins a 7 vegades en el sobrenadant.

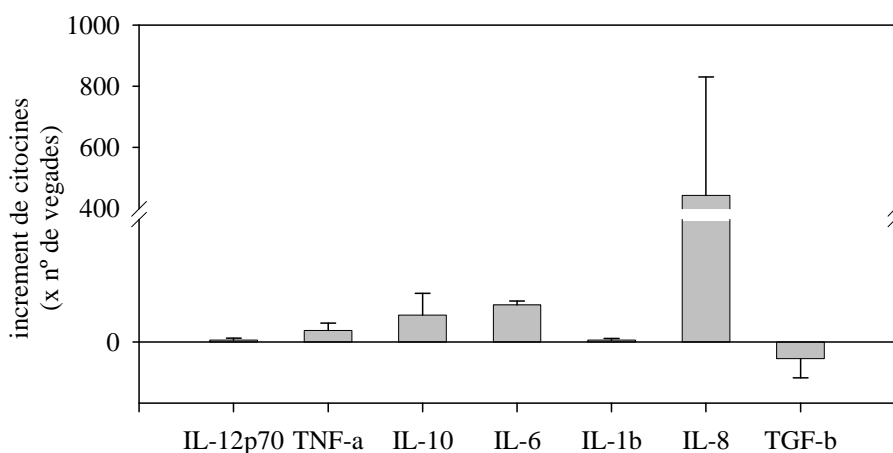


Figura 27. Caracterització del model in vitro d'estímul amb LPS segons el perfil de citocines. Determinació de diferents citocines i TGF- β en el model in vitro d'estímul amb LPS establert amb el tractament de 100 μ g/ml LPS durant 24 h. En el sobrenadant dels cultius s'ha quantificat IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β i IL-8 mitjançant l'assaig CBA-kit (n=3) i els nivells de TGF- β per ELISA (n=2). Els resultats s'expressen com a increment respecte el cultiu control: (concentració de la citocina en el cultiu tractat amb LPS/concentració de la mateixa citocina en el cultiu control)

Com ja s'ha comentat anteriorment, es creu que el TGF- β té un paper clau en la regulació de tota resposta inflamatòria i cal tenir en compte que, amb l'addició als

cultius del plasma ric en plaquetes (PRP), s'està incorporant aquest factor de creixement de forma exògena. Per a poder estudiar l'efecte del PRP sobre un model in vitro d'estímul amb LPS, es va voler avaluar si la disminució dels nivells de TGF- β és un factor característic de l'agressió per LPS i si el mateix efecte el provocava concentracions més baixes de LPS. Es va tractar el cultiu de condrocits amb 25, 50 i 100 $\mu\text{g/ml}$ LPS durant 24 h, i a la Figura 28 es pot veure com, efectivament, les concentracions més baixes de LPS també provoquen una disminució de la concentració de TGF- β en el sobrenadant del cultiu respecte el cultiu control. Per tant sembla que la disminució de TGF- β sigui un factor característic de l'estimulació dels condrocits amb LPS en les condicions estudiades.

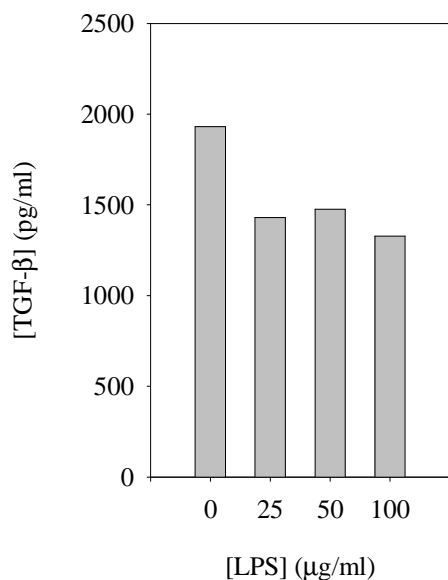


Figura 28. Efecte del LPS sobre la síntesi de TGF- β en condrocits en cultiu. Determinació mitjançant ELISA de la concentració de TGF- β en sobrenadant de cultiu tractat amb LPS (25, 50 i 100 $\mu\text{g/ml}$) durant 24 h i en sobrenadant de cultiu control.

RESULTATS

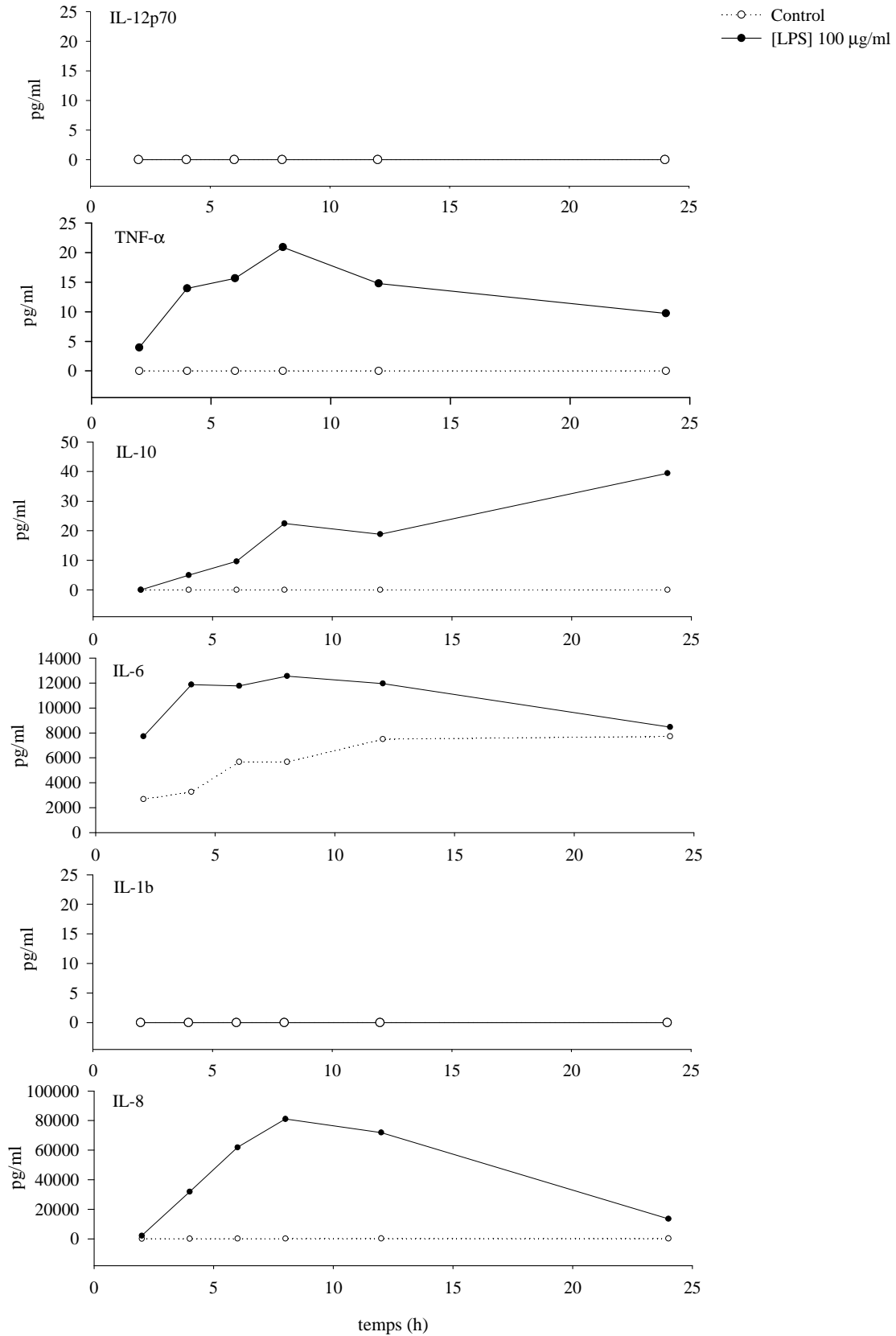


Figura 29. Efecte del LPS sobre la síntesi de citocines al llarg del temps en cultiu de condrocits. Determinació de la concentració de IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β i IL-8 en sobrenadants de cultius tractats amb LPS (100 μ g/ml) durant 2, 4, 6, 8, 12 i 24 h.

Avaluant la cinètica de síntesi de les diferents citocines abans de les 24 h, s'observa a la Figura 29 una resposta ràpida del condrocit a l'estímul amb LPS incrementant de forma considerable la síntesi de IL-6. Els condrocits sintetitzen IL-6 de forma constitutiva, però amb l'estímul amb LPS s'incrementen els nivells de síntesi i s'escurça el temps de reacció. A les 4 h d'incubació amb LPS el cultiu assoleix el seu màxim de concentració de IL-6 a diferència del que succeeix a les 12 h en les cèl·lules control.

Un cas semblant és el del TNF- α que comença a presentar concentracions notablement superiors respecte el control a les 4 h d'incubació amb LPS. El TNF- α assoleix el seu pic de concentració a les 8 h d'incubació, coincidint amb el de la IL-8, i en ambdós casos, passades les 8 h la concentració disminueix paulatinament, mantenint-se encara a les 24 h superior a la concentració de les cèl·lules sense estímul.

També s'observa com el LPS estimula la síntesi de IL-10, de forma lenta però constant, presentant el seu màxim a les 24 h d'incubació. La major diferència entre els nivells de IL-6 en sobrenadant de cultiu estimulat i no estimulat es produeix entre les 2 i 12 h ja que en el cultiu estimulat la concentració comença a disminuir a partir de les 12 h, mentre que en el cultiu no estimulat, la concentració de IL-6 entre les 12 i 24 h es manté constant.

Amb el mètode utilitzat no s'ha detectat IL-12p70 ni IL-1 β en sobrenadant de cultiu estimulat amb LPS, ni en el sobrenadant del cultiu control.

7.2. Tractament de cultiu de condrocits amb H₂O₂

L'oxidació es relaciona amb patologia i és causa de danys en diferents teixits, moltes vegades al provocar la disfuncionalitat de certes proteïnes, així com per la capacitat de provocar resposta inflamatòria. Com a model in vitro de dany articular per avaluar-ne l'efecte dels concentrats de plaquetes, s'ha cregut oportú establir un model in vitro d'oxidació.

Per a l'establiment del model in vitro d'oxidació s'ha tractat el cultiu de condrocits amb un agent oxidant, el peròxid d'hidrogen (H₂O₂) i s'ha seguit la mateixa estratègia que en l'establiment del model in vitro d'estímul amb LPS. Així, primer s'han determinat les condicions de concentració i temps d'incubació d'H₂O₂ que no ocasionen

efectes citotòxics, però que causen algun efecte metabòlic en el condrocit. L'activitat metabòlica s'ha valorat en funció de la concentració de GAGs en els sobrenadants dels cultius, de la mateixa manera que en el model anterior. Posteriorment, s'ha caracteritzat el model establert des del punt de vista del perfil de citocines inflammatòries/antiinflammatòries i de TGF- β .

7.2.1. Anàlisi de la citotoxicitat de l'H₂O₂.

Per a analitzar la citotoxicitat de l'H₂O₂ sobre els condrocits, s'han incubat les cèl·lules amb diferents concentracions d'H₂O₂ (0-10 mM) durant diferents temps compresos entre 2 h i 24 h. L'activitat mitocondrial dels condrocits s'ha determinat mitjançant assaig MTT i representa un indicador de la vitalitat cel·lular. Els resultats s'expressen com a percentatge de la vitalitat respecte el control: (activitat mitocondrial de les cèl·lules tractades amb H₂O₂/activitat mitocondrial de les cèl·lules sense tractar)x100

A la Figura 30 es mostra com la incubació del cultiu amb concentracions inferiors a 1 mM d'H₂O₂ no provoquen, en els condrocits, una disminució menor del 10% de la vitalitat respecte les cèl·lules control. A mesura que augmenta la concentració d'H₂O₂ la vitalitat disminueix notablement, quedant-se al 40% o 30% de vitalitat de les cèl·lules control quan el cultiu s'incuba amb 5 o 10 mM d'H₂O₂ respectivament. Per tant, considerem 1 mM la concentració màxima de treball, ja que concentracions superiors resulten citotòxiques.

A la Figura 31 s'observa que, en valorar la citotoxicitat de l'H₂O₂ al llarg del temps, la vitalitat dels condrocits ja és inferior respecte les cèl·lules control a les 2 h d'incubació amb 1 mM H₂O₂, mantenint-se constant entre un 80% i 90% de l'activitat de les cèl·lules sense H₂O₂ durant les 24 h posteriors d'incubació.

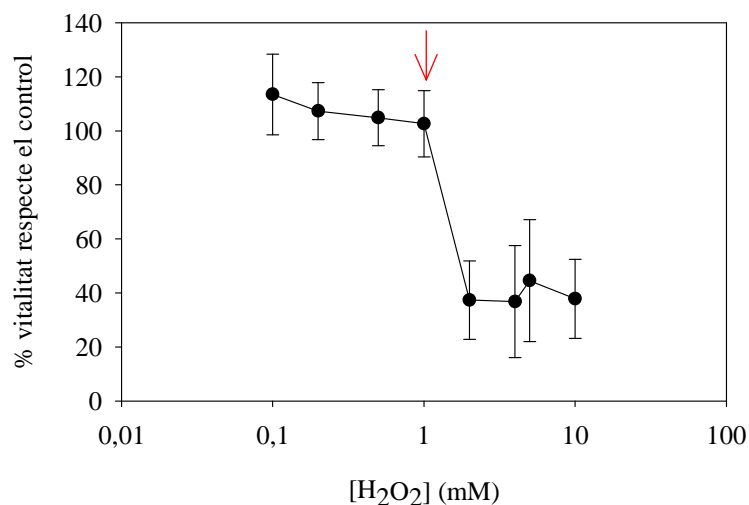


Figura 30. Avaluació de la citotoxicitat de l'H₂O₂ sobre condrocits en cultiu. Valoració de l'efecte l'H₂O₂ (0-10 mM) sobre la vitalitat de condrocits en cultiu. La vitalitat s'ha determinat mitjançant l'anàlisi de l'activitat mitocondrial dels condrocits mitjançant l'assaig MTT després de la incubació dels cultius amb H₂O₂ durant 24 h. Els resultats s'expressen com a percentatge respecte la vitalitat dels condrocits control: (activitat mitocondrial de cèl·lules tractades amb H₂O₂/activitat mitocondrial de cèl·lules control)x100

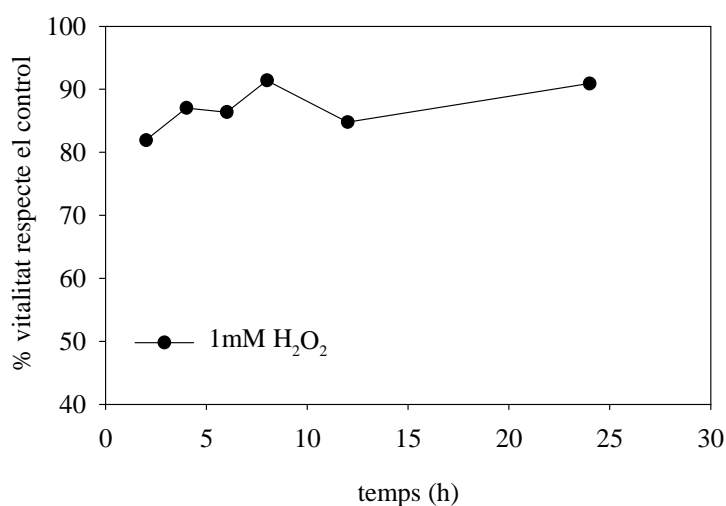


Figura 31. Anàlisi de la citotoxicitat de l'H₂O₂ al llarg del temps. Valoració de l'efecte de l'H₂O₂ (1 mM) durant 2, 4, 6, 8, 12 i 24 h d'incubació sobre la vitalitat de condrocits en cultiu. La vitalitat cel·lular s'ha determinat mitjançant l'anàlisi de l'activitat mitocondrial, per l'assaig MTT, en condrocits posterior al tractament amb H₂O₂. Els resultats s'expressen com a percentatge de vitalitat respecte el control: (activitat mitocondrial de condrocits tractats amb H₂O₂/activitat mitocondrial de condrocits control)x100.

7.2.2. Avaluació dels efectes de l'H₂O₂ sobre l'activitat metabòlica dels condrocits.

En aquest estudi s'ha utilitzat la determinació de la concentració de GAGs en el sobrenadant dels cultius com a indicador de l'activitat metabòlica dels condrocits. S'han incubat diferents cultius de condrocits amb H₂O₂ a concentracions en el rang 0-1 mM durant 24 h i s'ha quantificat la concentració de GAGs en el sobrenadant per l'assaig DMMB. S'ha valorant l'efecte de l'oxidació amb H₂O₂ sobre la cinètica de síntesi de GAGs.

D'un total d'11 assaigs únicament en 6 experiments s'ha pogut quantificar, amb la metodologia utilitzada, la concentració de GAGs en el sobrenadant dels cultius. Els resultats (Figura 32) ens mostren com en els sobrenadants dels condrocits tractats amb 1 mM d'H₂O₂ disminueix lleugerament la concentració de GAGs, mentre que a concentracions inferiors (0,5 mM d'H₂O₂) es manté la mateixa concentració de GAGs que en els sobrenadants dels cultiu control.

En 5 assaigs dels 11 no es va detectar GAGs en els seus sobrenadants. Per tant, es pot afirmar que, o bé les cèl·lules eren incapaces de sintetitzar-ne o que la concentració es trobava per sota del llindar de detecció del protocol utilitzat.

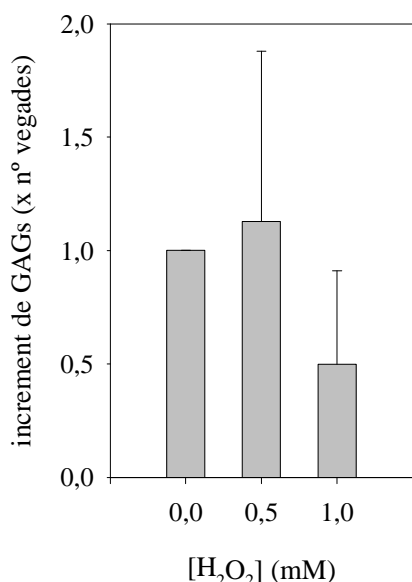


Figura 32. Efecte l'H₂O₂ sobre l'activitat metabòlica dels condrocits. L'activitat metabòlica dels condrocits s'ha mesurat mitjançant la determinació de glicosaminoglicans (GAGs) en els sobrenadants de cultius tractats amb H₂O₂ (0,5 i 1 mM) durant 24 h. La concentració de GAGs s'ha determinat mitjançant l'assaig DMMB i s'expressa com a increment respecte el control: (concentració de GAGs en sobrenadants de cultius tractats amb H₂O₂/concentració de GAG en sobrenadants de cultius control).

Per a estudiar la cinètica de síntesi de GAGs durant 24 h de cultiu i com l' H_2O_2 podia modificar-la, es van tractar cultius de condrocits amb 1 mM d' H_2O_2 durant diferents temps i se'n va quantificar la concentració de GAGs en els sobrenadants mitjançant la tècnica DMMB.

Fins a les 12 h no es detecta suficient GAG en el sobrenadant del cultiu control per a poder ser quantificat amb la tècnica del DMMB. Quan el cultiu s'incuba amb H_2O_2 sembla que aquest temps s'allargui, i tal com mostra la Figura 33, no es quantifica fins a les 24 h. Tal com ja havíem vist en altres experiments, en determinats cultius primaris de condrocits, 24 h no són suficients per poder-ne quantificar els GAGs en el sobrenadant amb la tècnica DMMB.

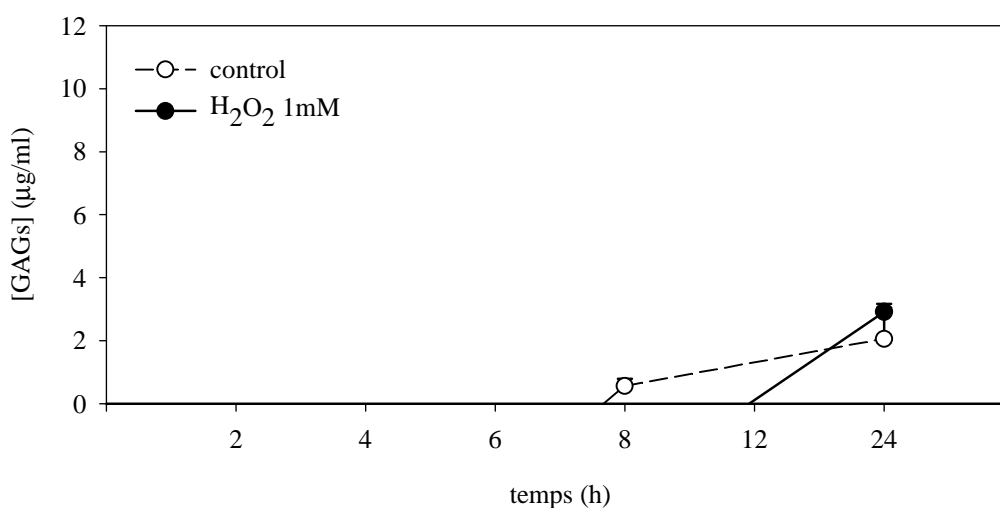


Figura 33. Efecte de l' H_2O_2 sobre la síntesi de glicosaminoglicans (GAGs) al llarg del temps. Anàlisi de la concentració de GAGs en sobrenadants de cultiu tractats amb H_2O_2 (1mM) durant 2, 4, 6, 8, 12 i 24 hores (línia contínua). La concentració de GAGs en els sobrenadants del cultiu control es mostra en el gràfic en línia discontinua.

A partir d'aquests resultats, escollim un temps d'incubació de 24 h per a l'establiment del model in vitro d'oxidació, ja que amb el tractament de 1 mM H_2O_2 no resulta citotòxic per als condrocits i és el temps mínim per a poder-ne determinar certs efectes sobre el metabolisme cel·lular mesurat com a capacitat de síntesi de GAGs.

7.2.3. Caracterització del model d'oxidació segons el perfil de citocines

De la mateixa manera que en el cas del model in vitro d'estímul amb LPS, hem caracteritzat el model d'oxidació des del punt de vista inflamatori/antiinflamatori. Per tal de poder estudiar l'efecte del PRP sobre el model d'oxidació és necessari que,

prèviament, es determini l'efecte de l'oxidació amb H_2O_2 sobre el perfil de citocines i TGF- β en el cultiu de condrocits.

S'han tractat els condrocits amb les condicions establertes en els assaigs anteriors (1 mM H_2O_2 durant 24 h) ja que no provoquen citotoxicitat i, a més, permeten detectar certa activitat metabòlica en els condrocits. S'ha analitzat la concentració de IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β , IL-8 en el sobrenadant mitjançant assaig de CBA-kit per citometria de flux. També s'ha quantificat la concentració de TGF- β mitjançant ELISA.

S'ha avaluat la cinètica de síntesi de IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β i IL-8 abans de les 24 h per tal de comprendre millor el paper d'aquestes citocines en el model oxidatiu.

Els resultats (Figura 34) mostren que l' H_2O_2 no causa cap efecte sobre la síntesi de les citocines analitzades en les condicions estudiades. A la Figura 34 es representa la variació entre la concentració de les diferents citocines respecte els sobrenadants controls i es pot observar que en totes les citocines està al voltant de 1, i per tant, que hi ha pràcticament la mateixa concentració en els sobrenadants control que en els sobrenadants dels cultius tractats. Sembla, que la concentració de IL-8 augmenti lleugerament amb l'addició de H_2O_2 al medi, però la desviació entre els diferents experiments és suficientment elevada perquè no es pugui considerar un augment significatiu.

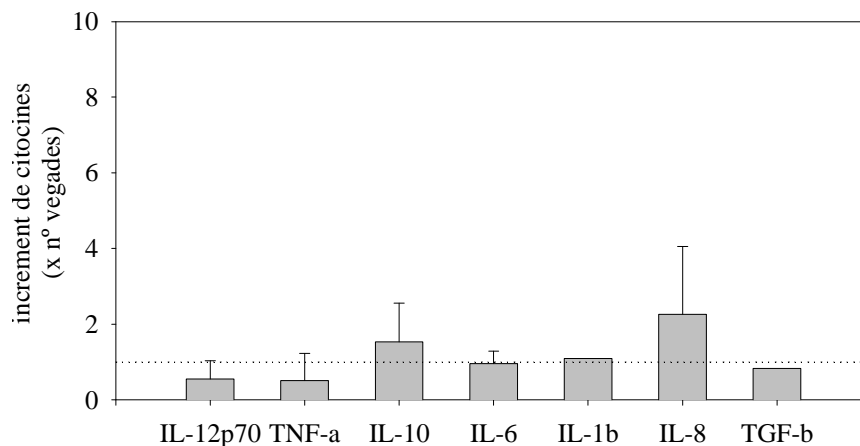


Figura 34. Caracterització del model in vitro d'oxidació segons el perfil de citocines. Determinació de diferents citocines inflamatòries i de TGF- β en el model in vitro d'oxidació en condròcits tractats amb H_2O_2 : 1 mM H_2O_2 durant 24 h. En el sobrenadant dels cultius s'ha quantificat IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β i IL-8 mitjançant l'assaig CBA-kit i els nivells de TGF- β per ELISA. Els resultats s'expressen com a increment respecte el cultiu control: (concentració de la citocina en el cultiu tractat amb H_2O_2 /concentració de la mateixa citocina en el cultiu control)

Valorant la cinètica de síntesi de IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β i IL-8, s'observa a la Figura 35 com de totes les citocines analitzades, únicament la IL-6 i IL-8 són constitutives dels condròcits en cultiu. La IL-6 ja es comença a detectar a les 2 h d'incubació, i la seva concentració va augmentant lleugerament fins a les 12 h on la concentració s'estabilitza. L' H_2O_2 no modifica aquest perfil. La IL-8 també es comença a detectar a les 2 h i augmenta tímidament fins a les 12 h, però sempre presenta concentracions molt inferiors respecte la IL-6. El cultiu tractat amb H_2O_2 presenta la mateixa cinètica que el cultiu control, tot i que sembla que a les 24 h la concentració augmenti. Les citocines IL-12p70, IL-1 β , TNF- α , IL-10 no es quantifiquen en els sobrenadants dels cultius sense estimular, i només se'n poden detectar traces a les 6 i/o 8 h en els cultius estimulats amb H_2O_2 .

RESULTATS

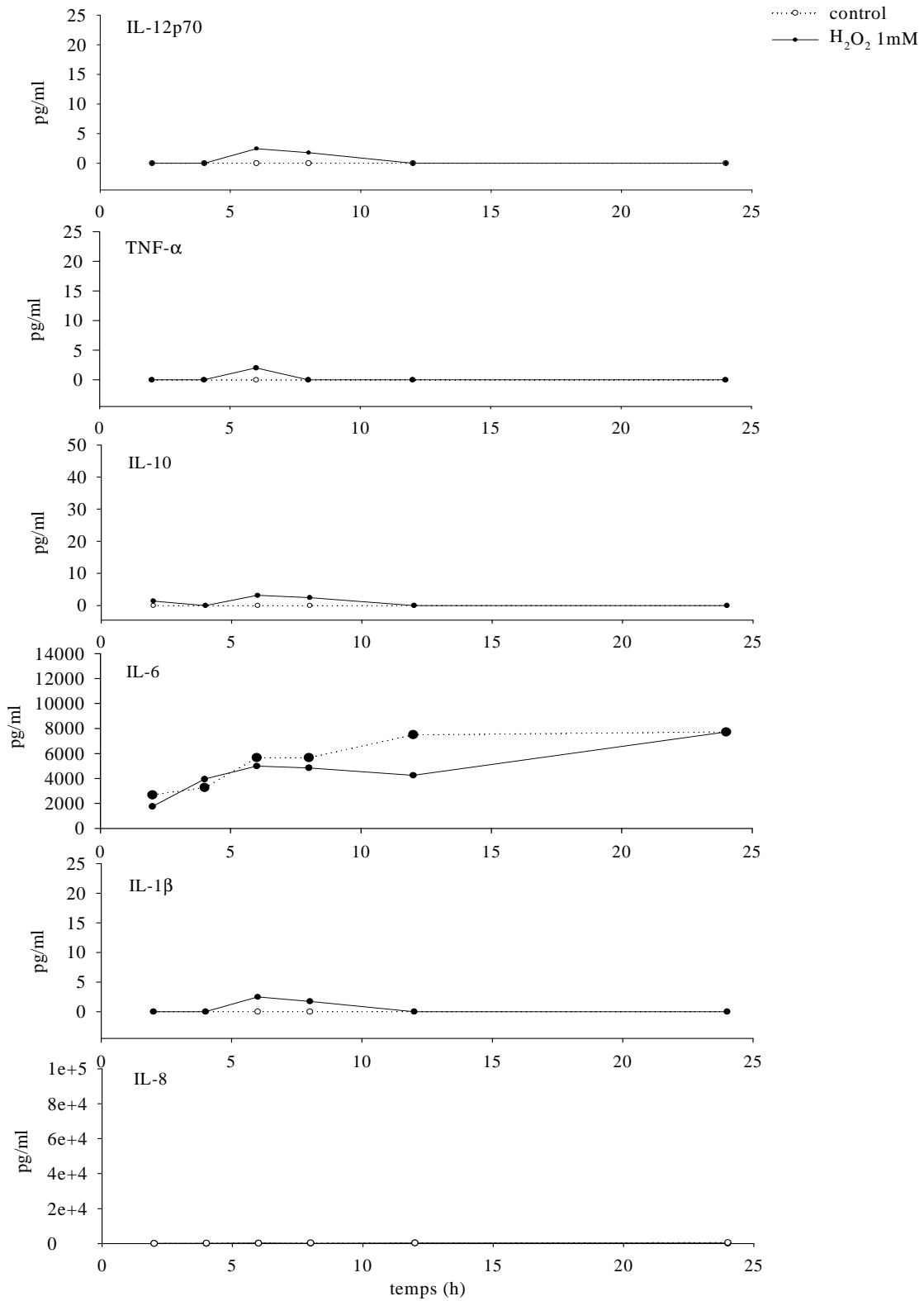


Figura 35. Efecte l'H₂O₂ sobre la síntesi de citocines al llarg del temps en cultiu de condrocits. Determinació de la concentració de IL-12p70, TNF-α, IL-10, IL-6, IL-1β i IL-8 en sobrenadants de cultius tractats amb H₂O₂ (1 mM) durant 2, 4, 6, 8, 12 i 24 h.

8. TRACTAMENT DEL MODEL DE DANY CEL·LULAR AMB PLASMA RIC EN PLAQUETES

8.1. Obtenció de Plasma Ric en Plaquetes (PRP)

El plasma ric en plaquetes (PRP) utilitzat en aquest estudi s'ha generat de manera específica per al seu ús en l'anàlisi de l'efecte del PRP sobre els models in vitro de dany articular. S'ha obtingut a partir de sang humana amb l'objectiu d'obtenir una font rica en TGF- β .

Per tal d'estandarditzar el protocol d'obtenció de plasma ric en plaquetes, ens hem guiat per protocols descrits en bibliografia que descriu l'ús del PRP en clínica humana mitjançant centrifugació. A partir de la centrifugació de la sang sencera (veure Figura 15 de l'apartat materials i mètodes) es separa la fracció vermella (eritròcits), la fracció inferior de plasma que és la que es considera rica en plaquetes (PRP) i la fracció superior de plasma que, després d'una segona centrifugació, es considera plasma pobre en plaquetes (PPP). Per a alliberar al plasma el TGF- β contingut en les plaquetes, és necessària l'activació in vitro de les plaquetes amb CaCl_2 .

Abans d'estandarditzar el protocol d'obtenció de PRP s'han valorat diferents paràmetres per tal d'obtenir una major quantitat de TGF- β en el PRP:

- a) Velocitat de centrifugació en l'obtenció del PRP
- b) Concentració de CaCl_2 per a l'activació de les plaquetes
- c) Temps d'activació de les plaquetes amb CaCl_2

La valoració d'aquests paràmetres s'ha realitzat per l'anàlisi de la concentració de TGF- β al plasma mitjançant ELISA i/o analitzant l'activació plaquetar mitjançant marcatge CD61/CD62P per citometria de flux, ja que l'alliberació del TGF- β és conseqüència de l'activació de les plaquetes.

8.1.1. Valoració de la velocitat de centrifugació per l'obtenció de PRP.

S'ha generat PRP a partir de la centrifugació de sang humana a dues velocitats diferents: 280 g i 460 g, durant 8 minuts. Part dels concentrats obtinguts s'han activat amb CaCl_2 , mentre que l'altra s'ha mantingut sense CaCl_2 per tal de poder determinar si

el procés de centrifugació provoca activació espontània de les plaquetes. En totes les fraccions de PRP s'ha determinat la concentració de TGF- β mitjançant ELISA com a índex d'activació de les plaquetes.

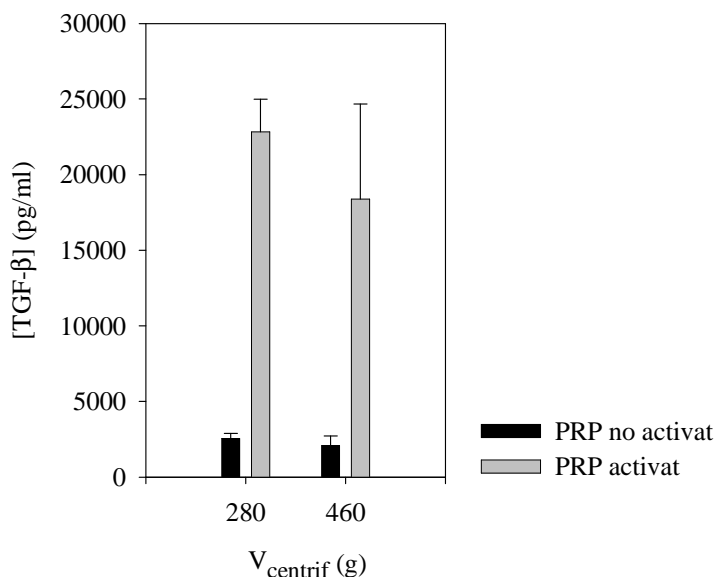


Figura 36. Valoració de diferents velocitats de centrifugació per a l'obtenció de plasma ric en plaquetes (PRP). Valoració a partir de la concentració de TGF- β en PRP obtingut a partir de la centrifugació a 280 g o 460 g de sang sencera. S'ha determinat la concentració de TGF- β mitjançant ELISA en PRP sense activar (barra negra) i en PRP activat amb 45 mM CaCl₂ durant 2 h (barra gris)

Tal com mostra la Figura 36, després de centrifugar la sang a 280 i 460 g es quantifica 2545 \pm 350 i 2094 \pm 636 pg/ml respectivament de TGF- β en els PRPs que no s'han activat. Quan les plaquetes s'activen amb CaCl₂, la concentració de TGF- β augmenta de forma considerable, fins a assolir uns valors 9 vegades superiors a quan no s'activen. Segons aquests resultats no s'observen diferències en la concentració de TGF- β en el PRP generat a 280 g i 460 g, ni s'observa més activació espontània en una velocitat de centrifugació que en l'altra. Per aquest motiu, ja que des del punt de vista de l'obtenció de TGF- β és indistint centrifugar la sang a 280 g que a 460 g, s'escull 460 g com a velocitat de centrifugació per a la preparació del PRP perquè, segons altres estudis no realitzats per nosaltres, 460 g és la velocitat amb la que s'obté PRP lliure de leucòcits i, per tant, és el que més s'utilitza en clínica humana.

8.1.2. Valoració de la concentració de CaCl₂ per a l'activació de les plaquetes.

S'han valorat diferents concentracions de CaCl₂ per a l'activació de les plaquetes, però perquè aquest factor químic no generés citotoxicitat posteriorment sobre les cèl·lules, no s'ha superat la concentració que s'utilitza en clínica humana.

L'activació de les plaquetes s'ha analitzat mitjançant citometria de flux (marcatge CD61/CD62P).

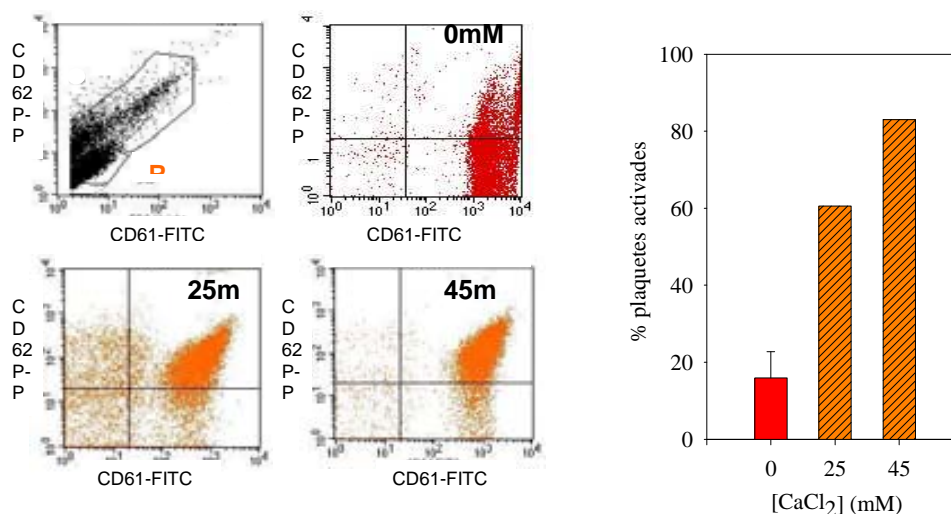


Figura 37. Valoració de la concentració de CaCl₂ per a l'activació de les plaquetes. Valoració de l'activació de PRP amb CaCl₂ (25 i 45 mM) mitjançant marcatge CD61⁺/CD62P⁺ per citometria de flux (taronja). El grau d'activació espontània de les plaquetes durant el procés d'obenció de PRP es mostra en vermell.

Tal com mostra la Figura 37, sempre existeix cert grau d'activació de les plaquetes. Per PRP no activat s'ha trobat que un 15,9±6,8% són CD61⁺/CD62P⁺. Activant amb 25 mM CaCl₂ s'assoleix un 60% de plaquetes CD62P⁺ mentre que amb la concentració utilitzada en clínica humana, 45 mM, s'aconsegueix un 80% d'activació. A la Figura 37 s'observa com la població CD61⁺CD62P⁺ és major a l'activar amb 45 mM de CaCl₂.

Per tant, tenint en compte els resultats obtinguts, s'escull la concentració 45 mM CaCl₂ per a activar les plaquetes del PRP, perquè és la concentració de CaCl₂ que produeix una major activació de plaquetes.

8.1.3. Valoració del temps d'activació de les plaquetes amb CaCl₂.

S'ha valorant el temps d'incubació de les plaquetes amb CaCl₂ que provoca una màxima activació i un major alliberament de TGF-β. S'ha activat PRP amb 45 mM CaCl₂ durant 10-150 min i s'ha determinat l'activació plaquetar mitjançant marcatge CD61/CD62P per citometria i la concentració de TGF-β alliberat al plasma per ELISA.

A la Figura 38 es mostren els resultats obtinguts del marcatge CD61/CD62P i de la determinació de la concentració de TGF-β. Tenint en compte la part superior del

RESULTATS

gràfic (% plaquetes CD61⁺/CD62P⁺), es pot observar que un 12% de les plaquetes s'activarien espontàniament en el procés d'obtenció del PRP o en el propi marcatge, ja que són CD61⁺/CD62P⁺ i no han estat activades amb CaCl₂. El PRP al qual no se li ha afegit CaCl₂ manté una activació basal estable entre els 10 i 90 min del 7-15%. Després de 10 minuts d'incubació del PRP amb 45 mM CaCl₂ el 46% de les plaquetes són CD61⁺/CD62P⁺ mentre que als 30 minuts el percentatge ja augmenta fins el 80%. A mesura que augmenta el temps d'incubació del PRP amb CaCl₂ el percentatge de plaquetes CD61⁺/CD62P⁺ disminueix, fins als 90 minuts que el % d'activació s'igualava amb el PRP control no activat.

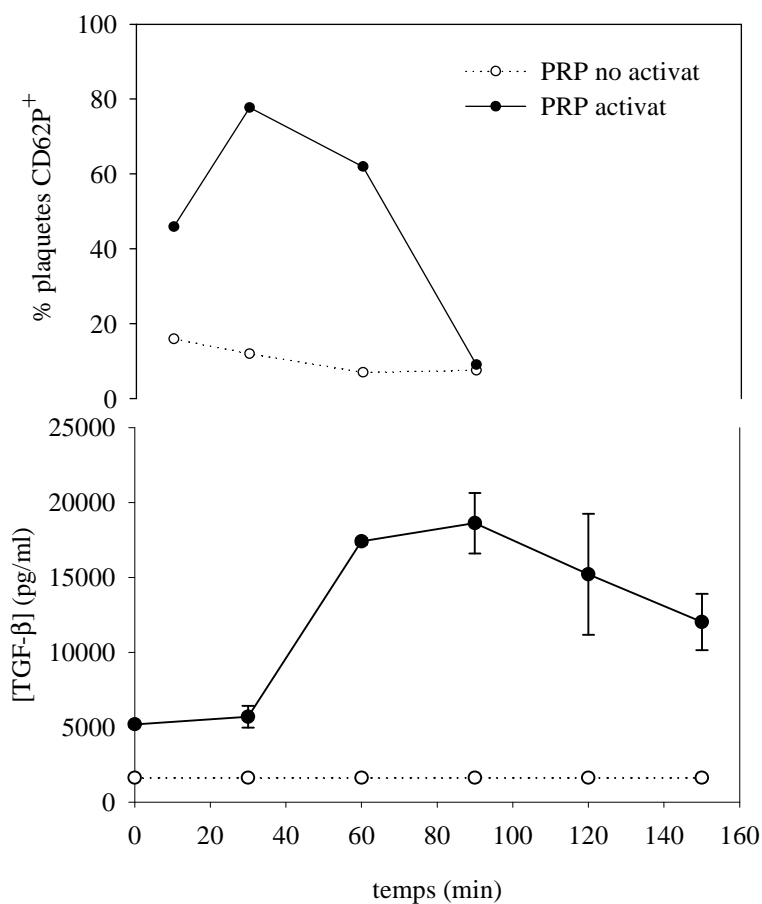


Figura 38. Valoració del temps d'activació in vitro de les plaquetes amb CaCl₂ Anàlisi de l'activació de plaquetes amb CaCl₂ (45 mM) al llarg del temps (0-150 min) mitjançant marcatge CD61⁺/CD62P⁺ per citometria de flux i per la quantificació del TGF-β alliberat en el plasma (ELISA)

Respecte a la mesura de la concentració de TGF-β en els sobrenadants dels PRP no activats (part inferior del gràfic) es detecta certa quantitat de TGF-β, 1613±68 pg/ml. Quan valorem el TGF-β present a les diferents mostres incubades amb CaCl₂ i activades durant diferents temps es pot observar (Figura 38) que fins als 60-90 minuts no s'assoleix la concentració de TGF-β més elevada (17406±2019 pg/ml de TGF-β als 60

min i 18621 ± 4034 pg/ml als 90 min). Ja en els 10 minuts després de l'activació amb CaCl_2 s'observa un increment de TGF- β fins al voltant de 5000 pg/ml, mantenint-se pràcticament constants fins als 30 minuts. Dels 30 als 60 minuts es produeix l'alliberació massiva de TGF- β assolint el màxim de concentració en el plasma als 60-90 min d'activació. A partir dels 90 min la concentració torna a disminuir poc a poc.

En valorar de manera conjunta aquests resultats, s'observa que existeix un desfasament en el temps d'activació de les plaquetes i el d'alliberació de TGF- β en el plasma. Tenint en compte els resultats obtinguts, s'ha escollit entre 60 i 90 min com a temps d'incubació del PRP amb CaCl_2 ja que és en aquest temps quan el plasma és més ric en TGF- β , proteïna del nostre interès per als estudis posteriors.

8.2. Tractament de condrocits amb PRP

Els concentrats de plaquetes amb els que es tracten els cultius de condrocits han estat activats amb 45 mM CaCl_2 durant 60-90 minuts. Prèviament a la incubació del cultiu amb els PRPs s'ha volgut estudiar si el CaCl_2 té algun efecte sobre els condrocits que pugui afectar els resultats del nostre estudi. Amb aquest objectiu s'ha avaluat la citotoxicitat del CaCl_2 sobre el cultiu de condrocits i l'efecte del CaCl_2 sobre la síntesi de TGF- β .

En aquest estudi s'utilitza el PRP com una font rica en TGF- β i s'avalua el seu efecte sobre diferents models in vitro de dany articular, tant sobre l'efecte en la síntesi de matriu extracel·lular, com sobre el perfil de citocines. Per aquest motiu és important conèixer la concentració de TGF- β en els PRP, així com la quantitat de GAGs i citocines que s'està afegint de manera exògena amb l'administració de PRP en els condrocits in vitro.

8.2.1. Control de l'efecte del CaCl_2 sobre el cultiu de condrocits

S'ha incubat el cultiu de condrocits amb diferents concentracions de CaCl_2 (0-100 mM) durant 24 i 48 h. S'ha determinat la citotoxicitat del CaCl_2 sobre els condrocits mitjançant la determinació de l'activitat mitocondrial amb l'assaig MTT, com a indicador de la vitalitat cel·lular. Els resultats s'expressen com a percentatge de vitalitat respecte el control: $(\text{activitat mitocondrial de les cèl·lules tractades amb } \text{CaCl}_2 / \text{activitat mitocondrial de les cèl·lules control}) \times 100$. L'efecte del CaCl_2 sobre la

síntesi de TGF- β en el cultiu s'ha valorat mitjançant la determinació de la concentració de TGF- β en els diferents sobrenadants mitjançant ELISA.

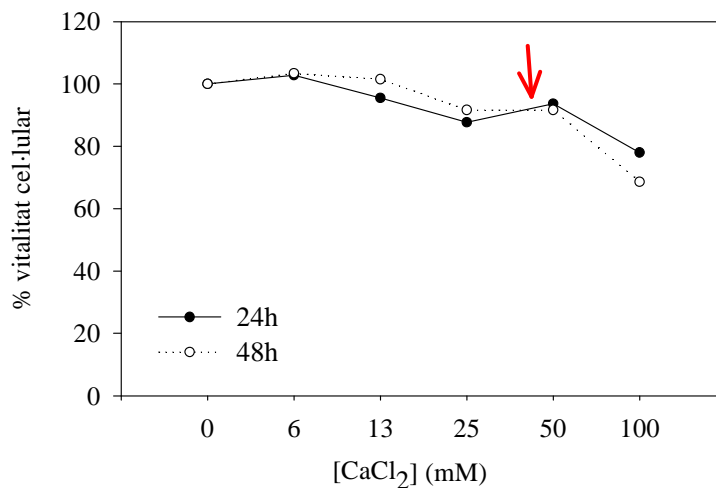


Figura 39. Anàlisi de la citotoxicitat del CaCl₂ sobre condrocits en cultiu. Valoració de la vitalitat cel·lular de condrocits tractats amb CaCl₂ (6, 13, 25, 50 i 100 mM) durant 24 o 48 h. La vitalitat cel·lular s'ha analitzat mitjançant la determinació de l'activitat mitocondrial mitjançant l'assaig MTT. Els resultats s'expressen com a percentatge de vitalitat cel·lular respecte el control: (activitat mitocondrial de condrocits tractats amb CaCl₂/activitat mitocondrial de condrocits control)x100.

A la Figura 39 es mostra com cap de les concentracions de CaCl₂ estudiades sembla que tingui algun efecte negatiu sobre la vitalitat dels condrocits, a excepció de 100 mM CaCl₂ que provoca un lleuger descens de la vitalitat cel·lular. D'aquesta manera els resultats obtinguts ens mostren que la concentració de CaCl₂ que s'utilitza per a l'activació de les plaquetes (45 mM) no té un efecte negatiu sobre la vitalitat dels condrocits.

En valorar l'efecte del CaCl₂ sobre la síntesi de TGF- β en condrocits en cultiu no sembla que el CaCl₂ hi causi cap efecte rellevant. A la Figura 40 s'observa que el cultiu de condrocits que no s'ha tractat amb CaCl₂, presenta a les 24 h de cultiu 1270,5 \pm 14,8 pg/ml de TGF- β en el sobrenadant i el que s'ha incubat amb 50 mM CaCl₂, 745,5 \pm 6,4 pg/ml de TGF- β . Amb una concentració de CaCl₂ molt superior a la present en el PRP, 100 mM CaCl₂, els nivells de TGF- β en el sobrenadant disminueixen fins a 295,5 \pm 40,3 pg/ml, fet que significa un 23,3% del TGF- β que es quantifica en els cultius control.

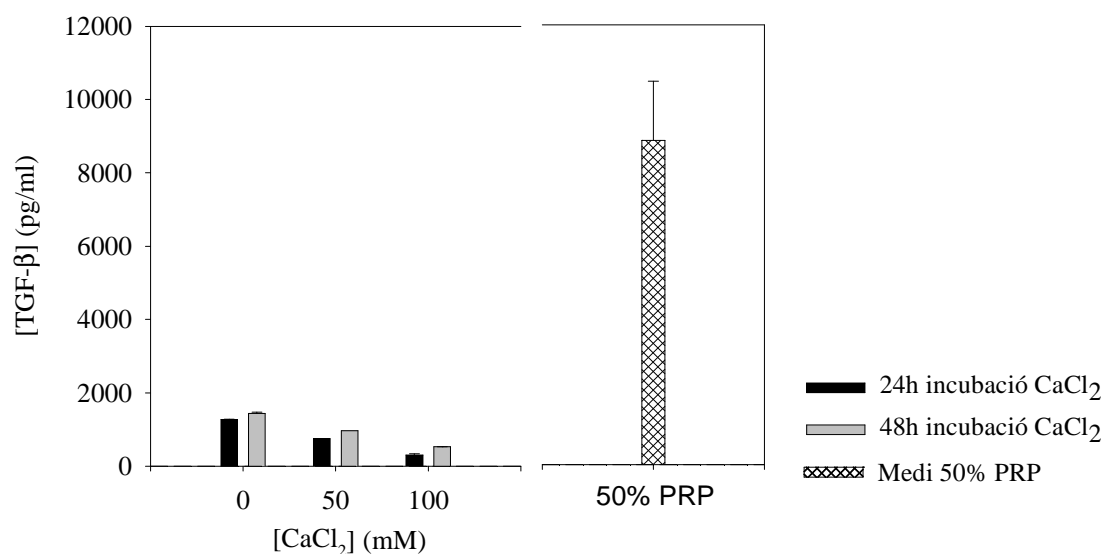


Figura 40 . Efecte del CaCl₂ sobre la síntesi de TGF-β en cultiu de condrocits. Determinació de la concentració de TGF-β en sobrenadant de cultiu de condrocits incubats amb CaCl₂ (0, 50 o 100 mM) durant 24 h (barra negra) o 48 h (barra grisa). Es mostra la concentració de TGF-β en medi 50% PRP (barra ratllada).

Els cultius control i els que s'han incubat amb diferents concentracions de CaCl₂ durant 48 h sempre presenten en els sobrenadants concentracions de TGF-β superiors als sobrenadants dels respectius cultius incubats 24 h.

D'aquests resultats és important destacar que l'addició al cultiu de CaCl₂ en cap cas provoca un augment en la síntesi de TGF-β en els condrocits en cultiu i que les concentracions de TGF-β en els sobrenadants en cultiu són totalment insignificants comparats amb els 8840±1619 pg/ml TGF-β presents en el medi amb 50% PRP amb el que es tractarà els cultius en els posteriors estudis (Figura 40). D'aquesta manera es pot estar segur que amb l'aplicació de PRP als cultius, tot el TGF-β que s'estarà afegint serà exogen, alliberat per les plaquetes.

8.2.2. Control del contingut en TGF-β, GAGs i citocines en els concentrats de plaquetes.

El plasma ric en plaquetes (PRP) és una font rica en TGF-β i altres factors de creixement. En aquest estudi, el producte que bàsicament es vol obtenir amb la generació de PRP és TGF-β. Aquesta és la raó per la qual s'ha valorat la concentració de TGF-β que s'obté seguint el protocol d'obtenció de plasma ric en plaquetes (Figura

15 i 16 de l'apartat Materials i Mètodes) establert en aquest treball: s'ha determinat la concentració de TGF- β mitjançant ELISA en PRP activat, PRP no activat, així com en fraccions de plasma pobre en plaquetes (PPP) activat i no activat.

A la Figura 41 s'observa com totes les fraccions de plasma presenten TGF- β . El PRP i PPP no activats presenten nivells molt semblants de TGF- β , $1990 \pm 428,5$ pg/ml i 2526 ± 964 pg/ml respectivament. El PPP activat presenta 4228 ± 2014 pg/ml, mentre que en el PRP aquesta concentració es quadruplica fins a $17680,5 \pm 3239,9$ pg/ml (Taula 6).

Taula 6. Concentració de TGF- β en diferents fraccions de plasma.

	TGF- β (pg/ml)
PRP sense activar (PRPNA)	$1990 \pm 428,5$
PRP activat (PRPA)	$17680,5 \pm 3239,9$
PPP sense activar (PPPNA)	2526 ± 964
PPP activat (PPPA)	4228 ± 2014

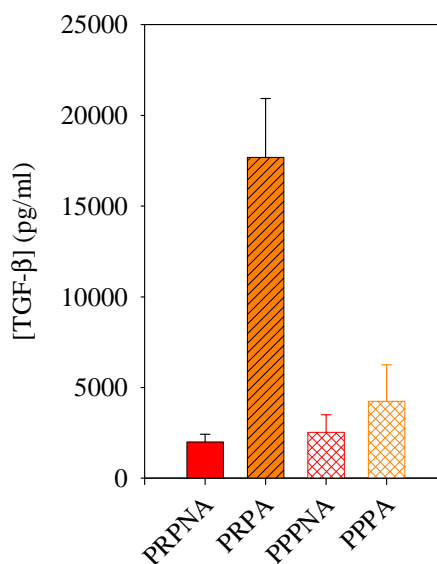


Figura 41. Contingut de TGF- β en diferents fraccions de plasma. Determinació de la concentració de TGF- β mitjançant ELISA en: Plasma ric en plaquetes no activat (PRPNA) n=4; plasma ric en plaquetes activat (PRPA) n=4; plasma pobre en plaquetes no activat (PPPNA) n= 2; plasma pobre en plaquetes activat (PPPA) n=2.

Per a conèixer els nivells de GAGs i citocines que s'afegiran de forma exògena amb l'addició de PRP als cultius, es quantifica la concentració de GAGs per l'assaig DMMB i la presència de IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β i IL-8 per citometria de flux en fraccions de PRP i en medi de cultiu enriquit amb 25% i 50% PRP, ja que aquest serà el medi amb el que es tractarà posteriorment els models in vitro de dany articular.

A la Taula 7 es mostren els resultats i s'observa com les concentracions de totes les citocines són baixes. La IL-12p70 és, de les citocines quantificades, la que major

concentració presenta ($43,66 \pm 13,6$ pg/ml en el PRP) i disminueix a mesura que el PRP es dilueix en medi de cultiu. En canvi, en la resta de citocines mesurades la concentració és lleugerament superior en el medi enriquit amb PRP que en el PRP pur.

Recordant els valors d'aquestes citocines que es quantificava en els sobrenadants dels cultius incubats amb LPS o amb H_2O_2 , els nivells de GAGs, IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β i IL-8 presents en el PRP són insignificants. Així, doncs, es pot considerar que amb l'addició de PRP en els cultius no s'està afegint de forma exògena GAGs, IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β ni IL-8, que pugui interferir amb els posteriors assaigs.

Taula 7. Contingut de citocines i glicosaminoglicans en plasma ric en plaquetes (PRP) i medi 25% i 50% PRP. La determinació de IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β i IL-8 mitjançant l'assaig CBA-kit, i la concentració de GAGs s'ha determinat mitjançant l'assaig DMMB.

	IL-12p70 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	GAGs (μ g/ml)
25% PRP	$9,23 \pm 5,2$	$5,25 \pm 7,4$	$6,2 \pm 5,7$	$12,5 \pm 12,6$	$5,45 \pm 7,7$	$13,8 \pm 11,8$	$2,46 \pm 1,2$
50% PRP	18,6	10,5	10,3	21,5	10,4	26,3	$10,46 \pm 2,45$
PRP	$43,66 \pm 13,6$	$1,24 \pm 1$	$2,38 \pm 1,7$	$14,8 \pm 3,9$	$3,01 \pm 1,4$	$10,88 \pm 1,5$	$5,71 \pm 1,2$

8.3 Tractament amb PRP dels models in vitro de dany cel·lular.

Per a avaluar l'efecte del PRP sobre els models in vitro de dany cel·lular, s'han tractat cultius control, cultius estimulats amb LPS (50 o 100 μ g/ml) i cultius oxidats amb H_2O_2 (1 mM), amb plasma ric en plaquetes (PRP 25% o 50%) durant 24 h. S'han recollit els sobrenadants després del primer tractament amb LPS o H_2O_2 i després del tractament amb PRP. A les Figures 42 i 43 es mostren els esquemes de l'experimental seguit. En tots els sobrenadants recollits es determina la concentració de GAGs mitjançant l'assaig DMMB i la concentració de IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β , i IL-8 mitjançant citometria de flux amb l'assaig CBA-kit.

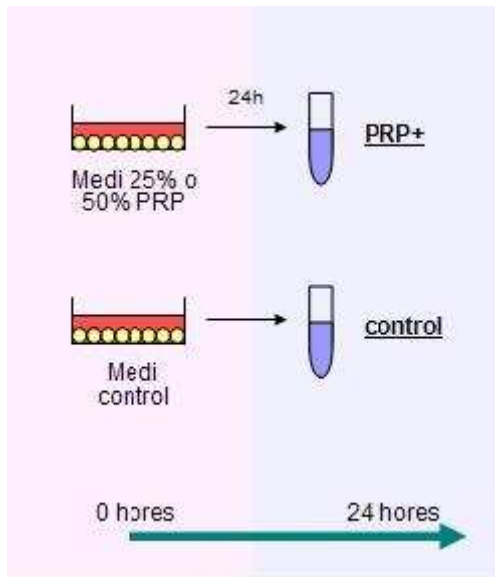


Figura 42. Esquema experimental de la valoració de l'efecte del PRP sobre cultiu de condrocits control. Es tracta el cultiu de condrocits amb PRP (25% o 50%) durant 24 h. Es recull el sobrenadant pel posterior anàlisi de GAGs i citocines.

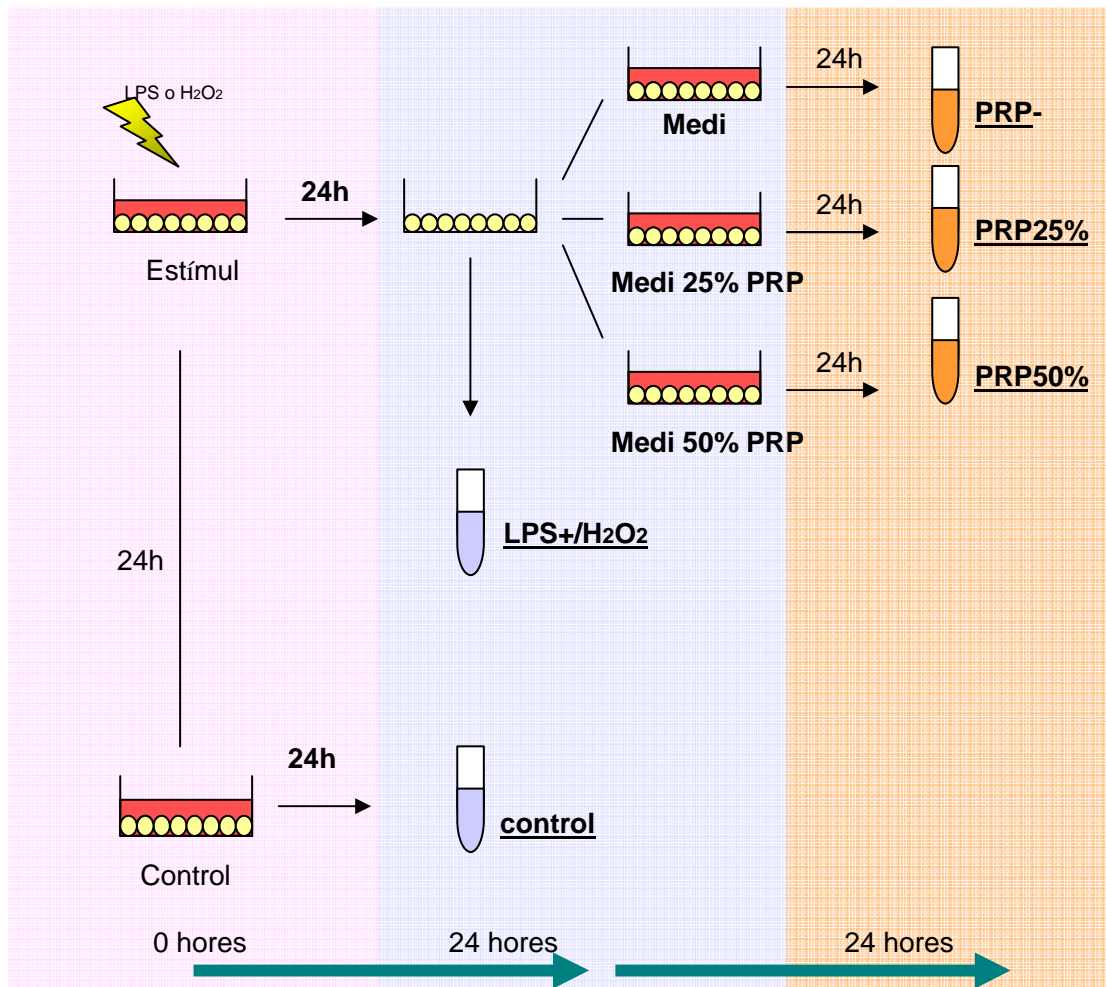


Figura 43. Esquema experimental de la valoració de l'efecte del PRP sobre model in vitro d'estímul amb LPS o d'oxidació. Es duu a terme el model in vitro mitjançant el tractament amb LPS o H₂O₂ durant 24 h. Passat el temps d'estimulació del cultiu es recullen els sobrenadants (blau) i es tracta el cultiu amb PRP (25% o 50%) durant 24 h. Finalitzat el procés es recullen els sobrenadants (taronja). Es determina el contingut de GAGs i citocines en tots els sobrenadants recollits.

8.3.1. Efecte del PRP sobre la capacitat de síntesi de matriu.

L'efecte del PRP sobre la capacitat de síntesi de la matriu s'ha avaluat mitjançant l'anàlisi de la concentració de GAGs en els sobrenadants del cultius abans i després del tractament amb PRP.

En els cultius control, cultius que no han estat tractats amb LPS ni H₂O₂, l'addició al cultiu de PRP provoca un augment en la síntesi de GAGs. La incubació amb 25% de PRP incrementa 6,5 vegades la síntesi de GAGs, mentre que amb 50% de PRP es pot arribar a incrementar fins a 9,3 vegades.

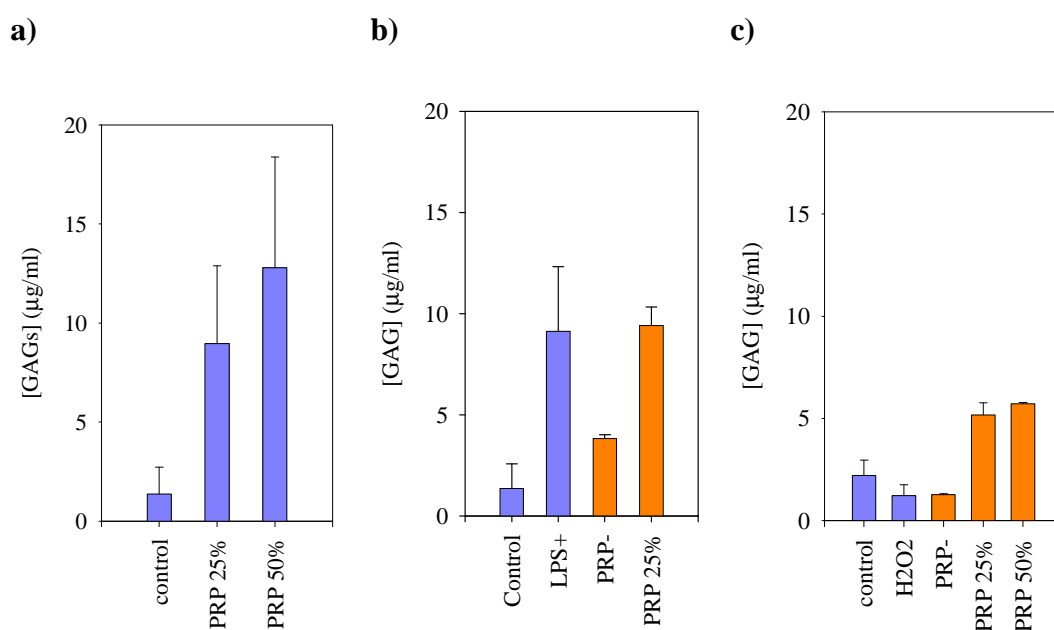


Figura 44. Efecte del PRP sobre la capacitat de síntesi de matriu en condrocits control (a), en el model in vitro d'estímul amb LPS (b) i en el model in vitro d'oxidació (c). Concentració de glicosaminoglicans (GAGs) en sobrenadants de cultius tractats amb PRP. (a) Concentració de GAGs en sobrenadant de cultius tractats amb 0, 25 o 50% PRP. (b) Concentració de GAGs en sobrenadants de cultius tractats amb LPS i posteriorment amb PRP. En el gràfic b) es mostren en blau els nivells de GAG control, de cultius sense tractar o de cultius immediatament després d'haver-se tractat amb LPS. En taronja es mostren els nivells de GAGs en els cultius tractats amb LPS durant 24 h i posteriorment, 24 h amb PRP (25%) o sense (PRP-) (c) Concentració de GAGs en sobrenadants de cultius tractats amb H₂O₂ i posteriorment amb PRP. En el gràfic es mostra en blau els nivells de GAG en els cultius control (cultiu sense tractar o immediatament després d'haver-se tractat amb H₂O₂). En taronja es mostren els nivells de GAGs en cultius tractats amb H₂O₂ durant 24 h i posteriorment 24 h amb PRP (25% o 50%) o sense (PRP-).

A la Figura 44 s'observa com la concentració de GAGs incrementa quan el cultiu s'estimula amb LPS. Quan aquest s'elimina del cultiu i es deixa durant les

següents 24 h els condrocits sense estímul, els nivells de GAGs tornen a revertir una mica, però si s'incuben amb 25% PRP, la concentració de GAG es manté elevada.

A la Figura 44 es mostra com quan s'afegeix PRP en el cultiu oxidat, els nivells de GAGs augmenten, però de forma més discreta que quan el PRP s'afegeix en els cultius control o en els cultius tractats amb LPS. Quan el cultiu oxidat s'incuba amb 25% de PRP el nivell de GAGs en el sobrenadant augmenta 2,3 vegades respecte el control, i quan s'incuba amb 50% de PRP, l'increment és de 2,6 vegades.

8.3.2. Efecte del PRP sobre el perfil de citocines

S'ha avaluat l'efecte del PRP sobre el perfil de citocines IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β , i IL-8 en els diferents cultius. En els cultius control, tal com mostra la Figura 45, el PRP no altera els nivells de IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-1 β en el sobrenadant. En canvi, s'observa un important canvi en la concentració de IL-6 i IL-8 que incrementen 5 i 8 vegades respectivament respecte el control a temps zero, i quan la concentració de PRP s'augmenta fins el 50%, aquest increment és de 8 vegades per la IL-6 i de 10,3 per la IL-8.

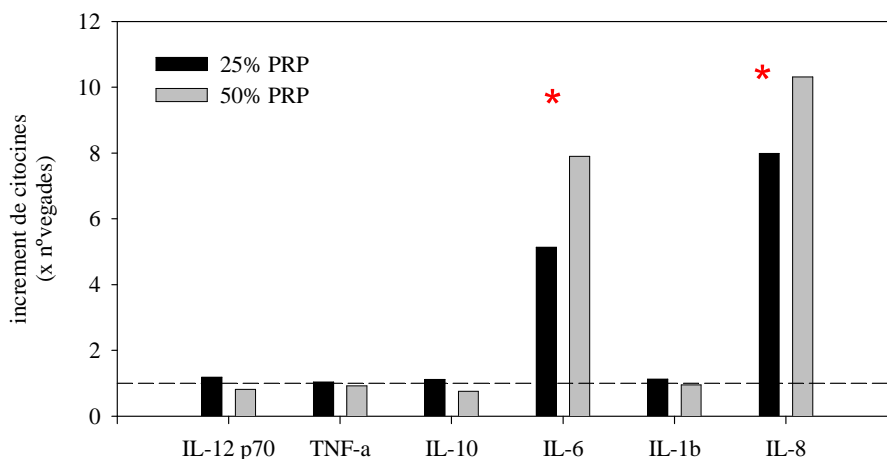


Figura 45. Efecte del PRP sobre el perfil de citocines en cultiu de condrocits. Determinació de la concentració de IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β i IL-8 en sobrenadants de cultiu tractat amb PRP (25% o 50%) durant 24 h. Els resultats s'expressen com a increment respecte el control: (concentració de la citocina en el cultiu tractat amb PRP/concentració de la mateixa citocina en el cultiu control).

Quan s'avalua l'efecte del PRP sobre el model in vitro d'estímul amb LPS, s'observa a la Figura 46, tal com ja s'havia vist en anteriors seccions de resultats, que ni l'addició de LPS, ni l'addició de PRP altera la síntesi de IL-12p70 ni de IL-1 β . En canvi, la incubació dels condrocits amb LPS provoca un augment lleuger de TNF- α i un augment elevat de IL-10. Després de 24 h d'estímul amb LPS i 24 h amb medi complet sense PRP, els nivells de TNF- α tornen a assolir els nivells control, de la mateixa manera que quan s'incuba amb PRP després del tractament amb LPS. La concentració de IL-10 disminueix en els sobrenadants dels cultius després de 24 h sense LPS, però en aquells cultius que s'han tractat amb 25% o 50% de PRP després del tractament amb LPS, la disminució dels nivells de IL-10 és molt més pronunciada.

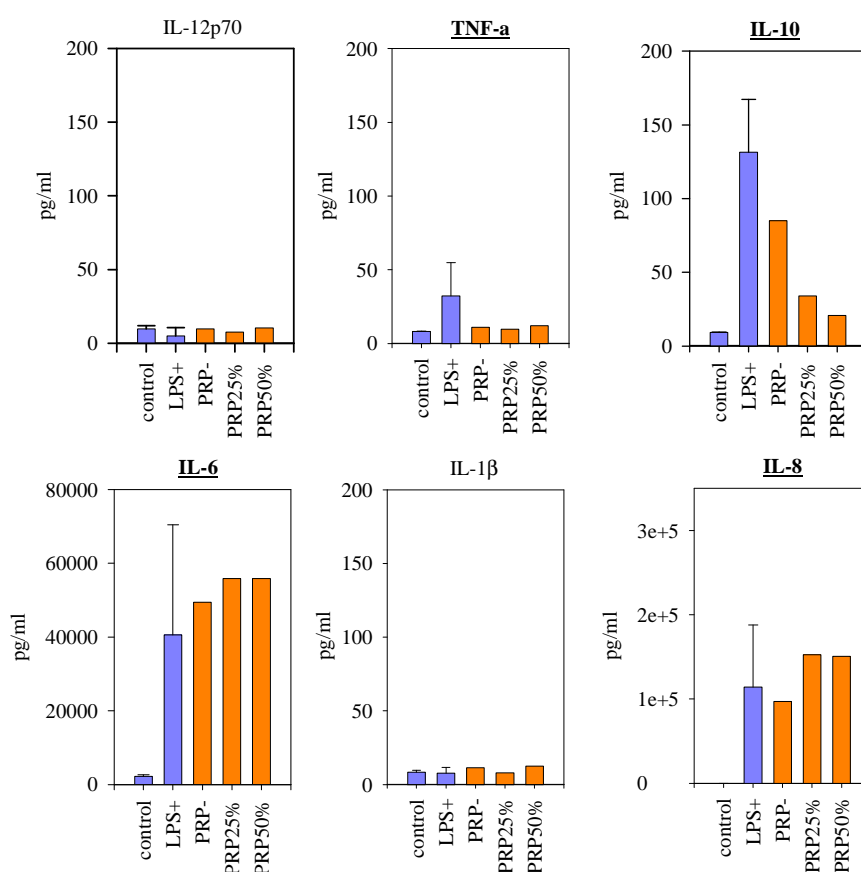


Figura 46. Efecte del PRP sobre el perfil de citocines en model in vitro d'estímul amb LPS. Determinació de la concentració de IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β , IL-8 en sobrenadants de cultiu de condrocits incubats amb LPS (100 μ g/ml) durant 24 h i posteriorment amb medi al 25% o 50% de PRP durant 24 h. Es mostren els nivells de les diferents citocines en el sobrenadant del cultiu sense tractar amb LPS ni amb PRP (control); després de 24 h amb LPS (LPS+); després de 24 h amb LPS seguides de 24 h amb medi (PRP-); després de 24 h amb LPS seguides de 24 h amb 25% PRP (PRP25%) i després de 24 h amb LPS seguides de 24 h amb 50% PRP (PRP50%).

Aquests resultats ens plantejaven si la disminució d'aquestes citocines només la provocava la no presència de LPS en el cultiu, present exclusivament les primeres 24 hores i substituït per medi de cultiu sense LPS les següents 24 hores, o si el PRP també participava en aquesta disminució dels nivells de TNF- α i de IL-10. Per aquesta raó, tal com mostra la Figura 47, vam incubar en altres experiments el cultiu de condrocïts amb LPS (50 o 100 μ g/ml) i PRP (25 i 50%) simultàniament i després de 24 h es van analitzar les citocines en els sobrenadants de la mateixa manera que en l'assaig anterior.

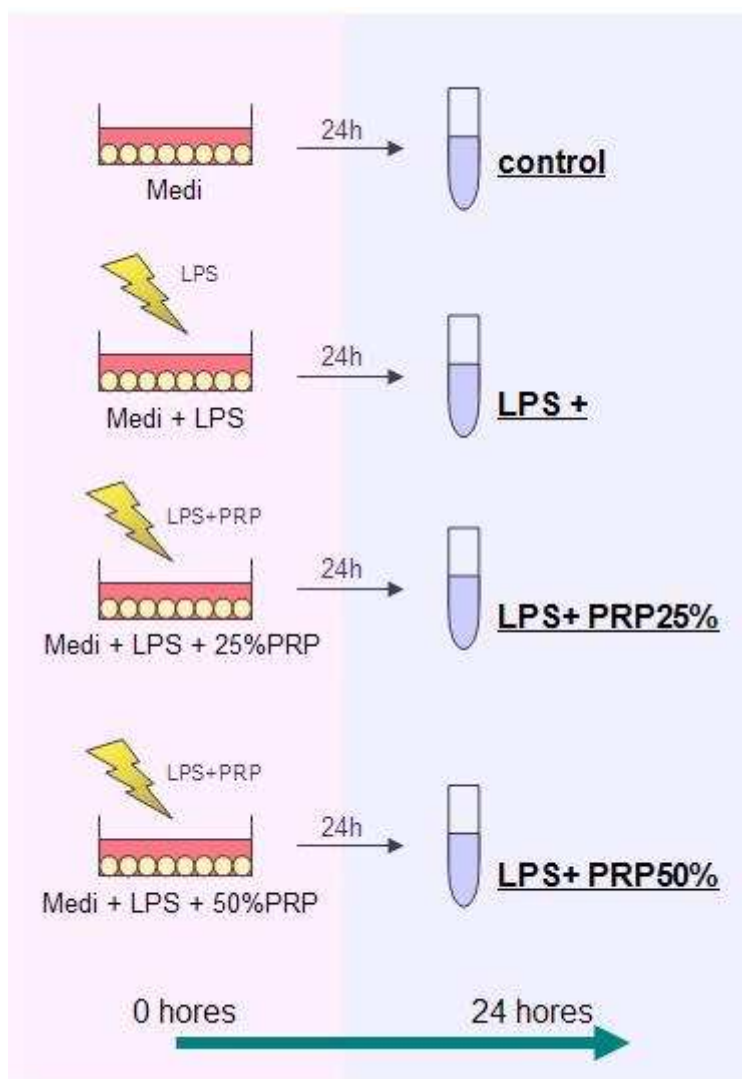


Figura 47. Esquema experimental de la valoració de l'efecte del PRP tractat conjuntament amb LPS sobre cultiu de condrocïts. Es tracta el cultiu de condrocïts conjuntament amb LPS (100 μ g/ml) i PRP (25% o 50%) durant 24 h i es determina la concentració de GAGs i citocines en els sobrenadants.

A la Figura 48 es mostra com la presència de PRP en un cultiu amb LPS manté els nivells de TNF- α normals, per tant sembla que el PRP sí participa en el restabliment dels nivells control de TNF- α en el cultiu de condrocits incubats amb LPS.

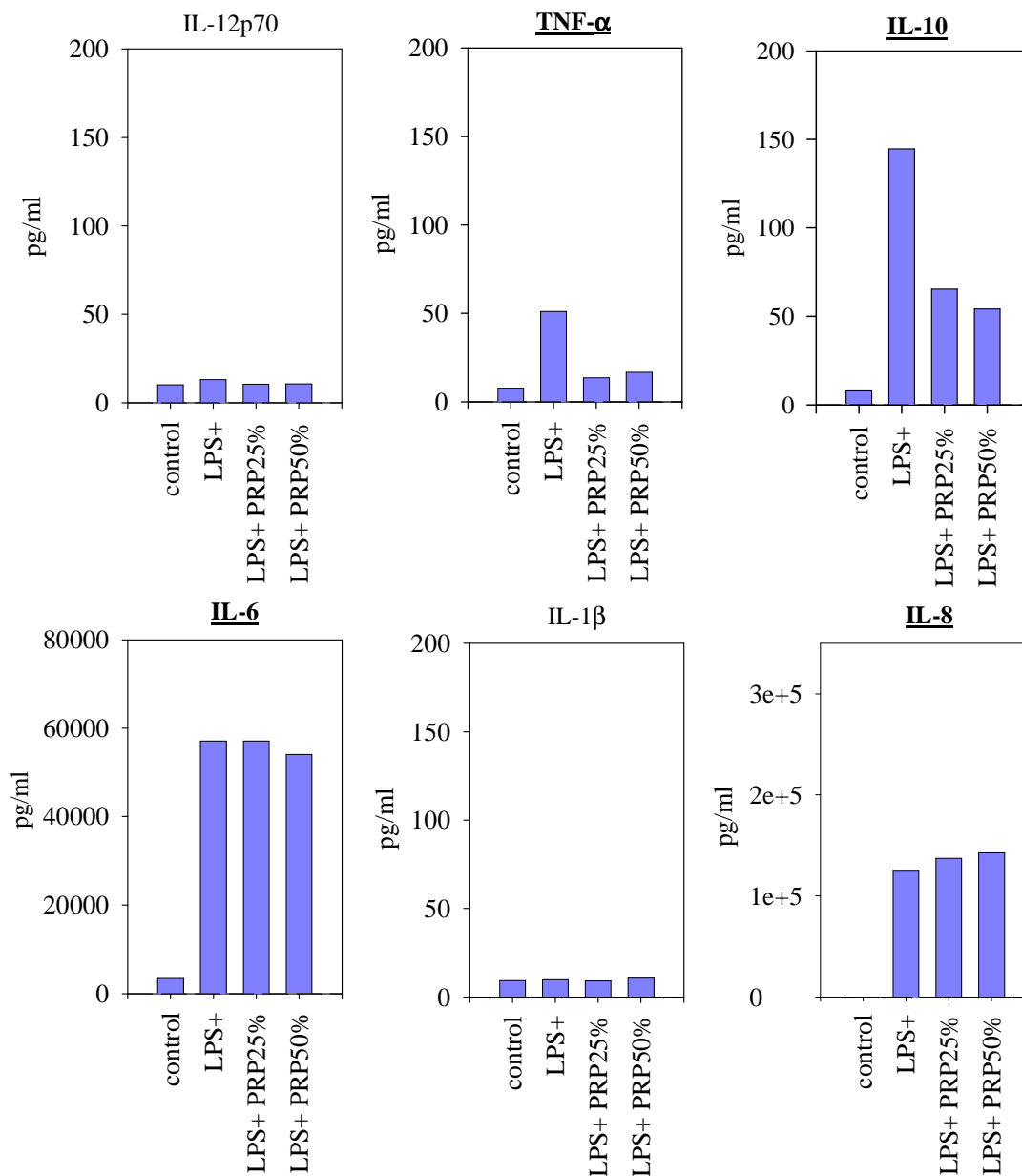


Figura 48. Efecte del PRP sobre el perfil de citocines quan es tracta el cultiu de condrocits conjuntament amb LPS. Concentració de IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β , IL-8 en sobrenadants de cultiu de condrocits tractats simultàniament amb LPS (100 μ g/ml) i PRP (25%) durant 24 h. Es mostren els valors de les diferents citocines en els sobrenadants sense tractar (control); tractats únicament amb 100 μ g/ml LPS (LPS+); tractats simultàniament amb LPS (100 μ g/ml) i PRP (25%) (LPS+PRP 25%) i tractats simultàniament amb LPS (100 μ g/ml) i PRP (50%) (LPS+PRP 50%).

En el cas de la IL-10, com ja s'havia vist en els experiments anteriors (Figura 46), la concentració de la citocina en el sobrenadant del cultiu disminueix lleugerament només eliminant el LPS del medi, però en aquells cultius tractats amb PRP després de l'estimulació amb LPS, la disminució dels nivells de IL-10 és molt més pronunciada, essent encara major a mesura que s'afegeix més PRP al medi. Quan s'observen els resultats de la incubació del PRP simultani al LPS (Figura 48), es corrobora que el PRP fa disminuir la concentració de IL-10 en sobrenadants de cultiu de condrocits estimulats amb LPS, tot i que ni amb el 50% de PRP es restableix els nivells control. Per tant, el PRP provoca els mateixos efectes sobre el cultiu de condrocits quan es tracta després de l'estimulació amb LPS que quan s'incuba el cultiu conjuntament amb PRP i LPS.

La concentració de IL-6 i IL-8 augmenta molt considerablement tant si el cultiu s'estimula amb LPS, com quan s'afegeix PRP. A les Figures 46 i 48 s'observa com en tots els casos els nivells d'aquestes citocines són molt elevats respecte el control, fins i tot després de les 24 h sense estímulo posteriors a la incubació amb LPS, la IL-6 i la IL-8 es mantenen altes.

En valorar l'efecte del PRP sobre el model in vitro d'oxidació, cal recordar els resultats que s'han exposat en l'apartat 7.2.3 els quals indicaven que, amb les condicions i metodologia utilitzades, la incubació amb H₂O₂ no causava cap efecte sobre la concentració de les citocines analitzades en el cultiu. Es vol avaluar, doncs, si el PRP té capacitat de generar algun efecte, com en els cultius control, tot i la oxidació de les cèl·lules.

La concentració de IL-12p70, TNF- α , IL-10 i IL-1 β en el sobrenadant no es veu alterada ni per l'acció de l'H₂O₂, ni del PRP, com es pot veure a la Figura 49. En canvi, l'addició de PRP en el cultiu oxidat provoca un lleuger augment de la IL-6 (1,5 vegades quan s'incuba amb PRP 25% i de 1,9 vegades amb el PRP 50%) i una mica més considerable de la IL-8 (4,5 i 6,3 vegades pel PRP 25% i 50% respectivament).

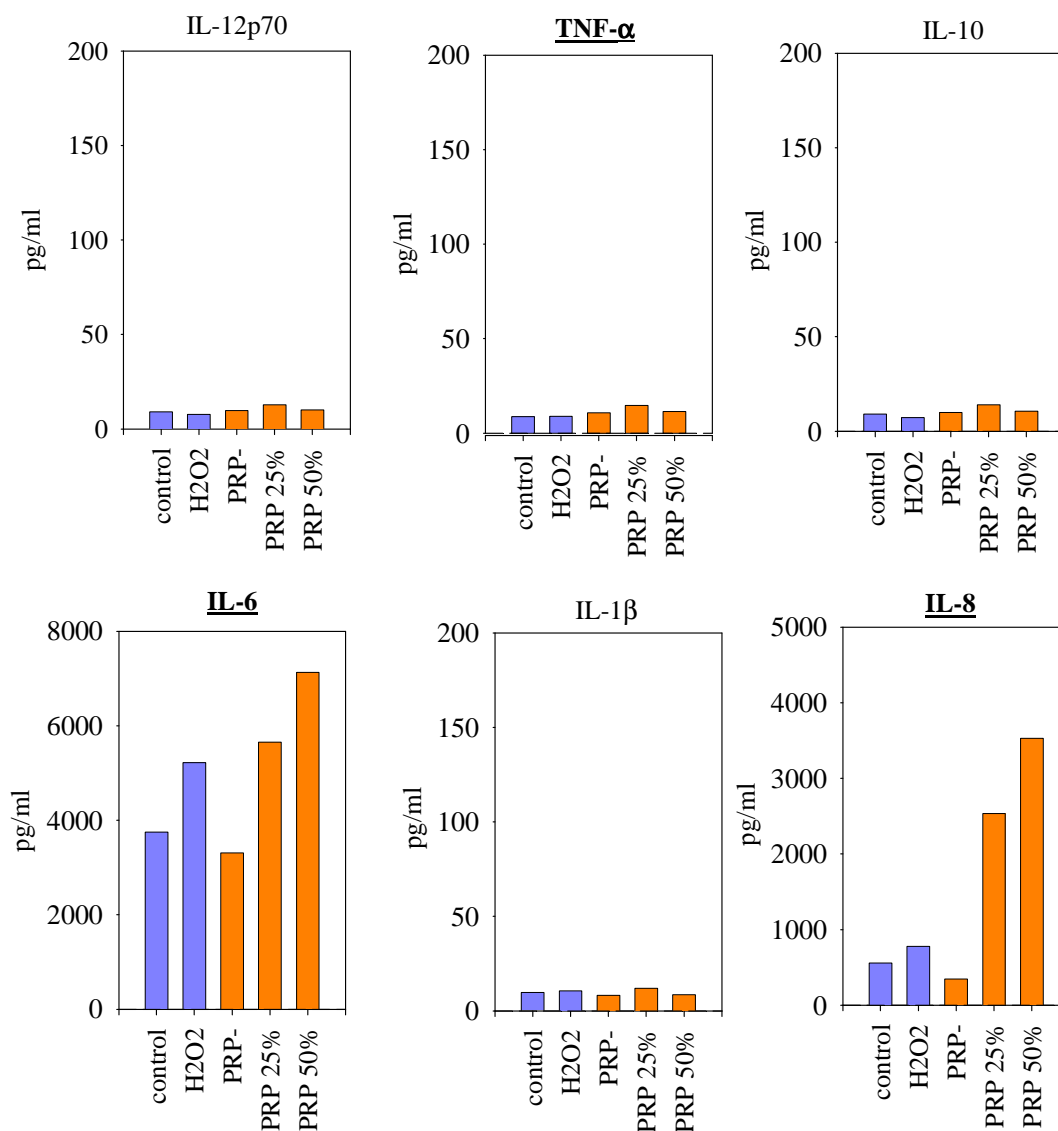


Figura 49. Efecte del PRP sobre el perfil de citocines en un model in vitro d'oxidació. Concentració de IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β , IL-8 en sobrenadants de cultiu de condrocits tractats amb H₂O₂ (1 mM) durant 24 h i posteriorment amb PRP (25% o 50%) durant 24 h. Es mostren els valors de les diferents citocines en el sobrenadant del cultiu sense tractar amb H₂O₂ ni amb PRP (control); després de 24 h amb H₂O₂ (H₂O₂⁺); després de 24 h amb H₂O₂ seguides de 24 h amb medi (PRP⁻); després de 24 h amb H₂O₂ seguides de 24 h amb 25% PRP (PRP25%) i després de 24 h amb H₂O₂ seguides de 24 h amb 50% PRP (PRP50%).

RESULTATS

A la Figura 50 es mostra l'efecte del PRP sobre el cultiu de condrocits control i sobre el cultiu oxidat amb H_2O_2 , avaluant la síntesi de GAGs i de diferents citocines. Es pot observar com l'efecte del PRP (25% i 50%) sempre és menor sobre les cèl·lules oxidades amb 1 mM H_2O_2 que sobre les cèl·lules control.

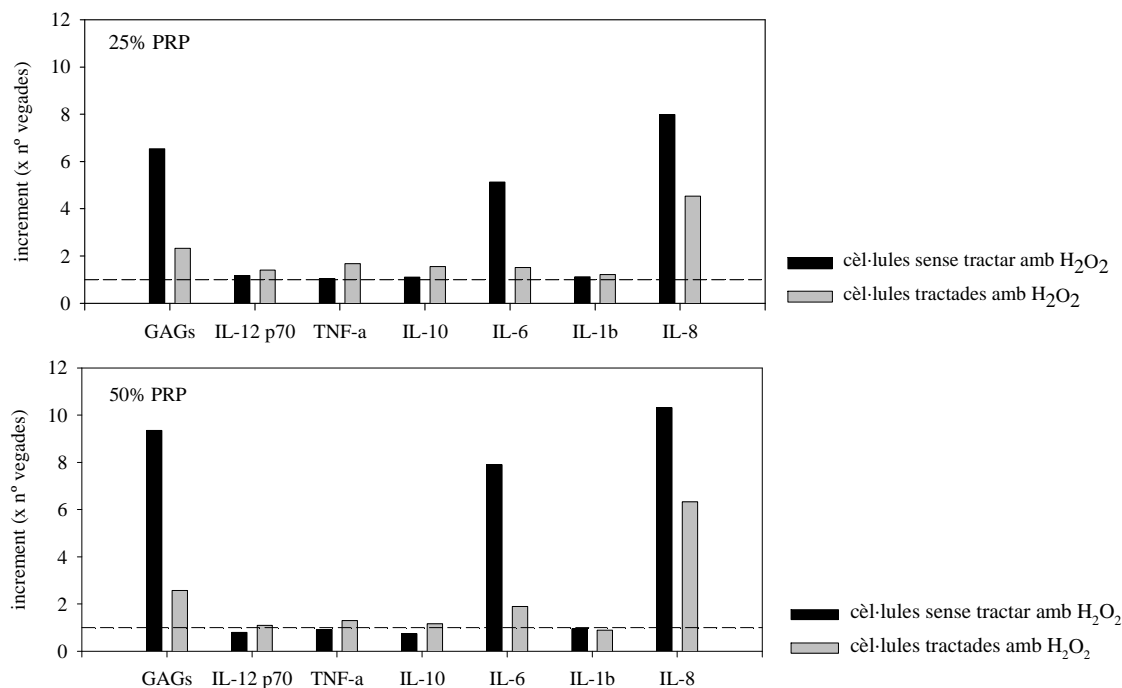


Figura 50. Comparació de l'efecte del PRP sobre condrocits oxidats o no oxidats. Concentració de GAGs i citocines (IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β , IL-8) en sobrenadants de cultius de condrocits control (barres negres) i en sobrenadants de cultius de condrocits oxidats amb H_2O_2 (1 mM) durant 24 h (barres grises)

Recollint els resultats més rellevants en relació a la síntesi de citocines en el nostre model in vitro de dany articular (LPS- H_2O_2), es pot observar com el TNF- α , la IL-10, IL-6 i IL-8 són, de les citocines avaluades, les que més responen als diferents estímuls estudiats. Cal remarcar, tal com es mostra a la Figura 51, que el LPS provoca uns efectes molt més elevats en els condrocits que l' H_2O_2 . També es valora molt millor l'efecte del PRP sobre condrocits tractats amb LPS que no pas amb H_2O_2 .

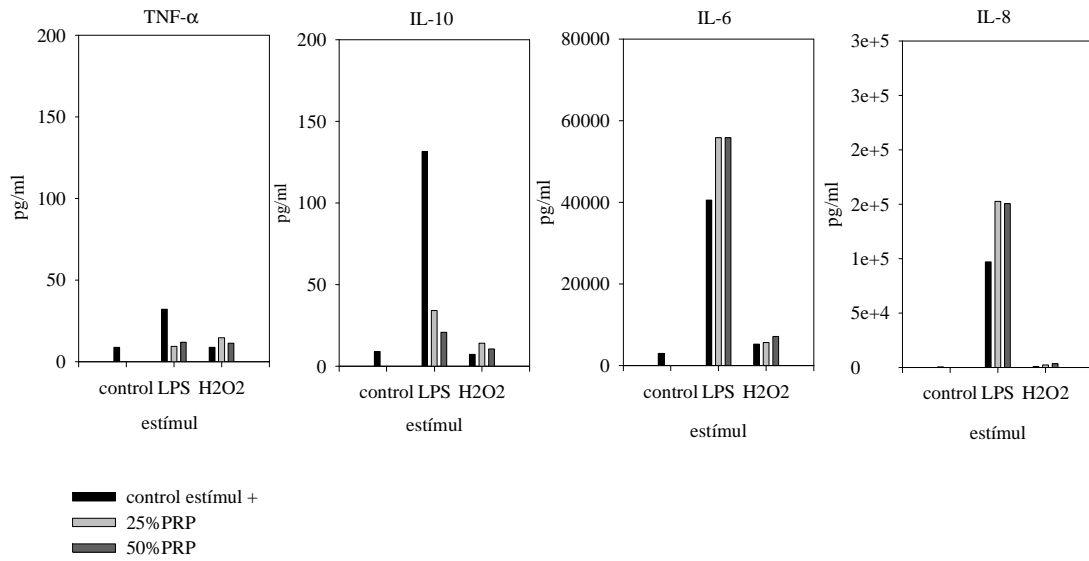


Figura 51. Comparació de l'efecte del PRP sobre un model in vitro d'estímul amb LPS i un model in vitro d'oxidació. Concentració de TNF- α , IL-10, IL-6 i IL-8 en sobrenadants de cultius que han rebut diferents tractaments: LPS o H₂O₂ (barra negra); LPS o H₂O₂ seguit de 25% PRP (barra gris clar); LPS o H₂O₂ seguit de 50% PRP (barra gris fosc)

DISCUSSIÓ

Davant els bons resultats clínics en l'aplicació de concentrats de plaquetes en lesions articulars i el poc coneixement sobre els mecanismes que ho fan possible, un dels objectius principals d'aquest treball ha estat avaluar l'efecte del plasma ric en plaquetes sobre condrocits en cultiu en una situació d'agressió, sigui causada per l'estímul amb LPS o per l'oxidació amb H₂O₂.

EL CULTIU DE CONDRÒCITS:

Els condrocits del cartílag articular, quan es cultiven in vitro, sintetitzen glicosaminoglicans (GAGs) i algunes citocines de forma constitutiva tal com s'ha vist en aquest estudi. Per establir el model in vitro s'han escollit aquelles condicions que assegurin que les cèl·lules estan adherides a la placa de cultiu i que desenvolupen la seva funció de síntesi de molècules de la matriu extracel·lular com són els GAGs. Tal com mostren els resultats, la presència de GAGs es detecta en els sobrenadants després de 24 h de cultiu, fet que indica que a partir d'aquest temps les cèl·lules estan en bones condicions i és quan s'estableix el model in vitro.

Les citocines que s'expressen de forma constitutiva en els condrocits en cultiu, segons els nostres resultats, són la IL-6, la IL-8 i el factor de creixement TGF- β d'entre les diferents molècules analitzades, ja que es detecten en sobrenadants de cultius que no han rebut cap tipus d'estímul i el medi de cultiu amb el lot de sèrum fetal emprat no presenta nivells de citocines detectables. Ja abans, Guerne, P.A et al.[6] i Merz et al. [118] havien descrit l'expressió de IL-6 i IL-8 respectivament en condrocits en cultiu, però no de TGF- β . Aida et al. [119] i Sandell et al. [120] també determinen expressió de IL-8, però únicament en condrocits que han rebut algun tipus d'estímul. Els nivells d'expressió de IL-8 en els nostres resultats varien molt entre els condrocits control i els estimulats. En el nostre estudi s'observa que l'estímul amb 100 μ g/ml LPS durant 24 h incrementa fins unes 400 vegades la síntesi de IL-8. En els estudis de Sandell et al. s'ha vist com la IL-1 β també estimula de forma important l'expressió de IL-8 [120]. Aquestes diferències en l'ordre de magnitud de l'expressió de IL-8 en condrocits estimulats respecte els control és el que probablement porti a considerar a autors com Sandell et al. que l'expressió de IL-8 en els condrocits és duguï a terme únicament com a resposta a l'estímul.

El TGF- β s'ha descrit com una molècula que es troba de forma normal en el cartílag i que està involucrada en el creixement i diferenciació del teixit [6]. Són bastants els estudis que avaluen el paper d'aquest factor de creixement sobre l'activitat dels condrocits en cultiu, però són molt pocs els que estudien la seva expressió in vitro en condrocits sota diferents condicions [121-123]. En aquest treball s'ha fet palesa l'especial importància dels condrocits en la síntesi de TGF- β i com aquesta capacitat es pot veure alterada per algun estímul. Aquest fet, clarament evident a partir dels nostres resultats, ens fa pensar que en el cartílag in vivo els condrocits exerceixen un paper important en el subministrament de TGF- β en el teixit i que la seva disminució pot tenir conseqüències en el desenvolupament dels processos patològics.

En aquest treball s'ha volgut comparar el comportament in vitro de condrocits que prèviament havien estat congelats, amb els cultivats directament a partir de biòpsies de cartílag. Des del punt de vista de síntesi de GAGs i de citocines no s'han observat diferències significatives entre uns cultius i altres, per tant, el seu comportament i activitat in vitro es pot considerar indistint. Des del punt de vista metodològic és una dada important ja que una de les limitacions dels estudis amb cultius primaris de condrocits és la disponibilitat de teixit i la duplicació/proliferació limitada de les cèl·lules que, amb el temps, es diferencien a fibroblastos. L'obtenció de biòpsies sovint està condicionada a la realització d'intervencions quirúrgiques amb un calendari establert i una molt bona coordinació entre l'equip mèdic de l'hospital i l'equip de recerca. Poder congelar els condrocits prèviament al seu ús experimental pot permetre un millor disseny experimental, evitant refusar biòpsies en èpoques de moltes operacions i poder seguir realitzant cultius quan no hi hagin biòpsies disponibles. Xia et al. [124] estudien l'efecte de la criopreservació en la viabilitat i proliferació dels condrocits i observen que tant el valor de la viabilitat, com de la proliferació és menor quan els condrocits han estat congelats. En el nostre estudi s'ha valorat la viabilitat dels cultius i no s'han observat diferències apreciables entre els cultius que s'havien realitzat amb condrocits prèviament congelats o amb condrocits frescos. Però tampoc seria un inconvenient per l'objectiu del nostre estudi que la viabilitat i proliferació fos menor, com anuncia Xia et al. [124], ja que el que interessa és que, un cop establert el cultiu, els condrocits tinguin el mateix comportament en síntesi de GAGs i de citocines, qüestió que s'afirma en els nostres resultats. Andreas et al., en els seus experiments, realitzen

els cultius primaris de condrocits amb cèl·lules prèviament congelades, fet que tampoc condiciona els seus resultats [125] i els permet un millor disseny experimental.

EFFECTE DEL LPS SOBRE CULTIUS PRIMARIS DE CONDRÒCITS:

Quan els condrocits s'estimulen amb LPS s'observa un increment important de GAGs en el sobrenadant dels cultius. En l'estudi realitzat per Sun et al. sobre condrocits de rata no s'observa el mateix. Ells descriuen que el LPS provoca la disminució de la síntesi de GAGs en condrocits en cultiu en el sisè dia de tractament amb el LPS, però prèviament observen que a les 48 h de tractament amb LPS la vitalitat dels condrocits disminueix notablement [126]. Per tant, la disminució en la síntesi de GAGs probablement sigui conseqüència de la baixa vitalitat cel·lular i no una conseqüència directa del LPS. En les nostres condicions de treball, la vitalitat cel·lular dels cultius de condrocits no disminueix quan es tracten amb LPS, i l'increment de la síntesi de GAGs s'observa fins a les 72 h de cultiu (veure Figura 26 de Resultats). Bobacz et al. descriuen també, als 5 dies de tractament de cultiu de condrocits de ratolí amb LPS, una disminució de la síntesi de GAGs, que relacionen directament amb l'estimulació dels receptors toll-like (TLR) [9]. Observen també en aquest treball que l'expressió d'alguns TLR (TLR-7) en condrocits humans està condicionada a l'edat. Com més elevada és l'edat menys expressió de TLR s'observa en els condrocits, concretament, a partir dels 30-35 anys el TLR-7 deixa d'expressar-se [9]. Està àmpliament descrit que amb l'edat es perd la capacitat de renovació de la matriu cartilaginosa [26, 127]. Per tant aquest fet donaria suport a què el LPS pogués estimular la síntesi de GAGs ja que, si la síntesi de GAGs s'accentua per l'estimulació de TLR, quan aquests no s'expressen, no es pot produir l'estímul que porta a la síntesi de GAGs i per tant la síntesi de matriu extracel·lular disminueix.

Un altre fet que podria explicar la inducció de la síntesi de GAGs pel LPS en condrocits podria ser la seva naturalesa. El LPS és un patró molecular de la superfície de molts patògens i la resposta via TLR està, evolutivament parlant, dissenyada per fer front i protegir l'organisme de la invasió de bacteris patògens gram negatius. Quan la cèl·lula rep l'estímul pels seus receptors de membrana TLR, a part de desencadenar altres respostes, la cèl·lula estimularia la síntesi de matriu extracel·lular com a mecanisme de protecció mitjançant barrera física. També s'ha descrit la capacitat de les molècules de la matriu extracel·lular d'estimular els receptors toll-like (TLR) [128].

Aquest mecanisme és el que utilitzarien els condrocits com a indicador de la degradació de la matriu cartilaginosa al que respondrien amb l'increment de la síntesi de molècules de la matriu extracel·lular com els GAGs, ja que una de les funcions del cartílag és el manteniment de la homeòstasi del teixit.

Campo et al. identifiquen la capacitat dels GAGs en contrarestar els efectes del LPS sobre la síntesi de citocines inflamatòries i enzims catalítics en el cultiu de condrocits [129]. Els resultats obtinguts en aquest estudi, en els quals s'observa un increment en la síntesi de GAGs en condrocits estimulats amb LPS, indicarien que els GAGs poden participar en la regulació de la resposta induïda per LPS utilitzant un mecanisme de feedback negatiu.

En els nostres experiments hem observat que els condrocits expressen IL-6, IL-8 i TGF- β de manera constitutiva. Quan s'estimulen els cultius amb LPS, els nivells de IL-6 i IL-8 s'incrementen, mentre que la síntesi de TGF- β disminueix. L'increment de IL-8 en el sobrenadant del cultiu tractat amb LPS és molt notable respecte als cultius de condrocits sense tractar, i tal com ja s'ha comentat anteriorment, sigui probablement per aquest fet que en altres publicacions es considera que la síntesi de IL-8 s'activa amb l'estimulació dels condrocits [119, 120].

L'augment de IL-6 s'ha descrit en altres treballs [6, 10, 129]. Majoritàriament la IL-6 té efectes pro-inflamatoris ja que propicia el reclutament de monòcits i estimula la diferenciació i creixement de cèl·lules T i B (Janeway, 1994). Sobre els condrocits, els efectes de la IL-6 són incerts, ja que alguns autors descriuen que inhibeix la proliferació dels condrocits en cultiu i disminueix la síntesi de proteoglicans [130], mentre que altres no observen que tingui cap d'aquests efectes [131, 132], però observen que estimula la síntesi d'inhibidors tissulars de metal·loproteases (TIMPs) [133]. Per aquest motiu Guerne et al. [6] postulen que la IL-6 pot participar de l'homeòstasi del cartílag, la qual cosa seria coherent amb les observacions de Fernandes et al. [32] que descriuen com la IL-6 actua de forma diferent en funció de l'entorn on es trobi, és a dir, en funció del perfil de citocines i altres molècules amb les que es coexpressi. El ratolí *knockout* per l'expressió de la IL-6 perd la capacitat de reparar ferides cutànies [134] i en estudis sobre regeneració de lesions de teixit cardíac s'ha vist que la IL-6 és capaç de modular fenotípicament l'expressió gènica d'uns quants tipus cel·lulars involucrats en la cura de

l'infart [135]. Aquesta capacitat pro-reparadora podria explicar l'increment d'aquesta citocina com a resposta a un estímul com el LPS.

La disminució de la síntesi de TGF- β observat en aquest treball com a conseqüència de l'estímul dels condrocits amb LPS pot tenir un significat rellevant en l'estudi de patologies degeneratives articulars com l'osteoartritis, o en el model *in vitro*, tal com aprofundirem més endavant. No hem trobat referències bibliogràfiques que mostrin l'efecte del LPS sobre la síntesi de TGF- β en condrocits en cultiu, la qual cosa indica que és una qüestió poc estudiada tot i la seva importància. Sniekers et al però, realitzen un model *in vitro* d'osteoartritis induït amb iodoacetat i observen també una disminució de l'expressió del TGF- β en els condrocits [121], fet que suggereix que el TGF- β pot jugar un paper clau en el desenvolupament de la patologia. El dèficit en la síntesi de TGF- β pot ser un dels causants de que es desenvolupi i perpetui el dany en el cartílag, situació que es podria revertir amb un aportament exogen de TGF- β , tal com s'avalua en el nostre estudi.

En altres models cel·lulars no realitzats sobre condrocits sí s'ha mirat l'efecte del LPS sobre la síntesi de TGF- β . Sobre cèl·lules de microglia el LPS no provoca canvis significatius en l'expressió de TGF- β [136], mentre que en cèl·lules tumorals PC3 el LPS indueix la síntesi de TGF- β [137]. Cal remarcar la característica de les cèl·lules tumorals que es divideixen de forma aberrant i es poden considerar immortals, totalment contrari als condrocits osteoartrítics amb major mortalitat que els normals. Potser no és del tot casual que un increment en la síntesi de TGF- β estigui relacionada amb la "immortalitat" cel·lular mentre que el dèficit en la síntesi d'aquet factor de creixement condueixi a una major mortalitat.

Havent observat aquesta disminució de la síntesi de TGF- β en condrocits tractats amb LPS *in vitro*, resultaria de gran interès saber si els condrocits de cartílags articulars danyats també sintetitzen *in vivo* menys TGF- β que els condrocits de cartílags sans. No hem trobat referències bibliogràfiques al respecte ni en les quals comparin els nivells de TGF- β en líquid sinovial d'articulacions sanes amb les osteoartrítics o d'artritis reumatoide, factor que podria donar molta informació del curs de la patologia. Com ja s'ha comentat anteriorment, Sniekers et al., en un model cel·lular d'osteoartritis induïda amb iodoacetat, troben que l'expressió de TGF- β també baixa [121], la qual cosa

reforçaria la idea que la disminució del TGF- β podria ser una de les causes del desenvolupament de la patologia. Pohlers et al. estudien l'expressió de les proteïnes de les vies de senyalització de TGF- β en fibroblastos sinovials d'individus amb artritis reumatoide (AR) i osteoartritis (OA) [138], però no ho estudien en individus sans, qüestió que hauria aportat dades importants per a poder entendre una mica millor el paper del TGF- β en aquest tipus de patologies. Segons Pohlers et al., receptors de TGF- β 1 i proteïnes de les seves rutes de senyalització estan sobreexpressats en cèl·lules sinovials d'individus amb AR respecte als dels individus amb OA [138]. Aquesta observació remarca la diferent naturalesa de les dues patologies, remarcant que en la osteoartritis, que es caracteritza pel desgast del teixit, existeix menys activitat del TGF- β , mentre que en una patologia com la artritis reumatoide clarament autoimmunitària l'activitat del TGF- β es presenta més elevada. Seria important, doncs, que es realitzessin estudis *in vivo* per avaluar la síntesi de TGF- β en cartílags sans i comparar-ho amb la síntesi de TGF- β de cartílags danyats. Si la disminució de TGF- β que s'observa en el nostre model *in vitro* tractat amb LPS, també s'observés *in vivo*, donaria molta informació sobre el curs de la patologia i seria de gran utilitat per al diagnòstic i correcte tractament de la lesió.

En altres estudis s'ha relacionat una disminució de la síntesi de TGF- β i una menor capacitat de resposta davant d'aquest factor de creixement amb l'edat [14, 26], essent l'edat el factor de risc més clar per malalties com l'osteoartritis [14, 30]. A més a més es reconeix el paper del TGF- β com a inhibidor de l'última diferenciació terminal en els condrocits del cartílag articular [14], cosa que els permet mantenir-se en un estat pre-hipertròfic. Quan es perd el bloqueig via ALK5 (receptor tipus I de TGF- β), els condrocits reprenen la seva maduració i s'encaminen cap a la diferenciació terminal. Amb aquesta última diferenciació, els condrocits prenen el fenotip hipertròfic (síntesi de col·lagen X, de metal·loproteases que degraden la matriu), fet que condiciona l'entorn cap al desenvolupament d'artrosi. D'aquesta manera, és considerat rellevant la disminució de la síntesi de TGF- β en condrocits tractats amb LPS, ja que pot ajudar a entendre el desenvolupament i transcurs de la patologia.

A més de la IL-6, IL-8 i TGF- β , ens hem fixat en altres citocines. Després de la incubació del cultiu amb LPS durant 24 h observem un augment de la citocina reguladora IL-10 i un lleuger increment de la pro-inflamatòria TNF- α . (Figura 27 de

l'apartat Resultats). Campo et al. observen també en els seus resultats un increment en la síntesi de TNF- α provocada per l'estímul amb LPS [129]. És important fixar-se en la cinètica d'expressió del TNF- α , ja que és una molècula que, conjuntament amb la IL-1 β , està directament implicada en l'osteoartritis i la degradació del cartílag en general [45, 139-141]. En diferents estudis, s'hagin realitzat in vitro [120] o in vivo [139, 142] s'observa que la primera citocina que s'expressa com a resposta a un estímul "inflamatori" és el TNF- α . Aquesta citocina presenta un pic d'expressió a temps curts, retornant pràcticament a nivells normals quan altres citocines encara es troben sobreexpressades.

Nosaltres observem un increment de TNF- α a les 2 h d'incubació amb LPS amb un màxim de concentració en el sobrenadant a les 8 h (veure Figura 29 de l'apartat Resultats). A les 24 h els nivells de TNF- α en el sobrenadant han disminuït fins a la meitat del seu màxim. Per aquest motiu, quan es descriu el perfil de citocines del model establert amb un estímul de LPS durant 24 h, pràcticament no s'observen diferències de concentració de TNF- α respecte els cultius control. Això no vol dir, però, que no s'hagi expressat ni desenvolupat la seva funció. Diferents autors han descrit que el TNF- α incrementa els nivells de IL-6 [6, 9], de IL-10 [139, 143] i PGE₂ [144] i incrementa l'apoptosi en els condrocits [145]. Per tant, és molt probable que el TNF- α , que es troba en concentració màxima a les 8 h de tractament del cultiu amb LPS, actui mantenint els nivells elevats de IL-6 i provoqui l'increment de la IL-10. Moretti et al. descriuen que el TNF- α estimula l'expressió de IL-10 en sinovitis d'artritis reumatoide [143], fet que reafirma la interrelació entre les dues citocines.

John et al. descriuen que la IL-10 contraresta els efectes apoptòtics del TNF- α sobre els condrocits [145]. En els treballs de Müller et al. es descriu com la IL-10 contraresta la disminució de col·lagen induïda per TNF- α en els condrocits, així com la síntesi de MMPs i de citocines proinflamatòries [146]. Concretament es mostra com la IL-10 inhibeix parcialment l'expressió de TNF- α i IL-1 β induïda per TNF- α . Aquest fet podria explicar també el que s'ha vist en aquest estudi: a mesura que augmenta la IL-10 en el sobrenadant, els nivells de TNF- α disminueixen. D'aquesta manera, la relació entre TNF- α i IL-10, podria actuar com un mecanisme de control de la pròpia resposta inflamatòria essent important que els nivells de TNF- α no es mantinguin elevats al llarg del temps, ja que és una molècula que es relaciona amb la fase aguda de la resposta

inflamatòria [33]. Iannone et al. observen que els condrocits osteoartrítics expressen més IL-10 que els sans, i com més danyat estigui el cartílag, més IL-10 intracel·lular es detecta [7], probablement com a mostra d'una major necessitat del teixit de contrarestar els efectes inflamatoris de la patologia.

Si es compara el perfil de citocines que es genera en el nostre model in vitro de condrocits tractats amb LPS amb el que es troba en líquid o teixit sinovial d'articulacions osteoartrítics, s'observa que el perfil de citocines és molt similar, coincidint amb la sobreexpressió de IL-6, IL-8, TNF- α i IL-10 [32, 33]. De les citocines característiques de patologies articulars degeneratives únicament la IL-1 β no s'ha pogut descriure a través de la metodologia utilitzada en aquest treball. Segons especifica la casa comercial de l'assaig utilitzat per realitzar la quantificació de les diferents citocines (Ref. 551811, BD Biosciences, San Diego, CA), la sensibilitat de detecció de la IL-1 β per aquest assaig és menor que per la resta de citocines. Amb les condicions establertes no hem quantificat IL-1 β en els sobrenadants dels cultius.

EFFECTE DE L'H₂O₂ SOBRE CULTIUS PRIMARIS DE CONDRÒCITS:

L'oxidació es relaciona amb moltes patologies, així com amb artritis reumatoide i osteoartritis [147-149]. Les espècies reactives d'oxigen (ROS de l'anglès reactive oxygen species) participen directament danyant els components de la matriu i com a molècules efectores en la inflamació i la immunitat [147].

Quan els condrocits es cultiven en un medi oxidatiu, hem observat que sintetitzen menys glicosaminoglicans. En determinar els nivells de GAGs en els sobrenadants de cultius tractats amb H₂O₂ durant 24 h, sovint la concentració es troba al límit de detecció de la tècnica utilitzada i, a diferència de quan els condrocits es tracten amb LPS, s'observa la tendència a una disminució de la síntesi de GAGs provocada per l' H₂O₂. La cinètica de síntesi de GAGs en condrocits durant 24 h de cultiu remarca els diferents efectes que té el LPS i l'H₂O₂ sobre la síntesi de GAGs. Mentre que l'estímul de LPS accelera i augmenta la síntesi de GAG, l'H₂O₂ l'alenteix i la disminueix. Diferents autors han descrit els efectes de l'H₂O₂ en la disminució de la capacitat sintètica dels condrocits observant una disminució de la síntesi de proteoglicans [150, 151] i col·lagen II [152]. També han relacionat l'efecte de l'H₂O₂ amb l'activació de l'expressió de metal·loproteases MMP-1 i MMP-3 [152].

Segons els nostres resultats, no sembla que l'aigua oxigenada tingui un efecte apreciable sobre la síntesi de les citocines analitzades en els condrocits, perquè s'observa el mateix perfil d'expressió de citocines constitutives que en els condrocits control. En cèl·lules epitelials Lakshminarayanan et al. [153] observen que l'H₂O₂ estimula l'expressió de IL-8 a diferència de les cèl·lules endotelials, la qual cosa mostra que diferents tipus cel·lulars responen de manera diferent a l'H₂O₂. Sobre condrocits no hem trobat altres estudis que determinin l'expressió de citocines en cultius tractats amb H₂O₂.

Un efecte àmpliament descrit de l'H₂O₂ sobre els condrocits en cultiu és la inducció de senescència i apoptosi [150, 154-156]. En el model establert s'ha treballat amb concentracions de H₂O₂ que no fossin citotòxiques pels condrocits, és a dir, que la seva vitalitat (mesurada com activitat mitocondrial mitjançant assaig MTT) es mantingués com a mínim al 80% respecte del control. En altres estudis del nostre grup realitzats sobre cèl·lules endometrials s'ha observat la inducció de l'activitat caspasa-3 d'una manera dosi-depenent a la concentració de H₂O₂, però en concentracions d'H₂O₂ que provocaven vitalitats baixes als cultius (resultats de Tesis Doctoral de S. Estany). Lo et al. descriuen que la inducció d'apoptosi als condrocits amb H₂O₂ requereix de l'activació de les caspases, però no de la permeabilització de la membrana mitocondrial [155]. En el nostre model, en les condicions de temps i concentració de H₂O₂ estudiades, no sembla que els condrocits entrin en apoptosi ja que no hi han disminucions en el percentatge de vitalitat, ni disminució de l'activitat mitocondrial mesurada amb l'assaig MTT. Vàrem plantejar estudiar l'efecte de l'H₂O₂ en condicions en les que no hagués disminució de vitalitat en les cèl·lules, motiu pel qual la inducció d'apoptosi no va ser mesurada. En principi, treballem en condicions no citotòxiques pels condrocits.

PLASMA RIC EN PLAQUETES. FONT DE TGF- β EXOGEN.

Amb l'addició de PRP s'està aplicant TGF- β exogen al cultiu. Són moltes les metodologies que s'utilitzen per l'obtenció de plasma ric en plaquetes [63], habitualment per separació cel·lular [56-58] o per centrifugació de sang sencera [59-62]. La gran quantitat de variables (des de volum de sang, anticoagulant, nombre i velocitat de centrifugació, mecanització/automatització) expliquen la variabilitat en la composició i concentració del plasma ric en plaquetes [56, 63], altrament dits plasma ric

en factors de creixement [82] perquè els PRPs són rics en factors de creixement alliberats per les plaquetes quan aquestes són activades. En aquest estudi s'ha comprovat que els PRP utilitzats són rics en TGF- β . En altres estudis, utilitzant protocols diferents, han obtingut concentracions més elevades de TGF- β [56, 157], no per això més eficaços o més recomanables per al seu ús en clínica.

El TGF- β alliberat dels grànuls- α de les plaquetes s'allibera de forma inactiva, associat al LAP (de l'anglès latency-associated peptide) i a la proteïna LTBP-1 (de l'anglès latent TGF- β binding protein), per tant és incapaç d'unir-se al seu receptor fins que en l'entorn cel·lular no sigui activat mitjançant la lisi o alliberació del LTBP-1 i el LAP. Per tant, l'objectiu en la realització dels PRP no és aconseguir la màxima concentració possible de TGF- β , sinó obtenir una font exògena de TGF- β , capaç d'actuar sobre els condrocits. Però en l'obtenció de PRP per l'aplicació clínica no únicament s'ha de tenir en compte la concentració en TGF- β . El protocol d'obtenció també condiona la composició del PRP d'altres poblacions cel·lulars presents en la sang, com eritròcits, limfòcits o monòcits, la concentració de les quals no és constant en la vida de l'individu, sinó que fluctua en funció de l'ambient (situació geogràfica, infeccions, etc.). Per poder utilitzar el PRP com a fàrmac, la legislació requereix de tot un seguit de requeriments com és, d'entre altres, la reproductibilitat en l'obtenció. En aquest estudi l'obtenció del PRP es realitza a partir de la centrifugació de sang a 460g, condicions que Anitua et al. determinen que s'aconsegueix un PRP lliure de leucòcits, i per tant, més adient per la seva utilització en clínica humana [158].

En aquest estudi s'ha determinat la concentració de citocines pro i anti-inflamatòries (IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β i el IL-8) dels concentrats de plaquetes per comprovar si les citocines que avaluàvem en els sobrenadants eren sintetitzades únicament pels condrocits i que no les afegíem exògenament amb l'addició del PRP. En cap altre treball no havíem trobat que es caracteritzés el PRP amb el contingut de citocines pro i anti-inflamatòries. En el nostre estudi s'han detectat traces d'aquestes citocines en el PRP. Cal ressaltar que les concentracions d'aquestes citocines en el PRP són totalment insignificants respecte les que sintetitzen els condrocits en cultiu. Aquests resultats ens asseguren que les citocines detectades en els sobrenadants dels cultius d'aquest estudi han estat sintetitzades pel condrocit i no s'han afegit de forma exògena amb l'addició del PRP.

La relació del TGF- β amb la protecció front la degeneració de cartílag ha quedat recolzada pels estudis de Mahr et al. [159] sobre ratolins STR/ort. Aquests ratolins desenvolupen espontàniament canvis degeneratius a les articulacions similars als que es produeixen en l'osteoartritis humana i s'ha observat que els condrocits de les femelles, més resistents al dany articular, tenen major expressió de TGF- β que els condrocits dels mascles. La protecció enfront de la degeneració del cartílag es correlaciona amb l'increment en l'expressió de TGF- β [159]. Això fa pensar que en els condrocits tractats amb LPS, que segons els nostres resultats presenten menys expressió de TGF- β que els condrocits control, una aportació exògena de TGF- β mitjançant l'addició de PRP, pot actuar de forma "condroprotectora".

En els nostres experiments, quan afegim plasma ric en plaquetes (PRP) en el cultiu de condrocits tractats prèviament amb LPS, la síntesi de glicosaminoglicans (GAGs) continua essent elevada. Sembla que el LPS i el PRP causin sobre els condrocits el mateix efecte en l'alliberació de GAGs en el sobrenadant, ja que cèl·lules sense estimular amb LPS i tractades amb PRP produeixen nivells de GAGs molt similars als cultius únicament tractats amb LPS. Com s'ha comentat anteriorment, amb l'addició de PRP s'està aplicant TGF- β exogen al cultiu, factor de creixement que s'ha relacionat amb la síntesi de matriu extracel·lular, especialment agrecan i col·lagen [76, 160]. En condrocits de porc, Akeda et al. observen que l'addició de PRP en el cultiu estimula la síntesi de proteoglicans i de col·lagen [100], igualment que en cultius de cèl·lules del disc vertebral [107], del lligament periodontal o en cèl·lules osteoblàstiques [161]. En canvi, Anitua et al. [106] observen que el tractament de fibroblastos de pell humana, sinòvium i tendó en cultiu amb PRP, incrementen la síntesi d'àcid hialurònic, component de la matriu extracel·lular, però no la síntesi de col·lagen. Conclouen que l'efecte del PRP depèn de la concentració de plaquetes i del tipus cel·lular sobre el que s'apliqui [106], però en tots els casos existeix un increment en la síntesi de components de la matriu extracel·lular, necessari per la regeneració del cartílag.

Des del punt de vista de les citocines, l'addició de PRP en el cultiu provoca la disminució de la síntesi de IL-10 i TNF- α que s'havia induït amb el LPS. La disminució de TNF- α en el sobrenadant mostra com el PRP provoca uns efectes antiinflamatoris i

protectors en el cultiu. El TNF- α , juntament amb la IL-1 β , es la “clàssica” citocina inflamatòria que estimula la síntesi d’altres citocines i mediadors inflamatoris, estimula la síntesi de metal·loproteases que degraden la matriu, inhibeix la síntesi de molècules de la matriu i indueix l’apoptosi cel·lular. Per tant, si la inhibició de la síntesi de TNF- α que s’observa en els condrocits tractats in vitro amb PRP en el nostre estudi també succeís in vivo, podria actuar atenuant la destrucció del teixit i l’estat inflamatori. Hui et al., a partir dels seus estudis, afirmen que el TGF- β , proteïna important del PRP, protegeix el cartílag dels efectes degradatius que provoca el TNF- α [162].

Verrecchia et al. observen que el TGF- β i el TNF- α actuen de manera antagònica en la regulació de l’expressió del col·lagen [160]. La via de senyalització del TGF- β i el TNF- α interfereixen per la via JUN i Smad, de manera que el TGF- β activa la transcripció del col·lagen mentre que el TNF- α la inhibeix [160]. Aquesta interacció de les rutes de senyalització en els condrocits, amb resultats antagònics pel que fa a la síntesi de col·lagen, fa pensar que el TGF- β pot actuar sobre el condrocit de forma inversa al TNF- α , factor que seria de gran importància des del punt de vista de la teràpia de l’osteoartritis, si també actués antagònicament als efectes apoptòtics del TNF- α . Aquest fet l’afirma Lires-Dean et al. quan descriuen que el TGF- β inhibeix l’apoptosi induïda amb TNF- α en condrocits osteoartítics, però no en condrocits normals [163], fet que posaria de manifest l’efecte protector del TGF- β sobre el cartílag danyat. L’efecte diferent del TGF- β sobre condrocits osteoartítics o condrocits sans també l’han descrit Xiang et al., els quals observen que el TGF- β regula de manera distinta l’expressió d’alguns gens en condrocits osteoartítics o condrocits sans [164]. Aquesta diferència podria estar relacionada amb la síntesi de TGF- β pròpia dels condrocits. Els condrocits amb una síntesi deficient de TGF- β respondrien favorablement al TGF- β exogen, mentre que els condrocits que ja sintetitzen suficient TGF- β respondrien al TGF- β exogen de menor forma o de diferent manera. Aquesta explicació també serviria per entendre la variabilitat que sovint s’extreu de la bibliografia en l’eficiència del tractament amb PRP. El seu efecte podria variar en funció de la gravetat o afectació del dany i/o de la síntesi intrínseca de TGF- β per part dels condrocits.

Dels resultats obtinguts, volem destacar la síntesi de IL-10 induïda amb LPS quan s’afegeix PRP en el cultiu de condrocits. La IL-10 és una reconeguda citocina anti-inflamatòria/reguladora i la seva expressió s’activa paral·lelament a les vies de

senyalització pro-inflamatòries (TNF- α /IL-1 β) induïdes per TLR [165]. S'han descrit efectes de la IL-10 sobre els condrocits molt similars als del TGF- β : no únicament inhibeix la síntesi de citocines inflamatòries, sinó que protegeix als condrocits dels efectes de la IL-1 i del TNF- α [7]. Cultius de condrocits tractats amb TNF- α i IL-10 mantenen el fenotip amb menor síntesi de col·lagen induïda pel TNF- α , però s'inhibeixen els efectes apoptòtics. En canvi, el cultiu tractat únicament amb IL-10, recupera l'expressió de col·lagen II, però no altera el nivell de les caspases (apoptosi) [145]. S'ha descrit també que la IL-10 inhibeix l'expressió de MMP-3 [166] i que proporciona una major protecció enfront de la destrucció del cartílag [139].

A priori, per tant, sembla que l'addició del PRP sobre el cultiu provoqui efectes perjudicials sobre els condrocits, ja que disminueix la síntesi d'una molècula protectora com la IL-10. S'ha comentat anteriorment però, que la síntesi de la IL-10 i la de TNF- α estan molt inter-relacionades, i que la síntesi d'una condiciona la síntesi de l'altra. Per tant, pot ser que els nivells de IL-10 disminueixin com a conseqüència de la disminució del TNF- α provocada per l'addició del PRP en el cultiu, o perquè a l'estar afegint de forma exògena TGF- β , potent citocina reguladora, ja no són necessaris els efectes de la IL-10. La relació entre l'expressió del TNF- α i la IL-10 també s'observa en el treball de Pilette et al. sobre monòcits [167]. L'augment en la síntesi de TNF- α i IL-10 que provoca el LPS en els monòcits es veu revertida pel tractament amb IL-9 [167], el qual tot i ser un model allunyat dels condrocits, reforça la idea que la disminució d'una citocina implica o condiciona la disminució de l'altra (TNF- α – IL-10).

També en el cartílag osteoartrític s'observa aquesta estreta relació entre l'expressió de TNF- α i IL-10. Tal com també s'ha observat en els cultius de condrocits tractats amb LPS, en el cartílag danyat existeix una sobreexpressió de TNF- α i de IL-10. El tractament del cartílag osteoartrític amb ones de xoc (ESW de l'anglès extracorporeal shock waves) millora els símptomes clínics i provoca la disminució de l'expressió de TNF- α i de IL-10 [143]; per tant, indica que la disminució de la IL-10 no té perquè ser un inconvenient pel bon curs de la patologia.

Com s'ha vist fins ara, el PRP té la capacitat de disminuir la sobreexpressió de TNF- α i de IL-10 induïda per LPS en condrocits, però no la de IL-8 i la de IL-6. De fet,

tal com mostren els resultats, el PRP estimula la síntesi de IL-8 i IL-6 en condrocits en cultiu.

La IL-8, que en el model in vitro d'estímul amb LPS no disminueix la seva expressió després del tractament amb PRP, en el model d'artritis induïda per antigen, es relaciona amb la fase aguda de la inflamació [168] per la seva capacitat quimiotàctica de neutròfils. També s'ha descrit que la IL-8 té capacitat quimiotàctica de cèl·lules MSC (de l'anglès mesenchymal stem cell) [169] que, tot i no ser rellevant pel model in vitro, sí que pot ser-ho per l'aplicació in vivo del PRP en una articulació danyada. Les cèl·lules MSC es diferencien a condrocits sota l'estímul de TGF- β [102, 170, 171]. Amb l'addició del PRP es genera un entorn favorable a la diferenciació de nous condrocits probablement a partir de MSC presents en el mateix PRP. Segons Purfe et al., en sang perifèrica existeix una població cel·lular pluripotent (PCMO, de l'anglès "programmable cells of monocytic origin") que tractades in vitro amb TGF- β , IGF-I, BMP-2 i BMP-7 es diferencien a condrocits [172]. Aquestes cèl·lules PCMO de sang perifèrica també es trobarien presents en els PRP que, en ser administrats in vivo conjuntament amb un entorn ric en TGF- β , es podrien diferenciar a condrocits i "renovar" el teixit.

Merz et al. [118] descriuen que la IL-8 induïx la hipertròfia dels condrocits estimulants-los la síntesi de col·lagen X. Aquesta observació indicaria que uns nivells elevats de IL-8 serien desfavorables per a una correcta regeneració del teixit. En contraposició, amb l'addició de PRP s'està administrant TGF- β , molècula que evita la diferenciació terminal de condrocits i per tant, el fenotip hipertròfic [76].

La IL-6 és una citocina inflamatòria l'expressió de la qual s'indueix per l'acció de la IL-1, el TNF- α , IFN- γ i l'estímul dels receptors TLR. El TGF- β també té la capacitat d'estimular la síntesi de IL-6 [6]. Els efectes que la IL-6 exerceix sobre els condrocits estan una mica discutits perquè sovint resulten contraris. S'han realitzat estudis en els quals la IL-6 no mostra cap efecte sobre la proliferació cel·lular en la síntesi de proteoglicans, ni en l'expressió de MMPs en condrocits en cultiu [131]. Altres autors associen la IL-6 a efectes inhibidors en la proliferació dels condrocits i en la síntesi de proteoglicans [130]. Tanmateix, en alguns treballs es descriu la IL-6 com estimuladora de la proliferació dels condrocits [32]. Aquesta varietat d'efectes

s'explicaria amb les observacions de Fernandes et al. que diferencien els efectes de la IL-6 en funció de l'entorn on actua. En presència de IL-1, la IL-6 potencia els efectes degradatius, mentre que en absència de IL-1, la IL-6 indueix la síntesi de TIMPs i pren més aviat efectes reparadors [32]. Els treballs de Fernandes et al. [32], conjuntament amb l'observació d'Henrotin et al. [173] que la IL-6 és capaç de disminuir la síntesi de IL-8 en condrocits en cultiu, fa pensar que la IL-6 pugui participar en l'homeòstasi del cartílag actuant mitjançant un mecanisme de feedback que limita el dany proteolític [6, 32].

La sobreexpressió de IL-6 i IL-8 que s'ha observat en el nostre estudi in vitro també s'observa en altres estudis que avaluen els efectes antiinflamatoris de diferents compostos. Els bifosfonats presenten efectes antiinflamatoris en artritis reumatoide in vivo i s'han realitzat estudis in vitro per avaluar-ne els efectes com a condroprotectors i antiinflamatoris, de manera no gaire distinta al nostre estudi amb el PRP [174]. De manera semblant amb el que succeeix amb el PRP en el nostre estudi, els bifosfonats no modifiquen la síntesi IL-6 i IL-8 induïda amb IL-1 en condrocits en cultiu [174], la qual cosa ens faria pensar que la sobreexpressió de IL-6 i IL-8 no és un inconvenient, o fins i tot és necessària, per a possibilitar una millora en el dany articular.

La IL-10 sobreexpressada en cultiu de condrocits tractats amb LPS tampoc podria regular els nivells de IL-6. Segons Radons et al., la IL-10 no provoca cap efecte sobre la síntesi de IL-6 induïda per IL-1 en la línia cel·lular de condrosarcoma humà SW1353, a causa d'una deficient expressió del receptor per IL-10 en la superfície cel·lular [175]. Aquesta deficient expressió del receptor per IL-10 pot indicar que la IL-10 no actuaria directament sobre els condrocits en la regulació de la inflamació [175] i potser per això es requereix del TGF- β que, en no ser suficientment sintetitzat per condrocits danyats, es necessari afegir-lo de forma exògena, com per exemple, amb l'addició de PRP.

El TGF- β i altres factors de creixement presents en el PRP activat poden participar en la regulació de la síntesi de molècules pro i anti-inflamatòries en els condrocits estimulats amb LPS, però no són les úniques molècules implicades. Campo et al. comproven que GAGs purificats del plasma (presenten un percentatge elevat de condroitin-4-sulfat) tenen la capacitat de reduir, en condrocits, l'expressió de citocines

inflamatòries induïdes amb LPS. [176]. Per tant, tot i que en els PRP utilitzats en aquests estudi no es quantifiqui nivells elevats de GAGs, comparat amb els GAGs que es produeix en els cultius de condrocits estimulats amb LPS o tractats amb PRP, els GAGs presents en el plasma poden contribuir en la disminució de citocines inflammatòries. Els PRP utilitzats en aquest estudi s'han generat a partir de sang d'individus sans, que segons Campo et al. presenten en el plasma nivells més baixos de condroitin sulfat que individus amb algun tipus de patologia, com lupus erythematosus, artritis reumatoide, etc. [176]. Si en la clínica s'utilitza el PRP de forma autòloga com a teràpia per a patologies com l'artritis reumatoide, l'enriquiment del plasma amb condroitin sulfat d'aquest tipus de pacients, pot ser avantatjós pels efectes antiinflamatoris del PRP.

L'addició de PRP en el model in vitro generat amb H_2O_2 provoca l'estímul per a la síntesi de les mateixes molècules que en el cultiu control, però amb una intensitat menor. Després del tractament dels condrocits amb H_2O_2 , que tendia a disminuir la producció de GAGs i no afectava la síntesi de citocines, el PRP estimula la síntesi de GAGs, però de 4 a 7 vegades menys (en funció de la concentració de PRP) que en un cultiu sense oxidar. La concentració de IL-6 i de IL-8 en els sobrenadants dels cultius també incrementa després del tractament amb PRP, però de 4 a 6 vegades menys que quan el cultiu no s'ha oxidat. Per tant, es pot deduir que condrocits oxidats perden bona part de la capacitat de resposta a les molècules que s'afegeixen de forma exògena amb l'addició del PRP, però tot i així el PRP encara és capaç d'actuar sobre aquestes cèl·lules. Condrocits oxidats amb H_2O_2 presenten inhibida l'expressió de IL-1 β , IL-6, IL-8, iNOS i COX-2 quan s'estimulen amb IL-1 β o LPS, així com també s'observa un increment de l'expressió de NF- κ B menor que en condrocits no tractats amb H_2O_2 [152, 177]. D'aquesta manera es pot observar que l'oxidació fa els condrocits més insensibles als estímuls inflamatoris, però de fet aquesta insensibilitat és resultat de la pèrdua de la capacitat de resposta, que també es dona en els estímuls anabòlics.

DE L'IN VITRO A L'IN VIVO. CONSIDERACIONS

Per tal d'intentar entendre els bons resultats obtinguts en clínica amb el tractament de lesions articulars amb PRP, convé tenir present que en una articulació danyada existeix una situació molt més complexa que la que es genera en qualsevol dels models d'artropatia establerts in vitro. Es genera una resposta inflamatòria amb infiltrat

cel·lular de neutròfils, eosinòfils, cèl·lules T, macròfags, etc. que actuen de forma coordinada produint i responent a múltiples mediadors pro- i anti inflamatoris amb la finalitat de resoldre el dany. Però sovint, i a causa de múltiples factors, no es pot resoldre de manera satisfactòria la inflamació i el dany en el teixit es cronifica. L'aplicació terapèutica dels PRP in vivo pot tenir efectes no únicament sobre els condrocits, com s'ha vist en els models establerts in vitro, sinó que pot actuar sobre els diferents tipus cel·lulars i de diferent manera.

La disminució de la síntesi de TGF- β en condrocits estimulats amb LPS que s'observa en aquest estudi in vitro, creiem que pot ser de gran rellevància en el desenvolupament i el curs de la patologia articular degenerativa si es demostra que això succeeix in vivo. A part de la capacitat reguladora del fenotip en els condrocits, el TGF- β és un dels majors responsables de la regulació i el control de la resposta immunològica. El TGF- β secretat per limfòcits reguladors (Treg) inhibeix la diferenciació de les cèl·lules T naïve a cèl·lules Th1, Th2 o Th17. Quan s'elimina en algun model animal les cèl·lules reguladores Foxp3⁺ es produeixen de forma espontània certes patologies autoimmunitàries com l'artritis [114], fet que mostra la importància d'aquest tipus cel·lular. Les cèl·lules Th17, altament proinflamatòries i que es relacionen amb l'artritis reumatoide, requereixen d'una estimulació constant amb TGF- β per mantenir-se en un estat no patològic [115]. Per tant, davant la manca de TGF- β induïda per l'estímul dels TLR, l'aportació exògena de TGF- β mitjançant l'aplicació de PRP pot provocar efectes beneficiosos.

Al PRP encara se li atribueix una altra propietat important que pot jugar un paper clau en la reparació del teixit. En estudis in vitro realitzats per Mishra et al. i Drengk et al. s'observa com el PRP provoca la proliferació de cèl·lules MSC i la diferenciació a condrocits [102, 103]. Li et al. [76] descriuen que és el TGF- β , que actuant de forma sinèrgica amb la via de senyalització Wnt, estimula la diferenciació de cèl·lules mesenquimals a condrocit. Com ja s'ha comentat anteriorment, el TGF- β juga un paper important en la condrogènesi com en el manteniment del fenotip no hipertròfic en els condrocits del cartílag articular [76]. Aquest fet pren importància quan es té en compte que el cartílag articular és un teixit on hi ha molt poca renovació de condrocits [14]. Quan per qüestions d'edat avançada, trauma o agressió inflamatòria els condrocits es tornen disfuncionals o amb la funció alterada, no existeix reemplaçament de cèl·lules,

la qual cosa deixa al cartílag encara més vulnerable. Amb l'aplicació del PRP in vivo s'està facilitant un entorn on hi pugui haver incorporació de “nous” condrocits. Probablement la pèrdua de condrocits per apoptosi es compensi amb la diferenciació de cèl·lules mesenquimals a condrocits, mediada pel TGF- β present en el PRP i a les cèl·lules MSC que es puguin trobar presents en el PRP [172] o que atregui la IL-8 [169].

Per tant, en aquest treball s'ha pogut comprovar com els condrocits tenen un paper actiu en la síntesi de citocines i factors de creixement. El perfil d'expressió d'aquestes citocines i factors de creixement canvia com a resposta a l'estímul amb LPS. Dels diferents canvis que s'han observat, remarquem la disminució de síntesi de TGF- β per la importància de la seva activitat biològica.

Amb l'aplicació de plasma ric en plaquetes al cultiu s'addiciona TGF- β de forma exògena, cosa que permet als condrocits recuperar el perfil de citocines que sintetitzen quan no existeix dany cel·lular. Aquest treball realitzat in vitro ens revela la importància que pot tenir el TGF- β en el transcurs de patologies articulars degeneratives i en el seu diagnòstic. Això animaria la realització d'altres estudis per determinar si un comportament semblant al que s'ha observat en aquest treball in vitro també succeeix in vivo. Treballs d'aquesta índole aportarien nova informació en el coneixement del dany articular la qual cosa seria de gran utilitat per a la millora en els tractaments, com també per a definir en quins diagnòstics de lesió articular seria justificat l'ús dels PRP com a teràpia, davant d'una disminució del TGF- β endogen conseqüència de la pròpia patologia.

CONCLUSIONS

1. Cultius de condrocits obtinguts a partir de biòpsies congelades presenten uns nivells de síntesi de glicosaminoglicans (GAGs) i de citocines similar al dels condrocits frescos. Per tant, és indistint utilitzar condrocits just després de la seva obtenció a partir de la biòpsia de cartílag, o condrocits que hagin estat congelats.
2. Un temps d'incubació de les plaquetes amb CaCl_2 45 mM durant 60-90 min per la seva activació in vitro, allibera tot el TGF- β present en els grànuls - α . Entre l'eclosió dels grànuls, detectat per l'externalització de la molècula CD62-P, i l'alliberació màxima del TGF- β en el plasma, existeix un desfasament de 30 min.
3. El plasma ric en plaquetes activat utilitzat en aquest estudi in vitro és ric en TGF- β , amb una concentració promig de $17,7 \pm 3,2$ ng/ml. No es detecten concentracions significatives de glicosaminoglicans ni de les citocines IL-12p70, TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-6, IL-8. En conseqüència, podem saber la concentració de TGF- β exogen que s'addiciona al cultiu de condrocits.
4. El tractament d'un cultiu primari de condrocits amb un 50% de plasma ric en plaquetes provoca un increment de la síntesi de GAGs i un augment de l'expressió de les citocines IL-6 i IL-8.
5. El LPS (100 $\mu\text{g/ml}$) no és citotòxic pels condrocits en cultiu en les condicions analitzades. Provoca un augment en la síntesi de GAGs, de les citocines inflamatòries TNF- α i IL-6, de la IL-8 i de la citocina reguladora IL-10. És a destacar la disminució que provoca el LPS sobre l'expressió de TGF- β en el cultiu de condrocits.
6. L'addició de PRP en el cultiu de condrocits tractats amb LPS aporta de forma exògena TGF- β als condrocits que han perdut la capacitat de sintetitzar-lo. La presència de TGF- β , faria possible la regulació de les citocines inflamatòries, malgrat la disminució de la síntesi de IL-10.

7. Concentracions de 1mM de H₂O₂, no citotòxiques pels condrocits, disminueixen lleugerament la velocitat de síntesi de GAGs i no modifiquen el perfil de citocines que els condrocits expressen de manera constitutiva.
8. L'efecte del PRP sobre el cultiu de condrocits en condicions d'oxidació genera un increment de la IL-8 i un lleuger augment de la IL-6.
9. El tractament amb PRP sobre cèl·lules tractades amb LPS modifica el patró de citocines cap a un perfil menys inflamatori i podria promoure la proliferació dels condrocits. Aquest efecte es produeix tant en el cas de que el PRP s'addicioni conjuntament amb el LPS, o bé després de la estimulació amb el LPS.

BIBLIOGRAFIA

1. Suh, J.-K., et al., *Basic science of articular cartilage injury and repair*. Operative Techniques in Sports Medicine, 1995. 3(2): p. 78-86.
2. Bhosale, A.M. and J.B. Richardson, *Articular cartilage: structure, injuries and review of management*. Br Med Bull, 2008. 87: p. 77-95.
3. Chiang, H. and C.C. Jiang, *Repair of articular cartilage defects: review and perspectives*. J Formos Med Assoc, 2009. 108(2): p. 87-101.
4. Archer, C.W. and P. Francis-West, *The chondrocyte*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. 35(4): p. 401-4.
5. Legendre, F., et al., *Chondroitin sulfate modulation of matrix and inflammatory gene expression in IL-1beta-stimulated chondrocytes--study in hypoxic alginate bead cultures*. Osteoarthritis Cartilage, 2008. 16(1): p. 105-14.
6. Guerne, P.A., D.A. Carson, and M. Lotz, *IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors, and hormones in vitro*. J Immunol, 1990. 144(2): p. 499-505.
7. Iannone, F., et al., *Interleukin-10 and interleukin-10 receptor in human osteoarthritic and healthy chondrocytes*. Clin Exp Rheumatol, 2001. 19(2): p. 139-45.
8. Hoberg, M., et al., *Expression analysis of different collagens and cytokines in cartilage cells derived from arthrotic hip and knee joints*. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 2006. 144(3): p. 289-95.
9. Bobacz, K., et al., *Toll-like receptors and chondrocytes: the lipopolysaccharide-induced decrease in cartilage matrix synthesis is dependent on the presence of toll-like receptor 4 and antagonized by bone morphogenetic protein 7*. Arthritis Rheum, 2007. 56(6): p. 1880-93.
10. Kim, H.A., et al., *The catabolic pathway mediated by Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes*. Arthritis Rheum, 2006. 54(7): p. 2152-63.
11. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira, *Toll-like receptors*. Annu Rev Immunol, 2003. 21: p. 335-76.
12. Blain, E.J., *Involvement of the cytoskeletal elements in articular cartilage homeostasis and pathology*. Int J Exp Pathol, 2009. 90(1): p. 1-15.
13. Lin, Z., et al., *The chondrocyte: biology and clinical application*. Tissue Eng, 2006. 12(7): p. 1971-84.
14. van der Kraan, P.M. and W.B. van den Berg, *Osteoarthritis in the context of ageing and evolution. Loss of chondrocyte differentiation block during ageing*. Ageing Res Rev, 2008. 7(2): p. 106-13.
15. Adams, C.S. and I.M. Shapiro, *The fate of the terminally differentiated chondrocyte: evidence for microenvironmental regulation of chondrocyte apoptosis*. Crit Rev Oral Biol Med, 2002. 13(6): p. 465-73.
16. Eyre, D., *Collagen of articular cartilage*. Arthritis Res, 2002. 4(1): p. 30-5.
17. Eyre, D.R., M.A. Weis, and J.J. Wu, *Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework?* Eur Cell Mater, 2006. 12: p. 57-63.
18. Gelse, K., E. Poschl, and T. Aigner, *Collagens--structure, function, and biosynthesis*. Adv Drug Deliv Rev, 2003. 55(12): p. 1531-46.
19. Gouttenoire, J., et al., *Modulation of collagen synthesis in normal and osteoarthritic cartilage*. Biorheology, 2004. 41(3-4): p. 535-42.
20. Saharinen, J., et al., *Latent transforming growth factor-beta binding proteins (LTBPs)--structural extracellular matrix proteins for targeting TGF-beta action*. Cytokine Growth Factor Rev, 1999. 10(2): p. 99-117.
21. Bastow, E.R., et al., *Hyaluronan synthesis and degradation in cartilage and bone*. Cell Mol Life Sci, 2008. 65(3): p. 395-413.

22. Corvol, M.T., *The chondrocyte: from cell aging to osteoarthritis*. Joint Bone Spine, 2000. 67(6): p. 557-60.
23. Kiani, C., et al., *Structure and function of aggrecan*. Cell Res, 2002. 12(1): p. 19-32.
24. Funderburgh, J.L., *Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function*. Glycobiology, 2000. 10(10): p. 951-8.
25. Aigner, T., et al., *Osteoarthritis: pathobiology-targets and ways for therapeutic intervention*. Adv Drug Deliv Rev, 2006. 58(2): p. 128-49.
26. Loeser, R.F., *Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix*. Osteoarthritis Cartilage, 2009. 17(8): p. 971-9.
27. Valencia, J.V., et al., *Advanced glycation end product ligands for the receptor for advanced glycation end products: biochemical characterization and formation kinetics*. Anal Biochem, 2004. 324(1): p. 68-78.
28. Goldring, M.B. and K.B. Marcu, *Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases*. Arthritis Res Ther, 2009. 11(3): p. 224.
29. Dijkgraaf, L.C., et al., *Normal cartilage structure, biochemistry, and metabolism: a review of the literature*. J Oral Maxillofac Surg, 1995. 53(8): p. 924-9.
30. Buckwalter, J.A. and J.A. Martin, *Osteoarthritis*. Adv Drug Deliv Rev, 2006. 58(2): p. 150-67.
31. Aigner, T., et al., *Mechanisms of disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis--structure, chaos and senescence*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2007. 3(7): p. 391-9.
32. Fernandes, J.C., J. Martel-Pelletier, and J.P. Pelletier, *The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology*. Biorheology, 2002. 39(1-2): p. 237-46.
33. Goldring, S.R. and M.B. Goldring, *The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis*. Clin Orthop Relat Res, 2004(427 Suppl): p. S27-36.
34. Sandell, L.J. and T. Aigner, *Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis*. Arthritis Res, 2001. 3(2): p. 107-13.
35. Borrelli, J., Jr., *Chondrocyte apoptosis and posttraumatic arthrosis*. J Orthop Trauma, 2006. 20(10): p. 726-31.
36. van Vollenhoven, R.F., *Treatment of rheumatoid arthritis: state of the art 2009*. Nat Rev Rheumatol, 2009. 5(10): p. 531-41.
37. García Vargas, M.Q., M^a Soledad, *Artritis reumatoide. Fisiopatología y tratamiento*, in *Serie de actualización Profesional*. 2004, Facultad de Farmacia de Costa Rica. p. 76.
38. Edwards, J.C. and G. Cambridge, *Rheumatoid arthritis: the predictable effect of small immune complexes in which antibody is also antigen*. Br J Rheumatol, 1998. 37(2): p. 126-30.
39. Song, Y.W. and E.H. Kang, *Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies*. Qjm, 2009.
40. Sarkar, S., L.A. Cooney, and D.A. Fox, *The role of T helper type 17 cells in inflammatory arthritis*. Clin Exp Immunol. 159(3): p. 225-37.
41. Bettelli, E., M. Oukka, and V.K. Kuchroo, *T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity*. Nat Immunol, 2007. 8(4): p. 345-50.
42. Pernis, A.B., *Th17 cells in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus*. J Intern Med, 2009. 265(6): p. 644-52.

43. Kumkumian, G.K., et al., *Platelet-derived growth factor and IL-1 interactions in rheumatoid arthritis. Regulation of synoviocyte proliferation, prostaglandin production, and collagenase transcription.* J Immunol, 1989. 143(3): p. 833-7.
44. Boissier, M.C., et al., *Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis.* Joint Bone Spine, 2009. 76(1): p. 10-4.
45. Kim, E.Y. and K.D. Moudgil, *Regulation of autoimmune inflammation by pro-inflammatory cytokines.* Immunol Lett, 2008. 120(1-2): p. 1-5.
46. Martinez, G.J., et al., *Regulation and function of proinflammatory TH17 cells.* Ann N Y Acad Sci, 2008. 1143: p. 188-211.
47. Berenbaum, F., *New horizons and perspectives in the treatment of osteoarthritis.* Arthritis Res Ther, 2008. 10 Suppl 2: p. S1.
48. Steinert, A.F., U. Noth, and R.S. Tuan, *Concepts in gene therapy for cartilage repair.* Injury, 2008. 39 Suppl 1: p. S97-113.
49. Mobasheri, A., et al., *Mesenchymal stem cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: applications in cartilage repair and osteoarthritis therapy.* Histol Histopathol, 2009. 24(3): p. 347-66.
50. Dudics, V., et al., *Mesenchymal stem cells as potential source cartilage repair.* Orv Hetil, 2005. 146(22): p. 1201-8.
51. Chen, F.H. and R.S. Tuan, *Mesenchymal stem cells in arthritic diseases.* Arthritis Res Ther, 2008. 10(5): p. 223.
52. Ringe, J. and M. Sittinger, *Tissue engineering in the rheumatic diseases.* Arthritis Res Ther, 2009. 11(1): p. 211.
53. Grayson, W.L., et al., *Engineering custom-designed osteochondral tissue grafts.* Trends Biotechnol, 2008. 26(4): p. 181-9.
54. Anitua, E., et al., *Delivering growth factors for therapeutics.* Trends Pharmacol Sci, 2008. 29(1): p. 37-41.
55. Bluteau, D., et al., *Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation.* J Thromb Haemost, 2009. 7 Suppl 1: p. 227-34.
56. Zimmermann, R., et al., *Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates.* Vox Sang, 2003. 85(4): p. 283-9.
57. Crovetto, G., et al., *Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds.* Transfus Apher Sci, 2004. 30(2): p. 145-51.
58. Carter, C.A., et al., *Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing.* Exp Mol Pathol, 2003. 74(3): p. 244-55.
59. Sammartino, G., et al., *Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars.* J Oral Maxillofac Surg, 2005. 63(6): p. 766-70.
60. Tsay, R.C., et al., *Differential growth factor retention by platelet-rich plasma composites.* J Oral Maxillofac Surg, 2005. 63(4): p. 521-8.
61. Cenni, E., et al., *Platelet release of transforming growth factor-beta and beta-thromboglobulin after in vitro contact with acrylic bone cements.* Biomaterials, 2002. 23(6): p. 1479-84.
62. Tozum, T.F. and B. Demiralp, *Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry.* J Can Dent Assoc, 2003. 69(10): p. 664.
63. Dohan Ehrenfest, D.M., L. Rasmusson, and T. Albrektsson, *Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF).* Trends Biotechnol, 2009. 27(3): p. 158-67.

64. Fortier, L.A., et al., *The Role of Growth Factors in Cartilage Repair*. Clin Orthop Relat Res.
65. Harrison, P., *Platelet function analysis*. Blood Rev, 2005. 19(2): p. 111-23.
66. Rendu, F. and B. Brohard-Bohn, *The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions* Platelets, 2001. 12(5): p. 261-273.
67. Rozman, P. and Z. Bolta, *Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries*. Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat, 2007. 16(4): p. 156-65.
68. Patel, S.R., J.H. Hartwig, and J.E. Italiano, Jr., *The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets*. J Clin Invest, 2005. 115(12): p. 3348-54.
69. Klinger, M.H., *Platelets and inflammation*. Anat Embryol (Berl), 1997. 196(1): p. 1-11.
70. Miyazono, K., *Positive and negative regulation of TGF-beta signaling*. J Cell Sci, 2000. 113 (Pt 7): p. 1101-9.
71. Kawakami, Y., J. Rodriguez-Leon, and J.C. Izpisua Belmonte, *The role of TGFbetas and Sox9 during limb chondrogenesis*. Curr Opin Cell Biol, 2006. 18(6): p. 723-9.
72. Gaissmaier, C., J.L. Koh, and K. Weise, *Growth and differentiation factors for cartilage healing and repair*. Injury, 2008. 39 Suppl 1: p. S88-96.
73. Frazier, K., et al., *Inhibition of ALK5 signaling induces physeal dysplasia in rats*. Toxicol Pathol, 2007. 35(2): p. 284-95.
74. Pateder, D.B., et al., *PTHrP expression in chondrocytes, regulation by TGF-beta, and interactions between epiphyseal and growth plate chondrocytes*. Exp Cell Res, 2000. 256(2): p. 555-62.
75. Zhang, Y., et al., *Cbfa1-dependent expression of an interferon-inducible p204 protein is required for chondrocyte differentiation*. Cell Death Differ, 2008. 15(11): p. 1760-71.
76. Li, T.F., R.J. O'Keefe, and D. Chen, *TGF-beta signaling in chondrocytes*. Front Biosci, 2005. 10: p. 681-8.
77. Sanchez-Capelo, A., *Dual role for TGF-beta1 in apoptosis*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. 16(1): p. 15-34.
78. Lacci, K.M. and A. Dardik, *Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing*. Yale J Biol Med, 2010. 83(1): p. 1-9.
79. Hall, M.P., et al., *Platelet-rich plasma: current concepts and application in sports medicine*. J Am Acad Orthop Surg, 2009. 17(10): p. 602-8.
80. Marx, R.E., et al., *Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 1998. 85(6): p. 638-46.
81. Oyama, T., et al., *Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting*. J Oral Maxillofac Surg, 2004. 62(5): p. 555-8.
82. Anitua, E., *The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery*. Pract Proced Aesthet Dent, 2001. 13(6): p. 487-93; quiz 487-93.
83. Bhanot, S. and J.C. Alex, *Current applications of platelet gels in facial plastic surgery*. Facial Plast Surg, 2002. 18(1): p. 27-33.
84. Englert, S.J., T.H. Estep, and C.C. Ellis-Stoll, *Autologous platelet gel applications during cardiovascular surgery: effect on wound healing*. J Extra Corpor Technol, 2005. 37(2): p. 148-52.
85. Wehberg, K.E., et al., *Intramyocardial injection of autologous platelet-rich plasma combined with transmyocardial revascularization*. Cell Transplant, 2009. 18(3): p. 353-9.

86. Erkilet, E., et al., *Platelet-rich plasma improves healing of tympanic membrane perforations: experimental study*. J Laryngol Otol, 2009. 123(5): p. 482-7.
87. Smrke, D., et al., *Allogeneic platelet gel with autologous cancellous bone graft for the treatment of a large bone defect*. Eur Surg Res, 2007. 39(3): p. 170-4.
88. Roussy, Y., M.P. Bertrand Duchesne, and G. Gagnon, *Activation of human platelet-rich plasmas: effect on growth factors release, cell division and in vivo bone formation*. Clin Oral Implants Res, 2007. 18(5): p. 639-48.
89. Mishra, A. and T. Pavelko, *Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma*. Am J Sports Med, 2006. 34(11): p. 1774-8.
90. Sanchez, M., et al., *Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices*. Am J Sports Med, 2007. 35(2): p. 245-51.
91. Sanchez, M., et al., *Platelet-rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries*. Sports Med, 2009. 39(5): p. 345-54.
92. Margolis, D.J., et al., *Effectiveness of platelet releasate for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers*. Diabetes Care, 2001. 24(3): p. 483-8.
93. Montón Echeverría, J.P.R., S. ; Gómez Bajo, *Experiencia Clínica en el empleo de factores de crecimiento autólogos obtenidos de plasma rico en plaquetas*. Cirugía plástica Ibero-latinoamericana, 2007. 33: p. 155-162.
94. Anitua, E., et al., *Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2008. 84(2): p. 415-21.
95. Sanchez, M., et al., *Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report*. Med Sci Sports Exerc, 2003. 35(10): p. 1648-52.
96. Echeverría, M., *Experiencia clínica en el empleo de GF autólogos obtenidos de plasma rico en plaquetas*. Cir.Plást. Iberolatinoam. 33(3): p. 155-162.
97. Woodall, J., Jr., et al., *Cellular effects of platelet rich plasma: a study on HL-60 macrophage-like cells*. Biomed Sci Instrum, 2007. 43: p. 266-71.
98. Huang, Q., et al., *Preliminary separation of the growth factors in platelet-rich plasma: effects on the proliferation of human marrow-derived mesenchymal stem cells*. Chin Med J (Engl), 2009. 122(1): p. 83-7.
99. Krasna, M., et al., *Platelet gel stimulates proliferation of human dermal fibroblasts in vitro*. Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat, 2007. 16(3): p. 105-10.
100. Akeda, K., et al., *Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis*. Osteoarthritis Cartilage, 2006. 14(12): p. 1272-80.
101. Anitua, E., et al., *Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture*. J Orthop Res, 2005. 23(2): p. 281-6.
102. Mishra, A., et al., *Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation*. Tissue Eng Part C Methods, 2009. 15(3): p. 431-5.
103. Drengk, A., et al., *Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells*. Cells Tissues Organs, 2009. 189(5): p. 317-26.
104. Pepelassi, E.A., et al., *Platelet-rich plasma effect on periodontally affected human gingival fibroblasts: an in vitro study*. J Int Acad Periodontol, 2009. 11(1): p. 160-8.

105. Smith, J.J., M.W. Ross, and R.K. Smith, *Anabolic effects of acellular bone marrow, platelet rich plasma, and serum on equine suspensory ligament fibroblasts in vitro*. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 2006. 19(1): p. 43-7.
106. Anitua, E., et al., *Fibroblastic response to treatment with different preparations rich in growth factors*. *Cell Prolif*, 2009. 42(2): p. 162-70.
107. Akeda, K., et al., *Platelet-rich plasma (PRP) stimulates the extracellular matrix metabolism of porcine nucleus pulposus and annulus fibrosus cells cultured in alginate beads*. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2006. 31(9): p. 959-66.
108. Spreafico, A., et al., *Biochemical investigation of the effects of human platelet releasates on human articular chondrocytes*. *J Cell Biochem*, 2009. 108(5): p. 1153-65.
109. de Mos, M., et al., *In vitro model to study chondrogenic differentiation in tendinopathy*. *Am J Sports Med*, 2009. 37(6): p. 1214-22.
110. Kawasumi, M., et al., *The effect of the platelet concentration in platelet-rich plasma gel on the regeneration of bone*. *J Bone Joint Surg Br*, 2008. 90(7): p. 966-72.
111. Lucarelli, E., et al., *Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells*. *Biomaterials*, 2003. 24(18): p. 3095-100.
112. El-Sharkawy, H., et al., *Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties*. *J Periodontol*, 2007. 78(4): p. 661-9.
113. Cools, N., et al., *Regulatory T cells and human disease*. *Clin Dev Immunol*, 2007. p. 891-95.
114. Taylor, A., et al., *Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells*. *Immunology*, 2006. 117(4): p. 433-42.
115. Li, M.O. and R.A. Flavell, *Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10*. *Immunity*, 2008. 28(4): p. 468-76.
116. de Jong, J.G., et al., *Dimethylmethylene blue-based spectrophotometry of glycosaminoglycans in untreated urine: a rapid screening procedure for mucopolysaccharidoses*. *Clin Chem*, 1989. 35(7): p. 1472-7.
117. Barbosa, I., et al., *Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies*. *Glycobiology*, 2003. 13(9): p. 647-53.
118. Merz, D., et al., *IL-8/CXCL8 and growth-related oncogene alpha/CXCL1 induce chondrocyte hypertrophic differentiation*. *J Immunol*, 2003. 171(8): p. 4406-15.
119. Aida, Y., et al., *The effect of IL-1beta on the expression of inflammatory cytokines and their receptors in human chondrocytes*. *Life Sci*, 2006. 79(8): p. 764-71.
120. Sandell, L.J., et al., *Exuberant expression of chemokine genes by adult human articular chondrocytes in response to IL-1beta*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008. 16(12): p. 1560-71.
121. Sniekers, Y.H., et al., *Estrogen modulates iodoacetate-induced gene expression in bovine cartilage explants*. *J Orthop Res*. 28(5): p. 607-15.
122. Pateder, D.B., et al., *Role of pentoxifylline in preventing radiation damage to epiphyseal growth plate chondrocytes*. *Radiat Res*, 2002. 157(1): p. 62-8.
123. Pateder, D.B., et al., *The role of autocrine growth factors in radiation damage to the epiphyseal growth plate*. *Radiat Res*, 2001. 155(6): p. 847-57.
124. Xia, Z., et al., *The viability and proliferation of human chondrocytes following cryopreservation*. *J Bone Joint Surg Br*, 2008. 90(9): p. 1245-8.

125. Andreas, K., et al., *Key regulatory molecules of cartilage destruction in rheumatoid arthritis: an in vitro study*. Arthritis Res Ther, 2008. 10(1): p. R9.
126. Sun, J.S., et al., *The in vitro effects of dehydroepiandrosterone on chondrocyte metabolism*. Osteoarthritis Cartilage, 2006. 14(3): p. 238-49.
127. Martin, J.A. and J.A. Buckwalter, *Roles of articular cartilage aging and chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis*. Iowa Orthop J, 2001. 21: p. 1-7.
128. Scanzello, C.R., A. Plaas, and M.K. Crow, *Innate immune system activation in osteoarthritis: is osteoarthritis a chronic wound?* Current Opinion in Rheumatology, 2008. 20(5): p. 565-572 10.1097/BOR.0b013e32830aba34.
129. Campo, G.M., et al., *Glycosaminoglycans modulate inflammation and apoptosis in LPS-treated chondrocytes*. J Cell Biochem, 2009. 106(1): p. 83-92.
130. Jikko, A., et al., *Effects of interleukin-6 on proliferation and proteoglycan metabolism in articular chondrocyte cultures*. Cell Biol Int, 1998. 22(9-10): p. 615-21.
131. Kandel, R.A., et al., *Comparison of the effect of interleukin 6 and interleukin 1 on collagenase and proteoglycan production by chondrocytes*. J Rheumatol, 1990. 17(7): p. 953-7.
132. Schuerwegh, A.J., et al., *Influence of pro-inflammatory (IL-1 alpha, IL-6, TNF-alpha, IFN-gamma) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function*. Osteoarthritis Cartilage, 2003. 11(9): p. 681-7.
133. Shingu, M., et al., *The role of IL-4 and IL-6 in IL-1-dependent cartilage matrix degradation*. Br J Rheumatol, 1995. 34(2): p. 101-6.
134. Gallucci, R.M., et al., *Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice*. Faseb J, 2000. 14(15): p. 2525-31.
135. Frangogiannis, N.G., *The immune system and cardiac repair*. Pharmacol Res, 2008. 58(2): p. 88-111.
136. Mayer, A.M., et al., *Differential Effects of Domoic Acid and E. coli Lipopolysaccharide on Tumor Necrosis Factor-alpha, Transforming Growth Factor-beta1 and Matrix Metalloproteinase-9 Release by Rat Neonatal Microglia: Evaluation of the Direct Activation Hypothesis*. Mar Drugs, 2007. 5(3): p. 113-135.
137. Pei, Z., et al., *TLR4 signaling promotes the expression of VEGF and TGFbeta1 in human prostate epithelial PC3 cells induced by lipopolysaccharide*. Cell Immunol, 2008. 254(1): p. 20-7.
138. Pohlers, D., et al., *Constitutive upregulation of the transforming growth factor-beta pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts*. Arthritis Res Ther, 2007. 9(3): p. R59.
139. Lubberts, E., et al., *Regulatory role of interleukin 10 in joint inflammation and cartilage destruction in murine streptococcal cell wall (SCW) arthritis. More therapeutic benefit with IL-4/IL-10 combination therapy than with IL-10 treatment alone*. Cytokine, 1998. 10(5): p. 361-9.
140. Goldring, M.B. and S.R. Goldring, *Osteoarthritis*. J Cell Physiol, 2007. 213(3): p. 626-34.
141. Goldring, M.B., *The role of the chondrocyte in osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2000. 43(9): p. 1916-26.
142. Hopkins, S.J., *The pathophysiological role of cytokines*. Leg Med (Tokyo), 2003. 5 Suppl 1: p. S45-57.

143. Moretti, B., et al., *Extracorporeal shock waves down-regulate the expression of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in osteoarthritic chondrocytes*. BMC Musculoskelet Disord, 2008. 9: p. 16.
144. Kojima, F., et al., *Membrane-associated prostaglandin E synthase-1 is upregulated by proinflammatory cytokines in chondrocytes from patients with osteoarthritis*. Arthritis Res Ther, 2004. 6(4): p. R355-65.
145. John, T., et al., *Interleukin-10 modulates pro-apoptotic effects of TNF-alpha in human articular chondrocytes in vitro*. Cytokine, 2007. 40(3): p. 226-34.
146. Muller, R.D., et al., *IL-10 overexpression differentially affects cartilage matrix gene expression in response to TNF-alpha in human articular chondrocytes in vitro*. Cytokine, 2008. 44(3): p. 377-85.
147. Hitchon, C.A. and H.S. El-Gabalawy, *Oxidation in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2004. 6(6): p. 265-78.
148. Abramson, S.B., *Osteoarthritis and nitric oxide*. Osteoarthritis Cartilage, 2008. 16 Suppl 2: p. S15-20.
149. Abramson, S.B., et al., *The role of nitric oxide in tissue destruction*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2001. 15(5): p. 831-45.
150. Asada, S., et al., *Effect of hydrogen peroxide on the metabolism of articular chondrocytes*. Inflamm Res, 1999. 48(7): p. 399-403.
151. Hadjigogos, K., *The role of free radicals in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Panminerva Med, 2003. 45(1): p. 7-13.
152. Martin, G., et al., *Comparative effects of IL-1beta and hydrogen peroxide (H2O2) on catabolic and anabolic gene expression in juvenile bovine chondrocytes*. Osteoarthritis Cartilage, 2005. 13(10): p. 915-24.
153. Lakshminarayanan, V., et al., *Differential regulation of interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 by H2O2 and tumor necrosis factor-alpha in endothelial and epithelial cells*. J Biol Chem, 1997. 272(52): p. 32910-8.
154. Takahashi, T., et al., *Lysosomal dysfunction on hydrogen peroxide-induced apoptosis of osteoarthritic chondrocytes*. Int J Mol Med, 2004. 14(2): p. 197-200.
155. Lo, M.Y. and H.T. Kim, *Chondrocyte apoptosis induced by hydrogen peroxide requires caspase activation but not mitochondrial pore transition*. J Orthop Res, 2004. 22(5): p. 1120-5.
156. Dai, S.M., et al., *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, 2006. 54(3): p. 818-31.
157. Weibrich, G., et al., *Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count*. J Craniomaxillofac Surg, 2002. 30(2): p. 97-102.
158. Anitua, E.A., I.; Sánchez, M., *PRGF (Plasma Rico en Factores de Crecimiento)*. Dental Dialogue, 2004. 3: p. 1-15.
159. Mahr, S., et al., *Sexual dimorphism in the osteoarthritis of STR/ort mice may be linked to articular cytokines*. Ann Rheum Dis, 2003. 62(12): p. 1234-7.
160. Verrecchia, F. and A. Mauviel, *TGF-beta and TNF-alpha: antagonistic cytokines controlling type I collagen gene expression*. Cell Signal, 2004. 16(8): p. 873-80.
161. Kawase, T., et al., *Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro*. J Periodontol, 2003. 74(6): p. 858-64.

162. Hui, W., A.D. Rowan, and T. Cawston, *Modulation of the expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinases by TGF-beta1 and IGF-1 in primary human articular and bovine nasal chondrocytes stimulated with TNF-alpha*. Cytokine, 2001. 16(1): p. 31-5.
163. Lires-Dean, M., et al., *Anti-apoptotic effect of transforming growth factor-beta1 on human articular chondrocytes: role of protein phosphatase 2A*. Osteoarthritis Cartilage, 2008. 16(11): p. 1370-8.
164. Xiang, Y., et al., *Expression of proteinase-activated receptors (PAR)-2 in articular chondrocytes is modulated by IL-1beta, TNF-alpha and TGF-beta*. Osteoarthritis Cartilage, 2006. 14(11): p. 1163-73.
165. Lawrence, T. and D.W. Gilroy, *Chronic inflammation: a failure of resolution?* Int J Exp Pathol, 2007. 88(2): p. 85-94.
166. Wang, Y. and S. Lou, *Direct protective effect of interleukin-10 on articular chondrocytes in vitro*. Chin Med J (Engl), 2001. 114(7): p. 723-5.
167. Pilette, C., et al., *IL-9 inhibits oxidative burst and TNF-alpha release in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes through TGF-beta*. J Immunol, 2002. 168(8): p. 4103-11.
168. Sukedai, M., et al., *Involvement of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8 in antigen-induced arthritis of the rabbit temporomandibular joint*. J Oral Pathol Med, 2004. 33(2): p. 102-10.
169. Mishima, Y. and M. Lotz, *Chemotaxis of human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 2008. 26(10): p. 1407-12.
170. Lee, J.W., et al., *Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications*. Yonsei Med J, 2004. 45: p. 41-7.
171. Freyria, A.M. and F. Mallein-Gerin, *Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: The indisputable role of growth factors*. Injury.
172. Pufe, T., et al., *Programmable cells of monocytic origin (PCMO): a source of peripheral blood stem cells that generate collagen type II-producing chondrocytes*. J Orthop Res, 2008. 26(3): p. 304-13.
173. Henrotin, Y.E., et al., *Effects of exogenous IL-1 beta, TNF alpha, IL-6, IL-8 and LIF on cytokine production by human articular chondrocytes*. Osteoarthritis Cartilage, 1996. 4(3): p. 163-73.
174. Van Offel, J.F., et al., *Influence of bisphosphonates on the production of pro-inflammatory cytokines by activated human articular chondrocytes*. Cytokine, 2005. 31(4): p. 298-304.
175. Radons, J., W. Falk, and T.E. Schubert, *Interleukin-10 does not affect IL-1-induced interleukin-6 and metalloproteinase production in human chondrosarcoma cells, SW1353*. Int J Mol Med, 2006. 17(2): p. 377-83.
176. Campo, G.M., et al., *Purified human plasma glycosaminoglycans reduced NF-kappaB activation, pro-inflammatory cytokine production and apoptosis in LPS-treated chondrocytes*. Innate Immun, 2008. 14(4): p. 233-46.
177. Mathy-Hartert, M., et al., *Reactive oxygen species downregulate the expression of pro-inflammatory genes by human chondrocytes*. Inflamm Res, 2003. 52(3): p. 111-8.