



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

TESIS DOCTORAL

Valoración de peptidasas en pacientes con artrosis de rodilla tratados con Plasma Rico en Factores de Crecimiento

DOCTORANDO:

JAVIER ARANCETA RAMOS

DIRECTOR DE TESIS:

PROF. LUIS CASIS SÁENZ

Junio 2022

TESIS DOCTORAL

Título:

Valoración de peptidasas en pacientes con artrosis de rodilla tratados con Plasma Rico en Factores de Crecimiento

DOCTORANDO:

JAVIER ARANCETA RAMOS

DIRECTORES DE TESIS:

PROF. LUIS CASIS SÁENZ

PROF. JUAN JOSE GOIRIENA DE GANDARIAS (El prof. Juan José Goiriena de Gandarias codirigió esta tesis doctoral hasta su fallecimiento en 2020)

AGRADECIMIENTOS

A mis padres. Por su apoyo incondicional. Por haber hecho posible ser quien soy.

Al Profesor Luis Casis. Por aceptar la dirección de mi tesis y por el apoyo que me ha brindado durante todo el proceso de este trabajo. Además de enseñarme una fisiología humana a la última en las aulas de la universidad, me ha permitido conocerle más como persona a lo largo de este proyecto.

Al Profesor Juan José Goiriena de Gandarías por hacer este proyecto posible y especialmente por implicarse personalmente en las fases iniciales. Me hubiese gustado poder verle sentado en la sala el día de mi defensa de este proyecto.

A Carmen. Sus conocimientos y ayuda polivalentes son de otro nivel. Gracias.

A Ayala por estar siempre ahí.

Al Dr. Mikel Sánchez y todo el equipo de la Unidad de Cirugía Artroscópica del Hospital Vithas San José de Vitoria, por compartir su conocimiento y su enfoque especial y único de la COT.

Al Dr. Jesús Seco Calvo por su colaboración.

Al programa de Doctorado de Investigación Biomédica y al Departamento de Fisiología de la UPV/EHU por haber acogido este proyecto y por su colaboración en el buen fin de esta tesis.

Al Dr. James P. Stannard (MOI-Missouri) y todo el equipo por acogerme con los brazos abiertos, ampliarme el horizonte y el campo de visión, y hacer parecer fácil lo difícil; y al Dr. Raymond M. Smith (MGH-Boston) y todos en el MGH que me enseñaron tanto en tan poco tiempo.

A mis profesores de la UPV/EHU.

A todos los pacientes que están dispuestos a participar en cualquier estudio como este.

A todos los que me han apoyado y ayudado en lo posible.

"La integridad sin conocimiento es débil e inútil y el conocimiento sin integridad es peligroso y terrible" (Samuel Johnson).

"La ciencia es simplemente sentido común en su mejor momento, es decir, rígidamente precisa en la observación y despiadada en la lógica" (Thomas Huxley).

Contenido

AGRADECIMIENTOS.....	3
ABREVIATURAS.....	11
INTRODUCCION.....	13
1. LA RODILLA.....	14
1.1 ANATOMIA Y FISILOGIA.....	14
1.2 LIQUIDO SINOVIAL.....	27
1.3 BIOMECANICA.....	31
2 ARTROSIS.....	35
2.1 DEFINICION.....	35
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	41
2.3 PATOGENESIS.....	44
2.4 TRATAMIENTO DE LA ARTROSIS.....	80
2.5 BIOMARCADORES DE ARTROSIS.....	85
3 PEPTIDASAS.....	89
3.1 CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA DE LAS PEPTIDASAS.....	89
3.2 FUNCIONES DE LAS PEPTIDASAS.....	92
3.3 LAS PEPTIDASAS EN LA FISIOLÓGÍA Y EN LA PATOLOGÍA.....	93
3.4. PAPEL DE LAS PEPTIDASAS EN LA ARTROSIS DE RODILLA.....	100
3.5. PEPTIDASAS ANALIZADAS EN ESTE TRABAJO.....	101
4. PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP).....	120
4.1. INTRODUCCIÓN, TERMINOLOGÍA Y USOS.....	120
4.2. BASES CIENTÍFICAS PARA SU USO EN ARTROSIS.....	121
4.3. PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO (PRGF).....	122
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	123
OBJETIVOS PRIMARIOS.....	125
OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	125
MATERIALES Y METODOS.....	127
1. POBLACION DE ESTUDIO Y ENSAYOS REALIZADOS.....	128
2. PACIENTES Y COMITÉ DE ÉTICA.....	128
2.1. TIPO DE ESTUDIO:.....	128
2.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN:.....	129
3 METODOLOGÍA DE LA OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO CON PRGF.....	130
3.1 MATERIALES EMPLEADOS:.....	133

4 MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO	133
4.1 MATERIAL	135
5 MÉTODOS	138
5.1 DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS ENDO/AMINO PEPTIDÁSICAS	138
5.2 ANÁLISIS DE DATOS DE LAS ACTIVIDADES PEPTIDÁSICAS.....	143
6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:	145
RESULTADOS	147
1 VARIABLES EPIDEMIOLOGICAS.....	148
2 ANALISIS DESCRIPTIVO	149
ANÁLISIS DE LAS AMINOPEPTIDASAS.....	154
APN	154
Cys-AP.....	157
APB	159
APA	161
PSA	164
ASP	166
DPPIV	168
ACE	170
ACE 2	171
PEP	173
NEP	176
PROTEÍNA	178
DISCUSION.....	183
1. SOBRE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASICA EN DISTINTOS TEJIDOS.....	184
2. SOBRE LAS AMINOPEPTIDASAS EN LA ARTROSIS: ACTIVIDAD OBSERVADA Y NUEVAS PERSPECTIVAS	191
LA ARTROSIS COMO ENFERMEDAD CRÓNICA E INFLAMACIÓN DE BAJO GRADO.....	191
ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASICA OBSERVADA Y SU PAPEL EN LA ARTROSIS	194
CONCLUSIONES	209
BIBLIOGRAFIA.....	212
ANEXOS	264

Índice de figuras

Figura 1.- Ligamentos cruzados y colaterales de la articulación de la rodilla derecha. Anatomía ósea.	14
Figura 2.- Interior de la articulación de la rodilla.	15
Figura 3.- Visión anterior de la articulación de la rodilla con la pierna en flexión parcial	17
Figura 4.- Ligamentos de la rodilla, visión anterior.	18
Figura 5.- Articulación de la rodilla: Visión posterior y sección sagital a través de la articulación de la rodilla.....	19
Figura 6.- Articulación de la rodilla: Visión lateral y medial.....	21
Figura 7.- Cartílago articular normal: características histológicas, grado 0. La superficie del cartílago es lisa. La matriz y los condrocitos se organizan en zona superficial, intermedia y profunda. (B) Tinción con safranina O, aumento original $\times 5$	24
Figura 8.- Dibujo esquemático de las diferentes capas de cartílago articular, placa ósea subcondral y esponjosa subarticular.....	24
Figura 9.- Dibujo esquemático de la capa de cartílago calcificado y la placa ósea subcondral con vasos del plexo vascular articular.....	26
Figura 10.- Justificación molecular del continuo mecanosensorial de los condrocitos. Esquema de los grados de tensión mecánica y los respectivos canales de señalización de mecano transducción identificados.	34
Figura 11.-Diferencias entre la articulación normal y artrósica (OA). Cambios macroscópicos característicos de la OA.....	38
Figura 12.- Cambios morfológicos característicos de estadios tempranos y tardíos en la artrosis.	39
Figura 13.- Esquema del círculo cerrado de enfermedad: progresión de la osteoartritis teniendo en cuenta sus causas y consecuencias.	44
Figura 14.- Principales cambios moleculares y celulares a nivel osteocondral en la artrosis.....	49
Figura 15.- Representación esquemática de las principales vías de señalización activadas por citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF α e IL-6) en condrocitos y sus efectos en procesos posteriores.	52
Figura 16.- Implicación de la membrana sinovial en la fisiopatología de la OA.....	58
Figura 17.- Cambios característicos a nivel condral y moléculas implicadas en la artrosis	61
Figura 18.- Cambios característicos en la articulación osteoartrítica	62
Figura 19.- Línea condral desde MSC condral al condrocito terminal. Marcadores y factores reguladores propios de cada uno.....	63
Figura 20.- Intercomunicación profunda entre TGF- β y la señalización canónica de Wnt presente en varios niveles en la célula	65
Figura 21.- Interacción entre la microbiota intestinal y los factores de riesgo de la artrosis.....	68

Figura 22.- Especies reactivas de oxígeno, envejecimiento y homeostásis del cartílago articular	69
Figura 23.- Representación esquemática de la influencia del estrés oxidativo y la inflamación en la patogenia de la artrosis y el posible papel de los polifenoles vegetales.....	74
Figura 24.- Mapa de calor mostrando las diferencias en el microbioma intra-articular en muestras de pacientes con artrosis de rodilla en comparación con muestras normales.....	76
Figura 25.- SRA simplificado con sus enzimas y receptores.....	96
Figura 26.- Niveles de péptidos de angiotensina en plasma. El diámetro de los círculos refleja su concentración en plasma	97
Figura 27.- Ejes del SRA y sus efectos.	98
Figura 28.- Estructura de la aminopeptidasa N porcina.....	104
Figura 29.- Estructura cristalina de la aminopeptidasa regulada por insulina.....	106
Figura 30.- Estructura de la aspartil aminopeptidasa humana	111
Figura 31.- Estructura cristalina de la dipeptidil peptidasa IV humana.	112
Figura 32.- Estructura cristalina de la enzima convertidora de angiotensina I humana.....	114
Figura 33.- Esquema mostrando los principales actores del Sistema Renina-Angiotensina, sus receptores y traslación de señales al interior celular.	115
Figura 34.- Estructura esquemática de la Encima Convertidora de Angiotensina 2.....	115
Figura 35.- Esquema mostrando el papel del Sistema Renina-Angiotensina (RAS). Ejes ACE y ACE2. Puntos de unión SRA e inmunoinflamatoria/oxidativas, estudiado en cáncer.	116
Figura 36.- Estructura esquemática de la Prolil Endopeptidasa (PEP)	117
Figura 37.- Estructura cristalina de la Endopeptidasa Neutra	118
Figura 38.- Centrifugadora específica (Imagen superior). Tubos centrifugados con plasma en la parte superior (Imagen inferior).	131
Figura 39.- Esquema del procedimiento utilizado para separar las tres diferentes fracciones ensayadas.....	135
Figura 40.- Espectrofotómetro UV-2401 P de Shimadzu y Espectrofluorímetro RF 540, también de Shimadzu	136
Figura 41.- Ultracentrifugadora OPTIMA L-100 XP de Beckman Coulter y Centrifugadora Sorvall RC 28S de Du Pont.....	136
Figura 42.-Esquema de la hidrólisis del sustrato de peptidasa en el ensayo enzimático.	141
Figura 43.- Esquema de la hidrólisis del sustrato de NEP en el ensayo enzimático	142
Figura 44.-Hidrólisis de 3-(-2-furylacryloyl-I-Phe-Gly-Gly)(FAPGG) por acción de la actividad ACE.	144
Figura 45.-Hidrólisis de Abz-Ser-Pro-3-nitro-Tyr-OH (SPNPT) por acción de la ACE2.	145
Figura 46.- Esquema de los factores etio-patogenicos, las alteraciones moleculares y los cambios celulares característicos de la patogenia de la artrosis.	192

Índice de tablas

Tabla 1.- Biomarcadores de envejecimiento que pueden traducirse en enfermedades metabólicas	71
Tabla 2.- Peptidadas, clasificación, sinónimos y función.	102
Tabla 3.- Características de los pacientes estudiados.....	148
Tabla 4.- Valores descriptivos de las diferentes aminopeptidasas en líquido sinovial, fracción membrana y citosol de forma basal (antes del tratamiento)	150
Tabla 5.- Descripción de los valores basales de las aminopeptidasas consideradas en líquido sinovial, en citosol y en membrana por sexo	151
Tabla 6.- Descripción ASP en líquido sinovial de segunda muestra, en hombres y en mujeres.....	152
Tabla 7.- Descripción de los valores basales de las aminopeptidasas consideradas en líquido sinovial, en citosol y en membrana según grado de artrosis.....	153
Tabla 8.- Descripción de los valores basales de APN en líquido sinovial, en citosol y en membrana (UP/mg de proteína). Total, por sexo y por grupo de artrosis.	155
Tabla 9.- Descripción de los valores de APN para las 3 tomas de muestras y en las 3 localizaciones (UP/mg de proteína). Total, y por grupo de artrosis.	156
Tabla 10.- Descripción de los valores basales de Cys-AP en líquido sinovial, en citosol y en membrana (UP/mg de proteína). Total, por sexo y por grupo de artrosis.	157
Tabla 11.- Descripción de los valores basales, en segunda y en tercera muestra de Cys-AP en líquido sinovial, en citosol y en membrana (UP/mg de proteína) por grupo de artrosis.....	158
Tabla 12.- Descripción de actividad de APB en líquido sinovial, citosol y en fracción membrana (UP/mg de proteína) por sexo y grupo de artrosis	159
Tabla 13.- Descripción de los valores basales, en segunda y en tercera muestra de APB en líquido sinovial, en citosol y en membrana (UP/mg de proteína) por grupo de artrosis	160
Tabla 14.- Descripción de actividad de APA en líquido sinovial, citosol y en fracción membrana (UP/mg de proteína) por sexo y grupo de artrosis	161
Tabla 15.- Descripción de los valores basales, en segunda y en tercera muestra de APB en líquido sinovial, en citosol y en membrana (UP/mg de proteína) por grupo de artrosis	163
Tabla 16.- Descripción de actividad de PSA en líquido sinovial, citosol y en fracción membrana (UP/mg de proteína) por sexo y grupo de artrosis	164
Tabla 17.- Descripción de los valores basales, en segunda y en tercera muestra de PSA en líquido sinovial, en citosol y en membrana (UP/mg de proteína) por grupo de artrosis.	165
Tabla 18.- Descripción de actividad de ASP en líquido sinovial, citosol y en fracción membrana (UP/mg de proteína) por sexo y grupo de artrosis.	166
Tabla 19.- Descripción de los valores basales, en segunda y en tercera muestra de ASP en líquido sinovial, en citosol y en membrana (UP/mg de proteína) en total y por grupo de artrosis.....	167
Tabla 20.- Descripción de actividad de DPPIV en líquido sinovial y citosol (UP/mg de proteína) por sexo y grupo de artrosis.....	168

Tabla 21.- Descripción de los valores basales, en segunda y en tercera muestra de DPPIV en líquido sinovial y en citosol (UP/mg de proteína) por grupo de artrosis.	169
Tabla 22.- Descripción de actividad de ACE en líquido sinovial	170
Tabla 23.- Descripción de los valores basales, en segunda y en tercera muestra de ACE en líquido sinovial (UP/mg de proteína) por grupo de artrosis.	170
Tabla 24.- Descripción de actividad de ACE2 en líquido sinovial	171
Tabla 25.- Descripción de los valores basales, en segunda y en tercera muestra de ACE2 en líquido sinovial (UP/mg de proteína) por grupo de artrosis.	172
Tabla 26.- Descripción de actividad de PEP en líquido sinovial, citosol y en fracción membrana (UP/mg de proteína) por sexo y grupo de artrosis.	173
Tabla 27.- Descripción de los valores basales, en segunda y en tercera muestra de PEP en líquido sinovial, en citosol y en membrana (UP/mg de proteína), en total y por grupo de artrosis.....	175
Tabla 28.- Descripción de actividad de NEP en líquido sinovial, citosol y en fracción membrana (UP/mg de proteína) por sexo y grupo de artrosis.	176
Tabla 29.- Descripción de los valores basales, en segunda y en tercera muestra de NEP en líquido sinovial, en citosol y en membrana (UP/mg de proteína) por grupo de artrosis.	177
Tabla 30.- Descripción de actividad de proteína en líquido sinovial, citosol y en fracción membrana (UP/mg de proteína) por sexo y grupo de artrosis.....	178
Tabla 31.- Descripción de los valores basales, en segunda y en tercera muestra de proteína en líquido sinovial, en citosol y en membrana (UP/mg de proteína) por grupo de artrosis.	179
Tabla 32.- Media de las tres determinaciones en líquido sinovial (UP/mg de proteína), total, por sexo y según grado de artrosis.....	180
Tabla 33.- Media de las tres determinaciones en citosol (UP/mg de proteína), total, por sexo y según grado de artrosis.....	181
Tabla 34.- Media de las tres determinaciones en membrana (UP/mg de proteína): total, por sexo y según grado de artrosis.....	181

ABREVIATURAS

AGEs: Advanced Glycation End products, Productos Finales de Glicación Avanzada

AH: Ácido hialurónico

Ang: Angiotensina

AR: Artritis Reumatoide

ATR: Receptor de Angiotensina 1,2 y 4.

BMP: Bone Morphogenetic Protein, Proteína Morfogenética del Hueso

COMP: Cartilage Oligomeric Matrix Protein, Matriz Protéica Oligomérica del Cartílago

DAMP: Damage Associated Molecular Pattern, Patrones Moleculares Asociados al Daño Articular

FLS: Fibroblast Like Sinoviocyte, Sinoviocitos de Tipo Fibroblástico

GDF: Growth/Differentiation Factor, Factores de Crecimiento/Diferenciación

HIF-1 α : Hipoxia Inducible Factor 1 α , Factor 1 α Inducible por Hipoxia

IL-1 β : Interleuquina 1 beta

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases, Proteína Quinasas Activada por Mitógenos

MEC: Matriz Extracelular

MSC: Células Madre Mesenquimales.

NF- κ β : Nuclear Factor kappa Beta, Factor Nuclear kappa Beta

OA: Osteoarthritis, Artrosis

OARSI: Osteoarthritis Research Society International, Sociedad Internacional para la Investigación de la Artrosis

PAMPs: Pathogen Associated Molecular Patterns, Patrones Moleculares Asociados Patógenos

PDGF: Platelet Derived Growth Factor, Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas

PRG4: Lubricina o Proteoglicano 4

ROS: Reactive Oxygen Species, Especies de Oxígeno Reactivas

Sox9: SRY-Box Transcription Factor 9, Factor 9 de Transcripción de SRY Box

SP: Sustancia P

SRA: Sistema Renina Angiotensina

TGF- β : Transforming Growth Factor beta, Factor de Crecimiento Transformante beta

TLR 2 y 4: Toll-Like Receptor), Receptor Tipo Toll

TNF- α : Tumor Necrosis Factor alfa, Factor de Necrosis Tumoral alfa

TRPV4: Transient Receptor Potential Vanilloid 4, canal activado por parámetros físicos
V4

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor), Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

WNT: de la contracción de Wingless e Int.

INTRODUCCION

1. LA RODILLA

1.1 ANATOMIA Y FISIOLOGIA

La rodilla es una articulación troclear que une el muslo con la pierna. Realiza el movimiento anteroposterior de flexión y extensión. También tiene función estática dentro de la que se incluye la de carga, lo cual le obliga mecánicamente a un complejo sistema estabilizador de partes blandas.

Se puede dividir de forma teórica en 2 articulaciones. La articulación femorotibial (bicondílea) y femorotuliana (tróclea). Desde el punto de vista fisiológico es toda una, y está recubierto por una sinovial común. El líquido sinovial, por su importancia, será tratado en un punto aparte más adelante.

- Fémur distal: los cóndilos femorales con forma convexa, curva, que se van estrechando hacia posterior. No son iguales, la superficie distal del cóndilo medial es más alargada que la del lateral. Suponen una superficie continua de contacto con la tibia que varía en función del grado de flexión de la articulación. Hacia anterior comprende un surco convexo para la rótula, la tróclea. Esta no es simétrica, siendo la cara lateral de la tróclea más prominente lo que le confiere más estabilidad cuando la rótula se encuentra en el surco a partir de los 30-45° de flexión. Ambas superficies están recubiertas de cartílago hialino. (Figuras 1 y 2).

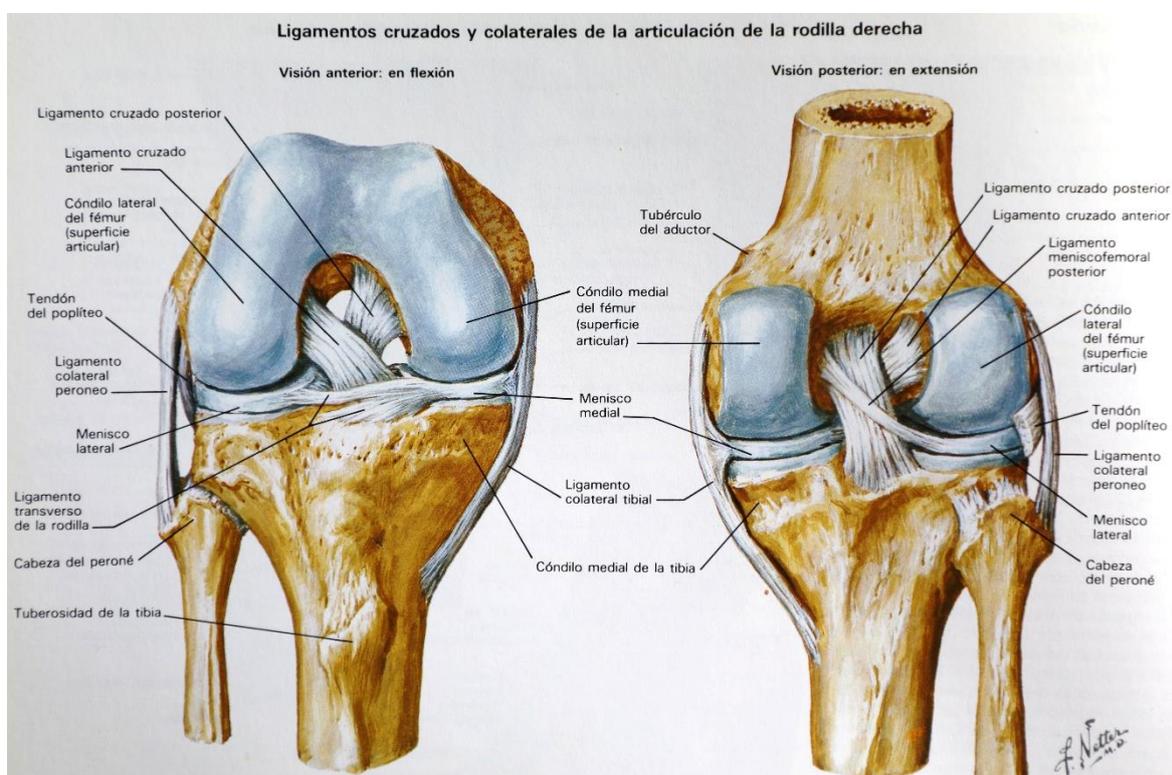


Figura 1.- Ligamentos cruzados y colaterales de la articulación de la rodilla derecha.

Anatomía ósea.

Esta imagen y todas las firmadas por el Dr. Frank H. Netter están tomadas de la Colección Netter de ilustraciones médicas tomo VIII/1 Sistema musculoesquelético. Reimpresión 2001. Ed. Masson

- Rótula (patela): Es el hueso sesamoideo más grande del cuerpo. Cóncava en su cara posterior presenta 2 caras divididas por una cresta para articular la tróclea. En su polo proximal se inserta el extremo distal del tendón cuadriceps y en su polo distal esta la inserción proximal del tendón rotuliano. Su función es de polea, deslizándose la rótula sobre la tróclea durante la flexoextensión. (Figura 3)
- Tibia proximal: Presenta 2 superficies ligeramente excavadas ovaladas en sentido anteroposterior, una para cada cóndilo, siendo la del medial cóncava y alargada, y la del lateral presenta cierta convexidad anteroposterior. El conjunto de la superficie se conoce como platillos tibiales.

Entre ambas esta la eminencia intercondílea en la que se encuentran los tubérculos intercondíleos o espinas tibiales en las que se insertan los ligamentos cruzados en su inserción distal, y por delante y por detrás, las áreas intercondíleas (Figuras 1 y 2).

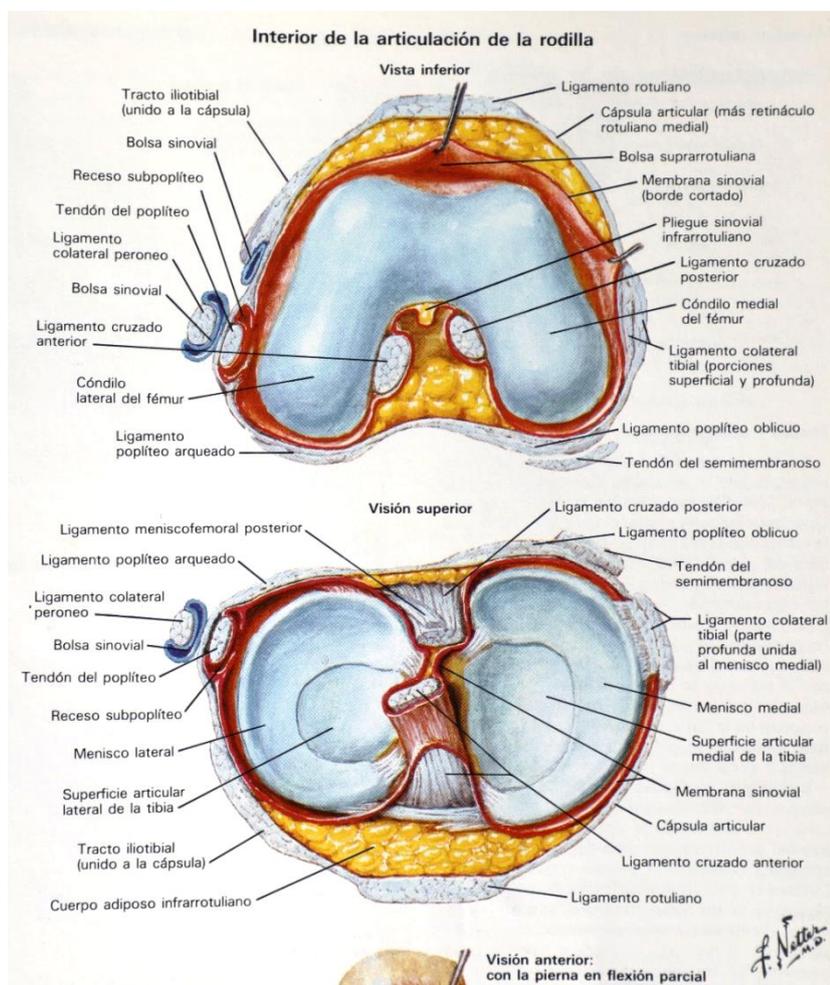


Figura 2.- Interior de la articulación de la rodilla.

Esta imagen y todas las firmadas por el Dr. Frank H. Netter están tomadas de la Colección Netter de ilustraciones médicas tomo VIII/1 Sistema musculoesquelético. reimpresión 2001. Ed. Masson

Meniscos:

Los meniscos son dos fibrocartílagos fijados en la tibia y en la capsula articular. Están muy poco vascularizados y con una capacidad de cicatrización muy limitada. El lateral tiene forma de semiluna casi cerrada en O, y el medial tiene forma de C. (Figura 2)

Se encargan de aportar congruencia a la articulación femorotibial aumentando la profundidad de las superficies articulares.

Se fijan a la tibia mediante sus respectivos cuernos anterior y posterior en el área intercondílea posterior y anterior. Por su cara lateral se fijan a la capsula en su totalidad, excepto el lateral en la zona posterior, donde deja el conocido como hiato poplíteo (Figura 2), para el tendón de dicho musculo. En la parte anterior se unen por el ligamento transverso de la rodilla con relación a la grasa de Hoffa, y a la rótula por los ligamentos meniscorotulianos. (Figura 1)

Ligamentos:

Las estructuras óseas se encuentran unidas por la capsula fibrosa con sus uniones femorales, tibiales y rotulianas, y los ligamentos que la refuerzan. Los más importantes son los ligamentos cruzados anterior (LCA) y posterior (LCP) y los ligamentos capsulares, que son engrosamientos de la propia capsula y los vemos descritos a continuación, entre los que destacan los llamados colaterales medial (LCM) y lateral (LCL), y los complejos posteromedial, posterolateral y anterolateral (Figuras 1 y 3).

Los ligamentos son estabilizadores pasivos de la articulación. Hay estabilizadores primarios de un determinado movimiento, por ejemplo, el LCA es primario para la traslación anterior de la tibia sobre el fémur. Es un ligamento cuyas fibras están dispuestas para soportar fuerzas en esa dirección, y es su principal función. Los estabilizadores secundarios de un movimiento son aquellos que colaboran, pero no es su principal función. En este caso el LCM también colabora en evitar la traslación de la tibia.

Cuando los ligamentos se tensan, es esta propia fuerza de tensión la que le da la función y actúa como estabilizador al transmitirse la fuerza tensil a lo largo del ligamento. Esto sucede cuando se da el movimiento para el cual las fibras están orientadas a contener. Los ligamentos tienen límites mecánicos de fuerzas que pueden soportar. Si se superase esta fuerza, primero se puede dar cierta elongación del ligamento. Si la fuerza aumentase más allá, se produciría la rotura del ligamento.

El LCA se origina en la superficie posteromedial del área intercondílea del cóndilo lateral y se desplaza distal y anterior para insertarse en la eminencia intercondílea. Está formado por 2 fascículos, el antero medial y posterolateral. Es el estabilizador primario de la traslación anterior de la tibia sobre el fémur, controla la rotación en los primeros grados de flexión y limita la hiperextensión de la rodilla. Cuando se lesiona su riego se suele ver comprometido y por lo tanto su capacidad de cicatrizar (Figuras 1 y 2).

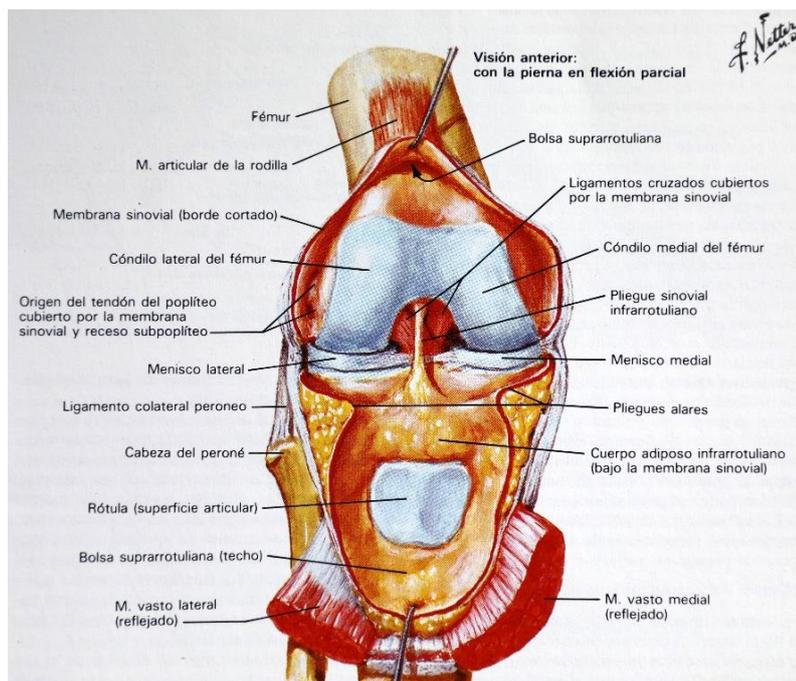


Figura 3.- Visión anterior de la articulación de la rodilla con la pierna en flexión parcial

Esta imagen y todas las firmadas por el Dr. Frank H. Netter están tomadas de la Colección Netter de ilustraciones médicas tomo VIII/1 Sistema musculoesquelético. reimpresión 2001. Ed. Masson

El LCP se origina en la superficie medial del área intercondílea del cóndilo medial y se desplaza a distal a insertarse en el margen posterior de la tibia a 1cm de la interlinea articular. Queda alineado en el eje anteroposterior con la cortical posterior de fémur y tibia. También está formado por 2 fascículos, el anterolateral y el posteromedial. Es el estabilizador primario de la traslación posterior de la tibia y controla la rotación en los últimos grados de flexión. Su relación con la capsula posterior hace que mantenga una mejor vascularización que el LCA, y por lo tanto mejor capacidad de cicatrización (Figuras 1 y 2).

Estos dos se conocen como el pivote central y en conjunto son los principales responsables de limitar la traslación de la tibia en el plano sagital.

El LCM es ancho y plano, y está descrito como un fascículo profundo y uno superficial, aunque su anatomía sea más difusa y compleja. Estabiliza el valgo y la rotación externa. El profundo está unido al menisco en 2 partes: meniscofemoral y meniscotibial. Es el primero en romperse. El superficial es más largo y resistente (Figuras 4 y 5).

Ligamento anterolateral: De menor resistencia mecánica, pero juega un papel en el control rotacional de la rodilla (Chahla J et al., 2018).

Banda ileotibial: se encuentra también en la cara lateral de la rodilla pasando por el epicóndilo femoral e insertándose distalmente en el tubérculo de Gerdy en la tibia. Controla el varo y la rotación interna (Figura 4).

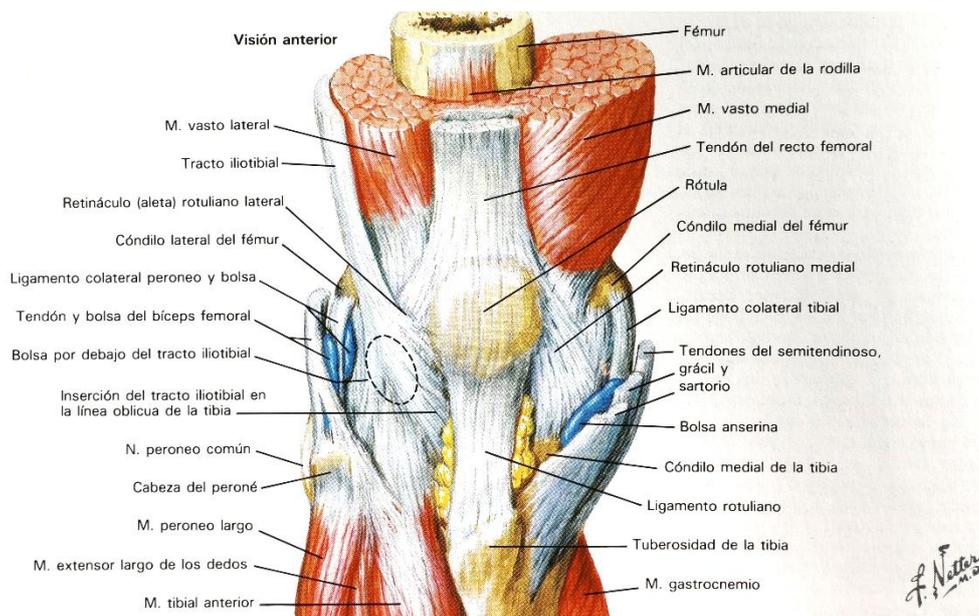


Figura 4.- Ligamentos de la rodilla, visión anterior.

Esta imagen y todas las firmadas por el Dr. Frank H. Netter están tomadas de la Colección Netter de ilustraciones médicas tomo VIII/1 Sistema musculoesquelético. reimpresión 2001. Ed. Masson.

Capsula articular:

Formada principalmente por fibras de colágeno, con poca celularidad. La dirección de las fibras responde a la dirección de las fuerzas que actúan sobre la capsula articular. En zonas que soportan mayores fuerzas continuas se producen engrosamientos de la capsula, que pueden ser observados desde externo, y se denominan ligamentos intrínsecos.

El retináculo compone principalmente la cara anterior de la capsula articular y forma parte del mecanismo extensor junto con los siguientes ligamentos.

Superficial al retináculo en la cara lateral encontramos el ligamento ileopatelar. Los ligamentos patelofemorales medial y lateral van desde su respectiva inserción femoral isométrica, a su lado correspondiente en el polo proximal de la rótula. Estos ligamentos sirven para prolongar la inserción distal del vasto oblicuo medial y del vasto lateral en la rótula hacia medial y lateral respectivamente. Estas inserciones musculares otorgan un papel dinámico a estos ligamentos sobre la articulación patelofemoral, actuando de forma integrada en el mecanismo extensor (Figura 4).

Los ligamentos patelotibiales tienen un papel más estático. No hay inserciones femorales en esta cara anterior.

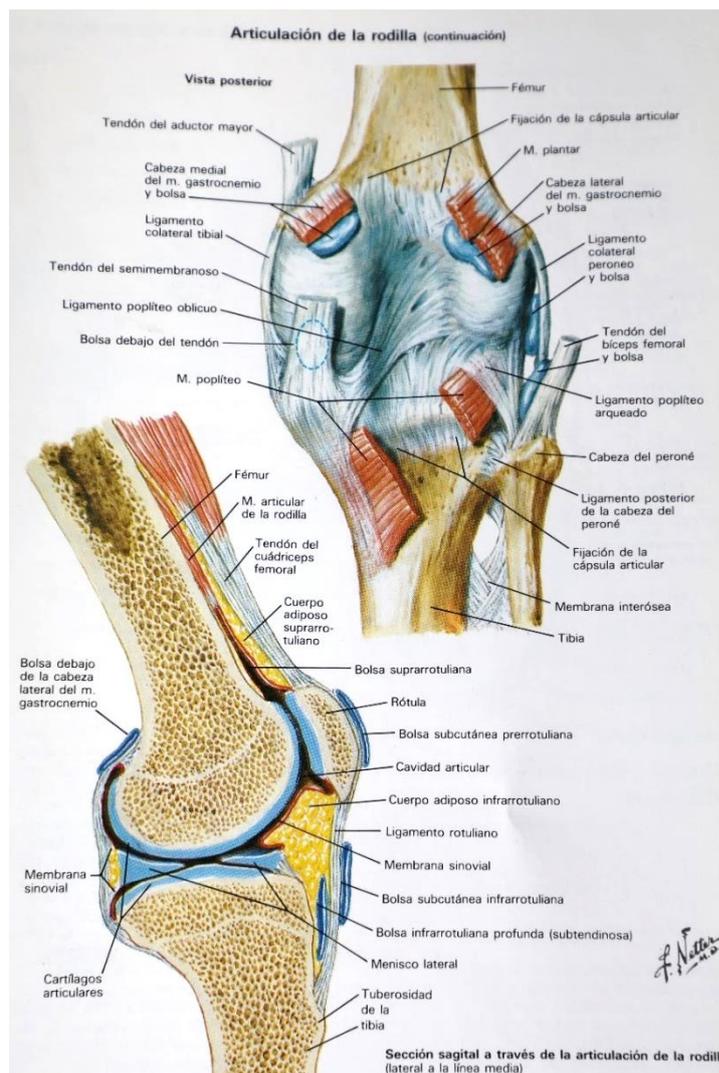


Figura 5.- Articulación de la rodilla: Visión posterior y sección sagital a través de la articulación de la rodilla.

Esta imagen y todas las firmadas por el Dr. Frank H. Netter están tomadas de la Colección Netter de ilustraciones médicas tomo VIII/1 Sistema musculoesquelético. reimpresión 2001. Ed. Masson.

Los ligamentos latero mediales y posteriores tienen una función más estática. Son estabilizadores del desplazamiento femorotibial. El complejo posteromedial actúa como una expansión de los isquiotibiales, y el posterolateral del bíceps femoral, llegando desde el musculo hasta el menisco. Se continúan con la capsula posterior, cubriendo y dando estabilidad a esta zona de la rodilla. Tenemos, así una unidad funcional musculotendinosa-ligamento menisco-capsular (Figura 5).

En anterolateral tenemos la banda ileotibial, con 2 divisiones, el ligamento ileopatelar del que ya hemos hablado; y el tracto ileotibial que va a insertarse al tubérculo tibial lateral (Gerdy) tras dar extensiones capsulo-óseas. El tracto ileotibial es responsable del “clunk” al realizar el test de “pivot shift”. Como hemos comentado las 2 cabezas del bíceps femoral, estabilizan y se unen a la capsula en esta zona, en sus inserciones distales en cabeza de peroné y cara lateral de tibia proximal. La parte de la cabeza corta

que se inserta lateral al tubérculo de Gerdy, es responsable del signo de Segond (Kittl C et al., 2018) (Figura 4).

En la cara posterolateral destaca el denominado complejo arcuato o complejo posterolateral, formado por el ligamento arcuato, el ligamento colateral lateral, poplíteo y la cabeza lateral del gemelo. El ligamento arcuato y el poplíteo principalmente, dan extensiones al menisco. El ligamento poplíteo pasa por el hiato poplíteo y profundo al ligamento colateral lateral y se inserta en el epicóndilo lateral (Figura 5).

Posee una rica inervación propioceptiva que permite regular la postura y actitud articulares (Flandry F y Hommel G, 2011).

Musculatura:

Existen numerosos músculos alrededor de la rodilla. Estos se encargan de realizar los movimientos funcionales de la rodilla de forma coordinada, y además son estabilizadores dinámicos de la rodilla. La flexo extensión y rotaciones las controlan principalmente el cuádriceps, gastrocnemios y los isquiotibiales. El cuádriceps es el principal musculo responsable de la extensión. Está compuesto por el vasto intermedio, superficial a este el recto femoral, el vasto medial y el vasto lateral (son las cuatro cabezas clásicas). En estos 2 últimos se pueden distinguir unas fibras con un mayor ángulo respecto el eje del fémur en su inserción distal: el vasto medial y lateral oblicuo. La inserción distal es en polo superior de patela y capsula anterior como se ha descrito. Además, el musculo articular de la rodilla, profundo al vasto intermedio o a veces unido a este, se inserta en la parte proximal de la plica sinovial y se encarga de elevarla durante la extensión para evitar su pinzamiento (Figura 4 y 6).

En el polo distal de la rótula se inserta el tendón rotuliano, que continua el aparato extensor, terminando distalmente en la tuberosidad tibial. Separado de la superficie tibial por la bursa infrarotuliana y la grasa de Hoffa o infrapatelar (Halewood C y Amis AA, 2016) (Figura 5).

Almohadilla grasa infrapatelar:

Tejido adiposo con una rica vascularización que se sitúa infrapatelar. Junto con el ligamento intermeniscal, están suspendidos por un pliegue de la sinovial, el ligamento mucoso, desde el techo de la escotadura intercondílea (Flandry F y Hommel G, 2011) (Figura 5).

Arterias y nervios

Las arterias que irrigan la articulación proceden de la arteria femoral, poplíteo y tibial anterior.

La inervación procede del nervio tibial, peroneo común, obturador y femoral.

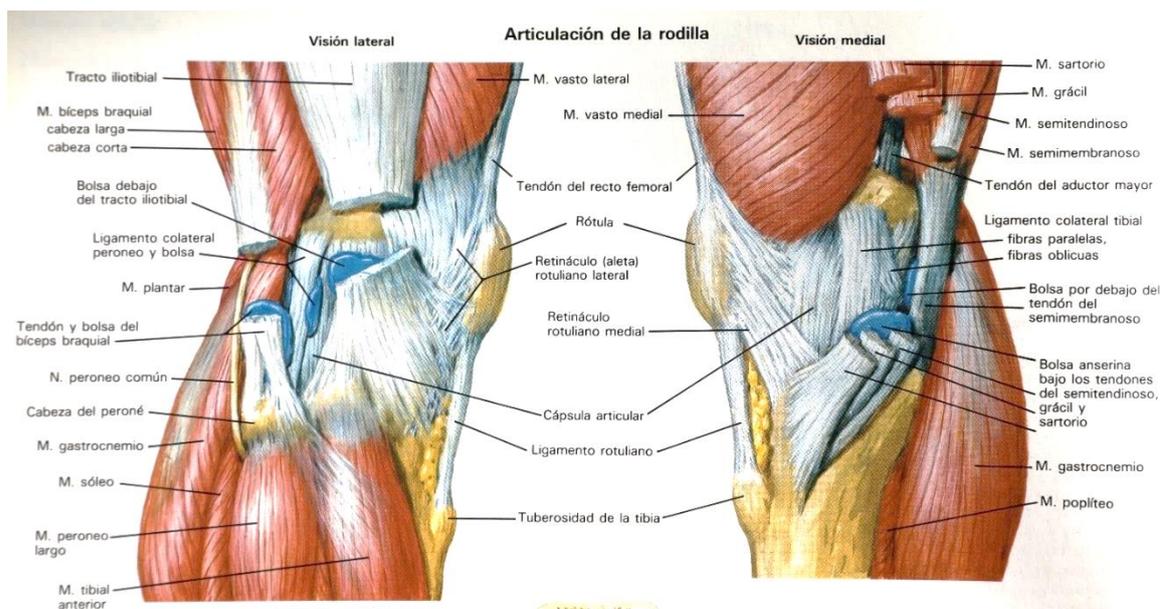


Figura 6.- Articulación de la rodilla: Visión lateral y medial.

Esta imagen y todas las firmadas por el Dr. Frank H. Netter están tomadas de la Colección Netter de ilustraciones médicas tomo VIII/1 Sistema musculoesquelético. reimpresión 2001. Ed. Masson

Membrana sinovial:

Es una capa de tejido conectivo. Es gruesa y muy vascularizada, y constituye la parte más reactiva de la articulación. Reviste las articulaciones internamente, llamando la atención que sea un tejido especializado y no un epitelio. Carece de membrana basal como tal. Podemos distinguir 2 capas: la íntima y la subíntima o subsinovial.

- La íntima: celularidad abundante rodeada de una matriz extracelular (MEC). Aunque lo parece, no llega a haber una verdadera membrana basal. Es la capa que limita el interior de la articulación y la realmente funcional. Es la zona donde más colágeno tipo VI encontramos, unido a células y matriz extracelular, por lo que parece dar andamiaje a esta capa.
- Subíntima: composición variable entre individuos y localizaciones. Presenta escasa celularidad. Predomina el tejido adiposo o fibroso con poco contenido extracelular.

Tapiza la cara interna de la capsula articular y se prolonga por la superficie del hueso intracapsular no recubierto de cartílago hasta contactar con este último, o cualquier estructura tendinosa o ligamentosa intracapsular. En la rodilla ligamentos como los cruzados son recubiertos por la membrana sinovial, quedando así extrasinoviales pero intracapsulares. En los meniscos la sinovial se detiene donde se inserta la capsula, en la porción periférica, quedando esta última porción fuera de la cavidad articular y el resto del menisco si estuviese intrasinovial.

Destacar el pliegue sinovial infrarrotuliano y el cuerpo adiposo infrarrotuliano. La de la rodilla es la más extensa y compleja de las sinoviales articulares.

El sinoviocito es la célula principal y característica. Puede producir grandes cantidades de ácido hialurónico (AH) y, en condiciones inflamatorias, enzimas degradadoras de matriz extracelular.

Se distinguen 2 tipos diferenciados de sinoviocitos:

- Sinoviocitos tipo macrófago o tipo A

Se derivan de monocitos de médula ósea.

Expresan CD14, CD45, CD68, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II), receptores Fc (FcγR) y actividad esterasa inespecífica.

- Sinoviocitos de tipo fibroblástico (FLS del inglés Fibroblast Like Sinoviocite) o fibroblastos sinoviales o tipo B:

Se derivan de progenitores mesenquimales de la propia sinovial.

Producen laminina, fibronectina, entactina, colágenos tipo I, III, IV y V, condroitin y heparan sulfato, y ácido hialurónico.

Expresan la proteína de adhesión celular vascular I (VCAM-I), factor de aceleración de decaimiento del complemento (DAF o CD55), y de forma específica la integrina $\alpha 6\beta 1$, que es una molécula de adhesión que le permite unirse a la laminina de la lámina basal (parte de la 'membrana basal').

Es la principal encargada de la producción del líquido sinovial. Este se tratará con mayor profundidad más adelante.

Es un controlador del tráfico hacia la articulación y desde la articulación. Se encarga así de mantener la homeostasis del líquido sinovial. Los posibles fragmentos de matriz condral desprendidos a líquido sinovial son degradados por la sinovial.

Es semipermeable, no dejando pasar moléculas de alto peso molecular, limitadas del plasma, ni la salida de ácido hialurónico.

Es una de las porciones con mayor inervación sensitiva con acceso desde articular junto con la inserción de los ligamentos cruzados, como refleja el llamativo estudio en el que el propio autor del estudio se somete a una artroscopia bilateral exploratoria sensitiva sin anestesia (Dye SF et al., 1998).

Cartílago:

El cartílago recubre las superficies óseas de la articulación. Es un tejido rico en matriz extracelular. Su principal función es servir como tejido de baja fricción que permita la función biomecánica articular humana, y absorber y transmitir las cargas aplicadas sobre él durante el movimiento articular y sin este.

Esta maravilla de la ingeniería humana hace posibles millones de ciclos cada año, durante muchos años. En cuanto a la carga que soporta hay que tener en cuenta que esta puede ser hasta unas 30 veces el peso del cuerpo al saltar, aunque en las actividades diarias se queda en unas 3-4 veces. Estamos hablando de que, para un individuo medio

de 70 kg, el rango habitual de fuerza soportada por una articulación como la rodilla, puede ir desde los 210 a 2100kg en cada paso (Heinlein B et al., 2009).

Su célula principal es el condrocito que se encarga de mantener la estructura y microambiente fisiológico del cartílago, adaptadas a las señales bioquímicas que reciben, bien tengan origen mecánico, molecular en sí, sistémico, genético... Son los encargados de la producción de la matriz extracelular y esta es la que otorga las propiedades mecánicas. Durante el normal funcionamiento articular, el condrocito es capaz de mantener un equilibrio entre el catabolismo y anabolismo (Goldring MB y Marcu KB, 2009). **Los condrocitos se encuentran inmersos en la MEC, en un ambiente de baja concentración de oxígeno y glucosa.** Su metabolismo está adaptado mediante la sobreexpresión de HIF-1 α (Factor de hipoxia inducible, del inglés: Hipoxia Inducible Factor 1 α) que **aumenta el número de GLUTs**; existe así un **transporte facilitado de glucosa y predomina la glucolisis anaerobia** (Mobasheri A et al., 2005).

Existen 3 tipos de cartílago, el hialino, el fibroso y el elástico. El cartílago articular sano es cartílago hialino y está formado principalmente por colágeno tipo II, suponiendo más del 50% de su peso seco, responsable de aportar la fuerza tensil. Forma una estructura que se refuerza con otros tipos de colágeno y proteínas de la matriz. Los proteoglicanos se integran dentro de esta estructura atrayendo agua y aportando resistencia a las fuerzas de compresión.

Los proteoglicanos son muy heterogéneos, aun así, aproximadamente un 90% es agrecano, y suponen el 10% del peso del cartílago. Los componentes principales del agrecano son el condroitin sulfato, dermatan sulfato y el queratan sulfato (glucosaminoglicanos). El agrecano es producido por los condrocitos y también es capaz de regularlos. Se une al ácido hialurónico, lo que le permite esa comunicación celular, principalmente con condrocitos, mediante el CD44 y CD54. Se degrada mediante Agrecanasas o Catepsinas (proteasas específicas).

Los componentes de la MEC (matriz extracelular) están unidos entre sí por glucoproteínas entre las que cabe destacar la proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP por sus siglas en inglés: Cartilage Oligomeric Matrix Protein), también conocida como trombospondina 5 (Recklies AD, 1998).

Partiendo desde la cara articular y avanzando hacia profundo, podemos dividir el cartílago en 3 zonas y las capas que vemos en las figuras 7, 8 y 9. La zona superficial, la intermedia o transicional y la zona profunda. Tras estas encontramos la marca de agua, previa al cartílago calcificado. Profundo a este último se encuentra el hueso subcondral (Goldring MB, 2008).

El cartílago es hipertrófico en la marca de agua y presenta condrocitos hipertróficos, fenotipo caracterizado por tener mayor tamaño y producir una matriz extracelular rica en colágeno tipo X. En el cartílago calcificado está presente el colágeno tipo X. Las fibrillas del cartílago articular sobrepasan la marca de agua y se continúan en el cartílago calcificado.

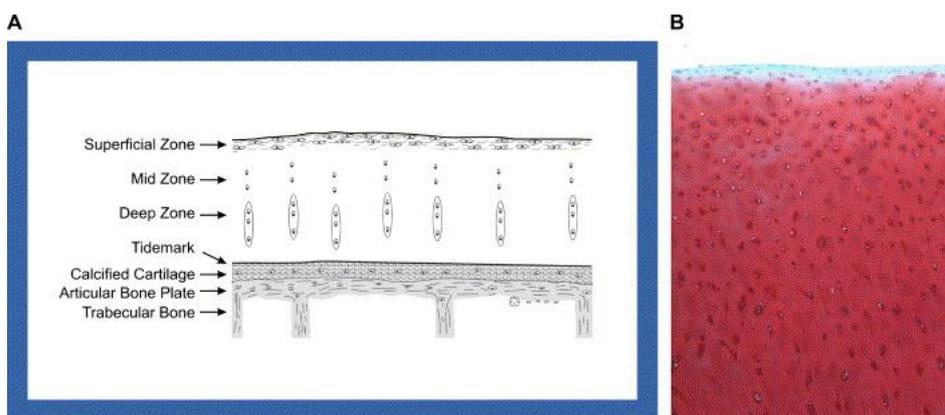


Figura 7.- Cartílago articular normal: características histológicas, grado 0. La superficie del cartílago es lisa. La matriz y los condrocitos se organizan en zona superficial, intermedia y profunda. (B) Tinción con safranina O, aumento original ×5.

Imagen tomada con permiso de: Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14(1):13-29

La estructura y características fisiológicas de cada capa del cartílago, y también del resto de capas óseas hacia medula ósea, son específicas para la función mecánica y fisiológica que desempeñan.

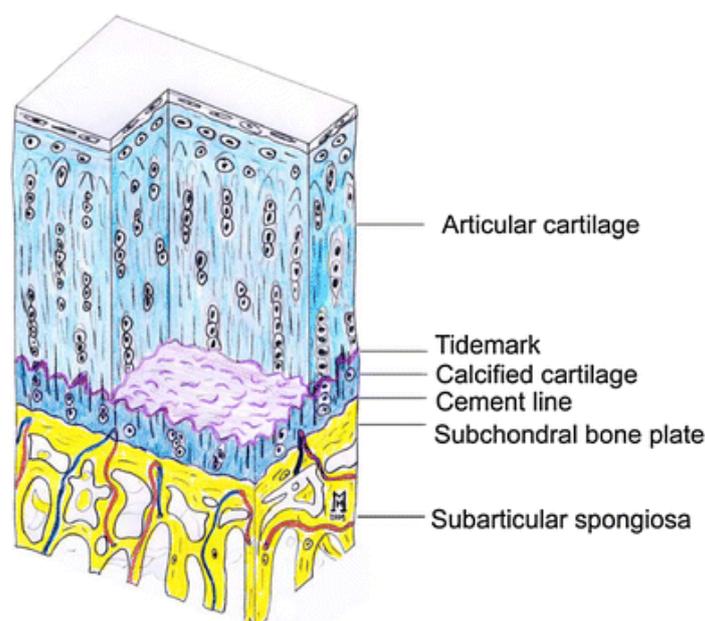


Figura 8.- Dibujo esquemático de las diferentes capas de cartílago articular, placa ósea subcondral y esponjosa subarticular

Imagen tomada con permiso de: Madry H, van Dijk CN, Mueller-Gerbl M. The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2010;18(4):419-433.

El cartílago tiene una capacidad de atenuación del 1-3%. Puede soportar cargas hasta 5 veces superiores a las que se producen al caminar, sin lesionarse. Los condrocitos regulan la estructura y composición del cartílago; cambios mecánicos y/o bioquímicos (factores de crecimiento, citoquinas, etc.) pueden modificarla (Madry H et al., 2010).

El cartílago no tiene el mismo espesor en todas las articulaciones. En las más congruentes el espesor es menor, al distribuirse la carga por más superficie (codo, tobillo). En las menos congruentes (rodilla, cadera), el espesor es mayor, permitiendo aumentar el área de carga.

Hay que mencionar la osificación endocondral, propia del crecimiento de los huesos largos durante el desarrollo, y sus mecanismos moleculares, ya que está implicada en el desarrollo de la artrosis (Kamaguchi H, 2008).

Factores a tener en cuenta por su participación en la diferenciación condral y también en el metabolismo articular, que se explicaran con más detalle en el apartado de patogenia:

- Sox9 (del inglés: SRY-Box Transcription Factor 9): este factor de transcripción perteneciente al grupo de alta movilidad es característico de células condrales. Se encuentra principalmente en progenitores mesenquimales y condrocitos en proliferación, y participa en esta. Es imprescindible para la correcta formación de cartílago. Realiza una regulación positiva de genes de colágeno II y XI y agreganos.
- Wnt/B-catenin (vía canónica): Son vías de transducción de señales al interior celular. Wnt viene del inglés, de la contracción de Wingless y Int. Participa en la maduración de los condrocitos. Vía aumentada en la artrosis, actúa vía mTOR. Inhibe la expresión de la Sox9 (Maeda K et al., 2019). También existen vías no canónicas.
- Proteína Morfogénica del Hueso (del inglés Bone Morphogenetic Protein: BMP): Incluye factores de crecimiento/diferenciación (del inglés Growth/Differentiation Factor: GDF)
- Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (Del inglés Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF): factor angiogénico producido principalmente por macrófagos y fibroblastos en la articulación. Tiene un papel en la angiogénesis por hipoxia y por inflamación. Se estimula por HIF- α y TNF- α (Del inglés, Tumor Necrosis Factor alfa. Factor de necrosis tumoral alfa) sobre todo.
- TGF- β (del inglés Transforming Growth Factor beta): juega un papel central en la señalización de la osificación endocondral, en el remodelado óseo y en la artrosis.

El cartílago no tiene nociceptores (Dye SF et al., 1998).

Hueso subcondral:

Debido a la importancia que se le ha atribuido en los últimos años, el hueso subcondral merece un apartado propio, que nos permita explicar la fisiología de forma más clara.

En comparación con el cartílago, el hueso subcondral se ha estudiado mucho menos.

Es la capa de hueso que se encuentra inmediatamente en profundidad del cartílago. Según el autor el punto de corte se toma a diferente nivel, pero el más aceptado fija la separación en la línea de cemento, dejando el cartílago calcificado hacia la superficie articular y la placa de hueso subcondral hacia la medula ósea.

El hueso subcondral está formado por la citada placa de hueso subcondral y por la esponjosa subarticular, y separa el cartílago de la medula ósea. Es la unión osteocondral. La estructura de unión no es plana, sino tridimensional muy irregular, que hace que la superficie de contacto entre cartílago y hueso subcondral sea mayor (Madry H et al., 2010) (Figura 9).

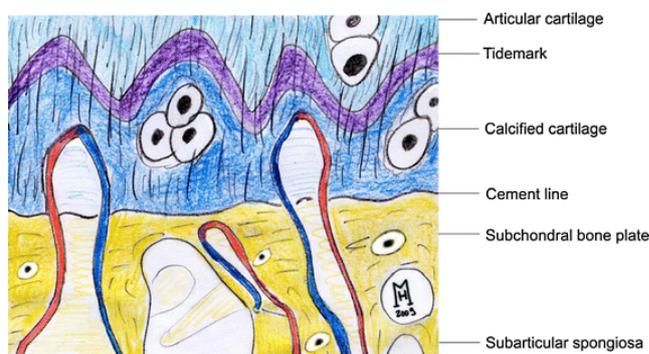


Figura 9.- Dibujo esquemático de la capa de cartílago calcificado y la placa ósea subcondral con vasos del plexo vascular articular.

Imagen tomada con permiso de: Madry H, van Dijk CN, Mueller-Gerbl M. The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010;18(4):419-433.

Su estructura es muy variable según la articulación y la zona dentro de esta.

Las trabéculas son predominantemente perpendiculares a la superficie articular. Con frecuencia estas son incluso laminillas o laminas en vez de trabéculas. Este denso hueso esponjoso de la placa subcondral tiene una estructura similar al panal de abeja con unos espacios de unos 0.4-0.6mm, que se van agrandando milímetros según están más profundo hacia la medula ósea. Esta estructura laminar y densa de la placa subcondral, está formada por fibrillas paralelas de colágeno que se continúan hacia el hueso laminar de las trabéculas de la medula ósea. El colágeno es tipo I (Madry H et al., 2010).

No hay fibras de colágeno que pasen del hueso subcondral hacia el cartílago calcificado, lo que hace que esta zona sea mecánicamente un punto débil.

Antes se tenía a hueso subcondral y cartílago como estructuras estancas en su unión, pero se ha visto que sí hay paso de **estructuras vasculares y nerviosas**. Estas penetran en estructuras de tipo canales huecos, desde la cavidad medular de la esponjosa subarticular hasta el cartílago. Se ha visto **una mayor concentración de estas estructuras en zonas con alto estrés mecánico** dentro de una articulación, y que es mayor en articulaciones que soportan mayor carga que en las que soportan una menor. Esto sugiere que el cartílago (y el hueso subcondral) en estas zonas tiene una vascularización muy rica, y se puede nutrir a partir de esta. Se ha demostrado la difusión de moléculas en ambas direcciones (Arkill KP y Winlove CP, 2008) y la **nutrición y oxigenación** en un porcentaje importante **de las capas profundas del cartílago desde el hueso subcondral**. (Oliveira Silva M et al., 2020).

El hueso subcondral tiene nociceptores.

El espesor y densidad de la placa subcondral varía dentro de una articulación y entre articulaciones. Esto se correlaciona con el estrés mecánico a largo plazo en cada punto de la superficie articular. Así tenemos que, en las zonas con un mayor estrés mecánico, el hueso subcondral tiene un mayor espesor, densidad y vascularización.

Esta adaptación a las características mecánicas de cada zona articular le permite desarrollar mejor su función: la atenuación y transmisión de cargas.

En este sentido, hay que tener en cuenta que el cartílago y el hueso subcondral tienen unas propiedades mecánicas muy diferentes, aumentando la rigidez de superficial a profundo. El hueso subcondral tiene una capacidad de atenuación de cargas del 25% (frente al 1-3% del cartílago) (Madry H et al., 2010).

En resumen, además de la estructura, la fisiología y todas las características de cada capa del cartílago y del hueso, vienen dadas para cumplir lo mejor posible con su función específica. Esto también hace que esta zona de transición entre cartílago y hueso subcondral sea una zona muy activa y dinámica, en la que existe una transmisión de información entre ambas y funcionan como una unidad funcional mecánica y bioquímica.

De la medula ósea parte la vascularización y la innervación. En medula ósea destacan las células madre mesenquimales (MSC del inglés: Mesenchymal Stem Cells) que participan en procesos reparativos y regenerativos, y en mantener una homeostasis inmunológica (Chan CKF et al., 2018).

1.2 LIQUIDO SINOVIAL

El líquido sinovial es claro, prácticamente transparente, y viscoso. Baña el interior de todas las articulaciones del cuerpo, con el límite articular interno de la membrana sinovial y cartílago. De forma fisiológica, la cantidad que se encuentra en el espacio articular, es limitada, pero la suficiente para el desempeño de sus funciones; si realizásemos una artrocentesis a un paciente sano obtendríamos no más de entre 0.5 y 2ml (Dougados M, 1996).

Esta continuamente renovándose. Se forma a partir de un ultrafiltrado que se realiza en la membrana sinovial desde el plasma que llega a los capilares sinoviales, y los componentes que secreta la propia membrana, entre los que destaca el ácido hialurónico y la lubricina. El filtrado se realiza en el intersticio sinovial. El sistema linfático sinovial es el principal encargado de eliminar líquido, macromoléculas y determinadas moléculas que son capaces de atravesar ese filtro de salida, y que no atraviesan ni AH ni lubricina (Ateashian GA y Mow VC, 2005).

En este proceso influye la presión intraarticular. La presión intraarticular en una rodilla sana en reposo se ha medido entre -10 y 0mmHg (Wood L et al., 1988). Una presión baja hace que tienda a haber un flujo hacia la articular, y una presión alta, a salir. Por tanto, los movimientos de la articulación favorecen el flujo y recambio del líquido sinovial, incluso al aumento del AH (Ingram KR et al., 2008).

1.2.1. FUNCIÓN

Una de las principales funciones del líquido sinovial es proteger la articulación y esto lo hace principalmente mediante la lubricación. Esto hace que se reduzca la fricción entre las superficies de la articulación que deslizan unas sobre otras (cartílago principalmente) con el movimiento articular.

También sirve de medio en el que se da el transporte de nutrientes, desechos y metabolitos de la articulación, sobre todo entre el cartílago y la sinovial.

Contiene células y compuestos solubles necesarios para el normal funcionamiento de la articulación.

Además, sirve como medio de comunicación entre las células de los diferentes tejidos de la articulación (Hui AY et al., 2012).

1.2.2. PRINCIPALES COMPONENTES

Dos de las moléculas más importantes son el ácido hialurónico y la lubricina.

El **Ácido Hialurónico (AH)**

El AH se produce en los sinoviocitos fibroblásticos. No se acumula, sino que es secretado directamente. TGF- β , IL-1 β (Interleuquina 1 beta) y PDGF (del inglés: Platelet Derived Growth Factor. Factor de crecimiento derivado de plaquetas) estimulan su producción (Oguchi T e Ishiguro N, 2004; Suzuki M et al., 1995). Además, el estiramiento y el movimiento articular aumentan su producción, ya que esta es mecanosensible (Mombberger TS et al., 2005; Ingram KR et al., 2008).

La interacción del AH con la lubricina, permite a esta última lubricar bajo altas presiones y es necesaria para reducir la fricción y el desgaste (Lee DW et al., 2014).

La **lubricina** o proteoglicano 4 (PRG4) es producida por condrocitos de la zona superficial y fibroblastos sinoviales. Se encuentra recubriendo la superficie del cartílago y en el líquido sinovial. Su estructura con múltiples O-glicosilaciones, le permite lubricar la superficie condral (y cualquier otra superficie) (Jay GD, 1992) reduciendo la fricción hasta casi 0 (0,1 es el valor estimado), que es su principal función (Jay GD y Walker KA, 2014). Esta lubricación varía según su concentración y es independiente de la viscosidad del líquido sinovial (Swann DA et al., 1985). Además, inhibe la hiperplasia sinovial y dificulta la adhesión de agregados proteicos en la superficie del cartílago (Rhee DK et al., 2005). Recientemente se ha visto que también tiene un **papel antiinflamatorio al interactuar con TLR 2 y 4** (Del inglés, Toll-Like Receptor. Receptor tipo toll) (Iqbal SM et al., 2016).

La principal macromolécula es la albumina, que junto con otras proteínas es la principal responsable de la presión osmótica, además de sus respectivas funciones.

En líquido sinovial también encontramos muchas otras proteínas, de las que hablamos más en el apartado proteómica. También encontramos vesículas, células, bacterias, lípidos.

Está aumentando mucho el interés y la importancia que reciben los exosomas presentes en líquido sinovial. Son vesículas extracelulares producidas por casi cualquier tipo celular, y su principal función es la comunicación intercelular y endocrina. Destacar que contienen citoquinas, además de las que se encuentran libres en el propio líquido sinovial, uno de los principales mensajeros entre células, enzimas degradadoras de tejidos, autoantígenos y otros (Gao K et al., 2020). También contienen material genético: ADN, ARN, microARN, ARNm (ARN mensajero) y ARNlnc (ARN largo no codificante) (Valadi H et al., 2007). Se les ha atribuido un papel protector y también un papel proartrósico (Li Z et al., 2018), por ello con el conocimiento actual se les atribuye un papel regulador en la artrosis según su contenido (Asghar S et al, 2020).

La celularidad en líquido sinovial guarda relación con la inflamación. En rodillas sanas no deberían superarse las 100 por mm³. Las artropatías no inflamatorias contienen hasta 1000 células/mm³, y más de 2000 en inflamatorias (Lemaire V et al., 1981).

El número de estudios que analiza en detalle los tipos celulares y su proporción en rodillas sanas, o incluso en artrosis, es casi inexistente. En la artrosis el tipo celular más abundante son los leucocitos y dentro de estos los linfocitos (con mayor proporción de CD4) que suponen algo más del 40% del total. Por orden encontramos monocitos/macrófagos (cerca del 35%), neutrófilos (8%), células dendríticas mieloides (5.5%), células NK (4%), células T reguladoras (2.3%), células dendríticas plasmocitoides (1.1%), y mastocitos (0.3%) (Kriegova E et al., 2018). También contiene células madre mesenquimales, que se ha visto que aumentan en la artrosis, y que, junto con los linfocitos, son el grupo de células que presenta un mayor número de estudios monocelulares en LS (Jones EA et al., 2008).

Quizá uno de los motivos de que no se analicen los tipos celulares y su proporción en rodillas sanas, o incluso en artrosis sea el hecho de que en numerosos casos los recuentos celulares diferenciales presentan resultados discrepantes. Por ejemplo, Schumacher HR Jr et al., 1986, enviaron alícuotas de 30 líquidos sinoviales a 4 laboratorios diferentes, para la comparación de los recuentos de leucocitos y los recuentos celulares diferenciales. Los recuentos de leucocitos mostraron solo una correlación justa (coeficientes de 0,76-0,80) con el laboratorio de referencia. Observaron cómo en el líquido sinovial de 4 pacientes hubo suficiente diferencia en los recuentos de leucocitos para hacer que los fluidos se clasificaran erróneamente como "inflamatorios" o "no inflamatorios", y en la mitad de las muestras examinadas, los porcentajes de neutrófilos cayeron fuera de los límites de confianza del 95% del valor determinado por el laboratorio de referencia. Plantearon por ello la importancia de recomendar prestar más atención al control de calidad de los análisis del líquido sinovial.

Y en relación directa con estas cuestiones planteadas, resulta interesante comentar la razón de no haber podido realizar un estudio/recuento celular en el presente trabajo.

Desde un punto de vista práctico, se recomienda encarecidamente que el recuento celular se lleve a cabo siempre dentro de las dos primeras horas posteriores a la toma de las muestras, ya que se ha observado que lecturas posteriores afectan seriamente a los resultados, debido a la fragilidad de las células fuera de la articulación (Martínez castillo A et al., 2010). De hecho, nosotros no pudimos observar formas celulares propiamente dichas ya que los ensayos citológicos los realizamos sobre muestras previamente ultracongeladas.

Frente al conocimiento clásico del líquido sinovial estéril, se han encontrado bacterias en todas las rodillas sanas y hongos en el 88% (Hammad DBM et al., 2019).

En el líquido sinovial están presentes numerosos lípidos: Ácidos grasos saturados, ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados (Van de Vyver A et al., 2020).

1.2.3. PROTEOMICA

En el año 2014 se describen 677 proteínas en líquido sinovial, de las cuales 545 no habían sido descritas hasta entonces. Esto nos hace ver por una parte lo poco que se había estudiado hasta entonces el proteoma articular, y el avance que supone este estudio (Balakrishnan L et al., 2014).

Primero su identificación y luego su papel en la fisiología articular, son considerados la base para la comprensión de la fisiopatogenia de la artrosis. Algunas proteínas podrían ser buenos elementos diagnósticos o como control de la enfermedad o tratamiento: biomarcadores. También pueden ser dianas terapéuticas (De Ceuninck F, 2007; Ruiz-Romero C y Blanco FJ, 2010).

Así, el conocimiento del proteoma articular es en gran medida el factor determinante del desarrollo en el conocimiento de la artrosis. Los avances van a caballo de la identificación de nuevas proteínas o funciones de éstas en la articulación. Con cada aporte se refuerzan hipótesis o se crean nuevas, se identifican nuevas vías, nuevas funciones celulares o conexiones con el resto del organismo. Comprender las funciones de las proteínas en líquido sinovial, es comprender la artrosis.

Cualquier análisis cuantitativo proteico conlleva una variabilidad interpersonal. En la artrosis se añade que es una enfermedad heterogénea en muchos aspectos, y esto complica el desarrollo del potencial referido de la proteómica.

Un área de interés dentro de la proteómica es conocer qué proteínas secreta cada célula (secretoma) y por lo tanto el origen u orígenes de las proteínas presentes en líquido sinovial, con un primer acercamiento muy reciente (Timur UT et al., 2021). Como hemos comentado el líquido sinovial es un elemento vehicular y junto con el suero plasmático, el elemento más práctico para el análisis del paciente con artrosis. El análisis de los secretomas de cada paciente o en cada momento, también puede ser una buena fuente de conocimiento (Gómez-Aristizabal A et al., 2017).

1.3 BIOMECANICA

La rodilla tiene una mecánica que a primera vista parece simple, ya que su único movimiento aparente es la flexo extensión, pero es más compleja como veremos a continuación. Con el avance de los métodos de estudio de la cinemática, los modelos y el conocimiento del movimiento han ido evolucionando.

La rodilla es básica para la deambulación y permite acercar o alejar el tronco del suelo, con el movimiento comúnmente conocido como sentadilla.

El rango articular normal se considera entre los 0 grados de extensión completa y los 120º de flexión máxima. En personas con mayor laxitud o en extensión pasiva, puede haber 5-10º grados de hiperextensión. Cuando la cadera está en flexión, la flexión activa alcanza los 140º y la pasiva los 160º.

Las nuevas técnicas en el análisis de la cinemática de la marcha han permitido estudiar mejor las fuerzas que soporta la rodilla durante la marcha, correr o el salto, su cinética (Fregly BJ et al., 2012).

Actualmente la cinemática de la rodilla se basa en variantes del modelo de 6 grados de libertad. Esta establece que la rodilla tiene movimientos en los 3 ejes. Diferencia 3 desplazamientos rotacionales: flexo extensión, adducción-abducción y rotación interna-externa; y 3 traslaciones: medio-lateral, anteroposterior y compresión-distracción (Bull AM y Amis AA, 1998).

En extensión completa es muy estable, lo que permite mantener la estabilidad en bipedestación y soportar todo el peso del cuerpo. En flexión, y según los grados de esta, la rodilla tiene mayor grado de rotación externa e interna y adducción-abducción.

La articulación femoropatelar tiene sus particularidades: aumenta la estabilidad articular, permite transmitir la fuerza del cuádriceps en flexión sin que haya una pérdida por fricción y aumenta el brazo de palanca (polea); sirve de protección a la tróclea femoral en flexión. Funciona como una polea junto con el tendón del cuádriceps y el rotuliano, y desliza por la tróclea durante la flexoextensión con diferentes áreas y porcentajes de contacto durante ella (Bull AM et al., 2002).

Todos los componentes articulares tienen su papel en la biomecánica articular, pero el control de la cinética lo realizan músculos y tendones. Como hemos visto anteriormente estos tienen su papel concreto de cara a que haya un movimiento coordinado y controlado, ofreciendo resistencia y limitando que haya desplazamientos y rotaciones no deseadas. Los ligamentos también tienen su papel en esta mecánica, estabilizando la rodilla. La estabilidad es básica para que pueda haber un normal movimiento de la rodilla. Aunque habitualmente pensemos en los ligamentos cuando nos enfrentamos a un problema de estabilidad articular, ésta no depende solo de los ligamentos.

La estabilidad puede ser estática o dinámica. Las estructuras musculotendinosas aportan principalmente una estabilidad dinámica, aunque también en la estática. El cuádriceps por ejemplo es agonista del LCP, y los isquiotibiales lo son del LCA. Aun así,

la estática viene dada principalmente por la congruencia ósea articular, los meniscos y los ligamentos.

Sirva de ejemplo para la estabilidad articular, y las lesiones asociadas cuando se sobrepasan los límites de esta, una de las lesiones deportivas más características: la rotura del LCA. Su incidencia es de 4 a 8 veces mayor en las mujeres. Su lesión se ha visto predisuelta por un valgo de rodilla, recurvatum (habitualmente secundario a hiperlaxitud) y un surco intercondíleo estrecho entre otros, desde el punto de vista anatómico. Vemos con ello que la biomecánica de la rodilla funciona como un todo, y una alteración en una estructura puede llevar a una disfunción o predisponer a una lesión. Incluso una alteración en la mecánica del pie-tobillo, la cadera o el raquis, también puede afectar la normal biomecánica de la rodilla de forma secundaria.

Así tenemos que una alteración estructural, mayor o menor, y que no tiene por qué ser traumática puntual, nos puede llevar a una desestabilización aguda o crónica de la rodilla, y como iremos viendo ésta nos va a general un desequilibrio mecánico que puede llegar a una disfunción global de los mecanismos fisiológicos y desembocar en una artrosis (Hafer JF et al., 2019).

Visto más atrás también, la superficie articular esta bañada por el líquido sinovial, incluyendo las superficies articulares que deslizan unas sobre otras durante el movimiento articular, la contracción muscular sin movimiento efectivo o en la carga en bipedestación. Durante la extensión la presión dentro de la articulación se negativiza aún más. Se ha medido una presión intraarticular en la rodilla de -43.9mmHg con la contracción isométrica del cuádriceps durante la elevación de la extremidad inferior extendida, y de -106.9mmHg durante la elevación resistida. La flexión tiende a aumentar la presión (Jayson MI y Dixon AJ, 1970).

La rodilla es una articulación especial en cuanto a su mecánica y los movimientos de las partes blandas. Tiene la particularidad de que estando en extensión y sin que haya movimiento, con la contracción del cuádriceps la rótula se desplaza hacia proximal, esto produce un “movimiento” capsuloligamentoso y a ello se le ha atribuido esa negativización aun mayor de la presión intraarticular. Se ha hipotetizado que estos movimientos de compresión y distracción de la capsula son un factor estabilizante de la rodilla y participan en su normal biomecánica.

Como estamos viendo, la mecánica articular es compleja y aunque hemos visto componentes anatómicos, de estabilidad articular, lubricado y presión intraarticular con su papel, el funcionamiento es como un todo y requiere del equilibrio de todos ellos para el normal funcionamiento y una cinética normal (Rutherford DJ et al., 2012). Una cinética alterada produce una alteración en la distribución de fuerzas y cargas sobre las superficies articulares, que se ven aumentadas. Las fuerzas habituales son: compresión, desviación varizante-valguizante y cizallamiento articular, frontal y sagital. La rótula sufre fuerzas de lateralización según el ángulo Q, compresión sobre la tróclea y de subluxación externa (Bullich J, 1995).

Cuando se produce una alteración de alguno de los elementos participantes en la mecánica articular, el organismo trata de hacer una adaptación de todos o parte de los elementos participantes que intentan compensar la alteración y devolver la rodilla a una biomecánica en equilibrio. En esta adaptación participan una serie de mecanismos moleculares que veremos más adelante, y que, junto a los mecánicos, son los responsables de los cambios macroscópicos que podemos ver al estudiar una rodilla artrósica.

Es importante tener en cuenta que estas compensaciones tienen unos límites fisiológicos. Cuando estos se ven sobrepasados, las compensaciones que se produzcan seguirán intentando e incluso devolviendo al equilibrio mecánico a la rodilla, pero serán patológicos. Si estos desequilibrios son grandes o repetidos, los mecanismos compensadores también serán grandes y llevarán a cambios patológicos irreversibles: la artrosis, que podríamos denominar mecánica, si ha sido producida por alteraciones en la mecánica articular.

En cuanto al papel primario de la musculatura como elemento motor articular, se ha estudiado muy poco la influencia de la mayor o menor fuerza muscular en la biomecánica de la rodilla. La importancia de la musculatura parece que va más allá que su función cinética. Así se ha estudiado el papel de la fuerza muscular en la correcta mecánica y su influencia con la artrosis. Se ha visto que la potencia es más relevante que la fuerza (Murray AM et al., 2015). Así una musculatura con un mayor entrenamiento o desarrollo implica una mayor estabilidad de la articulación y puede protegerla de lesiones ligamentosas (Halewood C y Amis AA, 2016). Trataremos con más detalle la influencia muscular en el desarrollo de la artrosis en el apartado de patogenia.

Mecanismos de mecano transducción:

Las fuerzas mecánicas son eje vertebrador en la fisiología articular, y aunque con menor peso que clásicamente, con gran importancia como causa de artrosis.

Los diferentes tipos de fuerzas vistas que soporta la articulación, junto con cambios fisicoquímicos tienen efectos biológicos sobre la misma. La mecano transducción es uno de los mecanismos.

La mecano transducción es la transformación de los estímulos mecánicos en señales celulares.

Se da principalmente en el cartílago y por el condrocito.

Se ha visto que la mecano transducción puede modificar el fenotipo de los condrocitos y controlar su respuesta anabólica. Estímulos mecánicos dañinos (traumatismos, obesidad...) producen señales de mecano transducción alteradas que llevan a cambios prodegenerativos en la articulación (Guilak F, 2011).

Los mecanismos más conocidos son canales iónicos, deformaciones celulares, conexiones extracelulares vía integrina. La apertura de canales de calcio, por ejemplo,

puede activar cascadas de cinasas o regular la expresión de genes en el núcleo del condrocito (Chen NX et al., 2000).

La vía por canales de calcio parece ser la más importante. Así, la transducción de los estímulos mecánicos fisiológicos-no dañinos es mediada por el canal activado por parámetros físicos V4 (TRPV4, del inglés: Transient Receptor Potential Vanilloid 4), que regula procesos anabólicos en el condrocito (O’Conor CJ et al., 2014). Como vemos en la imagen, este receptor parece actuar en el rango más fisiológico, y aunque parece haber cierta influencia, aún no sabemos cómo influye sobre este o los Piezo, la edad, la inflamación y otros (O’Conor CJ et al., 2016).

Por su parte los canales Piezo 1 y Piezo 2 se activan por estímulos mecánicos de compresión por encima de los niveles fisiológicos, y actúan de forma sinérgica transduciendo/modulando ese estímulo mecánico dañino al condrocito (Lee W et al., 2017) (Figura 10).

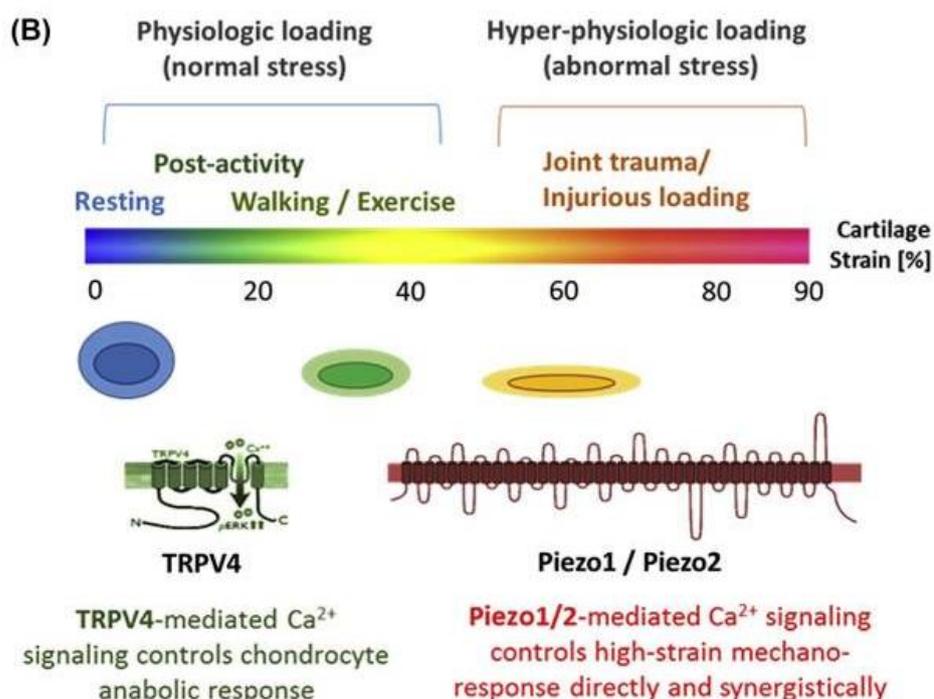


Figura 10.- Justificación molecular del continuo mecanosensorial de los condrocitos. Esquema de los grados de tensión mecánica y los respectivos canales de señalización de mecano transducción identificados.

Imágenes tomadas con permiso de: Lee W, Guilak F, Liedtke W. Role of Piezo Channels in Joint Health and Injury. *Curr Top Membr.* 2017;79:263-273

2 ARTROSIS

Es una enfermedad crónica y progresiva de la articulación en la que se ha perdido la homeostasis, siendo su aparición más precoz o tardía según la carga de trabajo a la que se le haya sometido, condicionantes genéticos, lesiones directas, obesidad y/o enfermedades concomitantes.

Su principal sintomatología es el dolor y la limitación funcional, pero sus consecuencias son mayores. El dolor crónico producido lleva a la toma de analgésicos y antiinflamatorios durante largos periodos de tiempo. La limitación funcional lleva a reducir la actividad física, puede limitar el trabajo, producir enfermedades psicológicas y llevar a una vida más sedentaria. Esto repercute en un empeoramiento de la patología médica y por ello en un aumento de la morbilidad y una pérdida de calidad de vida en estos pacientes (Nüesch E et al., 2011).

2.1 DEFINICION

Aunque clásicamente la artrosis se ha visto como una enfermedad degenerativa por desgaste que afectaba al cartílago, veremos que esto está cambiando en los últimos años. Se considera ahora la articulación como un órgano y la artrosis una enfermedad inflamatoria y biomecánica que afecta a esta. Aun así, esta definición está en continua revisión con las nuevas investigaciones que pueda haber.

La definición actual de la artrosis de la OARSI (Osteoarthritis Research Society International) es:

“Osteoarthritis is a disorder involving movable joints characterized by cell stress and extracellular matrix degradation initiated by micro- and macro-injury that activates maladaptive repair responses including pro-inflammatory pathways of innate immunity. The disease manifests first as a molecular derangement (abnormal joint tissue metabolism) followed by anatomic, and/or physiologic derangements (characterized by cartilage degradation, bone remodeling, osteophyte formation, joint inflammation and loss of normal joint function), that can culminate in illness.” [La artrosis es una alteración del normal funcionamiento de las articulaciones, caracterizado por el estrés celular y la degradación de la matriz extracelular iniciados por micro y macrodaños que activan una mal adaptación en las respuestas reparativas, que incluyen vías proinflamatorias de la inmunidad innata. La realidad biológica de la artrosis se manifiesta primero como una alteración molecular (metabolismo anormal de los tejidos articulares) seguido por la anatómica, y/o fisiológica (caracterizadas por la degradación del cartílago, remodelado óseo, formación de osteofitos, inflamación articular y pérdida de la normal función articular), que puede terminar en enfermedad con manifestación clínica] (Kraus VB et al., 2015).

Aun no conocemos los mecanismos fisiopatológicos que se encuentran detrás de los diferentes momentos evolutivos de la artrosis. El interés y el número de artículos publicados en los últimos años va en aumento, y esto está permitiendo arrojar cada vez más luz sobre estos procesos.

Todos estos avances en su estudio han llevado a OARSI a revisar su definición de la artrosis en la que hemos visto más arriba. En ella podemos ver claramente como ya se establecen 3 momentos en la evolución de la enfermedad: un primero en el que se produce un desequilibrio en la normal fisiología de la articulación, seguido de cambios visibles en los tejidos articulares; esto puede llevar a la enfermedad y manifestación clínica como tal (tercer momento).

Clásicamente se han descrito 2 grupos desde este punto de vista. Paciente que radiográficamente tiene datos de artrosis pero que no presenta clínica, y el que tiene datos radiológicos y manifestación clínica. Como bien se deja apreciar en la definición realizada, podemos establecer un tercer grupo evolutivo: aquellos pacientes en los que ya se ha iniciado una alteración en los procesos moleculares de su articulación, pero están asintomáticos en este aspecto y sin datos radiológicos de artrosis. Teniendo en cuenta las 2 principales herramientas diagnósticas en la actualidad (clínica y radiológica), hace que este grupo no se detecte ni se considere en la práctica clínica habitual.

Así, dentro de la población tenemos una parte que no presenta artrosis y una parte que sí. Dentro de esta última tendremos una gran parte asintomática y otra que si presenta clínicamente la enfermedad. Los asintomáticos, en general, no suelen diagnosticarse ya que no consultan por este motivo (y si lo hiciesen o como hallazgo incidental, solo se diagnosticarían los que ya tienen cambios radiológicos).

Incluso en los estudios sobre artrosis la definición de caso de artrosis varía de uno a otro. Las definiciones de caso de artrosis más empleadas son:

- Radiográfica: Para su diagnóstico solo se tienen en cuenta los cambios articulares visibles en una radiografía. La radiografía simple sigue siendo el gold estándar para el diagnóstico de artrosis. La clasificación más empleada es la de Kellgren-Lawrence (grado KL), que establece 6 grados según la severidad en los cambios radiográficos (Kellgren JH y Lawrence JS, 1957). Las otras más empleadas son la de la OARSI, la medición manual del espacio de la interlinea, y la de Alhback (1968) para el compartimento interno tibiofemoral (Culvenor AG et al., 2015).
- Referida por el paciente: el paciente refiere haber sido diagnosticado previamente de artrosis (Jordan KM et al., 2003).
- Sintomática (clínica y radiográfica): Existen unos criterios diagnósticos de artrosis internacionalmente aceptados, aunque existen 3 grupos que son los más empleados: los de la European League Against Rheumatism (EULAR), los de la American College of Rheumatology (ACR) y los del National Institute for Health and Care Excellence (NICE). Un estudio reciente sugiere que los de NICE son los más fiables (Skou ST et al., 2020). Los criterios diagnósticos de artrosis de NICE son: el paciente debe tener 45 años o más, dolor a la movilización de la articulación y no tener rigidez articular matutina o que esta sea menor de 30 minutos (Peat G et al., 2006).

Esta diferencia de criterios lleva a una heterogeneidad en los estudios, y a resultados dispares por ejemplo en la incidencia y prevalencia. Hablaremos más adelante de la

importancia del establecimiento de biomarcadores que permitan el diagnóstico y seguimiento evolutivo de la artrosis de forma objetiva y universal (Pereira D et al., 2011).

La gran mayoría de los pacientes que tenemos en la consulta son pacientes con cambios radiológicos y con clínica. Dentro de este grupo de pacientes, llama la atención que la correlación de la magnitud entre los cambios observados en la radiografía y la clínica que presentan es baja y la clínica variable. Es decir, tenemos pacientes que pueden tener un grado KL IV o incluso V, y apenas tener sintomatología o que sea leve; y otros que con un grado menor de artrosis ya se les ha colocado una prótesis por haberse acabado el resto del arsenal terapéutico. Además, dentro de la sintomatología, esta es variable entre unos y otros pacientes. Por todo esto y otros puntos que veremos más adelante, decimos que **la artrosis es una enfermedad heterogénea**, y lo es además desde numerosos puntos de vista.

Además, ni el grado KL, ni el estrechamiento de la interlinea ni el dolor reflejan por sí solos la gravedad de la enfermedad en los pacientes (Karsdal MA et al., 2015).

Es difícil establecer el inicio de la artrosis, excepto en las artrosis postraumáticas. En el resto, a día de hoy, los puntos de inicio que podemos establecer son los del diagnóstico como tal, pero desconocemos cuanto tiempo de evolución lleva esa artrosis al momento del diagnóstico.

Por lo general la sintomatología aparece cuando ya hay unos cambios artrósicos establecidos. La edad más frecuente a la que comienzan los síntomas es entre los 50 y 60 años.

Los cambios a nivel articular más características de la artrosis son la degradación de la matriz extracelular y el cambio de fenotipo de los condrocitos hasta su apoptosis, que lleva a la pérdida de cartílago articular, y hace de la artrosis una enfermedad irreversible (al menos de forma natural y a día de hoy); pero también se dan cambios en el resto de la articulación como la inflamación de la sinovial, la formación de osteofitos y el remodelado y esclerosis del hueso subcondral (Figura 11). El estrechamiento de la interlinea es característico, y es empleado en estudios como medición objetiva. En algunos pacientes pueden aparecer lesiones en medula ósea. También se puede producir engrosamiento de la capsula articular y calcificación de los meniscos en la rodilla (Tarner IH et al., 2005).

Estos cambios físicos a nivel articular producen por una parte unos cambios radiológicos característicos y por otra una manifestación clínica, que como hemos dicho, es heterogénea, pero en general incluye: rigidez articular, limitación funcional y dolor.

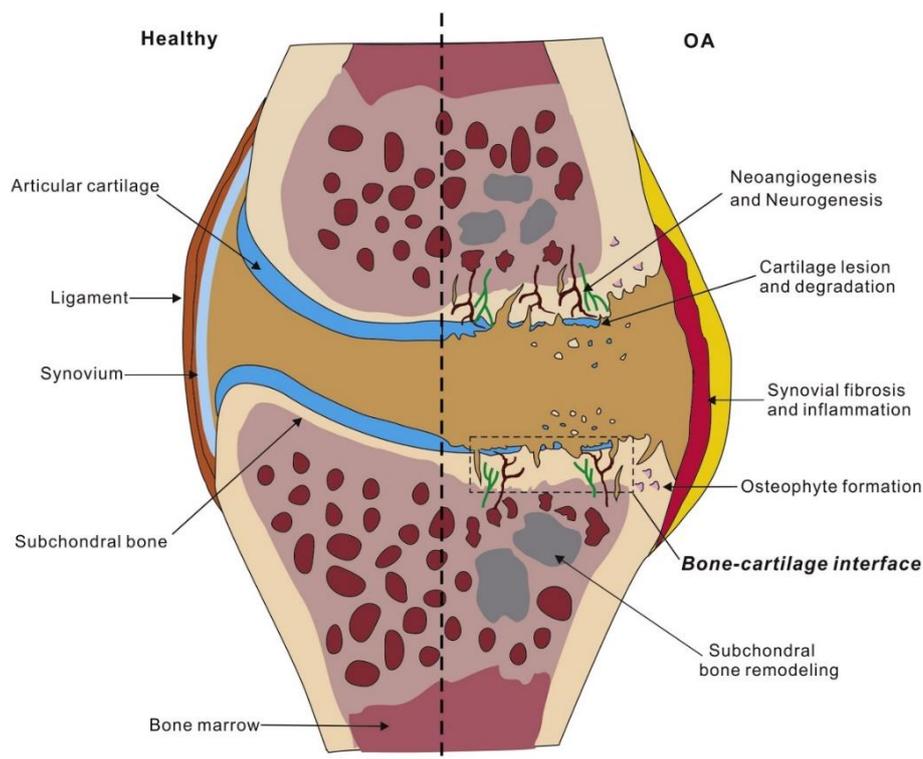


Figura 11.-Diferencias entre la articulación normal y artrósica (OA). Cambios macroscópicos característicos de la OA.

Imagen tomada de: Yuan XL, Meng HY, Wang YC, et al. Bone-cartilage interface crosstalk in osteoarthritis: potential pathways and future therapeutic strategies. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22(8):1077-1089.

Además de rigidez puede haber limitación en el rango articular, limitación para la realización de actividad y necesidad en el uso de ayuda como bastón o muletas. En cuanto al dolor este puede ser al iniciar el movimiento, durante el movimiento o en reposo; incluso puede dificultar o impedir el sueño. También puede aparecer crepitación y aumento de sensibilidad al frío.

Existen varias escalas de valoración funcional de la artrosis de rodilla entre las que destacamos: Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC), Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS), Lysholm Knee Scoring Scale (LKSS) e International Knee Documentation Committee (IKDS) (Collins NJ et al., 2011).

En cuanto a la medición del dolor, además del empleo de la habitual EVA (Escala Visual Analgésica), existe una escala específica: The Measure of Intermittent and Constant Osteoarthritis Pain (ICOAP) (Maillefert JF et al., 2009).

Radiográficamente, entre otras, los cambios observables más característicos son el estrechamiento de la interlinea, los osteofitos, radiolucencia por la esclerosis subcondral, calcificación de estructuras como meniscos.

En relación con los problemas en el diagnóstico, y sobre todo con su estudio estandarizado, la OARSI en el año 2000 crea un sistema de estadificación histopatológica que ha servido de referencia desde entonces. El problema, que requiere una muestra histológica y es invasivo. Se centra en los daños al cartílago. Establece 6 grados según su afectación en profundidad. 4 estadios según la extensión en porcentaje de la afectación articular. Su combinación da lugar a una puntuación que va de 0 a 24 (Pritzker KP et al., 2000).

Los grados de esta estadificación, nos sirven también para tener como referencia cuales son los cambios característicos de la progresión de la artrosis, ya que además tiene una buena correlación con los cambios macroscópicos y morfológicos.

- Grado 0: Superficie y morfología intactas.
- Grado 1: Superficie intacta con edema, fibrilación y acumulación de matriz superficial. Proliferación, hipertrofia y muerte celular en la zona superficial.
- Grado 2: Discontinuidad superficial. Fibrilación profunda. Perdida de columnas condrales en zona media. Proliferación, hipertrofia y muerte celular hasta zona media.
- Grado 3: Fisuras verticales hasta zona media. Proliferación, hipertrofia y muerte celular
- Grado 4: Erosión. Delaminación superficial y excavación.
- Grado 5: Denudación del cartílago hasta el cartílago calcificado. Esclerosis hueso subcondral, microfracturas y tejido fibrocartilaginosa cicatricial (microfracturas) sobre la superficie ósea.
- Grado 6: Deformación con remodelado óseo.

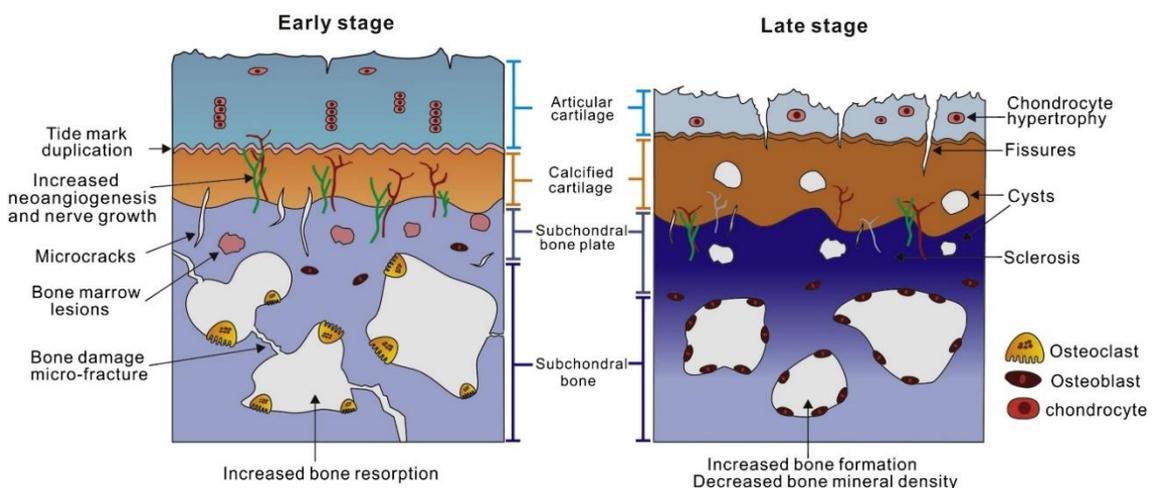


Figura 12.- Cambios morfológicos característicos de estadios tempranos y tardíos en la artrosis.

Imagen tomada de: Yuan XL, Meng HY, Wang YC, et al. Bone-cartilage interface crosstalk in osteoarthritis: potential pathways and future therapeutic strategies. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22(8):1077-1089.

Clásicamente las clasificaciones y estadificaciones se han establecido según la gravedad del daño en la articulación, distinguiendo unas fases tempranas con unas características morfológicas, y unas fases más avanzadas en la que los cambios morfológicos son mayores. En la Figura 12 podemos ver las características de los estadios tempranos y los tardíos.

El avance en el conocimiento del papel de los factores etiológicos y de la patogenia ha ido de la mano con ver la inflamación tienen un rol central en la progresión artrosis. Todos estos cambios en la forma de ver la artrosis han llevado, ya desde inicios del decenio pasado, a proponer unos **fenotipos de artrosis**; y no solo esto, sino a otorgarle a estos una mayor importancia en la progresión de la enfermedad, que las propias clasificaciones por grados de gravedad vistas hasta ahora. Esto entre otras cosas viene motivado por una parte por la heterogeneidad conocida de los propios pacientes incluidos en los estudios y de las diferentes características en la afectación articular de cada artrosis, por otra la dificultad para un manejo adecuado y la obtención de resultados concordantes y concluyentes entre diferentes estudios de similares características. En esta línea, también se ha visto como a pesar de que se ha demostrado un papel de la inflamación y de numerosas posibles dianas para medicamentos modificadores de la enfermedad, hay problemas en el planteamiento de los grupos de los estudios y en la obtención de resultados positivos.

La lógica junto con este conocimiento de la etiopatogenia nos hace pensar que un tratamiento puede ir bien a un tipo de paciente, pero no tener el efecto deseado en otro. Aquí es donde los fenotipos jugarían su papel: la correcta caracterización de la artrosis de cada paciente, primero para poder investigar sus características y segundo para desarrollar tratamientos modificadores de la progresión específica de esa artrosis. Así tendríamos los pacientes clasificados por grupos que representarían de forma más fiel lo que realmente está pasando en ese cuerpo y en esas articulaciones y poder orientar el tratamiento de forma más específica y eficaz.

El patrón de mediadores inflamatorios y la fuente de los mismos pueden variar de un patrón de artrosis a otro.

Los fenotipos de artrosis o subtipos llevan unos 10 años proponiéndose como una necesidad, sobre todo para el desarrollo de tratamientos. La división más frecuente suele ser en base al tejido primariamente o más afectado de la articulación: cartílago, hueso, sinovial; probablemente desfasado, ya que la articulación funciona como un todo. Otra opción es en base a si los pacientes tienen una determinada característica o no la tienen: características clínicas, valores de un determinado biomarcador, cambios en la grasa infrapatelar, características del dolor, etiología, etc. (Van Spil WE et al., 2019).

Pero actualmente no existen fenotipos establecidos porque tampoco existe el conocimiento para hacerlo e incluir a todos los pacientes, y que estos criterios respondan y estén basados en unas diferencias basadas en la evidencia y repetibles por cualquier médico que quiera clasificar a sus pacientes. El establecimiento de fenotipos parece estar aun lejano. El único abordaje que permite clasificar a los pacientes de forma

temprana (y por ello con el mayor potencial para el tratamiento, que es el interés último), son los marcadores moleculares, principalmente de líquido sinovial (endotipo). Para llegar a ese punto, es probable que sea necesario un primer planteamiento de fenotipos centrados en las características del paciente y de la enfermedad al momento del diagnóstico (o incluso durante su curso). Basándose en estos fenotipos, se puedan desarrollar estudios de los marcadores moleculares, y después, crear unos fenotipos útiles y tempranos, con la relación de fenotipo y endotipo.

Un primer acercamiento interesante dividiría los pacientes en 6 grupos de artrosis: 1. Dolor crónico, 2. Inflamatorio, 3. Síndrome metabólico, 4. Alteraciones locales del cartílago y el hueso, 5. Sobrecarga mecánica y 6. Enfermedad articular mínima (Dell'Isola A et al., 2016).

No parece tarea sencilla y es probable que los fenotipos deban tener en cuenta diferentes características clínicas, del dolor y de la etiología, además de datos de las radiografías/RMN (Resonancia Magnética Nuclear) y marcadores analíticos de LS, suero y/o orina (Deveza LA et al., 2017). Si no, corremos el riesgo de que aparezcan fenotipos moleculares, radiológicos, por patogenia, por tejido, clínicos, etc.

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Relativamente hay pocos estudios sobre la incidencia y prevalencia de la artrosis, a pesar del peso de esta patología en comorbilidades, pérdida de calidad de vida y coste económico y social entre otras. En los últimos 5 años, al igual que con otros aspectos de la artrosis, ha habido un renovado interés en la epidemiología de la artrosis. Además de para conocer el impacto real de esta enfermedad, estos estudios buscan aportar información en la línea de esclarecer los factores de riesgo en su desarrollo y progresión, y en su etiología. Esto permitiría trazar estrategias encaminadas a la prevención sobre los factores que sean modificables (Johnson VL y Hunter DJ, 2014; Vina ER y Kwoh CK, 2018).

La artrosis es una de las patologías más prevalentes y que más motivan a consultar con el médico y entre ellas, la de rodilla es clásicamente la más frecuente (35% consultas) (Web Sociedad Española Reumatología. www.ser.es). En 2020 se ha publicado el estudio EPISER2016 de la Sociedad Española de Reumatología, que analiza la prevalencia de la artrosis sintomática en varias articulaciones. La artrosis sintomática de rodilla tiene una prevalencia del 13.83% (Blanco FJ et al., 2020).

La artrosis es la 11ª causa de incapacidad en el mundo (Vost T et al., 2013). Es la enfermedad más incapacitante para la deambulación. Y sobre todo es la enfermedad que más incapacidad subjetiva le produce al paciente de todas las patologías. Además, es la enfermedad articular más frecuente y la 4ª causa de ingreso hospitalario en Estados Unidos (Cross M et al., 2014); Palazzo C et al., 2014). En el año 2007 se estimó en 1502€ el coste anual por paciente (Loza E et al., 2009).

La mayor parte de los estudios epidemiológicos son en pacientes sintomáticos que consultan, por lo que poco sabemos de la población a la que nos referíamos antes, que

tiene artrosis y nunca ha presentado clínica. Algunos quizás nunca tengan síntomas como para realizar una consulta médica, pero muchos otros si lo harán por este motivo y no sabemos con certeza a que volumen nos vamos a enfrentar en los próximos años. Se espera que la prevalencia siga aumentando, debido a una mayor vida sedentaria, el envejecimiento de la población y al aumento de la obesidad entre otros condicionantes (De Angelis G y Chen Y, 2013).

Factores de riesgo

Sí se han identificado los principales factores de riesgo a la hora de desarrollar artrosis (Figura 13). Los factores de riesgo clásicos están relacionados en mayor o menor medida con el uso y desgaste de la articulación, y es que así se ha considerado clásicamente. Pero como hemos visto esto está cambiando. Actualmente la edad, la obesidad y la enfermedad metabólica son los principales, aunque otros como las lesiones previas, el sexo o la genética les siguen de cerca. A la hora de pensar en los factores de riesgo conviene diferenciar los del individuo en sí, de los riesgos de la propia articulación (Silverwood V et al., 2015).

- Edad:

La función de los tejidos y de los órganos empeora con la edad, y la articulación no es una excepción. El cartílago articular se degenera con la edad. Se ha observado una disminución en la densidad celular de condrocitos y una apoptosis aumentada. Los condrocitos muestran datos de senescencia como acortamiento de telómeros; también muestran una menor respuesta a factores de crecimiento, con una menor capacidad proliferativa y de síntesis de proteoglicanos; la función mitocondrial también se ve reducida (Musumeci G et al., 2015; Varela-Eirin M et al., 2018). Además, el catabolismo de la matriz extracelular se ve aumentado (Rahmati M et al., 2017).

El papel de la edad en la merma de la función articular se da haya o no artrosis, aunque puede contribuir en su desarrollo o ser un factor predisponente como veremos más adelante en el apartado del papel sistémico en la patogenia.

Otro elemento que parece ser clave en el establecimiento de la relación entre la edad y el aumento de la prevalencia de la artrosis, son los productos finales de glicación avanzada (AGEs del inglés: Advanced Glycation End products). Estos se acumulan en tejidos envejecidos, entre ellos el cartílago, y hacen que la matriz sea más frágil (Loeser RF et al., 2005).

- Obesidad y enfermedad metabólica:

La obesidad ha sido ampliamente asociada como un factor de riesgo importante en el desarrollo de artrosis (Felson DT et al., 1988).

Existen cada vez más estudios que sugieren que la obesidad además de tener un efecto negativo puramente mecánico por exceso de carga, también favorece la artrosis por las alteraciones metabólicas que se dan en la obesidad y la dieta que suele ir asociada a personas obesas (Sekar S et al., 2017). Esto justificaría, y viene apoyado, por el hecho de que también se ha visto una asociación entre la obesidad y artrosis en articulaciones que

no son de carga, como en las manos. En la mano, el exceso de peso no justifica que se desarrolle una artrosis por motivos mecánicos, lo que deja abierta la influencia de otros mecanismos, que llevaban años sugiriéndose como pro-artrosicos, en estos casos de forma predominante, y favorecedores de la artrosis en todas las articulaciones (Visser AW et al., 2014).

En resumen, debemos ver a la obesidad más allá del clásico riesgo por **sobrecarga mecánica**. El exceso de adiposidad también produce **alteraciones inflamatorias y metabólicas**. Así, la obesidad se ha relacionado con mayor daño articular y mayor dolor (Sowers MR y Karvonen-Gutierrez CA, 2010).

En este sentido, se han encontrado diferencias moleculares en el líquido sinovial de pacientes obesos (Rai MF et al., 2020).

Por tanto, al hablar de los factores de riesgo, deberíamos de distinguir el factor puramente mecánico asociado al exceso de cargas en la obesidad, del riesgo metabólico de aquellas personas (obesas o no), con un metabolismo alterado, principalmente lipídico y que podríamos englobar bajo el nombre de síndrome metabólico (Berenbaum F et al., 2013), aunque las influencias son más complejas y van más allá.

Otros factores de riesgo:

- Lesiones previas: las lesiones traumáticas sobre la articulación aceleran el envejecimiento de los condrocitos y esta lleva a una degeneración prematura de la articulación (Martin JA et al., 2004).

En la rodilla el riesgo aumenta más de 4 veces (Muthuri SG et al., 2011).

- Alteraciones anatómicas que inciden sobre la normal mecánica articular, como son las alteraciones en varo o valgo en la rodilla (Felson DT et al., 2013; Sharma L et al., 2013) o la deformidad cam en la cadera (Agricola R et al., 2013).
- Genéticos: se han identificado varios loci relacionados con el desarrollo de artrosis (arcOGEN Consortium, 2012). Y varios polimorfismos de genes, principalmente polimorfismo de nucleótido único (SNP: single nucleotide polymorphism) (Hochberg MC et al., 2013), algunos de ellos, genes que codifican proteínas con papel inflamatorio (Fernandes MT et al., 2015; Fernandes MTP et al., 2019; Jeffries MA, 2019, y que apoyan la patogenia inflamatoria de la artrosis (Rogers EL et al., 2015).
- Alta densidad mineral del hueso (Nevitt MC et al., 2010).
- Sexo: Mayor prevalencia en mujeres que en hombres y diferencias en la progresión de la artrosis. Los motivos de estas diferencias por sexo no se han estudiado lo suficiente. Se ha propuesto que influye la edad, las diferencias hormonales, la percepción del dolor, variaciones anatómicas y metabólicas y factores psicosociales. Hasta los 50 años la incidencia es ligeramente mayor en hombres y a partir de esa edad y hasta los 80 años, es mayor en mujeres. El grado de artrosis y limitación funcional al diagnóstico y en el momento de la cirugía protésica articular, son mayores en la mujer; es decir, consulta y se somete a cirugía de reemplazo articular más tarde (Ferre IM et al., 2019).

- Aclarar qué importancia y papel tiene cada factor de riesgo, y cuales son el resto de los factores menores, es esencial para la prevención y el desarrollo de tratamientos

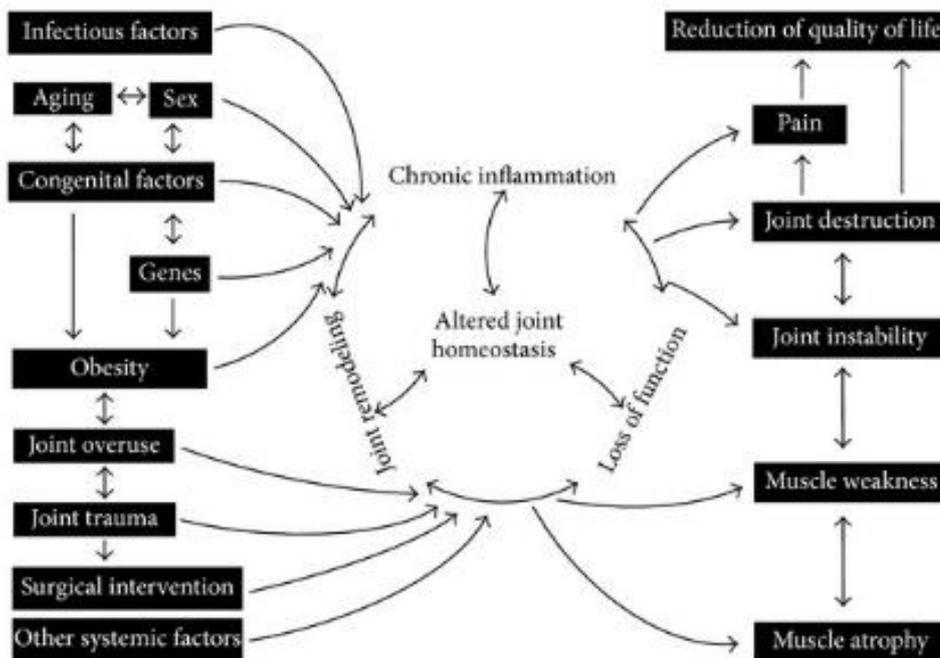


Figura 13.- Esquema del círculo cerrado de enfermedad: progresión de la osteoartritis teniendo en cuenta sus causas y consecuencias.

Imagen tomada de: Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:561459.

2.3 PATOGENESIS

Para hablar de la patogénesis de la artrosis debemos tener en cuenta lo comentado en la definición: la artrosis no es solo una enfermedad degenerativa en el sentido clásico que afecta únicamente al cartílago.

También llama la atención que, a pesar de la prevalencia y el coste global, como vamos a ver, la patogénesis de la artrosis y todos los mecanismos patogénicos que subyacen no se conocen en profundidad; sobre todo si se compara con el conocimiento que se ha logrado de otras patologías de peso menor en los últimos años. Aun así, recientemente se ha producido un gran número de artículos de investigación básica sobre el metabolismo del líquido articular que tratan de arrojar algo de luz sobre las moléculas y los procesos implicados en la biología de la artrosis.

Clásicamente el desencadenante se ha considerado como alteraciones en el cartílago producidos por agresiones mecánicas. Pero se ha visto que también se altera el hueso, la membrana sinovial, tejidos fibrocartilaginosos. Estos elementos que conforman la articulación están en equilibrio, existe una homeostasis. La pérdida de esta inicia el proceso de la artrosis. Un fallo en alguno de sus componentes puede llevar al desequilibrio y progresivamente al fallo de todo el órgano. Así, una lesión sobre el cartílago o el hueso favorecen y aumentan el riesgo de una artrosis futura, y también alteraciones mecánicas como lesiones meniscales, desestabilización articular por lesiones ligamentosas, etc.

Algunas de estas agresiones mecánicas son agudas o incluso mono traumáticas, y con la lesión generada en un instante ya van a dejar una alteración determinante, que va a desencadenar unos cambios en esa articulación suficientes para iniciar un proceso artrósico; en otros casos las agresiones se prolongaran en el tiempo y tendrán el mismo punto final: es la articulación en su conjunto la que falla en dar respuesta a determinado estímulo/agresión. Cabe mencionar que la articulación recibe continuamente estímulos (al andar, saltar, etc.) que no llegan a ese umbral de daño y por lo tanto no generan una lesión. La articulación esta continuamente en una modificación-renovación-adaptación; cuando esta se hace patológica, es la artrosis, y debemos tener en cuenta la influencia de todos los factores mencionados previamente en el potencial reparativo de cada organismo. Esto lo matizaremos más en el siguiente apartado.

Se acepta en general que la patogenia incluye la respuesta inmuno-inflamatoria de la sinovial, cambios en el hueso subcondral y degeneración del cartílago.

A modo de introducción y como resumen la patogenia cronológica es la siguiente. Un daño sobre el cartílago o la alteración de este estimula la sinovial y desencadena la producción de enzimas degradadoras del cartílago, mediadores inflamatorios y factores relacionados con estrés/daño de tejidos. El condrocito responde a estos cambios, madura y trata de reparar el tejido dañado: se inician una serie de procesos propios de la osificación endocondral. La alteración, aun en las capas más superficiales del cartílago, afecta la mecánica del hueso subcondral, que se adapta y modifica con un engrosamiento y angiogénesis. Según progresa la artrosis, los cambios estructurales y funcionales se hacen más evidentes, el metabolismo tiende al catabolismo, y el condrocito ya no es capaz de mantener una MEC sana. En estadios avanzados se da la apoptosis del condrocito.

Estas pinceladas las vamos a ampliar a continuación, lo suficiente para poder hacernos una idea y comprender aquellos aspectos más importantes implicados en la patogenia. Los procesos conocidos y sobre todo los desconocidos hacen de este proceso algo muchísimo más complejo y de mayor profundidad en su estudio y explicación. Además, otros componentes de un carácter más sistémico, pero que tienen su efecto en la articulación, hacen de la articulación ese órgano interconectado con el resto del cuerpo, y también los vamos a ver en su apartado correspondiente más adelante.

ALTERACIONES MECÁNICAS:

Se han estudiado las mecánicas alteradas en la artrosis y se ha sugerido su relación con una menor atenuación de fuerzas, aumento de la carga articular y la contribución al daño articular.

La articulación es un aparato dinámico también desde el punto de vista mecánico. Dispone de una serie de mecanismos que le permiten, hasta cierto límite, adaptarse a mayores demandas mecánicas de las basales. En este sentido hablaremos más adelante de los mecanismos de mecano transducción que subyacen a esta herramienta de adaptación.

Dentro de la homeostasis que mencionábamos, también se incluye la mecánica. La articulación está preparada para responder a los estímulos mecánicos a los que está acostumbrada. Cuando estos límites se sobrepasan, los mecanismos de mecanotransducción reaccionan para que se produzca una modificación física de los componentes articulares, que adaptan la articulación a esos estímulos mecánicos. Si los límites de adaptación se sobrepasan, la homeostasis se rompe, y sería ésta la agresión mecánica que desencadenaría el inicio de la artrosis.

Es importante entender este equilibrio mecánico de los diferentes tejidos que forman la articulación y sus niveles de lesión. Son el origen mecánico que probablemente inicia la patogenia, y los mecanismos de reparación de estas lesiones, sobrepasados en el sentido de dar una respuesta fisiológica, los que inician los procesos biológicos de la artrosis. Ambos han sido muy poco estudiados. Estas lesiones que se pueden etiquetar como “microdaño” y están frecuentemente asociadas a las lesiones de medula ósea (BML: Bone Marrow Lesions) que podemos ver en la RMN. Estas microlesiones pueden afectar a hueso subcondral, cortical o esponjoso, y desencadenan mecanismos de remodelado y reabsorción ósea, y formación de microcallos. La alteración de un volumen muy pequeño de hueso puede alterar las propiedades mecánicas de gran superficie de cartílago, e iniciar vías moleculares proartróticas (Alliston T et al., 2018).

Orientando los riesgos centrándonos en el punto de vista de los cambios en los estímulos mecánicos tenemos:

Pérdida de elementos estabilizadores como consecuencia de lesiones, como por ejemplo del LCA; alteraciones en meniscos, lesiones o alteraciones en otras articulaciones, etc. Estas pueden ser agudas o crónicas, y el espectro es muy amplio en cada persona al depender de tantos factores implicados en la biomecánica.

Los cambios en los estímulos pueden ser también por aumento de la demanda mecánica sobre esa articulación de forma aguda/subaguda: esfuerzos deportivos, aumento ponderal, sedentarismo/actividad puntual; y las que producen lesión por un traumatismo de alta energía: lesiones condrales, fracturas etc.

Las agresiones mecánicas del tipo que sean pueden predisponer y son un eje fundamental en el desarrollo de la artrosis, siempre y cuando sean un estímulo mecánico que sobrepasa los límites de adaptación de los que dispone el organismo y

rompan esa homeostasis. Ésta depende de muchos otros factores epidemiológicos, algunos predisponentes y otros que harán que ese límite de desequilibrio sea más difícil de romper (Issa RI y Griffin TM, 2012).

En el pasado, se ha estudiado la influencia de la fuerza muscular en la función de la articulación con artrosis. Recientemente se ha visto que la relación con la alteración de la mecánica articular durante la marcha, es mayor con la potencia del cuádriceps que con la fuerza de este. Se ha relacionado una potencia muscular insuficiente con una menor escala funcional medida y subjetiva. Esto refuerza el concepto y la influencia de la mecánica en el proceso de la artrosis, refuerza la importancia de aumentar los estudios sobre la influencia de la musculatura en la artrosis y plantea la intervención terapéutica del trabajo de potencia muscular.

En pacientes con artrosis y derrames crónicos, aunque hay estudios contradictorios, por electromiografía se ha visto un aumento de la actividad del cuádriceps y la coactivación de los isquiotibiales durante la fase de apoyo. En estos pacientes se ha visto una mayor flexión de la rodilla durante esta fase de la marcha, que podría deberse a un intento por no aumentar la presión intraarticular. Las estructuras estabilizadoras funcionan de forma diferente con una mayor flexión, lo cual podría justificar esa alteración en la actividad muscular (Rutherford DJ et al., 2012).

Las rodillas con derrame tienen una presión intraarticular aumentada en reposo, siendo esta de alrededor de 20mmHg de media. Además, se ha observado como esta presión, en vez de negativizarse como ocurre en la rodilla sana, se eleva aún más con la contracción del cuádriceps y durante la marcha.

Se ha propuesto que esta falta de negativización haría que se perdiese esa función estabilizadora que se la ha atribuido a las presiones negativas intraarticulares. También dificultaría el correcto flujo sanguíneo a la sinovial. Además, en los escasos estudios realizados, se ha visto que el aumento agudo de la presión intraarticular reduce la fuerza del cuádriceps (Rutherford DJ, 2014).

La pérdida de la función estabilizadora de la presión negativa y una menor estabilidad con mayor grado de flexión, podrían influir negativamente en la propiocepción explicando los resultados de CHO y el patrón de actividad muscular descrito (Cho YR et al., 2011).

La homeostasis es clave para el desarrollo o no de artrosis. Vamos a ver en los siguientes apartados que la articulación tiene numerosos mecanismos de defensa y adaptación, que tratan de mantener la homeostasis a lo largo del tiempo frente a las agresiones. Esto nos hace pensar en la posibilidad de que estos mecanismos sean comunes a todos los pacientes, independientemente de la etiología. Únicamente existirían diferencias genéticas y en aquellos factores que influyan en su funcionamiento propio de la variabilidad interpersonal, pero los mecanismos serían comunes; y también a tener en cuenta el nuevo planteamiento de los fenotipos artrósicos, que podrían plantear diferencias en los mecanismos o al menos en la magnitud de la activación de cada uno. Sea el origen físico o bioquímico, los mecanismos de mantenimiento de la homeostasis,

y en su límite de actuación fisiológica de inicio de la artrosis, son bioquímicos (Vina ER y Kwoh CK, 2018).

Además del cartílago, el hueso subcondral y la sinovial juegan un papel principal en la fisiopatogenia de la artrosis. Como hacíamos referencia parece que la articulación funciona como un órgano, y está conectado con el resto del cuerpo, del que podría recibir estímulos pro-inflamatorios o antiinflamatorios. Veamos a continuación, primero, como introducción los mecanismos bioquímicos responsables de la fisiopatogenia de la artrosis, para después poder comprender mejor el papel de estos 4 componentes, si bien será por apartados, la relación entre ellos es amplia y en varias ocasiones habrá solape al profundizar en determinados aspectos.

➤ MECANISMOS MOLECULARES DE LA ARTROSIS

Bien sea por un motivo u otro, en cierto momento la articulación pierde su equilibrio y comienza un proceso degenerativo que lleva a la artrosis. Lo primero en alterarse es la matriz pericelular del condrocito, justo en el paso de lo fisiológico a lo patogénico, que deja expuestas moléculas que activan procesos que modifican el ambiente pericelular y al propio condrocito. Esto ocurre sin que podamos hablar aun de una inflamación en la articulación, pero si comienza un ambiente proinflamatorio y catabólico en el cartílago.

Si el ambiente lesivo persiste y el cartílago no es capaz de equilibrarse, el daño a la matriz extracelular produce fragmentos de esta. Estos y moléculas producidas durante el estrés celular son capaces de activar el sistema inmune innato vía receptores tipo Toll (TLR) presentes en los condrocitos, que va a iniciar una serie de mecanismos que juegan un papel importante en la progresión estructural y los síntomas de la artrosis. Y es que la inflamación, de bajo grado, es el principal factor que determina la progresión de las lesiones de la artrosis (Goldring MB y Otero M, 2011).

En general se cree que estos productos fruto del daño articular, son los que inician este proceso, pero también es posible que señales inflamatorias desde membrana sinovial o hueso subcondral activen los condrocitos en esta dirección. Además, los procesos catabólicos y numerosas moléculas resultado de estas, existen en la normal fisiología de la articulación, sin que se activen procesos que lleven a daño irreparable. Los TLR se activan por los patrones moleculares asociados al daño articular (DAMP del inglés: Damage Associated Molecular Pattern), que son principalmente moléculas de esa matriz extracelular dañada; también se activan con el ácido úrico y el pirofosfato de calcio. Los AGE activan MAPK (del inglés, Mitogen-Activated Protein Kinases. Proteína quinasa activada por mitógenos) y NF- κ B (del inglés Nuclear Factor kappa Beta. Factor nuclear kappa Beta) y promueven un cambio fenotípico catabólico en los condrocitos (Glyn-Jones S et al., 2015).

En general se acepta que existe un desequilibrio en la homeostasis, entre las “fuerzas” pro-inflamatorias y las antiinflamatorias, siendo las citoquinas eje central.

Como respuesta al daño sobre el cartílago el sistema inmune se activa mediante citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF- α , IFN- γ (interferón gamma) y MSC inflamatorias migradas por la inflamación. Entre otras vías, se ha propuesto recientemente que estimulan células dendríticas (CD) para que produzcan Indolamina-2,3-dioxygenasa1 (IDO1) y reequilibrar el estado inmunológico. La producción de IDO1 en CD y MSC se estimula por la vía de NF- κ B.

Pero la IDO1 también tiene un efecto inhibitorio sobre genes condrogénicos. Activa la vía Wnt inhibiendo el Sox9 (al cual también inhibe indirectamente al inhibir al CCR2 (del inglés, Chemokine Receptor type 2. Receptor de quimiocinas tipo 2), HIF- α y PKA (Protein cinasa A) que son activadores habituales del Sox9). Además, los altos niveles de IDO1 estimulan a las propias MSC para que produzcan TSG-6 (del inglés, TNF- α Stimulated Gene-6. Gen 6 estimulado por TNF- α). Esta estimula la caspasa-3 en los condrocitos que induce la apoptosis de estos, y la degradación de la matriz extracelular por la MMP-13. Se aumenta así el riesgo de erosión del cartílago (Alahdal M et al., 2020; Zhu Z et al., 2020) (Figura 14).

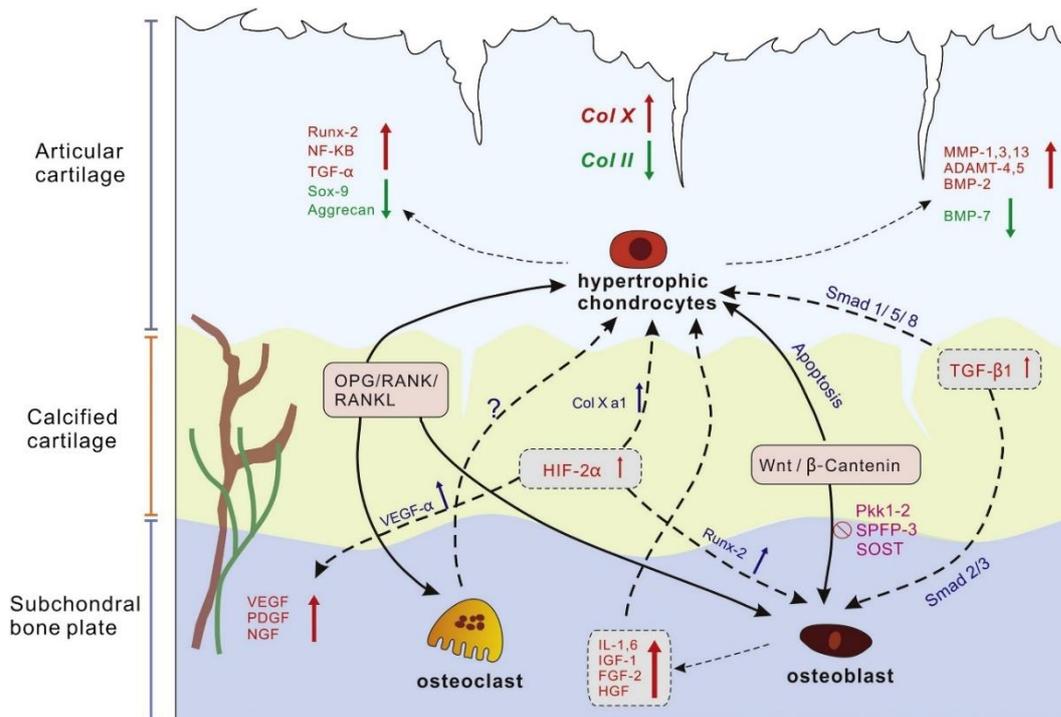


Figura 14.- Principales cambios moleculares y celulares a nivel osteocondral en la artrosis.

Imagen tomada de: Yuan XL, Meng HY, Wang YC, et al. Bone-cartilage interface crosstalk in osteoarthritis: potential pathways and future therapeutic strategies. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22(8):1077-1089

Se describen a continuación los principales actores implicados en los procesos fisiopatológicos de la artrosis:

Citoquinas

Son proteínas que actúan como mensajeros, principalmente entre células, mediando en la respuesta inmune e inflamatoria. En los últimos años ha aumentado su interés y la importancia de las funciones que tienen en la artrosis. Pueden ser pro-inflamatorias o antiinflamatorias. Describimos el papel de las más importantes, aunque son más las implicadas (Sutton S et al., 2009). Las proinflamatorias se encuentran aumentadas en la artrosis y se han relacionado con el grado de artrosis, el componente inflamatorio y el dolor (Orita S et al., 2011; Vangsness CT Jr et al., 2011; Haraden CA et al., 2019).

Las citoquinas inflamatorias tienen un efecto lesivo sobre el cartílago: disminuyen el recambio condral, inducen su apoptosis, reducen la síntesis de componentes de la MEC y aumentan las enzimas proteolíticas. Actúan sobre los condrocitos, células de la membrana sinovial y otras estructuras articulares, y sobre células del sistema inmune. Estas migran al lugar de la inflamación, donde producen más componentes pro-inflamatorios (prostaglandinas, NO (Óxido Nítrico), radicales libres, más citoquinas...) que perpetúan el estado inflamatorio (Figura 15).

Interleuquina 1 (IL-1):

La IL-1 β juega un papel en acciones catabólicas sobre el cartílago. Inhibe la producción de agreganos y de colágeno en el condrocito. También puede estimular la producción de ADAMTS-4, MMP-13, IL-6 e IL-8, NO, principalmente. No siempre encontramos la IL-1 β elevada en líquido sinovial en pacientes con artrosis. Actúa principalmente sobre condrocitos y sinoviocitos. Relacionada con la sintomatología, incluyendo el dolor en la artrosis (Attur M et al., 2011).

La IL-1 β requiere de la activación del inflammasoma NALP3 (del inglés NACHT, LRR and PYD domains containing protein), que a su vez se activa mediante cristales de ácido úrico, fosfato cálcico básico y ROS (del inglés Reactive Oxygen Species) (activación inmunidad innata). La caspasa-1 (o ICE del inglés Interleukin Converting Enzyme) forma parte del inflammasoma NALP3 y también activa la IL-18 y piroptosis vía Gasdermin-D. El inflammasoma, según los péptidos que lo activan, tiene diferentes grados de respuesta inflamatoria (Rosenthal AK, 2011). HMGB-1 (de sus siglas en ingles. Proteína de la caja 1 del grupo de alta movilidad) se encuentra en líquido sinovial y es capaz de aumentar IL-1 β al actuar sobre TLR2 y 4 (Garcia-Arnandis I et al., 2010). Es necesaria la mecanotransducción del TRPV4 para que los cristales activen el inflammasoma (Lan Z et al., 2021).

Recientemente se ha bloqueado el inflammasoma con Crisina (una flavona) en ratas, observándose una atenuación de la sinovitis y reducción de mediadores del dolor (Liao T et al., 2020).

El antagonista endógeno del receptor, IL-1RA, se produce en mayor cantidad en OA que en RA.

Se ha intentado bloquear la IL-1 β de forma terapéutica, observándose una mejoría clínica mínima. Por ello se cree que su actividad pueda ser más importante en determinadas artrosis, como la artropatía por cristales y la secundaria a síndrome metabólico (Diamantopoulos AP et al., 2012).

Interleuquina 6 (IL-6):

La IL-6 tiene principalmente 3 papeles en la OA: estimula la proliferación de los condrocitos, papel sinérgico con la IL-1 β en el aumento de las MMP y la inhibición de la producción de proteoglicanos, y promueve el reclutamiento de células inflamatorias en la sinovial. Podría estimular las TIMP (del inglés, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase. Inhibidor de metaloproteasas de tejido), con lo cual tendría cierto papel de feedback -.

IL-2, IL-15 e IL-21 están implicadas en el reclutamiento, supervivencia y acción de los linfocitos, que son la célula principal del infiltrado inflamatorio perivascular (Kapoor M et al., 2011).

TNF- α :

El factor de necrosis tumoral alfa, al igual que la IL-1 β , promueve procesos catabólicos sobre la matriz extracelular (aumento de la producción de MMP-1, 3, 13 y ADAMTS-4, disminución de la síntesis de componentes de los proteoglicanos y colágeno tipo II) a través de su actuación sobre el condrocito y la apoptosis de este, pero por vías diferentes a las usadas por la IL-1 β , iniciando vía caspasa-8. Se ha visto su papel sobre el metabolismo mitocondrial del condrocito, disminuyendo su eficacia. Aumenta la producción de IL-1 β , IL-6, IL-8, RANTES, entre otras sustancias pro-inflamatorias y VEGF. Es un componente de la neuro inflamación (Fernandes JC et al., 2002).

El TNF- α y la IL-1 β aumentan la sensibilidad del condrocito a otros estímulos catabólicos y apoptóticos, y son consideradas las 2 citoquinas más importantes en fisiopatología de la artrosis. Aumentan la síntesis de las enzimas COX-2, iNOS o NOS2 (del inglés, Inducible Nitric Oxide Synthase. Isoforma inducible de la sintetasa de NO) y PGE2 sintetasa, con lo que aumentan los productos que las activan.

Se ha observado in vitro que la presencia de ox-LDL junto con TNF- α hace que aumente la muerte de condrocitos considerablemente respecto a cualquiera de los 2 por separado (Shen P et al., 2017).

Además, recientemente se ha observado en cultivos celulares que pueden llevar a alteraciones en la mecánica del cartílago. Aumentarían la rigidez celular, el contenido de F-actina y reduciría la contractilidad celular (Cheng Chen C et al., 2015).

Existen varias citoquinas antiinflamatorias. Estas tienen un efecto de contrarrestar los efectos de las citoquinas inflamatorias y no tiene por sí mismas un efecto protector en una articulación sana. Si esto fuera así, actuando sobre estos mecanismos las lesiones ya establecidas permanecerían, ya que el efecto de estas no es anabólico, solo inhibe el efecto inflamatorio.

Destacar la mencionada IL-1RA, IL-4, IL-10, IL-13, entre otras. Además de lo comentado, actúan principalmente inhibiendo la producción celular de otras citoquinas, y de forma muy general, se podría decir que tienen efectos contrarios a los que hemos citado de IL-1 β y TNF- α . Se encuentran aumentadas en líquido sinovial de pacientes artrósicos (Wojdasiewicz O et al., 2014).

Varias citoquinas proinflamatorias son responsables de la liberación de péptidos bioactivos como PGE2 y óxido nítrico (NO).

Especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés: Reactive Oxygen Species):

Los más importantes son el peróxido de hidrogeno (H₂O₂), radical hidroxilo (OH⁻), superóxido (O₂⁻) y Óxido Nítrico (NO).

Se producen de forma fisiológica (principalmente en las mitocondrias y peroxisomas), pero un exceso de ROS produce aumento de la producción de citoquinas y quimiocinas, promoviendo la inflamación. Además, altera la función de ADN, proteínas y lípidos al oxidarlos, alterándose la normal función celular. Así que el exceso de ROS aumenta el estrés oxidativo.

Óxido Nítrico: Es un gas que difunde bien a través de membranas. Considerado un radical libre, se ha visto aumentado en líquido sinovial de articulaciones con procesos inflamatorios (aumenta su producción con IL-1 β y TNF- α entre otros). Se sintetiza a partir de L-arginina mediante la iNOS; esta isoforma es propia del sistema inmune, habitualmente estimulada por estados inflamatorios. El NO inhibe la síntesis de matriz condral y promueve las MMP. Aumenta la inflamación via NF κ B (Ahmad N et al., 2020).

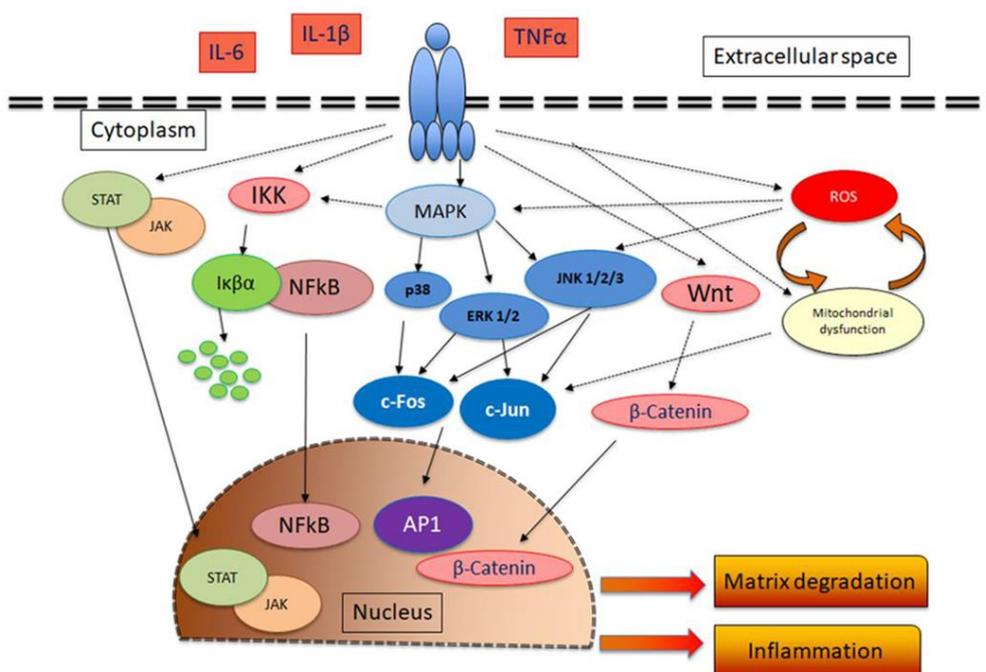


Figura 15.- Representación esquemática de las principales vías de señalización activadas por citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF α e IL-6) en condrocitos y sus efectos en procesos posteriores.

Imagen tomada de: Ansari MY, Ahmad N, Haqqi TM. Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis: Role of polyphenols. *Biomed Pharmacother.* 2020;129:110452

Adipocitoquinas:

Leptina, adiponectina y resistina son adipocitoquinas que juegan un papel en la patogenia de la artrosis ya que participan en inducir el proceso de degradación articular y de inflamación local. Se han visto aumentadas en líquido sinovial de pacientes con artrosis, y se han correlacionado con la clínica y con los niveles de marcadores inflamatorios (Orellana C et al 2021). Se producen sobre todo en la grasa infrapatelar y los condrocitos, y promueven la inflamación de bajo grado (Kang EH et al., 2010). Inducen citoquinas proinflamatorias, MMP e iNOS. A su vez, estímulos inflamatorios pueden aumentar su producción. Se han propuesto como punto que establece la relación entre la obesidad y la artrosis, de una forma no mecánica. Así, se ha establecido una especial relación en el papel que pueden jugar en la inflamación de la artrosis en aquellos pacientes con síndrome metabólico (Liu B et al., 2019).

La leptina fue la primera en describirse en líquido sinovial en 2003 (Dumond H et al., 2003). Resistina y adiponectina se encuentran en mayor concentración en suero que en líquido sinovial, y la leptina presenta mayor concentración en líquido sinovial (Presle N et al., 2006).

Leptina: Se produce en condrocitos, osteocitos, sinovial y en la grasa infrapatelar. Suele estar aumentada en pacientes obesos y también su expresión en estos tejidos de pacientes con artrosis respecto a sanos, y la concentración aumentada en LS respecto a suero (Cordero-Barreal A et al., 2021).

Aumenta la expresión de MMP-1, MMP-3, y MMP-13, y también de IL-1, IL-6, iNOS, and COX-2 (Koskinen A et al., 2011).

Los niveles de leptina se han asociados directamente al grado de degeneración condral, actividad inflamatoria; y a su papel en el metabolismo condral, con sus acciones catabólicas y anabólicas (Simopoulou T et al., 2007). En la sinovial puede tener un papel proinflamatorio. Participa en el remodelado óseo al actuar sobre el osteoclasto (Chou CH et al., 2013). El aumento de sus niveles se ha visto asociado a la progresión de la artrosis y la necesidad de PTR (Martel-Pelletier J et al., 2016).

La adiponectina se produce en cartílago, hueso y sinovial (Presle N et al., 2006).

Regula el metabolismo energético y la sensibilidad a la insulina. Se conoce menos su papel en el daño articular. Existen posturas contradictorias ya que se la ha propuesto como protectora en cierto modo, ya que modula la destrucción del cartílago al aumentar la expresión de TIMP-2 y reducir la de MMP-13 inducida por IL-1 β . También se han observado unos niveles 100 veces menores en líquido sinovial que en plasma de paciente artrósicos (Chen TH et al., 2006).

Por otra parte, son varios los estudios que indican en dirección hacia un papel proinflamatorio: Niveles mayores de adiponectina en plasma y cartílago se han observado en pacientes con artrosis más severas, sugiriendo su aumento como marcador de enfermedad severa (Koskinen A, Juslin S et al., 2011). Además, se observan mayores niveles de receptores 1 y 2 de adiponectinas en aquellas áreas lesionadas de

articulaciones artrósicas, estimulando la producción de enzimas catabólicas como MMP-1, MMP-3 y MMP-13, además de IL-6. (Lago R et al., 2008).

Resistina: Se encuentra en líquido sinovial y cartílago. Se ha visto aumentada en obesos. Igual que el resto de adipocinas vistas, también se le atribuye un papel proinflamatorio en la artrosis. (Koskinen A et al., 2014).

Quimiocinas

CXCL8 y 11 se encuentran aumentadas en líquido sinovial y suero de pacientes con artrosis. Se les ha atribuido un papel en la reducción de la proliferación de los condrocitos y aumento de su apoptosis. También actúan sobre osteoclastos, MMP-3 y papel sobre la pérdida de proteoglicanos en cartílago articular (Yang P et al., 2016).

MCP-1: También conocida como CCL2. Es una proteína quimiotáctica de monocitos, del inglés Monocyte Chemoattractant Protein-1.

CCL19 es el ligando de CCR7 que regula positivamente el VEGF. CCR7 se ha sugerido como potencial biomarcador de inflamación sinovial temprana, por su relación con los síntomas preoperatorios.

Actúan como quimioatrayentes de linfocitos T (LT) los siguientes: IL-8/CXCL8, CXCL11, proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), proteína inflamatoria de macrófagos 1 α (MIP-1 α /CCL3), MIP-1 β , RANTES (CCL5, relacionada con el síndrome metabólico), IL-2, IL-15. CD13 se ha visto quimioatrayente en AR en un 60% del total de actividad.

Complemento

Se ha visto una mayor activación del complemento en la artrosis. Proteoglicanos son capaces de activar la vía clásica. La COMP activa la vía alternativa. Participante del sistema inmune. (Wang Q et al., 2010).

Toll-Like Receptor (TLR)

Están descritos 10 (del 1 al 10) en humanos. Son receptores de señales para el sistema inmune innato. Reconocen principalmente DAMPs y PAMPs (del inglés: Pathogen associated Molecular Patterns. Patrones moleculares asociados al daño articular) (Kawai T y Akira S., 2010;).

TLR2 y TLR4 se han visto aumentados en zonas lesionadas de artrosis incipientes. TLR4 es uno de los más estudiados y también se ha identificado en artrosis relacionada con obesidad. Se expresan en macrófagos, condrocitos y fibroblastos sinoviales. (Kim HA et al. 2006)

Entre las moléculas que activan los TLR están ciertos componentes de la MEC, que llegan a la sinovial tras producirse un daño condral. Esto produce la activación del sistema inmune, llevada a cabo principalmente por macrófagos y fibroblastos sinoviales. Esta respuesta celular lleva a la producción de varios factores que desencadenan un proceso inflamatorio, entre los que destaca el NF- κ B. Este junto con la cascada del complemento,

produce un aumento de la transcripción de los genes de múltiples mediadores proinflamatorios, entre los que destacan dos mediadores solubles: las citoquinas y quimiocinas, que son liberadas a líquido sinovial. (Scanzello CR et al., 2008).

Este proceso inflamatorio es el responsable de la sinovitis. Además, las moléculas inflamatorias también llegan al condrocito desde el líquido sinovial donde también son responsables de un efecto proinflamatorio sobre el cartílago que desencadena un proceso catabólico que incluye la producción de más citoquinas y MMP por los condrocitos (Kapoor M y Martel-Pelletier J, 2011).

Numerosos artículos relacionan TLR2 con neuroinflamación y dolor (Kim D et al., 2011). Media, al menos en parte, el dolor en la artrosis desencadenado por fragmentos de agregano (Miller RE et al. 2018).

Factores de crecimiento

- TGF- β : Actor principal junto con las citoquinas. Descrito en mayor detalle más adelante al hablar del papel del cartílago.
- BMP: Tienen un importante papel modulador en la vía de la Wnt y la TGF- β . Esencial para la normal osificación endocondral (Retting KN et al., 2009).
- IGF-1 (del inglés Insulin-like Growth Factor): Tiene un efecto anabólico sobre el cartílago. Estimula la producción de proteoglicanos, colágeno tipo II. Reduce el estímulo de IL-1 β sobre la producción de MMP-3. Tiene una acción sinérgica con la proteína osteogénica (OP-1). Pero también se le ha relacionado con la progresión de la artrosis, ya que se le ha visto implicado en la formación de osteofitos.

Enzimas degradadoras de matriz extracelular:

En cuanto a la afectación sobre el cartílago, varias metaloproteinasas de matriz (MMP) son también dependientes de la activación por el NF- κ B, que desencadena por el ello una acción catabólica sobre el cartílago.

MMP: son un tipo de endopeptidasas dependientes de zinc que degradan componentes de la matriz extracelular. Reguladas principalmente por IL-1, TNF- α y TGF- β mediante vías MAPK, NF κ B y Smads (de un portmanteu del inglés del gen SMA y la proteína MAD). Se inhiben mediante las TIMP y de forma fisiológica se encuentran en equilibrio con estas. MMP-13, sintetizada por los condrocitos, es la que más actividad presenta frente a colágeno tipo II, se encuentra en capas profundas y también degrada agreganos (Moldovan F et al., 1997). MMP-3 actúa frente a proteoglicanos y activa MMP-1 (Bonassar LJ et al., 1995).

En la artrosis las más característicamente aumentadas son la MMP-1, 3 y 13. También se encuentran aumentadas en la AR, pero en mayor grado (Pozgan U et al., 2010).

Las agreganasas pertenecen a la familia conocida como ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs):

Las ADAMTS son proteasas extracelulares. Se han descrito 19 y también juegan un papel en la migración celular, inflamación y angiogénesis (Kelwick R et al., 2015). Juegan un papel temprano en la patogénesis de la artrosis ya que participan en la erosión del cartílago (Little CB et al. 2008).

ADAMTS-4 o Agrecanasa 1: es el mayor responsable de la degradación de los proteoglicanos del cartílago articular en la artrosis. Se inhibe por el inhibidor de metaloproteasas de tejido 3 (TIMP3).

ADAMTS-5 o Agrecanasa 2: es la segunda de las 2 agrecanasas conocidas y la segunda en importancia en la degradación de colágeno.

ADAMTS-7: se encarga de degradar la COMP. La TNF- α estimula su producción vía NF- κ B. Además, ADAMTS-7 es capaz de estimular el propio TNF- α y algunas MMP, cerrando un círculo de retroalimentación. Se encuentra aumentada en la artrosis. Se ha sugerido un importante papel en el establecimiento y progresión de la artrosis, ya que en modelos animales con esta enzima suprimida no hay progresión de la artrosis (Lai Y et al., 2014).

Neuropéptidos:

Los neuropéptidos son sustancias reguladoras encargadas de mantener una homeostasis en la articulación, y con un importante papel en el normal funcionamiento de la articulación y en la enfermedad.

Identificados principalmente en nervios y vasos, y en mayor medida en membrana sinovial desde donde se liberan; aunque también identificados en líquido sinovial (Walsh DA et al., 1993).

- Sustancia P:

También conocido como Neuropéptido P. Se encuentra en el sistema nervioso central (SNC) y en el sistema periférico (SNP). Es producido principalmente en el asta posterior en forma de propéptido y viaja hasta la terminación nerviosa donde es liberada. Descrita su presencia en líquido sinovial (Marshall KW et al., 1990) y en sinovial (Kontinen YT et al., 1990).

Estimula la liberación de mediadores inflamatorios (Lotz M et al., 1988; Kimball ES et al., 1988) y también tiene papel sobre el sistema inmune, en punto de unión inmuno-inflamatoria en la patogenia de la patología articular (Payan DG y Goetzl EJ., 1985).

La piel es uno de los sitios donde más ha sido estudiado. El tratamiento con capsaicina produce una depleción de sustancia P y la desensibilización al dolor de la zona donde es aplicada a altas dosis (también en medula espinal) (Sousa-Valente J y Brain SD., 2018).

En el asta posterior produce un aumento de la reactividad ante estímulos térmicos y mecánicos (hiperalgesia).

- Péptido intestinal vasoactivo (VIP: del inglés: Vasoactive Intestinal Peptide):

Tiene un efecto inhibitorio sobre la inflamación mediada por el sistema inmune. Las propias células del sistema inmune pueden producirlo. Inhibe la producción de TNF- α , IL-1 β , IL-6. Frena la activación de las vías TLR2 y TLR4.

- Factor liberador de corticotropina (CRF del inglés: Corticotropin Releasing Factor):

Parece que tiene un papel pro-inflamatorio a nivel articular, habiéndose demostrado su presencia en líquido y membrana sinovial. Aunque su papel a nivel adrenocorticotropo sea antiinflamatorio al estimular la producción de glucocorticoides (Pérez-García S et al., 2011).

- Urocortina:

Péptido de la familia de la CRF. Es un ligando del receptor de CRF-1 o 2. Según el receptor en el que actúe, puede tener tanto un papel inflamatorio como antiinflamatorio, dependiente de corticoides. Vía CRF-1 tiene un efecto condroprotector al actuar como factor de supervivencia celular, de forma mecanosensitiva (canal Piezo1) (Lawrence KM et al., 2017). También se le ha atribuido papel condroprotector frente al efecto pro-apotótico del NO (Intekhab-Alam NY et al. 2013).

2.3.1 EL PAPEL DE LA SINOVIAL EN LA PATOGENIA:

Se ha propuesto que la sinovial se activa por estímulos inflamatorios y moléculas de la matriz del cartílago. Tras una agresión de las características que tratábamos más arriba, componentes de la MEC liberados al líquido sinovial son degradados por la sinovial, y contribuyen en un proceso inflamatorio sobre ella misma y el resto de la articulación. Así, la sinovial mantiene el estímulo inflamatorio y catabólico de la degeneración articular de la artrosis mediante la producción de mediadores inflamatorios y enzimas degradativas por parte de los sinoviocitos. (Scanzello CR y Goldring SR, 2012).

Clásicamente se ha considerado que la inflamación de la sinovial era más propia de enfermedades reumáticas, como la artritis reumatoide, que de la artrosis. Pero es uno de los cambios que se ha observado con mayor frecuencia, y suele ser de bajo grado, en contraposición a la de alto grado que se observa en la AR. En esta última es más generalizada, mientras que en la artrosis la distribución suele ser más localizada y variable en zona, con un infiltrado celular menor. Se observa incluso en estadios precoces sin que haya aun cambios radiográficos (Ayrál X, et al., 2005), y gracias sobre todo al avance de la RMN, (Roemer FW et al., 2011). La inflamación de la sinovial se observa en todas las etapas evolutivas de la artrosis y como vemos, puede ser la responsable del mantenimiento de la inflamación articular y de la progresión de la artrosis. Además, se ha relacionado con peores escalas funcionales y mayor dolor (Mathiessen A y Conaghan PG, 2017).

Se caracteriza por infiltraciones celulares perivasculares e intersticiales en la capa íntima (principalmente monocitos/macrófagos de médula ósea, migrados por vía vascular), en la subíntima (linfocitos T con un ratio característico a favor de CD4 respecto CD8, y de Th1 sobre Th2, aunque menor que en AR), morfología alterada de las células sinoviales y vascularidad aumentada (de Lange-Brokaar BJ, et al., 2012).

Este aumento de la vascularización se da en la subíntima, y mediante la estimulación realizada por varios factores angiogénicos producidos por los macrófagos migrados y fibroblastos sinoviales: VEGF (del inglés Vascular Endothelial Growth Factor), TGF- β , IL-8, PDGF.

Los fibroblastos estimulados por la vía Wnt aumentan su producción de IL-6, IL-15, TNF- α y MMPs, responsables del daño condral junto con las producidas en otros tejidos articulares (Figura 16).

En esta sinovial alterada se produce IL-1 β mediante la activación del inflammasoma NALP3 en células endoteliales y por las células migradas de los infiltrados referidos (también condrocitos y osteoblastos). El patrón de citoquinas no permite distinguir la inflamación en la OA de la de la AR, aunque por la parte cuantitativa, si hay mayor proporción de células con perfil inflamatorio de citoquinas en la AR; el de la OA es mayor respecto de una rodilla sana, lo que indica que la artrosis se caracteriza por una inflamación que es menor que en la AR. Los fibroblastos no participan (Kolly L et al., 2010).

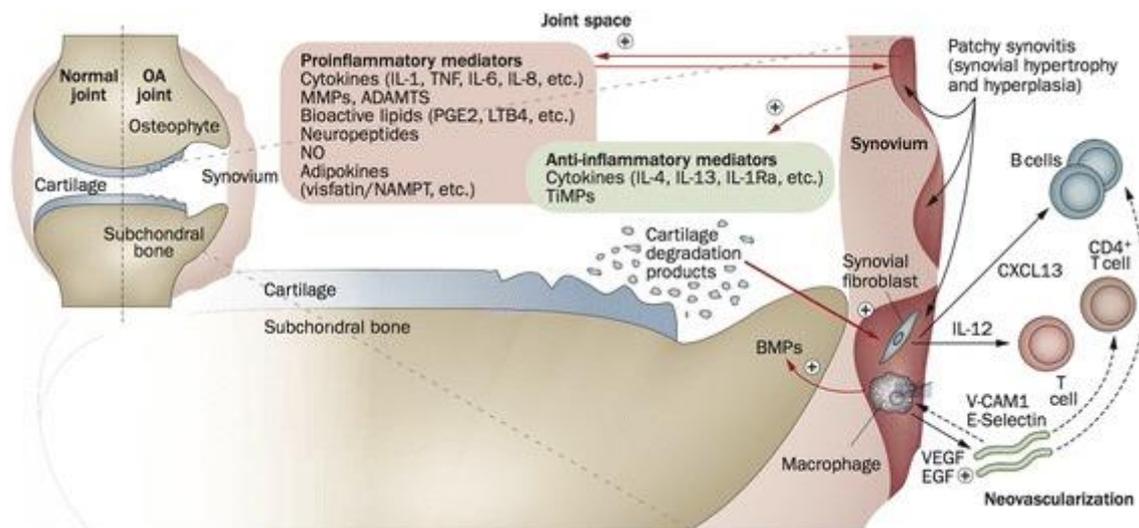


Figura 16.- Implicación de la membrana sinovial en la fisiopatología de la OA

Tomado con permiso de Nature Reviews: Mathiessen A, Conaghan PG. Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications. *Arthritis Res Ther.* 2017;19(1):18. Published 2017 Feb 2.

La alteración de la sinovial se puede detectar de 3 formas: estudio por imagen como RMN y ecografía, macroscópico intraoperatorio y estudio histológico. Además, la correlación entre la histología de la sinovial e imágenes RMN es buena.

Desde el análisis histológico y según los cambios predominantes observados se han sugerido 4 patrones de alteraciones sinoviales asociadas a artrosis: hiperplásico, fibrótico, rico en detritus e inflamatorio. Los cambios inflamatorios (sinovitis) e hiperplásicos son los más frecuentes y pueden estar presentes en el resto de los patrones. Si son hallazgo único se clasifican en su correspondiente patrón.

Se ha correlacionado la sinovitis de la artrosis principalmente **con el dolor** (Neogi T et al., 2016), y también con hinchazón **y la limitación funcional** de la rodilla, principalmente en estadios incipientes en los que las lesiones condrales son menores y no hay exposición ósea y tampoco se observan cambios radiográficos aún. **Algunos neuropeptidos como la sustancia P son responsables en la sinovial de la generación de dolor y mecanismos inflamatorios** (Marshall KW et al., 1990).

Aunque se ha sugerido la relación de la sinovitis con la progresión de la artrosis, no está tan claro y es probable que sea más relevante la causa de la artrosis, su grado y extensión del daño condral, en la velocidad de progresión. Aun así, la sinovitis podría servir como predictor del desarrollo y progresión de síntomas con un OR de 9.2 (Baker K et al., 2010), y de la pérdida de cartílago (OR: 2.7). La asociación entre la sinovitis por RMN y la artrosis radiográfica es buena (Guermazi A et al. 2014).

Las características de los cambios en la sinovial varían de un paciente a otro y pueden hacerlo según el estadio de la OA. Incluso se han descrito cambios en la celularidad del infiltrado y liberación de moléculas pro-inflamatorias entre artrosis unicompartimentales y bicompartimentales (Moradi B et al., 2015). Gracias al avance de la RMN, se ha propuesto recientemente que pueda haber patrones según la zona de sinovial afectada. Uno de los patrones tenía asociación con el dolor mientras los demás no (de Lange-Brokaar BJ et al. 2015).

Estos hallazgos requerirán más estudios y dejan la puerta abierta a una posible asociación entre determinadas localizaciones de la sinovitis y el dolor, o incluso a determinados patrones de sinovitis según el mecanismo lesional o un modelo/patrón de artrosis.

Sí se ha visto un mayor número de pacientes con sinovitis según avanza el grado de artrosis. Aunque depende de esto último, aproximadamente el 70% de las rodillas sin derrame tienen sinovitis, que aumenta al 95% cuando si tienen derrame (Scanzello CR y Goldring SR, 2012).

Tenemos así, el establecimiento de una relación bastante sólida de la sinovitis con la sintomatología y el daño condral (Berenbaum F, 2013).

Los cambios metabólicos que se dan en membrana sinovial y cartílago, además de otras estructuras articulares, se ven, en cierta forma, reflejadas en líquido sinovial, que es un excelente fluido para la toma de muestras y análisis de que está “pasando” en la articulación. (Oliviero F, et al. 2017).

Así, por ejemplo, y defendiendo la patogenia descrita hasta ahora: en un estudio reciente se ha relacionado la inflamación presente en la artrosis con los macrófagos y neutrófilos, y en relación con marcadores de severidad (Haraden CA et al., 2019). Se ha

observado un aumento de la concentración de lubricina en líquido sinovial y cartílago de rodillas con artrosis avanzada (Neu CPet al., 2010).

También se han observado diferencias entre sexos en cuanto a la proporción de ciertas células inmunes en líquido sinovial: en mujeres existe una mayor proporción de LT CD4+ y macrófagos y menor de monocitos y LT CD8+ (Kriegova E et al., 2018). Esta diferencia por sexos se extiende a la expresión de exosomas con miARN (Kolhe R et al., 2017). Como hemos mencionado antes, los exosomas están cobrando interés en la artrosis; Se ha observado una relación entre estos y las citoquinas presentes en líquido sinovial (Gao K et al., 2020).

2.3.2 EL PAPEL DEL CARTÍLAGO EN LA PATOGENIA:

En este apartado vamos a tratar los cambios patogénicos en el cartílago. A pesar de que cada vez hay más datos que apoyan que el funcionamiento con el hueso subcondral es como una unidad funcional, trataremos sus particularidades de forma separada; si bien es verdad que vías y alteraciones son comunes e interrelacionadas. Se hará primero una descripción más sencilla y global, morfológica, después de los cambios en la fisiología y de forma más detallada mención sobre algunas de las vías y moléculas que se ven alteradas. Parte de estas se han descrito con mayor profundidad en el apartado de mecanismos moleculares en la OA.

Como hemos introducido más atrás, la artrosis se inicia en el cartílago con estímulos lesivos sobre él, que inician unos mecanismos y mensajeros en el propio cartílago y fuera de este, que desencadenan el proceso evolutivo propio de la artrosis. Centrándonos en este inicio, recientemente se ha propuesto que existiese un ambiente en la matriz extracelular inmediatamente alrededor de los condrocitos, que junto a estos se denomina condrón o condrona. Esta matriz pericelular rodea los condrocitos y tiene unas características diferentes al resto de la matriz, en componentes, propiedades mecánicas, mayor resistencia a la digestión enzimática...

De estas peculiaridades en su estructura, se hipotetiza que tendría la función de hacer de filtro-receptor-modulador de las señales biomecánicas y bioquímicas hacia y desde el condrocito para mantener la homeostasis en el cartílago y en la articulación. Así recibiría, por ejemplo, los mecanismos de mecanotransducción vistos previamente, cambios osmóticos o flujos de líquido o cualquier otro cambio en el ambiente normal del cartílago. Con esta transmisión filtrada de señales, el condrocito es capaz de articular las respuestas o adaptaciones necesarias a los estímulos para mantener el equilibrio en el cartílago. Una alteración en esta matriz sería uno de los primeros cambios que observaríamos en el inicio de la artrosis (Guilak F et al., 2018).

Desde el punto de vista morfo-histológico, los cambios en el cartílago van variando conforme progresa la enfermedad. En fases iniciales el cartílago se muestra intacto macroscópicamente o puede tener fibrilación en su superficie y edema. La síntesis de matriz extracelular suele estar aumentada. Esta fibrilación progresa dando lugar a fisuras, que puede terminar en erosiones y denudación del cartílago (grados histológicos vistos previamente). En esta fase la destrucción de la matriz supera la síntesis y el metabolismo esta aumentado (Pritzker KP et al., 2006).

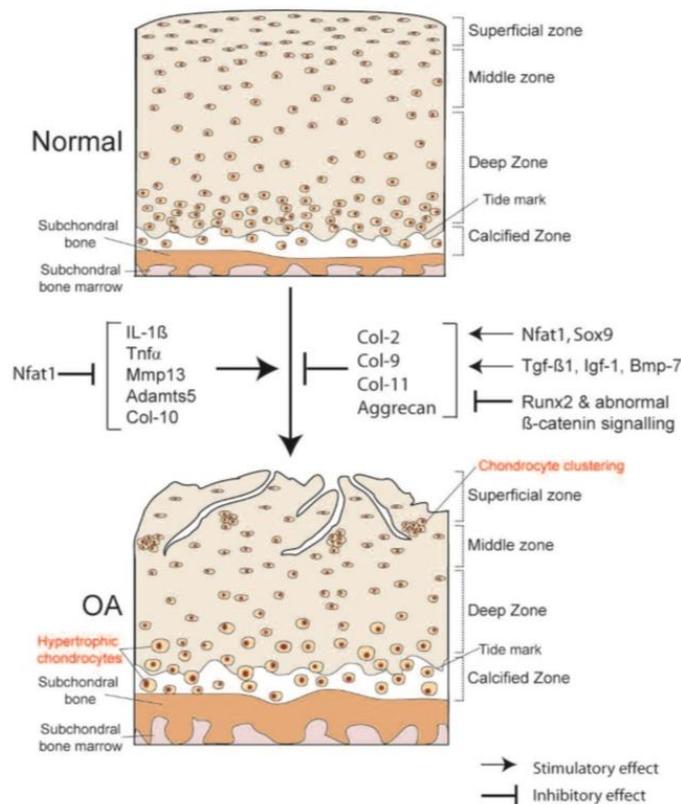


Figura 17.- Cambios característicos a nivel condral y moléculas implicadas en la artrosis

Imagen tomada de: Schroeppel JP, Crist JD, Anderson HC, Wang J. Molecular regulation of articular chondrocyte function and its significance in osteoarthritis. *Histol Histopathol.* 2011;26(3):377-394

Una vez que el ambiente fisiológico del cartílago se altera, los condrocitos dejan de tener un normal funcionamiento. Su número disminuye y se da un cambio fenotípico y diferenciación hacia condrocito hipertrófico. Se ve disminuida su capacidad de responder a factores de crecimiento, lo que reduce la actividad anabólica del cartílago. La catabólica se va viendo aumentada por excesivas señales en esta dirección, principalmente inflamatorias, que estimulan el condrocito para la producción de enzimas degradadoras del cartílago, citoquinas, colágeno tipo X (Col10) (mineralización de la matriz), osteocalcina. El cartílago es el tejido articular que más factor de crecimiento derivado de plaquetas D (PDGFD) produce.

A nivel microscópico todo se inicia con la degradación de proteoglicanos y de colágeno tipo II en las capas más superficiales del cartílago, y un aumento de la síntesis de agrecanos y otros tipos de colágeno en capas profundas. Componentes de la matriz extracelular y fragmentos derivados de su degradación, son el estímulo que inicia los procesos catabólicos propios de la artrosis. El batallón de moléculas inflamatorias y degradadoras comprende principalmente: TNF- α , IL-1, MMP-3, 8 y 13, ADAMTS 4 y 5 (Figura 17).

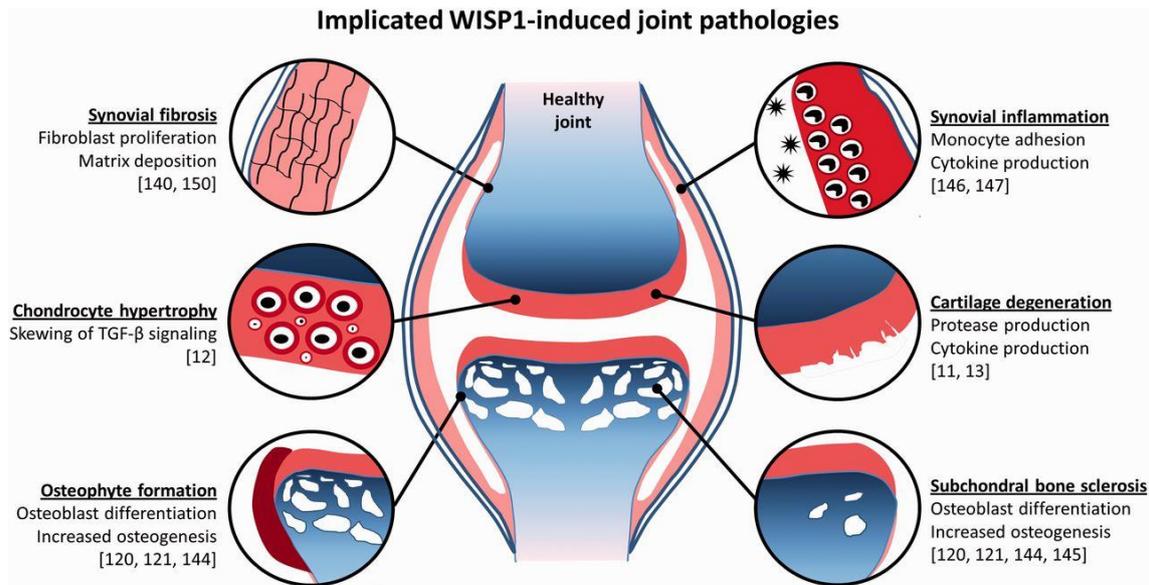


Figura 18.- Cambios característicos en la articulación osteoartrítica

Tomado con permiso de: van den Bosch MH, Gleissl TA, Blom AB, van den Berg WB, van Lent PL, van der Kraan PM. Wnts talking with the TGF- β superfamily: WISPs about modulation of osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2016;55(9):1536-1547

Estos cambios a nivel molecular llevan a un desequilibrio entre síntesis y degradación de la matriz cartilaginosa, siendo los condrocitos incapaces de mantener una matriz sana. Los cambios macroscópicos en la zona central de la superficie articular se caracterizan por esa degeneración y pérdida de espesor condral, mientras en la zona periférica de la superficie condro-articular se desarrolla la característica formación de osteofitos. Esta diferencia se ha sugerido por la diferencia de vascularización y el papel de la carminerina en la osificación del condrocito (Kawaguchi H, 2008).

El resto de las estructuras articulares también se ven afectadas: degeneración y adelgazamiento condral, mineralización de la matriz, esclerosis subcondral, inflamación, fibrosis de la sinovial y la mencionada formación de osteofitos (van den Bosch MH et al., 2016; Zhu M et al., 2009).

En estos cambios, que podemos ver en la Figura 18, están implicados las vías que se van a describir a continuación.

Debemos tener en cuenta los procesos, que son fisiológicos en la osificación endocondral, que se dan en el desarrollo de los huesos, la formación de las articulaciones y la diferenciación condral. Se ha descrito, ya de forma amplia, como estos mecanismos, entre ellos las de hipertrofia y proliferativas del cartílago, juegan un papel patológico en el proceso de degeneración articular iniciado por las lesiones del cartílago (Kawaguchi H, 2008).

Este proceso incluye la progresión en la diferenciación de los condrocitos hacia condrocito terminal (columnar->hipertrófico->terminal), y que terminara con la apoptosis del condrocito en las fases más avanzadas (Figura 19). Cada fase de diferenciación tiene unos factores reguladores que predominan, y en la matriz extracelular encontraremos marcadores característicos: colágeno I, III y X, anexina VI

(Minashima T y Kirsch T 2018), fosfatasa alcalina, MMP-13, COMP, además de los ya mencionados. Los factores de crecimiento fibroblástico y sus receptores (FGF y FGFR del inglés Fibroblast Growth Factor - Receptor) tienen un papel importante en la maduración de condrocitos hacia la hipertrofia y en su proliferación y el VEGF en la angiogénesis desde hueso trabecular que acompaña.

La autofagia es un mecanismo protector que permite el normal funcionamiento del cartílago. Su disminución se ha relacionado con la artrosis. La edad y el aumento de HIF-2 α , disminuyen la autofagia (Carames B et al., 2009)

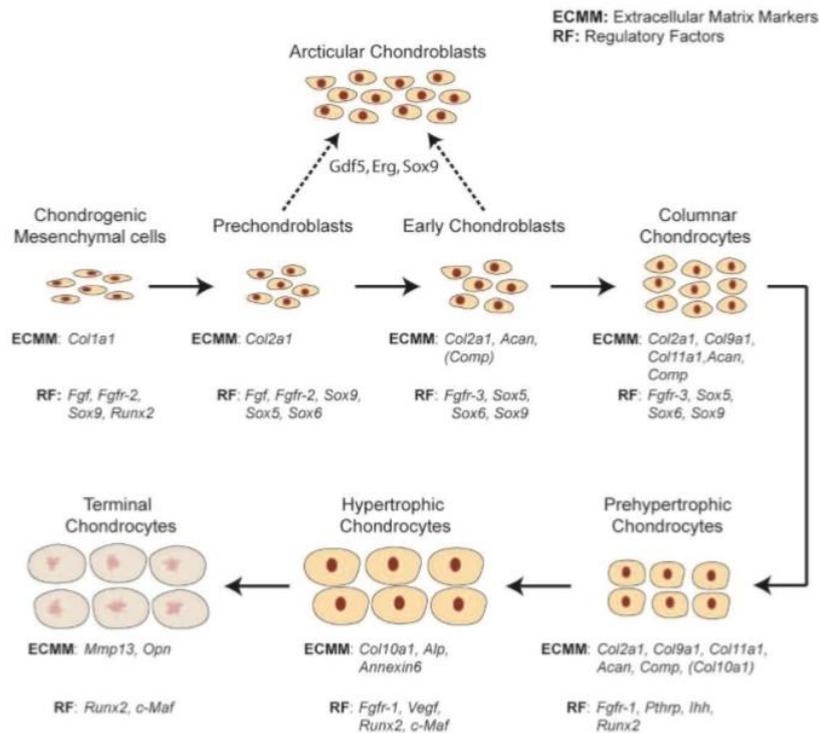


Figura 19.- Línea condral desde MSC condral al condrocito terminal. Marcadores y factores reguladores propios de cada uno.

Tomada de: Schroepel JP, Crist JD, Anderson HC, Wang J. Molecular regulation of articular chondrocyte function and its significance in osteoarthritis. *Histol Histopathol.* 2011;26(3):377-394

Los señalizadores característicos de la osificación endocondral iniciada por los condrocitos hipertróficos, con su característico colágeno X, en la artrosis incluyen: HIF-2 α , Runx2, C/EBP β , carminerin, syndecan-4, hedgehog y notch (Kawaguchi H, 2014).

La vía de señalización de la Wnt/ β -catenina, destacando la WISP-1 (del inglés: Wnt1-Induced Secreted Protein-1. Un factor de crecimiento del tejido conectivo que actúa más adelante en la vía de la Wnt) y la vía de la TGF- β junto con las BMP, juegan un papel central en el mantenimiento de la homeostasis de numerosos procesos en la normal fisiología y desarrollo de la articulación en el crecimiento, entre ellos la osificación y la formación y recambio del cartílago (Blaney Davidson EN et al., 2007). En la artrosis estas vías se han visto sobreexpresadas (Hopwood B et al., 2007), y su causalidad en el desarrollo de la artrosis probada en modelos animales y alteraciones genéticas humanas

(Chen CG et al., 2012; Xie L et al., 2016). Es una vía bien regulada, tanto por inhibidores específicos como por la vía no canónica. Por ejemplo, un aumento de BMP-2 que estimula la vía Wnt/ β -catenina vía LRP5 y Smads, produce hipertrofia de condrocitos y degradación condral (Papathanasiou I, et al., 2012).

La interrelación de estas vías mencionadas es amplia, compleja y aun por conocer en su totalidad. Su desregulación es responsable de gran parte de la patogenia de la artrosis, y la progresión de esta. La regulación de algunos mecanismos depende en mayor medida de uno de estos componentes, pero dada su complejidad no profundizaremos más allá y citaremos el papel conjunto, salvo detalles concretos.

Cabe mencionar que la sobreexpresión sinovial de determinados Wnt de la vía canónica en modelos animales, hace que se observen alteraciones condrales propias de la artrosis en solo 7 días. Su bloqueo específico reduce estas lesiones. La sobreexpresión de WISP-1 también conduce a estas lesiones, sugiriendo que es uno de los mediadores finales de esta vía y probablemente con un papel central (van den Bosch MH et al., 2015).

En la figura 20 tenemos un esquema en el que nos podemos hacer idea del funcionamiento conocido de estas vías y la relación conocida entre ellas (van den Bosch MH, et al., 2016).

WISP1 se ha visto implicado en diferentes estudios, en todos estos procesos característicos de la artrosis. Hay que destacar los siguientes: es capaz de estimular la producción de MMP y agreganasas en los macrófagos y condrocitos, sin la IL-1 β como efector. Puede aumentar la producción de IL-6 en fibroblastos sinoviales, e inducir en estos, la expresión de VCAM-1 que sirve de mediador en la adhesión de monocitos, implicados en la sinovitis. Es capaz de producir una respuesta inflamatoria en macrófagos de tejido adiposo (van den Bosch MH et al., 2015).

El TGF- β es uno de los principales responsables de la fibrosis sinovial, parece que con la participación de la vía Wnt, al igual que en otros tejidos como en la fibrosis pulmonar (Berschneider B et al., 2014).

Hay que destacar del TGF- β que sea visto que es mecano regulable a varios niveles. Sería este al menos, uno de los puntos de traslación de alteraciones mecánicas en cambios fisiológicos y morfoestructurales (Rys JP et al., 2016).

En cuanto a su localización en la artrosis. La Wnt se encuentra aumentada en líquido sinovial y la sinovial pero no en cartílago. La β -catenina esta aumentada en el cartílago. WISP-1 en áreas de degeneración condral y en tejido sinovial. TGF- β se encuentra aumentado en líquido sinovial y en hueso. Esto apoya el funcionamiento de la articulación como un órgano y la relación y participación de todos los tejidos en la fisiopatogenia de la artrosis (Varela-Eirin M, et al., 2018).

2.3.3 EL PAPEL DEL HUESO SUBCONDRA EN LA PATOGENIA.

A pesar de las diferencias estructurales y mecánicas entre el cartílago y el hueso subcondral, estos actúan como uno, cada uno con su parte de función. La alteración en las propiedades mecánicas de uno afecta al otro.

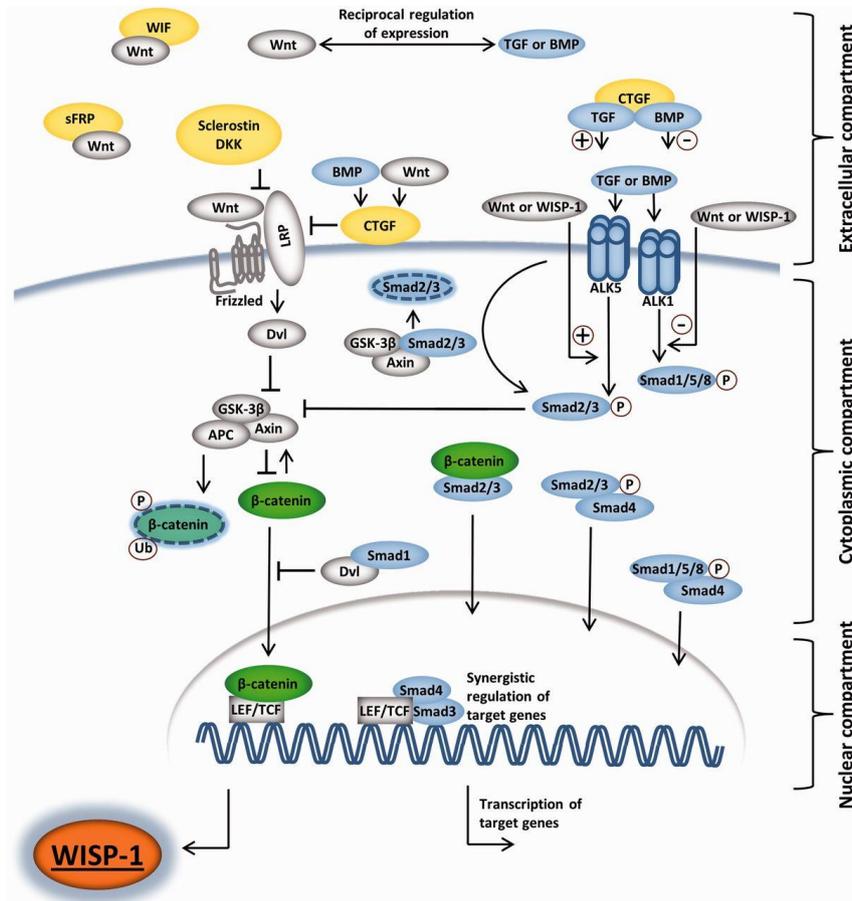


Figura 20.- Intercomunicación profunda entre TGF-β y la señalización canónica de Wnt presente en varios niveles en la célula

Tomado con permiso de: van den Bosch MH, Gleissl TA, Blom AB, van den Berg WB, van Lent PL, van der Kraan PM. Wnts talking with the TGF-β superfamily: WISPs about modulation of osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2016;55(9):1536-1547.

Varios estudios han demostrado ya que existe una comunicación, una transmisión de información entre el hueso subcondral y cartílago, y lesiones en uno pueden llevar a cambios “pro-artrosis” en el otro (Sánchez C et al., 2005). Además, en relación a los cambios metabólicos que se dan, con el aumento del daño en el cartílago, el aumento de la vascularización y el remodelado del hueso subcondral, el flujo entre hueso subcondral y cartílago se ve aumentado (Hwang J et al., 2008).

Las alteraciones estructurales y por lo tanto mecánicas que se dan con los cambios que hemos visto en el cartílago, afectan directamente a las propiedades mecánicas del hueso subcondral. Una lesión primaria en el hueso subcondral también podría afectar mecánicamente a su cartílago.

Al igual que los condrocitos, los osteoblastos tienen la capacidad de reaccionar a estímulos de agresión, produciendo una serie de citoquinas inflamatorias y enzimas degradativas, que también pueden afectar a tejidos contiguos (Sánchez C et al., 2012).

Los cambios en la artrosis en el hueso subcondral incluyen la formación de quistes, la esclerosis y los osteofitos (Weinans H et al., 2012).

La esclerosis subcondral parece responder a cambios mecánicos, ya que aparece en las zonas con mayor carga. No es otra cosa que parte del remodelado óseo que realiza el hueso subcondral secundario a microfracturas y alteraciones en las cargas, como intento de adaptación, que acaba en esclerosis, varias líneas de agua, deformación, formación de osteofitos y quistes. En estas zonas de sobrecarga se ha observado un aumento del metabolismo y mayor producción de matriz, que es la esclerosis que vemos en las radiografías; **se han identificado hasta 68 metabolitos alterados en estas zonas respecto a las no escleróticas, entre ellos beta-alanina y L-carnitina en relación con el aumento del metabolismo.** Además, parece que existe un ambiente hipóxico y acidótico (Yang G et al., 2016).

El metabolismo de la carnitina está en relación con el funcionamiento mitocondrial, que se puede ver alterado en la artrosis. La alteración de los niveles de algunas enzimas que metabolizan la carnitina puede traducir un diferente metabolismo lipídico. Además, aparecen alteradas en enfermedades como la obesidad, la diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares y encefalopatías. Ya se vieron en 2014 diferencias en los niveles de varios metabolitos implicados en el metabolismo de la carnitina y mitocondrial en pacientes con artrosis, sin establecerse correlaciones con los antecedentes o clínicas (Zhang et al., 2014). Estas alteraciones a nivel metabólico que se dan en el microambiente articular en la artrosis, hay que tenerlas en cuenta en el siguiente apartado, a la hora de considerar la influencia externa que ejercen sobre este metabolismo articular, las “influencias sistémicas”.

La perpetuación de este proceso de microfracturas y proceso reparativo, que incluye tejido cicatricial fibrocartilaginoso sobre la superficie ósea, es la que lleva a la deformación ósea. En este proceso de hundimientos de la placa de hueso subcondral, pueden desplazarse en profundidad y hacia zonas adyacentes más periféricas. Fragmentos de cartílago solapado y desplazado a periferia pueden ser rodeados de hueso formando los característicos osteofitos. Además de este mecanismo, la proliferación fibrocartilaginosa en los bordes articulares con metaplasia ósea también da lugar a osteofitos. Si bien los osteofitos periféricos son los más característicos, en ocasiones se puede dar este proceso a partir de tejido fibrocartilaginoso en zonas reparativas más centrales en la articulación. Estos procesos van asociados a deformación articular, pero los osteofitos pueden aparecer con menor afectación osteocondral y sin deformación. Los osteofitos también se pueden formar a partir de inserciones ligamentosas periféricas. En este proceso de lesiones repetidas, es característico el avance de la marca de agua hacia profundo o incluso la aparición de varias (Goldring SR, 2012).

Estos cambios característicos del hueso en la artrosis están bien descritos desde hace muchos años (Ahlbäck S, 1968). Con el avance en el uso de la RMN se describieron lesiones en medula ósea, aun algo menos estudiadas. Estas pueden aparecer en más de la mitad de los pacientes en algunas series y se han relacionado con el dolor (Yusuf E et al., 2011), daño en el cartílago y el avance en la pérdida de este, y la mala alineación de la extremidad (Hunter DJ et al., 2006). Con frecuencia aparecen antes de que exista una degeneración articular.

La relación observada entre la alteración en el eje de la rodilla y la aparición de lesiones en medula ósea (Felson DT et al., 2003), refuerza que estas alteraciones mecánicas producen lesión en el hueso subcondral.

Como hemos visto más arriba, el hueso subcondral cuenta con una amplia inervación desde medula ósea, con lo cual se cree que su alteración tiene una contribución importante al dolor en la artrosis (Hunter DJ et al. 2008).

2.3.4 EL PAPEL “SISTÉMICO” EN LA PATOGENIA

La artrosis se ha considerado una enfermedad local, con una patogenia centrada en la propia articulación. Si bien se lleva años sugiriendo un papel sistémico, principalmente de la inflamación, es en los últimos 5 años cuando ha empezado a cobrar más interés. Aunque el camino para comprender los mecanismos, más allá de las relaciones estadísticas que se puedan realizar, se antoje largo se están haciendo importantes hallazgos (Figura 21).

Por una parte, hemos de tener en cuenta, como nos hemos referido más arriba la importancia y el papel atribuido a la sinovitis en la patogenia (Scanzello CR y Goldring SR, 2012). Pero la sinovitis no es una entidad aislada o que inicie por si sola el proceso que nos lleva a la artrosis. Los daños en el cartílago desencadenan una respuesta inmuno-inflamatoria que actúa sobre la sinovial, pudiendo producir sinovitis; si bien no es el único tejido afectado por la inflamación, juega un papel central (Sellam J y Berenbaum F, 2010).

También hay que considerar ese componente inflamatorio que se activa, si bien clásicamente es la artritis reumatoide y otras artritis inflamatorias las que se han considerado enfermedades inflamatorias propiamente. Como hemos visto, los actores inflamatorios, con papel en su patogenia, que se sobreexpresan son numerosos: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-15, IL-17, TNF- α , TGF- β entre otros. El papel sistémico que vamos a ver de diferentes entidades, además de algún efector propio que pueda tener, su influencia final es proinflamatoria.

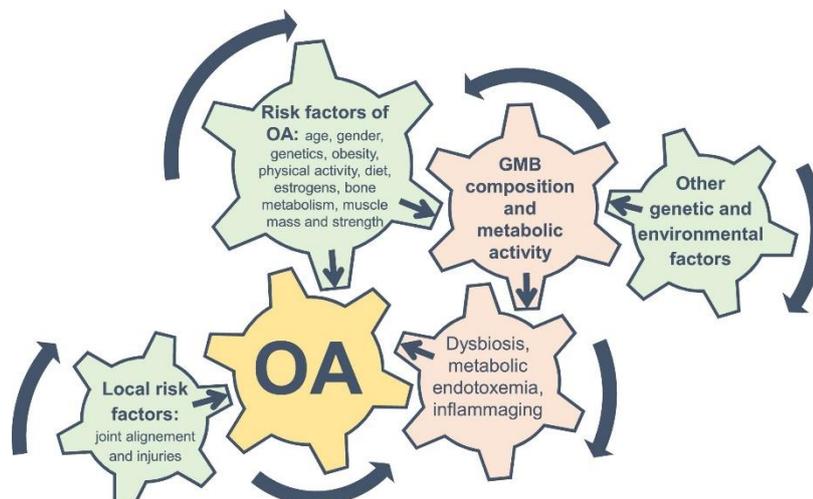


Figura 21.- Interacción entre la microbiota intestinal y los factores de riesgo de la artrosis.

Imagen tomada de: Biver E, Berenbaum F, Valdes AM, et al. Gut microbiota and osteoarthritis management: An expert consensus of the European society for clinical and economic aspects of osteoporosis, osteoarthritis and musculoskeletal diseases (ESCEO). *Ageing Res Rev.* 2019;55:100946.

Y por otra parte tenemos los factores etiológicos que tienen un papel en la patología, y podemos considerar que actúan desde un punto de vista sistémico. En unos pacientes, por ejemplo, la edad tendrá un papel importante, en otros no lo será y el principal será el traumático o la alteración mecánica; en otros la genética será un condicionante central, etc. Pero el punto final será común: la artrosis clínica. Las vías y los mecanismos propios son comunes, las alteraciones e influencias sobre estos mecanismos y vías, si serán diferentes en origen e intensidad. Si bien de forma general el componente inflamatorio en la artrosis es menor del que puede haber en una AR, habrá diferencias interpersonales en la magnitud de la inflamación, e incluso diferentes patrones de sinovitis como hemos comentado previamente (de Lange-Brokaar BJ et al., 2015). En relación con esto hemos hablado de la proposición de fenotipos o diferentes tipos de artrosis, ya que es un tema que cada vez está cogiendo más peso.

Son numerosos los artículos que amplían cada día información sobre la inflamación en la artrosis. El estrés oxidativo y la inflamación también están relacionados. En cambio, es en los últimos 5 años cuando se ha colocado al estrés oxidativo junto a otros actores en la patogenia directa de la artrosis, situando su papel: en la alteración de la condrona influyen la inflamación, el estrés oxidativo, la edad/envejecimiento de los tejidos, y otros agentes capaces de generar inflamación y estrés oxidativo, entre otros (Bolduc JA et al., 2019) (Figura 22).

El estrés oxidativo se produce como resultado de unos niveles excesivos de ROS en la célula, que han sobrepasado la capacidad del condrocito para eliminarlo; bien sea por exceso de producción o déficit en su eliminación. Por ejemplo, la disfunción mitocondrial hace que se acumulen más ROS y lleva al condrocito hacia la apoptosis (Lepetsos P y Papavassiliou AG, 2016).

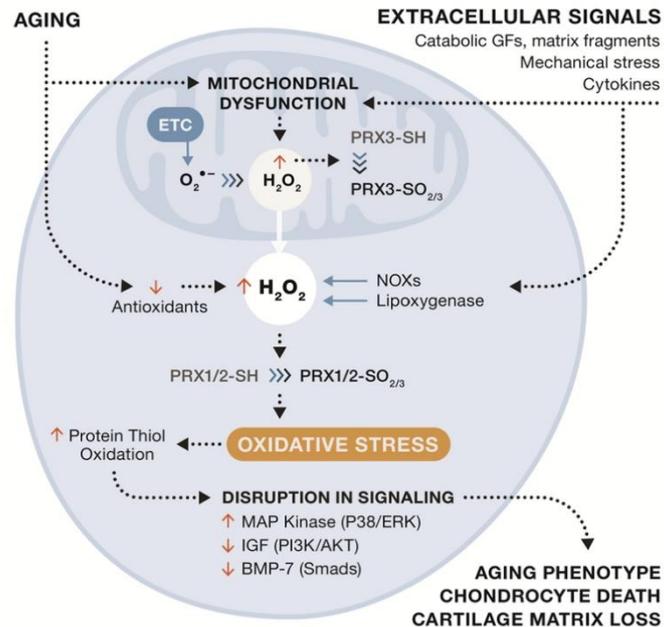


Figura 22.- Especies reactivas de oxígeno, envejecimiento y homeostásis del cartílago articular

Tomado de: Bolduc JA, Collins JA, Loeser RF. Reactive oxygen species, aging and articular cartilage homeostasis. *Free Radic Biol Med.* 2019;132:73-82

La alteración de la matriz pericelular del condrocito es uno de los primeros cambios que se producen, con lo que estos “actores sistémicos” tienen un papel temprano en la progresión de la artrosis (Rahmati M et al. 2017). En la figura 22 podemos ver un resumen que nos da una idea de cómo participan y están relacionados entre ellos. Podemos decir que el estrés oxidativo juega un papel muy importante en la patogenia de la artrosis y además lo hace temprano.

Con todo esto mencionado en mente, y tras una breve introducción común donde destacaremos la denominada “inflammaging”, vamos a estructurar la influencia sistémica en 3 grupos: el síndrome metabólico, el papel antioxidante y la alimentación, y el eje intestino-cerebro con el papel de la microbiota. Remarcar lo ya referido previamente, estos procesos tienen su influencia en todas las personas, lo que varía es su grado de influencia en la progresión de la artrosis (fenotipos) y si es tanto como para ser determinante que llegue a ser una artrosis clínica. Por su peso e importancia en la etiopatogenia la edad merece una mención aparte.

Con la edad los tejidos se degeneran. Los condrocitos tienen una baja capacidad de replicación y son menos sensibles a los estímulos anabólicos de los factores de crecimiento, por lo que no suelen presentar una senescencia replicativa, aunque si se ha observado el mencionado acortamiento de los telómeros de los condrocitos (Schroepel JP et al., 2011). Son varios los estímulos que pueden ir llevando al condrocito a ese estado de envejecimiento, a ese cambio de fenotipo, además de la edad que es un factor inmodificable de su curso. Entre otras el estrés oxidativo, las cargas mecánicas repetidas o más allá de unos límites mecánicos (Zhang H et al., 2022).

Como refleja este último artículo, parecen estar implicadas vías que también lo están en procesos tumorales, en este trabajo son varias las recogidas, aunque no se mencione y cada vez se van viendo más puntos en común. Ya se propuso en 2011 que podía existir cierta relación entre el cáncer y las enfermedades degenerativas relacionadas al envejecimiento de los tejidos (Campisi J et al., 2011).

En este fenotipo, entre otras, el condrocito secreta de forma característica unos niveles elevados de IL-6 e IL-8, o por ejemplo, es más sensible a la producción de MMP-13 estimulada por IL-1 β . Este estado, principalmente relacionado con la edad, en el que existe un patrón de secreción aumentado y característico, que incluye la secreción de citoquinas, factores de crecimiento, mediadores inmunes y **proteasas**, se le conoce como fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP: del inglés, Senescence-Associated Secretary Phenotype) (Lopes-Paciencia S et al., 2019).

El estímulo conocido principal que lleva al condrocito al SASP es el estrés oxidativo, que aumenta la producción de ROS intracelular. En estos apartados tratamos de reflejar varios orígenes y puntos clave del aumento del estrés oxidativo en la artrosis. Los ROS por vías que también vemos en este trabajo y por otras, produce cambios a varios niveles que llevan al SAPS (Jacob J et al., 2022). Actuaciones para proteger al condrocito de esta senescencia, podrían ser un buen enfoque terapéutico (Coryell PR et al., 2021).

Englobados dentro del SASP o no, los AGE participan en el proceso senescente, ya que tienen receptores (RAGE) en los condrocitos y aumentan en los tejidos envejecidos. En el cartílago aumentan con la edad, y llevan a los condrocitos a un fenotipo catabólico, que incluye aumento de IL-6 e IL-8 (Rasheed Z et al., 2011).

➤ EL INFLAMMAGING O ENVEJECIMIENTO INFLAMATORIO.

El SASP, que en el caso del condrocito se da a nivel articular, contribuye en el inflammaging sistémico. Este último no es más que un estado de inflamación de bajo grado y crónico a nivel sistémico. Los tejidos del organismo (enfermedades de estos), estímulos externos, dieta, edad y otros factores propician que se dé y su grado. A su vez el inflammaging influye sobre otros tejidos, teniendo papel en varias enfermedades degenerativas. En el caso de la articulación, el inflammaging influye promoviendo la inflamación de bajo grado y la actividad degradativa condral (Coryell PR et al., 2021).

Parte de estos cambios que se dan en los tejidos como consecuencia del envejecimiento de los mismos, tienen implicaciones inflamatorias en el propio tejido, y sistémicas. En la Tabla 1 se recogen varios de estos cambios, que se han propuesto como marcadores, las moléculas implicadas, los efectos que tienen y su implicación con enfermedades metabólicas como puede ser el síndrome metabólico y su relación con procesos inflamatorios en la artrosis (Loeser RF, 2017).

Tabla 1.- Biomarcadores de envejecimiento que pueden traducirse en enfermedades metabólicas

Biomarcador	Moléculas implicadas	Efecto
Citocinas inflamatorias	TNF; IL-1; IL-6; IL-8	Biomarcadores circulantes de inflamación crónica
Perfil de glicanos ligados a N	IgG-G0 digalactosilada sérica o estructuras agalactosiladas de glicanos ligados a N	Edad biológica (envejecimiento patológico vs no patológico)
Metilación de ADN	Sitios 353 CpG en ELOVL2 utilizados para construir el reloj epigenético para estimar la edad de metilación	Edad cronológica y biológica
miRNA circulante	miR-155; miR-21; miR-146a	Inflamación sistémica
Metabolómica y lipidómica	Glicerofosfoetanolaminas; glicerofosfolinas; glicerolípidos; ácidos biliares; esteroides; isoprenoides; amidas grasas; esfingolípidos; niveles de triptófano; ésteres de L-carnitina	Envejecimiento saludable (centenarios)
cf-mtDNA circulante	cf-mtDNA	Inflamación sistémica

cf-mtDNA: DNA mitocondrial libre de células; IgG-G0: versión de inmunoglobulina G (IgG) en la que Asp297 del fragmento cristalizable se queda sin galactosa en las dos ramas; miRNA: micro RNA; TNF: factor de necrosis tumoral

En relación a la artrosis, estudios publicados en los últimos años, con prometedores resultados, indican varios campos de interés en relación con la patogenia. Y son de interés principalmente por el componente inflamatorio que tienen y porque son factores patogénicos modificables, y por lo tanto podrían ser punto de actuación terapéutica. Destacando los mencionados: síndrome metabólico, estrés oxidativo y disbiosis. Aunque los vamos a ver por separado, estos tres están ampliamente relacionados, vertebrando en cierta forma en la alimentación (Collins KH et al., 2015).

Parece que puede existir una relación entre la dieta, los AGE y la presencia de HMGB1 y la estimulación por esta de los RAGE (Bartling B et al., 2007). A su vez un ambiente inflamatorio, al que puede contribuir un aumento del estrés oxidativo o un aumento neto en los radicales libres, puede hacer que se eliminen menos AGE (Trellu S et al. 2019). El estrés oxidativo está relacionado con la obesidad y la dieta. Así, la dieta, la disbiosis y el síndrome metabólico podrían influir sobre el estado inflamatorio en patologías en las que ya hay daño tisular y acelerar o frenar en parte este.

Síndrome metabólico (SM):

El síndrome metabólico agrupa una serie de alteraciones metabólicas que incluye la obesidad, la resistencia a la insulina, dislipemia e hipertensión.

Aunque clásicamente se ha considerado que la obesidad era un factor de riesgo por sobrecarga mecánica, la evidencia indica ya que el efecto ni es solo mecánico ni es solo por la obesidad (que también hay un componente mecánico), sino que el síndrome metabólico refleja mejor la realidad de estas 2 enfermedades (la OA y el SM) en las que el componente inflamatorio de bajo grado es característico

Una alteración en el metabolismo de los lípidos como puede ser la del síndrome metabólico, o incluso cambios agudos-subagudos tras una dieta rica en las grasas perjudiciales referidas en el siguiente apartado (en contraposición a las protectoras), puede producir cambios en los niveles y el comportamiento de varias aminopeptidasas, y favorecer la artrosis (Segarra AB et al., 2020; de Munter W et al., 2016). También la regulación de la actividad de APB, APN y PSA se ha descrito alterada en ratas obesas (Alponti RF et al., 2016). Otro estudio encuentra también una modificación de la actividad de APA, APB, Cys-AP y DPPiV en tejido cardíaco de ratas alimentadas con dieta rica en grasas (Domínguez-Vías G, et al., 2021)

Destacar la función reguladora del tejido adiposo y de las adipoquinas en el metabolismo lipídico y su participación en la patogenia de la artrosis (Collins KH et al., 2021). El tejido adiposo, produciría mediadores inflamatorios como citoquinas, ROS y las adipoquinas, que contribuirían en el mantenimiento de la inflamación de bajo grado (Courties A, et al., 2019). Las adipoquinas modulan el ambiente catabólico/anabólico, el pro/antiinflamatorio, la apoptosis y el remodelado del cartílago y el hueso subcondral; actúan al menos sobre cartílago, hueso y sinovial (Gao YH et al., 2020).

Así, el efecto atribuido al síndrome metabólico en ciertos patrones artrósicos (especialmente en la artrosis asociada al metabolismo) es cada vez mayor, con alteración principalmente del metabolismo lipídico y la capacidad antioxidante. Esta relación establecida recientemente, hace que el campo de la alimentación y la consideración del síndrome metabólico como un factor contribuyente sobre la patogenia de la artrosis, un campo aún más prometedor (Bortoluzzi A et al., 2018).

Llama la atención que el binomio antioxidantes-ejercicio físico no se ha estudiado en la artrosis metabólica, y por separado en muy pocos estudios. Ello a pesar de que la práctica de actividad física (evitando una vida sedentaria) y la alimentación, se han demostrado protectores de los componentes del síndrome metabólico: hipertensión, alteración del metabolismo lipídico y diabetes (Messier SP et al., 2013).

La alimentación y el papel antioxidante:

Tras la revisión de 151 artículos en las principales bases de datos online, hemos visto que está aumentando el interés en establecer relaciones entre la alimentación y un papel protector antioxidante de esta en la patología articular. En esta línea hay mayor interés por determinados compuestos y suplementos alimenticios naturales. Aun así, desde el ámbito de la atención primaria y especializada se ha prestado poca atención al papel que puede tener la dieta sobre la prevención de la artrosis.

Se realizó la búsqueda con los términos: diet/macronutrients/micronutrients/antioxidants/ fat(s) y osteoarthritis/bone marrow/bone heath. Ampliación con bibliografía de artículos y búsquedas relacionadas. Se descartaron los artículos centrados en la pérdida de peso, y sin relación con el tema tratado; también aquellos centrados en la glucosamina y el condroitin sulfato.

Hemos visto que en general la evidencia es de baja calidad e insuficiente; en muchos casos heterogénea y también contradictoria. Solo recientemente se ha realizado algún estudio clínico prospectivo. Eso no impide que existan prometedores estudios de ciencia base y epidemiológicos, que justifican el interés tanto en micronutrientes como en macronutrientes y patrones de alimentación.

Destaca el papel protector que atribuyen al consumo de ácidos grasos omega-3 y papel negativo a los omega-6 y ácidos grasos saturados. Hay estudios de cohortes que dan un papel protector a la dieta mediterránea, al consumo de frutas y verduras, y destaca al alto consumo de cereales (Veronese N et al., 2017; Wu CL et al., 2015; Lu B et al., 2017; Doré D et al., 2012; Williams FM et al., 2010). La dieta rica en grasas mencionadas negativas es pro-oxidativa y favorece la artrosis (Mooney RA et al., 2011).

Junto con estos, los mayores niveles de evidencia existentes son para la Curcumina, la Boswellia Serratia (y la combinación de estos 2) y los insaponificables de aguacate y soja (ASU por sus siglas en inglés: Avocado and Soy Unsaponifiables) (Bannuru RR et al., 2018; Haroyan A et al., 2018; Daily JW et al., 2016).

Los polifenoles tienen estudios experimentales favorables. En esta completa revisión se recogen los potenciales beneficios del consumo de té verde y extractos, en probable relación con su contenido en antioxidantes y sobre todo polifenoles (de Sire A et al., 2021); los estudios son sobre todo en animales y falta generar evidencia en humanos para defender su beneficio, con un potencial papel antioxidante, antiestrés oxidativo y antiinflamatorio (Luk HY et al., 2020). Las vitaminas A, B, C y E cuentan con estudios de cohortes y algún ensayo (Muraki S et al., 2015). La vitamina C es la de mayor interés. En un estudio se ha asociado su bajo consumo en mujeres a osteofitos y estrechamiento de la interlinea articular. No se ha podido establecer una causalidad entre el déficit de vitamina D y la artrosis (McAlindon T et al., 2013). La vitamina K cuenta con estudios observacionales favorables (Thomas S et al., 2018).

Para poder aclarar el papel que tiene la alimentación, ciertos macro y micronutrientes y los antioxidantes en la artrosis, es necesaria una buena metodología con estudios de calidad, que incluyan parámetros clínicos, físicos y biomarcadores, que nos permitan establecer una causalidad de intervenciones alimentarias y la artrosis (Basu A, et al., 2018).

En la artrosis el metabolismo celular se ve alterado, aumentando los procesos catabólicos y la inflamación responsables del daño tisular. Esta patogenia, en la que se atribuye un papel al estrés oxidativo en la inflamación, nos hace pensar en el papel que la alimentación tiene como posible tratamiento, al menos coadyuvante. Y es que algunos compuestos ya han demostrado actividad en este sentido (Ghoochani N et al.,

2016; Grover AK y Samson SE, 2016)., además de verse que el estrés oxidativo juega un papel importante en la homeostasis articular (Yudoh K et al., 2005; Davidson RK et al., 2018; Schell J et al., 2017).

Tener esta evidencia sólida en la que poder basarse para hacer intervenciones dietéticas personalizadas y recomendaciones poblacionales generales, como profilaxis secundaria e incluso primaria de la artrosis, podría tener un impacto importante. Analizar y actuar sobre aquellos pacientes que llevan una dieta proinflamatoria, que se podría incluso considerar factor de riesgo, también sería beneficioso. La investigación en la vehiculización de estos componentes protectores para aumentar su biodisponibilidad también es necesaria (Green JA et al., 2014).

Destacar la curcumina, un polifenol, que inhibe la APN. Además del efecto anti angiogénico y anti metastásico en procesos tumorales, al inhibir la APN, sería de esperar un papel protector de la curcumina en los procesos inflamatorios y angiogénicos articulares. Reduce la expresión de MMP-9 y el efecto anti angiogénico sin inhibir el VEGF (Shim JS et al., 2003). Además, en modelo animal se ha sugerido que actuaría sobre la vía TLR4/MyD88/NF- κ B en casos de hemorragia subaracnoidea, con cierto poder antiinflamatorio en este caso neuro inflamación, reducción de citoquinas proinflamatorias y aumento de antiinflamatorias (Gao Y et al., 2019).

En la Figura 23 podemos ver los numerosos puntos de actuación que se han propuesto para los polifenoles sobre procesos que hemos visto implicados en la patogenia de artrosis. Sería la base que justificaría su papel protector.

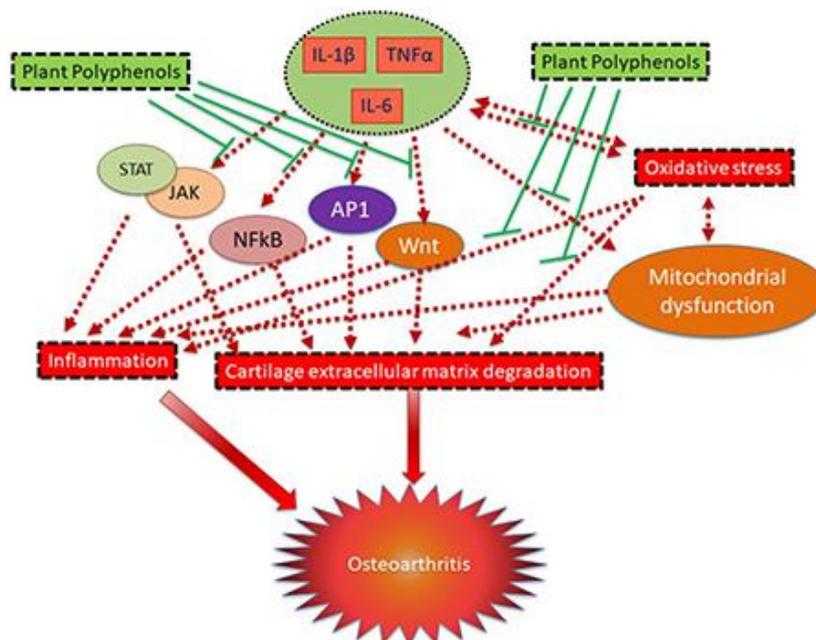


Figura 23.- Representación esquemática de la influencia del estrés oxidativo y la inflamación en la patogenia de la artrosis y el posible papel de los polifenoles vegetales.

Tomado de: Ansari MY, Ahmad N, Haqqi TM. Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis: Role of polyphenols. *Biomed Pharmacother.* 2020;129:110452

Existe además un estudio que compara pacientes sanos con pacientes con artrosis, y halla relación entre los niveles de marcadores de estrés oxidativo y LDL-ox con artrosis, incluso estableciendo correlación con gravedad de la artrosis. Además, ve como protectora frente a artrosis a la paraoxonasa 1 (PON1), que protege frente al estrés oxidativo. Hace un avance en demostrar la relación que el estrés oxidativo tiene en la artrosis, y esto vertebra la importancia de la alimentación en su profilaxis (Ertürk C et al., 2017).

Eje intestino-cerebro y la microbiota:

Se ha visto en modelo animal como la actividad de Ala-AP y Cys-AP varía según el perfil de las grasas en la dieta (Segarra AB et al., 2019). Se modifican en hígado, plasma y cerebro (Segarra AB et al., 2020). Si la actividad de estas enzimas se altera, es de esperar que el papel que desempeñan, también se vea modificado.

El efecto modificador de los lípidos sobre la actividad de estas aminopeptidasas podría producirse, bien vía directa por medio del eje intestino-cerebro, o bien por vía indirecta a través de la modificación de la microbiota. El eje intestino-cerebro-hígado es una vía neural, que, según esas grasas de la dieta, se demostró como un regulador de la homeostasis de la glucosa (Wang PY et al., 2008).

El 27-hidroxicolesterol (27-OH), colesterol cuya concentración está en relación con la colesterolemia, y que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (Björkhem I et al., 2006) aumenta la expresión del IRAP, pero reduce la de GLUT4, con lo que el transporte de glucosa al interior celular se ve disminuido. También produce un aumento de la actividad catalítica de la IRAP. Estos efectos son dependientes de los receptores X del hígado, los cuales regulan la APA y la APN. Un aumento de la APA produce un aumento de Ang III que activa IRAP e inhibe GLUT4. El aumento de APN, reduce la concentración de Ang IV, logrando el mismo efecto. Además, apoyando estas observaciones, aunque con poca evidencia aun, se ha sugerido una relación entre los niveles elevados de 27-OH con hipometabolismo de la glucosa en el cerebro (Ismail MA et al., 2017). Los receptores X del hígado además regulan y son regulados por el SRA (Li C et al., 2017).

El aumento de la actividad catalítica de IRAP tiene efectos periféricos, y como vemos, un metabolismo alterado de los lípidos puede tener efectos de sobre activación del SRA local, aumento de la actividad de IRAP, APN y APA, y disminución del metabolismo energético celular (Segarra AB et al., 2020).

Además de la relación que hemos visto entre las grasas y la microbiota, a esta última se le está atribuyendo cierto papel directo en la patogenia (Biver E et al., 2019; Silvestre MP et al., 2020; Li Y et al., 2016; Lei M et al., 2017). Incluso como vemos en la Figura 24, en la artrosis existiría un microbioma alterado en pacientes con artrosis respecto de articulaciones en pacientes sanos.

Se ha visto correlación entre la disbiosis y un estado proinflamatorio.

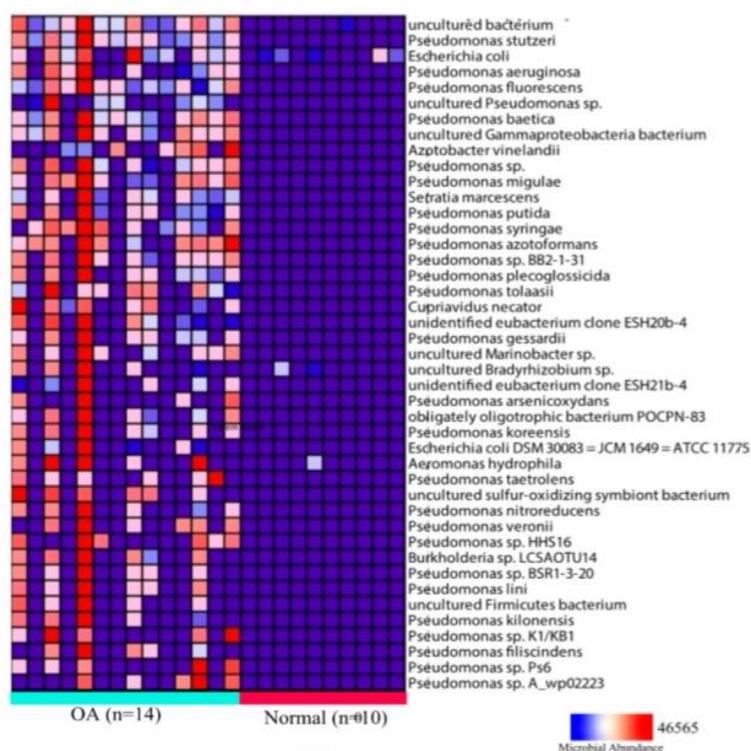


Figura 24.- Mapa de calor mostrando las diferencias en el microbioma intra-articular en muestras de pacientes con artrosis de rodilla en comparación con muestras normales

Imagen tomada de: Tsai JC, Casteneda G, Lee A, et al. Identification and Characterization of the Intra-Articular Microbiome in the Osteoarthritic Knee. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):8618

➤ INFLAMACIÓN NEUROGENICA

Es aquella que es producida por los nervios sensitivos que llegan a la articulación. Las fibras sensoriales, principalmente tipo C de conducción lenta (responden a estímulos térmicos, mecánicos y químicos), que llegan a la membrana sinovial contienen neuropéptidos que pueden liberar a líquido sinovial y otros tejidos, ante determinados estímulos. Entre ellos destaca la sustancia P (Saito T y Koshino T, 2000).

Participa en la generación del dolor, en la vasodilatación y el aumento de la permeabilidad microvascular (Sousa-Valente J y Brain SD, 2018).

En articulaciones artrósicas se ha visto aumentada en membrana y líquido sinovial. Parece que la mecanotransducción podría afectar a la liberación de la sustancia P, con lo que los cambios mecánicos de la artrosis podrían ser en parte responsables del papel de esta. También pueden producir su liberación la inflamación y la estimulación de las fibras sensoriales (Muschter D et al., 2019).

La exposición de macrófagos y células mononucleares de sangre periférica (PBMC: del inglés Peripheral Blood Mononuclear Cells) a sustancia P en las terminaciones nerviosas en membrana sinovial, promovería la liberación de citoquinas y quimiocinas, entre ellas IL-1 β , TNF- α y MCP-1, esta última caracterizada por reclutar monocitos a un lugar con

inflamación (Spitsin S et al., 2017). Es uno de los puntos de unión entre el sistema nervioso y sistema inmune. La sustancia P participaría en la patogenia de fases tempranas y tendría un efecto modulador de la inflamación: la inflamación neurogénica (Hernanz A et al., 2003).

Además, la sustancia P tiene efectos directos sobre el condrocito. Induce la liberación de PGE2. La sustancia P está estrechamente regulada por la NEP. El fragmento del extremo C-terminal que resulta de la actuación de la NEP sobre la sustancia P (SP7-11), promueve la liberación de PGE2, la producción de colagenasas y aumenta el calcio intracelular (Halliday DA et al., 1993).

La capsaicina a altas dosis, en su papel sobre la sustancia P, produce una desensibilización al dolor, pero no a estímulos mecánicos (Jancsó G et al., 1977).

➤ Mecanismo opioide en la artrosis

Más adelante, al presentar la regulación del sistema opioide, haremos una descripción más pormenorizada del sistema en su conjunto. Resumidamente, y para describir su papel en la artrosis, podemos decir que hay tres tipos de receptores opioides (OR): κ (KOR), δ (DOR), and μ (MOR) y varios subtipos. Se localizan en determinadas regiones del sistema nervioso central, en el sistema nervioso periférico, en sistema digestivo, pulmones y en otros tipos celulares. En células del sistema inmune, los 3 receptores opioides se expresan en LT, LB, NK y mononucleares. Se encuentran en células madre mesenquimales. En la articulación se expresan en FLS, además de las células inmunes (Brejchova J et al., 2020).

Hay tres tipos de péptidos opioides endógenos de forma simplificada: encefalinas, dinorfinas y endomorfina. Estos son rápidamente degradados por peptidasas, si bien no es de forma específica, la que más especificidad tienen son la NEP y la APN por las encefalinas.

La activación de estos receptores bien sea por opioides endógenos o exógenos, produce la inhibición de canales de calcio, de la adenilato ciclasa, la apertura de canales de potasio, la activación de MAP quinasas y la reducción de prostaglandinas.

El sistema opioide modula la respuesta algésica, el sistema autónomo (SNA) y el sistema neuroendocrino. Además, tiene un papel en las emociones y procesos cognitivos, interactúa con la inmunidad innata y adquirida, y modula la inflamación (Feng Y et al., 2012).

La espinorfina es un inhibidor endógeno de enzimas degradadoras de encefalinas (degrada, al menos, NEP, ACE y APN). Se le ha denominado un neuromodulador del metabolismo de las encefalinas. Así, se ha visto que reduce el dolor, tiene efectos antiinflamatorios y reducción en la migración de neutrófilos (Nishimura K, et al., 1993; Yamamoto Y et al., 2002; Yamamoto Y et al., 1997).

KOR y DOR se expresan de forma activa en FLS, además de células de sangre periférica. En AR y artrosis se encuentran disminuidos, habiéndose visto una relación con la actividad inflamatoria y el dolor. TNF- α e IL-1 β disminuyen la expresión de estos receptores, siendo DOR más sensible. La administración de agonistas aumenta el número de receptores. En células inmunes de sangre periférica, los KOR también se han visto disminuidos en artrosis de rodilla y no se modificarían con tratamiento con paracetamol o AINES. También inhiben la liberación de sustancia P en el asta posterior (Shen H et al., 2005; Gunji N et al., 2000; Shen H et al., 2006).

Es importante tener en cuenta que existen diferencias entre los efectos endógenos opioides y la administración exógena, la estimulación aguda de los receptores y la crónica. Los receptores presentan sensibilización. Además, hay interacción entre el sistema opioide y el cannabinoide, pudiendo potenciar este último los efectos antinociceptivos del primero (Bushlin I et al., 2010).

Desde que en 1979 se describió la relación del sistema opioide con el sistema inmune, los efectos conocidos de los opioides sobre componentes del sistema inmune no han dejado de aumentar. Los efectos son complejos, pudiendo influir factores como la duración del tratamiento, la privación o las dosis. Tampoco están claramente establecidas las vías mediante las que los opioides producen cambios que pueden ser de importancia en la artrosis, y que se citan a continuación. De forma general se acepta que tienen un efecto inmunosupresor y que este es mediante los MOR: disminuye la celularidad inmune, la producción de citoquinas por este, también de quimiocinas y aumento de sus receptores, reducción de la inflamación al reducir la quimiotaxis de células inflamatorias, disminución de VEGF, disminución de la fagocitosis de macrófagos y de la citotoxicidad de las NK (indirectamente por vía neural, sistemas adrenérgico y simpático).

Según el grueso de la literatura los opioides no actuarían directamente sobre el TLR4. Una hipótesis propuesta es que los opioides, con un efecto conocido de aumento en la permeabilidad intestinal a las bacterias, harían que aumentasen los lipopolisacáridos (o endotoxinas) bacterianos que estimularían al TLR4 (Eisenstein TK, 2019).

La inflamación puede bloquear la analgesia opioide al liberarse quimiocinas que desensibilizan los receptores opioides.

Las células madre mesenquimales de médula ósea presentan los 3 tipos de OR. Se ha visto que el tratamiento con morfina disminuye la migración de MSC, tanto endógenas como las administradas de forma terapéutica. Esta y otras alteraciones observadas en las MSC en pacientes tratados con opioides indican que los opioides tendrían efectos negativos sobre la curación de tejidos, incluida la osteogénesis (Holan V et al., 2018; Coluzzi F et al., 2020).

Dolor y artrosis:

El mecanismo del dolor comienza en el nociceptor, que es el encargado de determinar y codificar en un rango de intensidad, que estímulos son nocivos y cuales se pueden omitir como no dañinos.

Además de los estímulos nociceptivos, también hay estímulos inhibitorios (periféricos y centrales) que modulan las señales nociceptivas. El dolor no es una excitación nerviosa simple aferente. El dolor se produce tras la modulación periférica, medular y supraespinal. Cuando los estímulos nociceptivos sobrepasan a los inhibitorios: hay dolor. El gran centro modulador es el asta posterior espinal.

En ocasiones se puede dar cierta plasticidad en la percepción del dolor. Los más habituales, la hiperalgesia (mayor percepción de dolor frente a un estímulo nociceptivo), la alodinia (reducción del umbral del dolor) y la prolongación de la duración del dolor tras el estímulo (Romera E et al., 2000).

Para comprender como se produce el dolor, frecuentemente crónico en la artrosis, hay que tener en cuenta lo siguiente: los mediadores inflamatorios generados por los tejidos dañados estimulan los nociceptores locales de forma directa. Otro componente del dolor es la inflamación neurogénica de la que hemos hablado previamente. Y otro componente sería la neuro inflamación, que es la respuesta de los nervios, bien del sistema nervioso periférico o del central a estímulos inflamatorios directos. En esta última están implicadas principalmente las células de la glía, y se genera una sensibilización, dándose principalmente en procesos crónicos o postoperatorios; un ejemplo ilustrador de los mecanismos de esta neuro inflamación, es el caso del efecto del tratamiento con opioides que también vemos en su apartado correspondiente en más detalle (Matsuda M et al, 2019). En el proceso del dolor crónico en la artrosis existe una interacción neuro-inmune. Además, los mecanismos y características del dolor pueden ser diferentes a lo largo del proceso evolutivo de la artrosis y según el mecanismo lesional (Miller RE y Malfait AM, 2017).

En cuanto a los mediadores inflamatorios en la artrosis, el grupo de mayor importancia son los DAMPs como S100A8, α -2 macroglobulina, HMBG1, fragmentos de agregano (Miller RE et al., 2018). Estos, mediante TLR activan procesos neuroinmunes y proinflamatorios, que también son responsables de la estimulación nociceptiva (Miller RE et al., 2015).

El sistema nervioso autónomo (SNA) parece estar implicado en la regulación de la homeostasis articular (Courties A et al., 2017). Cuando se produce inflamación en un tejido el SNA une el SNC con el sistema inmune. Por ejemplo, se ha visto que el simpático es capaz de inhibir la TNF- α (Guirao X et al., 1997). Y el nervio vago tiene actividad antiinflamatoria. Pero los efectos atribuidos al SNA son tanto inflamatorios como antiinflamatorios. El SNA puede tener cierto papel en la patogenia de la artrosis mediante la actuación de las catecolaminas en los receptores adrenérgicos. Todas las estructuras de la articulación están inervadas por el sistema simpático, y las catecolaminas son también liberadas a líquido sinovial. Las células de los tejidos articulares presentan al menos un tipo de receptor adrenérgico (Sohn R et al., 2021).

Además, la simpatectomía ha conseguido reducir el dolor en relación a la hipersensibilidad mecánica en modelo animal (Xie W et al., 2016).

Depresión y artrosis

La depresión se ha relacionado con la artrosis, además del lógico componente directo derivado de la limitación funcional y el dolor, por mecanismos metabólicos. Estos no han sido aun bien establecidos, si bien se ha sugerido que cambios en el sistema opioide pueden influir en el estado anímico del paciente (Pitsillou E et al., 2020). También se considera que la inflamación (sobre todo la neuro inflamación), concretamente el papel de las citoquinas, la alteración de los glucocorticoides y aumento del estrés oxidativo presentes en la artrosis, contribuirían en la patogénesis de la depresión (Kim YK et al., 2016).

2.4 TRATAMIENTO DE LA ARTROSIS

A pesar del peso de esta enfermedad en la práctica clínica, no existe un tratamiento que haya conseguido demostrar una limitación en la progresión de la artrosis, y excluyendo la cirugía sustitutiva las opciones terapéuticas son pocas.

El tratamiento habitual incluye la recomendación de pérdida de peso si existe un exceso de este, el ejercicio físico y la fisioterapia (Gudbergesen H et al., 2012).

En cuanto al tratamiento farmacológico este se limita al tratamiento sintomático: antiinflamatorios orales, analgésicos en aumento según escala analgésica y respuesta del paciente y/o alergias. También se emplea la administración de corticoides de forma intraarticular.

El punto final es el reemplazo articular mediante la cirugía protésica.

Este abordaje terapéutico actual no responde a los problemas que genera en las primeras fases de la enfermedad. También presenta los inconvenientes propios de la cirugía protésica, como son la duración limitada del implante protésico y la incidencia de complicaciones. Este abordaje terapéutico, que podemos denominar clásico, y el más frecuente en la actualidad, responde de una forma limitada a las demandas por parte del paciente y del médico para el tratamiento de la artrosis, sobre todo en las fases más tempranas.

Esta falta de herramientas terapéuticas que permitan al médico dar respuesta a las necesidades del paciente junto con la alta prevalencia de la artrosis, ha llevado a que en los últimos años haya un renovado interés por los tratamientos específicos sobre la artrosis. Entre ellos tratamientos como el Ácido Hialurónico (HA), el Plasma Rico en Plaquetas (PRP) y las terapias con células mesenquimales (MSC). Todos ellos administrados vía intraarticular (Zhang W et al., 2008).

A continuación, se enumeran o describen brevemente estos y otros gestos terapéuticos disponibles y empleados para el tratamiento de la artrosis en la actualidad. También abordamos una serie de tratamientos más experimentales y con menor experiencia clínica.

Inyecciones intraarticulares:

Las inyecciones más clásicas incluyen los corticoides y el Ácido Hialurónico. Habitualmente una o las 2 suelen emplearse como grupos comparativos o como control en los estudios de nuevos tratamientos intraarticulares.

- Plasma rico en plaquetas (PRP)
- Suero autólogo condicionado (ACS del inglés: Autologous Conditioned Serum) (Neybecker P et al, 2018).
- Dextrosa hipertónica (Proloterapia): Técnica novedosa poco empleada en la práctica diaria. Empleada intraarticular y para inyecciones extrarticulares en inserciones tendinosas y ligamentosas. La mayor parte de los estudios defiende su seguridad y capacidad de mejorar el dolor y la función respecto a placebo o incluso AH. Pero el mecanismo de acción aún no está claro (Wang J et al., 2021).
Aun de forma experimental se han propuesto inyecciones intraarticulares que vehiculizan material genético, en probable relación a efectos derivados directa o indirectamente de células mesenquimales, que explicamos en más detalle a continuación (Si HB et al., 2017).

Tratamiento con células madre mesenquimales o derivados:

Se ha observado en modelo animal que exosomas de células madre mesenquimales de medula ósea podrían tener actividad antiinflamatoria y anti apoptótica reduciendo la actividad de la vía HMGB1, TLR4 y TNF- α , facilitando la condrogénesis (Zhao C et al., 2020).

Estos datos justificarían que se está proponiendo un posible efecto antiinflamatorio y anti fibrótico de las células mesenquimales en grasa infra patelar, y su empleo como tratamiento celular en artrosis incipientes, o bien de determinados exosomas purificados a partir de ellas, como forma de vehiculizar material genético con efecto protector (Greif DN et al., 2020; Wu X, et al., 2019).

Y es que las MSC endógenas o exógenas migran a los lugares de inflamación o daño tisular, producen factores de crecimiento, material genético y citoquinas. Tienen efectos anti apoptóticos e inmunoreguladores; disminuyen la inflamación y contribuyen en el proceso curativo local (Holan V et al, 2016).

Aunque un primer estudio de 2014, sugería que los exosomas producidos, en ese caso por los sinoviocitos tipo fibroblasto, favorecen la angiogénesis y cambios artrósicos (Kato T et al., 2014).

Estabilización ligamentosa:

Como hemos visto las lesiones ligamentosas pueden desencadenar una artrosis prematura. Si se objetiva una lesión ligamentosa, deberá estudiarse en busca de inestabilidad y ver si cumple criterios quirúrgicos. En tal caso deberá de reconstruirse, por lo general, la anatomía previa o lo más mecánicamente funcional, ya que, si no hará que otras estructuras puedan verse sobrecargadas, y podrá llevar igualmente a una

inestabilidad crónica, o a que este neoligamento se rompiera por soportar cargas que no debería.

El lavado artroscópico es otro gesto terapéutico que se emplea en ocasiones en que no ha habido mejoría previa con los tratamientos empleados. Suele emplearse previo a una actitud más agresiva e irreversible, como puede ser el reemplazo articular, y sin una clara indicación de otra actitud terapéutica. Habitualmente se considera también exploratoria en búsqueda de lesiones dudosas o no valorables por pruebas radiológicas. Hay estudios en los que estos lavados con suero fisiológico mejoran el dolor (Livesley PJ et al., 1991).

El trasplante autólogo de condrocitos se ha empleado con éxito, aunque su indicación son las lesiones traumáticas o no del cartílago localizadas, y no el daño articular artrósico como tal, aunque si pueden ayudar a mitigar las consecuencias de esas lesiones iniciales en el desarrollo de una artrosis secundaria (Luyten FP y Vanlauwe J, 2012).

Osteotomías

En aquellos casos que existe una mecánica articular alterada y se cumplen una serie de criterios, se puede considerar realizar una osteotomía, que puede contemplar varios planos, y con ello prevenir o retrasar una futura artrosis.

Prótesis total de rodilla (PTR)

Como se ha mencionado la implantación quirúrgica de una prótesis articular es el punto final del tratamiento de la artrosis. Esta cirugía busca reestablecer en la mayor medida posible la función articular, disminuir el dolor y aumentar la capacidad funcional del paciente.

Prótesis unicompartmental de rodilla

La prótesis unicompartmental con sus indicaciones clásicas, busca ser más conservadora que la PTR, tratando de mantener una cinemática más natural, conservar mayor stock óseo y una menor morbimortalidad. En algunos casos en los que al paciente ya se le ha operado de un compartimento, si tiene indicación, se plantea incluso colocar otra unicompartmental en el nuevo compartimento afectado (externo habitualmente).

Aun de forma menos extendida también se están colocando prótesis totales que conservan ambos ligamentos cruzados y que sería similar a una unicompartmental bilateral.

El Missouri Orthopaedic Institute (MOI) es un centro pionero en la implantación y desarrollo de la prótesis biológica. Es un trasplante osteocondral de hueso cadáver fresco de aquellos componentes afectados. Pueden implantarse desde defectos menores hasta los 2 cóndilos y la meseta tibial cuando la afectación es completa, en pacientes jóvenes seleccionados. Previamente se ha estudiado la adecuación en tamaño y todas las piezas son talladas de forma que queden pressfit, y tratadas con un

preparado de células madre de médula ósea del paciente receptor, además de fijarse específicamente después.

Nuevos tratamientos:

Hasta ahora el intento de desarrollar un tratamiento modificador de la enfermedad, ha fracasado. Para su desarrollo en los años próximos en nuevas estrategias terapéuticas el avance en la investigación sobre la artrosis es básico. La comprensión del funcionamiento articular a todos los niveles y la patogenia, permitirá identificar posibles dianas terapéuticas y junto con el progreso tecnológico, el desarrollo de terapéuticas que permitan reducir o parar la progresión de la artrosis, o bien prevenirla o incluso revertir parte de las lesiones existentes.

Como hemos ido viendo en los apartados anteriores, en los últimos 5-10 años se ha avanzado muchísimo en la comprensión de estos mecanismos moleculares que subyacen en la artrosis. Aunque aún queda un largo camino por recorrer, se van desarrollando ya algunas moléculas con potencial terapéutico que van iniciando su largo proceso del estudio básico hacia la clínica. Otras ya se han quedado por el camino, al menos por el momento, principalmente por problemas en cuanto a su seguridad. Por ejemplo, moléculas que tenían como diana terapéutica la inhibición de enzimas catabólicas como MMPs y ADAMTS.

Gran parte de estos estudios que identifican potenciales dianas, se nutren de los resultados de las ciencias ómicas: proteómica, transcriptómica, epigenómica, genómica. Estas bases de datos de diferentes células del organismo, en diferentes seres humanos, con patología y sanos, pueden ser cruzadas y con ello obtener esos datos que ya nos están ayudando a comprender mejor la fisiopatología, y a trazar la estrategia terapéutica.

Bloqueo del complemento: se ha visto en modelos animales que la ausencia de componentes del complemento, en particular C5, tiene un efecto protector sobre la artrosis. Bloquear el C5 a nivel articular sería una diana terapéutica a considerar.

Proteína morfogenética ósea 7 (BMP-7 del inglés Bone Morphogenetic Protein): es un factor de crecimiento que estimula la formación ósea y de cartílago durante el desarrollo embrionario y en primeras etapas de la vida.

Factor de crecimiento fibroblástico 18 (FGF-18 del inglés Fibroblast Growth Factor): presenta efectos anabólicos sobre los condrocitos.

Cathepsina K

Inhibición de TGF-beta: factor de crecimiento que juega un papel en la homeostasis. Su aumento se ha visto relacionado con el desarrollo de artrosis. Su inhibición se ha identificado como diana terapéutica y actualmente hay varias líneas ex-vivo e in vivo de investigación de diferentes vías para su inhibición.

La sobreexpresión de DKK-1 (Dickkopf-1), inhibidor de la vía Wnt canónica ha mostrado efectos protectores, pero tiene estudios contradictorios. Sus efectos

positivos no están claros ya que la Wnt es necesaria para el correcto funcionamiento condral y óseo.

Naltrexona:

La Naltrexona es un antagonista opioide que tiene varios papeles inmunoreguladores que están siendo investigados. Los efectos que enumeramos a continuación por su interés con la artrosis son antagónicos a los efectos de los opioides (Lysle DT et al., 1993).

La Naltrexona actúa mediante la vía OGF-OGFr (del inglés: Opioid Growth Factor-Opioid Growth Factor receptor), actuando como inhibidor (dosis bajas) o acelerador (dosis altas) de la diferenciación celular. No actúa sobre la muerte celular (Donahue R N et al., 2011; Meng J, et al., 2013).

También regula el número, actividad, proporción y función del LT; función y diferenciación de macrófagos; fenotipo y maduración funcional de células dendríticas en medula ósea; y se ha visto también que puede regular la expresión de citoquinas: puede aumentar la producción del IL-4 e IL-10, y reducir la de IL-6, IL-12, IL-17 e IFN- γ (Xu N, et al., 2020).

Se está empleando así en varias enfermedades con dolor e inflamación crónicas incluyendo: enfermedad de Crohn, fibromialgia, esclerosis múltiple.

Antagonistas de IL-1 y TNF- α :

Como hemos visto son 2 de las principales citoquinas relacionadas con la inflamación sinovial. Por ello se empezaron a ensayar como dianas terapéuticas.

La acción de IL-1 se ha intentado inhibir de varias formas sin conseguir claros efectos positivos: anticuerpos específicos, el bloqueo de ICE y antagonistas de receptores de IL-1 β .

Los medicamentos anti-TNF- α se están empleando con éxito en el tratamiento de la artritis reumatoide, pero en cambio no han conseguido unos claros efectos terapéuticos en la artrosis.

En esta línea varios estudios al respecto coinciden en considerar la inflamación de la membrana sinovial como una futura diana a estudiar, de cara al tratamiento de la sintomatología de la artrosis. Dentro de esta como objetivo, destacan los TLRs, sus agonistas y vías de activación como potenciales dianas terapéuticas a estudio.

Se han identificado también dianas genéticas. Destaca el SNP rs143383 que lleva a niveles reducidos del factor de crecimiento y diferenciación 5 (GDF5: Growth and differentiation factor 5). Actúa principalmente sobre el cartílago, aunque se ha visto que su papel es más complejo. Su déficit lleva al desarrollo de artrosis y es uno de los pocos que los metaanálisis y estudios en diferentes razas han confirmado su papel. Además, esta alteración concreta, es una metilación del ADN, y por lo tanto una alteración epigenética. Este tipo de alteraciones

genéticas se han identificado también como potenciales herramientas terapéuticas.

En la línea de estudios genéticos se ha identificado una variante del gen de la histona metiltransferasa (HMT) DOT1 (Disrupter Of Telomeric Silencing) (DOT1L), que se ha visto asociado a un aumento de la interlinea en la cadera y por lo tanto, factor protector de artrosis.

El resveratrol, un polifenol, aun solamente en modelos experimentales in vivo de artrosis, ha demostrado reducir procesos inflamatorios y de daño condral principalmente de la vía NF- κ B y favorecer la condrogénesis. Cambios moleculares que serían protectores frente a la artrosis, de interés, sobre todo orientados al tratamiento del paciente con artrosis con alteraciones metabólicas (Xu X et al., 2019; Zhang G et al., 2020; Yi H et al., 2020).

2.5 BIOMARCADORES DE ARTROSIS

2.5.1 DEFINICIÓN:

Un biomarcador (marcador molecular, marcador biológico, molécula distintiva) es una característica que se mide como indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o como respuesta a una determinada intervención o exposición. Pueden ser derivados de características histológicas, radiográficas o fisiológicas.

Se han definido varios subtipos de biomarcadores según su aplicación: Los biomarcadores diagnósticos que no solo detectan o confirman la presencia de enfermedad actual sino que también sirven para redefinir la clasificación de una enfermedad; los biomarcadores de monitorización que permiten determinar el estado de una enfermedad mediante su medición seriada; los biomarcadores predictivos que definen la probabilidad de presentar un efecto favorable o desfavorable tras una determinada exposición; los biomarcadores pronósticos que identifican la probabilidad de recurrencia, progresión o curación de la enfermedad; los biomarcadores de seguridad que miden la presencia de toxicidad o su magnitud como efecto adverso y los biomarcadores de riesgo que determinan el potencial riesgo de desarrollar la enfermedad (Califf RM, 2018).

Cabe diferenciar marcador pronóstico y marcador predictivo. El marcador pronóstico se refiere a la evolución de la enfermedad, y el predictivo a como va a ser la respuesta del paciente a un tratamiento, por ejemplo.

2.5.2 MARCADOR IDEAL:

Un marcador ideal debe ser específico, sensible, predictivo, rápido y económico, estable in vivo e in vitro, no invasivo, y que tenga suficiente relevancia preclínica y clínica como para modificar las decisiones relativas al proceso patológico en que se aplica

En una enfermedad, los marcadores facilitan el diagnóstico y control evolutivo de la misma. Además, es habitual que permita establecer criterios objetivos universales entre los profesionales, y suelen formar parte de las clasificaciones. Establecer marcadores en

la artrosis es esencial y base desde un diagnóstico temprano (algo que no se diagnostica fácilmente se puede tratar) hasta el control de la eficacia de tratamientos. Todo ello con el objetivo final, que no es otro que ahondar en el conocimiento de la artrosis para establecer tratamientos que prolonguen los años de calidad de vida del paciente.

El desarrollo de biomarcadores va dado de la mano con el desarrollo de medicamentos. Como hemos visto anteriormente, las ómicas son la base para la identificación de dianas terapéuticas, y también lo son para la identificación de nuevas moléculas en la articulación con potencial de ser biomarcadores. Probablemente el análisis metabólico molecular en líquido sinovial sea el método de análisis de la artrosis o patología articular, que mejor refleje lo que sucede en esa articulación. Tiene menor influencia que los análisis en orina o sangre, muestra esa articulación en concreta y en el momento concreto de la toma de la muestra; podríamos considerarlo un marcador ideal teóricamente (Adams SB Jr et al., 2013).

Además de la importancia a nivel molecular, con la identificación de todos los actores articulares en la artrosis, los biomarcadores son esenciales para el diagnóstico de las enfermedades y para el desarrollo de medicamentos, al permitir servir como parámetro objetivo que permite validar la mejoría o no con el tratamiento. Se evitaría así estar ligado a parámetros clínicos más subjetivos, y que con la heterogeneidad de la artrosis se vuelve aún más complejo. La heterogeneidad en la artrosis no lo es solo en el aspecto de la sintomatología y progresión. La etiología y los factores de riesgo o favorecedores de su desarrollo también lo pueden ser, y como es de esperar, el perfil molecular también lo será. Es aquí donde entrará en juego el desarrollo de fenotipos de forma conjunta con la de los marcadores. (Thyssen S et al., 2015).

El perfil molecular cambia de una rodilla sana o con artrosis incipiente a una artrosis avanzada, y es este perfil el que nos interesa identificar. Por ejemplo, se ha identificado que la expresión genética de los osteoblastos en hueso subcondral esclerótico de artrosis muestra niveles elevados de COL1A1 y 2, MMP13, VEGF, osteopontina, osteocalcina y fosfatasa alcalina, que son identificativos de los procesos que se están dando en cada momento evolutivo de la artrosis, como hemos podido ver en el apartado de patogenia (Sanchez C et al, 2008).

Si bien clásicamente la idea que tenemos de un biomarcador es de una molécula, que se identifica y se cuantifica, existen marcadores de otro tipo, por ejemplo, radiológicos. Como hemos visto la radiografía simple sigue siendo el gold estándar para el diagnóstico de la artrosis. Aun así, es una escala que se ve influida por el observador y en la que se observan diferencias entre observadores (κ en torno a 0.6) (Culvenor AG et al., 2005).

La RMN se está desarrollando como marcador en la artrosis. Las lesiones en médula ósea visibles en RMN, con frecuencia aparecen antes de que exista una degeneración articular. Aun no existe por lo general un daño tan extenso e irreversible en el cartílago. Esto permitiría, por tanto, un diagnóstico más temprano. Unido a un tratamiento capaz de frenar el avance de la artrosis, podría evitar o al menos enlentecer la progresión a estadios más avanzados de artrosis y su consecuente morbilidad e incapacidad.

Las lesiones en medula ósea se han relacionado con el desarrollo posterior de artrosis y por lo tanto serviría como marcador temprano.

Varios grupos de investigación han desarrollado protocolos de puntuación para la evaluación mediante RMN de lesiones tempranas, como las citadas lesiones de medula ósea o lesiones meniscales y otras puntuaciones. Estos buscan servir como marcadores y predecir el desarrollo futuro de artrosis mediante la correlación de la puntuación en la escala con la progresión en el tiempo de las lesiones hacia la artrosis. Entre otros destacan el BLOCK y el WORMS. Con aplicación en el diagnóstico, control evolutivo y en estudios, aunque con una correlación contradictoria en algunas revisiones, es un marcador no invasivo que con su mejora puede ser de gran utilidad (Felson DT et al., 2010; Hafezi-Nejad N et al., 2015).

2.5.3 MARCADORES MOLECULARES

En un estudio reciente en el que se han revisado los biomarcadores en la artrosis, se han identificado 201 en total en los diferentes estudios publicados hasta la fecha, siendo los más prometedores la IL-6, IL-8, leptina, proporción MMP-1/MMP-3, TIMP-1, C4S, TNF- α y VEGF. EN su mayor parte se han estudiado para emplearlos en el diagnóstico o en el análisis del impacto de la artrosis en la salud (Boffa A et al., 2021).

Destacar, por ejemplo, que IL-6, TNF- α y niveles de Leptina: la medición de los niveles de los 3 en suero, se ha propuesto como marcador diagnóstico de artrosis postraumáticas con una capacidad similar a las radiografías (Wang P ,2020).

Además, COMP se ha venido estableciendo desde hace más de 30 años como marcador en LS en la artrosis, siendo actualmente uno de los de mayor importancia en la artrosis y con el que se ha establecido relación con la actividad de degradación de cartílago. Y es que se ha observado aumentada su producción en cartílago, sinovial, hoffa y meniscos de rodillas artrósicas (Saxne T et al., 1997).

Los niveles de APB en líquido sinovial ya se han propuesto como marcador pronóstico, y como marcador diagnóstico en membrana sinovial y la fracción soluble de polimorfonucleares, ambos en AR. En la fracción soluble y la unida a membrana de membrana sinovial la actividad se vio aumentada, y en la fracción soluble de PMN disminuida (Mendes MT et al., 2011).

En otro estudio se menciona el potencial como marcador pronóstico de varias aminopeptidasas tras estudiarse su actividad en líquido sinovial en relación con precisar cirugía protésica. Observan niveles aumentados de APB, PEP, ASP, GLU y PGAG (Pyroglutamyl Aminopeptidase), no observando diferencia en APN y PSA. Establecen una correlación positiva entre los niveles de PEP y GLU, y como protector para PSA, de cara a precisar cirugía protésica de rodilla (Seco-Calvo J et al., 2020).

Receptores opioides (OR): Basado en la relación que hemos visto de la sintomatología de AR y artrosis con los receptores opioides, estos se han propuesto como marcadores del dolor crónico. En los estudios centrados en la artrosis la mayor asociación se ha visto

en la disminución de los MOR en LB de sangre periférica en relación al aumento del dolor crónico (también en dolor crónico en fibromialgia) (Raffaeli W et al. ,2020). Los OR también se podrían emplear para predecir como se van a comportar los pacientes frente a un tratamiento con opioides para prevenir el establecimiento del dolor tras una cirugía de reemplazo articular (Malafoglia V et al., 2017).

3 PEPTIDASAS

En los numerosos y variados procesos fisiológicos y patológicos que se dan en el organismo están implicadas multitud de moléculas, en una proporción alta, péptidos. Una forma de estudiar los procesos, funciones, vías moleculares, etc., es el estudio de las enzimas que actúan sobre estos péptidos, y que en general, reciben el nombre de peptidasas. Por lo general, un péptido puede ser degradado por varias enzimas y una peptidasa hidrolizar varios péptidos, dentro de cierta especificidad de sustrato.

Ya se ha visto que las peptidasas tienen un papel fundamental en numerosos procesos fisiológicos en varios sistemas del organismo, y son responsables y/o diana en diferentes patologías. Si bien han sido más estudiadas en otros tejidos y órganos, el interés por el conocimiento de su papel en la artrosis ha ido en aumento sobre todo en los últimos 10 años, y así lo refleja el número de estudios publicados, la mayor parte de ciencia base. Aun así, se sabe relativamente poco sobre ellas a nivel articular, algunas incluso sin identificar, y se les ha prestado relativa poca atención para el potencial que presentan. En otros tejidos ya se proponen como dianas terapéuticas y se emplean como marcadores tumorales.

Conocer los niveles de estas peptidasas en el líquido sinovial de pacientes con artrosis de rodilla y como se modifican con el tratamiento, nos puede permitir identificar la participación de estas moléculas en su patofisiología. Esta modificación nos puede ayudar a comprender su papel, establecer moléculas diagnósticas y marcadores de tratamiento. Así mismo podría permitir establecer y correlacionar la eficacia terapéutica del tratamiento con PRGF a nivel molecular, clínico, funcional y radiológico.

3.1 CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA DE LAS PEPTIDASAS.

Su clasificación y nomenclatura no es una tarea sencilla, ya que según se ha ido avanzando en su conocimiento, la visión, incluso el número de ellas ha variado. Son un grupo muy heterogéneo de proteínas y uno de los grupos funcionales más amplios. Se pueden encontrar unidas a membrana y de forma soluble. Presentan tamaños entre 25 y 300 kDa (Taylor A, 1993a).

Peptidasa es el término recomendado por la Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) para referirse a cualquier proteína que hidrolice uniones peptídicas. Es el término científico más correcto para referirse a las enzimas proteolíticas coloquialmente conocidas como proteasas o proteinasas.

Según la situación del enlace que hidrolizan, las peptidasas se dividen en exopeptidasas y endopeptidasas.

Las exopeptidasas actúan sobre un extremo de la cadena polipeptídica, pudiendo actuar sobre el último aminoácido, los dos o los tres últimos, liberando así un aminoácido o pequeños péptidos. Según si actúan sobre el extremo amino terminal o carboxilo terminal, las podemos dividir en aminopeptidasas, dipeptidil-peptidasas o tripeptidil-

peptidasas respectivamente según la posición, o carboxipeptidasas o peptidil-dipeptidasas. Las dipeptidasas son aquellas que hidrolizan el enlace en un dipéptido. Las omega peptidasas son aquellas que o bien no precisan de un extremo amino o carboxilo para actuar, o que hidrolizan residuos terminales que son sustituidos, ciclados o unidos por enlaces isopeptídicos (uniones peptídicas formadas por grupos diferentes al α -amino y α -carboxilo).

Las endopeptidasas no actúan en los extremos, sino dentro de la cadena.

Ha habido varias clasificaciones a lo largo de los años, y que actualmente se tienen en cuenta en mayor o menor medida, según la fuente, o al menos a la hora de describir una peptidasa.

En 1960 (Hartley BS, 1960) se propuso agruparlas según la naturaleza química de su sitio catalítico. Desde este punto de vista se han descrito las cisteinil-endopeptidasas, seril-endopeptidasas, aspartil-endopeptidasas, treonil-endopeptidasas y del tipo ion metálico, las metalopeptidasas. También existe un grupo de las que aún no han sido clasificadas.

A finales de los años 60 (Marks N et al., 1968 y 1975) se propuso clasificar las peptidasas en base a su afinidad por diferentes sustratos cromógenos, siendo estos ácidos, básicos o neutros; las peptidasas se dividirían así en ácidas, básicas y neutras.

También se las ha agrupado según el péptido o grupo de péptidos sobre los que actúan, por ejemplo: peptidasas degradadoras de encefalinas, de hormona liberadora de tirotropina (TRH) o de angiotensinas.

Hay otras clasificaciones como la empleada en la base de datos MEROPS (nombre que viene de la colorida ave conocida como abejaruco, pero de término científico Merops), que es la clásica y con un uso extendido. Las clasifica según su secuencia, estructura y el tipo catalítico en base al modelo propuesto en 1993 y que se ha ido enriqueciendo con los nuevos conocimientos, hasta llegar a la clasificación empleada hoy en día en MEROPS (Rawlings ND y Barrett AJ, 1993). La base de datos toma esta clasificación como referencia y es una referencia para la consulta online de información sobre peptidasas, conteniendo información sobre más de 4400.

Primero se divide a las peptidasas según su tipo catalítico, y se les asigna una letra mayúscula: A (aspártico), C (cisteínico), G (glutámico), M (metalo), N (asparaginico), S (serinico), T (treoninico) y U (sin clasificar). La letra P se utiliza para identificar 2 clanes mixtos que tienen peptidasas con distintos tipos catalíticos (C, S y T).

A partir de ahí se establecen 3 niveles: Clan, Familia y Peptidasa.

Los clanes agrupan familias que tienen un origen común, y suelen tener una estructura tridimensional similar o centro activos con similitudes. El clan se asigna con una segunda letra mayúscula, por ejemplo MA. La asignación de letras es arbitraria, y si un clan desaparece o se reorganiza, no se utiliza esa letra de nuevo.

Las familias agrupan peptidasas que presentan homología en su cadena de aminoácidos. Se asigna mediante un número secuencial, que tampoco se reutiliza en caso de desaparecer una familia.

Por último, la peptidasa, a la que se le asigna un número, quedando su nomenclatura separada por un punto. 3 caracteres que determinan la familia y, separados por un punto, los otros 3 caracteres propios de la peptidasa. Por ejemplo, a la aminopeptidasa N se le identifica como M01.001. Una se distingue de otra por su estructura de aminoácidos, su actividad o función, o por su origen genético.

El mayor clan de las metalopeptidasas es el clan MA, que a su vez se puede dividir en el subclan MA (E) y el MA (M). Se han descrito 47 familias dentro de este clan. Todas estas enzimas tienen en su estructura un ion Zn^{2+} , que está unido al resto de la proteína por medio de dos residuos de histidina. Dentro del clan hay endopeptidasas (M4, M10, M12) y exopeptidasas: aminopeptidasas (M1, M2, M4, M5, M9, M13, M30, M36, M48 y M61), peptidil-dipeptidasas (M2), carboxipeptidasas (M2, M32) y oligopeptidasas (M3, M13).

Una de las familias más estudiadas es la M1, que incluye 5 de las 11 aminopeptidasas de esta tesis.

La clasificación aceptada actualmente es la que establece la NC-IUBMB. Aun se encabeza con las letras EC (Enzyme Commission), seguido de un índice numérico. Por ejemplo, la Aminopeptidasa N se identifica como EC 3.4.11.2.

En este sistema todas las enzimas son divididas en 6 clases que corresponde al primer número: oxidorreductasas (1), transferasas (2), hidrolasas (3), liasas (4), isomerasas (5) y ligasas (6).

Las peptidasas forman parte de la clase 3, subclase 4: EC 3.4.-.-. Existen 13 sub-subclases: aminopeptidasas (11), dipeptidasas (13), di y tripeptidil-peptidasas (14), peptidil-dipeptidasas (1%), carboxipeptidasas serinicas (16), metalocarboxipeptidasas (17), carboxipeptidasas cisteinicas (18), omega peptidasas (19), endopeptidasas serinicas (21), endopeptidasas cisteinicas (22), endopeptidasas asparticas (23), metaloendopeptidasas (24), endopeptidasas treoninicas (35) y endopeptidasas de tipo desconocido (99).

Como vemos, las aminopeptidasas se engloban dentro del grupo EC 3.4.11.-.

Esta clasificación tiene un valor más de nomenclatura, que de clasificación en sí. Aun hoy en día, la terminología crea confusión en muchas ocasiones, ya que cada peptidasa suele tener varios nombres, y según la fuente puede que se refieran a ella con un término u otro. Esta nomenclatura asigna un código inequívoco a cada peptidasa. Esto viene reflejado más adelante al hablar sobre las peptidasas de este trabajo.

3.2 FUNCIONES DE LAS PEPTIDASAS.

Las aminopeptidasas están distribuidas por todo el organismo. Su localización y tejido también pueden condicionar su función. Se pueden localizar integradas en la membrana celular, en el citoplasma, en orgánulos celulares, extracelulares. Según el tejido o el tipo celular sobre/en el que actúan, su función puede ser diferente. También están condicionadas por el procesamiento postranscripcional.

La regulación peptídica es un proceso complejo y flexible, muy amplio, aún desconocido en su totalidad. Esencial para numerosas funciones fisiológicas y la comunicación intercelular, que a su vez es imprescindible para la coordinación en el funcionamiento de un organismo.

La comunicación se realiza principalmente mediante 3 sistemas: los mediadores celulares, el sistema hormonal y el sistema nervioso. Los péptidos bioactivos son, habitualmente secuencias cortas de aminoácidos, las moléculas empleadas por estos sistemas para comunicarse: mensajeros peptídicos.

La función más conocida de las peptidasas es esta actuación sobre péptidos bioactivos. Estos cuando no se encuentran de forma libre, sino en péptidos más grandes, precisan de su “liberación” para poder llevar a cabo su función. Las peptidasas, actúan mediante su actividad hidrolítica y producen formas activas e inactivas, modulando así las funciones de los mensajeros péptidos (Antczak C et al., 2001).

Si bien cada una de ellas suele tener un mecanismo proteolítico concreto, no actúan en solitario si no que forman parte de procesos proteolíticos y vías más amplias y complejas, con sus mecanismos de regulación que pueden regular o ser reguladas por otros péptidos. A esto se le conoce como sistema peptídico, que engloba: biopéptidos, peptidasas (enzimas) y receptores.

Desde un punto de vista clásico esta función de regulación de péptidos bioactivos, mediante su hidrólisis, se realizaba desde la membrana celular. Las peptidasas con el centro activo hacia el exterior ejercían su papel extracelular (Taylor A, 1993b). Se ha visto que las peptidasas unidas a membrana y las intracelulares pueden ser secretadas de forma soluble y ejercer su función. Si bien descritas las formas solubles ya en los 80 (Jung K et al., 1984), no se ha desarrollado el estudio de su función desde líquidos extracelulares hasta los últimos 20 años, creciendo su interés hasta la actualidad. (Du Y et al., 2019). De hecho, este estudio describe la actividad de la fracción soluble de varias aminopeptidasas en líquido sinovial.

Desde este punto de vista, aunque la peptidasa con esta función enzimática no sea una molécula efectora final, no deja de ser un péptido que puede ser secretado por una célula y es un mensajero en si, al activar o inactivar otros péptidos. Tienen funciones endocrinas, paracrinas y autocrinas. Además, la fracción soluble citoplasmática puede actuar sobre péptidos intracelulares, por lo que se le añade una función intracrina (Re RN, 2003; Descamps D et al., 2020).

Son capaces de procesar antígenos que son presentados a células del sistema inmune.

También participan en la degradación de la matriz extracelular, teniendo un papel así en la migración celular, metástasis, reparación de tejidos, inflamación.

Cuando pensamos en las funciones de una peptidasa, lo primero que nos viene a la cabeza es su actividad peptidásica y el papel que desempeña con ella. Pero su actividad en el organismo va más allá. Lo descrito hasta ahora es principalmente ese papel como enzima, pero además cada vez se van conociendo más funciones no enzimáticas (Kramer W et al., 2005;).

Uno de los más conocidos es que pueden ser receptores, incluyendo la transducción de señales al interior celular, regulación del tráfico vesicular intracelular e interacción con el citoesqueleto. Pueden servir de moléculas de adhesión y quimiotaxis, y regular el tráfico celular (Morgan R et al., 2015; Lu C et al., 2020; Descamps D et al., 2020).

Donde mejor vamos a ver, como ejemplos y en detalle, las funciones de las peptidasas y el alcance que llegan a tener, es en la explicación de cada peptidasa analizada en este estudio.

3.3 LAS PEPTIDASAS EN LA FISIOLOGÍA Y EN LA PATOLOGÍA.

Se ha visto que los niveles de actividad de varias de estas aminopeptidasas condicionan sus papeles en la fisiopatología, también según la función que ejercen donde se encuentran, y la concentración de sus sustratos. En muchas ocasiones sobre el sustrato puede actuar más de una enzima. En presencia de sustrato y peptidasa, la concentración del primero se modifica según el segundo actúa.

Participan en varias funciones a nivel celular: diferenciación, crecimiento, recambio proteico, apoptosis, migración y adhesión, nutrición, regulación endocrina, autocrina, paracrina e intracrina; fertilización e implantación del cigoto.

Así están implicadas en numerosos y diferentes procesos esenciales para el correcto funcionamiento del organismo. Se ha identificado que regulan vías metabólicas del sistema renina-angiotensina (SRA), de principal importancia en el funcionamiento de la función renal y el sistema cardiovascular y en el sistema nervioso entre otros. (Capettini LS et al., 2012; Garrido-Gil P et al., 2017). En este último, las peptidasas participan en funciones como la memoria, el comportamiento y la nocicepción (Albiston AL et al., 2001; Wright JW y Harding JW, 2011).

Las peptidasas también participan en el procesamiento de antígenos, procesamiento de neuropéptidos y hormonal, embarazo y reproducción, nutrición, angiogénesis, regulación del envejecimiento de tejidos, inflamación, infecciones virales, fúngicas y de parásitos. (Mecca AP et al., 2011 ; Weimershaus M et al., 2018; Lu C et al., 2020).

Por lo general las peptidasas ven modificada su función o funciones de forma secundaria a alguna alteración previa en el ambiente donde actúan. También pueden hacer evolucionar o iniciar procesos patológicos. Esto lo que genera es un desequilibrio en el sistema en que participan (Albiston AL et al., 2001; Parker BL et al., 2016).

Se ha descrito su alteración en patologías renales, cardiovasculares, respiratorias, endocrinas, de alteración de la memoria en enfermedades neurodegenerativas, cambios del estado de ánimo, y en procesos tumorales. De hecho, algunas aminopeptidasas se han propuesto como marcadores tumorales (Sanz B et al., 2015).

La bestatina está considerada como el inhibidor general de las aminopeptidasas, aunque existen numerosos inhibidores con mayor o menor especificidad. Tienen gran importancia para el estudio de las propias peptidasas (Mucha A et al., 2010). Algunos inhibidores de aminopeptidasas se llevan años utilizando como tratamiento farmacológico. Los más conocidos los Inhibidores de la Enzima Convertidora de la Angiotensina (IECA), por ejemplo, el enalapril y captopril, empleados principalmente para tratar la hipertensión y la insuficiencia cardiaca (Gavras H, 1988), también han demostrado efectos protectores en la artrosis a nivel experimental animal estos y otros fármacos que actúan a nivel del SRA, como reflejamos en el siguiente apartado (Tang Y et al., 2015). Otro grupo de inhibidores empleados son las gliptinas (sitagliptina, vildagliptina), que son inhibidores de la Dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) y se usan en el tratamiento de la diabetes tipo II.

3.3.1 PERFILES PEPTÍDICOS.

El presente estudio incluye peptidasas que forman parte de la regulación del sistema opioide y del SRA periférico y local. Estos sistemas merecen un apartado en el que ampliar información sobre las funciones de diferentes de sus componentes en el normal funcionamiento y las implicaciones en procesos patológicos. Son unos sistemas muy amplios y complejos, por lo que describimos en dos apartados la parte que puede tener más interés, para tratar de comprender la posible participación de las peptidasas estudiadas, a nivel articular.

3.3.1.1 Sistema Renina-Angiotensina:

Desde hace años es bien conocida la existencia de un SRA en el cerebro que es totalmente independiente del SRA periférico (de Gandarias JM et al., 1984), lo que hace pensar que en la articulación también pueda existir un SRA local. De hecho, son ya varios los tejidos y células que poseen SRA intrínsecos que actúan localmente a través de mecanismos tanto autocrinos como paracrinos, y con funciones que van más allá de la clásica atribuida de regulación de presión arterial (Gianzo M y Subirán N, 2020). Algunos de estos tejidos son los riñones, el cerebro, el sistema cardiovascular, la glándula pituitaria, el tejido adiposo, la piel, la glándula suprarrenal y los sistemas reproductivos femenino y masculino (Re RN, 2004); estos SRA desempeñan un papel importante en muchos procesos fisiológicos, como el crecimiento celular, la formación de la matriz extracelular, la proliferación vascular, el endotelio función y apoptosis (George AJ et al., 2010; Fyhrquist F y Saijonmaa O, 2008). Además, los SRA locales también pueden interactuar con otras vías de señalización, incluidas las que involucran taquiquininas, encefalinas, óxido nítrico, prostaglandinas o fosfatasa celulares (Paul M et al. 2006; Fyhrquist F y Saijonmaa O, 2008).

Al inicio de este proyecto, para nuestro conocimiento solo había publicado un artículo que proponía la existencia de un SRA local a nivel articular en el año 2005. Y para el análisis del SRA, median la actividad de una aminopeptidasa, la ACE, y renina en plasma y líquido sinovial, en ese caso de pacientes con AR y OA (Cobankara V et al., 2005). Después, se han publicado artículos en modelos animales que han demostrado la presencia de componentes del SRA en la articulación (Tsukamoto I et al., 2014; Yamagishi K et al., 2018) o de su papel en la articulación al verse una mejora en la artrosis con tratamientos para la tensión como los IECA o inhibidores de renina (Tang Y et al., 2015; Yan K et al., 2020).

Esto ha ido aumentando el peso de la existencia de un SRA local, de su posible papel en la patogenia de la artrosis, y en la influencia de la patología vascular en la artrosis. En los últimos 2-3 años, con esta base de artículos parece que se retoma la proposición de un SRA local, su papel e importancia, si bien con más peso en artritis que artrosis (Ching K et al., 2021)

Al SRA local se le está atribuyendo un papel como modulador del estado oxidativo, de la inflamación y el papel de células como neutrófilos o macrófagos. Estaría implicado en el equilibrio antioxidante/pro-oxidante y en las vías de producción de citoquinas, quimiocinas y de factores de transcripción (Capettini LS et al., 2012; Chang Y y Wei W, 2015), además de la regulación de la angiogénesis (Heffelfinger SC, 2007).

También es importante que el SRA local podría verse influido por estímulos mecánicos. Además, existen puntos de actuación/regulación del SRA sobre el sistema Wnt- β -catenina (Cuevas CA et al., 2015), y del sistema Wnt- β -catenina sobre el SRA, aun sin estudiarse a nivel articular (Zhou L et al., 2015).

Los principales péptidos activos de SRA son: angiotensina II (Ang II o Ang II (1-8)), Angiotensina (1-7) y Angiotensina IV (Ang IV). La angiotensina II es convertida a angiotensina (1-7) por la ACE2, o primero a Ang III y luego a Ang IV (Wright JW y Harding JW, 2011). La angiotensina (1-7) se une a receptores MAS. Se ha visto que los efectos que desencadena su interacción parecen depender del tipo celular. Podría tener puntos de unión con estímulos mecánicos. El esquema general clásico lo podemos resumir así:

La activación del sistema se produce cuando los riñones liberan renina al torrente sanguíneo en respuesta a la disminución de la presión arterial, la activación del sistema nervioso simpático y/o la depleción de sodio (Paul M et al., 2006). Esta renina actúa sobre el angiotensinógeno (AGT) de origen hepático, formando angiotensina I (Ang I). El péptido inactivo Ang I es hidrolizado por la enzima convertidora de angiotensina (ECA), dando lugar al péptido con mayor actividad en este sistema, Ang II, que finalmente ejerce su acción al interactuar con los receptores de Ang II tipo 1 y 2 (AT1R y AT2R) (Eje ACE/Ang II/AT1R) (Paul M et al., 2006; De Gasparo M et al., 2000).

La señalización de Ang II produce varias respuestas, como vasoconstricción de la circulación periférica, aumento de la actividad del sistema simpático, liberación de vasopresina, aumento del cronotropismo cardíaco y liberación de aldosterona de la corteza suprarrenal, que puede restaurar el volumen y la presión sanguíneos.

A su vez, la propia Ang II inhibe la síntesis y liberación de renina, regulando la activación del SRA (Paul M et al. 2006). Este concepto tradicional del SRA ha sido revisado debido al descubrimiento de nuevos miembros de la familia SRA, lo que ha proporcionado evidencia de la existencia de nuevas vías no canónicas de este sistema (Figura 25).

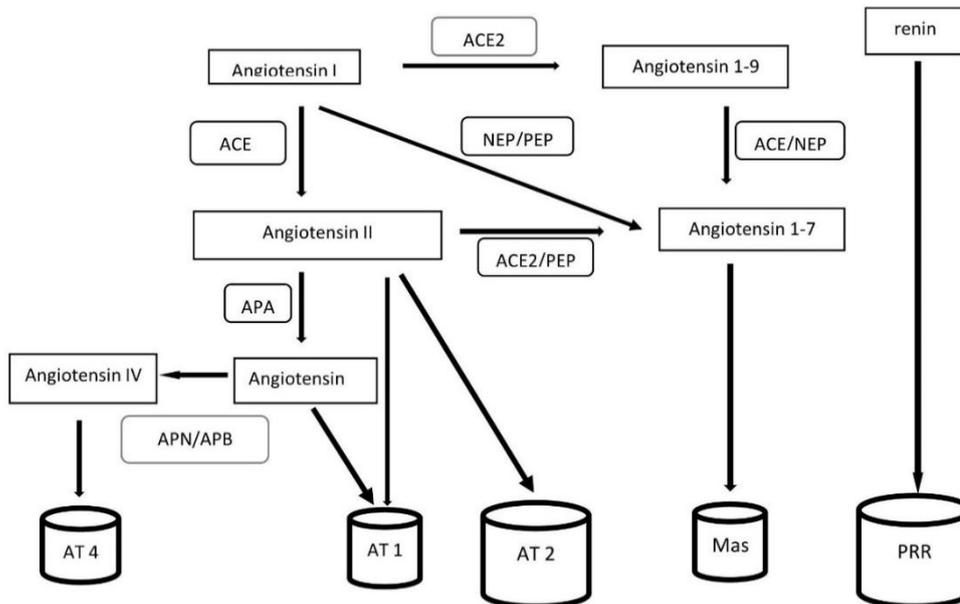


Figura 25.- SRA simplificado con sus enzimas y receptores.

Principalmente, el campo fue redefinido por el descubrimiento de ACE2, un homólogo de ACE que escinde Ang II para generar angiotensina 1-7 (Ang 1-7), que activa el receptor Mas (MasR), con efectos inhibitorios sobre la inflamación y la fibrogénesis (Eje ACE2/Ang 1-7/MAS) (Simões e Silva AC et al., 2013), y reducción de neutrófilos en el lugar de la inflamación e inhibición de NF- κ B en la articulación (Barroso LC et al., 2017). Posteriormente, la lista de miembros de la vía se amplió cuando se observó otro fragmento de Ang II, Ang (3-8) (también llamado Ang IV); Ang IV (3-8) actúa sobre su propio receptor, la aminopeptidasa regulada por insulina (IRAP, también llamada AT4R) (George AJ et al., 2010). Se han descrito también otros péptidos, recogidos en la figura 26, que muestra su concentración en plasma (en rata) proporcional a los círculos, en el que destaca la concentración de Ang 2-10, solo tras la de Ang I y Ang III (Wysocki J et al., 2015). Por último, se describió el receptor de (pro) renina (PRR), sobre el que actúan directamente la prorenina y la renina (Nguyen G et al., 2002).

La aparición de todos estos nuevos componentes de SRA ha implicado que este sistema de respuesta implica una interacción compleja entre varios receptores de angiotensina y sus vías de señalización, así como una actividad de tipo receptor de las enzimas SRA que pueden promover vías enzimáticas intracelulares independientes de Ang II (George AJ et al., 2010).

AT1R es proinflamatorio y pro-oxidativo, ya que activa $\text{NF}\kappa\beta$ y el complejo oxidativo NADPH que lleva a la producción de ROS (Garrido-Gil P et al., 2017), y también MAPK y vía Wnt/ β -catenina entre otros (O'Rawe M et al., 2021), evidenciada la alteración de este último en tejido sinovial (Wang Y et al., 2018). Descrita su presencia en condrocitos humanos en 2012 (Kawakami Y et al., 2012).

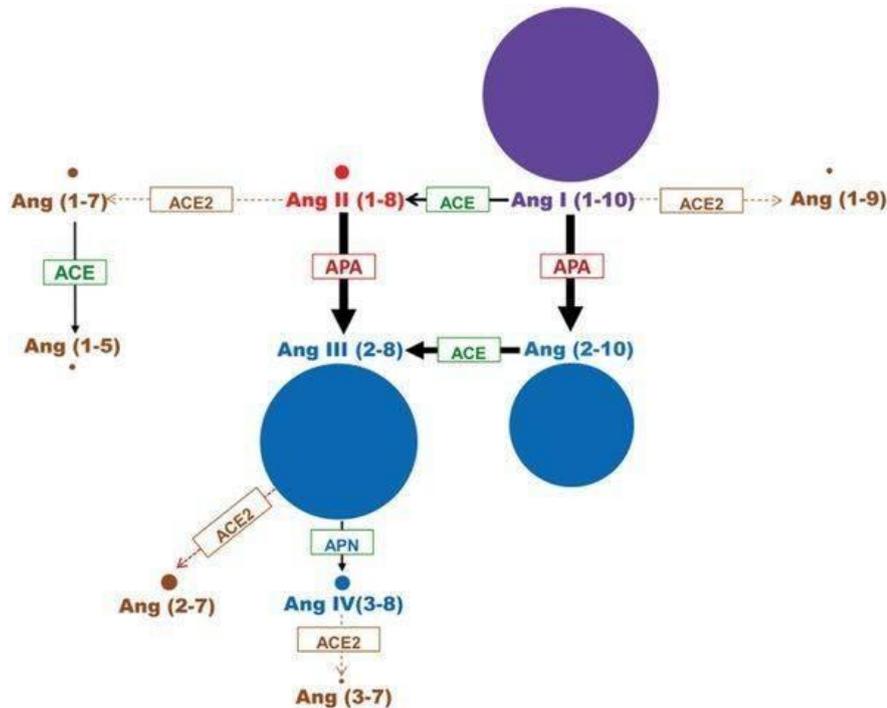


Figura 26.- Niveles de péptidos de angiotensina en plasma. El diámetro de los círculos refleja su concentración en plasma (Wysocki J, Ye M, Batlle D., 2015)

AT2R es vasodilatador, al aumentar el NO, bradiquinina y AMPc (Matavelli LC y Siragy HM, 2015). La activación de AT2R lleva al condrocito a un fenotipo hipertrófico y por su parte la activación de AT1R tiene el efecto opuesto e inhibe esa diferenciación (Tsukamoto I et al., 2013).

AT4R se ha relacionado con efectos positivos sobre la memoria. Al unirse la Ang IV se bloquearía la actividad peptidásica y no degradaría sus sustratos, por lo que estos prolongarían su efecto. Aunque en algún artículo se le ha atribuido un papel antiinflamatorio, se ha demostrado que al igual que AT1R, activa $\text{NF}\kappa\beta$ de forma independiente, por lo que es proinflamatorio (Esteban V et al., 2005).

Tanto la Ang IV al unirse al AT4R como la APN, tendrían ese papel modulador, ya que esta última transforma Ang III en Ang IV y además actúa como encefalinasa (Ramírez-Sánchez M et al., 2013).

Receptores MAS: el aumento de Ang (1-7)/ACE2 parece tener un efecto angiogénico mediado por eNOS (Jiang T et al., 2014). Se le han atribuido efectos antiinflamatorios y antioxidantes, reducción de los neutrófilos y desactivación de macrófagos, en cierta forma contrapuesto al eje ACE/Ang II/AT1R (Mecca AP et al., 2011; Barroso LC et al., 2017; Zaidan I et al. 2022) (Figura 27).

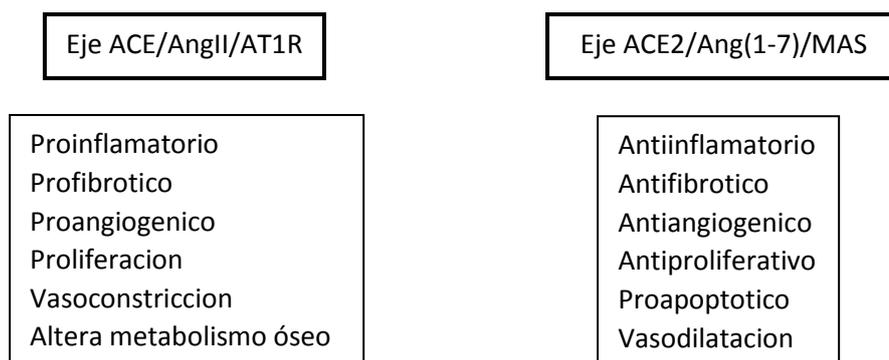


Figura 27.- Ejes del SRA y sus efectos.

Fyhrquist F y Saijonmaa O, 2008; George AJ et al, 2010; Romero CA et al., 2015; Wegman-Ostrosky T et al., 2015

Como hemos visto antes, una alteración del metabolismo lipídico, según lo estudiado, en concreto el 27-OH colesterol es capaz de alterar el equilibrio en el sistema SRA local entre la Ang III y la Ang IV, mediante el aumento de la APN principalmente y también la APA, en el cerebro, que llevan a su vez al aumento de IRAP: esto hará que disminuyan los sustratos que procesa la IRAP (Ismail MA et al., 2017).

El envejecimiento y la obesidad influyen sobre el SRA a nivel muscular (Lóry V et al., 2019). Esto nuevamente nos hace sospechar que su papel va más allá de las funciones y las localizaciones clásicas, y que el envejecimiento y la obesidad podrían alterar el SRA también a nivel articular.

3.3.1.2 Sistema opioide:

El opio es la resina obtenida de la adormidera o planta del opio (*Papaver Somniferum* L.) y la morfina de aquí extraída es la responsable de la mayoría de sus efectos bioactivos (de Lorenzo et al., 1999). En 1805, el químico alemán Friedrich Sertürner, consiguió morfina pura desde la adormidera y bautizó a esa sustancia con el nombre de morphium en homenaje al dios del sueño Morfeo. Posteriormente, en los años 70 del siglo pasado, se fueron descubriendo una serie de compuestos (y sus receptores), que constituían un sistema complejo que recibió el nombre de “sistema opioide endógeno”, inicialmente descrito en el sistema nervioso central. Describimos a continuación un resumen de estos componentes.

En 1973, se descubren en el sistema nervioso central de animales y en el hombre los tres receptores opioides farmacológicamente diferentes según la afinidad aparente que tiene cada receptor por los ligandos: receptor de opioides μ (μ = mu, por la morfina; MOR), receptor de opioides δ (δ = delta, por la palabra “deferens” ya que fue identificado en el conducto deferente del ratón; DOR) y receptor de opioides κ (κ = kappa, por la ketociclazocina; KOR) (Lord et al., 1977). Esos receptores metabotrópicos son monoméricos (en principio), están formados por 7 hélices α y se acoplan a proteínas Gi/o (Picatoste et al., 1996). Entre los diferentes receptores de opioides hay un 60-70% de homología (73-76% en los dominios transmembrana) (Minami y Satoh, 1995). En la

última década, se ha descrito el receptor que para la nociceptina y que guarda una gran homología con los receptores de opioides (la nociceptina es un péptido parecido a la dinorfina; NOR) (Wick et al., 1994).

En 1975 se identifican los ligandos endógenos para estos receptores (Colasanti, 1990; Lord et al., 1977), descubriendo la presencia en cerebro de una sustancia endógena que parecía comportarse como un ligando (agonista) de los receptores opioides. Están involucrados en el control de la homeostasia, la regulación del dolor, en la proliferación celular, en el control cardiovascular, el estrés y en la respuesta inmune; se ha demostrado que también participan en la adicción a varias drogas como la nicotina, alcohol y la cocaína e incluso a ciertas actividades, como el sexo. El sistema opioide endógeno se agrupa en tres familias: endorfinas, encefalinas y las dinorfinas. Al grupo de encefalinas, descubiertas en 1975 (Hugues et al., 1975; Cox et al., 1975), son a las que más nos referiremos. Son pentapéptidos que solo difieren en el aminoácido terminal: metionina-encefalina y leucina-encefalina. Cada familia deriva de un polipéptido precursor diferente y tiene una distribución anatómica característica. Estos precursores se designan con los nombres de proencefalina (proencefalina A), proopiomelanocortina (POMC) y prodinorfina (proencefalina B). La POMC se fracciona en el organismo mediante procesos enzimáticos y da origen a la hormona estimulante de los melanocitos (HEM), hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y beta-lipotropina (β -LPH). (Mario Villarejo-Díaz et al., 2000). El sistema opioide endógeno lo componen, por tanto, los receptores de opioides, sus ligandos endógenos (péptidos opioides endógenos: POE) y las moléculas que participan en la síntesis y la degradación de opioides.

La inactivación de los péptidos opioides se da mayoritariamente debido a la degradación metabólica llevada a cabo por peptidasas. Al romper los péptidos biológicamente activos, se generan fragmentos inactivos (Iversen LL, 1987). La degradación de las encefalinas (secuencia repetida en casi todos los POE) está catalizada por dos enzimas mayoritariamente: la alanina aminopeptidasa N (APN) y la PSA, que rompen el enlace Tyr-Gly de la encefalina (Waksman et al., 1985), y la endopeptidasa neutra (NEP), que rompe el enlace Gly-Phe (Relton et al., 1983). A través de esas degradaciones se regula la actividad de las encefalinas.

Los opioides endógenos, entre ellos las encefalinas, tienen un papel en la transmisión del dolor. Aminopeptidasas como la NEP, PSA y APN que degradan opioides endógenos, influyen en la percepción del dolor. Su inhibición o deficiencia en ratas ha sido ensayada y demuestra un efecto analgésico en ausencia de su actividad (Benoist JM et al, 2002).

Además, los opioides endógenos se han identificado en líquidos funcionales como el semen, con papel como reguladores de funciones reproductivas y la alteración de su actividad se ha asociado a alteraciones en la funcionalidad (fertilidad) de ese semen (Irazusta J et al., 2004).

3.4. PAPEL DE LAS PEPTIDASAS EN LA ARTROSIS DE RODILLA.

La primera referencia a aminopeptidasas en líquido sinovial que hemos encontrado es del año 1963 (Huettl S y Markovic O, 1963). En los años 70 hay contadas referencias a alguna aminopeptidasa en artritis inflamatorias (Vainio U, 1970). En los años 80 se analiza la ACE en líquido sinovial de artritis inflamatorias y se compara con la de pacientes con artrosis y sanos (Lowe JR et al., 1986).

En los años 90 aumenta el interés con el estudio de mas de una aminopeptidasa en liquido sinovial artrósico y de AR (Gotoh H et al., 1989). El mismo grupo aumenta a 3 las aminopeptidasas estudiadas, en este caso en membrana sinovial (Kamori M et al., 1991).

En 1991 se analiza la actividad de 5 aminopeptidasas en líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (Lees T et al., 1991).

Llama la atención el poco interés que han recibido las aminopeptidasas en la artrosis desde entonces. Si hacemos una búsqueda en Pubmed con los términos “osteoarthritis y aminopeptidase” desde el año 1994, nos devuelve 12 artículos y sin límite de tiempo, 20.

Existen numerosos péptidos reguladores que se encargan de mantener el correcto funcionamiento fisiológico de la articulación. Su normal funcionamiento depende principalmente de la concentración a la que se encuentran y su disponibilidad frente a sus receptores, sustratos o lugar de actuación. Su alteración en procesos como la inflamación puede llevar a la rotura de la homeostasis. Las peptidasas juegan un papel central en la regulación de los péptidos reguladores ya que participan en su activación, degradación, papel sobre receptores...

Como hemos visto en el apartado previo, son las proteínas que regulan péptidos reguladores, en este caso, de la fisiología de la articulación. Podemos ver, por tanto, que las peptidasas parecen ser eje central de, al menos, una parte importante de la fisiopatología articular.

La celularidad aumentada observada en la inflamación sinovial también lleva consigo un aumento en la concentración de algunas peptidasas (Walsh DA et al., 1993).

En el siguiente apartado vamos a profundizar más sobre el papel de algunas de ellas, lo que nos va a permitir ver hasta donde alcanza el papel de las peptidasas en la artrosis.

3.5. PEPTIDASAS ANALIZADAS EN ESTE TRABAJO.

A continuación, se recoge un resumen sobre las 11 peptidasas estudiadas en este trabajo, sobre muestra de líquido sinovial.

En la Tabla 2 se pueden ver los abundantes sinónimos de cada una de ellas. Los nombres suelen venir motivados por la función o el tejido en que se han descrito, viéndose después que peptidasas descritas en diferentes células o localizaciones, son la misma. Esta variedad en la denominación puede llevar a confusiones en la literatura y entre profesionales. Un ejemplo claro en las aminopeptidasas lo encontramos al presentar la aminopeptidasa ácida como agente regulador de la actividad de la angiotensina II y en menor medida a la Asp-aminopeptidasa, implicada en ese mismo efecto. Recordemos que el aminoácido N-terminal de la Ang-II es un aspártico, pero se emplea el glutamato- β -naftilamida como fluorómetro medidor de la actividad del enzima.

Esta confusión viene en parte solventada por la clasificación NC-IUBMB, que identifica de forma única cada peptidasa, de ahí la importancia de recoger este identificador en los estudios. A pesar de ello, es una clasificación que es numérica y solo es de uso investigacional-literario y no es la primera opción al hablar de una peptidasa, a las que nos solemos referir por el nombre y no su nomenclatura. El estudio, aprendizaje y divulgación de los ya complejos procesos en los que se ven implicadas las peptidasas, vendría facilitado por un consenso en una terminología universal y única para cada aminopeptidasa.

Además de las clasificaciones más clásicas, las peptidasas recogidas en este trabajo, atendiendo al sistema en el que tienen una función principal, podemos dividir las en varias subfamilias:

1. Subfamilia de las peptidasas implicadas en la regulación y control del Sistema Renina Angiotensina:
Aminopeptidasa neutra (APN), cistil (o cistina)-aminopeptidasa (Cys-AP), aminopeptidasa básica (APB), aminopeptidasa ácida (o glutamil-aminopeptidasa (APA), aspartato aminopeptidasa (Asp-AP), enzima convertidor de angiotensina (ACE), enzima convertidor de angiotensina 2 (ACE2), prolil-endopeptidasa (PEP) y endopeptidasa neutra (NEP).
2. Subfamilia de las peptidasas implicadas en la regulación y control del sistema oxitocinérgico.
Cistil-Aminopeptidasa (Cys-AP) y prolil endopeptidasa (PEP).
3. Subfamilia de las peptidasas implicadas en la regulación y el control del sistema encefalinérgico.
Aminopeptidasa neutra (APN), aminopeptidasa sensible a puromicina (PSA), endopeptidasa neutra (NEP) y en menor medida glutamil aminopeptidasa (APA) y aminopeptidasa básica (APB).
4. Subfamilia de las peptidasas implicadas en la regulación y control de citoquinas y quimiocinas.
Dipeptidil peptidasa IV (DPPIV).

Tabla 2.- Peptidasas, clasificación, sinónimos y función.

PEPTIDASA	CLASIFICACIÓN (Nº EC)	SINÓNIMOS	FUNCIÓN
APN	3.4.11.2	Alanil-aminopeptidasa de membrana, CD13, Aminopeptidasa microsomal, Aminopeptidasa M, Aminopeptidasa N, Aminopeptidasa unida a partículas, Amino-oligopeptidasa, Alanina aminopeptidasa, Aminopeptidasa de membrana I, Pseudoleucina aminopeptidasa, Aminopeptidasa específica de alanina, Cisteinilglicina-dipeptidasa, Cisteinilglicinasa, L-Alanil-aminopeptidasa, Aminopeptidasa neutra	Angiogénesis. Regulación y receptor de varias citoquinas. Modula el desarrollo y función de numerosas células inmunes. Regulación tráfico celular. Promueve la fagocitosis. Papel proinflamatorio
Cys-AP (CYS) - IRAP	3.4.11.3	Cistil-aminopeptidasa, Oxitocinasa, IRAP, Cistina aminopeptidasa, L-Cistina Aminopeptidasa, Peptidasa de oxitocina, Vasopresinasasa, P-LAP	Regulador del tráfico intracelular. Regula respuesta inmune e inflamatoria. Degradación de hormonas Degradación de antígenos Receptor de Ang-IV Mantenimiento de la homeostasis
APB	3.4.11.6	Aminopeptidasa B, Aminopeptidasa básica, Arilamidasa II, Arginina aminopeptidasa, Arginil-aminopeptidasa, Arginina aminopeptidasa activada por Cl, Aminopeptidasa citosólica IV, L-arginina aminopeptidasa	Sistema renina angiotensina Degradación de encefalinas
APA - APAGLU	3.4.11.7	Aminopeptidasa A, Aminopeptidasa ácida, gp160, Glutamil aminopeptidasa, Glu-AP, EAP, Angiotensinasa A, Aspartato aminopeptidasa, Glutamato aminopeptidasa activada por Ca ²⁺ , Antígeno BP-1/6C3 de linfocitos B de ratón, Aminopeptidasa de membrana II, Aminopeptidasa MII, Angiotensina A2, L-aspartato aminopeptidasa	Sistema Renina Angiotensina
PSA	3.4.11.14	Aminopeptidasa sensible a la puromicina, NPEPPS, Alanil-aminopeptidasa citosólica, Arilamamidasa, Aminopolipeptidasa, Aminopeptidasa activada por tiol, Aminopeptidasa citosólica III, Aminopeptidasa de hígado humana, Alanil-aminopeptidasa soluble, Alanina aminopeptidasa	Degradación de encefalinas Respuesta inmune. Protector frente al envejecimiento de tejidos. Papel en la proliferación y diferenciación celular
Asp-AP	3.4.11.21	Aspartil aminopeptidasa, DNPEP	Papel importante del metabolismo intracelular

Tabla 2.- Peptidasas, clasificación, sinonimos y función (continuación)

PEPTIDASA	CLASIFICACIÓN (Nº EC)	SINÓNIMOS	FUNCIÓN
DPPIV	3.4.14.5	Dipeptil-peptidasa IV, CD26, Dipeptil aminopeptidasa IV, Xaa-Pro-dipeptidil aminopeptidasa, Gly-Pronaftilamidasa, Postprolina dipeptidil aminopeptidasa IV, Antígeno de linfocito CD26, Glicoproteína GP110, Dipeptidil dipeptidasa IV, Glicilprolina aminopeptidasa, X-prolil dipeptidil aminopeptidasa, Pep X, Antígeno de leucocito CD26, Glicilprolil dipeptidil aminopeptidasa, Dipeptidil-peptido hidrolasa, Glicilpropil aminopeptidasa, Dipeptidil- aminopeptidasa IV, DPPIV/CD26, Amino acil-prolil dipeptidil aminopeptidasa, Molécula Tp103 activadora de células T, X-PDAP	Acción sobre citoquinas, quimiosinas, péptidos bioactivos, sistema inmune, transporte dipeptidos y tripeptidos
ACE	3.4.15.1	Enzima Convertidora de Angiotensina, Peptil-dipeptidasa A,	Sistema SRA local: Procesos proliferativos crónicos en desequilibrio del sistema
ACE 2	3.4.17.23	Enzima Convertidora de Angiotensina 2	Sistema renina angiotensina local.
PEP	3.4.21.26	Prolil endopeptidasa, Prolil oligopeptidasa, Enzima de actuación post-prolina, Endopeptidasa de prolina, Endopeptidasa post-prolina, Endoprolilpeptidasa, PPCE	Acción sobre varios péptidos bioactivos
NEP	3.4.24.11	Endopeptidasa neutra, Neprilisina, CD10, Encefalinasa, Endopeptidasa II, Endopeptidasa 24.11, CALLA, Metaloendopeptidasa neutra, Antígeno de leucemia linfoblástica aguda	En receptores opioides

3.5.1 AMINOPEPTIDASA N (APN)

La aminopeptidasa N (EC 3.4.11.2) es una metaloproteasa de tipo II de la familia M1, unida a membrana y que se ha demostrado idéntica a la CD13, una glicoproteína originalmente empleada como marcador en células hematopoyéticas. Nombrada en ciertas ocasiones como Aminopeptidasa M (APM). También se puede encontrar como proteína soluble (Mina-Osorio P, 2008).

Es dependiente de Zn^{2+} y actúa sobre el péptido N-terminal del sustrato preferentemente tras un aminoácido neutro (Luan Y y Xu W, 2007)

Sustratos de la APN: angiotensinas, encefalinas, neuroquininas, quimiocinas, citoquinas y puede degradar varios componentes de la matriz extracelular, entre ellos colágeno tipo IV (Bathon JM et al., 1992; Antczak C et al., 2001).

Es homodímero con dos subunidades unidas no covalentemente con un peso molecular aproximada de 150 kDa (Sjöström H et al., 2000). Se puede encontrar a varios niveles subcelulares incluido mitocondrial y el núcleo (Larrinaga G et al., 2005). Su forma soluble la encontramos en fluidos corporales como el plasma sanguíneo, la orina, el líquido seminal y el líquido folicular (Jung K et al., 1984; Fernández D et al., 2002; Romeu C et al., 2020; Erbeznik H y Hersh LB, 1997) (Figura 28).



Figura 28.- Estructura de la aminopeptidasa N porcina

Imagen de RCSB PDB (rcsb.org). Santiago, C., Reguera, J., Mudgal, G., Casasnovas, J.M. (2017) Sci Rep 7: 46045-46045

Descrita hace casi 30 años en linfocitos T de líquido sinovial en pacientes con derrame articular (Riemann D et al., 1993;) y un año antes en cultivo celular de fibroblastos sinoviales (FLS) (Bathon JM et al., 1992). También podemos encontrarla en: células epiteliales, macrófagos/monocitos, células endoteliales, neutrófilos (Haringman JJ et al., 2006). Se le considera ubicua por encontrarse en diversos tipos celulares de diferentes tejidos: hígados, riñones, placenta, células del borde en cepillo del intestino delgado...

Se le han atribuido numerosas funciones. En su estudio podemos diferenciar las enzimáticas y las no enzimáticas.

Dentro de las enzimáticas, como hemos dicho participa en la hidrolisis e inactivación de encefalinas (Gros C et al., 1985), bradiquininas, angiotensinas (regulando la tensión arterial al transformar Ang-III en Ang-IV) y varias citoquinas y quimiocinas (Matsas R et al., 1985). Se ha descrito su papel en la degradación de la matriz extracelular en la invasión tumoral (degrada colágeno tipo IV). Se ha visto sobreexpresada en varios tipos de tumores, ya que además participa en la angiogénesis tumoral; procesamiento peptídico para la presentación del mismo por parte de las células presentadoras de antígenos (MHC tipo II); regulación de la tensión arterial.

En cuanto a las funciones no enzimáticas son varias las conocidas: actúa como receptor de citoquinas, promueve la fagocitosis mediada por FcγR (receptores Fc para las inmunoglobulinas), modula el desarrollo y función de numerosas células inmunes, regulación sobre el tráfico celular (migración, adhesión), transducción de señales, participa en la absorción intestinal de colesterol (Lai A et al., 2010; Kramer W et al., 2005). Además, el CD13 soluble tiene un papel proinflamatorio (Lu C et al., 2020).

De forma global podemos ver que la APN está implicada en el sistema inmune y en la inflamación. Procesa de una forma o de otra IL-1β, IL-2, TNF-β, CXCL8, CXCL11 (en combinación con la DPPIV) y papel sobre IL-8 sin aclarar, entre otros. Su actuación enzimática sobre CXCL11 reduce la quimiotaxis de linfocitos y células NK, y aumenta la angiogénesis local. Podemos decir, por tanto, que reduce la respuesta inmune y aumenta la angiogénesis durante procesos inflamatorios, infecciosos o cáncer; participa en la angiogénesis tumoral, en la angiogénesis inducida por hipoxia y en la angiogénesis dependiente del factor de crecimiento fibroblástico (Proost P et al, 2007).

Entre las células inmunes que regula están los linfocitos T activados por citoquinas (Lck), en este caso quimiotaxis. A los Lck se les ha atribuido un peso importante en el desarrollo de la inflamación articular en la AR. Además, ya se ha propuesto como marcador en algunos cánceres (Sanz B et al., 2015).

Es una de las peptidasas del SRA incluidas en varios estudios que han encontrado niveles alterados de estas peptidasas en el Alzheimer, y relacionarían su actividad (Kehoe PG et al., 2017).

El grupo de investigación de Casis L. ha descrito su rol en la regulación de múltiples funciones espermáticas; viéndose cómo afecta su actividad incrementada a la motilidad espermática, su viabilidad, a la reacción acrosómica (Subirán N et al., 2011; Aparicio MV et al., 2021; Subirán N et al., 2008).

Si nos centramos en la articulación:

Se ha visto aumentada en los infiltrados característicos perivasculares y en la membrana sinovial de pacientes con artrosis y AR (Walsh DA et al., 1993)

La IL-17 aumenta la expresión de CD13 en la membrana de los FLS, independientemente de TNF-alfa, aunque TNF-α e INF-γ y otras citoquinas proinflamatorias aumentan su expresión (Morgan RL et al., 2016). El aumento de CD13 produce un incremento en el número de FLS, y aumenta la angiogénesis y la producción de citoquinas (IL-6, IL-8 y MCP-1) por los propios FLS (Chomarat P et al., 1995).

Además, la CD13 tiene actividad quimiotáctica a la articulación sobre Lck y monocitos. El CD13 inicia la quimiotaxis mediante un receptor unido a proteína-G, y esta actividad es independiente de su actividad enzimática (Du Y et al., 2019).

La APN soluble en líquido sinovial está producida por los FLS. La CD13 se encuentra aumentada en LS de AR respecto de OA, pero en cambio no está aumentada en los FLS de AR respecto a los de OA (Morgan R et al., 2015).

Se ha visto una actividad mayor en líquido sinovial de AR que en OA, de unas 5 veces mayor. Aunque la variabilidad observada en pacientes con OA es grande, siendo la actividad en algunos, mayor que en los de AR.

Menos de 1 de cada 100 fibroblastos de tejido sinovial de pacientes con OA expresan CD13, mientras que en AR lo hace la mitad de ellos. La actividad enzimática de la CD13 en estas células se ha visto como algo más del doble en AR que en OA. La transcripción genética en los fibroblastos también se ha detectado aumentada en la misma dirección.

En AR se ha visto una correlación entre la actividad de APN y el número de linfocitos en líquido sinovial, mientras no está relacionado con la cantidad de neutrófilos, o monocitos/macrófagos (Shimizu T et al., 2002).

También se ha identificado en la superficie de los condrocitos, donde se ha propuesto como receptor de al menos a una citoquina, cuya unión desencadenaría un cambio de fenotipo hacia uno catabólico, similar al propio de la artrosis (Nefla M et al., 2015).

Un mecanismo regulatorio fisiológico conocido sobre actividad de la APN es su endocitosis desde la membrana celular, que está regulado por la proteína RECK (del inglés: reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) (Miki T et al., 2007).

A tener en cuenta la curcumina, un alimento, ya que es capaz de inhibir la APN de forma irreversible y no competitiva (Shim JS et al, 2003).

3.5.2 CISTIL-AMINOPEPTIDASA (CYS-AP)

Es una metaloproteasa (EC 3.4.11.3) de la familia M1. Es una proteína transmembrana de tipo II, y habitualmente se encuentra en vesículas intracelulares o en la membrana plasmática. La forma soluble descrita en el embarazo es la misma proteína y no es más que una modificación postranslacional (Keller SR et al., 1995) (Figura 29).

Su distribución es amplia por el organismo, aunque clásicamente ha recibido diferentes nombres según la función atribuida y el tejido en el que se describió. Principalmente estudiada en células ampliamente reguladas por la insulina, como adipocitos y miocitos. También se ha estudiado en cerebro, riñón, ovarios, colon y otros (Nagasaka T et al., 1997).

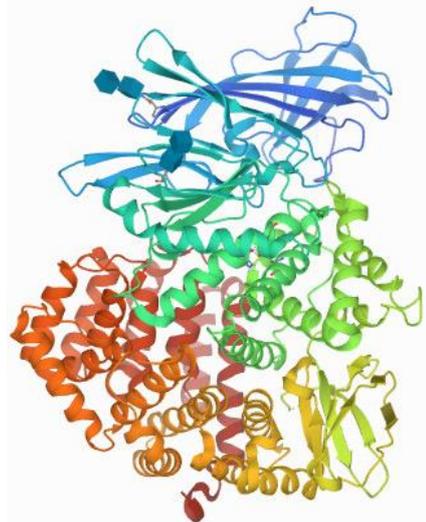


Figura 29.- Estructura cristalina de la aminopeptidasa regulada por insulina

Imagen de RCSB PDB (rcsb.org). Mpakali A, Saridakis E, Harlos K, et al. Crystal Structure of Insulin-Regulated Aminopeptidase with Bound Substrate Analogue Provides Insight on Antigenic Epitope Precursor Recognition and Processing. *J Immunol.* 2015;195(6):2842-2851

Actualmente el término más empleado es aminopeptidasa regulada por insulina (IRAP: del inglés Insulin-Regulated Aminopeptidase). No debe confundirse con la proteína antagonista del receptor de IL-1 (IL-1RA, pero por algunos autores abreviado como IRAP: IL-1 Receptor Antagonist Protein)

Descrita por primera vez en líquido sinovial, en este caso de pacientes con artritis reumatoide en 1968 (Baniowski A et al., 1968).

Se ha propuesto que es una herramienta de la célula, con diferentes funciones. Pero que en ausencia de estímulo se mantendría en vesículas específicas en el interior celular. Ante un estímulo determinado, se desplazaría a membrana plasmática.

Tanto en las vesículas intracelulares como en membrana plasmática, se han diferenciado unas funciones en su dominio externo (intravesicular o extracelular), y otras a su parte interna (citosólico). El dominio intravesicular es el extracelular al ser traslocada y el dominio citosólico sigue siendo el citosólico. Ese dominio citosólico actuaría como regulador del tráfico intracelular y receptor. Su parte intravesicular y extracelular son las que tienen actividad aminopeptidasa.

En cuanto a esta actividad como peptidasa, se encarga de la degradación de ciertas hormonas, y es la que le ha dado sus nombres propios: oxitocinasa por ser la única aminopeptidasa de membrana que degrada la oxitocina (Wallis MG et al., 2007), vasopresinasa por degradar la vasopresina, disminuyendo sus niveles en plasma y cerebro entre otros. Se ha observado mayor papel en la degradación de vasopresina que oxitocina (Wallis 2007). Otros substratos sobre los que actúa son: bradiquinina, encefalina, dinorfina y angiotensina III y IV.

Como peptidasa también participa en la degradación de antígenos dentro de endosomas para la presentación cruzada de estos, por células presentadoras de antígenos como células dendríticas (Descamps D et al., 2020)

En cuanto a la función de su dominio externo, viene determinada por el tipo celular y el contenido de la vesícula intracelular en la que se encuentra. Como ejemplo y de donde recibe su nombre, cuando se localiza asociada a GLUT-4, responde a la insulina. Así, en tejidos sensibles a insulina, como adipocitos o musculo, hace que se transloque junto con la GLUT-4 a membrana celular. Por el contrario, en ausencia de estímulo (insulina), la IRAP se encarga del transporte de GLUT-4 a los compartimentos intracelulares específicos tras la endocitosis y de que se mantenga allí (Jordens I et al., 2010).

Este proceso ha sido uno de los más estudiados de la IRAP, pero su función es más amplia. En células del sistema inmune se encuentra en vesículas que contienen principalmente cadena Z de TCR (receptor de linfocitos T, del inglés: T Cell Receptor), y que es llevado a membrana celular ante el estímulo de MHC-I (Evnouchidou I et al, 2020); en neuronas contiene un receptor de somatostatina (De Bundel D et al, 2015).

Ya en 2009 se observaron cambios en su actividad en hipocampo y amígdala en relación con el estrés (Hernández J et al., 2009). Más recientemente se ha visto IRAP aumentada en pacientes con fibromialgia (Martínez-Martos JM et al, 2019).

También regula la presentación de antígenos, reduce la respuesta inflamatoria mediada por TLR9, al reducir la activación de este (por tráfico endocítico-lisosomal), que implica el sistema inmune y adaptativo, tras infección bacteriana, por ejemplo, y que acaba activando NF- κ B) (Babdor J et al, 2017). TLR4 podría afectar de forma similar a como lo hace la insulina, pero en células dendríticas (Weimershaus M et al., 2018). Vemos que modula estas respuestas inmuno-inflamatorias via regulación de la translocación de ciertos endosomas y además interactúa con otras proteínas regulando el tráfico vesicular intracelular e interactúa con el citoesqueleto.

No está del todo claro como la regulación que se ejerce sobre su función del tráfico de vesículas puede influir en mayor o menor medida a su función como aminopeptidasa.

Nombrada como receptor de la angiotensina IV (AT4R: del inglés Angiotensin 4 Receptor), sirve como receptor para esta, aunque en discusión por algunos autores. Participaría en la regulación de la presión arterial y en la memoria. (Albiston AL et al., 2003; Royea J y Hamel E, 2020).

Si bien la IRAP está regulada por varios péptidos específicos, puede sufrir varios tipos de modificaciones post translacionales, que modifican su función, y su efecto podría depender del tipo celular. Tiene así otros reguladores de función, aunque sea de una forma fisiopatológica. Entre ellas destacar la glicosilación N-terminal que se produce en ambientes de inflamación, y que viene regulada por la TNF- α (Parker BL et al., 2016; Albiston AL et al, 2001).

Viendo sus funciones conocidas en los diferentes tipos celulares y por ser común en todos ellos, se ha propuesto que la IRAP tiene un papel de mantenimiento de la homeostasis.

3.5.3 AMINOPEPTIDASA B (APB)

Aminopeptidasa perteneciente a la familia M1 (EC 3.4.11.6) de las metalopeptidasas, presentando su unión a Zn²⁺ (Suda H et al., 1976; Ocain TD y Rich DH, 1987). Dado que depende de ese ion, sus inhibidores serán los quelantes, existiendo otros como la bestatina, los agentes tiolreactivos y la arfamenina A y B (Hopsu VK et al., 1966; Cadel S et al., 1995; O'Cuinn G, 1998; Foulon T et al., 1999). Este enzima, de 72 kDa es estimulado por iones clorados, y el intervalo de pH en el que actúa es bastante amplio, aunque es alrededor del pH 7 cuando desarrolla su actividad óptima. El gen que codifica este enzima (RNPEP), de 24 kb, se encuentra en el brazo largo del cromosoma 1 y posee numerosos exones (Aurich-Costa J et al., 1997); y el producto final se trata de una proteína monomérica cuyo extremo amino terminal puede actuar como péptido señal (Fukasawa KM et al., 1996; Cadel S et al., 1997).

Su acción libera los aminoácidos lisina o arginina del extremo amino terminal, siempre y cuando el anterior no sea una prolina (Gainer H et al., 1984; Cadel S et al., 1995). Sus sustratos naturales son las bradiquininas, encefalinas, somatostatina, Ang III, kalidina y Leucotrieno A4 (LT-A4) (McLellan S et al., 1988; Foulon T et al., 1999), estos tres últimos implicados en la regulación de la angiogénesis y la inflamación (Heffelfinger S 2007; Capettini LS et al., 2012).

La encontramos expresada en diferente medida, en múltiples tejidos de mamíferos (Foulon T et al., 1996). Ha sido detectada en cerebro, páncreas, cerebro, corazón, tejido testicular y líquido seminal (Cadel S et al., 1997; Taupenot L et al., 2003; Hwang SR et al., 2007; Ramón, 2011; Aparicio Prieto MV et al., 2021), y también en suero (Mäkinen KK y Virtanen KK, 1976). En cuanto a su localización subcelular, en sus inicios se describió cómo proteína citosoluble, localizándose posteriormente en el retículo endoplasmático y cómo enzima de secreción en la matriz extracelular, localizando principalmente su actividad en citosol y como enzima secretada (Lauffart B et al., 1988; Tanioka T et al., 2003; Cadel S et al., 2004). Es probable que actúe en el procesamiento de antígenos ya que forma parte del proteasoma (Hattori A y tsujimoto M, 2004). También se ha descrito su actividad en la fracción de membrana (Varona A et al., 2007). Esta fracción es la que actúa sobre Ang III y kalidina (Ruiz-Ortega M et al., 2007; Balogh A et al, 1998).

Descrita por primera vez en líquido sinovial de ratas en 1980 (Söderling E, 1980) y después solo en 2015 (Yamasaki SC et al., 2015). Tras esto hemos visto que ha sido propuesta como marcador diagnóstico y pronóstico en AR (estudio en ratas), el cual también plantea que la actividad en líquido sinovial venga principalmente de membrana sinovial (Mendes MT et al., 2011). En humanos para nuestro conocimiento solo fue descrita en 1991 (Lees T et al., 1991). No tenemos constancia en las búsquedas, de más estudios a nivel articular.

3.5.4 AMINOPEPTIDASA A (APA)

Es una metaloproteasa (EC 3.4.11.7) de la familia M1, subclan MA. Actúa en el extremo amino, hidrolizando residuos de glutámico y aspártico. Tiene un peso molecular de 109kDa.

Muy empleado también el término Glutamil Aminopeptidasa (Glu-AP) y angiotensinasa. Predominantemente se ha estudiado unida a membrana, aunque también se ha identificado de forma soluble en suero y orina. Se ha identificado en varios tejidos.

Cerebro es uno de los tejidos donde más ha sido estudiada. Transforma Ang II en Ang III (Reaux A et al., 2000), y Ang I en Ang (2-10) (Velez JC et al., 2009). Participa en la degradación de β -amiloide (Sevalle J et al., 2009). Y es la principal reguladora del metabolismo de la colecistoquinina al inactivarla (CCK-8) (Migaud M et al., 1996).

En cuanto a sus funciones, estas son muy amplias, ya que participa en numerosos mecanismos fisiológicos y se le ha visto implicada en varios procesos fisiopatológicos. Su función principal es la regulación de la tensión arterial, ya que es una de las enzimas reguladoras del SRA. También se le ha atribuido un papel en la regulación del ciclo celular, al regular la proliferación de los linfocitos B. En procesos patológicos se le ha visto implicada en la progresión de neoplasias como las colorectales y neoplasias renales, en la enfermedad de Alzheimer y en la hipertensión arterial (Errarte P et al., 2017).

Se ha propuesto como posible marcador temprano de daño renal, junto con APN, en ratas con síndrome metabólico (Montoro-Molina S et al., 2018)

3.5.5 AMINOPEPTIDASA SENSIBLE A LA PUROMICINA (PSA)

También conocida como Alanil-Aminopeptidasa (Ala-AP) y recientemente se le conoce también como NPEPPS, nombre que recibe del gen que la codifica (OMIM).

Es una metaloproteasa dependiente de zinc de la familia M1, subfamilia oxitocinasa, que hidroliza aminoácidos del extremo amino-terminal (EC 3.4.11.14). Unida a membrana y soluble localizada por ejemplo en citosol, núcleo y extracelular como el semen (Constam DB et al., 1995; Dyer SH et al., 1990; Irazusta J et al., 2004).

Descrito por primera vez su papel como degradadora de encefalinas en 1980 (Traficante LJ, et al., 1980). Su hidrólisis libera preferentemente alanina del extremo N-terminal de muchos oligopéptidos, que contengan menos de 13 aminoácidos, aunque también puede hidrolizar leucina, arginina, tirosina, fenilalanina y metionina con elevada afinidad (Taylor A, 1993). Por el contrario, su acción no afecta a los péptidos con prolina en última o antepenúltima posición (Dando P et al., 1997). Por ello, encefalinas, endorfinas y dinorfinas se encuentran entre los sustratos de este enzima (Gros C et al., 1985; McLellan S et al., 1988). Su máxima actividad se da a pH 7,5 y se activa por compuestos como tiol e iones calcio (Dando PM y Barrett AJ, 2004). Se inhibe por EDTA, fenantrolina, amastatina, bestatina y puromicina (Mantle D et al., 1983), siendo la sensibilidad por esta última, así como su activación por tioles, los hechos que diferencian a la PSA del resto de metalopeptidas (Mantle D, 1992).

Identificada su actividad por primera vez en líquido sinovial en 1991, tras lo cual, al menos para nuestro conocimiento, no ha vuelto a ser estudiada su actividad en una articulación (Lees T et al., 1991).

Donde más se expresa es en el cerebro, en el hipocampo y cuerpo estriado. Esto hace que sea el tejido donde más se ha estudiado y además es la aminopeptidasa más abundante en este tejido (Tobler AR et al., 1997). En el año 1999 ya se le atribuía ser necesaria para un correcto desarrollo y participar en procesos como la ansiedad y el dolor (Osada T et al, 1999). También destaca su estudio en sistema nervioso periférico.

En cerebro sano se ha identificado principalmente en las paredes de los capilares y en microglía. En cerebros con Alzheimer, se ha visto aumentada en la microglía activada cercana a depósitos de amiloide. Se le ha atribuido un papel de procesamiento de epitopos (péptidos antigénicos en el retículo endoplasmático) para MHC-I previa actuación de otras 2 aminopeptidasas, la Aminopeptidasa del Retículo Endoplasmático 1 y 2 (ERAP 1 y ERAP2). Y así su implicación en la respuesta inmune de la microglía e inflamación en el Alzheimer (Minnasch P et al., 2003).

Su actividad aminopeptidasa es la principal implicada de forma indirecta en la degradación de la neurotóxica proteína tau, por lo que se le ha atribuido un papel neuroprotector (Karsten SL et al., 2006; Chow KM et al., 2010)

En cuanto a este papel, también se ha visto que promueve la macroautofagia, mecanismo de gran importancia en procesos como el envejecimiento, procesos patológicos y la eliminación de agregados proteicos. La PSA es la única enzima citosólica que es capaz de degradar secuencias de poliglutamina (presentes en la Enfermedad de Huntington y ataxias, entre otras) (Menzies FM et al., 2010). Además, se le ha identificado como enzima proteolítica de la SOD1 (Superóxido dismutasa 1), aumentada en la Esclerosis Lateral Amiotrófica, lo que añade otro punto más de actuación neuroprotectora (Ren G et al., 2011). También se ha visto en modelo animal que es necesaria para la regeneración cerebral (Wu S et al., 2017).

En sistema nervioso periférico se ha visto que presenta una migración axonal anterógrada y que participa en el metabolismo de neuropéptidos en los terminales sinápticos (Yamamoto M et al., 2002)

También se ha visto que juega un papel fundamental en la proliferación y diferenciación celular, al menos, de los mioblastos (Osana S et al., 2021)

Se ha visto reducida su actividad en ambiente hipóxico en células tumorales prostáticas, disminuyendo la producción de MMP-9 (Lee SH y Kim HG, 2009).

3.5.6 ASPARTIL AMINOPEPTIDASA (ASP-AP)

Es una metalopeptidasa de la familia M18 (EC 3.4.11.21), con elevado peso molecular, en forma de oligómero, con 8 subunidades idénticas de 53 kDa cada una (Figura 30). Puede ser considerada como la principal peptidasa intracelular, ya que constituye más del 0,1% de las proteínas citosólicas solubles de varios tejidos, aunque también se ha descrito ligada a membrana (Ramirez-Expósito MJ et al., 2000; Varona A et al., 2007; Blanco L et al., 2008; Carrera et al., 2009).

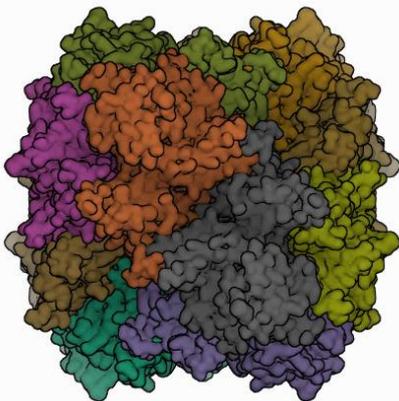


Figura 30.- Estructura de la aspartil aminopeptidasa humana

Imagen de RCSB PDB (rcsb.org). Chaikuad A, et al. (2012). Structure of human aspartyl aminopeptidase complexed with substrate analogue: insight into catalytic mechanism, substrate specificity and M18 peptidase family. *BMC Struct Biol.* 12:14. Published 2012 Jun 21.

Hidroliza el ácido glutámico o aspártico (preferentemente este último) del extremo amino terminal, preferentemente con aminoácidos neutros o hidrofóbicos en la siguiente posición. Única peptidasa de la familia M18 descrita en mamíferos, es codificada por el gen DNPEP que se localiza en el cromosoma 2, termino con frecuencia empleado para referirse a esta aminopeptidasa. Su pH óptimo está alrededor de 7,5 (Wilk et al., 2004) y como en las otras metalopeptidasas, es inhibida por EDTA, 1,10-fenantrolina y DTT (Sanderink et al., 1988; O’Cuinn G, 1998); y activada por Ca²⁺.

Debido a su elevada concentración y amplia distribución, se sugiere que tiene un papel importante en el proceso final del metabolismo intracelular de péptidos y proteínas, de forma coordinada con el proteosoma y otras peptidasas (Wilk et al., 1998, 2002). Aunque también, basándonos en su intervención en el metabolismo de péptidos biológicamente activos como la Angiotensina I y II, colescistoquinina-8 o neuropéptido-K, podría tener otras funciones más especializadas (Kelly et al., 1983; Wilk et al., 1998; Chen Y et al., 2012).

Relacionada con varios tipos de cáncer y con un papel en el sistema inmune (Wang A, et al., 2022). Se ha visto una actividad alterada tanto en el tejido como en suero de pacientes de diferentes tipos de cáncer (Geng N, et al. A, 2020; Haznedaroglu IC y Malkan UY; 2016), incluido el colorrectal en el que ha sido propuesta como marcador diagnóstico (Larrinaga G et al, 2013).

Se ha identificado como esencial en el normal funcionamiento del condrocito y concretamente participa en la osificación endocondral. El aumento de Asp-AP reduce la actividad de la BMP, y por tanto una menor activación de las vías que regula en la osificación endocondral, alterándose el normal funcionamiento de esta. Se altera vía BMP y no vía Wnt, y la alteración es posterior a la actuación de Smad, ya que no se alteran con la alteración de Asp-AP (Nakamura Y et al., 2011).

3.5.7 DIPEPTIDIL PEPTIDASA IV (DPP-IV)

Actúa sobre el extremo amino-terminal de sustratos cuya segunda posición es alanina o prolina. Se trata de una exopeptidasa (EC 3.4.14.5), perteneciente a un grupo variado de seril-peptidasas (familia S9). Empleada como marcador tumoral. Es del grupo de las prolil oligopeptidas, siendo su acción la hidrólisis de algunos oligopéptidos y polipéptidos, produciendo la liberación de un dipéptido del extremo amino terminal, siempre que el antepenúltimo residuo corresponda a una prolina (o alanina aunque con menor afinidad) y el anterior no sea ni prolina ni hidroxiprolina (O'Cuinn G, 1998; Pro B y Dang NH, 2004; Pro B y Dang NH, 2004) ; es incapaz de hidrolizar péptidos que contengan más de 30 residuos (Polgár L, 2002) (Figura 31).

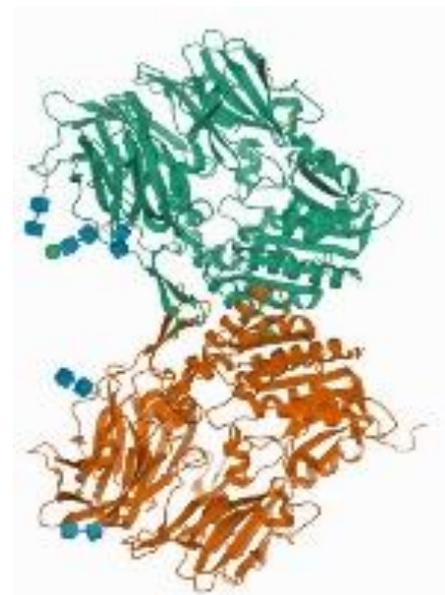


Figura 31.- Estructura cristalina de la dipeptidil peptidasa IV humana.

Imagen de RCSB PDB (rcsb.org). Aertgeerts K, Ye S, Tennant MG, et al. Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV in complex with a decapeptide reveals details on substrate specificity and tetrahedral intermediate formation. *Protein Sci.* 2004;13(2):412-421

En cuanto a su estructura, es una glicoproteína de membrana, con el extremo amino terminal hacia citoplasma de 6 aminoácidos, un dominio hidrofóbico que la ancla a la membrana y el centro activo en su gran dominio extracelular. Podemos encontrarla también de forma soluble, pero cuando pierde su extremo amino terminal insertado en la membrana. De esta forma lo encontramos en suero humano, líquido cefalorraquídeo, líquido seminal y otros fluidos (Iwaki-Egawa S et al., 1998; Carl-McGrath S et al., 2006; Ramon M, 2011; Aparicio Prieto MV et al., 2021).

Descrita por primera vez en 1966 en hígado y riñón de rata, es también conocida como CD26. Se ha encontrado en diversos tejidos en diferentes proporciones, con niveles bastante constantes; lo observamos en una elevada proporción en riñón, placenta e intestino delgado; siendo menor su concentración en lengua e hígado y aún menor en corazón, páncreas y cerebro; también en fibroblastos sinoviales (Gonzalez-Gronow Met al., 1994). Aunque se ha encontrado en otros tipos celulares, se encuentra principalmente en la superficie de una línea de linfocitos T. En estado basal los LT apenas presentan DPPIV, aumentando su presencia tras activarse estos.

La encontramos involucrada en la activación e inactivación de un gran número de citoquinas y quimiocinas (Havre et al., 2008), también descrita por su acción sobre péptidos bioactivos (como incretinas), interactuar con péptidos como colágeno y fibronectina (Lambeir AM et al., 2003), y su papel en el sistema inmune (movilización de linfocitos T) (Busso N et al., 2005). Actúa sobre la quimiocina CCL5 lo que aumenta su afinidad sobre CCR5, pero la impide sobre CCR1 y CCR3. Esto reduce la actividad quimiotáctica sobre monocitos y eosinófilos, pero la aumenta sobre linfocitos. También actúa sobre CXCL9, 10 y 11 (junto con APN), impidiendo su efecto sobre CXCR3, y así la quimiotaxis de linfocitos, pero la DPPIV no modifica la angiogénesis (Proost P et al., 2007). Además, tiene especial relevancia en el transporte específico de algunos dipéptidos y tripéptidos (Tiruppathi et al., 1990).

Tiene cierto papel en el sistema purinérgico, ya que sirve de anclaje a membrana celular de uno de sus principales reguladores en el espacio extracelular, la Adenosina desaminasa (ADA) (Moreno E et al., 2018).

A nivel articular la mayor parte de los estudios se centran en AR (Sedo A et al., 2005). En cuanto a su actividad en AR y en OA, es contradictoria; en algunos estudios se indica elevada, en otros disminuida y en otros no se observan variaciones, variando además según localización. En general se ha descrito actividad menor en líquido sinovial de pacientes con AR que en el de OA y sanos. En cambio, esta aumentada en fracción membrana. También se ha propuesto el ratio DPPII (dipeptidil peptidasa II)/DPPIV, ya que lo más frecuentemente descrito es que la DPPII tiene tendencia a estar aumentada y la DPPIV disminuida, en AR en mayor proporción que en OA y estos en mayor que en sanos. (Sedo A et al., 2005; Busso N et al., 2005; Gotoh H et al., 1989; Kamori M et al., 1991)

La explicación más aceptada es que la DPPIV soluble se uniría a fragmentos de colágeno del cartílago lesionado y sería internalizado por los sinoviocitos, haciendo que sus niveles en líquido sinovial disminuyan en pacientes con daño condral (y reduciendo la

producción de citoquinas al retirar productos de líquido sinovial que de otra forma estimularían la producción de citoquinas). Por otra parte, la fracción unida a membrana aumentada en OA y RA, favorecería la migración de Linfocitos T lo que favorece el ambiente inflamatorio. Los LT son la principal fuente de DPPIV, suponiendo el 90% de su actividad en plasma (Gorrell MD et al., 2001).

Los bajos niveles de DPPIV en plasma se han asociado a inmunosupresión, cáncer y VIH entre otros (Kobayashi H et al., 2002). Por otra parte el tratamiento con inhibidores de DPPIV mejoran la artritis (Tanaka S et al., 1998)

3.5.8 ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA (ACE)

También denominada peptidil-dipeptidasa A (EC 3.4.15.1), ya que actúa como una dipeptidil peptidasa. Cataliza la liberación de un dipéptido C-terminal, oligopéptido Xaa-Yaa, cuando Xaa no es Pro y Yaa es ni Asp ni Glu. Por tanto, cataliza la conversión de angiotensina I en angiotensina II, con aumento de actividad vasoconstrictora, pero sin acción posterior sobre la angiotensina II, y de Ang (1-9) en Ang (1-7) en menor medida. También actúa como endopeptidasa. Es una Zn-glicoproteína dependiente de Cl, que generalmente está unida a la membrana. Un potente inhibidor es el captopril. Resulta principal en la elevación de la presión arterial, mediante la formación de angiotensina II (vasoconstrictor) y destrucción de bradicinina (vasodilatador). Existen dos formas moleculares en tejidos de mamíferos, una forma somática ampliamente distribuida de 150 a 180 kDa que contiene dos sitios catalíticos (Figura 32) y una forma testicular de 90 a 100 kDa que contiene solo un sitio catalítico.

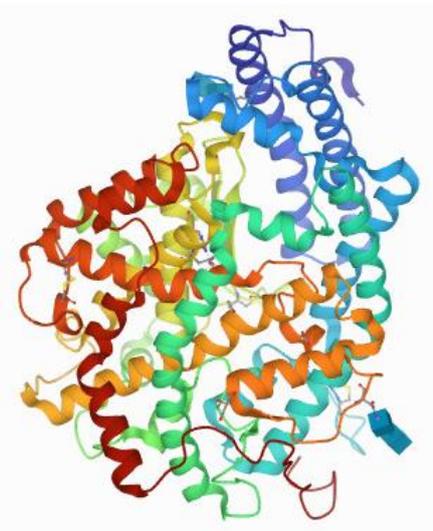


Figura 32.- Estructura cristalina de la enzima convertidora de angiotensina I humana

Imagen de RCSB PDB (rcsb.org). Corradi HR, Schwager SL, Nchinda AT, Sturrock ED, Acharya KR. Crystal structure of the N domain of human somatic angiotensin I-converting enzyme provides a structural basis for domain-specific inhibitor design. *J Mol Biol.* 2006;357(3):964-974.

Es idéntica al antígeno de diferenciación CD143, estando ampliamente distribuida en el organismo. Existen dos diferentes formas del enzima, la somática (sACE) o endotelial (sACE) y la testicular (tACE). La forma sACE contribuye sustancialmente a la homeostasis cardiovascular, mientras que la tACE está claramente implicada en la fertilidad masculina (Pauls K et al., 2003).

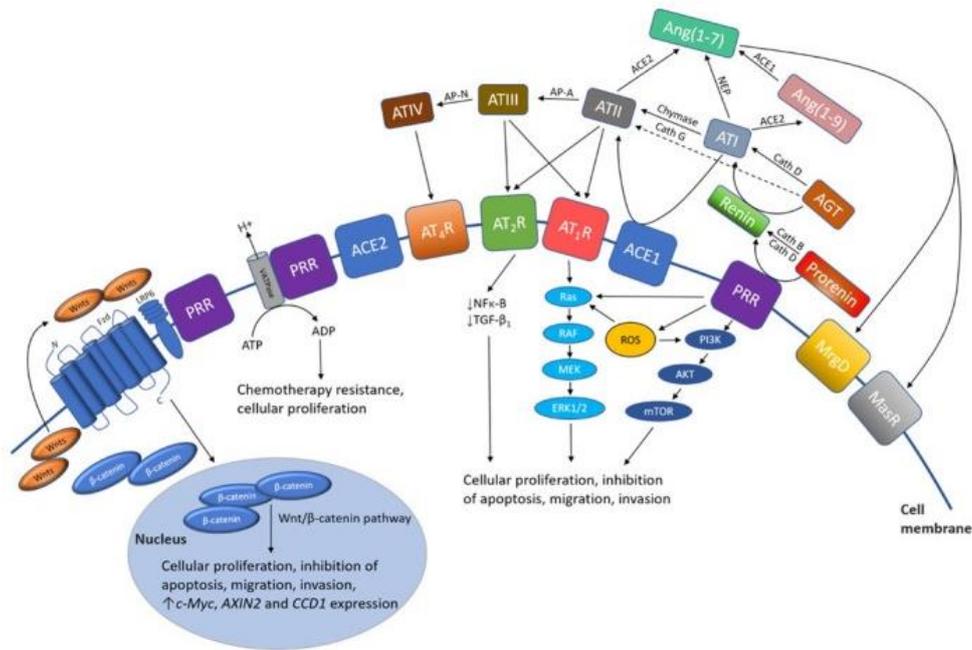


Figura 33.- Esquema mostrando los principales actores del Sistema Renina-Angiotensina, sus receptores y traslación de señales al interior celular.

Imagen tomada de: O'Rawe M, Kilmister EJ, Mantamadiotis T, Kaye AH, Tan ST, Wickremesekera AC. The Renin-Angiotensin System in the Tumor Microenvironment of Glioblastoma. *Cancers (Basel)*. 2021;13(16):4004. Published 2021 Aug 9. doi:10.3390/cancers13164004

Ya descrita en mayor profundidad en el apartado del Sistema Renina Angiotensina. En la Figura 33 podemos ver su lugar de actuación en el SRA

3.5.9 ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA 2 (ACE2)

También conocida como ACE-2; ACE2; hACE2; angiotensin converting enzyme 2. EC 3.4.17.23. Cataliza la siguiente reacción:

Angiotensina II + H₂O => angiotensina-(1-7) + L-fenilalanina

Es una glicoproteína de transmembrana con un dominio catalítico extracelular (Figura 34). Funciona como una carboxipeptidasa, escindiendo un solo residuo C-terminal de una amplia gama distinta de sustratos (Lambert DW et al., 2008). La eficiencia catalítica es 400 veces mayor con angiotensina II como sustrato que con angiotensina I, y aun así la Ang II se puede regular por otras aminopeptidasas en ausencia de ACE2 (Wysocki J et al., 2010). Actúa sobre la Ang I a Ang1-9, y sobre Ang II que transforma en Ang1-7.

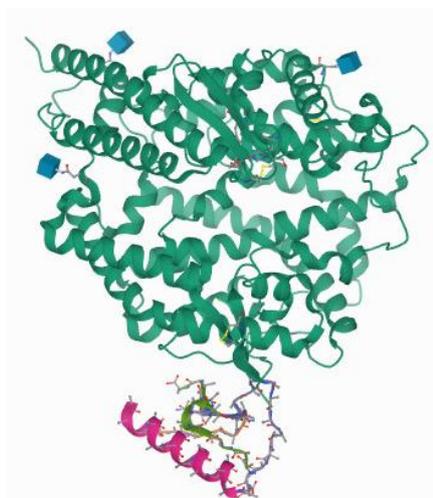


Figura 34.- Estructura esquemática de la Encima Convertidora de Angiotensina 2.

Imagen de RCSB PDB (rcsb.org). Towler P, Staker B, Prasad SG, et al. ACE2 X-ray structures reveal a large hinge-bending motion important for inhibitor binding and catalysis. *J Biol Chem*. 2004;279(17):17996-18007.

La enzima convertidora de angiotensina 2 también hidroliza de manera eficiente la des-Arg9-bradiquinina, pero no hidroliza la bradiquinina (Vickers C et al., 2002). Pertenece a la familia M2 de las peptidasas, y es particularmente abundante en el epitelio pulmonar, intestino delgado, endotelio vascular renal, corazón, hipotálamo, pared de la aorta y los testículos (Iwai M y Horiuchi M, 2009). Se han demostrado efectos directos sobre la función cardíaca, así como funciones protectoras en el sistema cardiovascular (Fyhrquist F y Saijonmaa O, 2008).

El eje ACE2/Ang(1-7)/MAS se ha visto con efectos opuestos al eje ACE/AngII/AT1. El eje ACE2/Ang(1-7)/MAS, que reduce la Ang II y por tanto la activación de AT1, ha mostrado efectos protectores frente a metástasis y progresión tumoral, que en parte se haría vía β -catenina. Así reduciría la activación de las vías Wnt, MAPK, HIF-2 α (y TGF- β y VEGF), reduciendo la hipoxia, la inflamación, la angiogénesis y los ROS (que se ven aumentadas cuando se activa AT1R). Vías estudiadas en células tumorales pero que hemos visto están presentes en la patogenia de la artrosis, y están esquematizadas en la Figura 35. (O'Rawe M et al., 2021; Liu Y, et al., 2015; Yang L y Liu B, 2014). Nos facilita hacernos una idea de como estos mecanismos representados en dicha figura y estudiados en mayor profundidad en procesos tumorales, son puntos de unión de patologías crónicas, con procesos senescentes, incluso el cáncer. Vemos la participación del SRA en procesos inmunoinflamatorios, de estrés oxidativo, y sobre vías efectoras intracelulares como Wnt o MAPK.

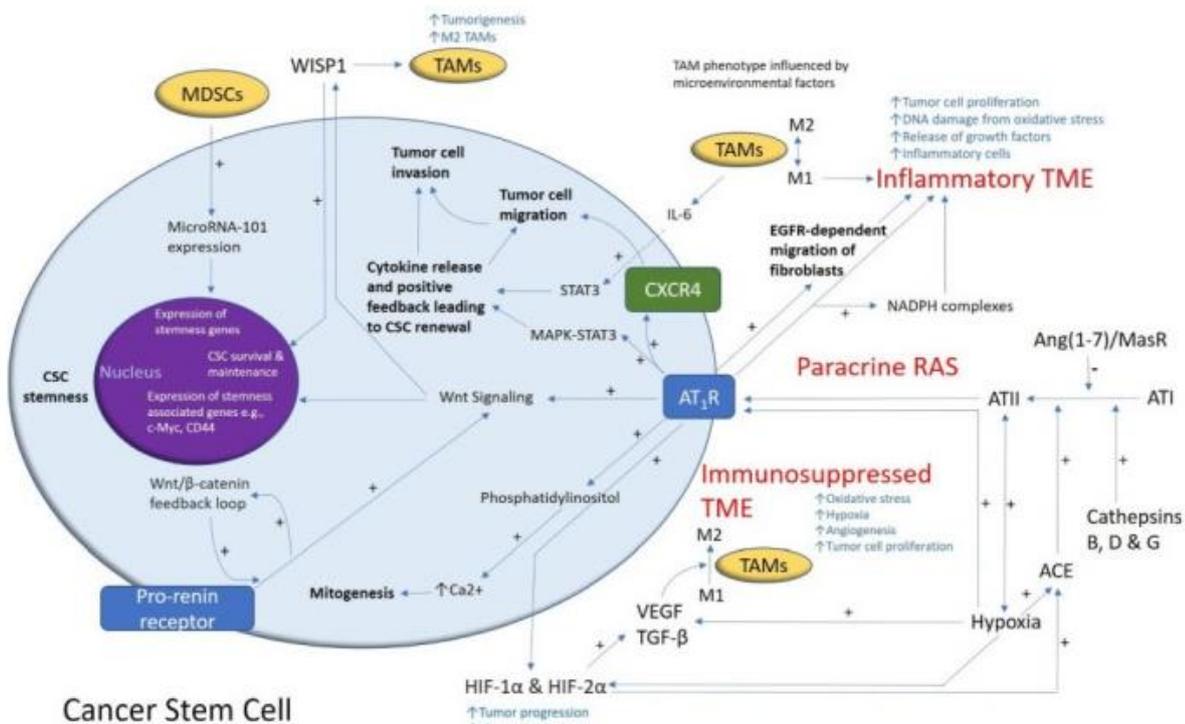


Figura 35.- Esquema mostrando el papel del Sistema Renina-Angiotensina (RAS). Ejes ACE y ACE2. Puntos de unión SRA e inmunoinflamatoria/oxidativas, estudiado en cáncer.

Imagen tomada de: O'Rawe M, Kilmister EJ, Mantamadiotis T, Kaye AH, Tan ST, Wickremesekera AC. The Renin-Angiotensin System in the Tumor Microenvironment of Glioblastoma. *Cancers (Basel)*. 2021;13(16):4004. Published 2021 Aug 9. doi:10.3390/cancers13164004

3.5.10 PROLIL ENDOPEPTIDASA (PEP)

Enzima perteneciente a la familia S9 del Clan SC (EC 3.4.21.26). Es principalmente una peptidasa citosólica, aunque también se ha descrito como enzima de membrana y soluble en diferentes líquidos del cuerpo, siendo en este caso más abundante en plasma que en suero (Gotoh et al., 1988; Oleary et al., 1996; Momeni et al., 2003; Szeltner y Polgar, 2008).

Peptidasa monomérica de 75kDa, con una actividad óptima en torno a pH 7,5 (Figura 36). Se puede incrementar su actividad con NaCl, potasio, fosfato e iones nitrato. Por el contrario, es inhibida con Z-tio-prolina-tioprolinal (Gass y Khosla, 2007). El gen que la codifica está ubicado en el brazo largo del cromosoma 6 y se llama PREP (Goossens 1996 a, b).

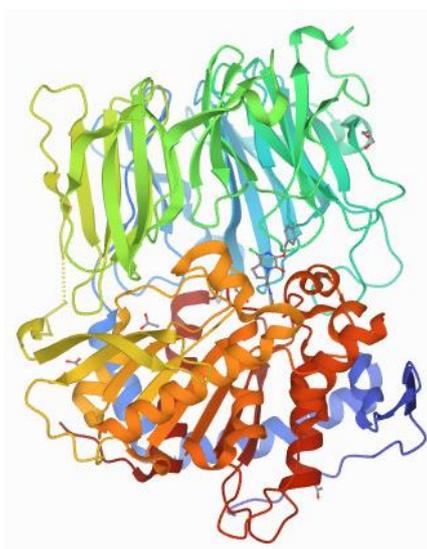


Figura 36.- Estructura esquemática de la Prolil Endopeptidasa (PEP)

Imagen de RCSB PDB (rcsb.org). Haffner CD, Diaz CJ, Miller AB, et al. Pyrrolidinyl pyridone and pyrazinone analogues as potent inhibitors of prolyl oligopeptidase (POP). *Bioorg Med Chem Lett.* 2008;18(15):4360-4363.

Hidroliza los péptidos en el residuo prolina interno, de su extremo carboxilo unido al péptido (Gass y Khosla, 2007). Inicialmente se descubrió cómo enzima degradadora de la oxitocina en útero (Walter et al., 1971), aunque en la actualidad conocemos su acción sobre otros péptidos bioactivos. Actúa sobre sustancias como la sustancia P, vasopresina, neurotensinas, angiotensinas I y II, dinorfinas, bradiquininas, TRH, hormona liberadora de hormona luteinizante y hormona liberadora de alfa-melanocitos; rompe específicamente la unión prolina (Welches et al., 1991; Ito et al., 2004; Ruiz-Ortega et al., 2007). PEP no es capaz de hidrolizar moléculas de mayor tamaño, por lo que su especificidad también viene determinada por el peso molecular (Polgár, 2002).

La encontramos ampliamente distribuida por todo el organismo, localizándola principalmente en cerebro, músculo, testículo, riñón y glándula submaxilar (Goossens et al., 1996a; Gass y Khosla, 2007; Myohanen et al., 2009). Sus funciones tienen que ver con el metabolismo de las sustancias anteriormente citadas, y su acción puede estar relacionada con el aprendizaje, la memoria, el estado de ánimo y otros procesos neurológicos (Li et al., 1996; Morain et al., 2000, 2007; Agirregoitia et al., 2003b). Es por este motivo que encontramos múltiples estudios en los últimos años donde se están utilizando inhibidores de PEP para el tratamiento del Alzheimer y el Parkinson, con prometedores resultados (Babkova et al., 2017).

A nivel articular fue descrita por primera vez en 1991 en membrana sinovial de pacientes con OA y AR

3.5.11 ENDOPEPTIDASA NEUTRA (NEP)

También conocida con frecuencia como CD10, neprilisina o encefalinasa (EC 3.4.24.11). Sus principales sustratos parecen ser encefalinas, taquicininas, sustancia P, endotelinas, bombesina y bradiquininas (McLellan S et al., 1988; Rogues y Beaumont, 1990).

El gen que se encarga de codificar NEP humana es el MME, localizado en el cromosoma 3 (q25.1-25.2). Gracias a su purificación y clonación se supo que esta proteína de membrana posee un corto dominio citoplasmático, una región hidrofóbica transmembrana y un centro activo localizado en un largo dominio extracelular (Malfroy et al., 1988). Normalmente aparece como un homodímero de membrana unido no covalentemente (Shimada et al., 1996). Sus cadenas peptídicas, de 100kDa de peso cada una, se encuentran ampliamente glicosiladas y posee cuatro residuos conservados de cisteína que parecen estar relacionados con el mantenimiento de la estructura y su actividad enzimática (Tam et al., 1985). Además NEP es idéntica al cluster de diferenciación CD10 y a CALLA (marcador de linfocitos) (Letarte, 1988; Roques et al., 1993) (Figura 37).

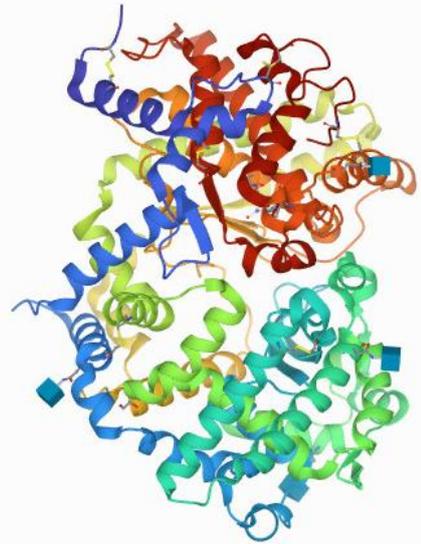


Figura 37.- Estructura cristalina de la Endopeptidasa Neutra

Imagen de RCSB PDB (rcsb.org). Moss S, Subramanian V, Acharya KR. Crystal structure of peptide-bound neprilysin reveals key binding interactions. *FEBS Lett.* 2020;594(2):327-336.

Descrita en FLS en 1992. Las funciones que se le atribuyen a nivel articular vienen principalmente de su actuación sobre sustancia P y bradiquininas (Bathon JM et al., 1992). Así, la NEP regula cierto componente inmuno-inflamatorio y la transmisión del dolor (Lee AS et al., 2013; Fortier LA y Nixon AJ, 1997), incluso sobre vías que llevan a la progresión de la artrosis (Wang H et al., 2015). En AR se ha identificado a la sustancia P relacionada con la actividad de la enfermedad y como herramienta para detectar niveles bajos de inflamación (Barbosa-Cobos RE et al., 2020). De hecho, ya se propuso a la NEP como diana terapéutica de procesos inflamatorios (Solan NJ et al., 1998).

Es un marcador diagnóstico de neoplasias renales de nefrona proximal (Pan y cols., 2004).

La primera referencia que encontramos haciendo referencia a su análisis a nivel articular es en el año 1990 en tejido sinovial (Sreedharan SP et al., 1990), y en 1991 en líquido sinovial (Appelboom T et al., 1991).

La mayor parte de los estudios centran su interés en la artritis (Halliday DA et al., 1993). En 1995 se describe por primera vez su expresión en la superficie de los condrocitos,

viéndose disminuida su expresión en las zonas de mayor estrés mecánico. (Lapadula G et al., 1995).

NEP regula la sustancia P. El fragmento del extremo C-terminal que resulta de la actuación de la NEP sobre la sustancia P (SP7-11), promueve la liberación de PGE₂, la producción de colagenasas y aumenta el calcio intracelular (Halliday DA et al., 1993).

Podría servir de marcador en aquellas rodillas con artrosis temprana que se consideren susceptibles de tratamiento con células mesenquimales de grasa infra patelar, como posible marcador para indicar el tratamiento y como control evolutivo del mismo (Kouroupis D et al., 2019; Greif DN et al., 2020).

4. PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP)

4.1. INTRODUCCIÓN, TERMINOLOGÍA Y USOS.

Introducción:

Las plaquetas tienen función principalmente sobre la hemorragia y la reparación vascular. Cuando son activadas al entrar en contacto con el colágeno liberan más de 800 proteínas y tienen un efecto principalmente paracrino en diferentes células (condrocitos, fibroblastos, tenocitos, MSC...), analgésico y antiinflamatorio, que se prolonga al menos durante 7 días (Senzel L et al., 2009; Drengk A et al., 2009; van Osch GJ et al., 2011; Asfaha S et al., 2007).

Terminología:

El plasma rico en plaquetas se engloba dentro de los derivados de las plaquetas. En general se les llama PRP de forma genérica. Siempre ha existido cierta confusión en cuanto a su terminología.

Existen muchos métodos de obtención y procesamiento, que le darán propiedades y características diferentes: Pueden tener diferente concentración de plaquetas, diferente cantidad de leucocitos. Se puede usar activado o sin activar, y activarse de diferentes formas (calcio, trombina, colágeno entre otros). Se puede administrar en forma líquida, gel, membrana, entre otras. La preparación puede ser comercial o puede ser manual (Mazzucco L et al., 2009).

Existen numerosos nombres comerciales que también difieren en técnica. Muchos de estos productos comerciales son kits que incluyen lo necesario para la obtención del producto final y no sea necesario un laboratorio para ello (Le G et al., 2011)

Una aproximación para clasificar los PRP se hizo en 2009 y recoge 4 tipos (Dohan Ehrenfest DM et al., 2009).

- Plasma rico en plaquetas puro (P-PRP del inglés: Pure Platelet Rich Plasma): también llamado plasma rico en plaquetas – pobre en leucocitos. El PRGF se incluye en este grupo. Al activarse crea una malla relativamente poco densa de fibrina. Se puede administrar en forma líquida y gel.
- Plasma rico en plaquetas y rico en leucocitos (L-PRP del inglés: Leukocyte and Platelet Rich Plasma): Al activarse crea una malla relativamente poco densa de fibrina. Se puede administrar en forma líquida y gel.
- Puro en plaquetas y rico en fibrina (P-PRF del inglés: Pure Platelet Rich Fibrine) o fibrina pobre en leucocitos rica en plaquetas: forma una malla densa de fibrina por lo que solo se puede administrar en forma de membrana. Producen una liberación de los factores de crecimiento más lenta y mantiene su estructura por más tiempo. (Dohan DM et al, 2006).

- Fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF del inglés: Leukocyte and Platelet Rich Fibrine): forma una malla densa de fibrina por lo que solo se puede administrar en forma de membrana. Producen una liberación de los factores de crecimiento más lenta y mantiene su estructura por más tiempo.

Para saber que estamos aplicando al paciente es imprescindible cuantificar sus componentes. Para ello, el método de obtención de PRP debe ser reproducible y constante en su composición (excepto por las variaciones interindividuales). El efecto y propiedades del tratamiento serán diferente según su composición. Deberíamos conocer al menos su contenido en plaquetas, leucocitos, contenido en células madre si es el caso, contenido de factores de crecimiento y la no activación de estos antes de su administración (Amable PR et al, 2013)

Así, el “tipo” de PRP, y sus efectos dependen de: su composición, su vía de administración, su forma de administración, número de administraciones, activación o no y su forma y momento de activación.

Usos:

Se ha empleado en medicina deportiva, cirugía ortopédica, cirugía maxilofacial, cicatrización de heridas o úlceras, entre otros usos.

4.2. BASES CIENTÍFICAS PARA SU USO EN ARTROSIS.

La base científica de su uso viene de sus componentes: factores de crecimiento, células, componentes de la matriz extracelular, citoquinas y quimiocinas, y moléculas relacionadas con la adhesión celular, recogidas en más detalle en material y métodos. También su estructura y forma y tiempos de administración (Amable PR et al, 2013).

Su uso viene justificado por los estudios que reflejan su capacidad de modificar alteraciones moleculares propias de la artrosis, hacia un estado de menor alteración; tendría cierto efecto hacia recuperar la homeostasis perdida en la artrosis. Esto se ha visto en estudios en tejido condral, subcondral, sinovial y de líquido sinovial, a nivel de mecanismos moleculares y cambios histológicos en el tejido, también en comparación con otros tratamientos (Sundman EA et al, 2014; Zhu Y et al, 2013). Existen así mismo, estudios a nivel clínico y comparativos con el AH que es el tratamiento estándar (Raeissadat SA et al., 2013; Chang KV et al., 2014).

Habíamos hablado del tratamiento con antagonistas del receptor de IL-1 (IL-1-Ra), como posible tratamiento novedoso. Los preparados de PRP y ACS que presentan una alta proporción de IL-1-Ra, podrían inhibir el efecto de IL-1 β a nivel local con su administración intraarticular.

El uso de PRP intraarticular parece haber mostrado superioridad a otras infiltraciones intraarticulares, como ácido hialurónico o corticoides, en la mejora de la función y el dolor, y una eficacia equivalente al suero autólogo condicionado (Shen L et al., 2017; Khurana A et al., 2020).

Aun así, también existen ensayos clínicos y revisiones que no encuentran diferencias con los tratamientos más clásicos intraarticulares. Si bien es verdad que muchos estudios son de baja calidad y no tienen una buena metodología.

Son muchos los estudios que remarcan que, sobre todo con esta controversia y contradicción de resultados, es necesario estandarizar los métodos de preparación y administración de PRP. Sobre todo, es necesario analizar cómo es la composición del PRP que estamos administrando, para saber qué es lo que el paciente recibe exactamente, en que proporciones, que efectos podemos esperar y poder estudiarlos (Dohan Ehrenfest DM et al., 2014).

4.3. PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO (PRGF)

Dentro de los P-PRP destaca el PRGF, administrado de forma líquida por la vía habitual intraarticular y más recientemente por vía intraósea, aunque también se puede administrar en forma de membrana, por ejemplo, según el efecto deseado. Lo recogemos explicado en mayor detalle en el apartado de material y métodos.

Aunque se ha visto que son capaces de producir mejoría clínica, son necesarios nuevos estudios de alta calidad que nos permitan ir comprendiendo la patogénesis de la artrosis y como la modifican estos nuevos tratamientos.

Su idoneidad en el tratamiento de la artrosis se basa en la evidencia que defiende que la clave parece estar en el equilibrio en la composición del PRP, siendo el PRGF cercano a ello. Sobre todo, la importancia de la concentración de los factores de crecimiento, citoquinas y quimiocinas y la celularidad (Sundman EA et al., 2011). Pero el estudio y control de todas las variables que puedan influir en la eficacia del tratamiento son importantes, de cara a adecuar al paciente el tratamiento más adecuado según su patología (Gabrielyan A et al., 2017).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La artrosis de rodilla es una patología crónica de difícil abordaje terapéutico y cada vez de más alta prevalencia e incidencia en nuestra sociedad. El aumento de la esperanza de vida, el cambio en los estilos de vida y diversos factores exógenos y endógenos pueden favorecer el desarrollo de esta enfermedad. Su importancia radica entre otras variables, en la pérdida de calidad de vida de los pacientes, la sintomatología más o menos invalidante y el elevado coste sociosanitario que ocasiona.

Las peptidasas son enzimas que regulan la actividad peptídica a través de la síntesis y/o degradación de gran cantidad de péptidos bioactivos. Con ello, se produce una modificación de sus acciones fisiológicas y, en consecuencia, regulan el crecimiento y la diferenciación celular, así como la transducción de señales (Carl-McGrath S et al., 2006). La presencia celular de los biopéptidos y los enzimas que los regulan ha sido ampliamente descrita en la literatura, no solo con el fin de conocer los mecanismos de control que subyacen a su acción, sino por su posible utilización como biomarcadores de la evolución, diagnóstico y pronóstico de multitud de patologías. Así, el grupo de investigación de Casis L ha descrito cómo distintas peptidasas podrían servir como marcadores de fertilidad masculina (Aparicio MV et al., 2021; Gianzo M; et al., 2018; Estomba H et al., 2016; Subirán N et al., 2011; Subirán N et al., 2008) y femenina (Romeu Pérez C et al., 2020), así como de diversos procesos tumorales (Blanco Criado L et al., 2014; Larrinaga Embeita G et al., 2012). La artrosis es una enfermedad articular inflamatoria crónica (Carl-McGrath S et al., 2006) que frecuentemente coexiste con otras comorbilidades (Herrero-Beaumont G et al., 2017), generando dolor, discapacidad y una gran carga económica (Glyn-Jones S et al., 2015), así como una limitación funcional en el movimiento articular (Herrero-Beaumont G et al., 2017). Aunque existen algunos métodos parcialmente efectivos, como el descrito por Sánchez et al. (Sánchez M et al., 2019), en general se acepta que los tratamientos de la artrosis no previenen por completo la progresión de la enfermedad y la disfunción resultante (Glyn-Jones S et al., 2015), que se asocia con erosión del cartílago e inflamación articular, lo que lleva a la discapacidad. En los últimos años, diferentes sistemas peptidérgicos, como los componentes del sistema renina-angiotensina, han sido descritos en líquido sinovial (Seco-Calvo J et al., 2020). Se ha sugerido en modelos animales (Yamagishi K, et al., 2018) que dichos sistemas peptidérgicos podrían estar relacionados con la patogénesis de la artrosis de rodilla, sugiriéndose también que, en humanos, podrían contribuir a la progresión de la artritis reumatoide (Cobankara V et al., 2005).

Nosotros nos hemos planteado un proyecto de investigación que determine la importancia de un elenco de aminopeptidasas presentes en las rodillas artrósicas para evaluar su presencia cuantitativa y cualitativa y su evolución mediada por el desarrollo de la alteración articular. Nos gustaría poder visualizar con claridad la utilidad de alguno o algunos de estos componentes biológicos como indicador precoz de la alteración y también como marcador de la eficacia terapéutica, su pronóstico y evolución. En todo caso, creemos que es una línea de trabajo que puede obtener buenos resultados, que puedan ser de utilidad a corto y medio plazo.

Objetivos

En el presente trabajo de Tesis Doctoral analizamos la actividad de diversas peptidasas presentes en líquido sinovial. En concreto describimos las actividades de los enzimas implicados en la regulación y control de cuatro sistemas peptidérgicos específicos:

1. Subfamilia de las peptidasas implicadas en la regulación y control del Sistema Renina Angiotensina:

Aminopeptidasa neutra (APN), cistil (o cistina)-aminopeptidasa (Cys-AP), aminopeptidasa básica (APB), aminopeptidasa ácida (o glutamil-aminopeptidasa (APA), aspartato aminopeptidasa (Asp-AP), enzima convertidor de angiotensina (ACE), enzima convertidor de angiotensina 2 (ACE2), prolil-endopeptidasa (PEP) y endopeptidasa neutra (NEP).

2. Subfamilia de las peptidasas implicadas en la regulación y control del sistema oxitocinérgico.

Cys-Aminopeptidasa y prolil endopeptidasa.

3. Subfamilia de las peptidasas implicadas en la regulación y el control del sistema encefalinérgico.

Aminopeptidasa neutra, aminopeptidasa sensible a puromicina (PSA), endopeptidasa neutra y en menor medida glutamil aminopeptidasa y aminopeptidasa básica.

4. Subfamilia de las peptidasas implicadas en la regulación y control de citoquinas y quimiocinas.

Dipeptidil peptidasa IV (DPPIV).

Con ello, perseguimos los siguientes objetivos:

OBJETIVOS PRIMARIOS

1. Cuantificar los niveles de determinadas peptidasas en el líquido sinovial de una rodilla artrósica, describiendo con ello el papel de los metabolismos peptídicos antecitados.
2. Estudiar cómo se modifican estos niveles con el tratamiento aplicado de PRGF. Al describir el posible papel de la actividad de las peptidasas del líquido sinovial, observaremos si pudieran utilizarse como biomarcadores de pronóstico clínico para la evolución de la artrosis de rodilla.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Revisar el papel de dichas aminopeptidasas en la artrosis y justificar su estudio.
2. Revisar y evaluar algunas intervenciones terapéuticas que pueden emplearse junto con el PRGF.
3. Observar si se establece una correlación entre la posible variación de las concentraciones de proteasas y las variables epidemiológicas.

Objetivos

Dado que está descrito que la celularidad en líquido sinovial parece guardar una relación directa con la inflamación, en el presente estudio trataremos de observar si la actividad metabólica celular (tanto soluble como unida a membrana) podría estar modificada en los procesos inflamatorios asociados a la OA. Por ello, realizaremos los ensayos enzimáticos en tres muestras diferentes del líquido sinovial recogido a cada paciente:

- 1) Líquido sinovial propiamente dicho: El LS depositado en tubos heparinizados, es centrifugado a 5000 g durante tres minutos para eliminar debris del líquido en el pellet. El sobrenadante es almacenado a -80°C . Tras descongelar, se ultracentrífuga a 100.000 g para eliminar las formas celulares y es la muestra que se utiliza para las determinaciones de LS.
- 2) Fracción celular soluble (citosol): El sedimento resultante anterior se homogeniza nuevamente con solución Tris HCl y se somete nuevamente a ultracentrifugación a 100.000 g durante 30 minutos. Esta sería la fracción celular soluble para ensayo de actividades enzimáticas.
- 3) Fracción celular unida a membrana: Nuevamente, el sedimento resultante vuelve a ser resolubilizado y homogeneizado con Tris HCl, pero en este caso añadiendo un 1% de Tritón X-100 como disolvente lipídico, que solubilizaría las proteínas unidas a membranas. Se ultracentrífuga a 100.000 g durante 30 minutos, y el sobrenadante es utilizado como tercera fracción, que sería la unida a membrana.

Todo ello dado que es básico conocer la patofisiología en estadios precoces para poder desarrollar herramientas diagnósticas y nuevas estrategias terapéuticas.

MATERIALES Y METODOS

1. POBLACION DE ESTUDIO Y ENSAYOS REALIZADOS

Selección de la población de estudio, que serán pacientes con artrosis de rodilla que acudan a la Unidad de Cirugía Artroscópica (UCA) de la Clínica Vithas San José de Vitoria-Gasteiz y que se les considere candidatos a iniciar tratamiento con PRGF (Plasma Rich in Growth Factors, Plasma Rico en Factores de Crecimiento). Los que cumplan los criterios de inclusión y acepten el consentimiento informado, entrarán a formar parte del proyecto y se les ira tomando muestras de líquido sinovial según protocolo establecido. Las muestras se almacenarán congeladas en dicho centro hasta la obtención de todas las muestras del estudio. Con posterioridad las muestras serán analizadas en el Laboratorio de Fisiología Celular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Enfermería de la Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea.

En todas las muestras se ensayarán las siguientes peptidasas: Aminopeptidasas Sensible a Puromicina (PSA), Aminopeptidasa Neutra (APN), Aminopeptidasa Básica (APB), Aminopeptidasa Ácida (APA-Glu), Endopeptidasa Neutra (NEP), Prolil-Endopeptidasa (PEP), Enzima Convertidor de Angiotensina (ACE), Enzima Convertidor de Angiotensina-2 (ACE2), Aspartil-aminopeptidasa (Asp-AP), Cystil-aminopeptidasa (Cys-AP) y Dipeptidil-peptidasa IV (DPPIV). Con estos enzimas cubrimos un amplio rango para el estudio general del metabolismo de diversos péptidos, especialmente los del grupo de los opioides endógenos (en nuestro caso encefalinas: PSA, APN, APB, NEP y APA) y los del sistema renina angiotensina local (Asp-AP, APA (Glu-AP), APB, APN, PEP, NEP, Cys-AP, ACE y ACE2), sin olvidar al sistema oxitocinérgico (PEP y Cys-AP) y las citoquinas y quimosinas (DPPIV).

2. PACIENTES Y COMITÉ DE ÉTICA

2.1. TIPO DE ESTUDIO:

Se trata de un estudio prospectivo y observacional.

Las muestras biológicas de líquido sinovial que se han analizado provienen de pacientes de la Unidad de Cirugía Artroscópica (UCA) del Hospital Vithas San José de Vitoria-Gasteiz, bajo la dirección del Dr. Mikel Sánchez Álvarez. Queremos aquí agradecer sinceramente la colaboración del Dr. Sánchez y su grupo para la obtención y almacenamiento de las muestras hasta su traslado al Departamento de Fisiología para ser analizadas.

Se ensayaron un total de 24 pacientes, de los cuales 14 fueron hombres y 10 mujeres, todos ellos con edades comprendidas entre los 52 y los 92 años. Fueron inicialmente diagnosticados en base a su grado de afección, dividiéndose en artrosis de rodilla de grado I (n=2), II (n=8), III (n=13) y IV (n=1).

Los pacientes han sido seleccionados de entre aquellos que han acudido a consulta en dicho centro. Son pacientes con artrosis de rodilla que han recibido tratamientos previos

sin mejoría o con una mejoría insuficiente que los ha llevado a consultar de nuevo. Los pacientes según criterio médico son seleccionados para someterse a tratamiento con PRGF (Plasma Rich in Growth Factors, Plasma Rico en Factores de Crecimiento) según protocolo. De estos, a aquellos que cumplen los criterios de inclusión y no presentan los de exclusión para este estudio se les ha incluido en el estudio, previo al inicio del tratamiento.

Todos los pacientes firmaron previamente a su inclusión en el estudio los correspondientes consentimientos informados. Este modelo de Consentimiento informado incluido en el protocolo del estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de referencia (Código de la Agencia: AVPD; número de registro: 280310015, 7 de octubre de 2011; **Anexo I**). Todos los participantes dieron el correspondiente visto bueno a su participación en el presente estudio. En todos los casos el estudio se llevó a cabo de acuerdo con la Helsinki Declaration of the World Medical Association (2013, revisada el 5 de mayo de 2015). Finalmente, remarcar que fueron totalmente respetadas todas las regulaciones éticas, entre las que se incluyen la Ley Española de Protección de Datos (15/1999) y la de Investigación Biomédica en Colaboradores humanos (14/2007).

2.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN:

Al ser un estudio que busca determinar si hay actividad de determinadas enzimas en líquido sinovial, se establece un único grupo de análisis con unos criterios de inclusión y exclusión que sí son más estrictos.

Criterios de inclusión:

- Pacientes de ambos sexos mayores de 35 años.
- Diagnóstico radiográfico de artrosis femoro-tibial, predominantemente del compartimento interno.
- Kellgren-Lawrence ≥ 1
- IMC entre 18,5 y 33.
- Dolor mayor de 2.5 de EVA.
- Indicación por un Cirujano Ortopédico para recibir tratamiento con PRGF.
- Posibilidad de observación durante el tiempo del estudio.

Criterios de exclusión:

- Afectación bilateral que hace que precise infiltración en las 2 rodillas.
- Alteración del eje con un varo superior a 4° o un valgo superior a 16°.
- Fractura articular o inmovilización rígida hace menos de 6 meses.
- Enfermedad poliarticular o reumática diagnosticada.
- Diabetes Mellitus mal controlada (Hb glicosilada >9%).

- Infiltraciones intraarticulares en los últimos 6 meses.
- Artroscopia de rodilla en el último año.
- Alteraciones hematológicas.
- Tratamiento inmunosupresor.
- Tratamiento con antiagregantes o anticoagulantes que contraindiquen la cirugía.
- Tratamiento corticoideo en los últimos 6 meses.
- Embarazo o lactancia.
- Rodillas con líquido sinovial escaso.

3 METODOLOGÍA DE LA OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO CON PRGF

El grupo de estudio del Dr. Sánchez lleva desarrollando y ajustando el tratamiento con PRGF durante más de 20 años. Cuentan con varios estudios que defienden su uso en patología osteocondral y heridas entre otras (Anitua E et al., 2011).

Se realiza una extracción sanguínea al paciente en tubos con citrato sódico, para evitar su coagulación. Estos se centrifugan en una centrifugadora programada específicamente, con la que obtenemos un plasma rico en plaquetas y sin leucocitos. Tras la centrifugación el plasma, que es lo que nos interesa, se encuentra en la parte superior y tiene un color amarillento. La segunda capa que vemos es donde se encuentran los leucocitos y la capa más inferior es donde se encuentran los eritrocitos principalmente.

En cuanto al plasma podemos diferenciar una zona superior con una concentración de plaquetas que es similar a la de la sangre, y una zona inferior que tiene una concentración entre 2 y 3 veces mayor que la de la sangre (Anitua E et al, 2009) (Figura 38).

Después de pipetear (con el uso de un sistema de pipeteado especialmente diseñado) el plasma de los tubos y antes de usarlo en el paciente se activa mediante el uso de Cloruro Cálcico (CaCl₂). Según el grado de activación y tiempo podemos obtener una presentación líquida, un coágulo o una membrana. Según la aplicación terapéutica de cada caso emplearemos una fracción y una presentación u otra. En cualquier caso, no contiene células blancas con lo que evitamos los efectos negativos que veíamos que podemos tener en los procesos de daño celular e inmuno-inflamatorios (Anitua E et al., 2015).

Por tanto, es autólogo, reabsorbible, tiene una técnica reproducible e inmunocompatible.

El PRGF contiene numerosos factores de crecimiento: VEGF, TGF- β , PDGF, BDGF, HGF, FGF, IGF); también citoquinas y quimiocinas: IL-2, 3, 4, 5, TNF- α ; componentes de la matriz extracelular como fibronectina, trombospondina y tenascina; moléculas relacionadas con la adhesión celular: L-selectina, N-CAM; proteínas relacionadas con el metabolismo lipídico (Anitua E et al, 2015; Nurden AT 2011).

Cuando se infiltra en la articulación e intraóseo deja de ser líquido y se crea cierta estructura con consistencia de coagulo. Según se va dando la fibrinólisis de esta estructura, los factores de crecimiento y otros componentes se van liberando. Esto ocurre de forma progresiva a la velocidad que se da la fibrinólisis (Aird WC, 2007; Shworak NW, 2004; Anitua E et al., 2014; Borselli C et al., 2010).



**Figura 38.- Centrifugadora específica (Imagen superior).
Tubos centrifugados con plasma en la parte superior
(Imagen inferior).**

Como se ha mencionado dependiendo del caso concreto de aplicación del plasma nos interesará más una presentación líquida o una más densa:

- Membrana PRGF-Endoret®: Es una matriz de fibrina que contiene en su entramado tridimensional factores de crecimiento, y diversas proteínas de plaquetas y plasma. En su aplicación se puede combinar con otros tipos de tejidos biológicos como chips de esponjosa, hueso autólogo, etc. Se emplea en aquellos lugares en los que nos interesa un crecimiento/reparación de un tejido, como pueden ser heridas, úlceras o fracturas (Orcajo B et al., 2011).
- PRGF-Endoret® Líquido: En numerosos casos el formato líquido es el que nos interesa para poder administrarlo. Justo antes se activa y la estructura del PRGF se forma en el propio ambiente y estructura intercelular del tejido. Aporta los componentes citados a ese tejido, facilitando un funcionamiento equilibrado. El PRGF inyectado se acaba absorbiendo por completo. Se emplea fundamentalmente en inyecciones intraarticulares, intraóseas (Sanchez M et al., 2008; Sanchez M et al., 2012; Wang-Saegusa A et al., 2011), sobre tendones y

varias cirugías sobre hueso en las que nos interesa más que sea líquido (Sanchez M et al., 2007; Sanchez M et al., 2009).

El protocolo de tratamiento es el siguiente: en la primera visita de tratamiento el paciente es infiltrado intraóseo en cóndilo y meseta tibial mediales y además una infiltración intraarticular. En la segunda visita de tratamiento a los 7 días de la primera el paciente recibe una infiltración intraarticular y a los 14 días de la primera otra.

Al paciente se le realiza una extracción sanguínea de aproximadamente 80ml. El PRP se prepara de acuerdo con el protocolo del PRGF-endoret líquido del Biotechnology Institute (BTI).

En cuanto a la primera visita de tratamiento, el procedimiento se realiza en el quirófano, bajo sedación y en decúbito supino. Se prepara el campo con povidona iodada líquida y se colocan los paños estériles creando un campo anterior sobre la rodilla para poder realizar las infiltraciones en condiciones de asepsia.

Se localizan los puntos a realizar las infiltraciones intraóseas y se marcan. El cóndilo femoral medial a unos 2cm de la interlinea y centrado en anteroposterior, y la meseta medial con las mismas referencias. En el lugar de la marca en cóndilo femoral, con una aguja de 24G se avanza hasta hueso y se infiltra el periostio con 2 ml de mepivacaina al 2% como anestésico local. Con otra aguja se realiza el mismo proceso para la meseta tibial. En ocasiones es necesario el uso de fluoroscopio.

Primero se realiza la infiltración intraarticular para lo que se emplea una aguja de 21G. Se realiza por lateral intentando realizarla en la zona femoropatelar y evitando realizarla en la sinovial, sin sentir la resistencia que opone esta última. Para ello se localiza el polo superoexterno de la rótula y se introduce la aguja a través del ala patelar externa. Se realiza una artrocentesis si es necesaria y después se filtran 8ml de PRGF-Endoret líquido.

Para las infiltraciones intraóseas se emplea un trocar 13G, empleado para biopsias óseas. Se realiza a través de la marca realizada en piel a nivel de la meseta tibial interna, avanzando paralelo hasta hueso. Tras contactar con este se introduce el trocar 2cm en el hueso. Se filtran 5ml de PRGF-Endoret líquido. Después se repite el proceso para el cóndilo femoral.

Las heridas se limpian y se desinfectan con alcohol, y se coloca un apósito en cada lugar de infiltración. El paciente puede realizar carga completa, aplicar frío en la zona y tomar paracetamol a demanda.

Se realizaron consultas de control médico a los 2 y 6 meses.

El PRP infiltrado se distribuye por el hueso subcondral donde es infiltrado y avanza hacia cartílago, sobre todo en las áreas dañadas que son más permeables, antes de coagularse y formar el entramado que hemos mencionado previamente.

3.1 MATERIALES EMPLEADOS:

Aguja 21G

Aguja 24G

Trocar 13G (CareFusion, San Diego, USA)

Mepivacaina al 2%.

El propio de la técnica de preparación del PRGF-endoret según protocolo de BTI.

Fluoroscopio.

A modo de resumen de las visitas, tratamiento y controles que se les realizan a los pacientes durante el estudio y tratamiento con PRGF:

- Primera visita: diagnóstico

Historia clínica, exploración, radiografías, pruebas complementarias e inclusión en el estudio si procede. Firma de consentimiento informado. A cada paciente incluido se le asigna un código numérico y se le cita para tratamiento.

- Primera consulta de tratamiento

Descrito previamente. Artrocentesis y toma de muestra de líquido sinovial de la rodilla afecta en el quirófano. Esta es la muestra que se analiza en el laboratorio. Tras tomarse la muestra esta se almacena ultracongelada en ese mismo centro. Sería la primera muestra, y es pretratamiento. Después de la artrocentesis, se realiza la inyección de PRGF-endoret intraarticular e intraóseo.

- Segunda consulta de tratamiento

Toma de 2ª muestra. Inyección de PRGF-endoret intraarticular.

- Tercera consulta de tratamiento

Toma de 3ª muestra. Inyección de PRGF-endoret intraarticular.

- Después se realizan consultas de control clínico postratamiento a los 2 y a los 6 meses.

Las artrocentesis, evidentemente, se realizan en aquellos pacientes en los que existe cierto derrame que permite la toma de la muestra. Los pacientes que tienen una rodilla con líquido sinovial escaso no permiten toma de muestra ni precisan artrocentesis, y por tanto no han sido incluidos en el estudio.

4 MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO

Muestras de líquido sinovial:

El líquido sinovial de rodilla es obtenido en el quirófano mediante punción-aspiración intraarticular en condiciones estériles. La muestra se almacena en un ultracongelador a -80°C.

Una vez obtenidas todas las muestras, son transportadas al laboratorio para su procesamiento. Las artrocentesis, sistema por la que fueron obtenidas las muestras, fueron realizadas según descrito previamente por vía lateral, previamente a la infiltración del PRGF.

Las muestras de líquido sinovial, obtenidas como hemos mencionado por artrocentesis, fueron depositadas en tubos heparinizados, centrifugados a 5000 g durante tres minutos (para eliminar debris -detritus- del líquido en el pellet (Seco et al, 2020), y luego quedarnos con el sobrenadante, que es lo que se utiliza para las determinaciones) y almacenados a -80 °C hasta el momento del análisis de las actividades enzimáticas y la determinación de proteínas totales. El contenido de proteína total en las muestras se llevó a cabo utilizando el método clásico de Bradford (1976).

No debemos olvidar que el objetivo del presente proyecto no es solo estudiar el metabolismo peptídico en el líquido sinovial de la articulación femorotibial, sino que teniendo en cuenta que las muestras disponibles provienen de pacientes con distintos grados de artrosis, también (y posiblemente más interesante) el objetivo sería la búsqueda de marcadores, tanto del grado de afectación articular como del desarrollo de la patología tras el tratamiento. Por tanto, medimos dicho metabolismo en el líquido sinovial propiamente dicho empleando la metodología clásica habitual (de Gandarias JM et al., 1989a; de Gandarias JM et al., 1989b; de Gandarias JM et al., 1992), pero también realizamos fracciones para determinar si alguna de ellas podría ser fuente de información específica/complementaria.

Inicialmente, tras la descongelación (en frío), se somete a las muestras a una ultracentrifugación a 100.000 g durante 30 minutos. Se recoge el sobrenadante (en el que ha desaparecido cualquier forma celular, que ha sedimentado) y se hacen en él las determinaciones enzimáticas del líquido sinovial. Se trataría de la muestra de líquido sinovial propiamente dicha, que serviría para el estudio del metabolismo peptídico general y de las observaciones de las posibles modificaciones para el hallazgo de posibles marcadores de artrosis y de recuperación.

El sedimento resultante tras la toma del sobrenadante descrito en el párrafo anterior se homogeniza nuevamente con solución Tris HCl y se somete nuevamente a ultracentrifugación a 100.000 g durante 30 minutos. De aquí se toma el sobrenadante, que es la segunda fracción (soluble) para ensayo de actividades enzimáticas, que sería utilizada para el posible hallazgo de marcadores de artrosis. Esta muestra la denominamos citosol, ya que la mayor parte del líquido pipeteado para esta muestra será citosol. En este líquido obtendremos principalmente actividad de peptidasas solubles presentes en el citosol y las solubles del interior vesicular/orgánular.

El sedimento resultante tras el paso anterior vuelve a ser resolubilizado y homogeneizado con Tris HCl, pero en este caso añadiendo un 1% de Tritón X-100 como disolvente lipídico, que solubilizaría las posibles proteínas unidas a membranas (membrana celular, membrana de vesículas y orgánulos).

Nuevamente se ultracentrífuga a 100.000 g durante 30 minutos, y el sobrenadante es utilizado como tercera fracción (que llamamos unida a membrana) también para el posible hallazgo de marcadores de artrosis. En esta fracción analizamos la actividad de las peptidasas que estaban unidas a membrana en la célula (Figura 39).

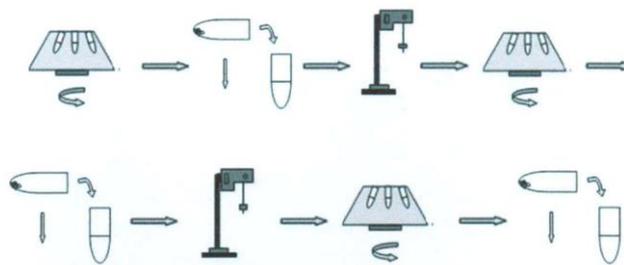


Figura 39.- Esquema del procedimiento utilizado para separar las tres diferentes fracciones ensayadas: La primera fracción sería el líquido sinovial. La segunda sería la porción soluble del sedimento. La tercera fracción sería la porción unida a membrana (solubilizada con Tritón X-100, véase texto).

Análisis de la actividad proteolítica en líquido sinovial y, segunda y tercera fracciones.
Determinación de las distintas actividades enzimáticas

4.1 MATERIAL

4.1.1 EQUIPAMIENTO

- Espectrofotómetro UV-2401 P. Shimadzu (Figura 40)
- Espectrofluorímetro. RF-540. Shimadzu (Figura 40)
- Ultracentrifugadora. OPTIMA L-100 XP. Beckman Coulter (Figura 41)
- Centrifugadora. Sorvall RC 28S. Du Pont (Figura 41).
- Rotor de ángulo fijo. TFT 45.6. Kontron
- Estufa de incubación HOTCOLD S. Selecta.
- Balanza de precisión. R180D. Sartorius.
- Homogenizador. PZR 50 Heidolph.
- Juego de puntas de teflón. Selecta.
- Agitador Magnético por mosca termostatizado. Agimatic-s. Selecta.
- pH-metro GLP 21. Crison
- Pipetas automáticas de precisión. Nychiryo.
- Dispensador universal. MuLtipette plus. Eppendorf
- Ultracongelador -80°C, MDF-U5 186 S. Sanyo.



Figura 40.- Espectrofotómetro UV-2401 P de Shimadzu y Espectrofluorímetro RF 540, también de Shimadzu.



Figura 41.- Ultracentrifugadora OPTIMA L-100 XP de Beckman Coulter y Centrifugadora Sorvall RC 28S de Du Pont.

4.1.2 REACTIVOS

- Acetato sódico tri-hidratado. Merck
- Ácido clorhídrico 35% Panreac
- Ácido acético glacial. Probus S.A
- Ácido ortofosfórico 85%. Merck
- Albúmina bovina. Sigma-Aldrich
- Captopril. Sigma-Aldrich
- Heparina. Sigma-Aldrich
- Albúmina bovina. Sigma-Aldrich
- Cloruro de manganeso. Merck
- Cloruro sódico. Merck
- Dimethyl-sulfóxido (DMSO). Sigma-Aldrich
- DL-Dithiothreitol (DTT). Sigma-Aldrich

Métodos

- EDTA.Merck
- Etanol absoluto. Probus S.A
- Fosfato sódico monobásico. Merck
- Fosfato sódico dibásico. Merck
- Puromicina. Sigma-Aldrich
- Tritón X-100. Sigma-Aldrich.
- Tris (hidroximetil) aminometazol (Trizma base). Sigma-Aldrich
- Azul brillante de Coomasie G-250. Sigma-Aldrich
- Z-Gly-Pro- β -naftilamina. Fluka
- L- Arg- β -naftilamida. Sigma-Aldrich
- L-Ala- β -naftilamida. Sigma-Aldrich
- L-Asp-AP- β -naftilamida. Sigma-Aldrich, H- Bachem
- Glu- β -naftilamida. Sigma-Aldrich
- Cys- β -naftilamida. Sigma-Aldrich
- N-Dansyl-D-Ala-Gly-pNO₂-Phe-Gly. Sigma-Aldrich
- H- Gly-Pro- β -naftilamida. Bachem
- 3-(2-furylacryloyl-l-Phe-Gly-Gly) (FAPGG) Trinity Biotech, Leiden, Holanda
- Abz-Ser-Pro-3-nitro-Tyr-OH (SPNPT) Bachem, Bubendorf, Suiza

4.1.3. SOLUCIONES

- Soluciones Tampón
- Tris-HCl 0,2 M
- Trizma base 24,22 gr + un litro de agua destilada (pH 7,4 utilizando HCl 1N)
- Tampón Fosfato 0,1 M.
- Solución A 19 mL + Solución B 81mL + Agua destilada hasta 200 ml (pH 7.4)
- Solución A: Fosfato sódico monobásico 0,2M 27,6 gr.+ Agua destilada hasta un litro
- Solución B: Fosfato sódico dibásico 0,2 M 28,4 gr.+ Agua destilada hasta un litro
- Tampón Acetato 0,1 M,
- Solución A 36,8 mL+ Solución B 13,2 mL+ Agua destilada hasta 200 mL (pH 4.2)
- Solución A: Ácido acético glacial 0,2 M 11,55 mL+ Agua destilada hasta un litro
- Solución B: Acetato sódico tri-hidratado+ Acetato sódico tri-hidratado 27,22 gr. + Agua destilada hasta un litro
- Sustratos enzimáticos de actividad endo/amino-peptidasa:
- Sustrato prolil endopeptidasa
- Z-Gly-Pro- β -naftilamina 0,125 M + DTT 2 mM + BSA 10 mg/100 ML + Tampón fosfato 50 mM
- Sustrato aminopeptidasa básica
- Arg- β -naftilamida 0,125 mM + NaCl X mM + BSA 10 mg/100 mL + Tampón fosfato 50 mM
- Sustrato aminopeptidasa neutra

- Ala- β -naftilamida 0,125 mM + DTT 2 mM + BSA 10 mg/100 mL + Tampón fosfato 50 mM
- Sustrato aspartil-aminopeptidasa
- Asp- β -naftilamida 0,125 mM + MnCl₂ X mM + BSA 10 mg/100 mL + Tampón Tris-HCl 50 mM
- Sustrato Aminopeptidasa ácida (Glu-aminopeptidasa):
- Glu- β -naftilamida 0,125 mM + DTT 2 mM + EDTA 2 mM + BSA 10 mg/100 ml + Tampón fosfato 50 mM
- Sustrato endopeptidasa neutra
- N-Dansyl-D-Ala-Gly-pNO₂-Phe-Gly 0,125 mM + BSA 10 mg/100 mL + Tampón Tris-HCl 50 mM
- Sustrato dipeptidil peptidasa IV
- H-Gly-Pro-W-naftilamida 0,125 mM + BSA 10 mg/100 mL + Tampón Tris- HCl 50 mM
- Sustrato Cys-aminopeptidasa
- Cys- β -naftilamida 0,125 mM + MnCl₂ X mM + BSA 10 mg/100 ml + Tampón Tris-HCl 50 mM
- Sustrato Aminopeptidasa sensible a Puromicina (PSA):
- Ala- β -naftilamida 0,125 mM + DTT 2 mM + BSA 10 mg/100 ml + Tampón fosfato 50 mM + 40 mM de Puromicina
- Soluciones para la determinación de la concentración de proteínas
- Reactivo de Bradford
- Azul brillante Coomasie 0,117 mM, etanol al 5% (v/v), Acido ortofosfórico al 15 %.
- Filtrar dos veces.

5 MÉTODOS

5.1 DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS ENDO/AMINO PEPTIDÁSICAS

Para obtener la concentración de una enzima en el líquido sinovial, se puede medir la velocidad de la reacción catalizada por dicha enzima. Para esto, se puede medir bien la disminución en la concentración de sustrato o bien el incremento en la concentración de los productos de la reacción en el tiempo, como es en este estudio.

Los sustratos artificiales más usados para la determinación de aminopeptidasas han sido los derivados amídicos de la β -naftilamina: las aminoacil- β -naftilamidas (a.a.- β -NA). Las peptidasas poseen la capacidad de romper dicho sustrato, generando aminoácidos libres y moléculas de β -naftilamina. Esta última molécula tiene la particularidad, que no tienen sus derivados amídicos, de ser fluorescente. De esta manera, cuando es excitada con una luz de 345 nm, emite parte de esta energía en una longitud de onda de 412 nm, lo que permite que la cantidad de β -naftilamina liberada pueda ser medida mediante un

espectrofluorimetro. La cantidad de producto fluorescente liberado está en función de la concentración/actividad del enzima presente en la muestra, de tal manera que la cantidad de β -naftilamina medida (es decir, producida: liberada) puede ser extrapolada a actividad peptidásica en la muestra estudiada mediante una recta patrón de regresión (véase más adelante).

5.1.1 Preparación de la muestra

Inicialmente, tras la obtención de las muestras sinoviales, el tejido (líquido sinovial) es depositado en tubos heparinizados, centrifugado a 5000 g durante tres minutos para eliminar debris del líquido en el pellet, y luego quedarnos con el sobrenadante (que es lo que se utiliza para las determinaciones), y almacenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su determinación. La obtención de cada muestra (fracción) de líquido sinovial la hemos explicado anteriormente en el apartado Muestras de Líquido Sinovial.

Tras su adecuado procesamiento, las muestras se someten a los ensayos enzimáticos específicos, todos basados en técnicas espectrofluorométricas. Para la determinación de las actividades peptidásicas seleccionadas: PSA, APN, APB, APA-Glu, NEP, PEP, ACE, ACE2, Asp-AP, Cys-AP y DPPIV, se utilizaron sustratos del tipo peptidil- o aminoacil-beta-naftilamida.

Concretamente, y como hemos presentado en material, los sustratos utilizados fueron Ala- β -naftilamida; H-Gly-Pro- β -naftilamida; H-Glu- β -naftilamida o Asp- β -naftilamida; Arg- β -naftilamida; Z-Gly-Pro- β -naftilamina y Cys- β -naftilamida, respectivamente.

Para la determinación de la NEP se empleó un ensayo fluorométrico también, pero en este caso el sustrato fue el N-Dansyl- D-Ala-Gly-pNO₂-Phe-Gly (DAGNPG).

5.1.2 Técnica para la cuantificación de proteínas

El método de determinación de proteínas totales está basado en la afinidad de los polipéptidos por un colorante, el Azul brillante de Coomassie G-250 (Bradford et al., 1976). La unión del colorante a las proteínas produce un cambio en la longitud de onda de máxima absorción del citado compuesto que pasa de 465 nm a 595 nm. El incremento de absorción, siempre y cuando exista un exceso de colorante, es directamente proporcional a la cantidad de proteína, por lo que este es el parámetro que se mide, utilizando un espectrofotómetro a 595 nm.

Para ello se añaden inicialmente 2 ml del reactivo de Bradford a 10 μl de muestra. A continuación, se lee la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro. Dicho valor se determina frente a un blanco de reactivo (2 ml de reactivo de Bradford sin muestra).

El resultado de la medición se transforma en miligramos de proteína por mililitro, utilizando para ello una curva de calibración ($y = ax + b$) que obtenemos tras medir por el mismo procedimiento, concentraciones crecientes y conocidas de una solución estándar de albúmina bovina.

La extrapolación se lleva a cabo en una hoja Excel de Office. Determinamos para cada una de las muestras los mg de proteína.

5.1.3 Ensayo enzimático

Las aminopeptidasas ensayadas han sido APA, APB, APN, Asp-AP, Cys-AP, DPPIV, PEP, PSA y NEP. Para medir su actividad peptidásica se usan sustratos del tipo peptidil- β -naftilamida o aminoacil- β -naftilamida (recordemos: amidas), cada uno específico de la enzima a ensayar.

Para producir la reacción, se añade 1 ml de sustrato artificial fluorogénico a cada muestra (30 μ l de muestra en el caso de APB, APN y PSA, y 50 μ l para Asp-AP, Cys-AP, DPPIV, PEP y APA-Glu; para el cálculo final en la hoja excel la equivalencia es de 10 μ l de muestra, aunque se utilice una mayor para determinar las actividades). Se deja que la reacción transcurra durante 30 minutos a 37°C en la estufa de incubación. Tras este tiempo la reacción se detiene mediante la adición de 1ml de tampón acetato 0,1M a pH 4,2. A continuación, se determina la actividad enzimática por métodos espectrofluorométricos, para lo que empleamos un espectrofluorímetro (en nuestro caso de Shimadzu).

El ensayo se realiza controlado para cada enzima, con extracto enzimático y sustrato en presencia de ácido acético para que no sea posible la reacción. Los valores se determinan empleando como blanco tubos que contienen tampón Tris-HCl, a modo de “cero” de calibrado.

Todas las muestras se ensayan por triplicado y se calcula la media y el error estándar. Los valores obtenidos espectrofluorimétricamente son transformados en picomoles de metabolito liberado mediante extrapolación, por ajuste no lineal, de los datos a una ecuación de regresión calculada a partir de una curva patrón con concentraciones crecientes (conocidas) de beta-naftilamina. Posteriormente, estos datos se convierten a unidades de actividad peptidásica (UP), definiéndose dicha unidad como la cantidad de enzima que hidroliza un picomol de sustrato por minuto. Los resultados finales se expresan como actividad específica (unidades de actividad peptidásica/mg proteína) (UAP/mg proteína).

Determinación concreta de la actividad de las aminopeptidasas. Fundamento particular para cada enzima.

La concentración de un enzima en un tejido o líquido puede determinarse midiendo la velocidad de una reacción catalizada por el enzima en cuestión. Uno de los métodos que puede ser utilizado (de manera muy habitual) para ello, es medir la disminución en la concentración de sustrato con el tiempo o medir el incremento que con el tiempo se produce en algunos de los productos de reacción.

Los sustratos artificiales más usados para la determinación de aminopeptidasas han sido sin lugar a duda los derivados amídicos de la 2-naftilamina: las denominadas aminoacil-2-naftilamidas o aminoacil- β -naftilamidas. Estos sustratos fueron introducidos por primera vez por Gomori (1954) y, desde entonces, se han obtenido derivados de todos los aminoácidos, de muchos dipéptidos e, incluso, de compuestos que han permitido la detección de diversas endopeptidasas.

En los ensayos iniciales, la 2-naftilamina liberada por la acción enzimática se acoplaba a una diazosal que producía color rojo o azul (dependiendo de la sal de acoplamiento

considerada), que podía ser medida espectrofotométricamente a 520 nm. Este método se ha aplicado en ocasiones también para la determinación histoquímica de aminopeptidasas (Gomori, 1954). Pero la 2-naftilamina liberada puede también medirse fluorimétricamente de manera más sencilla sin necesidad del posterior acoplamiento a la diazosal, siendo este método desarrollado inicialmente por Greenberg en 1962, y posteriormente modificado por Alba et al. en 1989 y, en algunos casos, por nuestro propio equipo de investigación (Fernández et al., 2002).

5.1.4 Fundamento general

Se incubaba el sustrato artificial adecuado para cada enzima junto con la muestra de líquido sinovial. La presencia de aminopeptidasas hará que la aminoacil-2-naftilamida se rompa liberando los aminoácidos libres por un lado (no detectables) y moléculas de 2-naftilamina por otro (detectables fluorimétricamente) (figura 41). Como hemos mencionado, esta molécula tiene la particularidad (que no posee el reactivo completo amídico) de ser fluorescente, y cuando es excitada con luz de 345 nm emite parte de esa energía a una longitud de onda de 412 nm. Esta propiedad permite que la cantidad de 2-naftilamina liberada pueda ser medida muy fácilmente mediante un espectrofluorímetro. La cantidad de 2-naftilamina liberada es directamente proporcional a la concentración del enzima en la muestra, de manera que la medida de 2-naftilamina puede ser extrapolada a concentración/actividad de aminopeptidasa presente en la muestra sinovial, todo ello mediante la utilización de una recta patrón realizada con concentraciones crecientes (o decrecientes) de 2-naftilamina (figura 42). Concretamente, los valores obtenidos en el fluorímetro son transformados en picomoles de beta-naftilamina liberada, mediante una ecuación obtenida tras la determinación de concentraciones decrecientes de 2-naftilamina, en un medio de solución igual al del sustrato utilizado.

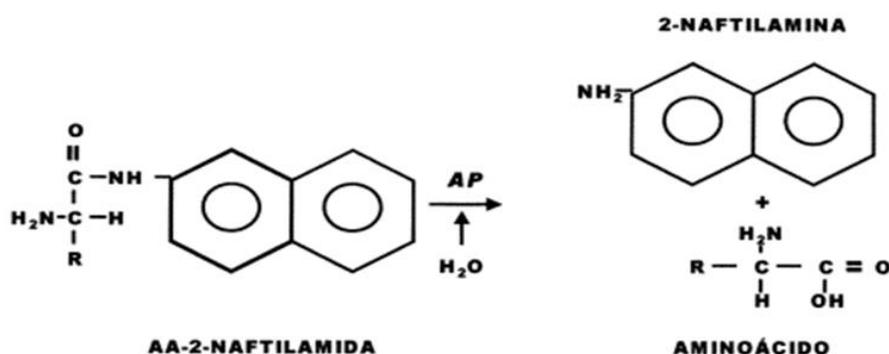


Figura 42.-Esquema de la hidrólisis del sustrato de peptidasa en el ensayo enzimático. Uno de los productos obtenidos, la β-naftilamina, emite fluorescencia a 412 nm cuando es excitado a 345 nm.

Todas las determinaciones se llevan a cabo por triplicado para comprobar la idoneidad de la realización de las pruebas analíticas, empleándose como resultado final la media de las mismas.

Las muestras sinoviales (10 μ l) se incuban a temperatura fisiológica (37°C) junto con 1 ml del sustrato artificial fluorogénico (Ala- β -naftilamida; H-Gly-Pro- β -naftilamida; H-Glu- β -naftilamida o Asp-AP- β -naftilamida; Arg- β -naftilamida y Cys- β -naftilamida). La presencia de aminopeptidasas en la muestra hace, como hemos comentado, que la aminoacil-beta-naftilamida (recordemos: amida) se rompa liberando aminoácidos libres y moléculas de beta-naftilamina (recordemos: amina).

La NEP es una peptidasa unida a membrana que degrada encefalinas por ruptura del enlace Gly³-Phe⁴. Un método similar a los anteriores para determinar su actividad es el fluorimétrico, pero basado en la utilización del sustrato artificial fluorogénico DAGNPG: N-Dansyl-D-Ala-Gly-(p-Nitro)-Phe-Gly.

En este caso, 10 μ l de líquido sinovial son incubados con 1 ml de sustrato. La presencia de NEP en la muestra provoca la ruptura del enlace nitro-fenil, Gly-(pNO₂)Phe, en la secuencia peptídica (figura 43).

En el DAGNPG, la fluorescencia nativa del grupo Dansyl está apantallada por la proximidad espacial del grupo (pNO₂)Phe. De esta manera, cuando el péptido N-Dansyl-D-Ala-Gly (DAG) es liberado por la acción enzimática se produce un aumento de la fluorescencia que puede ser detectada y cuantificada a longitudes de onda de excitación y de emisión de 342 y 562 nm, respectivamente (vemos que diferentes longitudes de onda que en el caso del resto de aminopeptidasas) (Figura 43). Esta propiedad permite (de forma similar a la explicada para las otras peptidasas) que el dansyl liberado pueda ser medido muy mediante un fluorímetro. La cantidad de producto fluorescente liberado está controlado por la concentración del enzima en la muestra, de manera que el DAG detectado fluorimétricamente puede ser extrapolado a concentración endopeptidasa neutra en el tejido estudiado, nuevamente mediante la utilización de una recta patrón.

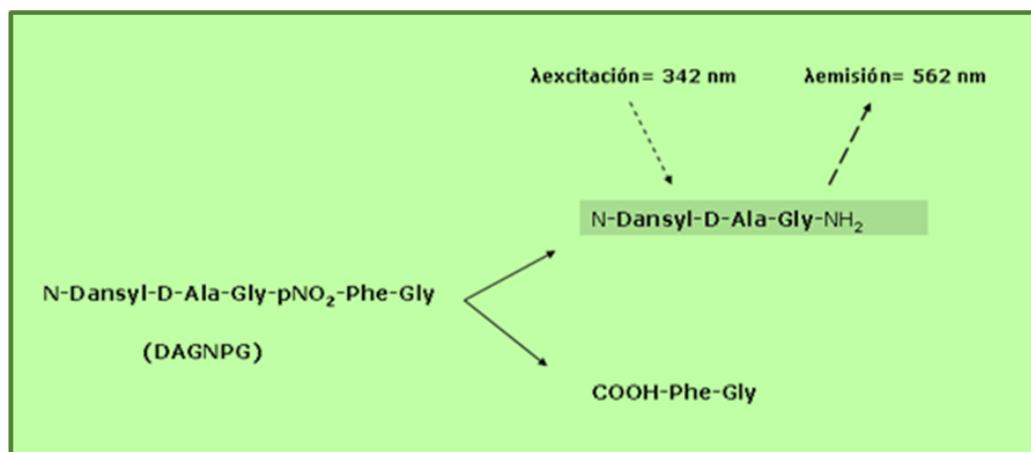


Figura 43.- Esquema de la hidrólisis del sustrato de NEP en el ensayo enzimático. Uno de los productos obtenidos, el Dansyl-D-Ala-Gly (DAG), emite fluorescencia a 562 nm con excitación a 342 nm.

5.2 ANÁLISIS DE DATOS DE LAS ACTIVIDADES PEPTIDÁSICAS

Los valores obtenidos espectrofluorimétricamente o fotométricamente fueron transformados en picomoles de metabolito liberado mediante extrapolación, por ajuste no lineal, de los datos a una ecuación de regresión calculada a partir de una curva patrón.

Posteriormente, estos datos fueron convertidos en unidades de actividad peptidasa (UAP), definiéndose dicha unidad como la cantidad de enzima que hidroliza un picomol de sustrato por minuto. Los resultados finales se expresaron como actividad específica (unidades de actividad peptidásica/mg proteína).

5.2.1 Determinación de enzima convertidor de angiotensina (ACE) y enzima convertidor de angiotensina 2 (ACE2)

Para la determinación de estos enzimas no se utilizan sustratos del tipo aminoacil-b-naftilamidas, por lo que las presentamos separadamente de las anteriores, y además la determinación puede ser fotométrica (ACE) o fluorimétrica (ACE2), en este caso con diferentes ondas de excitación y transmisión.

5.2.2 Determinación de enzima convertidor de angiotensina (ACE)

Sustrato enzimático:

FAPGG (3-(2-furylacryloyl-l-Phe-Gly-Gly (0,8 mM, pH 8), en solución 300 mM de NaCl, con albúmina bovina sérica (BSA) en una concentración de 0,1 mg/ml. El sustrato se prepara en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,4).

5.2.3 Determinación de la actividad ACE

Como hemos mencionado, la determinación de la actividad enzimática ACE (Homquist et al., 1979) utilizamos el sustrato artificial FAPGG (3-(2-furylacryloyl-l-Phe-Gly-Gly). El enzima rompe la unión Phe-Gly, produciéndose FAP (3-(2-furylacryloyl-l-Phe) (detectable fotométricamente) y Gly-Gly (Figura 44). Inmediatamente se incuban 90 μ l de sustrato con 10 μ l de muestra y se mide la absorbancia, a una longitud de onda de 340 nm, mediante el fotómetro (25 °C). Tras 30 min de incubación volvemos a medir la absorbancia (340 nm). El cambio del espectro de la absorbancia durante este período corresponde a la acción que la enzima tiene sobre el sustrato. Para verificar que la liberación de FAP fue mayoritariamente debida a la acción de la ACE, se realizan ensayos de inhibición con captopril (10 μ M) en muestras sinoviales. La inhibición obtenida fue en todos los casos del 100%.

La actividad enzimática, al igual que en los casos anteriores, la expresamos como unidades de actividad peptidásica (UAP) (pmol de sustrato fluorogénico hidrolizado/min)/mg de proteína.

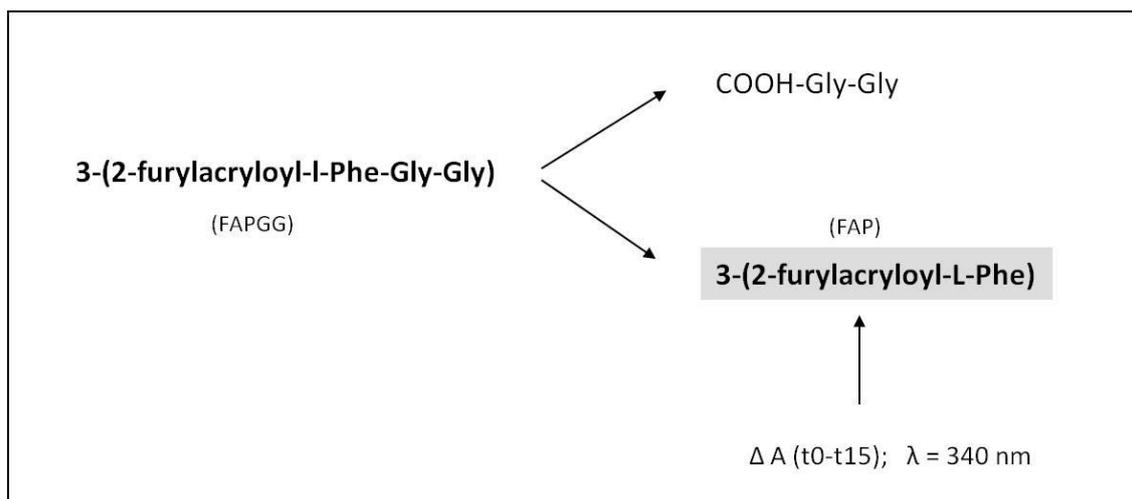


Figura 44.-Hidrólisis de 3-(2-furylacryloyl-L-Phe-Gly-Gly)(FAPGG) por acción de la actividad ACE. Se mide la absorbancia de 3-(2-furylacryloyl-L-Phe)(FAP), en diferentes tiempos (0 y 30 minutos) a 340 nm.

5.2.2 Determinación de enzima convertidor de angiotensina 2 (ACE2)

Sustrato enzimático:

Abz-Ser-Pro-3-nitro-Tyr-OH (SPNPT) (0.1 mM, pH 6.5), con albúmina bovina sérica (BSA) en una concentración de 0,1 mg/ml. El sustrato se prepara en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,4).

5.2.3 Determinación de la actividad ACE2:

Para la determinación de esta actividad utilizamos el Método de Yan y Cols. (2003), empleando el sustrato artificial (en este caso fluorogénico) SPNPT (Abz-Ser-Pro-3-nitro-Tyr-OH). Incubamos 10 μl de muestra con 10 ml de sustrato durante dos horas a 37 $^{\circ}\text{C}$, tras lo que se detiene la reacción añadiendo 1 ml de 0,1 M de acetato pH 4,2 (al igual que con las aminopeptidasas). Tras detener la reacción medimos espectrofluorimétricamente la actividad ACE2, de manera similar a las APs, pero en este caso a 360 nm de excitación y 410 nm de emisión (Figura 45).

El enzima hidroliza el sustrato liberando Abz-Ser-Pro y 3-nitro-Tyr-OH, detectable, como decimos, fluorimétricamente. La cantidad de 3-nitro-Tyr-OH liberada es directamente proporcional a la concentración del enzima en la muestra, de manera que la medida de 3-nitro-Tyr-OH puede ser extrapolada a concentración/actividad de ACE2 presente en la muestra sinovial mediante la utilización de una recta patrón realizada con concentraciones crecientes (o decrecientes) de 3-nitro-Tyr-OH. Concretamente, los valores obtenidos en el fluorímetro son transformados en picomoles de 3-nitro-Tyr-OH liberada, mediante una ecuación obtenida tras la determinación de concentraciones decrecientes de la misma, en un medio de solución igual al del sustrato utilizado.

Finalmente, en este caso, los ensayos de inhibición de la ACE2 con DX-600 (1 μM) mostraron una inhibición del 97%.

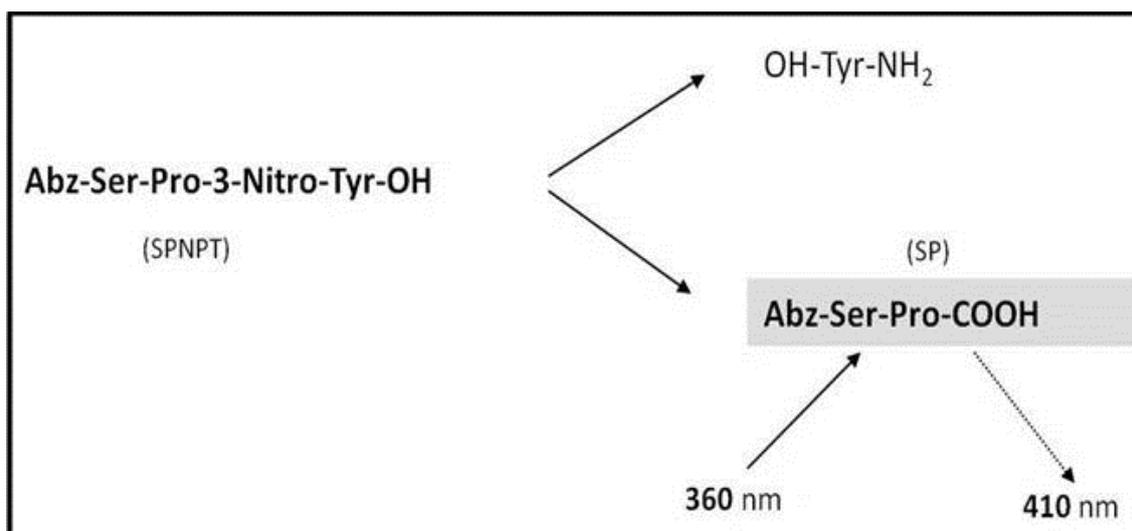


Figura 45.-Hidrólisis de Abz-Ser-Pro-3-nitro-Tyr-OH (SPNPT) por acción de la ACE2.

6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Como se ha mencionado, se trata de un estudio analítico observacional y prospectivo en 24 pacientes, 14 hombres y 10 mujeres.

Para el análisis descriptivo de los datos se utilizan la media y la mediana como parámetros centrales y la desviación típica como parámetro de dispersión para las variables cuantitativas. Las variables categóricas se describen como proporciones.

Previamente al análisis de la posible asociación entre los niveles de aminopeptidasas determinadas en muestras de líquido sinovial de los pacientes en función del sexo, la edad o el grado de artrosis, se exploró si las distribuciones de los valores se ajustaban a una distribución normal (prueba de Kolmogorov – Smirnov).

Se han realizado análisis paramétricos y no paramétricos para todas las comparativas realizadas en todas las tablas. Para el análisis paramétrico, los valores se transformaron para ajustarlos a la distribución normal (datos no mostrados).

Se utilizó el test de χ^2 para analizar la posible asociación entre variables categóricas. Para analizar la posible asociación de las distintas aminopeptidasas con variables como sexo o grupo de artrosis se utilizaron las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney y análisis bidimensional de Friedmann (análisis de la varianza por rangos en muestras relacionadas, puesto que se trata de un diseño con medidas repetidas).

Se ha realizado por una parte el análisis de diferencias entre los momentos de observación y por otra, la diferencia por grupos de artrosis, todo ello en las 3 localizaciones estudiadas. Además, se ha realizado el análisis de la varianza para medidas repetidas de las variables transformadas (test de Hotelling (normalidad multivariante); se ha realizado el test de esfericidad Mauchly para ver si se puede aplicar y se ha aplicado la corrección de Greenhouse-Geisser cuando era necesario.

En algunas aminopeptidasas por problemas con la técnica, en pacientes puntuales no hemos obtenido ningún valor. Estos pacientes se han omitido para el análisis estadístico de esa aminopeptidasa. Para el caso de valores aislados perdidos de algún momento muestra, este ha sido sustituido por la media.

Los resultados se han considerado estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$. En cada tabla se han señalado los valores con diferencias significativas, identificados con la leyenda a pie de tabla.

El análisis estadístico se ha hecho empleando el programa SPSS (versión 24.0). Las tablas se han realizado usando Excel y Word de Microsoft Office.

RESULTADOS

Para el análisis de los resultados obtenidos en laboratorio, hemos de tener en cuenta que tenemos 3 muestras de cada uno de los 24 pacientes, una de cada uno de los 3 momentos diferentes en el tratamiento. Cada una de estas muestras se ha ensayado para cada una de las 11 peptidasas objeto de este estudio (y la determinación de proteínas), para 3 localizaciones diferentes: líquido sinovial, citosol y membrana celular. Además, como hemos mencionado cada análisis se ha realizado por triplicado. Con esto tenemos más de 7500 determinaciones realizadas, que nos dejan unos 2500 valores a analizar.

En un primer apartado hemos realizado un análisis de las características de epidemiológicas de los pacientes. Después hemos realizado un análisis descriptivo de los datos obtenidos y por últimos una comparativa entre diferentes grupos, localización y momentos de las muestras.

1 VARIABLES EPIDEMIOLOGICAS

Tenemos una muestra de 24 pacientes de los que 14 son hombres y 10 son mujeres. Tienen una edad comprendida entre 52 y 92 años, siendo la edad media 68.67. La edad media en los hombres es de 68,21 y en las mujeres de 69.30, sin diferencias significativas ($p=0,794$).

Tabla 3.- Características de los pacientes estudiados

	Total		Hombre		Mujer		p
	n	%	n	%	n	%	
	24	100,0	14	58,3	10	41,7	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	
Edad	68,67	9,707	68,21	8,737	69,30	11,392	0,794
Grado de artrosis	n	%	n	%	n	%	
I	2	8,3	1	6,3%	1	8,3%	0,088
II	8	33,3	4	25,0%	6	50,0%	
III	13	54,2	11	68,8%	3	25,0%	
IV	1	4,2	0	0,0%	2	16,7%	
Grupo de artrosis	n	%	n	%	n	%	
Artrosis menos de III	10	41,7	4 _a	28,6%	6 _a	60,0%	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	
Edad	62,20	6,443	58,20	7,362	64,43	5,473	0,003
	n	%	n	%	n	%	
Artrosis III o más	14	58,3	10 _a	71,4%	4 _a	40,0%	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	
Edad	73,29	9,101	71,18	6,646	79,20	12,377	0,053

DE: Desviación estándar

Tenemos pacientes de los 4 grados de artrosis según Kellgren-Lawrence, con una distribución que podemos ver en la Tabla 3. Además, para el análisis posterior se han creado 2 grupos de pacientes. Un grupo con pacientes con un menor grado de artrosis radiológica (grados I y II) que lo componen 10 pacientes y otro con artrosis más avanzada (grados III y IV) con 14 pacientes. Como cabe esperar la edad media es menor en el grupo de menor artrosis. Además, las mujeres presentan mayor edad media en ambos grupos, de forma significativa en el grupo de menor artrosis.

2 ANALISIS DESCRIPTIVO

Hemos obtenido actividad de las 11 aminopeptidasas en líquido sinovial. Con esto demostramos no solo que están presentes en el líquido sinovial, sino que presentan actividad aminopeptidásica en su forma soluble.

También hemos estudiado la actividad aminopeptidásica en la fracción membrana en 8 de ellas, observando actividad en 7. Con esto demostramos que estas 7 aminopeptidasas también se encuentran unidas a membrana y presentan actividad en esta localización.

Además, hemos estudiado la actividad en la fracción citosol en 9 de ellas, observando actividad en 8 de ellas. Con lo que estas 8 aminopeptidasas están presentes de forma activa en el citosol celular.

En la tabla 4 recogemos varios valores descriptivos de las diferentes aminopeptidasas en líquido sinovial, fracción membrana y citosol de forma basal (antes de tratamiento). Estos datos nos permiten hacernos una idea global de la actividad que presentan estas aminopeptidasas en líquido sinovial de pacientes con artrosis de rodilla, y también en citosol y en la fracción unida a membrana.

Tabla 4.- Valores descriptivos de las diferentes aminopeptidasas en líquido sinovial, fracción membrana y citosol de forma basal (antes del tratamiento)

Determinación	Muestra	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Proteína (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	22,6	23,3	9,9	7,6	40,4
	Citosol	1,3	1,6	1,1	0,01	3,3
	Membrana	2,9	3,8	2,0	0,6	7,5
PSA (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	245,5	234,5	79,2	143,7	480,2
	Citosol	285,1	241,6	175,1	67,0	645,8
	Membrana	119,6	106,1	104,6	1,5	436,3
APN (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	142,7	125,9	72,0	48,1	357,6
	Citosol	1177,2	256,7	1719,6	70,3	5885,5
	Membrana	76,3	51,7	87,6	0,0	397,2
APB (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	138,6	91,6	123,7	52,7	628,5
	Citosol	767,9	184,2	1049,4	43,0	3802,9
	Membrana	22,8	20,7	22,3	0,0	91,5
APAGLU (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	24,1	21,6	7,9	13,0	41,6
	Citosol	188,6	20,5	299,8	1,7	1067,9
	Membrana	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NEP (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	130,1	99,6	68,2	50,1	293,5
	Citosol	3569,6	139,4	6698,7	36,1	23360,3
	Membrana	194,6	238,5	108,5	35,3	349,6
PEP (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	2,9	2,9	1,2	0,0	5,5
	Citosol	104,6	5,6	216,8	0,0	605,4
	Membrana	8,2	0,0	22,9	0,0	89,5
ACE (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	7,6	6,6	5,7	0,0	19,9
ACE2 (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	0,7	0,3	0,9	0,0	2,7
ASP (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	4,1	3,9	1,6	1,7	7,9
	Citosol	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Membrana	0,3	0,0	1,5	0,0	7,4
DPPIV (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	331,0	270,8	135,2	176,8	600,7
	Citosol	6318,1	370,5	14139,8	76,7	65798,4
CYS (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	24,1	21,0	14,0	6,2	69,0
	Citosol	738,1	252,0	1083,1	95,8	4636,4
	Membrana	101,3	85,5	97,3	0,0	311,5

Tabla 5.- Descripción de los valores basales de las aminopeptidasas consideradas en líquido sinovial, en citosol y en membrana por sexo

Determinación	Muestra	Hombres					Mujeres				
		Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Proteína (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	23,2	26,2	10,5	7,6	40,4	21,6	21,0	9,4	8,2	33,7
	Citosol	1,3	1,4	1,1	0,01	3,3	1,3	1,7	1,0	0,1	2,4
	Membrana	2,6	3,1	1,8	0,7	4,8	3,3	4,3	2,4	0,6	7,5
PSA (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	256,2	234,5	91,8	143,7	480,2	230,5	224,2	58,5	149,1	354,3
	Citosol	221,0	219,3	121,6	67,0	451,7	381,2	337,4	209,2	154,9	645,8
	Membrana	148,4	130,4	123,9	12,7	436,3	79,2	92,4	51,7	1,5	139,3
APN (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	140,1	131,3	54,1	61,6	261,8	146,3	119,6	94,9	48,1	357,6
	Citosol	1190,8	268,8	1933,9	70,3	5885,5	1158,1	228,2	1467,5	87,5	4443,1
	Membrana	95,7	76,3	105,9	0,0	397,2	49,1	35,2	45,0	4,0	152,3
APB (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	120,4	89,7	75,5	52,7	321,2	164,0	104,6	172,2	53,0	628,5
	Citosol	761,4	189,2	1121,3	43,0	3802,9	777,0	176,5	998,8	67,3	3003,4
	Membrana	28,5	24,4	26,0	0,0	91,5	14,9	11,6	13,1	1,1	39,2
APAGLU (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	24,9	22,1	8,4	13,2	41,6	22,8	21,1	7,5	13,0	36,3
	Citosol	177,8	32,4	337,0	9,3	1067,9	204,0	18,1	262,5	1,7	657,9
	Membrana	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NEP (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	143,2	99,6	73,7	72,9	293,5	110,0	98,1	62,2	50,1	221,7
	Citosol	4778,3	153,6	8270,5	36,1	23360,3	1689,4	116,2	2390,6	79,1	5523,8
	Membrana	204,3	267,0	116,4	37,9	349,6	179,6	195,6	99,7	35,3	286,8
PEP (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	2,8	2,9	1,1	0,0	3,8	3,2	2,8	1,5	1,1	5,5
	Citosol	81,8	5,3	211,7	0,0	605,4	141,0	5,6	244,7	0,0	568,0
	Membrana	12,2	0,0	29,3	0,0	89,5	2,2	0,0	4,3	0,0	10,9
ACE (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	8,4	6,8	6,7	0,0	19,9	6,5	6,1	3,8	0,0	12,7
ACE2 (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	0,7	0,3	0,9	0,0	2,7	0,7	0,3	1,0	0,0	2,6
ASP (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	4,1	3,7	1,6	1,7	7,5	4,1	4,0	1,6	2,3	7,9
	Citosol	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Membrana	0,5	0,0	2,0	0,0	7,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DPPIV (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	334,5	272,7	144,9	176,8	587,8	326,0	259,2	127,7	230,8	600,7
	Citosol	7994,4	489,3	17649,5	76,7	65798,4	3971,4	188,9	7106,4	89,6	22510,9
CYS (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	21,6	19,5	11,5	6,2	54,2	27,5	23,4	17,0	7,9	69,0
	Citosol	750,9	252,0	1251,2	95,8	4636,4	720,2	238,9	857,8	129,4	2280,4
	Membrana	106,0	93,0	103,4	0,0	311,5	94,9	64,0	93,0	0,6	241,7

DE: Desviación estándar

En la tabla 5 desglosamos los datos por sexo para todas las aminopeptidasas y localizaciones. No hay diferencias significativas por sexo en los valores basales de ninguna aminopeptidasa en líquido sinovial, en citosol o en membrana.

Vemos que en aquellas aminopeptidasas y localizaciones que la actividad destaca por ser mayor o menor, esta sigue el mismo patrón tanto en hombres como mujeres. Así, no hemos obtenido diferencias significativas en el análisis comparativo en ninguna de las aminopeptidasas y para ninguna de las localizaciones, excepto para la media de ASP en líquido sinovial tras la primera infiltración (segunda determinación), entre hombres y mujeres, siendo significativamente mayor en hombres (Tabla 6).

Tabla 6.- Descripción ASP en líquido sinovial de segunda muestra, en hombres y en mujeres

		n	Media	DE	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
							Inferior	Superior
ASP en líquido sinovial de segunda muestra (UP/mg de proteína)	Hombre	14	4,92*	1,92	1,68	0,59	0,46	2,91
	Mujer	10	3,24	0,89				

*p=0,01

También hemos desglosado el análisis de los datos en los 2 grupos por grado de artrosis que hemos mencionado. Recogemos la media, mediana, desviación estándar, mínimo y máximo de todas las localizaciones ensayadas para todas las aminopeptidasas (Tabla 7).

Al realizar la comparativa por grupos de artrosis si hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la media de 3 aminopeptidasas. La media de PSA en membrana para el grupo de mayor artrosis es 161,3 UP/mg de proteína, mientras que para el de menor artrosis es de 61,1 UP/mg de proteína. Para la APN en membrana tenemos una media de 103,7 UP/mg de proteína en los de mayor artrosis, frente a 37,9 UP/mg de proteína en los de menor. Y, por último, para la actividad de APB también en membrana, esta es de 32,1 UP/mg de proteína en los de mayor artrosis, frente a 9,7 UP/mg de proteína en los de menor artrosis. Estas tres diferencias de las medias son estadísticamente significativas con una $p < 0.05$.

Tabla 7.- Descripción de los valores basales de las aminopeptidasas consideradas en líquido sinovial, en citosol y en membrana según grado de artrosis

Determinación	Muestra	Artrosis menos de III					Artrosis III o más				
		Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Proteína (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	21,6	22,3	9,3	8,2	34,2	23,2	26,3	10,5	7,6	40,4
	Citosol	1,3	1,7	1,1	0,1	2,7	1,2	1,4	1,1	0,0	3,3
	Membrana	3,3	4,2	2,4	0,6	7,5	2,6	3,1	1,7	0,7	4,5
PSA (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	253,7	231,8	82,8	143,7	428,4	239,6	234,5	79,1	149,1	480,2
	Citosol	305,0	161,5	243,4	67,0	645,8	267,7	267,4	99,1	119,9	451,7
	Membrana	61,1	49,5	52,2	1,5	151,6	161,3*	131,2	113,8	12,7	436,3
APN (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	119,1	103,3	60,3	48,1	249,5	159,5	146,6	77,0	66,8	357,6
	Citosol	960,8	228,2	1391,1	73,1	4443,1	1331,8	268,8	1957,0	70,3	5885,5
	Membrana	37,9	27,5	44,8	4,0	154,3	103,7*	81,7	101,2	0,0	397,2
APB (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	113,8	108,7	57,9	52,7	212,6	156,3	89,7	154,7	64,2	628,5
	Citosol	546,8	176,5	676,8	43,1	1863,9	925,9	189,2	1251,6	43,0	3802,9
	Membrana	9,7	5,8	8,7	0,0	22,0	32,1*	30,2	24,6	0,0	91,5
APAGLU (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	21,0	20,2	5,8	13,2	33,3	26,2	23,4	8,7	13,0	41,6
	Citosol	275,3	218,1	321,7	7,0	657,9	161,9	20,5	301,2	1,7	1067,9
	Membrana	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NEP (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	119,2	106,6	53,5	50,1	221,7	137,3	96,6	79,9	55,9	293,5
	Citosol	1965,1	116,2	3147,2	36,1	8658,7	4601,1	153,6	8180,2	68,9	23360,3
	Membrana	186,0	238,5	114,0	35,3	308,6	200,1	232,9	108,8	43,5	349,6
PEP (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	2,9	2,4	1,0	1,9	4,3	2,9	3,0	1,4	0,0	5,5
	Citosol	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	123,6	9,7	232,0	0,0	605,4
	Membrana	2,6	0,0	4,7	0,0	10,9	10,9	0,0	27,9	0,0	89,5
ACE (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	6,8	6,8	3,7	0,0	11,6	8,2	5,7	6,8	0,0	19,9
ACE2 (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	0,6	0,4	0,7	0,0	2,1	0,8	0,3	1,0	0,0	2,7
ASP (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	4,1	3,8	2,1	1,7	7,9	4,0	3,9	1,1	2,3	6,5
	Citosol	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Membrana	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	2,0	0,0	7,4
DPPIV (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	337,0	273,2	135,8	176,8	600,7	326,7	270,2	139,7	198,1	587,8
	Citosol	3396,1	181,0	6927,5	76,7	22510,9	8405,3	489,3	17585,4	89,6	65798,4
CYS (UP/mg de proteína)	Líquido sinovial	19,8	21,4	7,5	6,2	30,0	27,1	21,0	16,9	7,9	69,0
	Citosol	450,8	207,6	663,8	106,1	2280,4	943,4	252,0	1289,0	95,8	4636,4
	Membrana	104,0	60,4	104,1	0,0	241,7	99,4	92,9	96,0	0,0	311,5

DE: Desviación estándar. *p<0,05

ANÁLISIS DE LAS AMINOPEPTIDASAS

Hemos desglosado y analizado los datos por separado para cada aminopeptidasa en todas las localizaciones estudiadas y en los 3 momentos analizados para el total de los pacientes, para hombres, mujeres y según grupo de artrosis. Para ello reflejamos los datos de cada aminopeptidasa en las siguientes tablas:

- Una en la que recogemos los datos basales. En las columnas recogemos la media, mediana, desviación estándar, mínimo y máximo; en las filas representamos el total, los hombres, las mujeres y los 2 grupos de artrosis, y ello en las 3 localizaciones. Se ha realizado un análisis comparativo estadístico en busca de diferencias por sexo y por grupos de artrosis.
- Otra tabla en la que hemos recogido como varían los niveles de actividad a lo largo del estudio en cada localización estudiada (filas), para el total de los pacientes, y para los 2 grupos de artrosis. Hemos realizado el análisis estadístico en busca de diferencias en los valores entre los 3 momentos en cada localización (también representado en las filas). También hemos analizado diferencias que pudiesen existir entre los valores del grupo de menor artrosis respecto del grupo de pacientes con mayor grado de artrosis.

Asimismo, dejamos recogido su correspondiente apartado para los niveles de proteína.

APN

Hemos obtenido actividad de APN en líquido sinovial, citosol y en fracción unida a membrana. En citosol es donde mayor actividad muestra, siendo más del doble que en líquido sinovial y unas 5 respecto a membrana, donde muestra la menor actividad. La actividad en citosol presenta el mayor rango de valores, habiendo la mayor diferencia entre el paciente con menor actividad y mayor. No hemos encontrado diferencias por sexo o grupo de artrosis para los datos basales (Tabla 8).

En las pruebas no paramétricas hallamos diferencias significativas (a) en la distribución de APN en líquido sinovial entre 1ª, 2ª y 3ª observación en el grupo de artrosis más leve. Hallamos diferencias significativas (b) en la distribución de APN en membrana en la muestra basal entre los pacientes con artrosis menor (27,5 UP/mg de proteína) y con artrosis mayor (81,7 UP/mg de proteína). En la misma localización para la segunda muestra, también existen diferencias significativas (c) en la misma dirección, que muestran menor actividad para el grupo de menor artrosis (14,8 UP/mg de proteína) y mayor (116,7 UP/mg de proteína) para el de mayor artrosis.

Se ha realizado el análisis de la varianza para medidas repetidas de las variables transformadas (test de Hotelling (normalidad multivariante) y test de esfericidad Mauchly indican que se puede aplicar, con corrección de Greenhouse-Geisser: no hay diferencias significativas intra-sujetos (entre los tres momentos de observación) pero sí inter-sujetos (según grado de artrosis) por la edad en las determinaciones de APN en líquido sinovial y APN en membrana. Esto nos viene a reflejar que hay diferencias entre los momentos en el grupo de artrosis leve pero no en el de artrosis grave (Tabla 9).

Tabla 8.- Descripción de los valores basales de APN en líquido sinovial, en citosol y en membrana (UP/mg de proteína). Total, por sexo y por grupo de artrosis.

	Muestra	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Total	Líquido sinovial	142,7	125,9	72,1	48,1	357,6
	Citosol	1177,2	256,7	1719,6	70,3	5885,5
	Membrana	76,3	51,7	87,6	0,0	397,2
Hombres	Líquido sinovial	140,1	131,3	54,1	61,6	261,8
	Citosol	1190,8	268,8	1933,9	70,3	5885,5
	Membrana	95,7	76,3	105,9	0,0	397,2
Mujeres	Líquido sinovial	146,3	119,6	94,9	48,1	357,6
	Citosol	1158,1	228,2	1467,5	87,5	4443,1
	Membrana	49,1	35,2	45,0	4,0	152,3
Artrosis menos de III	Líquido sinovial	119,1	103,3	60,3	48,1	249,5
	Citosol	960,8	228,2	1391,1	73,1	4443,1
	Membrana	37,9	27,5	44,8	4,0	154,3
Artrosis III o más	Líquido sinovial	159,5	146,6	77,0	66,8	357,6
	Citosol	1331,8	268,8	1957,0	70,3	5885,5
	Membrana	103,7	81,7	101,2	0,0	397,2

DE: Desviación estándar

Tabla 9.- Descripción de los valores de APN para las 3 tomas de muestras y en las 3 localizaciones (UP/mg de proteína). Total, y por grupo de artrosis.

Muestra	Observación	Total					Artrosis menos de III					Artrosis III o más				
		Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Líquido sinovial	Primera muestra	142,7	125,9	72,0	48,1	357,6	119,1	103,3 ^{a*}	60,3	48,1	249,5	159,5	146,6	77,0	66,8	357,6
	Segunda muestra	161,7	149,5	69,5	64,1	362,5	151,7	149,5 ^a	65,3	69,0	264,0	168,9	150,6	73,9	64,1	362,5
	Tercera muestra	162,4	161,0	63,8	55,7	352,8	163,6	163,0 ^a	36,7	118,2	234,2	161,6	159,3	79,2	55,7	352,8
Citosol	Primera muestra	1177,2	256,7	1719,6	70,3	5885,5	960,8	228,2	1391,1	73,1	4443,1	1331,8	268,8	1957,0	70,3	5885,5
	Segunda muestra	866,4	287,0	1058,5	81,2	3601,5	801,2	323,1	1012,6	104,1	3308,1	913,0	251,0	1125,5	81,2	3601,5
	Tercera muestra	1407,5	434,0	1815,1	52,6	6132,2	1251,4	434,0	1915,8	84,0	5664,1	1519,0	861,0	1804,3	52,6	6132,2
Membrana	Primera muestra	76,3	51,7	87,6	0,0	397,2	37,9	27,5 ^b	44,8	4,0	154,3	103,7	81,7 ^{b*}	101,2	0,0	397,2
	Segunda muestra	88,9	65,2	111,2	0,0	514,8	28,0	14,8 ^c	35,8	0,0	102,5	132,5	116,7 ^{c*}	126,9	0,0	514,8
	Tercera muestra	91,5	28,9	197,8	0,0	969,8	56,2	22,0	83,3	0,0	242,6	116,7	41,0	250,5	3,0	969,8

DE: Desviación estándar; * p<0,05 (a,b,c: valores/ distribuciones diferentes)

Cys-AP

Hemos descrito actividad de Cys-AP en líquido sinovial, citosol y fracción unida a membrana. La actividad hallada es mayor en citosol, siendo unas 3 veces mayor que en membrana y unas 12 veces más que en líquido sinovial, donde presenta la menor actividad. Vemos que en citosol existe una amplia variabilidad en la actividad, con el rango más amplio y estos valores son consistentes por sexo.

No hemos encontrado diferencias por sexo o grupo de artrosis para los datos basales (Tabla 10).

Tabla 10.- Descripción de los valores basales de Cys-AP en líquido sinovial, en citosol y en membrana (UP/mg de proteína). Total, por sexo y por grupo de artrosis.

	Muestra	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Total	Líquido sinovial	24,1	21,0	14,0	6,2	69,0
	Citosol	738,1	252,0	1083,1	95,8	4636,4
	Membrana	101,3	85,5	97,3	0,0	311,5
Hombres	Líquido sinovial	21,6	19,5	11,5	6,2	54,2
	Citosol	750,9	252,0	1251,2	95,8	4636,4
	Membrana	106,0	93,0	103,4	0,0	311,5
Mujeres	Líquido sinovial	27,5	23,4	17,0	7,9	69,0
	Citosol	720,2	238,9	857,8	129,4	2280,4
	Membrana	94,9	64,0	93,0	0,6	241,7
Artrosis menos de III	Líquido sinovial	19,8	21,4	7,5	6,2	30,0
	Citosol	450,8	207,6	663,8	106,1	2280,4
	Membrana	104,0	60,4	104,1	0,0	241,7
Artrosis III o más	Líquido sinovial	27,1	21,0	16,9	7,9	69,0
	Citosol	943,4	252,0	1289,0	95,8	4636,4
	Membrana	99,4	92,9	96,0	0,0	311,5

DE: Desviación estándar

Hay diferencias (a) según grupo de artrosis en la segunda determinación de Cys-AP en líquido sinovial (pruebas paramétricas (t-Student) y pruebas no paramétricas (U-Mann Whitney y comparación de medianas), siendo mayor la actividad en los pacientes con mayor grado de artrosis.

En las pruebas no paramétricas no hay diferencia significativa en la distribución entre la 1ª, 2ª y 3ª observación en ninguno de los grupos de artrosis, ni en general, en ninguna localización.

Tabla 11.- Descripción de los valores basales, en segunda y en tercera muestra de Cys-AP en líquido sinovial, en citosol y en membrana (UP/mg de proteína) por grupo de artrosis

Muestra	Observación	Total					Artrosis menos de III					Artrosis III o más				
		Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Líquido sinovial	Primera muestra	24,1	21,0	14,0	6,2	69,0	19,8	21,4	7,5	6,2	30,0	27,1	21,0	16,9	7,9	69,0
	Segunda muestra	23,2	22,2	12,2	8,2	70,7	17,6 ^a	17,6	5,5	8,2	25,2	27,1 ^{a*}	23,9	14,2	12,2	70,7
	Tercera muestra	25,5	20,6	24,2	8,5	129,9	16,9	17,0	5,2	8,5	23,8	31,0	23,1	29,9	10,1	129,9
Citosol	Primera muestra	738,1	252,0	1083,1	95,8	4636,4	450,8	207,6	663,8	106,1	2280,4	943,4	252,0	1289,0	95,8	4636,4
	Segunda muestra	653,1	271,2	768,2	91,0	3396,1	462,7	310,4	378,5	137,4	1230,2	789,0	232,2	947,1	91,0	3396,1
	Tercera muestra	998,5	346,2	1438,3	31,3	5305,6	620,6	346,0	865,6	31,3	2999,4	1268,4	457,0	1718,4	65,6	5305,6
Membrana	Primera muestra	101,3	85,5	97,3	0,0	311,5	104,0	60,4	104,1	0,0	241,7	99,4	92,9	96,0	0,0	311,5
	Segunda muestra	98,2	80,6	93,5	0,0	318,0	103,9	79,1	93,5	0,0	228,0	94,1	82,0	96,8	0,0	318,0
	Tercera muestra	112,2	77,9	109,7	0,0	328,3	103,9	68,6	110,3	0,0	282,5	118,2	79,7	113,0	0,0	328,3

DE: Desviación estándar;

*p<0,05 (a: valores/ distribuciones diferentes)

El análisis de la varianza para medidas repetidas de las variables transformadas (test de Hotelling (normalidad multivariante) y test de esfericidad Mauchly indican que se puede aplicar, sin corrección de Greenhouse-Geisser: en las determinaciones de Cys-AP en líquido sinovial no hay diferencias significativas intra-sujetos (entre los tres momentos de observación), ni inter-sujetos (según grado de artrosis) ajustado por la edad (Tabla 11).

APB

Describimos actividad de APB en líquido sinovial, citosol y en fracción membrana.

La mayor actividad la presenta en citosol, siendo aproximadamente el doble que en líquido sinovial y unas 9 veces mayor que en membrana, donde es menor.

Tabla 12.- Descripción de actividad de APB en líquido sinovial, citosol y en fracción membrana (UP/mg de proteína) por sexo y grupo de artrosis

	Muestra	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Total	Líquido sinovial	138,6	91,6	123,7	52,7	628,5
	Citosol	767,9	184,2	1049,4	43,0	3802,9
	Membrana	22,8	20,7	22,3	0,0	91,5
Hombres	Líquido sinovial	120,4	89,7	75,5	52,7	321,2
	Citosol	761,4	189,2	1121,3	43,0	3802,9
	Membrana	28,5	24,4	26,0	0,0	91,5
Mujeres	Líquido sinovial	164,0	104,6	172,2	53,0	628,5
	Citosol	777,0	176,5	998,8	67,3	3003,4
	Membrana	14,9	11,6	13,1	1,1	39,2
Artrosis menos de III	Líquido sinovial	113,8	108,7	57,9	52,7	212,6
	Citosol	546,8	176,5	676,8	43,1	1863,9
	Membrana	9,7	5,8 ^a	8,7	0,0	22,0
Artrosis III o más	Líquido sinovial	156,3	89,7	154,7	64,2	628,5
	Citosol	925,9	189,2	1251,6	43,0	3802,9
	Membrana	32,1	30,2 ^{a*}	24,6	0,0	91,5

DE: Desviación estándar *p<0,05

Observamos diferencias (a) en APB en membrana entre grupos de artrosis en los valores basales. Observamos que el grupo de pacientes con mayor grado de artrosis, y de forma previa al tratamiento, presentan de media unos niveles mayores de APB en fracción membrana (30,2 UP/mg de proteína) que los de menor grado (5,8 UP/mg de proteína).

El mayor rango entre los valores máximo y mínimo vuelve a estar en el citosol y es consistente entre sexos (Tabla 12).

Tabla 13.- Descripción de los valores basales, en segunda y en tercera muestra de APB en líquido sinovial, en citosol y en membrana (UP/mg de proteína) por grupo de artrosis

Muestra	Observación	Total					Artrosis menos de III					Artrosis III o más				
		Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Líquido sinovial	Primera muestra	138,6	91,6	123,7	52,7	628,5	113,8	108,7	57,9	52,7	212,6	156,3	89,7	154,7	64,2	628,5
	Segunda muestra	143,9	118,8	99,3	47,0	541,5	130,7	122,0	53,7	47,0	212,7	153,4	115,3	123,4	54,1	541,5
	Tercera muestra	167,0	146,8	148,6	58,7	805,7	151,2	151,0	48,3	82,8	267,4	178,2	116,9	192,6	58,7	805,7
Citosol	Primera muestra	767,9	184,2	1049,4	43,0	3802,9	546,8	176,5	676,8	43,1	1863,9	925,9	189,2	1251,6	43,0	3802,9
	Segunda muestra	729,4	225,5	1035,3	67,8	4679,8	507,0	221,0	587,5	74,5	1920,0	888,3	230,2	1261,8	67,8	4679,8
	Tercera muestra	1078,7	311,1	1708,5	53,9	7458,9	888,4	311,0	1395,4	63,1	4295,2	1214,5	528,0	1941,3	53,9	7458,9
Membrana	Primera muestra	22,8	20,7	22,3	0,0	91,5	9,7	5,8 ^a	8,7	0,0	22,0	32,1	30,2 ^{a,c*}	24,6	0,0	91,5
	Segunda muestra	32,4	26,5	41,2	0,0	178,4	8,4	1,7 ^b	14,5	0,0	36,4	49,6	41,2 ^{b,c*}	45,7	0,0	178,4
	Tercera muestra	28,2	8,0	55,5	0,0	263,1	20,5	8,3	29,8	0,0	86,7	33,7	8,0 ^c	69,0	0,0	263,1

DE: Desviación estándar;

*p<0,05 (a,b,c: valores/ distribuciones diferentes)

En las pruebas no paramétricas hemos observado una diferencia significativa en la actividad de APB en membrana en la 1ª (a), y en la 2ª (b) observación entre grupos de artrosis, siendo menor en el grupo de menor artrosis y mayor en el de mayor artrosis. También hallamos diferencias significativas (c) en la distribución de la actividad de APB en la fracción membrana entre los valores previos al tratamiento, después de la primera infiltración y después de la segunda infiltración, en el grupo de artrosis III o más. Observamos por tanto que la actividad de la APB unida a membrana (30,2 UP/mg de proteína), se modifica durante el tratamiento; aumenta tras la primera infiltración (41,2 UP/mg de proteína), pero en la última muestra la actividad se reduce (8,0 UP/mg de proteína), y la diferencia significativa que veíamos entre los pacientes con menor (5,8 UP/mg de proteína) y mayor artrosis (30,2 UP/mg de proteína), desaparece, y los pacientes con mayor artrosis (que presentaban una mayor actividad), presentan tras el tratamiento una actividad sin diferencias respecto a la actividad del grupo de menor artrosis (8 y 8,3 UP/mg de proteína, respectivamente) (Tabla 13).

En cuanto al análisis de la varianza para medidas repetidas de las variables transformadas (test de Hotelling (normalidad multivariante) y test de esfericidad Mauchly indican que se puede aplicar, con corrección de Greenhouse-Geisser: en las determinaciones de APB en membrana hay diferencias significativas inter-sujetos (según grado de artrosis).

APA

Tabla 14.- Descripción de actividad de APA en líquido sinovial, citosol y en fracción membrana (UP/mg de proteína) por sexo y grupo de artrosis

	Muestra	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Total	Líquido sinovial	24,1	21,6	7,9	13,0	41,6
	Citosol	188,6	20,5	299,8	1,7	1067,9
	Membrana	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Hombres	Líquido sinovial	24,9	22,1	8,4	13,2	41,6
	Citosol	177,8	32,4	337,0	9,3	1067,9
	Membrana	0	0	0	0	0
Mujeres	Líquido sinovial	22,8	21,1	7,5	13,0	36,3
	Citosol	204,0	18,1	262,5	1,7	657,9
	Membrana	0	0	0	0	0
Artrosis menos de III	Líquido sinovial	21,0	20,2	5,8	13,2	33,3
	Citosol	275,3	218,1	321,7	7,0	657,9
	Membrana	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Artrosis III o más	Líquido sinovial	26,2	23,4	8,7	13,0	41,6
	Citosol	161,9	20,5	301,2	1,7	1067,9
	Membrana	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

DE: Desviación estándar

Describimos actividad de APA en líquido sinovial y en citosol (tabla 14). En fracción membrana se ha ensayado, pero no se ha obtenido actividad en ninguna de las muestras de ningún paciente.

La actividad se muestra similar en líquido sinovial y en citosol. En el citosol es mayor el rango entre el menor valor y el mayor; y los valores del líquido sinovial están menos dispersos. Esto hace que la media en citosol sea mayor. Esto es consistente entre sexos y entre grupos de artrosis.

No hay diferencias en la comparativa según grupo de artrosis en las determinaciones 1ª, 2ª o 3ª (ni por pruebas paramétricas (t-Student) ni por pruebas no paramétricas (U-Mann Whitney y comparación de medianas).

Sin embargo, si hay diferencias significativas (a), en las pruebas no paramétricas en la distribución de APA en citosol comparando los 3 momentos analizados entre sí, en el grupo de artrosis menor de III.

En el análisis de la varianza para medidas repetidas de las variables transformadas (test de Hotelling (normalidad multivariante) y test de esfericidad Mauchly indican que se puede aplicar y no es necesaria corrección de Greenhouse-Geisser: no hay diferencias significativas intra-sujetos (entre los tres momentos de observación) ni inter-sujetos (según grado de artrosis) para las determinaciones de APA en líquido sinovial ni APA en citosol, ajustado por edad (tabla 15).

Tabla 15.- Descripción de los valores basales, en segunda y en tercera muestra de APB en líquido sinovial, en citosol y en membrana (UP/mg de proteína) por grupo de artrosis

Muestra	Observación	Total					Artrosis menos de III					Artrosis III o más				
		Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Líquido sinovial	Primera muestra	24,1	21,6	7,9	13,0	41,6	21,0	20,2	5,8	13,2	33,3	26,2	23,4	8,7	13,0	41,6
	Segunda muestra	25,6	23,1	10,8	12,3	51,1	21,3	21,0	9,1	12,3	42,5	28,8	25,5	11,1	15,6	51,1
	Tercera muestra	24,9	23,7	7,7	14,9	49,9	24,3	24,0	5,0	16,8	34,3	25,3	23,0	9,3	14,9	49,9
Citosol	Primera muestra	188,6	20,5	299,8	1,7	1067,9	275,3	218,1 ^a	321,7	7,0	657,9	161,9	20,5	301,2	1,7	1067,9
	Segunda muestra	115,8	25,8	167,9	4,4	561,4	151,0	19,1 ^a	273,7	4,4	561,4	105,0	25,8	135,4	5,2	371,2
	Tercera muestra	174,7	31,0	234,7	8,9	716,9	358,4	350,9 ^{a*}	394,4	15,0	716,9	118,1	31,0	140,9	8,9	383,1
Membrana	Primera muestra	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Segunda muestra	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Tercera muestra	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

DE: Desviación estándar *p<0,05 (a,b,c: valores/ distribuciones diferentes)

PSA

Tabla 16.- Descripción de actividad de PSA en líquido sinovial, citosol y en fracción membrana (UP/mg de proteína) por sexo y grupo de artrosis

	Muestra	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Total	Líquido sinovial	245,5	234,5	79,2	143,7	480,2
	Citosol	285,1	241,6	175,1	67,0	645,8
	Membrana	119,6	106,1	104,6	1,5	436,3
Hombres	Líquido sinovial	256,2	234,5	91,8	143,7	480,2
	Citosol	221,0	219,3	121,6	67,0	451,7
	Membrana	148,4	130,4	123,9	12,7	436,3
Mujeres	Líquido sinovial	230,5	224,2	58,5	149,1	354,3
	Citosol	381,2	337,4	209,2	154,9	645,8
	Membrana	79,2	92,4	51,7	1,5	139,3
Artrosis menos de III	Líquido sinovial	253,7	231,8	82,8	143,7	428,4
	Citosol	305,0	161,5	243,4	67,0	645,8
	Membrana	61,1	49,5 ^a	52,2	1,5	151,6
Artrosis III o más	Líquido sinovial	239,6	234,5	79,1	149,1	480,2
	Citosol	267,7	267,4	99,1	119,9	451,7
	Membrana	161,3	131,2 ^{a*}	113,8	12,7	436,3

DE: Desviación estándar *p<0,05 Hay diferencias significativas en PSA en membrana según grado de artrosis en primera observación.

Obtenemos actividad de PSA en líquido sinovial, citosol y en fracción membrana. La actividad parece ser algo mayor en líquido sinovial y citosol que en membrana. Observamos diferencias significativas (a) en la actividad basal en membrana entre el grupo de menor artrosis (49,5 UP/mg de proteína) y el de mayor artrosis (131,2 UP/mg de proteína), siendo mayor en este último (Tabla 16).

En las pruebas no paramétricas, obtenemos la citada diferencia significativa (a) en la distribución de PSA en membrana en la 1ª observación entre grupos de artrosis. En cuanto a las diferencias por momentos muestrales, obtenemos significativas en la actividad de PSA en líquido sinovial entre el 1º, 2º y 3º momentos en el total (b) y en el grupo de artrosis III o más (c), pero no en el grupo de artrosis más leve (Tabla 17).

El análisis de la varianza para medidas repetidas de las variables transformadas (test de Hotelling (normalidad multivariante) y test de esfericidad Mauchly indican que se puede aplicar y no es necesaria corrección de Greenhouse-Geisser: no hay diferencias significativas intra-sujetos (entre los tres momentos de observación) ni inter-sujetos (según grado de artrosis) para las determinaciones de PSA en líquido sinovial, PSA en citosol ni PSA en membrana, ajustado por edad (tampoco si no se ajusta por edad).

Tabla 17.- Descripción de los valores basales, en segunda y en tercera muestra de PSA en líquido sinovial, en citosol y en membrana (UP/mg de proteína) por grupo de artrosis.

Muestra	Observación	Total					Artrosis menos de III					Artrosis III o más				
		Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Líquido sinovial	Primera muestra	245,5	234,5 ^{b*}	79,2	143,7	480,2	253,7	231,8 ^a	82,8	143,7	428,4	239,6	234,5 ^{c*}	79,1	149,1	480,2
	Segunda muestra	317,0	298,8 ^b	108,0	122,8	633,2	306,6	306,0	60,7	235,0	439,4	324,4	289,2 ^c	133,9	122,8	633,2
	Tercera muestra	274,3	272,5 ^b	66,7	128,0	386,2	263,2	263,0	75,9	128,0	386,2	282,3	288,3 ^c	60,9	154,9	373,5
Citosol	Primera muestra	285,1	241,6	175,1	67,0	645,8	305,0	161,5	243,4	67,0	645,8	267,7	267,4	99,1	119,9	451,7
	Segunda muestra	599,7	296,8	1061,5	134,8	4394,9	984,4	396,6	1513,5	171,5	4394,9	263,1	270,3	113,0	134,8	480,8
	Tercera muestra	427,6	186,6	563,5	91,7	2121,5	576,9	113,0	815,6	113,0	2121,5	296,9	284,7	152,0	91,7	512,0
Membrana	Primera muestra	119,6	106,1	104,6	1,5	436,3	61,1	49,5 ^a	52,2	1,5	151,6	161,3	131,2 ^{a*}	113,8	12,7	436,3
	Segunda muestra	155,3	87,2	216,9	8,3	953,1	150,0	45,0	289,7	8,3	953,1	159,1	92,9	158,5	29,5	620,5
	Tercera muestra	121,1	61,8	148,1	8,9	639,3	118,8	42,0	202,4	8,9	639,3	122,6	97,0	109,1	23,3	406,0

DE: Desviación estándar; * $p < 0,05$ (a,b,c: valores/ distribuciones diferentes)

ASP

Tabla 18.- Descripción de actividad de ASP en líquido sinovial, citosol y en fracción membrana (UP/mg de proteína) por sexo y grupo de artrosis.

	Muestra	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Total	Líquido sinovial	4,1	3,9	1,6	1,7	7,9
	Citosol	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Membrana	0,3	0,0	1,5	0,0	7,4
Hombres	Líquido sinovial	4,1	3,7	1,6	1,7	7,5
	Citosol	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Membrana	0,5	0,0	2,0	0,0	7,4
Mujeres	Líquido sinovial	4,1	4,0	1,6	2,3	7,9
	Citosol	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Membrana	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Artrosis menos de III	Líquido sinovial	4,1	3,8	2,1	1,7	7,9
	Citosol	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Membrana	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Artrosis III o más	Líquido sinovial	4,0	3,9	1,1	2,3	6,5
	Citosol	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Membrana	0,5	0,0	2,0	0,0	7,4

DE: Desviación estándar

Hemos analizado la Asp-AP en las tres localizaciones y hemos obtenido actividad en líquido sinovial en todos los pacientes. En cambio, no hemos obtenido actividad en citosol más que en una muestra de un paciente. En la fracción membrana solo hemos obtenido actividad en 3 pacientes y no en todas las muestras (Tabla 18).

En el análisis entre grupos de artrosis, hay diferencias (a) según grupo de artrosis en la 2ª determinación de ASP en líquido sinovial, siendo mayor la actividad en el grupo de mayor artrosis en esta segunda muestra. Pruebas paramétricas (t-Student) y pruebas no paramétricas (U-Mann Whitney y comparación de medianas) (Tabla 19).

En las pruebas no paramétricas no hay diferencia significativa en la distribución entre la 1ª, 2ª y 3ª observación en ninguno de los grupos de artrosis, ni en general, en ninguna localización.

Análisis de la varianza para medidas repetidas de las variables transformadas (test de Hotelling (normalidad multivariante) y test de esfericidad Mauchly indican que se puede aplicar y no es necesaria corrección de Greenhouse-Geisser para las determinaciones de ASP en líquido sinovial hay diferencias significativas intra-sujetos para la interacción entre el momento de observación y el grado de artrosis, pero no inter-sujetos (según grado de artrosis).

Tabla 19.- Descripción de los valores basales, en segunda y en tercera muestra de ASP en líquido sinovial, en citosol y en membrana (UP/mg de proteína) en total y por grupo de artrosis.

Muestra	Observación	Total					Artrosis menos de III					Artrosis III o más				
		Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Líquido sinovial	Primera muestra	4,1	3,9	1,6	1,7	7,9	4,1	3,8	2,1	1,7	7,9	4,0	3,9	1,1	2,3	6,5
	Segunda muestra	4,2	4,2	1,8	1,9	9,4	3,2 ^a	3,1	1,1	1,9	4,9	4,9 ^{a*}	4,3	1,8	2,8	9,4
	Tercera muestra	4,1	4,2	1,5	1,9	7,9	3,9	4,3	1,4	1,8	5,7	4,2	4,1	1,6	1,9	7,9
Citosol	Primera muestra	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Segunda muestra	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tercera muestra	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Membrana	Primera muestra	0,3	0	1,5	0	7,4	0	0	0	0	0	0,5	0	2	0	7,4
	Segunda muestra	0	0	0,2	0	1,1	0	0	0	0	0	0,1	0	0,3	0	1,1
	Tercera muestra	0,8	0	3,6	0	17,8	0	0	0	0	0	1,4	0	4,7	0	17,8

DE: Desviación estándar;

*p<0,05 (a: valores/ distribuciones diferentes)

DPPIV

Tabla 20.- Descripción de actividad de DPPIV en líquido sinovial y citosol (UP/mg de proteína) por sexo y grupo de artrosis.

	Muestra	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Total	Líquido sinovial	331,0	270,8	135,2	176,8	600,7
	Citosol	6318,1	370,5	14139,8	76,7	65798,4
Hombres	Líquido sinovial	334,5	272,7	144,9	176,8	587,8
	Citosol	7994,4	489,3	17649,5	76,7	65798,4
Mujeres	Líquido sinovial	326,0	259,2	127,7	230,8	600,7
	Citosol	3971,4	188,9	7106,4	89,6	22510,9
Artrosis menos de III	Líquido sinovial	337,0	273,2	135,8	176,8	600,7
	Citosol	3396,1	181,0	6927,5	76,7	22510,9
Artrosis III o más	Líquido sinovial	326,7	270,2	139,7	198,1	587,8
	Citosol	8405,3	489,3	17585,4	89,6	65798,4

DE: Desviación estándar

Hemos analizado la DPPIV en líquido sinovial y citosol, observando una gran actividad en ambas localizaciones.

La actividad es mayor en citosol. La variabilidad de la actividad entre pacientes en citosol es más grande que en líquido sinovial, y esto es constante por sexo y por grupo de artrosis. Así podemos ver cómo mientras un paciente presenta una actividad de 76,7 UP/mg de proteína, otro de 65798,4 UP/mg de proteína. No obtenemos diferencias significativas en los valores basales ni por sexo ni por grupo de artrosis (Tabla 20).

Hay diferencias (a) según grupo de artrosis en la 3ª determinación de DPPIV en líquido sinovial (pruebas paramétricas (t-Student) y pruebas no paramétricas (U-Mann Whitney y comparación de medianas), siendo mayor la actividad observada en el grupo de menor artrosis (Tabla 21).

En las pruebas no paramétricas no hay diferencia significativa en la distribución entre la 1ª, 2ª y 3ª observación en ninguno de los grupos de artrosis, ni en general, en ninguna localización.

El análisis de la varianza para medidas repetidas de las variables transformadas (test de Hotelling (normalidad multivariante) y test de esfericidad Mauchly indican que se puede aplicar, con corrección de Greenhouse-Geisser: en las determinaciones de DPPIV en líquido sinovial hay diferencias significativas intra-sujetos, para la interacción entre el momento de observación y el grado de artrosis, pero no inter-sujetos (según grado de artrosis).

Tabla 21.- Descripción de los valores basales, en segunda y en tercera muestra de DPPIV en líquido sinovial y en citosol (UP/mg de proteína) por grupo de artrosis.

Muestra	Observación	Total					Artrosis menos de III					Artrosis III o más				
		Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Líquido sinovial	Primera muestra	331,0	270,8	135,2	176,8	600,7	337,0	273,2	135,8	176,8	600,7	326,7	270,2	139,7	198,1	587,8
	Segunda muestra	341,5	321,0	115,7	179,3	620,1	332,3	316,4	95,6	218,6	477,6	348,1	321,0	131,3	179,3	620,1
	Tercera muestra	361,6	381,6	122,6	136,1	706,5	437,0 ^a	426,9	108,8	281,8	706,5	307,8 ^{a*}	308,0	104,4	136,1	477,4
Citosol	Primera muestra	6318,1	370,5	14139,8	76,7	65798,4	3396,1	181,0	6927,5	76,7	22510,9	8405,3	489,3	17585,4	89,6	65798,4
	Segunda muestra	4136,7	536,9	5653,6	44,2	19105,7	2472,4	741,2	3103,9	44,2	7767,2	5325,6	331,9	6799,0	110,6	19105,7
	Tercera muestra	5509,7	297,0	10929,0	130,8	49708,7	4180,6	362,9	6990,1	182,2	20495,0	6459,0	275,0	13235,0	130,8	49708,7

DE: Desviación estándar;

* $p < 0,05$ (a: valores/ distribuciones diferentes)

ACE

Tabla 22.- Descripción de actividad de ACE en líquido sinovial (UP/mg de proteína), por sexo y grupo de artrosis.

	Muestra	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Total	Líquido sinovial	7,6	6,6	5,7	0	19,9
Hombres	Líquido sinovial	8,4	6,8	6,7	0	19,9
Mujeres	Líquido sinovial	6,5	6,1	3,8	0,0	12,7
Artrosis menos de III	Líquido sinovial	6,8	6,8	3,7	0,0	11,6
Artrosis III o más	Líquido sinovial	8,2	5,7	6,8	0	19,9

DE: Desviación estándar

Hemos obtenido actividad de ACE en líquido sinovial, única localización ensayada. No observamos diferencias en la actividad ni por sexo ni por grupo de artrosis en los valores basales. En un paciente no hemos obtenido actividad en ninguna muestra y en otros 6 pacientes en alguna muestra; esto puede haber sido debido a problemas con el procedimiento de análisis (Tabla 22).

Tabla 23.- Descripción de los valores basales, en segunda y en tercera muestra de ACE en líquido sinovial (UP/mg de proteína) por grupo de artrosis.

Muestra	Observación	Total									
		Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo					
Líquido sinovial	Primera muestra	7,6	6,6	5,7	0,0	19,9					
	Segunda muestra	7,9	6,3	5,7	0,0	19,7					
	Tercera muestra	8,2	7,7	5,1	0,0	19					
	Observación	Grupo de artrosis									
		Artrosis menos de III					Artrosis III o más				
		Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Líquido sinovial	Primera muestra	6,8	6,8	3,7	0,0	11,6	8,2	5,7	6,8	0,0	19,9
	Primera muestra	6,2	5,0	4,9	0,0	14,8	8,9	7,8	6,1	0,0	19,7
	Segunda muestra	8,2	7,7	1,6	6,5	11,4	8,2	5,9	6,5	0,0	19

DE: Desviación estándar;

No hay diferencias según grupo de artrosis en las determinaciones 1ª, 2ª o 3ª (ni por pruebas paramétricas (t-Student) ni por pruebas no paramétricas (U-Mann Whitney y comparación de medianas).

En las pruebas no paramétricas no hay diferencia significativa en la distribución entre la 1ª, 2ª y 3ª observación en ninguno de los grupos de artrosis, ni en general, en ninguna localización.

Análisis de la varianza para medidas repetidas de las variables transformadas (test de Hotelling (normalidad multivariante) y test de esfericidad Mauchly indican que se puede aplicar y no es necesaria corrección de Greenhouse-Geisser: no hay diferencias significativas intra-sujetos (entre los tres momentos de observación) ni inter-sujetos (según grado de artrosis) para las determinaciones de ACE en líquido sinovial ajustado por edad (Tabla 23).

ACE 2

Tabla 24.- Descripción de actividad de ACE2 en líquido sinovial (UP/mg de proteína), por sexo y grupo de artrosis.

	Muestra	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Total	Líquido sinovial	0,7	0,3	0,9	0,0	2,7
Hombres	Líquido sinovial	0,7	0,3	0,9	0,0	2,7
Mujeres	Líquido sinovial	0,7	0,3	1,0	0,0	2,6
Artrosis menos de III	Líquido sinovial	0,6	0,4	0,7	0,0	2,1
Artrosis III o más	Líquido sinovial	0,8	0,3	1,0	0,0	2,7

DE: Desviación estándar

Describimos actividad de ACE2 en líquido sinovial, única localización ensayada. No observamos diferencias en la actividad ni por sexo ni por grupo de artrosis en los valores basales. La actividad obtenida es baja, aun así, se ha obtenido actividad en todos los pacientes menos en 3 (Tabla 24).

Tabla 25.- Descripción de los valores basales, en segunda y en tercera muestra de ACE2 en líquido sinovial (UP/mg de proteína) por grupo de artrosis.

Muestra	Observación	Total									
		Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo					
Líquido sinovial	Primera muestra	0,7	0,3	0,9	0,0	2,7					
	Segunda muestra	0,8	0,5	0,9	0,0	2,9					
	Tercera muestra	0,8	0,5	0,9	0,0	3,8					
	Observación	Grupo de artrosis									
		Artrosis menos de III					Artrosis III o más				
		Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Líquido sinovial	Primera muestra	0,6	0,4	0,7	0,0	2,1	0,8	0,3	1,0	0,0	2,7
	Primera muestra	0,5	0,5	0,5	0,0	1,4	1,0	0,4	1,1	0,0	2,9
	Segunda muestra	0,5	0,5	0,5	0,0	1,4	0,9	0,5	1,1	0,0	3,8

DE: Desviación estándar;

No hay diferencias según grupo de artrosis en las determinaciones 1ª, 2ª o 3ª (ni por pruebas paramétricas (t-Student) ni por pruebas no paramétricas (U-Mann Whitney y comparación de medianas).

En las pruebas no paramétricas no hay diferencia significativa en la distribución entre la 1ª, 2ª y 3ª observación en ninguno de los grupos de artrosis, ni en general, en ninguna localización.

Análisis de la varianza para medidas repetidas de las variables transformadas (test de Hotelling (normalidad multivariante) y test de esfericidad Mauchly indican que se puede aplicar y no es necesaria corrección de Greenhouse-Geisser: no hay diferencias significativas intra-sujetos (entre los tres momentos de observación) ni inter-sujetos (según grado de artrosis) para las determinaciones de ACE2 en líquido sinovial ajustado por edad (Tabla 25).

PEP

Tabla 26.- Descripción de actividad de PEP en líquido sinovial, citosol y en fracción membrana (UP/mg de proteína) por sexo y grupo de artrosis.

	Muestra	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Total	Líquido sinovial	2,9	2,9	1,2	0	5,5
	Citosol	104,6	5,6	216,8	0	605,4
	Membrana	8,2	0,0	22,9	0	89,5
Hombres	Líquido sinovial	2,8	2,9	1,1	0,0	3,8
	Citosol	81,8	5,3	211,7	0,0	605,4
	Membrana	12,2	0,0	29,3	0,0	89,5
Mujeres	Líquido sinovial	3,2	2,8	1,5	1,1	5,5
	Citosol	141,0	5,6	244,7	0,0	568,0
	Membrana	2,2	0,0	4,3	0,0	10,9
Artrosis menos de III	Líquido sinovial	2,9	2,4	1,0	1,9	4,3
	Citosol	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Membrana	2,6	0,0	4,7	0	10,9
Artrosis III o más	Líquido sinovial	2,9	3,0	1,4	0,0	5,5
	Citosol	123,6	9,7	232,0	0	605,4
	Membrana	10,9	0,0	27,9	0	89,5

DE: Desviación estándar

Observamos actividad de PEP en líquido sinovial, citosol y en la fracción unida a membrana. En líquido sinovial es donde la actividad es menor, siendo casi la mitad que en membrana. En citosol es donde más variabilidad hay entre el paciente que menos actividad presenta al que más, y la actividad es casi 5 veces mayor que en líquido sinovial. No hallamos diferencias por sexo ni por grupo de artrosis (Tabla 26).

Sin hallar diferencias significativas, llama la atención que no hayamos actividad de PEP en citosol en ningún paciente con grado bajo de artrosis; en el de artrosis avanzada la mediana es 9,7 UP/mg de proteína y solo hay 5 pacientes de 14 en los que no hayamos actividad en citosol en la muestra basal (datos no mostrados).

Hay diferencias (a) según grupo de artrosis en la 2ª determinación en líquido sinovial (pruebas paramétricas (t-Student) y pruebas no paramétricas (U-Mann Whitney y comparación de medianas), siendo mayor la actividad en el grupo de mayor artrosis (Tabla 27).

En las pruebas no paramétricas no hay diferencia significativa en la distribución entre la 1ª, 2ª y 3ª observación en ninguno de los grupos de artrosis, ni en general, en ninguna localización.

En cuanto al análisis de la varianza para medidas repetidas de las variables transformadas (test de Hotelling (normalidad multivariante) y test de esfericidad Mauchly indican que se puede aplicar y no es necesaria corrección de Greenhouse-Geisser: no hay diferencias significativas intra-sujetos (entre los tres momentos de observación) para las determinaciones de PEP en líquido sinovial, PEP en citosol, ni PEP en membrana; ni inter-sujetos (según grado de artrosis) para las determinaciones de PEP en líquido sinovial, ni PEP en membrana, ajustado por edad.

Tabla 27.- Descripción de los valores basales, en segunda y en tercera muestra de PEP en líquido sinovial, en citosol y en membrana (UP/mg de proteína), en total y por grupo de artrosis.

Muestra	Observación	Total					Artrosis menos de III					Artrosis III o más				
		Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Líquido sinovial	Primera muestra	2,9	2,9	1,2	0	5,5	2,9	2,4	1,0	1,9	4,3	2,9	3,0	1,4	0,0	5,5
	Segunda muestra	3,3	3,3	1,7	0,5	6,9	2,5	2,3 ^{a*}	0,6	1,8	3,5	3,7	3,7 ^a	1,9	0,5	6,9
	Tercera muestra	2,9	2,6	2	0	8,9	2,4	2,5	1,1	0,0	3,6	3,1	2,6	2,3	0,1	8,9
Citosol	Primera muestra	104,6	5,6	216,8	0	605,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	123,6	9,7	232,0	0	605,4
	Segunda muestra	22,1	10,9	30,5	0	109,1	4,1	4,1	4,2	1,2	7,1	25,4	12,7	32,2	0	109,1
	Tercera muestra	124,0	7,4	224,4	0	763,3	3,0	3,0	0,8	2,4	3,6	146,0	15,2	238,6	0	763,3
Membrana	Primera muestra	8,2	0,0	22,9	0	89,5	2,6	0,0	4,7	0	10,9	10,9	0,0	27,9	0	89,5
	Segunda muestra	13,1	1,3	21,0	0	64,3	17,0	3,9	27,1	0	64,3	11,1	0,8	18,5	0,0	54,5
	Tercera muestra	16,9	0,5	35,5	0	114,7	5,4	0,3	11,7	0	26,4	22,7	1,8	42,3	0,0	114,7

DE: Desviación estándar; *p<0,05 (a: valores/ distribuciones diferentes)

NEP

Tabla 28.- Descripción de actividad de NEP en líquido sinovial, citosol y en fracción membrana (UP/mg de proteína) por sexo y grupo de artrosis.

	Muestra	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Total	Líquido sinovial	130,1	99,6	68,2	50,1	293,5
	Citosol	3569,6	139,4	6698,7	36,1	23360,3
	Membrana	194,6	238,5	108,5	35,3	349,6
Hombres	Líquido sinovial	143,2	99,6	73,7	72,9	293,5
	Citosol	4778,3	153,6	8270,5	36,1	23360,3
	Membrana	204,3	267,0	116,4	37,9	349,6
Mujeres	Líquido sinovial	110,0	98,1	62,2	50,1	221,7
	Citosol	1689,4	116,2	2390,6	79,1	5523,8
	Membrana	179,6	195,6	99,7	35,3	286,8
Artrosis menos de III	Líquido sinovial	119,2	106,6	53,5	50,1	221,7
	Citosol	1965,1	116,2	3147,2	36,1	8658,7
	Membrana	186,0	238,5	114,0	35,3	308,6
Artrosis III o más	Líquido sinovial	137,3	96,6	79,9	55,9	293,5
	Citosol	4601,1	153,6	8180,2	68,9	23360,3
	Membrana	200,1	232,9	108,8	43,5	349,6

DE: Desviación estándar

Hemos obtenido actividad de NEP en líquido sinovial, citosol y en fracción unida a membrana.

La actividad es mayor en citosol y membrana, presentando mayor variabilidad entre pacientes en citosol, con un rango de más de 23000. En líquido sinovial la actividad es algo menor. Las actividades en líquido, citosol y en membrana son similares en cuanto a grupos de artrosis y por sexo en las muestras pretratamiento (Tabla 28).

No hay diferencias según grupo de artrosis en las determinaciones 1ª, 2ª o 3ª (ni por pruebas paramétricas (t-Student) ni por pruebas no paramétricas (U-Mann Whitney y comparación de medianas).

En las pruebas no paramétricas, no hay diferencia significativa en la distribución entre la 1ª, 2ª y 3ª observación en ninguno de los grupos de artrosis, ni en general, en ninguna localización (Tabla 29).

El análisis de la varianza para medidas repetidas de las variables transformadas (test de Hotelling (normalidad multivariante) y test de esfericidad Mauchly indican que se puede aplicar y no es necesaria corrección de Greenhouse-Geisser: no hay diferencias significativas intra-sujetos (entre los tres momentos de observación) ni inter-sujetos (según grado de artrosis) para las determinaciones de NEP en líquido sinovial, NEP en citosol, ni NEP en membrana, ajustado por edad

Tabla 29.- Descripción de los valores basales, en segunda y en tercera muestra de NEP en líquido sinovial, en citosol y en membrana (UP/mg de proteína) por grupo de artrosis.

Muestra	Observación	Total					Artrosis menos de III					Artrosis III o más				
		Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Líquido sinovial	Primera muestra	130,2	99,3	69,9	50,1	293,5	119,2	106,6	53,5	50,1	221,7	137,3	96,6	79,9	55,9	293,5
	Segunda muestra	128,8	93,0	70,4	66,2	276	122,0	93,0	63,4	68,2	248,7	133,1	93,5	76,6	66,2	276
	Tercera muestra	129,3	93,4	77,0	39	325,7	115,7	101,0	64,9	39	256,2	138,1	90,2	84,9	64,2	325,6
Citosol	Primera muestra	3569,6	139,4	6698,7	36,1	23360,3	1965,1	116,2	3147,2	36,1	8658,7	4601,1	153,6	8180,2	68,9	23360,3
	Segunda muestra	2810,4	124,3	3971,5	51,7	12449,5	2509,0	124,3	4451,8	67,1	12449,5	3004,2	147,5	3793,8	51,7	10077,1
	Tercera muestra	3191,7	136,7	5210,9	58,6	18054,3	2343,4	200,0	5911,7	58,6	18054,2	3737,0	129,2	4860,9	72,8	13504,6
Membrana	Primera muestra	194,6	238,5	108,5	35,3	349,6	186,0	238,5	114,0	35,3	308,6	200,1	232,9	108,8	43,5	349,6
	Segunda muestra	190,5	222,6	108,5	27,5	357,2	204,8	283,5	129,6	27,5	357,2	181,3	195,6	96,8	34,5	298,3
	Tercera muestra	199,0	253,7	120,4	41	368,1	214,6	285,2	130,6	45,2	339,4	188,9	251,7	117,2	41	368,1

DE: Desviación estándar

PROTEÍNA

Tabla 30.- Descripción de actividad de proteína en líquido sinovial, citosol y en fracción membrana (UP/mg de proteína) por sexo y grupo de artrosis.

	Muestra	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Total	Líquido sinovial	22,6	23,3	9,9	7,6	40,4
	Citosol	1,3	1,6	1,1	0,0	3,3
	Membrana	2,9	3,8	2,0	0,6	7,5
Hombres	Líquido sinovial	23,2	26,2	10,5	7,6	40,4
	Citosol	1,3	1,4	1,1	0,0	3,3
	Membrana	2,6	3,1	1,8	0,7	4,8
Mujeres	Líquido sinovial	21,6	21,0	9,4	8,2	33,7
	Citosol	1,3	1,7	1,0	0,1	2,4
	Membrana	3,3	4,3	2,4	0,6	7,5
Artrosis menos de III	Líquido sinovial	21,6	22,3	9,3	8,2	34,2
	Citosol	1,3	1,7	1,1	0,1	2,7
	Membrana	3,3	4,2	2,4	0,6	7,5
Artrosis III o más	Líquido sinovial	23,2	26,3	10,5	7,6	40,4
	Citosol	1,2	1,4	1,1	0,0	3,3
	Membrana	2,6	3,1	1,7	0,7	4,5

DE: Desviación estándar

Los niveles de proteína son mayores en líquido sinovial que en citosol o fracción membrana y estos no se alteran con el grado de artrosis, ni existen diferencias por sexo (Tabla 30).

Los niveles de proteína permanecen constantes en las 3 localizaciones, sin verse alterados en los 3 momentos estudiados. Y tampoco obtenemos diferencias significativas según el grupo de artrosis para ninguna localización o momento de análisis. Llama la atención que los valores muestran menor variabilidad con una desviación estándar pequeña, menor variabilidad en comparación con las aminopeptidasas estudiadas.

No hay diferencias significativas entre las 3 mediciones (1ª, 2ª, 3ª) en ninguna localización, excepto en membrana (a) en el grupo de artrosis III o más entre los 3 momentos (Tabla 31).

Análisis de la varianza para medidas repetidas de las variables transformadas (test de Hotelling (normalidad multivariante) y test de esfericidad Mauchly indican que se puede aplicar y no es necesaria corrección de Greenhouse-Geisser: no hay diferencias significativas intra-sujetos (entre los tres momentos de observación) ni inter-sujetos (según grado de artrosis) para las determinaciones de proteína en líquido sinovial, proteínas en citosol ni proteínas en membrana, ajustado por edad (tampoco si no se ajusta por edad).

Tabla 31.- Descripción de los valores basales, en segunda y en tercera muestra de proteína en líquido sinovial, en citosol y en membrana (UP/mg de proteína) por grupo de artrosis.

Muestra	Observación	Total					Artrosis menos de III					Artrosis III o más				
		Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo	Media	Mediana	DE	Mínimo	Máximo
Líquido sinovial	Primera muestra	22,6	23,3	9,9	7,6	40,4	21,6	22,3	9,3	8,2	34,2	23,2	26,3	10,5	7,6	40,4
	Segunda muestra	22,7	21,8	9,7	9,2	39,9	22,0	21,9	6,9	10,3	30,3	23,2	21,0	11,5	9,2	39,9
	Tercera muestra	21,3	20,7	9,2	7,7	38,3	19,5	19,5	8,2	7,7	33,7	22,6	22,6	10,0	8,1	38,3
Citosol	Primera muestra	1,3	1,6	1,1	0,0	3,3	1,3	1,7	1,1	0,1	2,7	1,2	1,4	1,1	0,0	3,3
	Segunda muestra	1,2	1,1	1,1	0,0	3,3	0,9	0,6	0,9	0,1	2,6	1,3	1,3	1,3	0,0	3,3
	Tercera muestra	1,2	0,8	1,3	0,0	4,3	0,8	0,7	1,1	0,0	3,6	1,4	1,4	1,4	0,0	4,3
Membrana	Primera muestra	2,9	3,8	2,0	0,6	7,5	3,3	4,2	2,4	0,6	7,5	2,6	3,1 ^{a*}	1,7	0,7	4,5
	Segunda muestra	2,6	3,1	1,7	0,6	5,0	2,5	3,0	1,6	0,6	4,2	2,7	3,4 ^a	1,9	0,7	5,0
	Tercera muestra	2,7	2,7	2,1	0,6	9,3	2,9	2,9	2,7	0,6	9,3	2,5	2,5 ^a	1,8	0,7	4,9

DE: Desviación estándar; * p<0,05 (a: valores/ distribuciones diferentes)

A continuación, analizamos todos los datos de cada aminopeptidasa desde un punto de vista atemporal. Mostramos las medias de todas las muestras de todos los pacientes, en una tabla para cada localización ensayada. Nos permite hacernos una idea de la actividad de todas ellas de un vistazo. Además, tomar todas las muestras de las que disponemos y analizarlas en conjunto nos permite tener una n de muestras considerable. Así las hemos analizado en busca de posibles diferencias por sexo y por grupo de artrosis en las 3 fracciones.

Tabla 32.- Media de las tres determinaciones en líquido sinovial (UP/mg de proteína), total, por sexo y según grado de artrosis.

	Total		Hombre		Mujer		Artrosis menos de III		Artrosis III o más	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Proteína (UP/mg de proteína)	22,2	8,7	22,9	9,8	21,2	7,1	21,0	6,6	23,0	10,0
PSA (UP/mg de proteína)	278,9	60,5	280,1	63,7	277,3	59,2	274,5	51,7	282,1	67,8
APN (UP/mg de proteína)	155,6	60,2	149,2	46,0	164,5	77,7	144,8	39,9	163,3	71,7
APB (UP/mg de proteína)	149,8	119,4	129,4	56,6	178,4	173,9	131,9	38,9	162,6	154,1
APAGLU (UP/mg de proteína)	24,9	8,0	26,0	8,8	23,2	6,7	22,2	5,7	26,7	9,0
NEP (UP/mg de proteína)	129,5	70,3	143,9	76,2	107,0	56,6	119,0	57,2	136,2	78,9
PEP (UP/mg de proteína)	3	1,3	3,0	1,4	2,9	1,4	2,5 ^a	0,8	3,3 ^{**}	1,5
ACE (UP/mg de proteína)	7,9	5,0	8,4	6,0	7,0	3,0	7,0	2,7	8,4	6,1
ACE2 (UP/mg de proteína)	0,7	0,9	0,8	0,8	0,7	0,9	0,5	0,5	0,9	1,0
ASP (UP/mg de proteína)	4,1	1,3	4,5	1,5	3,6	0,9	3,8	1,3	4,4	1,3
DPPIV (UP/mg de proteína)	344,7	97,8	341,5	108,2	349,1	86,5	368,8	70,8	327,5	112,6
CYS (UP/mg de proteína)	24,2	15,8	21,4	8,5	28,1	22,5	18,2	5,0	28,4	19,5

DE: Desviación estándar;

*p<0,05 (a: valores/ distribuciones diferentes)

Hay diferencias significativas (a) **según grupo de artrosis** en la media de las determinaciones de **PEP (a) en líquido sinovial** (pruebas paramétricas (t-Student) y pruebas no paramétricas (U-Mann Whitney y comparación de medianas), siendo mayor la actividad de PEP en el grupo de mayor artrosis (3,3). El resto de los valores por sexo y por grupos de artrosis no presentan diferencias estadísticamente significativas y los valores son bastante similares entre sexos y entre grupos de artrosis para todas ellas.

Destacan por su actividad DPPIV y PSA como las dos más activas en líquido sinovial. Por el contrario, ACE2, PEP y ASP presentan actividad, aunque esta es pequeña en comparación con las demás (Tabla 32).

Tabla 33.- Media de las tres determinaciones en citósol (UP/mg de proteína), total, por sexo y según grado de artrosis.

	Total		Hombre		Mujer		Artrosis menos de III		Artrosis III o más	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Proteína (UP/mg de proteína)	1,2	1,0	1,2	1,1	1,1	0,9	1,0	0,8	1,3	1,1
PSA (UP/mg de proteína)	437,5	563,2	259,4	83,3	704,7	857,0	622,1	811,6	275,9	76,9
APN (UP/mg de proteína)	1150,3	1302,5	1143,6	1288,3	1159,8	1392,2	1004,5	1258,5	1254,6	1370,1
APB (UP/mg de proteína)	858,7	1161,5	732,2	797,5	1035,7	1571,3	647,4	796,8	1009,6	1374,2
APAGLU (UP/mg de proteína)	159,7	204,4	163,5	225,7	154,3	187,1	261,6	291,0	128,3	173,3
NEP (UP/mg de proteína)	3190,6	4684,0	4165,4	5543,2	1674,2	2480,8	2272,5	4282,4	3780,7	4988,5
PEP (UP/mg de proteína)	83,6	118,2	56,2	74,8	127,3	168,0	2,4	1,7	98,3	123,3
ASP (UP/mg de proteína)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DPPIV (UP/mg de proteína)	5321,5	9487,3	6261,0	11595,4	4006,3	5702,2	3349,7	5202,7	6730,0	11635,2
CYS (UP/mg de proteína)	796,6	970,9	735,3	877,7	882,3	1132,4	511,4	532,9	1000,3	1167,9

DE: Desviación estándar; *p<0,05

No hallamos diferencias significativas para ninguna aminopeptidasa en citósol.

DPPIV, NEP y APN son las que más actividad presentan. De ASP no hemos hallado actividad en citósol.

A pesar de no ser diferencias estadísticamente significativas llama la atención las diferencias existentes por sexo en PSA, NEP y PEP, con valores medios con una diferencia de más del doble. Por grupo de artrosis sucede algo similar, PSA y APAGLU presentan un valor medio en el grupo de menor artrosis que es más del doble que en el de mayor artrosis; en el caso de PEP; DPPIV y CYS, la diferencia también es de más del doble, pero en este caso en mayor la media en el grupo de pacientes con mayor grado de artrosis (Tabla 33).

Tabla 34.- Media de las tres determinaciones en membrana (UP/mg de proteína): total, por sexo y según grado de artrosis.

	Total		Hombre		Mujer		Artrosis menos de III		Artrosis III o más	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Proteína (UP/mg de proteína)	2,7	1,8	2,5	1,7	3,0	2,1	2,9	2,0	2,6	1,7
PSA (UP/mg de proteína)	130,5	106,7	150,8	110,9	102,1	98,9	106,4	113,6	147,7	102,2
APN (UP/mg de proteína)	85,6	112,4	75,6	62,9	99,6	161,8	40,7 ^a	37,3	117,6 ^{a*}	136,8
APB (UP/mg de proteína)	27,8	33,7	26,1	21,9	30,3	46,8	12,9 ^b	13,9	38,5 ^{b*}	39,7
APAGLU (UP/mg de proteína)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NEP (UP/mg de proteína)	194,7	109,2	200,1	112,8	186,2	109,7	201,8	123,6	190,1	103,6
PEP (UP/mg de proteína)	12,7	23,7	16,4	29,3	7,2	11,7	8,4	12,7	14,9	28,1
ASP (UP/mg de proteína)	0,4	1,7	0,7	2,2	0,0	0,1	0,0	0,0	0,7	2,2
CYS (UP/mg de proteína)	103,9	91,5	103,6	99,3	104,4	84,5	103,9	86,8	103,9	97,9

DE: Desviación estándar; *p<0,05 (a, b: valores/ distribuciones diferentes)

Hay diferencias significativas **según grupo de artrosis** en la media de las determinaciones de **APN (a)** y de **APB (b) en membrana** (pruebas paramétricas (t-Student) y pruebas no paramétricas (U-Mann Whitney y comparación de medianas). La actividad de APN en membrana la hallamos casi 3 veces mayor en el grupo de pacientes con mayor grado de artrosis (117,6). En cuanto a la APB, observamos una actividad más de 3 veces mayor en el grupo de pacientes con mayor grado de artrosis (38,5) (Tabla 34).

No hemos hallado actividad de APAGLU en fracción membrana, y la actividad de ASP es pequeña. Destaca NEP como la de mayor actividad en esta fracción. Las actividades por lo general son menores que en el resto de las localizaciones, excepto NEP, PEP y CYS que presentan mayor actividad en fracción membrana que en fracción líquido sinovial.

DISCUSION

1. SOBRE LA ACTIVIDAD AMINOPEPTIDÁSICA EN DISTINTOS TEJIDOS

El presente trabajo representa el primer estudio en el que se describen los niveles de tres sistemas peptidérgicos (opioideérgico, oxitocinérgico y renina angiotensina), en líquido sinovial proveniente de tres muestras tomadas en diferentes momentos de pacientes sometidos a tratamiento de artrosis de rodilla (KOA) con factores de crecimiento. Cada muestra se obtiene en un momento específico del tratamiento: antes, durante y después del mismo. El estudio se ha realizado en distintos grados de artrosis: I, II, III y IV. Además, los niveles opioideérgico y oxitocinérgico es la primera vez que se describen en líquido sinovial.

El estudio del metabolismo peptídico se puede llevar a cabo a través del ensayo de su degradación por acción de diversas peptidasas. Ya hemos descrito cuáles son los elementos que participan en cada uno de los sistemas, ya que, si bien hoy en día están claramente establecidas estas regulaciones, hasta hace relativamente poco los trabajos eran mucho más inespecíficos. Para que entendamos un poco esta situación podemos recordar que los primeros trabajos relacionados con el estudio de la actividad peptidásica, su ubicación, características bioquímicas y sustratos se remontan a principios de la década de los años 60 del siglo pasado, aunque posiblemente el verdadero interés por el estudio de la misma surgió a finales de la década de los 70 con el descubrimiento de que la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) tenía efectos antihipertensivos (Ondetti MA et al., 1977). A partir de este momento se multiplicaron las publicaciones relacionadas con el análisis de los enzimas proteolíticos y la regulación de sus péptidos bioactivos, en situaciones tanto fisiológicas como patológicas, tratando además de encontrar aplicaciones clínicas. Muchos de estos estudios estuvieron encaminados a la descripción de las actividades enzimáticas en el sistema nervioso central, aunque actualmente existe un nutrido número de estudios sobre actividad peptidásica en tejidos tan diversos como músculo esquelético, pulmón, corazón, hígado, riñón, intestino, próstata, espermatozoides y ovocitos, etc. (Singh J et al., 2008; Pérez I, et al., 2009; Larrinaga G et al., 2011a; Larrinaga G et al., 2011b; Thorek DLJ et al., 2013), así como en multitud de líquidos corporales (sangre, suero, líquido seminal, líquido folicular) (para una revisión de este tema: Casis L, 2022), ya que se ha demostrado que las peptidasas están involucradas en multitud de funciones fisiológicas y que juegan un papel clave en el control del crecimiento, diferenciación y traducción de señales de multitud de sistemas celulares (Pinto FM et al., 2004).

Algunas de estas actividades enzimáticas han sido también ensayadas en diversas situaciones patológicas con el fin de describir si alguna de ellas pudiera servir como marcador de presencia de enfermedad. Por ejemplo, algunos estudios han propuesto que la expresión y la actividad proteica podrían tener un valor predictivo para la supervivencia de los pacientes con carcinoma de células renales y, por tanto, que estas enzimas podrían ser útiles como marcadores tumorales pronósticos en esta enfermedad. En este sentido, en el año 2012 el grupo de trabajo de Casis L presentó un

estudio prospectivo (Larrinaga G et al., 2012) sobre la actividad y expresión de un pool de peptidasas en varios subtipos histológicos de cáncer renal, y observaron que la actividad de algunas peptidasas como APN, CAP y DPPIV se incrementó en alto grado en la etapa avanzada de carcinoma renal de células claras (CCRCC), con mucho, el más frecuente carcinoma en el riñón. Mostraron que la supervivencia a 5 años de pacientes con CCRCC era más corta si la actividad de estas tres peptidasas era alta. Por el contrario, los altos niveles de actividad de APB se correlacionan con una supervivencia significativamente mayor de 5 años. Con estos datos sugirieron la implicación de las peptidasas en la agresividad biológica de CCRCC y apoyan la utilidad de estas proteasas no solo como marcadores pronósticos de esta enfermedad, sino también en la delimitación de la supervivencia de esta neoplasia.

Por tanto, se describieron las peptidasas como nuevas herramientas de diagnóstico con impacto pronóstico, particularmente rentables en el hospital, al ser su determinación fácil, asequible y repetitiva. De hecho, llegaron a patentar un sistema de diagnóstico basado en peptidasas y receptores (Larrínaga G et al., 2015)

Posteriormente describieron (Blanco L et al, 2014) cómo la actividad de Glu-AP se correlacionaba positivamente con el tamaño del tumor de CCRCC, lo que indicaba que esta peptidasa probablemente estaba involucrada en el grado de crecimiento y agresividad del mismo. Se ha implicado a este enzima como regulador del crecimiento tumoral mediado por angiotensina II y la invasividad a través de la conversión de angiotensina II (ang II) producida localmente en varios tumores sólidos (Ino K et al., 2004). La regulación a la baja de Glu-AP y otras peptidasas convertidoras de angiotensina (Varona A et al., 2007; Blanco L et al., 2008) sugiere un desequilibrio en el metabolismo de las angiotensinas intrarrenales. Dado que esta enzima convierte la angiotensina II en III, se produciría una acumulación de angiotensina II en vasos tumorales renales, lo que podría estimular la angiogénesis.

En este sentido, y precisamente en relación con el sistema renina angiotensina, cada vez hay más evidencia de que la señalización del mismo también está involucrada en la respuesta inflamatoria asociada con varios estados de enfermedad. La inflamación es una parte normal de la respuesta inmune a una lesión o infección, pero su desregulación promueve el desarrollo de enfermedades inflamatorias, que causan un sufrimiento humano considerable. Los agentes antiinflamatorios no esteroideos son los agentes prescritos con mayor frecuencia para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias, pero se acompañan de una amplia variedad de efectos secundarios, incluidos los eventos gastrointestinales y cardiovasculares. El sistema renina-angiotensina es tradicionalmente conocido por su papel en la regulación de la presión arterial. La angiotensina II aumenta la presión arterial al unirse al AT1R, y los inhibidores directos de la renina, los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y los bloqueadores del AT1R (BRA) se usan clínicamente como agentes antihipertensivos. Datos recientes sugieren que estos fármacos también tienen efectos antiinflamatorios, y por ello los IECA y los BRA se utilizan para reducir o tratar enfermedades inflamatorias como la aterosclerosis, la artritis, la esteatohepatitis, la colitis, la pancreatitis y la nefritis

(Ranjbar R et al., 2019). Por tanto, el SRA está implicado en la señalización de las respuestas inflamatorias. Más adelante presentaremos los pocos trabajos existentes sobre los niveles locales de los componentes del SRA a nivel de líquido sinovial.

Pero para terminar esta discusión comparativa de metabolismos peptidérgicos a distintos niveles y, sobre todo, su posible utilización como marcadores de estados fisiopatológicos, presentamos algunos resultados de estos niveles no ya a nivel tisular, sino a nivel de líquidos orgánicos.

Un primer estudio realizado por Romeu y colaboradores (Romeu C et al., 2018; Romeu C, et al., 2020) describieron los niveles de 9 enzimas proteolíticas en líquido folicular (LF) humano en mujeres sanas y con diversas patologías de fertilidad. Observaron cómo, en LF de mujeres sanas, los mayores niveles de actividad los registraban la APN, PSA, APB y DPPIV, mientras que el resto de peptidasas presentaban una actividad significativamente inferior. A este estudio siguió otro (Rodríguez Gallego MV et al., 2022), realizado en tres muestras de líquido folicular por cada paciente y que no solo corroboró los resultados de Roméu, sino que ayudó a sentar las bases de la utilización de diversas peptidasas como marcadores de fertilidad (edad avanzada, endometriosis, factor tubárico). En estos estudios se describieron los enzimas de acuerdo con su papel en distintos metabolismos peptidérgicos, y que serán los que utilizemos en el presente trabajo. Esquemáticamente:

-Sistema encefalinérgico: controlado por los enzimas APN/CD13, APB, APA, PSA, PEP y NEP/CD10, y a través de los mu, delta y kappa receptores de opioides.

-Sistema oxitocinérgico: controlado por los enzimas PEP y Cys-AP.

-Sistema renina angiotensina, controlado cada paso por: prolil endopeptidasa (PEP) (que transforma las angiotensina I (Ang I) y angiotensina II (Ang II) en angiotensina 1-7 (Ang1-7); endopeptidasa neutra (NEP) (Ang I a Ang1-7); aminopeptidasa N (APN/CD13): angiotensina III (Ang III) a angiotensina IV (Ang IV); aminopeptidasa A (APA) (Ang II en Ang III); aminopeptidasa B (APB) (Ang III en Ang IV); y enzima convertidora de angiotensina (ACE) (Ang I en Ang II), así como los receptores AT1R (receptor de Ang II y Ang III), AT2R (receptor de Ang II), MasR (receptor de Ang1-7), AT4R (receptor de Ang IV) y PRR (receptor de prorenina).

En dicho estudio, las actividades de las enzimas APN, PSA y APB fueron más altas en el subgrupo de mujeres mayores de 40 años. Estas diferencias sólo fueron significativamente diferentes en el caso del PSA. En cuanto a la participación de peptidasas en patologías reproductivas, se observó que se produjo un incremento significativo de la actividad de PSA y APB en mujeres con síndrome de ovario poliquístico (PCOS) o endometriosis (END) al compararlas con el Grupo Control (grupo fértil: 20-34 años). Se propuso que los metabolismos opioidérgicos y del SRA estaban alterados tanto en mujeres mayores de 40 años de edad como en pacientes con PCOS y END, lo que parecía revelar que un ambiente folicular adverso alteraba el metabolismo de los péptidos de dichos sistemas. Por lo tanto, algunos de estos componentes podrían ser utilizados como biomarcadores de diagnóstico.

Muy recientemente se han descrito modificaciones en líquido seminal de los sistemas antecitados. Por ejemplo, Aparicio y colaboradores (2022) han propuesto que el SRA está implicado en la respuesta espermática celular que puede producir la fragmentación del ADN, aunque estudios previos ya habían propuesto a algunos de estos enzimas como posibles biomarcadores de fertilidad masculina (Subirán N et al., 2008; Fernández D et al., 2002; Subirán N et al., 2011; Valdivia A et al., 2004).

Pero una vez descritos los sistemas reguladores, vamos a presentar algunos de los pocos trabajos que implican a alguno de estos sistemas en la respuesta inflamatoria, y más concretamente en la artrosis de la rodilla, aspecto más relacionado con el presente proyecto de tesis doctoral. Uno de los primeros trabajos fue el desarrollado por Shimizu y colaboradores (Shimizu T et al., 2002) describiendo los niveles de APN en pacientes con artritis reumatoide, enfermedad crónica que se caracteriza por la inflamación de las articulaciones y la destrucción concomitante de cartílago y hueso. Encontraron una mayor actividad de aminopeptidasa en los líquidos sinoviales y una mayor expresión de CD13/aminopeptidasa N en fibroblastos sinoviales en pacientes con AR en comparación con pacientes con artrosis (OA), demostrando que la CD13/aminopeptidasa N tiene un papel importante en la participación de los linfocitos en las articulaciones inflamadas de los pacientes con KOA: De hecho es sobradamente conocido desde hace tiempo que los linfocitos T tienen un papel importante en el desarrollo de la inflamación articular en la AR (Janossy G et al., 1981), ya que liberan citocinas, como interferón- γ (IFN- γ) (Feldman M et al., 1996) e interleucina-6 (IL-6) (Hirano T et al., 1988), que activan aún más los linfocitos e inducen la producción de autoanticuerpos, como el factor reumatoide (Ridley MG et al., 1986). Por lo tanto, la participación de los linfocitos T puede desempeñar un papel importante en las articulaciones inflamadas en la AR. Varias quimiocinas, incluidas IL-8 (Wilkinson PC y Newman J, 1992), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) (Taub DD et al., 1995), proteína inflamatoria de macrófagos 1 (MIP-1) (Schall TJ et al., 1993) y RANTES (Schall TJ et al., 1990), son quimioatrayentes de linfocitos. Las no quimiocinas, como la IL-2, también tienen tal actividad, y se ha demostrado que la IL-15 induce la quimiotaxis de los linfocitos de forma selectiva (Wilkinson PC y Liew FY, 1995).

Este primer trabajo fue corroborado (a nivel experimental) por Yamasaki y cols, en el año 2012, que describieron que las actividades de APN y DPPIV se expresan en el líquido sinovial de animales de experimentación. Las ratas resistentes a la artritis inducida por colágeno se caracterizaban por una alta actividad de DPPIV en plasma y una baja actividad en fracción soluble de células mononucleares (CM), junto con una baja actividad de APN en fracción de membrana (FM) del tejido sinovial. Por otro lado, niveles elevados de APN en plasma, líquido sinovial y fracción soluble del tejido sinovial, junto con niveles bajos de APN y DPPIV en FM de CM caracterizaban la susceptibilidad a desarrollar artritis. Propusieron que los cambios compartimentados en las actividades de APN y DPPIV podrían representar nuevos objetivos potencialmente valiosos que condujeran a una mejor comprensión de los procesos artríticos y tratamientos novedosos.

En el año 2005, Cobankara y cols. describieron modificaciones de algunos componentes del SRA sinovial. Así, los niveles de ACE en el líquido sinovial fueron significativamente más altos en los pacientes con AR que en los pacientes con OA. Asimismo, las concentraciones de renina en líquido sinovial fueron mayores en pacientes con AR que en pacientes con OA, mientras que las concentraciones de renina sérica fueron similares en pacientes con AR y OA y en controles sanos. Además, hubo una correlación negativa significativa entre la duración de la enfermedad y las concentraciones de renina sinovial en pacientes con AR. En conclusión, la renina activa y la ACE generadas localmente podrían contribuir a la destrucción articular en la artritis reumatoide.

Más reciente es el estudio de Seco y cols. en 2020, que describieron la primera evidencia de un posible papel de la actividad peptidásica del líquido sinovial como biomarcador de pronóstico clínico para la evolución de la artrosis de la rodilla. Analizaron la actividad de varias peptidasas del líquido sinovial, como elementos esenciales del sistema renina-angiotensina local articular, poniendo de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre los pacientes que requirieron artroplastia total de rodilla y otros pacientes con KOA avanzada cuyo estado fue manejado de forma conservadora. En concreto, en los primeros observaron actividades de líquido sinovial significativamente superiores en los casos de APB, PEP, ASP, GLU y PGAP, pero sin diferencias en APN y PSA, lo que indica alteraciones en el sistema renina-angiotensina local en pacientes con deterioro funcional importante. Esto está de acuerdo con la observación de Yamasaki y cols. antes descrita, de menor actividad de APB en líquido sinovial de rodillas no edematosas en un modelo de rata con artritis reumatoide (Insall JN et al., 1989), así como la presencia de actividad NEP en el líquido sinovial que puede inducir la quimiotaxis de células T, en un modelo animal similar. También hay que tener en cuenta que la NEP es expresada por sinoviocitos tipo fibroblastos y está implicada en la patogenia de la artritis reumatoide (Federation of European Nutrition Societies (FENS). 2020. Sugirieron que la actividad del líquido sinovial del PSA era un factor protector, mientras que las actividades de PEP y GLU eran factores de riesgo para la misma, proponiendo un posible papel de la actividad peptidásica sinovial como biomarcador pronóstico de progresión clínica de KOA, lo que sería útil en la práctica clínica habitual.

En el presente trabajo describimos los niveles de actividad de 11 enzimas peptidásicas a tres niveles distintos del líquido sinovial, con el fin no solo de describir el metabolismo peptídico del mismo, sino de tratar de encontrar posibles marcadores de KOA en sus diversos grados y tras el tratamiento. En primer lugar, hemos obtenido actividad de las 11 aminopeptidasas en LS, con lo que demostramos no solo que están presentes en el líquido, sino que presentan actividad aminopeptidásica en su fracción completa.

También hemos descrito la actividad aminopeptidásica en la fracción membrana en 8 de ellas, observando actividad en 7. Además, hemos estudiado la actividad en la fracción citosol en 9 de ellas, observando actividad en 8. Sin embargo, la enorme variabilidad que observamos en estas fracciones nos limita enormemente la posibilidad de discutir los resultados y mucho más la posibilidad de encontrar algún tipo de marcador en dichas fracciones, al contrario de lo que describían Yamasaki y cols. Por ello nos referiremos en

este primer apartado exclusivamente a los niveles obtenidos en LS. No podemos saber si lo que ocurre es que las muestras ensayadas lo eran siempre así tras la ultracongelación. De hecho, aunque realizamos fijaciones en portaobjetos de acuerdo con técnicas básicas descritas, no pudimos observar formas celulares propiamente dichas. Como ya hemos citado en la introducción, desde un punto de vista práctico, parece fundamental que el recuento celular se lleve a cabo siempre dentro de las dos primeras horas posteriores a la toma de las muestras (es decir, en muestra fresca), ya que se ha observado que lecturas posteriores afectan seriamente a los resultados, debido a la fragilidad de las células fuera de la articulación (Martínez Castillo A et al., 2010).

Los resultados obtenidos muestran en primer lugar que todas las muestras estudiadas presentan actividad enzimática para las 11 peptidasas ensayadas en LS, siendo los mayores niveles los observados para la DPPIV, seguidos de PSA, APN, APB y NEP, siendo los menores los observados para la APA, Cys-AP, ACE, Asp-AP, PEP y ACE2, en orden de actividad.

Describir actividad de estas aminopeptidasas, es describir la participación en líquido sinovial de los sistemas citados anteriormente y desde un punto de vista clásico: el opioide-encefalínico (APN, APB, APA, PSA, PEP y NEP), el SRA local (Asp-AP, APA, APB, APN, PEP y NEP), el oxitocínico (Cys-AP y PEP) y la regulación de citoquinas y quimiocinas (DPPIV).

La DPPIV está involucrada en la activación e inactivación de un gran número de citoquinas y quimosinas (Havre P et al., 2008), además de su acción sobre péptidos bioactivos y su papel en el sistema inmune, esta aminopeptidasa tendría especial relevancia en el transporte específico de algunos dipéptidos y tripéptidos (Tirupathi C et al., 1990). A pesar de ser una glicoproteína de membrana, que presenta un extremo amino terminal de tan sólo 6 aminoácidos hacia el citoplasma, un dominio hidrofóbico que la ancla a la membrana y un gran dominio extracelular en el que se haya el centro activo. También se ha visto, que en ocasiones, la pérdida del extremo amino terminal insertado en la membrana, puede originar su presencia en forma soluble en suero humano, líquido cerebroespinal, líquido seminal y otros fluidos corporales (Iwaki-Egawa S. et al., 1998; Casis L, 2022), por lo que es válido encontrar actividad de este enzima en líquido sinovial, si bien es interesante el hecho de que esta sea la actividad enzimática más alta hallada en este estudio, coincidente (de manera curiosa) con los resultados obtenidos en LF. Este resultado podría corroborar la propuesta de Yamasaki de que la DPPIV podría representar nuevos objetivos potencialmente valiosos que condujeran a una mejor comprensión de los procesos artríticos y tratamientos novedosos de la KOA.

Los niveles de péptidos opioides están controlados por la degradación enzimática, siendo sus enzimas reguladores los más estudiados hasta el momento. Específicamente, son dos las enzimas degradadoras de encefalinas: la APN (recordemos que este enzima también participa en la regulación del SRA) y la PSA. También han sido implicadas en el control de los niveles de opioides endógenos las enzimas APB y APA, si bien estas actividades parecen participar también en la regulación de los niveles de otros péptidos.

Así, entre los sustratos naturales de la APB se encuentran las bradiquininas, encefalinas, somatostatina, Angiotensina III y kalidinas (McLellan S et al., 1988; Foulon T et al., 2004).

En el presente trabajo hemos observado cómo, tras la DPPIV, los niveles más altos se observan en PSA, APN, APB, NEP y APA. De ello podríamos deducir la existencia de un importante sistema opioidérgico “local”. Incluso más específicamente se podría hablar de un sistema encefalinérgico “local”, que lógicamente estaría implicado en el mantenimiento del microambiente sinovial.

Además del sistema opioidérgico, otro importante modelo de regulación fisiológica es el sistema renina angiotensina, del que existen evidencias de la presencia local del mismo en LS (Seco-Calvo J et al., 2020). Como hemos comentado, y para comparar exclusivamente los niveles de actividad sinoviales, Seco y cols. demostraron la existencia de diferencias significativas entre los pacientes que requirieron artroplastia total de rodilla y otros pacientes con KOA avanzada cuyo estado fue manejado de forma conservadora. En concreto, en el primero observamos actividades de líquido sinovial significativamente superiores en los casos de APB, PEP, Asp-AP, APA, pero sin diferencias en APN y PSA, lo que indica alteraciones en el sistema renina-angiotensina local en pacientes con deterioro funcional importante. En el presente trabajo, y en relación con los niveles de actividad enzimática del SRA local, observamos cómo, de mayor a menor, las actividades fueron: APN, APB, NEP, APA (Glu-AP), ACE, Asp-AP, PEP y ACE2. Por lo que, al menos inicialmente, estos resultados sugieren un posible papel de la actividad de la peptidasa del líquido sinovial como biomarcador pronóstico de progresión clínica de KOA, lo que sería útil en la práctica clínica habitual.

Finalmente, también han sido incluidas en este proyecto de investigación enzimas que participan en la regulación de los niveles oxitocinérgicos (PEP y Cys-AP), siendo en ambos casos los niveles de actividad bajos, si bien los de la Cys-AP son casi 10 veces superiores a los de la PEP. Como decimos debemos matizar que tanto los niveles de Cys-AP como de PEP son de los más bajos hallados en el presente trabajo, por lo que podría ser factible que el papel de ambas enzimas fuera pequeño, es decir, que la importancia del sistema oxitocinérgico a nivel sinovial fuera menor que el observado y descrito en otros líquidos orgánicos.

2. SOBRE LAS AMINOPEPTIDASAS EN LA ARTROSIS: ACTIVIDAD OBSERVADA Y NUEVAS PERSPECTIVAS

LA ARTROSIS COMO ENFERMEDAD CRÓNICA E INFLAMACIÓN DE BAJO GRADO

La artrosis es una enfermedad crónica con una alta prevalencia en nuestro medio. Es una de las enfermedades que más incapacidad produce, lleva una alta morbimortalidad asociada y produce un deterioro significativo en la calidad de vida. Supone un importante consumo de recursos sobre todo en los países desarrollados (Vos Tet al., 2012).

El gasto sanitario aumenta año tras año, haciendo presagiar un futuro difícilmente sostenible. El aumento de la esperanza de vida, el cambio de los hábitos de vida, el aumento de la obesidad y el aumento de las expectativas de calidad de vida, son los principales responsables del aumento particular que ha experimentado el gasto en patología del aparato locomotor, principalmente patología degenerativa y crónica, como la artrosis (Loza E et al., 2009).

En los Estados Unidos de América (EUA), el gasto relacionado con la artrosis se ha duplicado en los últimos 15 años. Si bien es cierto que la investigación en este campo ha aumentado en los últimos años, ésta aún es insuficiente, y no se han conseguido tratamientos que alteren el curso de la artrosis. La medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos pueden dar respuesta en parte a la necesidad de un tratamiento que no sea de sustitución articular protésica y con un mejor coste-efectividad (Cross M et al., 2014; Palazzo C et al., 2014).

La última definición de la artrosis de la OARSI refleja lo que actualmente entendemos como artrosis: una mal adaptación a daños producidos en la MEC y el estrés celular, activan vías inflamatorias que incluyen la inmunidad innata. Se producen unos cambios que parten de lo molecular, van progresando en morfofuncionales y pueden finalmente ser clínicos (Kraus VB et al., 2015).

Todos los pacientes con artrosis comparten ciertas características fisiopatológicas y moleculares, por ejemplo, por ser crónica y por producirse una inflamación de bajo grado. Pero la artrosis también se caracteriza por las diferencias entre las personas afectadas, por la variabilidad interpersonal: por ser heterogénea. Y es que es heterogénea en los síntomas y su intensidad, en la velocidad de progresión, en la afectación de los diferentes tejidos articulares y su grado, en la correlación de la alteración de los tejidos o en las imágenes radiológicas con la clínica, en el momento del diagnóstico, en los datos epidemiológicos de los pacientes, en los factores de riesgos, en la variabilidad interpersonal en las características de los propios tejidos afectados (morfológicas, de adaptación, moleculares, genéticas...), entre otros aspectos (Labinsky H et al., 2020).

Como hemos dejado recogido en la profunda revisión bibliográfica realizada y también recoge la OARSI, la artrosis ha dejado de ser vista como una enfermedad por uso y desgaste de la articulación. El estrés mecánico se sigue considerando un desencadenante de la artrosis, pero ya no es el único. La edad, la enfermedad metabólica, todos los factores y situaciones que aumenten el estrés celular, y que acaban contribuyendo a que aumente la inflamación de bajo grado y se active la inmunidad innata, son promotores de la artrosis. Vemos recogidos en la figura 46 un resumen esquemático de algunos de los participantes más importantes en la patogenia (de Lange-Brokaar BJ et al., 2012).

Como resumen, el aspecto metabólico y sistémico ha adquirido mucho más peso en la etiopatogenia con el mayor conocimiento de estos últimos años, y es ahora un eje central en los mecanismos fisiopatológicos. La artrosis se considera hoy una enfermedad más global en el organismo y en cierta forma sistémica (Courties A et al., 2019; Bolduc JA et al., 2019).

Todo esto hace ver que las aminopeptidasas tienen muchos lugares de participación, más aún de los que pensábamos al plantear el estudio. Así, lo hemos recogido en la introducción, donde se ve que cada vez se les atribuyen más funciones en otros tejidos, pero en vías moleculares que también están presentes en la articulación.

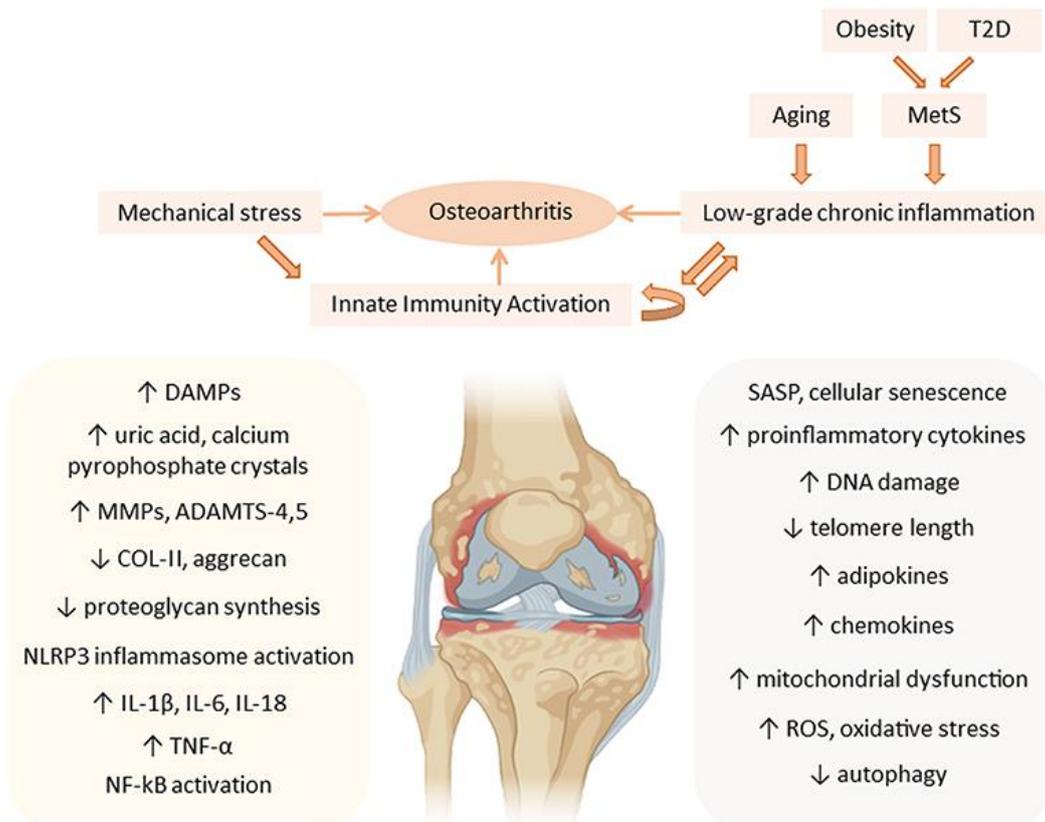


Figura 46.- Esquema de los factores etio-patogénicos, las alteraciones moleculares y los cambios celulares característicos de la patogenia de la artrosis.

Imagen de Gratal P, Lamuedra A, Medina JP, et al. Purinergic System Signaling in Metainflammation-Associated Osteoarthritis. *Front Med (Lausanne)*. 2020;7:506. Published 2020 Aug 28.

En este estudio se ha elegido la rodilla como articulación objeto de estudio por ser la artrosis de rodilla una de las de mayor prevalencia y ser de fácil acceso para la obtención de muestras. A la hora de valorar los datos obtenidos y extrapolarlos al funcionamiento articular debemos tener en cuenta, que a pesar de lo referido, la rodilla es una articulación de carga en la que el factor mecánico es determinante; en contraposición con articulaciones como la muñeca o el codo en las que rara vez encontramos artrosis. Incluso en el tobillo, que es una articulación de carga, la incidencia de artrosis es muchísimo menor que en la rodilla o cadera; y cuando aparece en esas otras articulaciones, suele ser postraumática o con una lesión inestabilizante.

En los últimos años la aceleración en la aparición de nuevos tratamientos para la artrosis ha aumentado, aunque ninguno modificador de la enfermedad con éxito claro. Y es que su evaluación y traslación clínica es complicada si se desconoce la fisiopatología y se suma su heterogeneidad. Para el desarrollo y adecuada valoración de las nuevas terapias es necesario establecer unos criterios estandarizados y universales de evaluación. Y este ha sido uno de los objetivos del presente estudio, identificar ciertos péptidos en la articulación, algunos de ellos no descritos previamente en la artrosis y describir la participación en la fisiopatología de la artrosis de ciertos mecanismos moleculares. En esta línea también podría establecerse alguna de las aminopeptidasas estudiadas, como biomarcador para el diagnóstico, seguimiento y herramienta de control en estudios.

Hemos visto que la sinovitis está tomando un papel central en la artrosis, en parte por su papel en el establecimiento y progresión de la artrosis. Y es que puede aparecer antes del establecimiento radiográfico de la artrosis e incluso puede tener cierto patrón predictivo de su progresión, influye en el dolor y también en las escalas funcionales (Berenbaum F, 2013). Esto además viene apoyado, por el tratamiento farmacológico principal hoy en día: los AINES y corticoides. Los 2 son antiinflamatorios y han demostrado cierta mejoría en la clínica. Estarían actuando sobre esta inflamación de bajo grado de la sinovial principalmente, y en general de las vías inmuno-inflamatorias activas en las artrosis, que justificaría la mejoría (Mathiessen A y Conaghan PG, 2017).

Detectar esta inflamación temprana de la sinovial permitiría establecer un tratamiento precoz, antes incluso del establecimiento clínico. Las aminopeptidasas implicadas en procesos tempranos podrían servir de marcadores de diagnóstico temprano junto con otros marcadores moleculares y patrones de RMN. Esto permitiría un tratamiento en fases tempranas que tendría como diana esos procesos inflamatorios de la sinovitis y otros tejidos que promueven el perpetuamiento del daño condral. El reto está en buscar unos tratamientos y dianas más específicas, quizás alguna de las aminopeptidasas implicadas en la fisiopatología articular.

ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASICA OBSERVADA Y SU PAPEL EN LA ARTROSIS

Está habiendo una gran progresión en el conocimiento de la fisiología del organismo en general, y concretamente del papel de las aminopeptidasas en sistemas como el cardiovascular, nervioso, renal, entre otros. Esto nos está haciendo ver una mayor interconexión entre diferentes sistemas del organismo, y establecer donde termina la fisiología de uno y de otro, es cada vez más complejo. Antiguas propuestas cogen peso y otras nuevas surgen basadas en estudios prometedores sobre las relaciones entre componentes del aparato digestivo (como la microbiota, componente inmune, la alimentación) con procesos cognitivos por ejemplo. Procesos fisiológicos y patológicos como la inflamación, la respuesta inmune, el envejecimiento y los agentes externos (dieta, estilos de vida, sueño, personalidad, drogas, salud mental) también difuminan sus límites y la influencia que tienen en muchos sistemas se extiende e interdigita. La evidencia sobre la influencia que pueden tener todos ellos sobre la fisiopatología de la artrosis empieza a ser digna de prestarle atención. (Du Y et al., 2019; Descamps D et al., 2020). Aquí proponemos a las aminopeptidasas como un nexo común de afectación en patologías crónicas con mayor o menor relación directa, y la vez analizables en el microambiente articular: el líquido sinovial.

En la revisión realizada por nosotros, evidenciamos que desde principios de los años 90 hasta la actualidad el interés por el estudio de las aminopeptidasas es mínimo, excepto contados artículos. Ni siquiera planteamientos descriptivos de que están presentes. Tampoco de que se haya propuesto que las aminopeptidasas pudieran tener un papel de cierta relevancia en la artrosis

Como presentamos en el congreso nacional de la SECOT (Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología) en el año 2018, describimos la actividad en líquido sinovial del mayor número de aminopeptidasas realizado a esa fecha en un mismo estudio, hasta nuestro conocimiento, alguna descrita por primera vez y otras descritas tras muchos años sin hacerse. Además, como hemos mencionado, estas aminopeptidasas incluyen e implican que existe actividad a nivel articular, de los sistemas clásicos de regulación y control de la renina angiotensina, del encefalinérgico, del oxitocinérgico y de citoquinas y quimiocinas. Cubrimos así un amplio espectro de actividad reguladora articular.

La mayor parte de los estudios realizados sobre aminopeptidasas hasta la fecha en articulaciones son en pacientes con artritis reumatoide, siendo los realizados en pacientes con artrosis muy escasos en número; un porcentaje importante de estos son de antes del año 2000 (NCBI-PUBMED).

Nuestro estudio va más allá de un análisis puntual y no se limita a la toma de una muestra en un momento concreto, como mera descripción, sino que se toman tres muestras a lo largo de un tratamiento con PRGF. En nuestra principal revisión bibliográfica, a la obtención de los resultados del presente ejemplar (2019), no se había realizado previamente la toma consecutiva de muestras en pacientes con artrosis. Esto nos permite dar una consistencia mayor de los datos sobre la actividad peptidásica

obtenida, al no ser de una toma aislada. La actividad se mantiene en el tiempo y hemos sido capaces de observar cómo se comportan con el tratamiento.

Por otra parte, la división de cada muestra en tres fracciones nos ha permitido, además de describir la actividad del líquido sinovial en sí, hacerlo también en la fracción soluble de citosol e interior de vesículas y orgánulos, y de la fracción unida a membrana. La metodología y la tecnología empleada en base a los objetivos del estudio, no nos permiten diferenciar que actividad de las aminopeptidasas proviene de las que se encontraban realmente activas. Tampoco nos permite localizar exactamente la ubicación de su actividad a nivel intracelular. Por ejemplo, las aminopeptidasas unidas a membrana en el interior de vesículas citoplasmáticas se encuentran en estado inactivo pendientes de traslocarse. En cambio, la actividad de estas aminopeptidasas sí la recogemos en la fracción unida a membrana junto con las que estando en membrana celular se encontraban activas.

El aumento del conocimiento del sistema opioide, nos está permitiendo ver que la participación de este en la artrosis puede ser mayor de lo que uno podría pensar y se le atribuía hasta ahora; e ir más allá del papel sobre el dolor (Xu N et al., 2020). El sistema opioide interactúa con la inmunidad innata y adquirida, modula la inflamación y la respuesta algésica, así como el sistema neuroendocrino y autónomo, y participa en procesos cognitivos y emotivos (Feng Y et al., 2012). Si el sistema opioide se ve alterado, podríamos detectarlo con la medición de la actividad de las aminopeptidasas implicadas en él, entre otras, encefalinasas. Apoyando la importancia del papel de las aminopeptidasas en la artrosis y el sistema opioide, ya hace más de 20 años que se vio que inhibiendo NEP, ACE y APN con espinorfina, se reducía el dolor, la inflamación y la migración de neutrófilos, pero sin ensayos aun en artrosis (Nishimura K et al., 1993; Yamamoto Y et al., 2002; Yamamoto Y et al., 1997). Estos tres aspectos que estarían condicionados por estas aminopeptidasas, son importantes en la patogenia de la artrosis.

Dos de estas encefalinasas cuya actividad hemos descrito en este trabajo, la **APN** y la **NEP**, están siendo ensayadas y propuestas como dianas para el tratamiento del dolor. Aquí describimos su participación en el ambiente del líquido sinovial, y es posible que sus niveles mantengan cierta relación con procesos algésicos (Roques BP et al., 2012).

En cuanto a alteraciones en la **NEP**, pueden reflejar cambios en la inflamación, en el dolor y en el estado de ánimo. La sustancia P parece tener un efecto modulador de la inflamación y punto de unión entre lo mecánico y lo químico, y también nexo entre el sistema nervioso, inmune y la inflamación (Hernanz A et al., 2003). La sustancia P (y las bradiquininas) están estrechamente reguladas por la NEP por lo que medir los niveles de NEP podría servir de monitorización de los mecanismos en los que está implicada la sustancia P (Halliday DA, et al., 1993). Y es que la NEP también está implicada en la metabolización de componentes activos del sistema opioide, y la alteración en sus niveles puede influir en el estado anímico. De hecho, en el año 1993 ya se planteó si podía reflejar la actividad de la AR o más bien reflejaba su actividad como regulador del dolor y la inflamación en la articulación (Matucci-Cerinic M et al, 1993), aunque otros

estudios si la relacionan con la progresión de la artrosis y AR (Wang H et al, 2015). Incluso se ha propuesto como herramienta para detectar niveles bajos de inflamación a nivel articular (en AR) (Barbosa-Cobos RE et al., 2018). Ya se propuso a la NEP como diana terapéutica de procesos inflamatorios (Solan NJ et al., 1998). Además, se ha propuesto como marcador de la depresión (Gregoriou GC et al., 2020)

Aunque no hemos encontrado diferencias ni por grado de artrosis, ni por sexo, ni modificaciones durante el tratamiento, si hemos descrito su actividad en el líquido sinovial, en citosol y unida a membrana, viendo sobre todo en citosol una gran diferencia de unos pacientes a otros. Sobre todo, destacan algunos con unos niveles muy elevados, lo cual sería de interés de mayor investigación junto con datos clínicos. Quizá pueda guardar cierta relación con aquellos pacientes con dolor neuropático o nociceptivo.

Por su parte la **APN**, descrita y estudiada ampliamente en numerosos tejidos, con actividad incluso a nivel mitocondrial y núcleo, es una de las más estudiadas a nivel articular, desde que fue descrita hace casi 30 años, de todas las aminopeptidasas incluidas en este estudio. Igual que otras aminopeptidasas su estudio en la articulación se ha centrado en la AR. Aun así, se han descrito muchas funciones de importancia en la patogenia de la artrosis, con lo que su papel en esta parece claro (Du Y et al., 2019). Y este va más allá de su papel más conocido como encefalinasa y dentro del SRA. Produce un incremento de los FLS, favorece la migración de Lck y monocitos a la articulación, aumenta la producción de citoquinas, y ejerce un papel sobre la angiogénesis y la inflamación (Chomarat P et al., 1995; Morgan R et al., 2015); se encuentra en la superficie del condrocito y puede regular su fenotipo a uno artrósico (Nefla M et al. 2015). En rasgos generales la actividad es mayor en AR que en OA, aunque en OA es muy variable de unos pacientes a otros. (Harrington JJ et al., 2006; Lai A et al., 2010).

Con una actividad asociada al componente inmuno-inflamatorio, sobre la angiogénesis y el condrocito, la medición de sus niveles puede ser un buen indicador de actividad inflamatorio-lesiva y progresión de la artrosis. Así, aquellas OA que tuviesen unos niveles más elevados, nos indicarían un mayor componente inflamatorio (Shimizu T et al., 2002).

En este sentido en nuestros resultados hemos observado como en la muestra basal y tras el inicio del tratamiento, en la fracción unida a membrana, los niveles de actividad de APN son significativamente mayores en los pacientes con mayor grado de artrosis, respecto a los de menor grado de artrosis. Además, en líquido sinovial, hemos visto como en el grupo con menor artrosis los niveles de actividad de APN se ven modificados durante el tratamiento con PRGF. Esto podría reflejar que este tratamiento produce cambios sobre la actividad de APN, al menos en este grupo de pacientes con una artrosis menos evolucionada.

Hemos visto que el hueso y el cartílago son elementos dinámicos que tratan de adaptarse a los estímulos. Las zonas que reciben mayor carga mecánica de la articulación son las que tienen una mayor demanda metabólica y recambio celular, y por lo tanto serán las más sensibles a una afectación en la capacidad de nutrición (Hopwood B et al., 2007). También hemos visto las características del metabolismo anaerobio del

condrocito inmerso en la MEC (Mobasher A et al., 2005). En estadios iniciales de la artrosis (preclínicos y preradiográficos) se dan numerosos cambios en el metabolismo del condrocito. Existe un mayor metabolismo con una mayor demanda de energía (glucosa) y oxígeno, que acaba haciendo que exista hipoperfusión que produce cambios celulares y moleculares en el condrocito (Yang G et al., 2016). Además, estos estímulos favorecen los mayores cambios que se dan en la vascularización de dichas zonas y a su vez verse más afectados por alteraciones vasculares (teoría vascular) (Ching K et al., 2021).

Así, durante los cambios propios de la osificación endocondral en la artrosis, se altera el metabolismo de la glucosa, que lleva a la alteración de la maduración de los condrocitos (Hollander JM y Zeng L, 2019). Esto nos hace pensar en la importancia de las vías metabólicas entorno a la glucosa para el correcto funcionamiento del condrocito como integrante de la articulación. En nuestro estudio destacamos la IRAP como la aminopeptidasa más implicada en el metabolismo de la glucosa. Además, se produce una disfunción mitocondrial, un aumento del estrés oxidativo y mayor acumulación de AGEs.

La **IRAP o Cys-AP** fue descrita por primera vez a nivel articular a finales de los 60 por el grupo de Baniowski, en 1970 por Vainio con una técnica similar a la empleada aquí (Vainio U, 1970), y por un grupo alemán en el 72 (Kurdow N y Oeser W, 1972); durante más de 50 años solo ha vuelto a ser descrita otra vez mas a nivel articular (Lees T et al., 1991), para nuestro conocimiento, y todos ellos en pacientes con artritis reumatoide. En cambio, su estudio en otros tejidos como cerebro, líquido amniótico o células del sistema inmune ha visto importantes avances. Describimos por tanto por primera vez actividad de IRAP a nivel articular de pacientes con artrosis. Además, es la primera vez que se describe en líquido sinovial, fracción soluble y unida a membrana, identificando su actividad en las tres. También es la primera vez que se recogen muestras durante un tratamiento para el análisis de esta aminopeptidasa. Tras el inicio del tratamiento, vemos diferencias estadísticamente significativas, en la actividad de IRAP en líquido sinovial, observando menor actividad en el grupo de pacientes con menor grado de artrosis y mayor actividad en el grupo de mayor artrosis.

Apoiando aún más la participación de la IRAP en las alteraciones metabólicas de la artrosis, en los pacientes obesos existe un aumento de la inflamación en el tejido adiposo, lo que genera la alteración de la IRAP y la resistencia a la insulina (Segarra AB et al, 2020). En la artrosis también existe un ambiente inflamatorio en la articulación, con aumento TNF- α . Esto podría producir la glicosilación amplia de la IRAP modificando su función y pudiendo al menos alterar el metabolismo celular en la articulación. La TNF- α produce alteraciones metabólicas por otras vías también.

Por otra parte, en el síndrome metabólico y la obesidad, dos factores de riesgo que presentan alteración del metabolismo de los lípidos, esta alteración parece ser la que favorece la artrosis en mayor medida. Hay estudios que nos indican que en obesos la regulación, y por lo tanto la actividad, de al menos la APB, IRAP, DPPIV, PSA y APN estaría alterada. Estas enzimas están reguladas en mayor o menor medida por la insulina y esta

está interrelacionada con los cambios metabólicos asociados a la obesidad y la alteración del metabolismo lipídico. Además, la actividad dependerá de la localización a nivel celular de cada una de estas aminopeptidasas, de su papel y de la concentración de sustratos (Alponti RF et al., 2016).

En esta misma línea lipídica, pero desde el punto de vista de la dieta, son ya varios los estudios que han observado cambios en varias aminopeptidasas en relación con la alteración del metabolismo lipídico o patrón de lípidos de la dieta, entre ellas IRAP, APN, PSA, APB y DPPiV. Se han observado estos cambios en tejidos como hígado, cerebro y en plasma. Si se alteran los niveles y el comportamiento de estas peptidasas, también es de esperar que se alteren sus funciones. A esto se añade la relación que se ha visto entre los cambios en el perfil lipídico y cambios pro-oxidativos y artrosis. El perfil lipídico tendría así un papel destacado al estar relacionado con el síndrome metabólico, la dieta y el eje intestino-cerebro, producir cambios en aminopeptidasas presentes en líquido sinovial, influir en el estado oxidativo. Todo ello con estudios sugiriendo su relación con cambios artrósicos (Mooney RA et al., 2011; Segarra AB et al., 2020; de Munter W et al., 2016; Segarra AB et al., 2019; Domínguez-Vías G et al., 2021).

Estas alteraciones metabólicas, tanto de lípidos como del metabolismo de la glucosa, están interrelacionadas. A su vez lo están como vemos con la dieta, pero también con el eje intestino-cerebro y la disbiosis intestinal y el estrés metabólico. Tras la revisión bibliográfica específica realizada, son factores de riesgo modificables, en los que la alimentación juega un papel común que crece en importancia, y también el ejercicio físico en este grupo. La obesidad, clásicamente un factor de riesgo de primera línea y considerado como mecánico, queda desdibujado, con la reciente evidencia de la importancia de la adiposidad (adipoquinas) en la artrosis. Quizás deberíamos de diferenciar los obesos metabólicamente sanos de aquellos obesos metabólicamente obesos junto con los de normopeso metabólicamente obesos. Estas evidencias de un paciente con un determinado perfil de factores de riesgo que presenta artrosis, y que esta puede haberse desarrollado en gran proporción por estos factores de riesgo metabólicos, ha ayudado a la creación de perfiles artrósicos, en este caso, la artrosis metabólica (Gómez-Zorita S et al., 2021).

La artrosis relacionada con el síndrome metabólico tendría muchos factores de riesgo en común con la enfermedad cardiovascular y la enfermedad de Alzheimer (Puertas M del C et al., 2013). Igual que se ha visto que el tratamiento de los riesgos cardiovasculares reduce el riesgo de eventos cardiovasculares, y además reduce el empeoramiento cognitivo y la incidencia de Alzheimer (Villapol S y Saavedra JM, 2015), también podría tener efectos positivos sobre este perfil de artrosis (Azouz AA et al., 2020). Igual que la hipertensión altera la barrera hematoencefálica y supone un riesgo para la alteración cognitiva y la demencia (Lane CA et al., 2020), en la articulación podría alterar el microfiltrado hemato-sinovial y participar en los procesos en los que se altera la vascularización subcondral. El tratamiento antihipertensivo se ha visto como una de las mejores armas frente a la demencia (Chiu WC et al., 2014), y dado el papel del SRA en el control de la presión sanguínea y la asociación del SRA local con el deterioro cognitivo,

el estudio y actuación sobre este SRA, puede conllevar efectos beneficiosos para su tratamiento. Y es que la alteración del metabolismo de los lípidos puede tener efectos de sobre activación del SRA local, con al menos, aumento de IRAP, APN y APA, y disminución del metabolismo energético. Además, ya se ha visto que hay interrelación entre la importante vía de la Wnt- β -catenina y el SRA local en la patogenia (Zhou L et al., 2015).

Todo lo mencionado nos hace ver la importancia y participación que el SRA local puede tener en la fisiopatogenia de la artrosis. Con el presente estudio describimos actividad de este SRA local en líquido sinovial de pacientes con artrosis, incluyendo las citadas APN, IRAP, y además APA, APB, ASP-Ap, ACE, ACE2, PEP y NEP, aminopeptidasas implicadas en el SRA local.

Como comentábamos se ha visto que la **ACE** y la **ACE2** tienen funciones más allá del SRA clásico y regulan ejes que se han propuesto como de papel opuesto entre ellas. Sin hacer de menos al resto de aminopeptidasas implicadas en el SRA, por su papel central en propio sistema y las funciones que se les van atribuyendo, parecen tomar un protagonismo si cabe mayor. Por una parte, tenemos el eje ACE/AngII/AT1R: proinflamatorio, profibrótico, prooxidativo, que activa MAPK (eje AT1R/MAPK/RAS), Wnt entre otros y que a su vez regula el SRA; por otra parte, tenemos el eje ACE2/Ang(1-7)/Mas: antifibrótico, antioxidativo, que reduce la concentración de Ang II y activa el receptor Mas. Así, un desbalance a favor de ACE, se ha visto que puede ser perjudicial en patología cardiovascular y tumoral (Ramírez-Expósito MJ y Martínez-Martos JM, 2018; Li C et al., 2017). A nivel cardiaco, pancreático, renal y peritoneal, se ha visto como el aumento de estímulos sobre AT1R, producen una alteración del metabolismo del colágeno que lleva a fibrosis cardiaca e inflamación. A nivel articular un desequilibrio entre estos 2 ejes también podría alterar la homeostasis de la MEC y el condrocito. De hecho, este es el punto de actuación de varios antihipertensivos/antifibroticos que se han visto con capacidad de mejoría clínica en la artrosis (Tang Y et al., 2015; Yan K et al., 2020).

Hace años que al SRA local se le está atribuyendo un papel en el mantenimiento del equilibrio antioxidante/pro-oxidante y de la producción de componentes inflamatorios como citoquinas y quimiocinas (Capettini LS et al., 2012). La edad y la obesidad, 2 factores de primera línea en la artrosis (Loeser RF, 2017) influyen en el SRA, al menos a nivel muscular y aun sin demostrarse a nivel articular (Lóry V et al., 2019). También veíamos como concretamente la APN, la APA y la IRAP del SRA local se pueden ver alteradas, en este caso estudiado a nivel cerebral, con la alteración del metabolismo de los lípidos, que incluye la dieta (Ismail MA et al., 2017).

Esto nuevamente nos hace ver que su papel va más allá de las funciones y las localizaciones clásicas, y que el SRA local podría ser uno de los mecanismos que reflejan o mediante el cual el envejecimiento y la obesidad actúan de forma negativa a nivel articular y favorecen la artrosis. Faltaría por determinar si esta vía tiene puntos en común con la afectación del SASP o son diferentes vías de afectación senescente, y si

alguna de las aminopeptidasas del presente estudio, podrían ser parte de ese fenotipo secretor SASP.

Esta relación SRA local-enfermedad crónica sistémica-artrosis, coge aún más peso cuando vemos que en modelo animal se ve que el receptor X del hígado es capaz de regular el SRA y las MAPK activadas vía AT1R (inhibe eje ACE) (Li C et al., 2017). Aquí es donde recordamos el peso que se les está dando como factor predisponente al síndrome metabólico (Gao YH et al., 2020), y los estudios que hacían referencia a los lípidos en la dieta (Alponti RF et al., 2016; de Munter W et al., 2016), a la microbiota (Silvestre MP et al., 2020), y el eje intestino cerebro (Björkhem I et al., 2006; Wang PY et al., 2008).

El tejido cardíaco es uno de los tejidos donde mejor se ha estudiado el SRA, las aminopeptidasas, la fibrosis y la inflamación, con mecanismos que también están presentes a nivel articular. En cuanto al SRA, y concretamente la ACE y ACE2, el daño a tejido miocárdico produce un desbalance entre los ejes ACE y ACE2, aumentando ACE, Ang II y AT1R; y disminuyendo ACE2, Ang (1-7) y Mas; que lleva a aumento de daño al tejido miocárdico (Li C et al., 2017)

Quizás a nivel articular el SRA local actúe de forma similar y mediante estímulos desde la MEC, se rompa la homeostasis entre ACE y ACE2. El receptor X del hígado podría regular el SRA también a nivel articular al inhibir el eje ACE.

En nuestro estudio hallamos actividad en líquido sinovial de ACE y ACE2. Si bien la actividad de ACE es, de media, mayor en pacientes con mayor artrosis, la diferencia no es significativa. La ACE2 tampoco es significativa en ningún valor. En ningún paciente la actividad de ACE2 es mayor que la de ACE. En cuanto al ratio medio ACE/ACE2 es de 10,8, sin hallar diferencias en el ratio. Cobankara V y colaboradores (Cobankara V et al., 2005) ya describieron la actividad de ACE el líquido sinovial en 2005. Ellos no hallaron diferencias en la actividad en pacientes con artrosis, pero si en pacientes con artritis reumatoide respecto sujetos sanos; los valores de actividad obtenidos no son comparables a los del presente estudio, aunque llama la atención en cuanto a los pacientes, sobre todo en el caso de los de artrosis, la baja edad media. No hemos encontrado otros estudios posteriores que analicen la actividad de ACE en líquido sinovial humano.

La **APA** es otra aminopeptidasa que compone el SRA, desde un punto de vista más clásico en cuanto a la regulación de la tensión arterial, ya que transforma Ang II en Ang III. Recientemente se ha descrito que incluso en mayor cantidad metaboliza Ang II en Ang 2-10. Así reduce los efectos de Ang II al disminuir su concentración (Wysocki J et al., 2015). Además, se ha descrito en varios SRA locales, y se le han atribuido funciones más allá de la cardiovascular, en neoplasias renales, colorrectales, Alzheimer (Errarte P et al., 2017).

Hemos estudiado la actividad de APA en las 3 fracciones, obteniendo actividad en líquido sinovial y en fracción citosol de forma similar, con mayor rango en citosol. En fracción membrana no hemos obtenido actividad en ninguna muestra. Durante el tratamiento

observamos modificaciones en su actividad, estadísticamente significativas, en el grupo de menor artrosis.

La **APB** ya se ha propuesto como marcador pronóstico en líquido sinovial de pacientes con AR. Se ha visto aumentada en líquido sinovial en aquellos pacientes con mayor gravedad y en relación a la actividad de TNF- α . En cuanto a la fracción unida a membrana de PMN, sucede al contrario y en los pacientes con menor actividad de AR, se encuentra aumentada. Los niveles de actividad en las ratas control es de unos 700 pmol/min/mg proteína (Mendes MT et al., 2011), bastante mayor a los resultados obtenidos aquí en líquido sinovial, pero similar a la actividad obtenida en citosol. Los resultados obtenidos con una actividad mucho mayor en citosol, cuadra con la bibliografía que la describe como una proteína predominantemente citosólica (Cadel S et al., 1995). El único estudio publicado en humanos que hemos encontrado no publica la actividad de APB (Lees T et al., 1991). En nuestros resultados en artrosis hemos observado, con diferencias estadísticamente significativas, en la fracción unida a membrana de la muestra basal y tras el inicio del tratamiento, que aquellos pacientes con mayor grado de artrosis presentan mayores niveles de APB; y además estos niveles parecen ser sensibles al tratamiento con PRGF, ya que se modifican durante este, en el grupo de mayor artrosis. Describimos actividad en las 3 fracciones.

De las funciones atribuidas a **Asp-AP**, hay al menos tres, que justifican su estudio a nivel articular por su posible participación a este nivel. Su participación peptidásica sobre el SRA (Haznedaroglu IC y Malkan UY, 2016); en el sistema inmune (Wang A, et al., 2022) y sobre todo por su posible actuación en la osificación endocondral, ya que con su aumento se ha visto reducida la actividad de BMP (Nakamura Y et al., 2011).

Si bien hemos visto que las vías de la osificación endocondral están presentes en la fisiopatogenia de la artrosis, no hemos sido capaces de encontrar ningún artículo que estudie la Asp-AP a nivel articular. En el presente trabajo hemos visto actividad en líquido sinovial en todos los pacientes. En cuanto al análisis en citosol, solo la muestra de un paciente ha mostrado actividad. En la fracción membrana solo hemos obtenido actividad en 3 pacientes y no en todas las muestras de estos. Esto nos llama la atención ya que la Asp-AP es una peptidasa principalmente citosólica, lo cual quizás podemos atribuir a un error en la técnica de las fracciones. En cuanto a su actividad en líquido sinovial, este es bajo en comparación con la actividad de otras aminopeptidasas ensayadas. Es la única en la que encontramos diferencias por sexo, pero solo tras iniciar el tratamiento, siendo mayor la actividad en hombres. En este momento de estudio también la encontramos aumentada en los pacientes con mayor artrosis respecto a los de menor artrosis.

En cuanto a la **PSA**, descrita como encefalinasa en 1980 (Traficante LJ, et al., 1980), en líquido sinovial fue descrita en 1991 (Lees T et al., 1991) y para nuestro conocimiento no ha vuelto a ser descrita en líquido sinovial. Cerebro es donde más ha sido estudiada. Se le ha atribuido un papel neuroprotector, de procesamiento de neuropéptidos y en la proliferación y diferenciación celular (Gros C et al., 1985a; Minnasch Pet al., 2003). Es

posible que a nivel articular también tuviese una función protectora, sobre todo frente a senescencia articular y dolor o neuroinflamación.

Apoiando esto, presenta un papel regulador sobre la SOD1 con lo que es lógico pensar que juega un papel en la regulación del estado oxidativo de las células. Su papel de macroautofagia podría jugar un papel en el envejecimiento articular. Teniendo un papel en la respuesta inmune e inflamación en SNC, podría tener cierta participación en estos procesos a nivel articular en la artrosis. Además al degradar encefalinas, participa en el procesamiento del dolor (Menzies FM et al., 2010; Osada T et al., 1999; Ren G, et al., 2011).

En este trabajo hemos descrito actividad de PSA en las 3 fracciones estudiadas, líquido sinovial, citosol y unida a membrana. La actividad es similar en ellas, siendo algo menor en membrana. En esta fracción observamos de forma basal mayor actividad en los pacientes con mayor artrosis respecto de la actividad del grupo de menor artrosis, de forma significativa. Durante el tratamiento observamos cambios significativos en la actividad de PSA en líquido sinovial en el conjunto de los pacientes y en el grupo de pacientes con mayor grado de artrosis. El tratamiento con PRGF podría producir cambios que modifican los niveles de PSA soluble en líquido sinovial.

La **DPPIV** es una aminopeptidasa que, viendo sus funciones descritas, es lógico pensar que juega un importante papel en la artrosis y podría ser un buen marcador evolutivo o de control de tratamientos (Valencia-Sánchez L et al., 2019). Es junto con la APN una de las más estudiadas a nivel articular, y aun así existen pocos estudios y centrados en AR, mayoritarios en rata. Descrita por primera vez en líquido sinovial en 1989 (Gotoh H, et al., 1989). Varios estudios se han centrado en su estudio a nivel sinovial, ya que su actividad es mayor, y en plasma; ya que es predominantemente una peptidasa transmembrana (Sedo A .et a.l, 2005).

Una de sus principales funciones es la regulación de numerosas citoquinas y quimiocinas, y también regular la migración de LT, que a su vez es la fuente principal de DPPIV. Participa en el transporte específico de péptidos, interactúa con péptidos bioactivos, sin que este claro un papel a nivel articular, e interactúa también con el colágeno y la fibronectina. Participa por tanto en la respuesta inmuno-inflamatoria y sobre varios péptidos (Sedo A et al., 2005; Yamasaki SC et al., 2012).

Además, las diferencias vistas entre los niveles en plasma y a nivel articular (Busso N et al., 2005), nos hacen pensar en que puede existir un microambiente en la articulación, que desconocemos en qué medida puede estar influido por alteraciones sistémicas crónicas como la diabetes, el síndrome metabólico u otras patologías crónicas (Gong Q et al., 2015; Fletcher MA et al., 2010), y la DPPIV podría ser también uno de los puntos diferenciadores de una afectación metabólica, incluso dieta, de los tejidos articulares (Gabrielyan A, et al., 2017; Domínguez-Vías G et al., 2021).

Actividades enzimáticas que están más elevadas en AR que en OA y que están implicadas en la degradación del colágeno en la articulación, como la DPPII y el ratio DPPII/DPPIV, de las que se ha sugerido una relación con la causa de la degradación del colágeno. La

AR es una enfermedad inflamatoria, y clásicamente a la OA no se le ha atribuido una gran actividad en este sentido. Con los perfiles de OA propuestos ahora, el estudio de estas enzimas con perfiles inflamatorios en pacientes agrupados por tipos de artrosis podría permitir relacionar su aumento con un proceso inflamatorio en la rodilla, y como marcador para clasificar los tipos de artrosis (Gotoh H et al., 1989).

En el presente estudio, la DPPIV es la única aminopeptidasa de las estudiadas, en la que las diferencias encontradas son inversas al grado de artrosis. Es la única en la que, en el análisis de líquido sinovial, la actividad es menor en los pacientes con mayor grado de artrosis, de forma estadísticamente significativa en el tercer momento muestral, si bien no obtenemos diferencias durante el tratamiento. En un estudio en ratas la actividad en líquido sinovial es baja, sobre 175-250 pmol/min/mg proteína (nuestra mediana es de 270), y la encuentran similar en artrosis y sanas (Yamasaki SC et al., 2012). Por lo demás, las diferencias encontradas en nuestro resultados, irían en línea con la bibliografía en la que se encuentra la DPPIV disminuida en extracelular (Busso N et al., 2005), probablemente por su mayor unión a fragmentos de colágeno y procesamiento que hace que su concentración y actividad sea menor; podríamos incluso hipotetizar que con el tratamiento con PRGF hay un aumento de la disponibilidad de DPPIV, pero el consumo en los pacientes con mayor grado de artrosis es mayor, y por lo tanto, al observar la actividad esta parece menor. A pesar de poder estar disminuida por una y otra causa, parece que su actividad es condroprotectora (Herlihy SE, et al., 2015).

La **PEP** fue descrita a nivel articular en 1991 (Kamori M et al., 1991), y no encontramos otros estudios que la describan a nivel articular o en líquido sinovial. En este estudio describimos actividad de PEP en líquido sinovial, en fracción citosol y unida a membrana de pacientes con artrosis. Observamos la mayor actividad en fracción citosol, aunque en los pacientes con bajo grado de artrosis no hemos obtenido actividad. En la fracción unida a membrana la actividad es baja, aunque 3 pacientes presentan una actividad varias veces mayor que el resto. Obtenemos varias muestras sin actividad, lo que plantea que pueda haber habido un error en la técnica en algunas de estas muestras. En líquido sinovial hemos obtenido actividad en todos los pacientes, mientras en citosol y membrana obtenemos los mencionados ceros de actividad en todas las muestras de algunos pacientes. En la muestra de líquido sinovial tras el inicio del tratamiento observamos una actividad significativamente mayor en el grupo de pacientes con mayor artrosis respecto del de menor artrosis.

En cuanto a las proteínas en las tres fracciones, no obtenemos diferencias ni por grupo de artrosis ni por sexo. Si hemos visto que con el tratamiento con PRGF se modifica la cantidad de proteína en fracción unida a membrana en el grupo de pacientes con mayor artrosis.

El análisis citológico del líquido sinovial, en los pocos estudios que se ha analizado de forma global, ha mostrado diferencias interpersonales y ciertos patrones que precisaran confirmación. La citología puede contribuir al establecimiento de patrones de artrosis, ya que, si se ha asociado el aumento de determinados tipos celulares, como los macrófagos, con una mayor severidad (Capettini LS et al., 2012).

La heterogeneidad de la artrosis en numerosos aspectos, incluiría las alteraciones del líquido sinovial. Estas diferencias hacen cobrar fuerza la idea de que existirían pacientes con unas características inflamatorias y cambios moleculares que serían agrupables (Labinsky H et al., 2020). Es decir, dentro de esa heterogeneidad, si tendríamos pacientes de características similares. Podríamos establecer así, subgrupos de pacientes con artrosis, más homogéneos, los mencionados patrones artrósicos. Esto facilitaría desde la realización de estudios, al desarrollo de tratamientos mejor enfocados y más eficaces.

En esta línea, hemos observado una gran variabilidad en la actividad sobre todo en determinadas aminopeptidasas, que puede responder a esa heterogeneidad a otros niveles. La hemos observado en mayor medida en citosol, aunque en conjunto no hallamos diferencias estadísticamente significativas. Las diferencias en las medias, en varios casos de más del doble, es probable que venga en gran parte justificado por esa gran variabilidad que hemos comentado que existía en los valores entre pacientes; hay cierto número de pacientes con valores extremos. Esta es una característica interesante y es una de las posibles utilidades del análisis de aminopeptidasas. La clave estaría en relacionar este perfil característico de algunos pacientes en una o más aminopeptidasas, con unas características clínicas (que también podría orientarse a la etiología, más orientado al diagnóstico), que probablemente estén relacionadas clínico-molecularmente. Esto es posible que permita o facilite clasificar los pacientes por fenotipos de artrosis, o bien objetivar en mayor medida determinadas manifestaciones clínicas. Así, el establecimiento de patrones artrósicos podría ayudar en la aplicabilidad de la proteomía.

Más aun, estaremos caracterizando la artrosis del paciente molecularmente, estableciendo un fenotipo acorde a esto, a sus características médicas y a su clínica. Sera una artrosis con nombre y apellidos; y esta caracterización nos permitirá un tratamiento personalizado de cada paciente.

Aun así, estaría por ver si seremos capaces de diferenciar orígenes etiológicos de la artrosis, o si la proteomía será una “foto” del momento de toma de la muestra, y artrosis traumáticas y no traumáticas, convergen en los mismos mecanismos moleculares (Martin JA et al., 2004). Es probable que sea más factible, al menos en una primera fase, su empleo en medir la magnitud de síntomas, afectación...

Añadido a esto, en la actualidad existe una proporción de pacientes en los que nos encontramos con dificultades diagnosticas a la hora de etiquetar la patología articular que presenta como artrosis o del espectro artritis; o de la causa predominante que produce la clínica y/o limitación en ese momento. Las aminopeptidasas han sido más estudiadas en AR, y para este propósito podrían servirnos. Pacientes, por ejemplo, con ciertos datos radiológicos de artrosis y sin antecedentes ni datos reumatológicos claros, con frecuencia etiquetados de artrosis, y que en realidad pueden tener un componente de base o agudo de artritis; en estos casos un análisis de proteomía que incluya aminopeptidasas, es posible que sea una útil herramienta futura.

El manejo del dolor del paciente debe ser adecuado en todas las fases, evitando que este se cronifique. Como abordaje terapéutico en cuanto a la progresión de la enfermedad, parece no tener un efecto positivo, sino ser incluso negativo. En algunos pacientes tratados con anticuerpos monoclonales dirigidos a factores de crecimiento nervioso, cuyo objetivo era el bloqueo del dolor, se ha visto una rápida progresión de la artrosis (Chevalier X et al., 2013). Se ha propuesto que el dolor tiene cierto efecto protector, y que, en ausencia de este, la demanda y sobrecarga mecánica de la articulación es mayor, y lleva a la rápida progresión de la artrosis en esa articulación que ya había perdido su equilibrio homeostático. Por lo que el tratamiento ortobiológico debe quizás ir más encaminado a tratar de restablecer el equilibrio articular (medible molecularmente), que a una mejoría de escalas del dolor. Las aminopeptidasas implicadas en el procesamiento opioide podrían formar parte de marcadores de los mecanismos implicados en el dolor, de la detección temprana de la alteración de estos y marcador objetivo del dolor en sí.

En cuanto al tratamiento con PRGF, la discrepancia vista en la evidencia sobre este y otros tratamientos ortobiológicos, puede venir motivada por la heterogeneidad de los estudios. Es probable que aún no se haya establecido el mejor protocolo de administración y componentes del PRP o incluso este deba ser diferente según las características del paciente. Existen casi tantos protocolos como estudios/escuelas donde se administran. La evidencia molecular debe seguir avanzando para ir ajustando parámetros de los protocolos que se sustenten en ellas, y realizar unas publicaciones y revisiones sistemáticas, revisadas y ajustadas a los datos que ya tenemos y no creen más confusión. Ello incluye una clasificación completa y cuantificar la composición del tratamiento que se administra.

Es posible que algunos estudios obtengan resultados negativos de tratamientos ortobiológicos por que las muestras sean heterogéneas para parámetros que aún no hemos tenido en cuenta o no conocemos, como pueden ser los propuestos perfiles artrosicos o condicionantes genéticos. Si es así, habría que plantear crear estudios con pacientes más homogéneos en aspectos que puedan estar relacionados con las dianas moleculares del tratamiento en sí. Es posible que estos tratamientos tengan su indicación en un perfil de paciente solamente y en otros no, o incluso haya que adaptar la terapia al perfil artrósico de ese paciente. Por ejemplo, es de esperar un mayor efecto de las terapias ACS o PRP en pacientes con un perfil artrósico con alteraciones metabólicas, en los que se ha visto una mayor actividad del inflammasoma.

En el presente estudio, hemos observado modificaciones estadísticamente significativas en la actividad de APN, APA, APB y PSA en algún momento durante el tratamiento con PRGF. Incluso aun sin hallar diferencias durante el tratamiento con PRGF, los valores de estas aminopeptidasas podrían ser de utilidad en el diagnóstico, y algunas de ellas no verse alteradas con este tratamiento o no estar relacionada su actividad con el grado de artrosis. En cualquier caso, los datos son consistentes por sexo y también por grado de artrosis, lo que indica que es un método reproducible y valido para la determinación de

la actividad de estas aminopeptidasas en líquido sinovial y durante el tratamiento con PRGF u otros.

Hay un punto que hemos desarrollado y justificado a lo largo de este trabajo, y es la importancia que se está demostrando del factor “sistémico” en la patogenia de la artrosis. Esto no hace más que reforzar que a nivel articular un número de aminopeptidasas se ven alteradas por condicionantes externos a la articulación, e internos, igual que se está viendo que sucede en otros tejidos en patologías crónicas. Y que esto tiene un efecto sobre el normal funcionamiento de la articulación.

Las alteraciones del metabolismo de los lípidos (incluido el eje intestino-cerebro), del funcionamiento mitocondrial, de las adipoquinas, del estrés oxidativo, del metabolismo de la carnitina, y algunos elementos del SRA local, parecen guardar relación identificable a través del análisis metabolómico con la artrosis (Segarra AB et al., 2019; Bolduc JA et al., 2019; Zhang W et al., 2014).

Cabe destacar la función reguladora del tejido adiposo y de las adipoquinas en el metabolismo lipídico y su participación en la patogenia de la artrosis. El tejido adiposo, produciría mediadores inflamatorios como citoquinas, ROS y las adipoquinas, que contribuirían en el mantenimiento de la inflamación de bajo grado. Las adipoquinas modulan el ambiente catabólico/anabólico, el pro/antiinflamatorio, la apoptosis y el remodelado del cartílago y el hueso subcondral; actúan al menos sobre cartílago, hueso y sinovial (de Munter W et al., 2016; Collins KH et al., 2021).

De hecho, las adipoquinas se han propuesto como punto que establece la relación entre la obesidad y la artrosis, de una forma no mecánica. Así, se ha establecido una especial relación en el papel que pueden jugar en la inflamación de la artrosis en aquellos pacientes con síndrome metabólico (Koskinen A et al., 2011; Liu B et al., 2019).

Este trabajo realiza un análisis, descripción de la actividad y revisión en profundidad de esas 11 aminopeptidasas en la artrosis. Reflejamos la presencia de los sistemas citados a nivel articular y el papel que demuestran estas aminopeptidasas en varios tejidos del organismo. Esto sugiere que estos mecanismos están presentes a nivel articular y forman parte de la patogenia de la artrosis, y estas aminopeptidasas están implicadas. Esto nos abre el campo a que alguna de las aminopeptidasas del presente estudio podrían proponerse como elementos diagnósticos y pronósticos de la artrosis y /o AR (biomarcadores); también podrían servir para clasificar fenotipos artrosicos y como control de la eficacia de tratamientos. Además, trabajos de análisis de metabolómica, como el presente estudio, señalan posibles dianas concretas. Toda esta evidencia que, nos muestra una importancia de varios elementos a nivel general del organismo hasta hace poco desconocidos, llama la atención de muchos como una nueva oportunidad para la búsqueda de puntos de intervención profiláctica sobre la artrosis. Y ello podría ser aplicable incluso a otras enfermedades con afectación articular/periarticular como la osteonecrosis o el SDCR.

Afortunadamente contamos con una naturaleza que es sabia, y nos lleva algo de ventaja en crear elementos terapéuticos. Hablamos de todos esos elementos creados por la

naturaleza que introducimos en nuestro cuerpo a diario: la alimentación. La consideramos de un especial interés en la artrosis, particularmente en su profilaxis primaria y secundaria. Por ello le hemos dedicado una especial revisión. La alimentación es vital, diaria y modificable, lo que le coloca en una posición privilegiada para influir, como ningún otro elemento, sobre el estrés oxidativo, el metabolismo de los lípidos, la flora intestinal, la obesidad y la hipertensión, entre otros. Más allá incluso, hemos visto los puntos protectores de actuación de los polifenoles, y también, por ejemplo, la curcumina que es capaz de inhibir la APN (Shim JS et al., 2003; Daily JW et al., 2016; Ansari MY, et al., 2020).

La evidencia aumenta en esta dirección, pero las recomendaciones y la importancia que se le da a la alimentación no son acordes. Consideramos que debería de cobrar más peso en el enfoque preventivo de la artrosis desde la medicina primaria. Por ejemplo, no existen recomendaciones dietéticas para el consumo de antioxidantes en la artrosis. Además, 7 piezas de frutas y verduras diarias pueden no ser suficientes para hacer frente al estrés oxidativo, ya que el cuerpo cuenta con unos mecanismos muy limitados de “acumulación de poder antioxidante” y también depende de la cantidad que tiene cada fruta y verdura ingerida: es necesario calidad y regularidad.

Resumiendo lo visto, la artrosis es una enfermedad crónica y con inflamación de bajo grado. Cada vez existe más evidencia que alteraciones a nivel sistémico influyen sobre el desarrollo o progresión de la artrosis. Dentro de estas alteraciones destaca el síndrome metabólico (Berenbaum F et al., 2013; Rai MF et al., 2020; Rai MF et al., 2020) (con énfasis en el metabolismo lipídico y el papel de las adipoquinas), pero también debemos considerar el papel de la microbiota, del eje intestino cerebro y de la hipertensión arterial (teoría vascular) (Ching K, et al., 2021); la edad/senescencia de tejidos con el recientemente descrito SASP también contribuye a la sistemicidad de la artrosis, y es más abordable que un envejecimiento puro. El SRA local, cuya actividad en la articulación hemos cuantificado en este trabajo de la forma más completa realizada hasta la fecha, participa de una forma más o menos directa en estos procesos sistémicos. También describimos implicado el sistema opioide-encefalínérgico, el oxitocinérgico y el de citoquinas y quimiocinas. Algunas de las 11 aminopeptidasas descritas, e implicadas en estos sistemas, demuestran potencial como biomarcadores en la artrosis. Esto viene radicado en su presencia activa a nivel articular y las funciones que se les han atribuidos en otros tejidos.

En cuanto a la profilaxis, no vemos nada que pueda actuar sobre un mayor número de estas alteraciones que la alimentación. Es capaz de mejorar el perfil lipídico, de reducir el estrés oxidativo, de alterar de forma favorable la microbiota (Collins KH et al., 2015; Messier SP et al., 2013; Bortoluzzi A et al., 2018). Aun así, obtener evidencia directa y concluyente en humanos sobre un efecto preventivo o de tratamiento en la artrosis es, como poco, complejo con la tecnología y conocimientos actuales (Basu A et al., 2018). Tanto es así, que actualmente no existe evidencia sólida ni recomendaciones dietéticas (Green JA, et al., 2014).

Toda esta evidencia que nos muestra una importancia de varios elementos a nivel general del organismo hasta ahora desconocidos llama la atención de muchos como una nueva oportunidad para la búsqueda de puntos de intervención profiláctica sobre la artrosis. Trabajos de análisis de metabolómica, como el presente estudio, señalan posibles dianas concretas. Así, alguna de las aminopeptidasas del presente estudio podrían proponerse como dianas terapéuticas, además de elementos diagnósticos y pronósticos.

Afortunadamente contamos con una naturaleza que es sabia, y nos lleva algo de ventaja en crear elementos terapéuticos. Hablamos de todos esos elementos creados por la naturaleza que introducimos en nuestro cuerpo a diario: la alimentación. La consideramos de un especial interés en la artrosis, particularmente en su profilaxis primaria y secundaria. Por ello le hemos dedicado una especial revisión. La alimentación es vital, diaria y modificable, lo que le coloca en una posición privilegiada para influir, como ningún otro elemento, sobre el estrés oxidativo, el metabolismo de los lípidos, la flora intestinal, la obesidad y la hipertensión, entre otros. Más allá incluso, hemos visto los puntos protectores de actuación de los polifenoles, y también, por ejemplo, la curcumina que es capaz de inhibir la APN (Shim JS et al., 2003; Daily JW et al., 2016; Ansari MY, et al., 2020).

La evidencia aumenta en esta dirección, pero las recomendaciones y la importancia que se le da a la alimentación no son acordes. Consideramos que debería de cobrar más peso en el enfoque preventivo de la artrosis desde la medicina primaria. Por ejemplo, no existen recomendaciones dietéticas para el consumo de antioxidantes en la artrosis. Además, 7 piezas de frutas y verduras diarias pueden no ser suficientes para hacer frente al estrés oxidativo, ya que el cuerpo cuenta con unos mecanismos muy limitados de “acumulación de poder antioxidante” y también depende de la cantidad que tiene cada fruta y verdura ingerida: es necesario calidad y regularidad.

El análisis realizado sobre aminopeptidasas en el presente estudio, nos han servido para confirmar que existe un SRA local articular, y al menos nos servirán para conocer en qué grado está implicado el SRA en la artrosis, o incluso en otras enfermedades con afectación articular/periarticular como la osteonecrosis o incluso el SDCR. Además, algunas podrían ser marcadores diagnósticos o pronósticos de la artrosis y/o AR o para clasificar el fenotipo artrósico, o incluso ver que tratamiento puede ser más efectivo.

CONCLUSIONES

1. Hemos constatado y descrito la presencia y actividad en la articulación de las 11 aminopeptidasas estudiadas y, particularmente su presencia en forma activa, en el líquido sinovial de rodillas con artrosis.
2. Al demostrar la actividad de estas aminopeptidasas en líquido sinovial, establecemos que el sistema renina angiotensina local, el oxitocinérgico y el opioide, están implicados en la fisiopatología articular y concretamente en la de la artrosis.
3. Los niveles de actividad y las diferencias obtenidas en varias aminopeptidasas implicadas en el sistema renina angiotensina, sugieren que varias de estas aminopeptidasas pueden tener un papel regulador en la actividad del sistema renina angiotensina local en la artrosis.
4. Las funciones de estas aminopeptidasas van más allá de las clásicas atribuidas de regulación de la presión arterial en el sistema renina angiotensina. Participan en procesos directamente relacionados con la fisiopatología de la artrosis como la regulación de vías inmuno-inflamatorias, el estrés oxidativo, vías de la osificación endocondral, la senescencia articular y el dolor.
5. El número de publicaciones que han estudiado estas aminopeptidasas en el contexto articular, y sobre todo en la artrosis, es mínimo; mientras que en otros tejidos el interés y número de artículos es mucho mayor.
6. Con la profundización en el conocimiento de su papel en la artrosis, al igual que se han propuesto en otros sistemas del organismo, algunas de estas peptidasas tienen potencial e interés para ser marcadores diagnósticos, pronósticos, predictivos o dianas terapéuticas en un futuro.
7. En este trabajo describimos por primera vez actividad en líquido sinovial de la Aspartil Aminopeptidasa (Asp-AP) y de la Prolil Endopeptidasa (PEP) en pacientes con artrosis. De ACE, ACE2 y APB solo existía un estudio previo en líquido sinovial humano. Cys-AP llevaba 50 años sin ser descrita en líquido sinovial humano y es el primer estudio en OA. PSA llevaba 30 años sin ser descrita en líquido sinovial humano.
8. Las diferencias estadísticamente significativas obtenidas en las más de 7500 mediciones realizadas de la actividad de las 11 aminopeptidasas, por grado de artrosis de los 24 pacientes, muestran un aumento de la actividad de dichas aminopeptidasas en el grupo de pacientes con mayor artrosis, excepto para la Dipeptidil Peptidasa IV (DPPIV), que muestra una relación inversa.

9. Hemos puesto en valor a partir de la revisión de la literatura, el papel etiológico de agentes como la alimentación, patologías crónicas con componente inflamatorio o alteraciones metabólicas y hábitos que favorecen el estrés oxidativo y el envejecimiento de los tejidos. Este perfil demuestra el interés real que puede tener la dieta y los componentes antioxidantes en la prevención y el tratamiento de la artrosis.

10. La revisión bibliográfica y la contextualización de los resultados nos genera expectativas del potencial interés de estas aminopeptidasas. Identificar su actividad es un primer paso. Ahondar en su estudio con más participantes, datos clínicos y radiológicos detallados, también en pacientes sanos y en diferentes intervenciones terapéuticas nos permitirá conocer mejor su papel en la artrosis. Es posible que alguna se pueda establecer como marcador de referencia en estudios, diagnóstico, control evolutivo, fenotipo artrosico o de la efectividad de distintos tratamientos. Y que todo ello sea una destacada contribución al conocimiento de la fisiopatología de la artrosis, con la mira puesta en el fin último: conseguir desarrollar tratamientos modificadores de la evolución de la artrosis.

BIBLIOGRAFIA

Adams SB Jr, Setton LA, Nettles DL. The role of metabolomics in osteoarthritis research. *J Am Acad Orthop Surg*. 2013;21(1):63-64. doi:10.5435/JAAOS-21-01-63

Agirregoitia N, Gil J, Ruiz F, Irazusta J, Casis L. Effect of aging on rat tissue peptidase activities. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2003; 58 (9): B792-B797. doi:10.1093/gerona/58.9.b792

Agricola R, Waarsing JH, Arden NK, et al. Cam impingement of the hip a risk factor for hip osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2013;9:630-634.

Ahlbäck S. Osteoarthrosis of the knee. A radiographic investigation. *Acta Radiol Diagn (Stockh)*. 1968;277: 7-72.

Ahmad N, Ansari MY, Haqqi TM. Role of iNOS in osteoarthritis: Pathological and therapeutic aspects. *J Cell Physiol*. 2020;235(10):6366-6376.

Aird WC. *Endothelial biomedicine*. Cambridge university press; 2007.

Alahdal M, Duan L, Ouyang H, Wang D. The role of indoleamine 2,3 dioxygenase 1 in the osteoarthritis. *Am J Transl Res*. 2020;12(6):2322-2343.

Alba F, Iríbar C, Ramírez M, Arenas C. Un método fluorimétrico para la determinación de aminopeptidasas cerebrales [A fluorimetric method for the determination of brain aminopeptidasas]. *Arch Neurobiol (Madr)*. 1989;52(4):169-173.

Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, et al. Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem*. 2001;276(52):48623-48626.

Albiston AL, Mustafa T, McDowall SG, Mendelsohn FA, Lee J, Chai SY. AT4 receptor is insulin-regulated membrane aminopeptidase: potential mechanisms of memory enhancement. *Trends Endocrinol Metab*. 2003;14(2):72-77.

Alliston T, Hernandez CJ, Findlay DM, Felson DT, Kennedy OD. Bone marrow lesions in osteoarthritis: What lies beneath. *J Orthop Res*. 2018;36(7):1818-1825.

Alponti RF, Alves PL, Silveira PF. Novel adipocyte aminopeptidasas are selectively upregulated by insulin in healthy and obese rats. *J Endocrinol*. 2016;228(2):97-104

Amable PR, Carias RB, Teixeira MV, et al. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(3):67. Published 2013 Jun 7. doi:10.1186/scrt218

Anitua E, Prado R, Azkargorta M, et al. High-throughput proteomic characterization of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret)-derived fibrin clot interactome. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015;9(11):E1-E12.

Anitua E, Prado R, Sánchez M et al. Platelet-Rich Plasma: Preparation and Formulation. *Oper Tech Orthop* 2012;22:25-32.

Anitua E, Sánchez M, Prado R, Orive G. Plasma rich in growth factors: The pioneering autologous technology for tissue regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 2011;97(4):536-536.

Anitua E, Sanchez M, Zalduendo MM, et al. Fibroblastic response to treatment with different preparations rich in growth factors. *Cell Prolif*. 2009;42(2):162-170.

Anitua E, Zalduendo M, Prado R, Alkhraisat M, Orive G. Morphogen and pro-inflammatory cytokine release kinetics from PRGF-Endoret fibrin scaffolds: evaluation of the effect of leukocyte inclusion. *J Biomed Mater Res A*. 2014.

Anitua E, Zalduendo M, Troya M, Padilla S, Orive G. Leukocyte inclusion within a platelet rich plasma-derived fibrin scaffold stimulates a more pro-inflammatory environment and alters fibrin properties. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121713

Ansari MY, Ahmad N, Haqqi TM. Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis: Role of polyphenols. *Biomed Pharmacother*. 2020;129:110452

Antczak C, De Meester I, Bauvois B. Ectopeptidases in pathophysiology. *Bioessays*. 2001;23(3):251-260

Aparicio Prieto MV, Rodríguez Gallego MV, Valdivia Palacín A, et al. Local renin angiotensin system and sperm DNA fragmentation. *Asian J Androl*. 2022;24(2):139-146. doi:10.4103/aja202150

Appelboom T, de Maertelaer V, de Prez E, Hauzeur JP, Deschodt-Lanckman M. Enkephalinase: a physiologic neuroimmunomodulator detected in the synovial fluid. *Arthritis Rheum*. 1991;34(8):1048-1051. doi:10.1002/art.1780340815

arcOGEN Consortium, arcOGEN Collaborators, Zeggini E, et al. Identification of new susceptibility loci for osteoarthritis (arcOGEN): a genomic-wide association study. *Lancet* 2012;380:815-823.

Arkill KP, Winlove CP. Solute transport in the deep and calcified zones of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008;16(6):708-714.

Asfaha S, Cenac N, Houle S, Altier C, Papez MD, Nguyen C, Steinhoff M, Chapman K, Zamponi GW, Vergnolle N: Protease-activated receptor-4: a novel mechanism of inflammatory pain modulation. *Br J Pharmacol* 2007, 150:176–185.

Asghar S, Litherland GJ, Lockhart JC, Goodyear CS, Crilly A. Exosomes in intercellular communication and implications for osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2020;59(1):57-68. doi:10.1093/rheumatology/kez462.

Ateshian GA, Mow VC. *Friction, lubrication, and wear of articular cartilage and diarthrodial joints*. In: Mow VC, Huijskes R, editors. *Basic Orthopaedic Biomechanics and Mechano-Biology*. 3. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. pp. 447–494.

Attur M, Belitskaya-Lévy I, Oh C, et al. Increased interleukin-1 β gene expression in peripheral blood leukocytes is associated with increased pain and predicts risk for

progression of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2011;63(7):1908-1917.

Aurich-Costa J, Cadel S, Gouzy C, Foulon T, Chérif D, Cohen P. Assignment of the aminopeptidase B gene (RNPEP) to human chromosome 1 band q32 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* 1997;79(1-2):143-144.

Ayral X, Pickering EH, Woodworth TG, Mackillop N, Dougados M. Synovitis: a potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis -- results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13(5):361-367,

Azouz AA, Saleh E, Abo-Saif AA. Aliskiren, tadalafil, and cinnamaldehyde alleviate joint destruction biomarkers; MMP-3 and RANKL; in complete Freund's adjuvant arthritis model: Downregulation of IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway. *Saudi Pharm J.* 2020;28(9):1101-1111. doi:10.1016/j.jsps.2020.07.011

Babdor J, Descamps D, Adiko AC, et al. IRAP+ endosomes restrict TLR9 activation and signaling. *Nat Immunol.* 2017;18(5):509-518. doi:10.1038/ni.3711.

Babkova K, Korabecny J, Soukup O, Nepovimova E, Jun D, Kuca K. Prolyl oligopeptidase and its role in the organism: attention to the most promising and clinically relevant inhibitors. *Future Med Chem.* 2017;9(10):1015-1038. doi:10.4155/fmc-2017-0030.

Baker K, Grainger A, Niu J, et al. Relation of synovitis to knee pain using contrast-enhanced MRIs. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(10):1779-1783

Balakrishnan L, Nirujogi RS, Ahmad S, et al. Proteomic analysis of human osteoarthritis synovial fluid. *Clin Proteomics.* 2014;11(1):6.

Balogh A, Cadel S, Foulon T, et al. Aminopeptidase B: a processing enzyme secreted and associated with the plasma membrane of rat pheochromocytoma (PC12) cells. *J Cell Sci.* 1998;111 (Pt 2):161-169. doi:10.1242/jcs.111.2.161

Baniowski A, Cichecka K, Drozd H, Jedrychowski A, Zielonka E. Cystineaminopeptidase activity of synovial fluid in patients with rheumatoid arthritis. *Acta Med Pol.* 1968;9(4):493-495

Bannuru RR, Osani MC, Al-Eid F, Wang C. Efficacy of curcumin and Boswellia for knee osteoarthritis: Systematic review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum.* 2018;48(3):416-429.

Barbosa-Cobos RE, Lugo-Zamudio G, Flores-Estrada J, et al. Serum substance P: an indicator of disease activity and subclinical inflammation in rheumatoid arthritis [published correction appears in Clin Rheumatol. 2020 Jul;39(7):2245]. *Clin Rheumatol.* 2018

Barret AJ, Rawling ND, Woessner JF. *Handbook of proteolytic enzymes.* Elsevier, 2004

Barroso LC, Magalhaes GS, Galvão I, et al. Angiotensin-(1-7) Promotes Resolution of Neutrophilic Inflammation in a Model of Antigen-Induced Arthritis in Mice. *Front Immunol.* 2017;8:1596. Published 2017 Nov 20. doi:10.3389/fimmu.2017.01596.

Bartling B, Fuchs C, Somoza V, Niemann B, Silber RE, Simm A. Lung level of HMBG1 is elevated in response to advanced glycation end product-enriched food in vivo. *Mol Nutr Food Res.* 2007;51(4):479-487

Basu A , Schell J , Scofield RH. Dietary fruits and arthritis. *Food Funct.* 2018;9(1):70-77.

Bathon JM, Proud D, Mizutani S, Ward PE. Cultured human synovial fibroblasts rapidly metabolize kinins and neuropeptides. *J Clin Invest.* 1992;90(3):981-991. doi:10.1172/JCI115975.

Benoist JM, Keime F, Montagne J, et al. Depressant effect on a C-fibre reflex in the rat, of RB101, a dual inhibitor of enkephalin-degrading enzymes. *Eur J Pharmacol.* 2002;445(3):201-210.

Berenbaum F, Eymard F, Houard X. Osteoarthritis, inflammation and obesity. *Curr Opin Rheumatol.* 2013;25(1):114-118.

Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis Cartilage.* 2013;21(1):16-21

Berschneider B, Ellwanger DC, Baarsma HA et al. miR- 92a regulates TGF- β 1-induced WISP1 expression in pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2014;53:432-41

Biver E, Berenbaum F, Valdes AM, et al. Gut microbiota and osteoarthritis management: An expert consensus of the European society for clinical and economic aspects of osteoporosis, osteoarthritis and musculoskeletal diseases (ESCEO). *Ageing Res Rev.* 2019;55:100946. doi:10.1016/j.arr.2019.100946

Björkhem I, Heverin M, Leoni V, Meaney S, Diczfalusy U. Oxysterols and Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl.* 2006;185:43-49.

Blanco FJ, Silva-Díaz M, Quevedo Vila V, et al. Prevalence of symptomatic osteoarthritis in Spain: EPISER2016 study [published online ahead of print, 2020 Apr 28]. Prevalencia de artrosis sintomática en España: Estudio EPISER2016 [published online ahead of print, 2020 Apr 28]. *Reumatol Clin (Engl Ed).* 2020;S1699-258X(20)30023-1.

Blanco L, Larrinaga G, Pérez I, López JI, Gil J, Agirregoitia E, Varona A: Acid, basic and neutral peptidases present different profiles in chromophobe renal cell carcinoma and in oncocytoma. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008, 294(4):850–858)

Blanco L, Sanz B, Perez I, Clara E Sánchez, M Luz Cándenas, Francisco M Pinto, Javier Gil, Luis Casis, José I López and Gorka Larrinaga: Altered glutamyl-aminopeptidase activity and expression in renal neoplasms. *BMC Cancer* 2014, 14:386-395

Blaney Davidson EN, van der Kraan PM, van den Berg WB. TGF- β and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007;15(6):597-604..

Boffa A, Merli G, Andriolo L, Lattermann C, Salzmann GM, Filardo G. Synovial Fluid Biomarkers in Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Quantitative Evaluation Using BIPEDs Criteria. *Cartilage*. 2021;13(1_suppl):82S-103S.

Bohensky J, Terkhorn SP, Freeman TA, et al. Regulation of autophagy in human and murine cartilage: hypoxia-inducible factor 2 suppresses chondrocyte autophagy. *Arthritis Rheum*. 2009; 60:1406–1415

Bolduc JA, Collins JA, Loeser RF. Reactive oxygen species, aging and articular cartilage homeostasis. *Free Radic Biol Med*. 2019;132:73-82.

Bonassar LJ, Frank EH, Murray JC, et al. Changes in cartilage composition and physical properties due to stromelysin degradation. *Arthritis Rheum*. 1995;38(2):173-183.

Borselli C, Storrie H, Benesch-Lee F, et al. Functional muscle regeneration with combined delivery of angiogenesis and myogenesis factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(8):3287-3292.

Bortoluzzi A, Furini F, Scirè CA. Osteoarthritis and its management - Epidemiology, nutritional aspects and environmental factors. *Autoimmun Rev*. 2018;17(11):1097-1104.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-254

Brejchova J, Holan V, Svoboda P. Expression of Opioid Receptors in Cells of the Immune System. *Int J Mol Sci*. 2020;22(1):315. Published 2020 Dec 30

Bull AM, Amis AA. Knee joint motion: description and measurement. *Proc Inst Mech Eng H*. 1998;212(5):357-372.

Bull AM, Katchburian MV, Shih YF, Amis AA. Standardisation of the description of patellofemoral motion and comparison between different techniques. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2002;10(3):184-193.

Bullich J. *Biomecánica I: Cinética de la rodilla*. En: Josa Bullich S, Palacios y Carvajal J. *Cirugía de la rodilla*. Barcelona: JIMS SA, 1995;35-48.

Bushlin I, Rozenfeld R, Devi LA. Cannabinoid-opioid interactions during neuropathic pain and analgesia. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10(1):80-86

Busso N, Wagtmann N, Herling C, et al. Circulating CD26 is negatively associated with inflammation in human and experimental arthritis. *Am J Pathol*. 2005;166(2):433-442. doi:10.1016/S0002-9440(10)62266-3

Cadel S, Foulon T, Viron A, et al. Aminopeptidase B from the rat testis is a bifunctional enzyme structurally related to leukotriene-A4 hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(7):2963-2968.

Cadel S, Pierotti AR, Foulon T, et al. Aminopeptidase-B in the rat testes: isolation, functional properties and cellular localization in the seminiferous tubules. *Mol Cell Endocrinol*. 1995;110(1-2):149-160. doi:10.1016/0303-7207(95)03529-g.

Califf RM. Biomarker definitions and their applications. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2018;243(3):213-221. doi:10.1177/1535370217750088

Campisi J, Andersen JK, Kapahi P, Melov S. Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease?. *Semin Cancer Biol*. 2011;21(6):354-359. doi:10.1016/j.semcancer.2011.09.001

Capettini LS, Montecucco F, Mach F, Stergiopoulos N, Santos RA, da Silva RF. Role of renin-angiotensin system in inflammation, immunity and aging. *Curr Pharm Des*. 2012;18(7):963-970.

Carames B, Taniguchi N, Otsuki S, et al. Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2010; 62:791–801.

Carl-McGrath S, Lendeckel U, Ebert M, Röcken C. Ectopeptidases in tumour biology: a review. *Histol Histopathol* 2006;21:1339-1353.

Casis L. Papel del metabolismo peptídico en la reproducción: de la regulación del ciclo sexual a su función sobre los gametos. *Rev Real Acad Med País Vasco*, 1 (1), 2022, 2-11

Casis L, Valdivia A, Irazusta J. Enkephalin-degrading enzymes in normal and subfertile human semen. *J Androl*. 2004;25(5):733-9.

Cawston TE, Wilson AJ. Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006;20(5):983-1002.

Chahla J, Geeslin AG, Cinque ME, LaPrade RF. Biomechanical Proof for the Existence of the Anterolateral Ligament. *Clin Sports Med*. 2018;37(1):33-40. doi:10.1016/j.csm.2017.07.003

Chan CKF, Gulati GS, Sinha R, et al. Identification of the Human Skeletal Stem Cell. *Cell*. 2018;175(1):43-56.e21.

Chang KV, Hung CY, Aliwarga F, Wang TG, Han DS, Chen WS. Comparative effectiveness of platelet-rich plasma injections for treating knee joint cartilage degenerative pathology: a systematic review and meta-analysis. *Arch Phys Med Rehabil*. 2014;95(3):562-57

Chang Y, Wei W. Angiotensin II in inflammation, immunity and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2015;179(2):137-145. doi:10.1111/cei.12467

Chen CG, Thuillier D, Chin EN, Alliston T. Chondrocyte-intrinsic Smad3 represses Runx2-inducible matrix metalloproteinase 13 expression to maintain articular cartilage and prevent osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2012;64(10):3278-3289.

Chen NX, Ryder KD, Pavalko FM, et al. Ca²⁺ regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;278(5):C989-C997.

Chen TH, Chen L, Hsieh MS, Chang CP, Chou DT, Tsai SH. Evidence for a protective role for adiponectin in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1762(8):711-718.

Chen Y, Farquhar ER, Chance MR, Palczewski K, Kiser PD. Insights into substrate specificity and metal activation of mammalian tetrahedral aspartyl aminopeptidase. *J Biol Chem*. 2012;287(16):13356-13370. doi:10.1074/jbc.M112.347518

Cheng Chen C, Jing Xie J, Rajappa R. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α increase stiffness and impair contractile function of articular chondrocytes. *Acta Biochim Biophys Sin* 2015, 47(2):121–129.

Chevalier X, Eymard F, Richette P. Biologic agents in osteoarthritis: hopes and disappointments. *Nat Rev Rheumatol* 2013; 9:400-10.

Ching K, Houard X, Berenbaum F, Wen C. Hypertension meets osteoarthritis - revisiting the vascular aetiology hypothesis. *Nat Rev Rheumatol*. 2021;17(9):533-549. doi:10.1038/s41584-021-00650-x

Chiu WC, Ho WC, Lin MH, et al. Angiotension receptor blockers reduce the risk of dementia. *J Hypertens*. 2014;32(4):938-947.,

Cho YR, Hong BY, Lim SH, Kim HW, Ko YJ, Im SA, et al. Effects of joint effusion on proprioception in patients with knee osteoarthritis: a single-blind, randomized controlled clinical trial. *Osteoarthritis Cartilage* 2011,19:22-8.

Chomarat P, Rissoan MC, Pin JJ, Banchereau J, Miossec P. Contribution of IL-1, CD14, and CD13 in the increased IL-6 production induced by in vitro monocyte-synoviocyte interactions. *J Immunol*. 1995;155(7):3645-3652..

Chou CH, Wu CC, Song IW, et al. Genome-wide expression profiles of subchondral bone in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(6):R190.

Chow KM, Guan H, Hersh LB. Aminopeptidases do not directly degrade tau protein. *Mol Neurodegener*. 2010;5:48. Published 2010 Nov 5

Cobankara V, Oztürk MA, Kiraz S, et al. Renin and angiotensin-converting enzyme (ACE) as active components of the local synovial renin-angiotensin system in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2005;25(4):285-291. doi:10.1007/s00296-004-0564-8

Colasanti B. *Narcotic analgesics*. In Craig C, Stitzel R, editors: *Modern Pharmacology ed 3*. Boston, Little, Brown, 1990.

Collins KH, Lenz KL, Pollitt EN, et al. Adipose tissue is a critical regulator of osteoarthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(1):e2021096118.

Collins KH, Paul HA, Reimer RA, Seerattan RA, Hart DA, Herzog W. Relationship between inflammation, the gut microbiota, and metabolic osteoarthritis development: studies in a rat model. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(11):1989-1998.

Collins NJ, Misra D, Felson DT, Crossley KM, Roos EM. Measures of knee function: International Knee Documentation Committee (IKDC) Subjective Knee Evaluation Form, Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS), Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score Physical Function Short Form (KOOS-PS), Knee Outcome Survey Activities of Daily Living Scale (KOS-ADL), Lysholm Knee Scoring Scale, Oxford Knee Score (OKS), Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC), Activity Rating Scale (ARS), and Tegner Activity Score (TAS). *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2011;63 Suppl 11(0 11):S208-S228.

Coluzzi F, Scerpa MS, Centanni M. The Effect of Opiates on Bone Formation and Bone Healing. *Curr Osteoporos Rep*. 2020;18(3):325-335.

Constam DB, Tobler AR, Rensing-Ehl A, Kemler I, Hersh LB, Fontana A. Puromycin-sensitive aminopeptidase. Sequence analysis, expression, and functional characterization. *J Biol Chem*. 1995;270(45):26931-26939.

Cordero-Barreal A, González-Rodríguez M, Ruiz-Fernández C, et al. An Update on the Role of Leptin in the Immuno-Metabolism of Cartilage. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5):2411.

Corradi HR, Schwager SL, Nchinda AT, Sturrock ED, Acharya KR. Crystal structure of the N domain of human somatic angiotensin I-converting enzyme provides a structural basis for domain-specific inhibitor design. *J Mol Biol*. 2006;357(3):964-974.

Coryell PR, Diekman BO, Loeser RF. Mechanisms and therapeutic implications of cellular senescence in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2021;17(1):47-57. doi:10.1038/s41584-020-00533-7

Courties A, Berenbaum F, Sellam J. The Phenotypic Approach to Osteoarthritis: A Look at Metabolic Syndrome-Associated Osteoarthritis. *Joint Bone Spine*. 2019;86(6):725-730.

Courties A, Sellam J, Berenbaum F. Role of the autonomic nervous system in osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2017;31(5):661-675

Cox BM, Opheim KE, Teschemacher H, Goldstein A. A peptide-like substance from pituitary that acts like morphine. 2. Purification and properties. *Life Sci*. 1975;16(12):1777-1782. doi:10.1016/0024-3205(75)90272-6

Cross M, Smith E, Hoy D, et al. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(7):1323-1330.

Cuevas CA, Gonzalez AA, Inestrosa NC, Vio CP, Prieto MC. Angiotensin II increases fibronectin and collagen I through the β -catenin-dependent signaling in mouse

collecting duct cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015;308(4):F358-F365. doi:10.1152/ajprenal.

Culvenor AG, Engen CN, Øiestad BE, Engebretsen L, Risberg MA. Defining the presence of radiographic knee osteoarthritis: a comparison between the Kellgren and Lawrence system and OARSI atlas criteria. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2015;23(12):3532-

Daily JW, Yang M, Park S. Efficacy of Turmeric Extracts and Curcumin for Alleviating the Symptoms of Joint Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *J Med Food*. 2016;19(8):717-729.

Dando P, Young N, Barrett A. *Aminopeptidase PS: a widely distributed cytosolic peptidase*. In: Hopsu-Havu VK, Järvinen M, Kirschke H. *Proteolysis in Cell Functions*. IOS Press, 1997; pp 88-95

Dando PM y Barrett AJ. *Aminopeptidase PS*. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes: Second Edition*, 2004:pp 313-316.

Davidson RK, Green J, Gardner S, Bao Y, Cassidy A, Clark IM. Identifying chondroprotective diet-derived bioactives and investigating their synergism. *Sci Rep*. 2018;8(1):17173. Published 2018 Nov 21.

De Angelis G, Chen Y. Obesity among women may increase the risk of arthritis: observations from the Canadian Community Health Survey, 2007-2008. *Rheumatol Int*. 2013;33(9):2249-2253.

De Bundel D, Fafouri A, Csaba Z, et al. Trans-Modulation of the Somatostatin Type 2A Receptor Trafficking by Insulin-Regulated Aminopeptidase Decreases Limbic Seizures. *J Neurosci*. 2015;35(34):11960-11975

De Ceuninck F. The birth and infancy of proteomic analysis in osteoarthritis research. *Curr Opin Mol Ther*. 2007;9(3):263-269.

de Gandarias JM, Casis L, Casis E, Iribar C. Angiotensina y sistema nervioso central, *Gac .ed Bilbao* 1984;81: 373-384.,

de Gandarias JM, Casis Saenz L, Irazusta J, Echevarría E, Arechaga G, Ramírez M. Lys- and Tyr-arylamidase activities in serum and brain during the estrous cycle of the rat. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1989;121(5):671-673. (a)

de Gandarias JM, Echevarría E, Irazusta J, Casis L. Cyclic changes of exopeptidase activities in the rat brain: a regional study. *Exp Clin Endocrinol*. 1992;99(2):64-67.,

de Gandarias JM, Ramírez M, Zulaica J, Iribar C, Casis Saenz L. Postnatal development of aminopeptidase (arylamidase) activity in rat brain. *J Biochem*. 1989;105(1):44-46 (b).

de Lange-Brokaar BJ, Ioan-Facsinay A, van Osch GJ, et al. Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20(12):1484-1499

de Lange-Brokaar BJ, Ioan-Facsinay A, Yusuf E, et al. Association of pain in knee osteoarthritis with distinct patterns of synovitis. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(3):733-740

de Munter W, van den Bosch MH, Slöetjes AW, et al. High LDL levels lead to increased synovial inflammation and accelerated ectopic bone formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24(5):844-855

de Sire A, Marotta N, Marinaro C, Curci C, Invernizzi M, Ammendolia A. Role of Physical Exercise and Nutraceuticals in Modulating Molecular Pathways of Osteoarthritis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11):5722. Published 2021 May 27. doi:10.3390/ijms22115722;

Del Pilar Carrera M, Ramírez-Expósito MJ, García MJ, Mayas MD, Martínez-Martos JM. Ovarian renin-angiotensin system-regulating aminopeptidases are involved in progesterone overproduction in rats with mammary tumours induced by N-methyl nitrosourea. *Anticancer Res*. 2009;29(11):4633-4637.

Dell'Isola A, Allan R, Smith SL, Marreiros SS, Steultjens M. Identification of clinical phenotypes in knee osteoarthritis: a systematic review of the literature. *BMC Musculoskelet Disord*. 2016;17(1):425. Published 2016 Oct 12.

Descamps D, Evnouchidou I, Caillens V, et al. The Role of Insulin Regulated Aminopeptidase in Endocytic Trafficking and Receptor Signaling in Immune Cells. *Front Mol Biosci*. 2020;7:583556. Published 2020 Oct 20.

Deveza LA, Melo L, Yamato TP, Mills K, Ravi V, Hunter DJ. Knee osteoarthritis phenotypes and their relevance for outcomes: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017;25(12):1926-1941.

Diamantopoulos AP, Brodin C, Hetland H, Haugeberg G. Interleukin 1 β blockade improves signs and symptoms of chronic calcium pyrophosphate crystal arthritis resistant to treatment. *J Clin Rheumatol*. 2012;18(6):310-311. doi:10.1097/RHU.0b013e31826149a2.

Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101:e45-50

Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang CQ, Pinto NR, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2014;4(1):3-9. Published 2014 May 8.

Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 2009;27:158-167.:

Domínguez-Vías G, Segarra AB, Ramírez-Sánchez M, Prieto I. High-Fat Diets Modify the Proteolytic Activities of Dipeptidyl-Peptidase IV and the Regulatory Enzymes of the Renin-Angiotensin System in Cardiovascular Tissues of Adult Wistar Rats. *Biomedicines*. 2021;9(9):1149. Published 2021 Sep 3. doi:10.3390/biomedicines9091149

Donahue RN, McLaughlin PJ, Zagon IS. Low-dose naltrexone targets the opioid growth factor-opioid growth factor receptor pathway to inhibit cell proliferation: mechanistic evidence from a tissue culture model. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2011;236(9):1036-1050.

Doré D, de Hoog J, Giles G, Ding C, Cicuttini F, Jones G. A longitudinal study of the association between dietary factors, serum lipids, and bone marrow lesions of the knee. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(1):R13. Published 2012 Jan 18.

Dougados M. Synovial fluid cell analysis. *Baillieres Clin Rheumatol*. 1996;10(3):519-534.

Drengk A, Zapf A, Stürmer EK, Stürmer KM, Frosch KH: Influence of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation and proliferation of chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs* 2009, 189:317–326.

Du Y, Lu C, Morgan RL, et al. Angiogenic and Arthritogenic Properties of the Soluble Form of CD13. *J Immunol*. 2019;203(2):360-369.

Dumond H, Presle N, Terlain B, et al. Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48(11):3118-3129.

Dye SF, Vaupel GL, Dye CC. Conscious neurosensory mapping of the internal structures of the human knee without intraarticular anesthesia. *Am J Sports Med*. 1998;26(6):773-777.

Dyer SH, Slaughter CA, Orth K, Moomaw CR, Hersh LB. Comparison of the soluble and membrane-bound forms of the puromycin-sensitive enkephalin-degrading aminopeptidases from rat. *J Neurochem*. 1990;54(2):547-554.

Eisenstein TK. The Role of Opioid Receptors in Immune System Function. *Front Immunol*. 2019;10:2904. Published 2019 Dec 20.

Erbezni H, Hersh LB. A novel mammalian high-molecular-weight aminopeptidase. *Arch Biochem Biophys*. 1997;344(1):228-234.

Errarte P, Beitia M, Perez I, et al. Expression and activity of angiotensin-regulating enzymes is associated with prognostic outcome in clear cell renal cell carcinoma patients. *PLoS One*. 2017;12(8):e0181711. Published 2017 Aug 15. doi:10.1371/journal.pon

Ertürk C, Altay MA, Bilge A, Çelik H. Is there a relationship between serum ox-LDL, oxidative stress, and PON1 in knee osteoarthritis?. *Clin Rheumatol*. 2017;36(12):2775-2780

Esteban V, Ruperez M, Sánchez-López E, et al. Angiotensin IV activates the nuclear transcription factor-kappaB and related proinflammatory genes in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 2005;96(9):965-973. doi:10.1161/01.RES.0000166326.91395.74

Estomba H, Muñoa-Hoyos I, Gianzo M, et al. Expression and Localization of Opioid Receptors in Male Germ Cells and the Implication for Mouse Spermatogenesis. *PLoS One*. 2016;11(3):e0152162. Published 2016 Mar 31. doi:10.1371/journal.pone.0152162

Evnouchidou I, Chappert P, Benadda S, et al. IRAP-dependent endosomal T cell receptor signalling is essential for T cell responses. *Nat Commun*. 2020;11(1):2779. Published 2020 Jun 2

Federation of European Nutrition Societies (FENS). 2020. <https://fensnutrition.org/> (date last accessed 15 October 2020)

Feldman M, Brennan F, Maini R. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Ann Rev Immunol* 1996, 14: 397-440

Felson DT, Anderson JJ, Naimark A, Walker AM, Meenan RF. Obesity and knee osteoarthritis. The Framingham Study. *Ann Intern Med*. 1988;109(1):18-24. doi:10.7326/0003-4819-109-1-18.

Felson DT, Lynch J, Guermazi A, et al. Comparison of BLOKS and WOMBS scoring systems part II. Longitudinal assessment of knee MRIs for osteoarthritis and suggested approach based on their performance: data from the Osteoarthritis Initiative. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(11):1402-1407. doi:10.1016/j.joca.2010.06.016

Felson DT, McLaughlin S, Goggins J, et al. Bone marrow edema and its relation to progression of knee osteoarthritis. *Ann Intern Med* 2003; 139:330–33

Felson DT, Niu J, Gross KD, et al. Valgus malalignment is a risk factor for lateral knee osteoarthritis incidence and progression: findings from Multicentre Osteoarthritis Study and the Osteoarthritis Initiative. *Arthritis Rheum* 2013;65:355-362.

Feng Y, He X, Yang Y, Chao D, Lazarus LH, Xia Y. Current research on opioid receptor function. *Curr Drug Targets*. 2012;13(2):230-246.

Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology*. 2002;39(1-2):237-246.

Fernandes MT, Fernandes KB, Marquez AS, Cólus IM, Souza MF, Santos JP, Poli-Frederico RC. Association of interleukin-6 gene polymorphism (rs1800796) with severity and functional status of osteoarthritis in elderly individuals. *Cytokine*. 2015;75(2):316-20.

Fernandes MTP, Fernandes KBP, Anibal FF, Shimoya-Bittencourt W, Santos VM, de Oliveira Perrucini PD, Poli-Frederico RC. Functional status and severity of osteoarthritis in elderly is associated to the polymorphism of TNFA gene. *Adv Rheumatol*. 2019 Jun 25;

Fernández D, Valdivia A, Irazusta J, Ochoa C, Casis L. Peptidase activities in human semen. *Peptides*. 2002;23(3):461-468

Fernandez-Lopez JC, Laffon A, Blanco FJ, Carmona L: Prevalence, risk factors, and impact of knee pain suggesting osteoarthritis in Spain. *Clin Exp Rheumatol*. 2008;26:324-332.

Ferre IM, Roof MA, Anoushiravani AA, Wasterlain AS, Lajam CM. Understanding the Observed Sex Discrepancy in the Prevalence of Osteoarthritis. *JBJS Rev*. 2019 Sep;7(9):e8.

Flandry F, Hommel G. Normal Anatomy and Biomechanics of the Knee. *Sports Med Arthrosc Rev*. 2011;19:82-92.

Fletcher MA, Zeng XR, Maher K, et al. Biomarkers in chronic fatigue syndrome: evaluation of natural killer cell function and dipeptidyl peptidase IV/CD26. *PLoS One*. 2010;5(5):e10817. Published 2010 May 25. doi:10.1371/journal.pone.0010817

Fortier LA, Nixon AJ. Distributional changes in substance P nociceptive fiber patterns in naturally osteoarthritic articulations. *J Rheumatol*. 1997;24(3):524-530.

Foulon T, Cadel S, Chesneau V, Draoui M, Prat A, Cohen P. Two novel metallopeptidases with a specificity for basic residues: functional properties, structure and cellular distribution. *Ann N Y Acad Sci*. 1996;780:106-120.

Foulon T, Cadel S, Cohen P. Aminopeptidase B (EC 3.4.11.6). *Int J Biochem Cell Biol*. 1999;31(7):747-750.

Foulon T, Cadel S, Piesse C, Cohen P, Barret AJ, Rawling ND, Woessner JF. *Aminopeptidase B. Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier Academic Press, 2004.

Fregly BJ, Besier TF, Lloyd DG, et al. Grand challenge competition to predict in vivo knee loads. *J Orthop Res*. 2012;30(4):503-513.

Fukasawa KM, Fukasawa K, Kanai M, Fujii S, Harada M. Molecular cloning and expression of rat liver aminopeptidase B. *J Biol Chem*. 1996;271(48):30731-30735.

Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med*. 2008;264(3):224-236. doi:10.1111/j.1365-2796.2008.01981.x.

Gabrielyan A, Neumann E, Gelinsky M, Rösen-Wolff A. Metabolically conditioned media derived from bone marrow stromal cells or human skin fibroblasts act as effective chemoattractants for mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):212. Published

Gainer H, Russell JT, Loh YP. An aminopeptidase activity in bovine pituitary secretory vesicles that cleaves the N-terminal arginine from beta-lipotropin60-65. *FEBS Lett*. 1984;175(1):135-139.

Gaissmaier C, Koh JL, Weise K. Growth and differentiation factors for cartilage healing and repair. *Injury*. 2008; 39 Suppl 1:S88-96.

Gao K, Zhu W, Li H, et al. Association between cytokines and exosomes in synovial fluid of individuals with knee osteoarthritis. *Mod Rheumatol*. 2020;30(4):758-764.

Gao Y, Zhuang Z, Lu Y, et al. Curcumin Mitigates Neuro-Inflammation by Modulating Microglia Polarization Through Inhibiting TLR4 Axis Signaling Pathway Following Experimental Subarachnoid Hemorrhage. *Front Neurosci*. 2019;13:1223

Gao YH, Zhao CW, Liu B, et al. An update on the association between metabolic syndrome and osteoarthritis and on the potential role of leptin in osteoarthritis. *Cytokine*. 2020;129:155043

García-Arnandis I, Guillén MI, Gomar F, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Alcaraz MJ. High mobility group box 1 potentiates the pro-inflammatory effects of interleukin-1 β in osteoarthritic synoviocytes. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(4):R165. doi:10.1186/ar3

Garrido-Gil P, Rodriguez-Pallares J, Lanciego JL, Guerra MJ. Brain Renin-Angiotensin System and Microglial Polarization: Implications for Aging and Neurodegeneration. *Front Aging Neurosci*. 2017;9:129. Published 2017 May 3.

Gasparello-Clemente E, Casis L, Varona A. Aminopeptidases in visceral organs during alterations in body fluid volume and osmolality. *Peptides*. 2003;24(9):1367-72.

Gass J, Khosla C. Prolyl endopeptidases. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(3):345-355. doi:10.1007/s00018-006-6317-y

Gavras H. The place of angiotensin-converting enzyme inhibition in the treatment of cardiovascular diseases. *N Engl J Med*. 1988;319(23):1541-1543

Geng N, Li Y, Zhang W, et al. A PAK5-DNPEP-USP4 axis dictates breast cancer growth and metastasis. *Int J Cancer*. 2020;146(4):1139-1151. doi:10.1002/ijc.32523.

George AJ, Thomas WG, Hannan RD. The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(11):745-759. doi:10.1038/nrc2945.

Ghoochani N, Karandish M, Mowla K, Haghighizadeh MH, Jalali MT. The effect of pomegranate juice on clinical signs, matrix metalloproteinases and antioxidant status in patients with knee osteoarthritis. *J Sci Food Agric*. 2016;96(13):4377-4381.

Gianzo M, Subirán N. Regulation of Male Fertility by the Renin-Angiotensin System. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21):7943. Published 2020 Oct 26

Gianzo M, Urizar-Arenaza I, Muñoz-Hoyos I, et al. Human sperm testicular angiotensin-converting enzyme helps determine human embryo quality. *Asian J Androl*. 2018;20(5):498-504. doi:10.4103/aja.aja_25_18

Glyn-Jones S, Palmer AJ, Agricola R, et al. Osteoarthritis. *Lancet*. 2015;386(9991):376-387.

Goldring MB. Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006;20(5):1003-1025. doi:10.1016/j.berh.2006.06.003

Goldring MB. *Cartilage and chondrocytes*. In: Firestein GS, Budd RC, McInnes IB, Sergent JS, Harris ED, Ruddy S, editor. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. 8. Philadelphia: WB Saunders, an imprint of Elsevier Inc; 2008. pp. 37–69.

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

Goldring MB, Otero M. Inflammation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2011;23(5):471-478.

Goldring SR. Alterations in periarticular bone and cross talk between subchondral bone and articular cartilage in osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2012;4(4):249-258. doi:10.1177/1759720X12437353.

Goldring SR, Goldring MB. Clinical aspects, pathology and pathophysiology of osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2006;6(4):376-378.

Gómez-Aristizábal A, Sharma A, Bakooshli MA, et al. Stage-specific differences in secretory profile of mesenchymal stromal cells (MSCs) subjected to early- vs late-stage OA synovial fluid. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017;25(5):737-741.

Gómez-Zorita S, Queralt M, Vicente MA, González M, Portillo MP. Metabolically healthy obesity and metabolically obese normal weight: a review. *J Physiol Biochem*. 2021;77(1):175-189.

Gomori G. Chromogenic substrates for aminopeptidase. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1954;87(3):559-561

Gong Q, Rajagopalan S, Zhong J. Dpp4 inhibition as a therapeutic strategy in cardiometabolic disease: Incretin-dependent and -independent function. *Int J Cardiol*. 2015;197:170-179. doi:10.1016/j.ijcard.2015.06.076.

Gonzalez-Gronow M, Gawdi G, Pizzo SV: Characterization of the plasminogen receptors of normal and rheumatoid arthritis human synovial fibroblasts. *J Biol Chem*. 1994;269:4360-4366..

Goossens F, De Meester I, Vanhoof G, Scharpé S. Distribution of prolyl oligopeptidase in human peripheral tissues and body fluids. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1996;34(1):17-22. doi:10.1515/cclm.1996.34.1.17

Gorrell MD, Gysbers V, McCaughan GW. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand J Immunol*. 2001;54(3):249-264. doi:10.1046/j.1365-3083.2001.00984.x.

Gotoh H, Hagihara M, Nagatsu T, Iwata H, Miura T. Activities of dipeptidyl peptidase II and dipeptidyl peptidase IV in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Chem*. 1989;35(6):1016-1018.

Green JA, Hirst-Jones KL, Davidson RK, et al. The potential for dietary factors to prevent or treat osteoarthritis. *Proc Nutr Soc*. 2014;73(2):278-288.

Greenberg LJ. Fluorometric measurement of alkaline phosphatase and aminopeptidase activities in the order of 10⁻¹⁴ mole. *Biochem Biophys Res Commun*. 1962;9:430-435

Gregoriou GC, Patel SD, Winters BL, Bagley EE. Neprilysin Controls the Synaptic Activity of Neuropeptides in the Intercalated Cells of the Amygdala. *Mol Pharmacol*. 2020;98(4):454-461

Greif DN, Kouroupis D, Murdock CJ, et al. Infrapatellar Fat Pad/Synovium Complex in Early-Stage Knee Osteoarthritis: Potential New Target and Source of Therapeutic Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:860. Published 2020 Jul 28

Gros C, Giros B, Schwartz JC. Identification of aminopeptidase M as an enkephalin-inactivating enzyme in rat cerebral membranes. *Biochemistry*. 1985;24(9):2179-2185. doi:10.1021/bi00330a011

Gros C, Giros B, Schwartz JC. Purification of membrane-bound aminopeptidase from rat brain: identification of aminopeptidase M. *Neuropeptides*. 1985;5(4-6):485-488

Grover AK, Samson SE. Benefits of antioxidant supplements for knee osteoarthritis: rationale and reality. *Nutr J*. 2016;15:1. Published 2016 Jan 5

Gudbergesen H, Boesen M, Lohmander LS, et al. Weight loss is effective for symptomatic relief in obese subjects with knee osteoarthritis independently of joint damage severity assessed by high-field MRI and radiography. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20(6)

Guermazi A, Hayashi D, Roemer FW, et al. Synovitis in knee osteoarthritis assessed by contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI) is associated with radiographic tibiofemoral osteoarthritis and MRI-detected widespread cartilage damage: the MOST study. *J Rheumatol*. 2014;41(3):501-508..

Guilak F, Nims RJ, Dicks A, Wu CL, Meulenbelt I. Osteoarthritis as a disease of the cartilage pericellular matrix. *Matrix Biol*. 2018;71-72:40-50

Guilak F. Biomechanical factors in osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2011;25(6):815-823.

Guirao X, Kumar A, Katz J, et al. Catecholamines increase monocyte TNF receptors and inhibit TNF through beta 2-adrenoreceptor activation. *Am J Physiol*. 1997;273(6):E1203-E1208

Gunji N, Nagashima M, Asano G, Yoshino S. Expression of kappa-opioid receptor mRNA in human peripheral blood lymphocytes and the relationship between its expression and the inflammatory changes in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2000;19(3):95-100.

Hafer JF, Kent JA, Boyer KA. Physical activity and age-related biomechanical risk factors for knee osteoarthritis. *Gait Posture*. 2019;70:24-29. doi:10.1016/j.gaitpost.2019.02.008.

Hafezi-Nejad N, Zikria B, Eng J, Carrino JA, Demehri S. Predictive value of semi-quantitative MRI-based scoring systems for future knee replacement: data from the osteoarthritis initiative. *Skeletal Radiol.* 2015;44(11):1655-1662.

Haffner CD, Diaz CJ, Miller AB, et al. Pyrrolidinyl pyridone and pyrazinone analogues as potent inhibitors of prolyl oligopeptidase (POP). *Bioorg Med Chem Lett.* 2008;18(15):4360-4363

Halewood C, Amis AA. Clinically relevant biomechanics of the knee capsule and ligaments. *Clin Sports Med.* 2016;35(1):1-18.

Halliday DA, McNeil JD, Betts WH, Scicchitano R. A role for the C-terminal fragment of substance P,SP7-11 in the pathogenesis of arthritis. *Regul Pept.* 1993;46(1-2):195-197.

Halliday DA, McNeil JD, Betts WH, Scicchitano R. The substance P fragment SP-(7-11) increases prostaglandin E2, intracellular Ca²⁺ and collagenase production in bovine articular chondrocytes. *Biochem J.* 1993;292 (Pt 1)(Pt 1):57-62.

Hammad DBM, Liyanapathirana V, Tonge DP. Molecular characterisation of the synovial fluid microbiome in rheumatoid arthritis patients and healthy control subjects. *PLoS One.* 2019;14(11):e0225110. Published 2019 Nov 21.

Happonen KE, Saxne T, Aspberg A, Mörgelin M, Heinegård D, Blom AM. Regulation of complement by cartilage oligomeric matrix protein allows for a novel molecular diagnostic principle in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(12):3574-3583

Haraden CA, Huebner JL, Hsueh MF, Li YJ, Kraus VB. Synovial fluid biomarkers associated with osteoarthritis severity reflect macrophage and neutrophil related inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2019;21(1):146. Published 2019 Jun 13

Haringman JJ, Smeets TJ, Reinders-Blankert P, Tak PP. Chemokine and chemokine receptor expression in paired peripheral blood mononuclear cells and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and reactive arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2006;65(3):294-300.

Haroyan A, Mukuchyan V, Mkrtchyan N, et al. Efficacy and safety of curcumin and its combination with boswellic acid in osteoarthritis: a comparative, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *BMC Complement Altern Med.* 2018;18(1):7. Published 20

Hartley BS. Proteolytic enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 1960;29:45-72.

Hattori A, Tsujimoto M. Processing of antigenic peptides by aminopeptidases. *Biol Pharm Bull.* 2004;27(6):777-780. doi:10.1248/bpb.27.777.

Havre PA, Abe M, Urasaki Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dang NH. The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer. *Front Biosci.* 2008;13:1634-1645.;

Haznedaroglu IC, Malkan UY. Local bone marrow renin-angiotensin system in the genesis of leukemia and other malignancies. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(19):4089-4111

Heffelfinger SC. The renin angiotensin system in the regulation of angiogenesis. *Curr Pharm Des*. 2007;13(12):1215-1229. doi:10.2174/138161207780618858

Heinlein B, Kutzner I, Graichen F, et al. ESB Clinical Biomechanics Award 2008: Complete data of total knee replacement loading for level walking and stair climbing measured in vivo with a follow-up of 6-10 months. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*. 2009;24(4)

Herlihy SE, Brown ML, Pilling D, Weeks BR, Myers LK, Gomer RH. Role of the neutrophil chemorepellent soluble dipeptidyl peptidase IV in decreasing inflammation in a murine model of arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(10):2634-2638. doi:10.1002/art.392

Hernández J, Segarra AB, Ramírez M, et al. Stress influences brain enkephalinase, oxytocinase and angiotensinase activities: a new hypothesis. *Neuropsychobiology*. 2009;59(3):184-189. doi:10.1159/000219306.

Hernanz A, Medina S, de Miguel E, Martín-Mola E. Effect of calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y, substance P, and vasoactive intestinal peptide on interleukin-1beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production by peripheral whole blood cells from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Regul Pept*. 2003;115(1):19-24

Herrero-Beaumont G, Roman-Blas JA, Bruyère O, et al. Clinical settings in knee osteoarthritis: Pathophysiology guides treatment. *Maturitas*. 2017;96:54-57.

Hirano T, Matsuda T, Turner M, Miyasaka N, Buchan G, Tang B. Excessive production of interleukin 6/B cell immunitary factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 1988, 18: 1797-801

Hochberg MC, Yerges –Armstrong L, Yau M, Mitchell BD. Genetic epidemiology of osteoarthritis: recent developments and future directions. *Curr Opin Rheumatol* 2013;25:192-97.

Holan V, Cechova K, Zajicova A, et al. The Impact of Morphine on the Characteristics and Function Properties of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Rev Rep*. 2018;14(6):801-811.

Holan V, Hermankova B, Bohacova P, et al. Distinct Immunoregulatory Mechanisms in Mesenchymal Stem Cells: Role of the Cytokine Environment. *Stem Cell Rev Rep*. 2016;12(6):654-663

Hollander JM, Zeng L. The Emerging Role of Glucose Metabolism in Cartilage Development. *Curr Osteoporos Rep*. 2019;17(2):59-69..

Holmquist B, Bünning P, Riordan JF. A continuous spectrophotometric assay for angiotensin converting enzyme. *Anal Biochem*. 1979;95(2):540-548

Hopsu VK, Mäkinn KK, Glenner GG. Characterization of aminopeptidase B: substrate specificity and affector studies. *Arch Biochem Biophys*. 1966;114(3):567-575.

Hopwood B, Tsykin A, Findlay DM, Fazzalari NL. Microarray gene expression profiling of osteoarthritic bone suggests altered bone remodelling, WNT and transforming growth factor-beta/bone morphogenic protein signalling. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(5):R100.

Huettl S, Markovic O. Aminotripeptid'azov'a aktivita synovi'alneho v'ypotku. I [Aminotripeptidase activity in synovial fluid. I]. *Bratisl Lek Listy*. 1963;43:585-596

Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*. 1975;258(5536):577-580. doi:10.1038/258577a0

Hui AY, McCarty WJ, Masuda K, Firestein GS, Sah RL. A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2012;4(1):15-37.

Hunter DJ, McDougall JJ, Keefe FJ. The symptoms of osteoarthritis and the genesis of pain. *Rheum Dis Clin North Am*. 2008;34(3):623-643. doi:10.1016/j.rdc.2008.05.004

Hunter DJ, Zhang Y, Niu J, Goggins J, Amin S, LaValley MP, Guermazi A, Genant H, Gale D, Felson DT. Increase in bone marrow lesions associated with cartilage loss: a longitudinal magnetic resonance imaging study of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2006; 54(5):1529-35.

Hwang J, Bae WC, Shieu W, Lewis CW, Bugbee WD, Sah RL. Increased hydraulic conductance of human articular cartilage and subchondral bone plate with progression of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58(12):3831-3842.

Hwang SR, O'Neill A, Bark S, Foulon T, Hook V. Secretory vesicle aminopeptidase B related to neuropeptide processing: molecular identification and subcellular localization to enkephalin- and NPY-containing chromaffin granules. *J Neurochem*. 2007;100(5):134

Ingram KR, Wann AK, Angel CK, Coleman PJ, Levick JR. Cyclic movement stimulates hyaluronan secretion into the synovial cavity of rabbit joints. *J Physiol*. 2008;586(6):1715-1729.

Ino K, Shibata K, Kajiyama H, Kikkawa F, Mizutani S: Regulatory role of 609 membrane-bound peptidases in the progression of gynecologic malignancies. *Biol Chem* 2004, 385(8):683–690.].

Insall JN, Dorr LD, Scott RD, Scott WN. Rationale of the Knee Society clinical rating system. Modified by: Stern SH, Becker MW, Insall JN. Unicondylar knee arthroplasty. An evaluation of selection criteria. *Clin Orthop Relat Res* 1993;(286):143-148. *Clin Orthop Relat Res*. 1989; 248:13–14.

Intekhab-Alam NY, White OB, Getting SJ, et al. Urocortin protects chondrocytes from NO-induced apoptosis: a future therapy for osteoarthritis?. *Cell Death Dis*. 2013;4(7):e717. Published 2013 Jul 11.

Iqbal SM, Leonard C, Regmi SC, et al. Lubricin/Proteoglycan 4 binds to and regulates the activity of Toll-Like Receptors In Vitro. *Sci Rep*. 2016;6:18910. Published 2016 Jan 11.

Irazusta J, Valdivia A, Fernández D, Agirregoitia E, Ochoa C, Casis L. Enkephalin-degrading enzymes in normal and subfertile human semen. *J Androl*. 2004;25(5):733-739.

Ismail MA, Mateos L, Maioli S, et al. 27-Hydroxycholesterol impairs neuronal glucose uptake through an IRAP/GLUT4 system dysregulation. *J Exp Med*. 2017;214(3):699-717.

Issa RI, Griffin TM. Pathobiology of obesity and osteoarthritis: integrating biomechanics and inflammation. *Pathobiol Aging Age Relat Dis*. 2012;2(2012):10.3402/pba.v2i0.17470.

Ito T, Nomura S, Okada M, et al. Transcriptional regulation of human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase gene. *Mol Hum Reprod*. 2001;7(9):887-894. doi:10.1093/molehr/7.9.887

Iversen LL. Differences between early and late-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1987;8(6):554-555. doi:10.1016/0197-4580(87)90132-1

Iwai M, Horiuchi M. Devil and angel in the renin-angiotensin system: ACE-angiotensin II-AT1 receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis. *Hypertens Res*. 2009;32(7):533-536.

Iwaki-Egawa S, Watanabe Y, Kikuya Y, Fujimoto Y. Dipeptidyl peptidase IV from human serum: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *J Biochem*. 1998;124(2):428-433. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022130

Jacob J, Aggarwal A, Aggarwal A, et al. Senescent chondrogenic progenitor cells derived from articular cartilage of knee osteoarthritis patients contributes to senescence-associated secretory phenotype via release of IL-6 and IL-8 [published online ahead of print, 2022 Feb 19]. *Acta Histochem*. 2022;124(3):151867.

Jancsó G, Kiraly E, Jancsó-Gábor A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature*. 1977;270(5639):741-743.

Janossy G, Panayi GS, Duke O, Bofill M, Poulter LW, Goldstein G. Rheumatoid arthritis: a disease of T-lymphocyte/macrophage immunoregulation. *Lancet* 1981, 2: 839-842

Jay GD, Waller KA. The biology of lubricin: near frictionless joint motion. *Matrix Biol*. 2014;39:17-24.

Jay GD. Characterization of a bovine synovial fluid lubricating factor. I. Chemical, surface activity and lubricating properties. *Connect Tissue Res*. 1992;28(1-2):71-88.

Jayson MI, Dixon AJ. Intra-articular pressure in rheumatoid arthritis of the knee. Pressure changes during joint use. *Ann Rheum Dis* 1970;29:401-8.

Jeffries MA. Osteoarthritis year in review 2018: genetics and epigenetics. *Osteoarthritis Cartilage*. 2019 Mar;27(3):371-377.

Jiang T, Yu JT, Zhu XC, et al. Angiotensin-(1-7) induces cerebral ischaemic tolerance by promoting brain angiogenesis in a Mas/eNOS-dependent pathway. *Br J Pharmacol*. 2014;171(18):4222-4232

Johnson VL, Hunter DJ. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2014;28(1):5-15.

Jones EA, Crawford A, English A, et al. Synovial fluid mesenchymal stem cells in health and early osteoarthritis: detection and functional evaluation at the single-cell level. *Arthritis Rheum*. 2008;58(6):1731-1740.

Jordan KM, Arden NK, Doherty M, et al. EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Ann Rheum Dis*. 2003;62(12):1145-1155.

Jordens I, Molle D, Xiong W, Keller SR, McGraw TE. Insulin-regulated aminopeptidase is a key regulator of GLUT4 trafficking by controlling the sorting of GLUT4 from endosomes to specialized insulin-regulated vesicles. *Mol Biol Cell*. 2010;21(12):2034-2044

Jung K, Pergande M, Wischke UW. Characterization of particulate and soluble variants of the brush-border enzymes alanine aminopeptidase, alkaline phosphatase and gamma-glutamyltransferase in human urine. *Biomed Biochim Acta*. 1984;43(12):1357-1364.

Kamori M, Hagihara M, Nagatsu T, Iwata H, Miura T. Activities of dipeptidyl peptidase II, dipeptidyl peptidase IV, prolyl endopeptidase, and collagenase-like peptidase in synovial membrane from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Biochem Med Metab Biol*. 1991;45(2):154-160.

Kang EH, Lee YJ, Kim TK, et al. Adiponectin is a potential catabolic mediator in osteoarthritis cartilage. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(6):R231.

Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011;7(1):33-42

Karsdal MA, Bihlet A, Byrjalsen I, et al. OA phenotypes, rather than disease stage, drive structural progression--identification of structural progressors from 2 phase III randomized clinical studies with symptomatic knee OA. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011

Karsten SL, Sang TK, Gehman LT, et al. A genomic screen for modifiers of tauopathy identifies puromycin-sensitive aminopeptidase as an inhibitor of tau-induced neurodegeneration. *Neuron*. 2006;51(5):549-560.

Kato T, Miyaki S, Ishitobi H, et al. Exosomes from IL-1 β stimulated synovial fibroblasts induce osteoarthritic changes in articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(4):R163. Published 2014 Aug 4.

Kawaguchi H. Endochondral ossification signals in cartilage degradation during osteoarthritis progression in experimental mouse models. *Mol Cells*. 2008;25(1):1-6.

Kawaguchi H. Mechanism of molecular backgrounds of osteoarthritis. *Nihon Rinsho*. 2014;72(10):1729-1733.

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010;11(5):373-384. doi:10.1038/ni.1863.

Kawakami Y, Matsuo K, Murata M, et al. Expression of Angiotensin II Receptor-1 in Human Articular Chondrocytes. *Arthritis*. 2012;2012:648537. doi:10.1155/2012/648537

Kehoe PG, Hibbs E, Palmer LE, Miners JS. Angiotensin-III is Increased in Alzheimer's Disease in Association with Amyloid- β and Tau Pathology. *J Alzheimers Dis*. 2017;58(1):203-214.

Keller SR, Scott HM, Mastick CC, Aebersold R, Lienhard GE. Cloning and characterization of a novel insulin-regulated membrane aminopeptidase from Glut4 vesicles [published correction appears in *J Biol Chem* 1995 Dec 15;270(50):30236]. *J Biol Chem*. 1995;270

Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteoarthrosis. *Ann Rheum Dis* 1957;16:494-502.

Kelly JA, Neidle EL, Neidle A. An aminopeptidase from mouse brain cytosol that cleaves N-terminal acidic amino acid residues. *J Neurochem*. 1983;40(6):1727-1734.

Kelwick R, Desanlis I, Wheeler GN, Edwards DR. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. *Genome Biol*. 2015;16(1):113

Khurana A, Goyal A, Kirubakaran P, Akhand G, Gupta R, Goel N. Efficacy of Autologous Conditioned Serum (ACS), Platelet-Rich Plasma (PRP), Hyaluronic Acid (HA) and Steroid for Early Osteoarthritis Knee: A Comparative Analysis. *Indian J Orthop*. 2020;55(Supp

Kim D, You B, Lim H, Lee SJ. Toll-like receptor 2 contributes to chemokine gene expression and macrophage infiltration in the dorsal root ganglia after peripheral nerve injury. *Mol Pain*. 2011;7:74. Published 2011 Sep 28.

Kim HA, Cho ML, Choi HY, et al. The catabolic pathway mediated by Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2006;54(7):2152-2163. doi:10.1002/art.21951

Kim YK, Na KS, Myint AM, Leonard BE. The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016;64:277-284.

Kimball ES, Persico FJ, Vaught JL. Substance P, neurokinin A, and neurokinin B induce generation of IL-1-like activity in P388D1 cells. Possible relevance to arthritic disease. *J Immunol*. 1988;141(10):3564-3569

Kittl C, Inderhaug E, Williams A, Amis AA. Biomechanics of the Anterolateral Structures of the Knee. *Clin Sports Med*. 2018;37(1):21-31. doi:10.1016/j.csm.2017.07.004

Kobayashi H, Hosono O, Mimori T, Kawasaki H, Dang NH, Tanaka H, Morimoto C: Reduction of serum soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV enzyme activity and its correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2002;29:1858-1866.

Kolhe R, Hunter M, Liu S, et al. Gender-specific differential expression of exosomal miRNA in synovial fluid of patients with osteoarthritis. *Sci Rep.* 2017;7(1):2029. Published 2017 May 17

Kolly L, Busso N, Palmer G, Talabot-Ayer D, Chobaz V, So A. Expression and function of the NALP3 inflammasome in rheumatoid synovium. *Immunology.* 2010;129(2):178-185.

Konttinen YT, Rees R, Hukkanen M, et al. Nerves in inflammatory synovium: immunohistochemical observations on the adjuvant arthritis rat model. *J Rheumatol.* 1990;17(12):1586-1591.

Koskinen A, Juslin S, Nieminen R, Moilanen T, Vuolteenaho K, Moilanen E. Adiponectin associates with markers of cartilage degradation in osteoarthritis and induces production of proinflammatory and catabolic factors through mitogen-activated protein kinase pathways. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(6):R184.

Koskinen A, Vuolteenaho K, Moilanen T, Moilanen E. Resistin as a factor in osteoarthritis: synovial fluid resistin concentrations correlate positively with interleukin 6 and matrix metalloproteinases MMP-1 and MMP-3. *Scand J Rheumatol.* 2014;43(3):249-253

Koskinen A, Vuolteenaho K, Nieminen R, Moilanen T, Moilanen E. Leptin enhances MMP-1, MMP-3 and MMP-13 production in human osteoarthritic cartilage and correlates with MMP-1 and MMP-3 in synovial fluid from OA patients. *Clin Exp Rheumatol.* 2011;29(1):57-6

Kouroupis D, Bowles AC, Willman MA, et al. Infrapatellar fat pad-derived MSC response to inflammation and fibrosis induces an immunomodulatory phenotype involving CD10-mediated Substance P degradation. *Sci Rep.* 2019;9(1):10864. Published 2019 Jul 26.

Kramer W, Girbig F, Corsiero D, et al. Aminopeptidase N (CD13) is a molecular target of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in the enterocyte brush border membrane. *J Biol Chem.* 2005;280(2):1306-1320.

Kraus VB, Blanco FJ, Englund M, Karsdal MA, Lohmander LS. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthritis Cartilage.* 2015;23(8):1233-1241.

Kriegova E, Manukyan G, Mikulkova Z, et al. Gender-related differences observed among immune cells in synovial fluid in knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2018;26(9):1247-1256.

Kurdow N, Oeser W. Bestimmung der Leuzinaminopeptidase im Serum und Gelenkpunktat bei Patienten mit progressive chronischer Polyarthritits [Determination of leucine aminopeptidase in the serum and synovial fluid of patients with progressive chronic polyarthritits]. *Z Gesamte Inn Med.* 1972;27(1):38-40. doi:10.1136/ard.29.4.434

Labinsky H, Panipinto PM, Ly KA, et al. Multiparameter Analysis Identifies Heterogeneity in Knee Osteoarthritis Synovial Responses. *Arthritis Rheumatol.* 2020;72(4):598-608.

Lago R, Gomez R, Otero M, et al. A new player in cartilage homeostasis: adiponectin induces nitric oxide synthase type II and pro-inflammatory cytokines in chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008;16(9):1101-1109.

Lai A, Ghaffari A, Ghahary A. Inhibitory effect of anti-aminopeptidase N/CD13 antibodies on fibroblast migration. *Mol Cell Biochem.* 2010;343(1-2):191-199.

Lai Y, Bai X, Zhao Y, et al. ADAMTS-7 forms a positive feedback loop with TNF- α in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(8):1575-1584

Lambeir AM, Durinx C, Scharpé S, De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2003;40(3):209-294. doi:10.1080/713609354

Lambert DW, Hooper NM, Turner AJ. Angiotensin-converting enzyme 2 and new insights into the renin-angiotensin system. *Biochem Pharmacol.* 2008;75(4):781-786.

Lan Z, Chen L, Feng J, et al. Mechanosensitive TRPV4 is required for crystal-induced inflammation. *Ann Rheum Dis.* 2021;80(12):1604-1614. doi:10.1136/annrheumdis-2021-220295.

Lane CA, Barnes J, Nicholas JM, et al. Associations Between Vascular Risk Across Adulthood and Brain Pathology in Late Life: Evidence From a British Birth Cohort. *JAMA Neurol.* 2020;77(2):175-183.,

Lapadula G, Iannone F, Zuccaro C, et al. Expression of membrane-bound peptidases (CD10 and CD26) on human articular chondrocytes. Possible role of neuropeptidases in the pathogenesis of osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 1995;13(2):143-148.

Larrinaga G, Blanco L, Sanz B, et al. The impact of peptidase activity on clear cell renal cell carcinoma survival. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;303(12):F1584-F1591. doi:10.1152/ajprenal.00477.2012

Larrinaga G, Callado LF, Agirregoitia N, Varona A, Gil J. Subcellular distribution of membrane-bound aminopeptidases in the human and rat brain. *Neurosci Lett.* 2005;383(1-2):136-140.

Larrínaga G, Irazusta J, Gil FJ, Casis L: "EMPLEO DEL RECEPTOR DE CANNABINOIDES CB1 COMO MARCADOR DE CARCINOMA RENAL DE CÉLULAS CROMÓFOBAS (CRCCh) Y ONCOCITOMA RENAL (OR) patente en España nº P201231588, 2015

Larrinaga G, Perez I, Ariz U, et al. Clinical impact of aspartyl aminopeptidase expression and activity in colorectal cancer. *Transl Res.* 2013;162(5):297-308. doi:10.1016/j.trsl.2013.07.010

Larrinaga G, Perez I, Sanz B, et al. Activity of soluble aminopeptidase A and dipeptidyl peptidase IV and membrane-bound aminopeptidase B and pyroglutamyl peptidase I in adenoid hyperplasia, tonsillar hyperplasia and chronic tonsillitis [published correction appears in *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2012 Feb;76(2):305. Sanchez, Carmen Elena [corrected to Sanchez, Clara Elena]]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2011;75(11):1399-1403. doi:10.1016/j.ijporl.2011.07.037

Larrinaga G, Pérez I, Sanz B, et al. Altered dipeptidyl peptidase IV and prolyl endopeptidase activities in chronic tonsillitis, tonsillar hyperplasia and adenoid hyperplasia. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2011;75(3):347-350. doi:10.1016/j.ijporl.2010.1

Lauffart B, Mcdermott J, Jones P, Mantle D. Amino acid inhibition of aminopeptidases purified from human cerebral cortex. *Biochem Soc Trans.* 1988;16(5):849–850.

Lawrence KM, Jones RC, Jackson TR, et al. Chondroprotection by urocortin involves blockade of the mechanosensitive ion channel Piezo1. *Sci Rep.* 2017;7(1):5147. Published 2017 Jul 11

Le G, Kaux JF, Seidel L, Péters P, Gothot A, Albert A, Crielaard JM: Étude comparative de cinq techniques de préparation plaquettaire (platelet-rich plasma). *Pathol Biol* 2011, 59:157–160.

Lee AS, Ellman MB, Yan D, et al. A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. *Gene.* 2013;527(2):440-447. doi:10.1016/j.gene.2013.05.069.

Lee DW, Banquy X, Das S, Cadirov N, Jay G, Israelachvili J. Effects of molecular weight of grafted hyaluronic acid on wear initiation. *Acta Biomater.* 2014;10(5):1817-1823.

Lee SH, Kim HG. Cobalt chloride-induced downregulation of puromycin-sensitive aminopeptidase suppresses the migration and invasion of PC-3 cells. *J Microbiol Biotechnol.* 2009;19(5):530-536

Lee W, Guilak F, Liedtke W. Role of Piezo Channels in Joint Health and Injury. *Curr Top Membr.* 2017;79:263-273.

Lees T, Mantle D, Walker D, Jones P, Blake D. Identification of aminopeptidases in synovial fluid from rheumatoid arthritis patients. *Biochem Soc Trans.* 1991;19(2):215S. doi:10.1042/bst019215s

Lei M, Guo C, Wang D, Zhang C, Hua L. The effect of probiotic *Lactobacillus casei* Shirota on knee osteoarthritis: a randomised double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Benef Microbes.* 2017;8(5):697-703

Lemaire V, Peltier A, Jouvent C, Ryckewaert A. Résultats de l'examen cytologique du liquide synovial dans diverses arthropathies [Results of the cytological examination of the synovial fluid in various arthropathies]. *Rev Rhum Mal Osteoartic.* 1981;48(3):

Lepetos P, Papavassiliou AG. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1862(4):576-591.

Letarte M, Vera S, Tran R, et al. Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. *J Exp Med.* 1988;168(4):1247-1253. doi:10.1084/jem.168.4.1247

Li C, Han R, Kang L, et al. Pirfenidone controls the feedback loop of the AT1R/p38 MAPK/renin-angiotensin system axis by regulating liver X receptor- α in myocardial infarction-induced cardiac fibrosis. *Sci Rep.* 2017;7:40523. Published 2017 Jan 16. doi:10.

Li J, Wilk E, Wilk S. Inhibition of prolyl oligopeptidase by Fmoc-aminoacylpyrrolidine-2-nitriles. *J Neurochem.* 1996;66(5):2105-2112. doi:10.1046/j.1471-4159.1996.66052105.x

Li Y, Luo W, Deng Z, Lei G. Diet-Intestinal Microbiota Axis in Osteoarthritis: A Possible Role. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:3495173.

Li Z, Wang Y, Xiao K, Xiang S, Li Z, Weng X. Emerging Role of Exosomes in the Joint Diseases. *Cell Physiol Biochem.* 2018;47(5):2008-2017.

Liao T, Ding L, Wu P, et al. Chrysin Attenuates the NLRP3 Inflammasome Cascade to Reduce Synovitis and Pain in KOA Rats. *Drug Des Devel Ther.* 2020;14:3015-3027.

Little CB, Meeker CT, Golub SB, et al. Blocking aggrecanase cleavage in the aggrecan interglobular domain abrogates cartilage erosion and promotes cartilage repair [published correction appears in *J Clin Invest.* 2008 Nov;118(11):3812]. *J Clin Invest.* 2007

Liu B, Gao YH, Dong N, et al. Differential expression of adipokines in the synovium and infrapatellar fat pad of osteoarthritis patients with and without metabolic syndrome. *Connect Tissue Res.* 2019;60(6):611-618.

Liu Y, Yang L, Liu B, Jiang YG. Podocalyxin promotes glioblastoma multiforme cell invasion and proliferation via β -catenin signaling [published correction appears in *PLoS One.* 2015;10(3):e0119049. Yang, Liang [added]; Liu, Bo [added]]. *PLoS One.* 2014;9(10

Livesley PJ, Doherty M, Needoff M, Moulton A. Arthroscopic lavage of osteoarthritic knees. *J Bone Joint Surg Br.* 1991;73(6):922-926. doi:10.1302/0301-620X.73B6.1720118

Loeser RF, Yammani RR, Carlson CS, et al. Articular chondrocytes express the receptor for advanced glycation end products: Potential role in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2005;52(8):2376-2385.

Loeser RF. The Role of Aging in the Development of Osteoarthritis. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2017;128:44-54.

Lopes-Paciencia S, Saint-Germain E, Rowell MC, Ruiz AF, Kalegari P, Ferbeyre G. The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine*. 2019;117:15-22.

Lord JA, Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature*. 1977;267(5611):495-499. doi:10.1038/267495a0

Lóry V, Balážová L, Kršková K, et al. Obesity and aging affects skeletal muscle renin-angiotensin system and myosin heavy chain proportions in pre-diabetic Zucker rats. *J Physiol Biochem*. 2019;75(3):351-365

Lotz M, Martel-Pelletier J, Christiansen C, et al. Value of biomarkers in osteoarthritis: current status and perspectives [published correction appears in *Ann Rheum Dis*. 2017 May 25;:]. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(11):1756-1763. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203726

Lotz M, Vaughan JH, Carson DA. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science*. 1988;241(4870):1218-1221. doi:10.1126/science.2457950

Lowe JR, Dixon JS, Guthrie JA, McWhinney P. Serum and synovial fluid levels of angiotensin converting enzyme in polyarthritis. *Ann Rheum Dis*. 1986;45(11):921-924.

Loza E, Lopez-Gomez JM, Abasolo L, et al. Economic burden of knee and hip osteoarthritis in Spain. *Arthritis Rheum*. 2009;61(2):158-165. doi:10.1002/art.24214

Lu B, Driban JB, Xu C, Lapane KL, McAlindon TE, Eaton CB. Dietary Fat Intake and Radiographic Progression of Knee Osteoarthritis: Data From the Osteoarthritis Initiative. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2017;69(3):368-375.

Lu C, Amin MA, Fox DA. CD13/Aminopeptidase N Is a Potential Therapeutic Target for Inflammatory Disorders. *J Immunol*. 2020;204(1):3-11

Luan Y, Xu W. The structure and main functions of aminopeptidase N. *Curr Med Chem*. 2007;14(6):639-647

Luk HY, Appell C, Chyu MC, et al. Impacts of Green Tea on Joint and Skeletal Muscle Health: Prospects of Translational Nutrition. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(11):1050. Published 2020 Oct 28.

Luyten FP, Vanlauwe J. Tissue engineering approaches for osteoarthritis. *Bone* 2012;51(2):289-96.

Lysle DT, Coussons ME, Watts VJ, Bennett EH, Dykstra LA. Morphine-induced alterations of immune status: dose dependency, compartment specificity and antagonism by naltrexone. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993;265(3):1071-1078.

Madry H, van Dijk CN, Mueller-Gerbl M. The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2010;18(4):419-433.

Maeda K, Kobayashi Y, Koide M, et al. The Regulation of Bone Metabolism and Disorders by Wnt Signaling. *Int J Mol Sci*. 2019;20(22):5525.

Maillefert JF, Kloppenburg M, Fernandes L, et al. Multi-language translation and cross-cultural adaptation of the OARSI/OMERACT measure of intermittent and constant osteoarthritis pain (ICOAP). *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(10):1293-1296.

Mäkinen KK, Virtanen KK. Aminopeptidase B in human serum. *Clin Chim Acta*. 1976;67(2):213-218. doi:10.1016/0009-8981(76)90262-x

Malafoglia V, Celi M, Muscoli C, et al. Lymphocyte opioid receptors as innovative biomarkers of osteoarthritic pain, for the assessment and risk management of opioid tailored therapy, before hip surgery, to prevent chronic pain and opioid tolerance/addiction development: OpMarkArt (Opioids-Markers-Arthroprosthesis) study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2017;18(1):605. Published 2017 Dec 19.

Malfroy B, Kuang WJ, Seeburg PH, Mason AJ, Schofield PR. Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase). *FEBS Lett*. 1988;229(1):206-210. doi:10.1016/0014-5793(88)80828-7

Mantle D, Hardy MF, Lauffart B, McDermott JR, Smith AI, Pennington RJ. Purification and characterization of the major aminopeptidase from human skeletal muscle. *Biochem J*. 1983;211(3):567-573. doi:10.1042/bj2110567

Mantle D. Comparison of soluble aminopeptidases in human cerebral cortex, skeletal muscle and kidney tissues. *Clin Chim Acta*. 1992;207(1-2):107-118. doi:10.1016/0009-8981(92)90154-i

Marks N, Datta RK, Lajtha A. Partial resolution of brain arylamidases and aminopeptidases. *J Biol Chem*. 1968;243(11):2882-2889.

Marks N, Stern F, Lajtha A. Changes in proteolytic enzymes and proteins during maturation of the brain. *Brain Res*. 1975;86(2):307-322.

Marshall KW, Chiu B, Inman RD. Substance P and arthritis: analysis of plasma and synovial fluid levels. *Arthritis Rheum*. 1990;33(1):87-90. doi:10.1002/art.1780330111

Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2008;22(2):351-84.

Martel-Pelletier J, Raynauld JP, Dorais M, Abram F, Pelletier JP. The levels of the adipokines adiponin and leptin are associated with knee osteoarthritis progression as assessed by MRI and incidence of total knee replacement in symptomatic osteoarthritis patients: a post hoc analysis. *Rheumatology (Oxford)*. 2016;55(4):680-688.

Martel-Pelletier J, Welsch DJ, Pelletier JP. Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2001;15(5):805-29

Martin JA, Brown T, Heiner A, Buckwalter JA. Post-traumatic osteoarthritis: the role of accelerated chondrocyte senescence. *Biorheology*. 2004;41(3-4):479-91..

Martínez-Castillo A, Núñez C, Cabiedes J. Análisis de líquido sinovial. *Reumatol Clin*. 2010 Nov-Dec;6(6):316-21. doi: 10.1016/j.reuma.2009.12.010. Epub 2010 Jun 26.

Martínez-Martos JM, Correa-Rodríguez M, Rus A, Molina F, Ramírez-Expósito MJ, Aguilar-Ferrandiz ME. Altered Serum Oxytocinase and Enkephalin-Degrading Aminopeptidase Activities in Patients With Fibromyalgia. *Biol Res Nurs*. 2019;21(4):431-439. doi:10.1177/

Matavelli LC, Siragy HM. AT2 receptor activities and pathophysiological implications. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2015;65(3):226-232

Mathiessen A, Conaghan PG. Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications. *Arthritis Res Ther*. 2017;19(1):18. Published 2017 Feb 2

Matsas R, Stephenson SL, Hryszko J, Kenny AJ, Turner AJ. The metabolism of neuropeptides. Phase separation of synaptic membrane preparations with Triton X-114 reveals the presence of aminopeptidase N. *Biochem J*. 1985;231(2):445-449.

Matsuda M, Huh Y, Ji RR. Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and neuroinflammation in pain. *J Anesth*. 2019;33(1):131-139

Matucci-Cerinic M, Lombardi A, Leoncini G, et al. Neutral endopeptidase (3.4.24.11) in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. A marker of disease activity or a regulator of pain and inflammation?. *Rheumatol Int*. 1993;13(1):1-4. d

Mazzucco L, Balbo V, Cattana E, Guaschino R, Borzini P: Not every PRP-gel is born equal. Evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP-gel preparations: Fibrinet, RegenPRP-kit, Plateltex and one manual procedure. *Vox Sang* 2009, 97:

McAlindon T, LaValley M, Schneider E, et al. Effect of vitamin D supplementation on progression of knee pain and cartilage volume loss in patients with symptomatic osteoarthritis: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2013;309(2):155-162.

McLellan S, Dyer SH, Rodriguez G, Hersh LB. Studies on the tissue distribution of the puromycin-sensitive enkephalin-degrading aminopeptidases. *J Neurochem*. 1988;51(5):1552-1559.

Mecca AP, Regenhardt RW, O'Connor TE, et al. Cerebroprotection by angiotensin-(1-7) in endothelin-1-induced ischaemic stroke. *Exp Physiol*. 2011;96(10):1084-1096.

Mendes MT, Murari-do-Nascimento S, Torrigo IR, Alponi RF, Yamasaki SC, Silveira PF. Basic aminopeptidase activity is an emerging biomarker in collagen-induced rheumatoid arthritis. *Regul Pept*. 2011;167(2-3):215-221

Meng J, Meng Y, Plotnikoff NP, Youkilis G, Griffin N, Shan F. Low dose naltrexone (LDN) enhances maturation of bone marrow dendritic cells (BMDCs). *Int Immunopharmacol*. 2013;17(4):1084-1089. doi:10.1016/j.intimp.2013.10.012

Menzies FM, Hourez R, Imarisio S, et al. Puromycin-sensitive aminopeptidase protects against aggregation-prone proteins via autophagy. *Hum Mol Genet.* 2010;19(23):4573-45

Messier SP, Mihalko SL, Legault C, et al. Effects of intensive diet and exercise on knee joint loads, inflammation, and clinical outcomes among overweight and obese adults with knee osteoarthritis: the IDEA randomized clinical trial. *JAMA.* 2013;310(12):12

Migaud M, Durieux C, Viereck J, Sorooca-Lucas E, Fournié-Zaluski MC, Roques BP. The in vivo metabolism of cholecystokinin (CCK-8) is essentially ensured by aminopeptidase A. *Peptides.* 1996;17(4):601-607

Miki T, Takegami Y, Okawa K, Muraguchi T, Noda M, Takahashi C. The reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) interacts with membrane type 1 matrix metalloproteinase and CD13/aminopeptidase N and modulates their endocytic pathways. *J Biol Chem.* 2007;282(16):12341-12352..

Miller RE, Belmadani A, Ishihara S, et al. Damage-associated molecular patterns generated in osteoarthritis directly excite murine nociceptive neurons through Toll-like receptor 4. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(11):2933-2943.

Miller RE, Ishihara S, Tran PB, et al. An aggrecan fragment drives osteoarthritis pain through Toll-like receptor 2. *JCI Insight.* 2018;3(6):e95704. Published 2018 Mar 22.

Miller RE, Malfait AM. Osteoarthritis pain: What are we learning from animal models?. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2017;31(5):676-687. doi:10.1016/j.berh.2018.03.003

Minami M, Satoh M. Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci Res.* 1995;23(2):121-145. doi:10.1016/0168-0102(95)00933-k

Mina-Osorio P. The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends Mol Med.* 2008;14(8):361-371.

Minashima T, Kirsch T. Annexin A6 regulates catabolic events in articular chondrocytes via the modulation of NF- κ B and Wnt/ β -catenin signaling. *PLoS One.* 2018;13(5):e0197690. Published 2018 May 17

Minnasch P, Yamamoto Y, Ohkubo I, Nishi K. Demonstration of puromycin-sensitive alanyl aminopeptidase in Alzheimer disease brain. *Leg Med (Tokyo).* 2003;5 Suppl 1:S285-S287.

Mobasheri A. Osteoarthritis year 2012 in review: biomarkers. *Osteoarthritis Cartilage.* 2012;20(12):1451-64.

Mobasheri A, Richardson S, Mobasheri R, Shakibaei M, Hoyland JA. Hypoxia inducible factor-1 and facilitative glucose transporters GLUT1 and GLUT3: putative molecular components of the oxygen and glucose sensing apparatus in articular chondrocytes. *Histol Histopathol.* 2005;20(4):1327-1338.

Moldovan F, Pelletier JP, Hambor J, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. Collagenase-3 (matrix metalloprotease 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ: in vitro mimicking effect by transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum.* 1997;40(9):1653-1661.

Momberger TS, Levick JR, Mason RM. Hyaluronan secretion by synoviocytes is mechanosensitive. *Matrix Biol.* 2005;24(8):510-519.

Momeni N, Yoshimoto T, Ryberg B, Sandberg-Wollheim M, Grubb A. Factors influencing analysis of prolyl endopeptidase in human blood and cerebrospinal fluid: increase in assay sensitivity. *Scand J Clin Lab Invest.* 2003;63(6):387-395. doi:10.1080/00365510310

Montoro-Molina S, López-Carmona A, Quesada A, et al. Klotho and Aminopeptidases as Early Biomarkers of Renal Injury in Zucker Obese Rats. *Front Physiol.* 2018;9:1599. Published 2018 Nov 13. doi:10.3389/fphys.2018.01599.

Mooney RA, Sampson ER, Lerea J, Rosier RN, Zuscik MJ. High-fat diet accelerates progression of osteoarthritis after meniscal/ligamentous injury. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(6):R198.

Moradi B, Rosshirt N, Tripel E, et al. Unicompartmental and bicompartamental knee osteoarthritis show different patterns of mononuclear cell infiltration and cytokine release in the affected joints. *Clin Exp Immunol.* 2015;180(1):143-154..

Morain P, Boeijinga PH, Demazières A, De Nanteuil G, Luthringer R. Psychotropic profile of S 17092, a prolyl endopeptidase inhibitor, using quantitative EEG in young healthy volunteers. *Neuropsychobiology.* 2007;55(3-4):176-183. doi:10.1159/000107070.

Morain P, Robin JL, De Nanteuil G, Jochemsen R, Heidet V, Guez D. Pharmacodynamic and pharmacokinetic profile of S 17092, a new orally active prolyl endopeptidase inhibitor, in elderly healthy volunteers. A phase I study. *Br J Clin Pharmacol.* 2000;50(4):3

Moreno E, Canet J, Gracia E, et al. Molecular Evidence of Adenosine Deaminase Linking Adenosine AA Receptor and CD26 Proteins. *Front Pharmacol.* 2018;9:106. Published 2018 Feb 15

Morgan R, Endres J, Behbahani-Nejad N. Expression and function of aminopeptidase N/CD13 produced by fibroblast like synoviocytes in rheumatoid arthritis: role of CD13 in chemotaxis of cytokine activated T cells independent of enzymatic activity. *Arthritis Rheumatol.* 2015 January;67(1):74-85

Morgan RL, Behbahani-Nejad N, Endres J, et al. Localization, Shedding, Regulation and Function of Aminopeptidase N/CD13 on Fibroblast like Synoviocytes. *PLoS One.* 2016;11(9):e0162008. Published 2016 Sep 22.

Moss S, Subramanian V, Acharya KR. Crystal structure of peptide-bound neprilysin reveals key binding interactions. *FEBS Lett.* 2020;594(2):327-336

Mpakali A, Saridakis E, Harlos K, et al. Crystal Structure of Insulin-Regulated Aminopeptidase with Bound Substrate Analogue Provides Insight on Antigenic Epitope Precursor Recognition and Processing. *J Immunol*. 2015;195(6):2842-2851

Mucha A, Drag M, Dalton JP, Kafarski P. Metallo-aminopeptidase inhibitors. *Biochimie*. 2010;92(11):1509-1529

Muraki S, Akune T, En-yo Y, et al. Association of dietary intake with joint space narrowing and osteophytosis at the knee in Japanese men and women: the ROAD study. *Mod Rheumatol*. 2014;24(2):236-242.

Murray AM et al. The associations between quadriceps muscle strength, power, and knee joint mechanics in knee osteoarthritis: A cross-sectional study. *Clinical Biomechanics*. 2015;30:1140-1145.

Muschter D, Beiderbeck AS, Späth T, Kirschneck C, Schröder A, Grässel S. Sensory Neuropeptides and their Receptors Participate in Mechano-Regulation of Murine Macrophages. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3):503. Published 2019 Jan 24.

Musumeci G, Szychlińska MA, Mobasher A. Age-related degeneration of articular cartilage in the pathogenesis of osteoarthritis: molecular markers of senescent chondrocytes. *Histol Histopathol*. 2015;30(1):1-12.

Muthuri SG, McWilliams DF, Doherty M, Zhang W. History of knee injuries and knee osteoarthritis: a meta-analysis of observational studies. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011;19:1286-93.

Myöhänen TT, Kääriäinen TM, Jalkanen AJ, Piltonen M, Männistö PT. Localization of prolyl oligopeptidase in the thalamic and cortical projection neurons: a retrograde neurotracing study in the rat brain. *Neurosci Lett*. 2009;450(2):201-205. doi:10.1016/j.ne

Nagasaka T, Nomura S, Okamura M, et al. Immunohistochemical localization of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in normal human placental, fetal and adult tissues. *Reprod Fertil Dev*. 1997;9(8):747-753..

Nakamura Y, Inloes JB, Katagiri T, Kobayashi T. Chondrocyte-specific microRNA-140 regulates endochondral bone development and targets Dnpep to modulate bone morphogenetic protein signaling. *Mol Cell Biol*. 2011;31(14):3019-3028. doi:10.1128/MCB.05178-11

NCBI. National Library of Medicine. [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]

Nefla M, Sudre L, Denat G, et al. The pro-inflammatory cytokine 14-3-3ε is a ligand of CD13 in cartilage. *J Cell Sci*. 2015;128(17):3250-3262

Neidhart M, Hauser N, Paulsson M, DiCesare PE, Michel BA, Häuselmann HJ. Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation. *Br J Rheumatol*. 1997;36(11):1151-1160.

Neogi T, Guermazi A, Roemer F, et al. Association of Joint Inflammation With Pain Sensitization in Knee Osteoarthritis: The Multicenter Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68(3):654-661

Netter F. *Colección Netter de ilustraciones médicas tomo VIII/1 Sistema musculoesquelético*. Reimpresión. Ed. Masson, 2001.

Neu CP, Reddi AH, Komvopoulos K, Schmid TM, Di Cesare PE. Increased friction coefficient and superficial zone protein expression in patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2010;62(9):2680-268

Nevitt MC, Zhang Y, Javaid MK, et al. High systemic bone mineral density increases the risk of incident knee OA and joint space narrowing, but not radiographic progression of existing knee OA: the MOST study. *Ann Rheum Dis* 2010;69:163-68.

Neybecker P, Henrionnet C, Pape E, et al. In vitro and in vivo potentialities for cartilage repair from human advanced knee osteoarthritis synovial fluid-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):329. Published 2018 Nov 28.

Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest*. 2002;109(11):1417-1427.

Nishimura K, Ueki M, Kaneto H, Hazato T. [Study of a new endogenous inhibitor of enkephalin-degrading enzymes; pharmacological function and metabolism of spinorphin]. *Masui*. 1993;42(11):1663-1670.

Nüesch E, Dieppe P, Reichenbach S, Williams S, Iff S, Jüni P. All cause and disease specific mortality in patients with knee or hip osteoarthritis: population based cohort study. *BMJ*. 2011;342:d1165. Published 2011 Mar 8.

Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost*. 2011;105 Suppl 1:S13-33.

Ocain TD, Rich DH. L-lysine thiol: a subnanomolar inhibitor of aminopeptidase B. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987;145(3):1038-1042.

O'Connor CJ, Leddy HA, Benefield HC, Liedtke WB, Guilak F. TRPV4-mediated mechanotransduction regulates the metabolic response of chondrocytes to dynamic loading. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(4):1316-1321.

O'Connor CJ, Ramalingam S, Zelenski NA, et al. Cartilage-Specific Knockout of the Mechanosensory Ion Channel TRPV4 Decreases Age-Related Osteoarthritis. *Sci Rep*. 2016;6:29053.

O'Cuinn G. Peptide metabolism in cytoplasm of brain cells. *Biochem Soc Trans*. 1998;26(3):279-292.

Oguchi T, Ishiguro N. Differential stimulation of three forms of hyaluronan synthase by TGF-beta, IL-1beta, and TNF-alpha. *Connect Tissue Res*. 2004;45(4-5):197-205

O'Leary RM, Gallagher SP, O'Connor B. Purification and characterization of a novel membrane-bound form of prolyl endopeptidase from bovine brain. *Int J Biochem Cell Biol.* 1996;28(4):441-449. doi:10.1016/1357-2725(95)00154-9

Oliveira Silva M, Gregory JL, Ansari N, Stok KS. Molecular Signaling Interactions and Transport at the Osteochondral Interface: A Review. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:750.

Oliviero F, Galozzi P, Ramonda R, et al. Unusual Findings in Synovial Fluid Analysis: A Review. *Ann Clin Lab Sci.* 2017;47(3):253-259.

OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man. AMINOPEPTIDASE, PUROMYCIN-SENSITIVE; NPEPPS [<https://omim.org/entry/606793>]

Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science.* 1977;196(4288):441-444. doi:10.1126/science.191908

O'Rawe M, Kilmister EJ, Mantamadiotis T, Kaye AH, Tan ST, Wickremesekera AC. The Renin-Angiotensin System in the Tumor Microenvironment of Glioblastoma. *Cancers (Basel).* 2021;13(16):4004. Published 2021 Aug 9. doi:10.3390/cancers13164004

Orcajo B, Muruzabal F, Isasmendi MC, et al. The use of plasma rich in growth factors (PRGF-En-doret) in the treatment of a severe mal perforant ulcer in the foot of a person with diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;93(2):e65-67.

Orellana C, Calvet J, Berenguer-Llargo A, et al. Synovial Adiponectin Was More Associated with Clinical Severity than Synovial Leptin in Women with Knee Osteoarthritis. *Cartilage.* 2021;13(1_suppl):1675S-1683S.

Orita S, Koshi T, Mitsuka T, et al. Associations between proinflammatory cytokines in the synovial fluid and radiographic grading and pain-related scores in 47 consecutive patients with osteoarthritis of the knee. *BMC Musculoskelet Disord.* 2011;12:144. Pu

Osada T, Ikegami S, Takiguchi-Hayashi K, et al. Increased anxiety and impaired pain response in puromycin-sensitive aminopeptidase gene-deficient mice obtained by a mouse gene-trap method. *J Neurosci.* 1999;19(14):6068-6078

Osana S, Kitajima Y, Suzuki N, et al. Puromycin-sensitive aminopeptidase is required for C2C12 myoblast proliferation and differentiation. *J Cell Physiol.* 2021;236(7

Palazzo C, Ravaud JF, Papelard A, Ravaud P, Poiraudou S. The burden of musculoskeletal conditions. *PLoS One.* 2014;9(3):e90633. Published 2014 Mar 4.

Pan CC, Chen PC, Ho DM. The diagnostic utility of MOC31, BerEP4, RCC marker and CD10 in the classification of renal cell carcinoma and renal oncocytoma: an immunohistochemical analysis of 328 cases. *Histopathology.* 2004;45(5):452-459. doi:10.1111/j.1365-2

Papathanasiou I, Malizos KN, Tsezou A. Bone morphogenetic protein-2-induced Wnt/ β -catenin signaling pathway activation through enhanced low-density-lipoprotein receptor-related protein 5 catabolic activity contributes to hypertrophy in osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(2):R82. Published 2012 Apr 18. doi:10.1186/ar3805

Parker BL, Thaysen-Andersen M, Fazakerley DJ, Holliday M, Packer NH, James DE. Terminal Galactosylation and Sialylation Switching on Membrane Glycoproteins upon TNF-Alpha-Induced Insulin Resistance in Adipocytes. *Mol Cell Proteomics.* 2016;15(1):141-153.

Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev.* 2006;86(3):747-803.

Pauls K, Metzger R, Steger K, Klonisch T, Danilov S, Franke FE. Isoforms of angiotensin I-converting enzyme in the development and differentiation of human testis and epididymis. *Andrologia.* 2003;35(1):32-43. doi:10.1046/j.1439-0272.2003.00535.x

Payan DG, Goetzl EJ., Modulation of lymphocyte function by sensory neuropeptides. *J Immunol.* 1985;135(2 Suppl):783s-786s.

Peat G, Thomas E, Duncan R, Wood L, Hay E, Croft P. Clinical classification criteria for knee osteoarthritis: performance in the general population and primary care. *Ann Rheum Dis.* 2006;65(10):1363-1367.

Pereira D, Peleteiro B, Araújo J, Branco J, Santos RA, Ramos E. The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011;19(11):1270-85.

Pérez I, Varona A, Blanco L, et al. Increased APN/CD13 and acid aminopeptidase activities in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2009;31(10):1335-1340. doi:10.1002/hed.21099

Pérez-García S, Juarranz Y, Carrión M, et al. Mapping the CRF-urocortins system in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts: effect of vasoactive intestinal peptide. *J Cell Physiol.* 2011;226(12):3261-3269.

Pinto FM, Almeida TA, Hernandez M, Devillier P, Advenier C, Candenas ML: mRNA expression of tachykinins and tachykinin receptors in different human tissues. *Eur J Pharmacol* 2004, 494(2-3):233-239

Pitsillou E, Bresnehan SM, Kagarakis EA, et al. The cellular and molecular basis of major depressive disorder: towards a unified model for understanding clinical depression. *Mol Biol Rep.* 2020;47(1):753-770.

Polgár L. The prolyl oligopeptidase family. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(2):349-362. doi:10.1007/s00018-002-8427-5

Pozgan U, Caglic D, Rozman B, Nagase H, Turk V, Turk B. Expression and activity profiling of selected cysteine cathepsins and matrix metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Biol Chem*. 2010;391(5):5

Presle N, Pottie P, Dumond H, et al. Differential distribution of adipokines between serum and synovial fluid in patients with osteoarthritis. Contribution of joint tissues to their articular production. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14(7):690-695.

Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14(1):13-29

Pritzker KP, Ostergaard K, Salter DM. Towards standardization of osteoarthritis histopathology: terminology, topology and technology. *Osteoarthritis Cartilage*. 2000;8(Suppl B):IP010.

Pro B, Dang NH. CD26/dipeptidyl peptidase IV and its role in cancer. *Histol Histopathol*. 2004;19(4):1345-1351

Proost P, Mortier A, Loos T, et al. Proteolytic processing of CXCL11 by CD13/aminopeptidase N impairs CXCR3 and CXCR7 binding and signaling and reduces lymphocyte and endothelial cell migration. *Blood*. 2007;110(1):37-44

Puertas MC, Martínez-Martos JM, Cobo M, et al. Plasma renin-angiotensin system-regulating aminopeptidase activities are modified in early stage Alzheimer's disease and show gender differences but are not related to apolipoprotein E genotype. *Exp Gerontol*. 2013;48(6):557-564.

Raeissadat SA, Rayegani SM, Babae M, Ghorbani E. The effect of platelet-rich plasma on pain, function, and quality of life of patients with knee osteoarthritis. *Pain Res Treat*. 2013;2013:165967. doi:10.1155/2013/165967.

Raffaelli W, Malafoglia V, Bonci A, et al. Identification of MOR-Positive B Cell as Possible Innovative Biomarker (Mu Lympho-Marker) for Chronic Pain Diagnosis in Patients with Fibromyalgia and Osteoarthritis Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(4):1499.

Rahmati M, Nalesso G, Mobasheri A, Mozafari M. Aging and osteoarthritis: Central role of the extracellular matrix. *Ageing Res Rev*. 2017;40:20-30

Rai MF, Sandell LJ, Barrack TN, et al. A Microarray Study of Articular Cartilage in Relation to Obesity and Severity of Knee Osteoarthritis. *Cartilage*. 2020;11(4):458-472.

Ramírez-Expósito MJ, Martínez JM, Prieto I, Alba F, Ramírez M. Comparative distribution of glutamyl and aspartyl aminopeptidase activities in mouse organs. *Horm Metab Res*. 2000;32(5):161-163.

Ramírez-Expósito MJ, Martínez-Martos JM. Anti-Inflammatory and Antitumor Effects of Hydroxytyrosol but Not Oleuropein on Experimental Glioma In Vivo. A Putative Role for the Renin-Angiotensin System. *Biomedicines*. 2018;6(1):11. Published 2018 Jan 26. doi:

Ramírez-Sánchez M, Prieto I, Wangensteen R, et al. The renin-angiotensin system: new insight into old therapies. *Curr Med Chem*. 2013;20(10):1313-1322..

Ramon MO, 2011. *Estudio de la actividad aminopeptidasica en espermatozoides astenozoospermicos. Comparación clinica*. Departamento de Fisiología. Universidad del Pais Vasco. Tesis doctoral.

Ranjbar R, Shafiee M, Hesari A, Ferns GA, Ghasemi F, Avan A. The potential therapeutic use of renin-angiotensin system inhibitors in the treatment of inflammatory diseases. *J Cell Physiol*. 2019;234(3):2277-2295. doi:10.1002/jcp.27205

Rasheed Z, Akhtar N, Haqqi TM. Advanced glycation end products induce the expression of interleukin-6 and interleukin-8 by receptor for advanced glycation end product-mediated activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B in human osteoarthritis chondrocytes. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50(5):838-851.

Ravaud JF, Papelard A, Ravaud P, Poiraudeau S. The burden of musculoskeletal conditions. *PLoS One*. 2014;9(3):e90633. Published 2014 Mar 4.

Rawlings ND, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidases. *Biochem J*. 1993;290 (Pt 1)(Pt 1):205-218.

Re RN. Intracellular renin and the nature of intracrine enzymes. *Hypertension*. 2003;42(2):117-122.

Re RN. Tissue renin angiotensin systems. *Med Clin North Am*. 2004;88(1):19-38. doi:10.1016/s0025-7125(03)00124-

Reaux A, Iturrioz X, Vazeux G, et al. Aminopeptidase A, which generates one of the main effector peptides of the brain renin-angiotensin system, angiotensin III, has a key role in central control of arterial blood pressure. *Biochem Soc Trans*. 2000;28(4):4

Recklies AD, Baillargeon L, White C. Regulation of cartilage oligomeric matrix protein synthesis in human synovial cells and articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 1998;41(6):997-1006.

Relton JM, Gee NS, Matsas R, Turner AJ, Kenny AJ. Purification of endopeptidase-24.11 ('enkephalinase') from pig brain by immunoabsorbent chromatography. *Biochem J*. 1983;215(3):519-523. doi:10.1042/bj2150519

Ren G, Ma Z, Hui M, Kudo LC, Hui KS, Karsten SL. Cu, Zn-superoxide dismutase 1 (SOD1) is a novel target of Puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA/NPEPPS): PSA/NPEPPS is a possible modifier of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurodegener*. 2011;6:29. Pu

Retting KN, Song B, Yoon BS, Lyons KM. BMP canonical Smad signaling through Smad1 and Smad5 is required for endochondral bone formation. *Development*. 2009;136(7):1093-1104. doi:10.1242/dev.029926

Rhee DK, Marcelino J, Baker M, et al. The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *J Clin Invest*. 2005;115(3):622-631.

Ridley MG, Payani GS, Nicholas NS, Murphy J. Mechanism of macrophage activation in rheumatoid arthritis: The role of gamma interferón. *Clin Exper Immunol* 1986, 63: 587-93)

Riemann D, Schwachula A, Hentschel M, Langner J. Demonstration of CD13/aminopeptidase N on synovial fluid T cells from patients with different forms of joint effusions. *Immunobiology*. 1993;187(1-2):24-35

Rodríguez Gallego MV, Aparicio Prieto MV, Leza Garcia A, Hernández Hernández J, Arizaleta Uralde JA, Casis Saenz L. Renin-angiotensin and enkephalin peptide metabolism in human follicular fluid. *Int J Reprod Biomed*, 2022 en prensa

Roemer FW, Guermazi A, Felson DT, et al. Presence of MRI-detected joint effusion and synovitis increases the risk of cartilage loss in knees without osteoarthritis at 30-month follow-up: the MOST study. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(10):1804-1809

Rogers EL, Reynard LN, Loughlin J. The role of inflammation-related genes in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(11):1933-8.

Romera E, Perena MJ, Perena MF and Rodrigo MD. Neurophysiology of pain. *Rev Soc Esp Dolor* 2000;7:Supl. II, 11-17.

Romero CA, Orias M, Weir MR. Novel RAAS agonists and antagonists: clinical applications and controversies. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(4):242-252. doi:10.1038/nrendo.2015.6.

Roméu C, Irazusta J, Casis L. The role of peptidases in (in) fertility. *MOJ Anat & Physiol*. 2018;5(2):110-115

Romeu C, Perez I, Irazusta J, Agirregoitia E, Sanz B, Valdivia A, Casis L. Peptide Metabolism is Altered in the Follicular Fluid of Patients with Various Reproductive Pathologies. *Infotxt J of Reprductv Med* 2020;01(01):1-9.

Roques BP, Beaumont A. Neutral endopeptidase-24.11 inhibitors: from analgesics to antihypertensives?. *Trends Pharmacol Sci*. 1990;11(6):245-249. doi:10.1016/0165-6147(90)90252-4

Roques BP, Fournié-Zaluski MC, Wurm M. Inhibiting the breakdown of endogenous opioids and cannabinoids to alleviate pain. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(4):292-310

Roques BP, Noble F, Daugé V, Fournié-Zaluski MC, Beaumont A. Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1993;45(1):87-146.

Rosenthal AK. Crystals, inflammation, and osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2011;23(2):170-173. doi:10.1097/BOR.0b013e3283432d1f.

Royea J, Hamel E. Brain angiotensin II and angiotensin IV receptors as potential Alzheimer's disease therapeutic targets. *Geroscience*. 2020;42(5):1237-1256

Ruiz-Ortega M, Esteban V, Egido J. The regulation of the inflammatory response through nuclear factor-kappaB pathway by angiotensin IV extends the role of the renin angiotensin system in cardiovascular diseases. *Trends Cardiovasc Med*. 2007;17(1):19-25. doi:10.1016/j.joca.2012.05.014.

Ruiz-Romero C, Blanco FJ. Proteomics role in the search for improved diagnosis, prognosis and treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(4):500-509.

Rutherford DJ, Hubley-Kozey CL, Stanish WD. Knee effusion affects knee mechanics and muscle activity during gait in individuals with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20(9):974-981. doi:10.1016/j.joca.2012.05.014.

Rutherford DJ. Intraarticular pressures and joint mechanics: Should we pay attention to effusion in knee osteoarthritis? *Medical Hypotheses* 2014;83:292-295.

Rys JP, Monteiro DA, Alliston T. Mechanobiology of TGF β signaling in the skeleton. *Matrix Biol*. 2016;52-54:413-425

Saito T, Koshino T. Distribution of neuropeptides in synovium of the knee with osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*. 2000;(376):172-182

Sanchez C, Deberg M, Bellahcene A. Phenotypic characterization of osteoblasts from sclerotic zones of osteoarthritic subchondral bone. *Arthritis Rheum*. 2008 58,442-455.

Sanchez C, Deberg MA, Piccardi N. Subchondral bone osteoblasts induce phenotypic changes in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2005 13,988-997

Sanchez C, Pesesse L, Gabay O, et al. Regulation of subchondral bone osteoblast metabolism by cyclic compression. *Arthritis Rheum*. 2012;64(4):1193-1203

Sanchez M, Anitua E, Azofra J, Aguirre JJ, Andia I. Intra-articular injection of an autologous preparation rich in growth factors for the treatment of knee OA: a retrospective cohort study. *Clin Exp Rheumatol*. 2008;26(5):910-913.

Sanchez M, Anitua E, Azofra J, Andia I, Padilla S, Mujika I. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med*. 2007;35(2):245-251.

Sanchez M, Anitua E, Orive G, Mujika I, Andia I. Platelet-rich therapies in the treatment of or- thopaedic sport injuries. *Sports Med*. 2009;39(5):345-354.

Sánchez M, Delgado D, Pompei O, Pérez JC, Sánchez P, Garate A, et al. Treating severe knee osteoarthritis with combination of intra-osseous and intra-articular infiltrations of platelet-rich plasma: an observational study. *Cartilage* 2019;10:245-253.

Sanchez M, Fiz N, Azofra J, et al. A randomized clinical trial evaluating plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) versus hyaluronic acid in the short-term treatment of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthroscopy*. 2012;28(8):1070-1078.

Sánchez M, Fiz N, Guadilla J. Intraosseous infiltration of platelet-rich plasma for severe knee osteoarthritis. *Arthrosc Tech*. 2014;3(6):e713-7.

Sanderink GJ, Artur Y, Schiele F, Gueguen R, Siest G. Alanine aminopeptidase in serum: biological variations and reference limits. *Clin Chem*. 1988;34(7):1422-1426.

Sanz B, Perez I, Beitia M, et al. Aminopeptidase N activity predicts 5-year survival in colorectal cancer patients. *J Investig Med*. 2015;63(5):740-746.

Saxne T, Heinegård D. Cartilage oligomeric matrix protein: a novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood. *Br J Rheumatol*. 1992;31(9):583-591.

Scanzello CR, Goldring SR. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone*. 2012;51(2):249-257. doi:10.1016/j.bone.2012.02.012

Scanzello CR, Plaas A, Crow MK. Innate immune system activation in osteoarthritis: is osteoarthritis a chronic wound?. *Curr Opin Rheumatol*. 2008;20(5):565-572. doi:10.1097/BOR.0b013e32830aba34

Schall TJ, Bacon K, Camp RPD, Kaspari JW, Goeddel DV. Human macrophage inflammatory protein 1-a (MIP-1a) and MIP-1b chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *J Exp Med* 1993, 177: 1821-5

Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV. Selective attraction of monocytes and T-lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 1990, 347: 660-71

Schell J, Scofield RH, Barrett JR, et al. Strawberries Improve Pain and Inflammation in Obese Adults with Radiographic Evidence of Knee Osteoarthritis. *Nutrients*. 2017;9(9):949. Published 2017 Aug 28. doi:10.3390/nu9090949

Schroepfel JP, Crist JD, Anderson HC, Wang J. Molecular regulation of articular chondrocyte function and its significance in osteoarthritis. *Histol Histopathol*. 2011 Mar;26(3):377-94.

Schumacher HR Jr, Sieck MS, Rothfuss S, Clayburne GM, Baumgarten DF, Mochan BS, Kant JA. Reproducibility of synovial fluid analyses. A study among four laboratories. *Arthritis Rheum*. 1986;29(6):770-4. doi: 10.1002/art.1780290610.

Seco-Calvo J, Sánchez-Herráez S, Casis L, Valdivia A, Perez-Urzelai J, Gil J, Echevarría E. Synovial fluid peptidase activity as a biomarker for knee osteoarthritis clinical progression. *Bone Joint Res*. 2020;9(11):789-797. doi: 10.1302/2046-3758.911.BJR-

Sedo A, Duke-Cohan J.S, Balaziová E. et al. Dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologs: Contributing factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis? *Arthritis Res Ther*. 2005;7:253. <https://doi.org/10.1186/ar1852>

Segarra AB, Prieto I, Banegas I, et al. The Type of Fat in the Diet Influences the Behavior and the Relationship Between Cystinyl and Alanyl Aminopeptidase Activities in Frontal Cortex, Liver, and Plasma. *Front Mol Biosci.* 2020;7:94. Published 2020 May 15

Segarra AB, Prieto I, Martinez-Canamero M, et al. Enkephalinase activity is modified and correlates with fatty acids in frontal cortex depending on fish, olive or coconut oil used in the diet. *Endocr Regul.* 2019;53(2):59-64.

Sekar S, Crawford R, Xiao Y, Prasadam I. Dietary Fats and Osteoarthritis: Insights, Evidences, and New Horizons. *J Cell Biochem.* 2017;118(3):453-463.

Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6(11):625-635

Senzel L, Gnatenko DV, Bahou WF: The platelet proteome. *Curr Opin Hematol* 2009, 5:329–333.

Sevalle J, Amoyel A, Robert P, Fournié-Zaluski MC, Roques B, Checler F. Aminopeptidase A contributes to the N-terminal truncation of amyloid beta-peptide. *J Neurochem.* 2009;109(1):248-256.

Sharma L, Chmiel JS, Almagor O, et al. The role of varus and valgus alignment in the initial development of knee cartilage damage by MRI: the MOST study. *Ann Rheum Dis* 2013;72:235-240.

Shen H, Aeschlimann A, Reisch N, et al. Kappa and delta opioid receptors are expressed but down-regulated in fibroblast-like synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2005;52(5):1402-1410. doi:10.1002/art.2114

Shen H, Sprott H, Aeschlimann A, et al. Analgesic action of acetaminophen in symptomatic osteoarthritis of the knee. *Rheumatology (Oxford).* 2006;45(6):765-770.

Shen L, Yuan T, Chen S, Xie X, Zhang C. The temporal effect of platelet-rich plasma on pain and physical function in the treatment of knee osteoarthritis: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Orthop Surg Res.* 2017;12(1):1

Shen P, Zhu Y, Zhu L, Weng F, Li X, Xu Y. Oxidized low density lipoprotein facilitates tumor necrosis factor- α mediated chondrocyte death via autophagy pathway. *Mol Med Rep.* 2017;16(6):9449-9456. doi:10.3892/mmr.2017.7786.

Shim JS, Kim JH, Cho HY, et al. Irreversible inhibition of CD13/aminopeptidase N by the antiangiogenic agent curcumin. *Chem Biol.* 2003;10(8):695-704

Shimada K, Takahashi M, Turner AJ, Tanzawa K. Rat endothelin-converting enzyme-1 forms a dimer through Cys412 with a similar catalytic mechanism and a distinct substrate binding mechanism compared with neutral endopeptidase-24.11. *Biochem J.* 1996;315 (Pt

Shimizu T, Tani K, Hase K, Ogawa H, Huang L, Shinomiya F, Sone S. . CD13/Aminopeptidase N-Induced lymphocyte involvement in inflamed joint of patient with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002 Sep;46(9):2330-2338.

Shworak NW. Angiogenic modulators in valve development and disease: does valvular disease recapitulate developmental signaling pathways? *Curr Opin Cardiol.* 2004;19(2):140-146. doi:10.1097/00001573-200403000-00013

Si HB, Zeng Y, Liu SY, Zhou ZK, Chen YN, Cheng JQ, Lu YR, Shen B. Intra-articular injection of microRNA-140 (miRNA-140) alleviates osteoarthritis (OA) progression by modulating extracellular matrix (ECM) homeostasis in rats. *Osteoarthritis Cartilage.* 2017

Silveira PF, Gil J, Casis L, Irazusta J: Peptide metabolism and the control of body fluid homeostasis. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents.* 2004;2(3):219-38.

Silverwood V, Blagojevic-Bucknall M, Jinks C, Jordan JL, Protheroe J, Jordan KP. Current evidence on risk factors for knee osteoarthritis in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2015;23(4):507-515.

Silvestre MP, Rodrigues AM, Canhão H, et al. Cross-Talk between Diet-Associated Dysbiosis and Hand Osteoarthritis. *Nutrients.* 2020;12(11):3469. Published 2020 Nov 12

Simões e Silva AC, Silveira KD, Ferreira AJ, Teixeira MM. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *Br J Pharmacol.* 2013;169(3):477-492. doi:10.1111/bph.12159

Simopoulou T, Malizos KN, Iliopoulos D, et al. Differential expression of leptin and leptin's receptor isoform (Ob-Rb) mRNA between advanced and minimally affected osteoarthritic cartilage; effect on cartilage metabolism. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007;15

Singh J, Naran A, Misso NL, Rigby PJ, Thompson PJ, Bhoola KD. Expression of kallikrein-related peptidases (KRP/hK5, 7, 6, 8) in subtypes of human lung carcinoma. *Int Immunopharmacol.* 2008;8(2):300-306. doi:10.1016/j.intimp.2007.08.015

Sjöström H, Norén O, Olsen J. Structure and function of aminopeptidase N. *Adv Exp Med Biol.* 2000;477:25-34

Skou ST, Koes BW, Grønne DT, Young J, Roos EM. Comparison of three sets of clinical classification criteria for knee osteoarthritis: a cross-sectional study of 13,459 patients treated in primary care. *Osteoarthritis Cartilage.* 2020;28(2):167-172.

Sociedad Española Reumatología. [www.ser.es]

Söderling E. A rapid and simple method for purification of the chloride-activated arginine aminopeptidase from biological materials. *Prep Biochem.* 1980;10(2):191-203. doi:10.1080/00327488008061734

Sohn R, Rösch G, Junker M, Meurer A, Zaucke F, Jenei-Lanzl Z. Adrenergic signalling in osteoarthritis. *Cell Signal.* 2021;82:109948.

Solan NJ, Ward PE, Sanders SP, Towns MC, Bathon JM. Soluble recombinant neutral endopeptidase (CD10) as a potential antiinflammatory agent. *Inflammation*. 1998;22(1):107-121. doi:10.1023/a:1022304025789

Sousa-Valente J, Brain SD. A historical perspective on the role of sensory nerves in neurogenic inflammation. *Semin Immunopathol*. 2018;40(3):229-236

Sowers MR, Karvonen-Gutierrez CA. The evolving role of obesity in knee osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2010;22(5):533-537.

Spitsin S, Meshki J, Winters A, Tuluc F, Benton TD, Douglas SD. Substance P-mediated chemokine production promotes monocyte migration. *J Leukoc Biol*. 2017;101(4):967-973.

Sreedharan SP, Goetzl EJ, Malfroy B. Elevated synovial tissue concentration of the common acute lymphoblastic leukaemia antigen (CALLA)-associated neutral endopeptidase (3.4.24.11) in human chronic arthritis. *Immunology*. 1990;71(1):142-144.

Subirán N, Casis L, Irazusta J. Regulation of male fertility by the opioid system. *Mol Med*. 2011;17(7-8):846-853..

Subirán N.; Agirregoitia E.; Valdivia A.; Ochoa C.; Casis L. and Irazusta J. Expression of enkephalin-degrading enzymes in human semen and implications for sperm motility. *Fertil Steril*. 2008;89(5):1571-1577.

Suda H, Aoyagi T, Takeuchi T, Umezawa H. Inhibition of aminopeptidase B and leucine aminopeptidase by bestatin and its stereoisomer. *Arch Biochem Biophys*. 1976;177(1):196-200.

Sundman EA, Cole BJ, Fortier LA. Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the cellular composition of platelet-rich plasma. *Am J Sports Med*. 2011;39(10):2135-2140. doi:10.1177/0363546511417792

Sundman EA, Cole BJ, Karas V, et al. The anti-inflammatory and matrix restorative mechanisms of platelet-rich plasma in osteoarthritis. *Am J Sports Med*. 2014;42(1):35-41. doi:10.1177/0363546513507766.

Sutton S, Clutterbuck A, Harris P, et al. The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *Vet J*. 2009;179(1):10-24.

Suzuki M, Asplund T, Yamashita H, Heldin CH, Heldin P. Stimulation of hyaluronan biosynthesis by platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor-beta 1 involves activation of protein kinase C. *Biochem J*. 1995;307(Pt 3)(Pt 3):817-821.

Swann DA, Silver FH, Slayter HS, Stafford W, Shore E. The molecular structure and lubricating activity of lubricin isolated from bovine and human synovial fluids. *Biochem J*. 1985;225(1):195-201.

Szeltner Z, Polgár L. Structure, function and biological relevance of prolyl oligopeptidase. *Curr Protein Pept Sci*. 2008;9(1):96-107. doi:10.2174/138920308783565723

Tanaka S, Murakami T, Nonaka N, Ohnuki T, Yamada M, Sugita T. Anti-arthritic effects of the novel dipeptidyl peptidase IV inhibitors TMC-2A and TSL-225. *Immunopharmacology*. 1998;40(1):21-26. doi:10.1016/s0162-3109(98)00014-9

Tang Y, Hu X, Lu X. Captopril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, possesses chondroprotective efficacy in a rat model of osteoarthritis through suppression local renin-angiotensin system. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(8):12584-12592. Published 2015

Tanioka T, Hattori A, Masuda S, et al. Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase. The third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases. *J Biol Chem*. 2003;278(34):32275-32283.

Tarner IH, Härle P, Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S. The different stages of synovitis: acute vs chronic, early vs late and non-erosive vs erosive. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2005;19(1):19-35. doi:10.1016/j.berh.2004.08.002

Taub DD, Proost P, Murphy WJ, Anver M, Longo DL, van Damme J. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes. *J Clin Invest* 1995, 95: 1370-6

Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT. The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med*. 2003;348(12):1134-1149.

Taylor A (a). Aminopeptidases: structure and function. *FASEB J*. 1993;7(2):290-298.

Taylor A (b). Aminopeptidases: towards a mechanism of action. *Trends Biochem Sci*.1993;18(5):167-171

Thomas S, Browne H, Mobasheri A, Rayman MP. What is the evidence for a role for diet and nutrition in osteoarthritis?. *Rheumatology (Oxford)*. 2018;57(suppl_4):iv61-iv74.

Thorek DL, Evans MJ, Carlsson SV, Ulmert D, Lilja H. Prostate-specific kallikrein-related peptidases and their relation to prostate cancer biology and detection. Established relevance and emerging roles. *Thromb Haemost*. 2013;110(3):484-492. doi:10.1160/TH

Thyssen S, Luyten FP, Lories RJ. Targets, models and challenges in osteoarthritis research. *Dis Model Mech*. 2015;8(1):17-30. doi:10.1242/dmm.016881

Timur UT, Jahr H, Anderson J, et al. Identification of tissue-dependent proteins in knee OA synovial fluid. *Osteoarthritis Cartilage*. 2021;29(1):124-133.

Tiruppathi C, Ganapathy V, Leibach FH. Evidence for tripeptide-proton symport in renal brush border membrane vesicles. Studies in a novel rat strain with a genetic absence of dipeptidyl peptidase IV. *J Biol Chem*. 1990;265(4):2048-2053.

Tobler AR, Constam DB, Schmitt-Gräff A, Malipiero U, Schlapbach R, Fontana A. Cloning of the human puromycin-sensitive aminopeptidase and evidence for expression in neurons. *J Neurochem*. 1997;68(3):889-897.

Traficante LJ, Rotrosen J, Siekierski J, Tracer H, Gershon S. Enkephalin inactivation by N-terminal tyrosine cleavage: purification and partial characterization of a highly specific enzyme from human brain. *Life Sci.* 1980;26(20):1697-1706

Trellu S, Courties A, Jaisson S, et al. Impairment of glyoxalase-1, an advanced glycation end-product detoxifying enzyme, induced by inflammation in age-related osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2019;21(1):18

Tsai JC, Casteneda G, Lee A, et al. Identification and Characterization of the Intra-Articular Microbiome in the Osteoarthritic Knee. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):8618

Tsukamoto I, Akagi M, Inoue S, Yamagishi K, Mori S, Asada S. Expressions of local renin-angiotensin system components in chondrocytes. *Eur J Histochem.* 2014;58(2):2387. Published 2014 Apr 23. doi:10.4081/ejh.2014.2387.

Tsukamoto I, Inoue S, Teramura T, Takehara T, Ohtani K, Akagi M. Activating types 1 and 2 angiotensin II receptors modulate the hypertrophic differentiation of chondrocytes. *FEBS Open Bio.* 2013;3:279-284. Published 2013 Jul 4. doi:10.1016/j.fob.2013.07.00

Vainio U. Leucineaminopeptidase in rheumatoid arthritis. Localization in subchondral bone and in synovial fluid cells. *Ann Rheum Dis.* 1970;29(4):434-438

Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654-659.

Valdivia A, Irazusta J, Fernández D, Múgica J, Ochoa C, et al. Pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase in human semen: increased activity in necrozoospermia. *Regul Peptides* 2004; 122: 79–84.

Valencia-Sánchez L, Almendra-Pegueros R, R-Valdez LJD, Esmer-Sánchez D, Medina Ú, Gordillo-Moscoso A. DPP-4 as a Possible Biomarker of Inflammation Before Abdominal Surgery for Chronic Pathology: Our Experience with Elective Cholecystectomy. *Medicina (Kaunas).* 2019;55(5):148. Published 2019 May 16. doi:10.3390/medicina55050148.

Van de Vyver A, Clockaerts S, van de Lest CHA, et al. Synovial Fluid Fatty Acid Profiles Differ between Osteoarthritis and Healthy Patients. *Cartilage.* 2020;11(4):473-478.

van den Bosch MH, Blom AB, Sloetjes AW, et al. Induction of Canonical Wnt Signaling by Synovial Overexpression of Selected Wnts Leads to Protease Activity and Early Osteoarthritis-Like Cartilage Damage. *Am J Pathol.* 2015;185(7):1970-1980.

van den Bosch MH, Gleissl TA, Blom AB, van den Berg WB, van Lent PL, van der Kraan PM. Wnts talking with the TGF- β superfamily: WISPers about modulation of osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2016;55(9):1536-1547.

van Osch GJ, Bernsen MR, van Buul GM, Koevoet WL, Kops N, Bos PK, Verhaar JA, Weinans H: Platelet-rich plasma releasate inhibits inflammatory processes in osteoarthritic chondrocytes. *Am J Sports Med* 2011, 39:2362–2370.

Van Spil WE, Kubassova O, Boesen M, Bay-Jensen AC, Mobasheri A. Osteoarthritis phenotypes and novel therapeutic targets. *Biochem Pharmacol.* 2019;165:41-48.

Vangsness CT Jr, Burke WS, Narvy SJ, MacPhee RD, Fedenko AN. Human knee synovial fluid cytokines correlated with grade of knee osteoarthritis--a pilot study. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2011;69(2):122-127.

Varela-Eirin M, Loureiro J, Fonseca E, Corrochano S, Caeiro JR, Collado M, Mayan MD. Cartilage regeneration and ageing: Targeting cellular plasticity in osteoarthritis. *Ageing Res Rev.* 2018 Mar;42:56-71.

Varona A, Blanco L, López JI, et al. Altered levels of acid, basic, and neutral peptidase activity and expression in human clear cell renal cell carcinoma. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(2):F780-F788.

Velez JC, Ryan KJ, Harbeson CE, et al. Angiotensin I is largely converted to angiotensin (1-7) and angiotensin (2-10) by isolated rat glomeruli. *Hypertension.* 2009;53(5):790-797. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.128819.

Veronese N, Stubbs B, Noale M, et al. Adherence to a Mediterranean diet is associated with lower prevalence of osteoarthritis: Data from the osteoarthritis initiative. *Clin Nutr.* 2017;36(6):1609-1614.

Vickers C, Hales P, Kaushik V, et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 2002;277(17):14838-14843.

Villapol S, Saavedra JM. Neuroprotective effects of angiotensin receptor blockers. *Am J Hypertens.* 2015;28(3):289-299.,

Villarejo-Díaz M, Murillo-Zaragoza JR, Alvarado-Hernández H. Farmacología de los agonistas y antagonistas de los receptores opioides. *Educación e Investigación Clínica* 2000;1 (2): 106-137.

Vina ER, Kwok CK. Epidemiology of osteoarthritis: literature update. *Curr Opin Rheumatol.* 2018;30(2):160-167.

Visser AW, Ioan-Facsinay A, de Mutsert R, et al. Adiposity and hand osteoarthritis: the Netherlands Epidemiology of Obesity study. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(1):R19. Published 2014 Jan 22.

Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 [published correction appears in *Lancet.* 2013 Feb 23;381(9867):628. AlMazroa, Mohammad A [added]; Memish, Ziad A [added]]. *Lancet.* 2012;380(9859):2163-2196

Waksman G, Bouboutou R, Devin J, et al. In vitro and in vivo effects of ketatorphan on enkephalin metabolism in rodent brain. *Eur J Pharmacol.* 1985;117(2):233-243. doi:10.1016/0014-2999(85)90608-9

Wallis MG, Lankford MF, Keller SR. Vasopressin is a physiological substrate for the insulin-regulated aminopeptidase IRAP. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293(4):E1092-E1102.

Walsh DA, Mapp PI, Wharton J, Polak JM, Blake DR. Neuropeptide degrading enzymes in normal and inflamed human synovium. *Am J Pathol.* 1993;142(5):1610-1621

Walter R, Shlank H, Glass JD, Schwartz IL, Kerenyi TD. Leucylglycinamide released from oxytocin by human uterine enzyme. *Science.* 1971;173(3999):827-829. doi:10.1126/science.173.3999.827

Wang A, Chu H, Jin Z, Gong Z, Jia Q, Zhu B. ENPEP as a potential predictor of immune checkpoint inhibitor efficacy. *Cancer Med.* 2022;11(3):880-887. doi:10.1002/cam4.4475.

Wang H, Zhang X, He JY, et al. Increasing expression of substance P and calcitonin gene-related peptide in synovial tissue and fluid contribute to the progress of arthritis in developmental dysplasia of the hip. *Arthritis Res Ther.* 2015;17(1):4. Published

Wang J, Liang J, Yao J, et al. Meta-analysis of clinical trials focusing on hypertonic dextrose prolotherapy (HDP) for knee osteoarthritis [published online ahead of print, 2021 Aug 27]. *Aging Clin Exp Res.* 2021;10.1007/s40520-021-01963-3.

Wang P. Diagnostic Value of Combined Serum IL-6, TNF- α , and Leptin Levels in Patients with Post-Traumatic Osteoarthritis. *Clin Lab.* 2020;66(10):10.7754/Clin.Lab.2020.200229.

Wang PY, Caspi L, Lam CK, et al. Upper intestinal lipids trigger a gut-brain-liver axis to regulate glucose production. *Nature.* 2008;452(7190):1012-1016

Wang Q, Rozelle AL, Lepus CM, et al. Identification of a central role for complement in osteoarthritis. *Nat Med.* 2011;17(12):1674-1679.

Wang Y, Kou J, Zhang H, et al. The renin-angiotensin system in the synovium promotes periarticular osteopenia in a rat model of collagen-induced arthritis. *Int Immunopharmacol.* 2018;65:550-558. doi:10.1016/j.intimp.2018.11.001

Wang-Saegusa A, Cugat R, Ares O, Seijas R, Cusco X, Garcia-Balletbo M. Infiltration of plasma rich in growth factors for osteoarthritis of the knee short-term effects on function and quality of life. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2011;131(3):311-317.

Wegman-Ostrosky T, Soto-Reyes E, Vidal-Millán S, Sánchez-Corona J. The renin-angiotensin system meets the hallmarks of cancer. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2015;16(2):227-233. doi:10.1177/1470320313496858.

Weimershaus M, Mauvais FX, Saveanu L, et al. Innate Immune Signals Induce Anterograde Endosome Transport Promoting MHC Class I Cross-Presentation. *Cell Rep.* 2018;24(13):3568-3581.

Weinans H, Siebelt M, Agricola R, Botter SM, Piscoer TM, Waarsing JH. Pathophysiology of peri-articular bone changes in osteoarthritis. *Bone*. 2012;51(2):190-196

Welches WR, Santos RA, Chappell MC, Brosnihan KB, Greene LJ, Ferrario CM. Evidence that prolyl endopeptidase participates in the processing of brain angiotensin. *J Hypertens*. 1991;9(7):631-638. doi:10.1097/00004872-199107000-00008

Wick MJ, Minnerath SR, Lin X, Elde R, Law PY, Loh HH. Isolation of a novel cDNA encoding a putative membrane receptor with high homology to the cloned mu, delta, and kappa opioid receptors. *Brain Res Mol Brain Res*. 1994;27(1):37-44. doi:10.1016/0169-328x(

Wilk S, Wilk E, Magnusson RP. Identification of histidine residues important in the catalysis and structure of aspartyl aminopeptidase. *Arch Biochem Biophys*. 2002;407(2):176-183.

Wilk S, Wilk E, Magnusson RP. Purification, characterization, and cloning of a cytosolic aspartyl aminopeptidase. *J Biol Chem*. 1998;273(26):15961-15970.

Wilk S. *Aspartyl aminopeptidase*, en Handbook of Proteolytic Enzymes Second Edition Elsevier, 2004: pp. 937-939.

Wilkinson PC, Liew FY. Chemoattraction of human blood T lymphocytes by IL-15. *J Exp Med* 1995, 181: 1255-9

Wilkinson PC, Newman J. Identification of interleukin-8 as a locomotor attractant for activated human lymphocytes in mononuclear cultures with anti-CD3 or purified protein derivative of Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* 1992, 149: 2689-94

Williams FM, Skinner J, Spector TD, et al. Dietary garlic and hip osteoarthritis: evidence of a protective effect and putative mechanism of action. *BMC Musculoskelet Disord*. 2010;11:280. Published 2010 Dec 8.

Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:561459.

Wong AH, Zhou D, Rini JM. The X-ray crystal structure of human aminopeptidase N reveals a novel dimer and the basis for peptide processing. *J Biol Chem*. 2012;287(44):36804-36813

Wood L, Ferrell WR, Baxendale RH. Pressures in normal and acutely distended human knee joints and effects on quadriceps maximal voluntary contractions. *Q J Exp Physiol* 1988;73:305-14.

Wright JW, Harding JW. Brain renin-angiotensin--a new look at an old system. *Prog Neurobiol*. 2011;95(1):49-67.

Wu CL, Jain D, McNeill JN, et al. Dietary fatty acid content regulates wound repair and the pathogenesis of osteoarthritis following joint injury. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(11):2076-2083.

Wu S, Liu B, Yuan Z, et al. Planarian homolog of puromycin-sensitive aminopeptidase DjPsa is required for brain regeneration. *Invert Neurosci*. 2017;17(2):3.

Wu X, Wang Y, Xiao Y, Crawford R, Mao X, Prasadam I. Extracellular vesicles: Potential role in osteoarthritis regenerative medicine. *J Orthop Translat*. 2019;21:73-80. Published 2019 Dec 6.

Wysocki J, Ye M, Batlle D. Plasma and Kidney Angiotensin Peptides: Importance of the Aminopeptidase A/Angiotensin III Axis. *Am J Hypertens*. 2015;28(12):1418-1426. doi:10.1093/ajh/hpv054

Wysocki J, Ye M, Rodriguez E, et al. Targeting the degradation of angiotensin II with recombinant angiotensin-converting enzyme 2: prevention of angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension*. 2010;55(1):90-98. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.138420.

Xie L, Tintani F, Wang X, et al. Systemic neutralization of TGF- β attenuates osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci*. 2016;1376(1):53-64..

Xie W, Chen S, Strong JA, Li AL, Lewkowich IP, Zhang JM. Localized Sympathectomy Reduces Mechanical Hypersensitivity by Restoring Normal Immune Homeostasis in Rat Models of Inflammatory Pain. *J Neurosci*. 2016;36(33):8712-8725.

Xu N, Wang Y, Zhao S, et al. Naltrexone (NTX) relieves inflammation in the collagen-induced- arthritis (CIA) rat models through regulating TLR4/NF κ B signaling pathway. *Int Immunopharmacol*. 2020;79:106056. doi:10.1016/j.intimp.2019.106056

Xu X, Liu X, Yang Y, et al. Resveratrol inhibits the development of obesity-related osteoarthritis via the TLR4 and PI3K/Akt signaling pathways. *Connect Tissue Res*. 2019;60(6):571-582.

Yamagishi K, Tsukamoto I, Nakamura F, Hashimoto K, Ohtani K, Akagi M. Activation of the renin-angiotensin system in mice aggravates mechanical loading-induced knee osteoarthritis. *Eur J Histochem*. 2018;62(3):2930. Published 2018 Jul 24. doi:10.4081/ejh.20

Yamamoto M, Chikuma T, Yajima R, et al. Axonal transport of puromycin-sensitive aminopeptidase in rat sciatic nerves. *Neurosci Res*. 2002;42(2):133-140

Yamamoto Y, Kanazawa T, Shimamura M, Ueki M, Hazato T. Inhibitory effects of spinorphin, a novel endogenous regulator, on chemotaxis, O₂- generation, and exocytosis by N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP)-stimulated neutrophils. *Biochem Pharmacol*. 1997;54(6):695-701.

Yamamoto Y, Ono H, Ueda A, Shimamura M, Nishimura K, Hazato T. Spinorphin as an endogenous inhibitor of enkephalin-degrading enzymes: roles in pain and inflammation. *Curr Protein Pept Sci*. 2002;3(6):587-599.

Yamasaki SC, Mendes MT, Alponi RF, Silveira PF. Efficacy of parenteral administration of bee venom in experimental arthritis in the rat: a comparison with methotrexate. *Toxicol.* 2015;98:75-88. doi:10.1016/j.toxicol.2015.02.016

Yamasaki SC, Murari-do-Nascimento S, Silveira PF. Neutral aminopeptidase and dipeptidyl peptidase IV in the development of collagen II-induced arthritis. *Regul Pept.* 2012;173(1-3):47-54. doi:10.1016/j.regpep.2011.09.004.

Yan K, Shen Y, Azouz AA, Saleh E, Abo-Saif AA. Aliskiren, tadalafil, and cinnamaldehyde alleviate joint destruction biomarkers; MMP-3 and RANKL; in complete Freund's adjuvant arthritis model: Downregulation of IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway. *Saudi Pharm J.* 2020;28(9):1101-1111. doi:10.1016/j.jsps.2020.07.011

Yan ZH, Ren KJ, Wang Y, Chen S, Brock TA, Rege AA. Development of intramolecularly quenched fluorescent peptides as substrates of angiotensin-converting enzyme 2. *Anal Biochem.* 2003;312(2):141-147

Yang G, Zhang H, Chen T, et al. Metabolic analysis of osteoarthritis subchondral bone based on UPLC/Q-TOF-MS. *Anal Bioanal Chem.* 2016;408(16):4275-4286.

Yang P, Tan J, Yuan Z, Meng G, Bi L, Liu J. Expression profile of cytokines and chemokines in osteoarthritis patients: Proinflammatory roles for CXCL8 and CXCL11 to chondrocytes. *Int Immunopharmacol.* 2016;40:16-23.

Yang, Liang [added]; Liu, Bo [added]]. *PLoS One.* 2014;9(10):e111343. Published 2014 Oct 28. doi:10.1371/journal.pone.0111343

Yi H, Zhang W, Cui ZM, et al. Resveratrol alleviates the interleukin-1 β -induced chondrocytes injury through the NF- κ B signaling pathway. *J Orthop Surg Res.* 2020;15(1):424. Published 2020 Sep 18.

Yuan XL, Meng HY, Wang YC, et al. Bone-cartilage interface crosstalk in osteoarthritis: potential pathways and future therapeutic strategies. *Osteoarthritis Cartilage.* 2014;22(8):1077-1089.

Yudoh K, Nguyen vT, Nakamura H, Hongo-Masuko K, Kato T, Nishioka K. Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(2):R380-91.

Yusuf E, Kortekaas MC, Watt I, et al.. Do knee abnormalities visualised on MRI explain knee pain in knee osteoarthritis? A systematic review. *Ann Rheum Dis.* 2011;70:60-67

Zaidan I, Tavares LP, Sugimoto MA, et al. Angiotensin-(1-7)/MasR axis promotes migration of monocytes/macrophages with a regulatory phenotype to perform phagocytosis and efferocytosis. *JCI Insight.* 2022;7(1):e147819. Published 2022 Jan 11. doi:10.1172/jci

Zhang G, Zhang H, You W, Tang X, Li X, Gong Z. Therapeutic effect of Resveratrol in the treatment of osteoarthritis via the MALAT1/miR-9/NF- κ B signaling pathway. *Exp Ther Med*. 2020;19(3):2343-2352.

Zhang H, Shao Y, Yao Z, et al. Mechanical overloading promotes chondrocyte senescence and osteoarthritis development through downregulating FBXW7. *Ann Rheum Dis*. 2022;81(5):676-686. doi:10.1136/annrheumdis-2021-221513

Zhang W, Likhodii S, Zhang Y, et al. Classification of osteoarthritis phenotypes by metabolomics analysis. *BMJ Open*. 2014;4(11):e006286. Published 2014 Nov 19

Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008;16(2):137-162. doi:10.1016/j.joca.2007.12.013

Zhao C, Chen JY, Peng WM, Yuan B, Bi Q, Xu YJ. Exosomes from adipose-derived stem cells promote chondrogenesis and suppress inflammation by upregulating miR-145 and miR-221. *Mol Med Rep*. 2020;21(4):1881-1889.

Zhou L, Li Y, Hao S, et al. Multiple genes of the renin-angiotensin system are novel targets of Wnt/ β -catenin signaling. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(1):107-120. doi:10.1681/ASN.2014010085.

Zhu M, Tang D, Wu Q, et al. Activation of beta-catenin signaling in articular chondrocytes leads to osteoarthritis-like phenotype in adult beta-catenin conditional activation mice. *J Bone Miner Res*. 2009;24(1):12-21.

Zhu Y, Yuan M, Meng HY, et al. Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013;21(11):1627-1637. doi:10.1016/j.joca.2013.07.017.

Zhu Z, Bai X, Wang H, Li X, Sun G, Zhang P. A study on the mechanism of Wnt inhibitory factor 1 in osteoarthritis. *Arch Med Sci*. 2020;16(4):898-906.

ANEXOS



Universidad de León
Vicerrectorado de Investigación
Comité de Ética

Reunida la Comisión Ejecutiva del Comité de Ética de la Universidad de León el día 7 de Octubre de 2011, con objeto de informar la solicitud presentada por el Dr. D. Jesús Seco Calvo, y analizados los correspondientes informes emitidos por los distintos miembros de dicho Comité de Ética,

HAGO CONSTAR

Que el proyecto titulado "Actividad enzimática de peptidasas en líquidos sinoviales y plasma de pacientes con artrosis de rodilla", presentado ante este Comité de Ética como Investigador Principal por el Dr. D. Jesús Seco Calvo, ha obtenido **INFORME FAVORABLE** del citado Comité.

León a 7 de Octubre de 2011
EL SECRETARIO DEL COMITÉ



Fdo.: Dr. Julio Gabriel Prieto Fernández