

Estimulación de la síntesis de colágeno en cultivos celulares

Posible tratamiento de enfermedades degenerativas mediante la dieta

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Patricia de Paz Lugo
D.L.: Gr. 1409 - 2006
ISBN: 978-84-338-4042-4

Estimulación de la síntesis de colágeno en cultivos celulares

**Posible tratamiento de enfermedades
degenerativas mediante la dieta**

Patricia de Paz Lugo

Tesis Doctoral

**Dirigida por el Prof. Enrique Meléndez-Hevia,
Dr. David Meléndez Morales y
Prof. José Antonio Lupiáñez Cara**

**Universidad de Granada
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Granada 2006**

ENRIQUE MELÉNDEZ-HEVIA, Catedrático de Bioquímica de la Facultad de Biología de la Universidad de La Laguna, DAVID MELÉNDEZ MORALES, Doctor en Biología por la Universidad de La Laguna, y JOSÉ ANTONIO LUPIÁÑEZ CARA, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada,

CERTIFICAMOS Que Dña. PATRICIA DE PAZ LUGO, licenciada en Biología por la Universidad de La Laguna, ha realizado bajo nuestra dirección, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada en colaboración con el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de La Laguna, el trabajo experimental y teórico: *'Estimulación de la síntesis de colágeno en cultivos celulares. Posible tratamiento de enfermedades degenerativas mediante la dieta'* que presenta como Tesis Doctoral.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación en Granada a 31 de Mayo de 2006.

Prof. Enrique Meléndez
Hevia

Dr. David Meléndez
Morales

Prof. José Antonio
Lupiáñez Cara

El doctorando,
Patricia de Paz Lugo

A mis padres

Agradecimientos

Este trabajo se ha hecho con una subvención de la Fundación Ramón Areces para el proyecto “*Desarrollo de modelos experimentales para el estudio de la artrosis, y su aplicación para diseñar una terapia correctora de las actividades enzimáticas*” (2002-2005) y con una subvención del Instituto del Metabolismo Celular, nº IMC-PI-004/2004 (2004-2007) para el proyecto “*Síntesis de colágeno en cultivos de fibroblastos y condrocitos *in vitro* como modelos experimentales para el estudio de la artrosis y de otros problemas de la estructura mecánica del cuerpo*”. Durante la realización de esta Tesis he disfrutado de una beca de Formación de Profesorado Universitario (Beca FPU) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. A estas Instituciones debo mi primer agradecimiento porque su soporte económico ha hecho posible este trabajo.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a los directores de esta Tesis, el Prof. Enrique Meléndez-Hevia, el Dr. David Meléndez Morales y el Prof. José Antonio Lupiáñez Cara, por haber compartido conmigo sus muchos conocimientos cuando los he necesitado, y por todo el esfuerzo, la dedicación y la ilusión que han volcado en este trabajo. A ellos debo la posibilidad de la realización de esta Tesis. Espero haber sido capaz de aprovechar todos los conocimientos que ellos han tratado de transmitirme.

Al Instituto del Metabolismo Celular (IMC), y a todo el equipo de grandes profesionales que lo constituyen, por haber aportado el principal soporte técnico, económico y personal de este trabajo, sin el cual habría sido imposible su desarrollo.

En primer lugar, a la Junta Directiva del IMC, además del Prof. Enrique Meléndez Hevia, Presidente del IMC, y del Dr. David Meléndez Morales, Secretario del IMC, deseo dar las gracias en particular a Dña. María Rosa Morales Pérez, Vocal de la Junta Directiva, a Dña. Nancy Montero Gómez, Directora General del IMC, por su inestimable colaboración en todos los aspectos, esforzándose en poner a mi disposición todos los recursos humanos y materiales del IMC que he necesitado para esta investigación, y a Don Eligio Hernández Gutiérrez, asesor jurídico y promotor del proyecto de investigación del IMC, sin cuya labor desinteresada, el IMC no podría existir.

Al personal de los departamentos y secciones del IMC: a Elyn Calviño, Jefe del Departamento de Análisis de Datos, por su ayuda en la clasificación de los resultados del estudio nutricional; a Ruymán Rodríguez, Jefe del Departamento de Informática, por ayudarme con todos los problemas informáticos que he necesitado a lo largo de este trabajo; a Juan Fuertes, Director médico, a Angelo Bora, Coordinador del consultorio nutricional, a Leticia Moral, Jefe de Administración, que siempre ha estado dispuesta a ayudarme para poner a mi disposición todo el material, y el personal de apoyo que he necesitado en la realización de este trabajo; a Marta R. Pardo, Coordinadora de proyectos de investigación, por su continua ayuda, y a Marialina Romero, Jefe del laboratorio de Farmacia, que está desarrollando productos para aplicar algunos de los resultados de esta investigación.

A los médicos que han colaborado en la realización del estudio nutricional del IMC, especialmente al Dr. Carlos García, y al Dr. Carlos Morello, por su gran colaboración con el IMC y la aportación de los resultados nutricionales de este trabajo, y a la Dra. Pilar Casaseca, por la minuciosa corrección del capítulo 3, y por su dedicación y deseos para que todo saliese bien.

A los miembros del grupo de investigación *Metabolismo Celular* de la Universidad de La Laguna, en especial a las profesoras Raquel Rodríguez Raposo y Marifina Rodríguez Enriquez, por su continuo apoyo en este trabajo, sobre todo en los momentos más difíciles que hemos tenido que pasar en el desarrollo de este proyecto; a la profesora Luisa Rodríguez Montelongo por su apoyo moral desde la distancia, a Idaira, que espero que termine muy bien su carrera, y a Elisa, que espero tenga mucho éxito con su proyecto de fin de carrera en Alemania.

Al equipo del laboratorio del profesor Joan Guinovart del Parc Científic de Barcelona por haberme acogido con tanto cariño durante mi estancia allí, a Mar, Jorge, David, Dani, Delia, Anna, Ivet y Mari Carmen, gracias por todo el conocimiento, apoyo, confianza, pero principalmente por todo el cariño que me han dado, porque han hecho que me sintiera como en casa, y sin su ayuda no habría podido llevar a cabo muchos de los protocolos de trabajo de esta Tesis.

Al equipo de investigación del Servicio de Apoyo a las Ciencias Experimentales (S.A.C.E.) de la Universidad de Murcia por su gran ayuda con los cultivos celulares. En especial, gracias a la Dra. María Antonia Bernabeu Esclapez, directora técnica del servicio de cultivo de tejidos, por haberme ayudado con tanta entrega y dedicación con todos los problemas que me iban surgiendo con los cultivos celulares.

Al personal del animalario de la Universidad de La Laguna, y en especial a María Rosa y a Carmelo, por haberme enseñado tanto sobre la fisiología y la etología de los ratones. Sin ellos no hubiese podido distinguir un ratón hembra de un ratón macho.

Al equipo del Matadero Insular de Tenerife por haberme ayudado tanto con las *patas de las vacas*. Especialmente a su veterinario, Juan Carlos González, por todo el interés depositado en este trabajo y su ayuda con la elección de la articulación adecuada, y a Paco Costumero, por su gran disposición.

Al Prof. Francisco Montero, catedrático de Biofísica de la Universidad Complutense de Madrid, por su ayuda en el análisis matemático del teorema descrito en el estudio teórico de este trabajo.

Al Dr. José Ramón Castro por su ayuda con el cultivo de condrocitos.

A Manuel Soto, bibliotecario del Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid), por haber sido tan generoso con la información bibliográfica que he necesitado.

Al Prof. Luis Javier López Martín, Catedrático de Economía Aplicada de la Universidad de La Laguna, por su inestimable ayuda con el procesamiento estadístico de los resultados de este trabajo.

A Antonia Nelsi Torres por su ayuda con las dudas gramaticales de este manuscrito.

A mis compañeras del laboratorio. A Marta, por haber compartido tan buenos momentos juntas, porque sé que siempre está ahí cuando la necesito y por su ayuda en todo momento. A mis nuevas compañeras, Toña, Fátima, Marita y Yoanna, les deseo lo mejor en su investigación.

Al personal técnico de apoyo a la investigación del IMC: a Sandra y a Paquita, por sus ganas de aprender, por su ayuda con los experimentos, por tantos madrugones para acompañarme en horas intempestivas al matadero. A Georgina, Yurena, Sonia, Raquel y Nieves, Mónica Rodríguez, Mónica García, Edgar y Rafael por su ayuda en todo momento.

A mis amigas. A mi gran amiga Mónyka por su ayuda en todo momento, por dejarme echar un vistazo en su laboratorio de cultivos celulares y por compartir tan buenos ratitos juntas. Le deseo todo lo mejor en su Tesis Doctoral. A Ainhoa por estar siempre a mi lado y haber compartido tan buenos y malos momentos, espero que nuestra amistad siga viva siempre. A Leticia y Yaiza por saber escuchar y dar ánimos en los peores momentos. A Yure por sus consejos de reciente doctora. A Paquita porque siga siendo tan buena persona siempre, le deseo lo mejor en su nueva etapa como mamá. A Xavi, Germán y Fran porque los llevo siempre conmigo, gracias por haberme hecho vivir una etapa inolvidable en mi vida. A Eduardo por haberse preocupado porque esta Tesis saliera lo mejor posible.

A mi abuela y a mi tía Yeya por estar siempre a mi lado.

A mi hermana Gara por ser mi mejor amiga. Espero que no cambie nunca porque es especial.

A mis padres, gracias por todo.

Índice

Introducción	1
Capítulo I.— El colágeno	3
Estructura y composición de aminoácidos del colágeno	4
Biosíntesis y ensamblaje del colágeno	15
1. Estructura del procolágeno	15
2. Hidroxilación de prolina y de lisina	16
3. Glicosilación de la hidroxilisina	18
4. Ensamblaje de la triple hélice	18
5. Secreción del procolágeno	20
6. Procesamiento del procolágeno	20
7. Formación de microfibrillas	20
8. Formación de entrecruzamientos y agrupaciones de microfibrillas	22
Tipos de colágeno y distribución tisular	26
Colágenos I, II, III, V y XI –los colágenos formadores de fibrillas	30
Colágenos IX, XII y XIV –los colágenos FACIT	32
Colágeno VI –un colágeno microfibrilar	33
Colágenos VIII y X –colágenos de cadena corta	33
Colágeno IV –el colágeno de las membranas basales	34
Enfermedades del colágeno	35
Osteogénesis imperfecta	37
Dermatosparaxis	39
Síndrome de Ehlers-Danlos	39
Latirismo	42
Escorbuto	42

Capítulo 2.— El cartílago articular	47
El tejido cartilaginoso	47
El cartílago hialino	49
El cartílago fibroso o fibrocartílago	51
El cartílago elástico	52
Las articulaciones sinoviales o diartrosis	52
El cartílago articular	55
Composición del cartílago articular	57
Condrocitos	57
Matriz extracelular	58
Fluido tisular	59
Macromoléculas estructurales	60
Colágenos	60
Proteoglicanos	62
Proteínas no colágenas	67
Estructura del cartílago articular	67
Zonas del cartílago articular	67
Zona superficial	68
Zona transicional	69
Zona medial	69
Zona de cartílago calcificado	69
Regiones de la matriz	70
Región pericelular	70
Región territorial	70
Región interterritorial	71
Síntesis y renovación del cartílago articular	71
Envejecimiento del cartílago articular	73
Capítulo 3.— La artrosis	75
Síntomas y signos de artrosis	78
Epidemiología	80
Factores de riesgo	80
La articulación artrósica	84
Degeneración del cartílago articular en la artrosis	84
Alteraciones en otros tejidos de la articulación artrósica	87
Características bioquímicas y metabólicas del cartílago artrósico	89
Cambios en el contenido de agua	89

Cambios en los proteoglicanos	90
Cambios en el colágeno	90
Cambios en otros materiales	92
Enzimas de degradación del cartílago articular	92
Regulación de las enzimas de degradación del cartílago articular	96
Criterios diagnósticos	98
Tratamiento de la artrosis	102
Tratamiento no farmacológico	102
Cirugía	103
Tratamiento farmacológico	103
Tratamiento nutracéutico	104
Hipótesis y objetivos	105
Capítulo 4.– Hipótesis generales de la investigación bioquímica	107
Hipótesis y axiomas	107
Axiomas de las teorías científicas	108
Proposiciones, teoremas y demostraciones	110
Axiomas generales de la investigación bioquímica	110
1. El método científico	110
2. La evolución biológica	111
3. La selección natural	112
4. Oportunismo	113
5. Termodinámica	113
6. Filogenia de las especies biológicas	113
7. El soporte químico de las funciones biológicas	114
8. Estudios en los sistemas reducidos	114
9. Concordancia bioquímica y biofísica	115
Capítulo 5.– Objetivos y Modelos experimentales	117
Objetivos teóricos	117
1. Revisión del concepto de aminoácidos esenciales	117
2. Estudio del caso particular de la glicina	118
Objetivos experimentales	118
1. Modelos experimentales	119

2. Cultivos de fibroblastos <i>in vitro</i>	120
3. Cultivos de condrocitos <i>in vitro</i>	121
4. Cuantificación del colágeno producido por las células en cultivo	122
5. Efecto de la glicina y de otros nutrientes sobre el crecimiento celular y sobre la síntesis de colágeno	122
Capítulo 6.— Hipótesis específicas de este trabajo	125
Concepto de enfermedades degenerativas	125
Hipótesis sobre las enfermedades degenerativas	127
Hipótesis teóricas	129
Variables de la actividad celular	129
Vitaminas y nutrientes esenciales	130
Enfermedades carenciales	131
Hipótesis terapéutica	132
Hipótesis experimentales	133
Estudio teórico	137
Capítulo 7.— Estudio teórico	139
Aminoácidos esenciales	139
Teoría de los puntos débiles del metabolismo	141
Revisión crítica del concepto de aminoácidos esenciales	143
La glicina como aminoácido esencial por motivos de esencialidad matemática	146
Biosíntesis de serina	147
Ruta de biosíntesis de glicina	147
Treonina aldolasa	152
Usos de la glicina	153
Estructura de proteínas	153
Reactivo para síntesis química	154
Cálculos cuantitativos de la producción y gasto de glicina	155
Carencia de glicina. Repercusiones patológicas de la escasez de glicina	158
Origen del problema de la escasez de glicina	159
Aparición del problema—El código genético y el origen de la vida	160
Agravamiento del problema—Aparición del colágeno	161
Reptiles y aves	165

Artrópodos	166
Estudio experimental	169
Capítulo 8.– Material y métodos	171
8.1. Disoluciones y medios generales de trabajo	171
8.1.1. Disoluciones generales de trabajo	171
Agua	171
Disoluciones de HCl para ajustar el pH	173
Disoluciones de NaOH para ajustar el pH	174
8.1.2. Disoluciones empleadas en el cultivo de células	174
Alcohol 70% (v/v)	174
Antibióticos	175
Azul Tripán	175
Medio DME (DMEM, del inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	176
Medio Ham F12	177
Solución de Dulbecco o PBS (del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>)	179
Solución de Hank (HBSS, del inglés <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>)	180
Solución de tripsina 0'25%-EDTA 0'02%	181
Solución de hialuronidasa y pronasa	181
Solución de colagenasa	181
Solución salina	182
Suero bovino fetal (FBS, del inglés <i>Fetal Bovine Serum</i>)	182
8.1.3. Disoluciones empleadas en la inmunofluorescencia	182
Gelatina 0'5% (p/v)	182
Azida sódica 10% (p/v)	182
PBS-azida	182
Buffer fosfato 2x (buffer fosfato concentrado)	183
Disolución de fijación (paraformaldehído 4%)	183
Disolución de borohidruro sódico	183
Disolución de permeabilización (Tritón X-100 0'2% en PBS)	183
Disolución de bloqueo (BSA 3% en PBS/Tritón X-100 0'1%)	183
Disolución de incubación de los anticuerpos (3% BSA en PBS)	184
8.1.4. Disoluciones empleadas en la cuantificación colorimétrica del colágeno	184
Reactivo colorante	184

Patrón de colágeno	184
Reactivo alcalino	184
Ácido acético 0'5 M	184
8.1.5. Disoluciones empleadas en la cuantificación de colágeno mediante ELISA	184
Ácido acético 0'05 M (pH 2'8-3'0 con ácido fórmico)	184
Disolución de pepsina	184
Disolución de elastasa	184
Buffer TRIS 10x (TBS 10x, del inglés <i>TRIS-Buffered Saline</i>)	185
Buffer TRIS 1x (TBS 1x)	185
8.2. Cultivo de células animales —características generales	185
8.2.1. Ventajas e inconvenientes de los cultivos celulares como modelos experimentales	186
8.2.2. Requerimientos de los cultivos celulares	188
8.2.2.1. Asepsia	188
8.2.2.2. Requerimientos físico-químicos	189
Oxígeno	189
Dióxido de carbono	190
Temperatura	190
pH y capacidad amortiguadora	192
Osmolaridad	193
Viscosidad	193
Tensión superficial	193
8.2.2.3. Requerimientos nutritivos	193
Iones minerales y sales inorgánicas	194
Aminoácidos	194
Vitaminas	195
Glucosa	195
Otros suplementos orgánicos de bajo peso molecular	195
Hormonas y factores de crecimiento: suero	195
Antibióticos y antifúngicos	197
8.2.2.4. El sustrato de cultivo	197
Vidrio	197
Plástico desechable	198
Superficies tratadas	198
Células nodriza ('feeder layers')	198
Microsoportes ('microcarriers')	198
Sustratos metálicos	198
Matrices tridimensionales	198

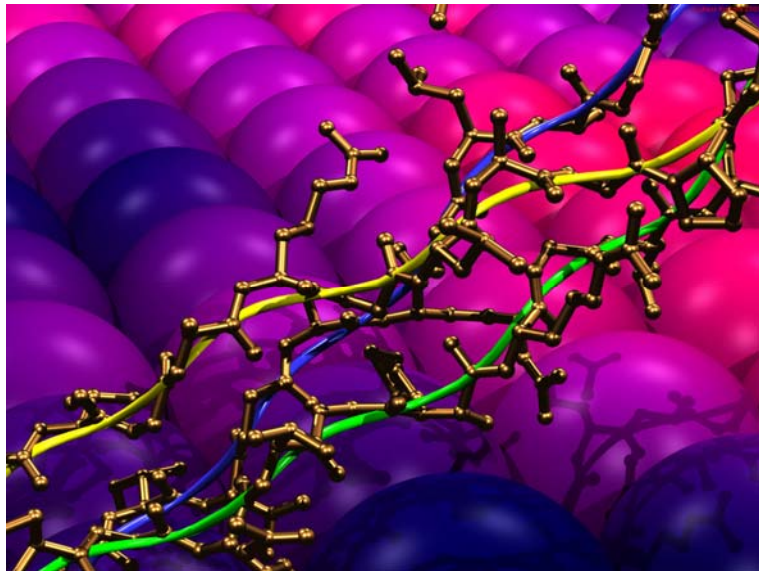
Sustratos no adherentes	199
Haces microcapilares permeables	199
8.2.3. Líneas celulares primarias y líneas celulares continuas	199
8.2.4. Establecimiento de cultivos primarios	200
8.2.4.1. Técnica de los explantes	201
8.2.4.2. Disgregación enzimática	201
8.2.4.3. Disgregación mecánica	203
8.3. Cultivos primarios de fibroblastos	204
8.3.1. Material biológico	204
8.3.2. Procedimiento experimental	205
8.4. Cultivos primarios de condrocitos	210
8.4.1. Material biológico	210
8.4.2. Procedimiento experimental	212
8.5. Experimentos de estimulación	214
8.5.1. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento de fibroblastos	214
8.5.1.1. Subcultivo de células	214
8.5.1.2. Medios de cultivo enriquecidos	215
8.5.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento de condrocitos	216
8.6. Caracterización de los cultivos celulares mediante inmunofluorescencia indirecta	216
8.6.1. Fundamento de la inmunofluorescencia	217
8.6.2. Procedimiento	218
8.7. Determinación del crecimiento celular	221
8.7.1. Fundamento	222
8.7.2. Procedimiento	223
8.8. Valoración de la síntesis de colágeno	224
8.8.1. Valoración de la síntesis de colágeno mediante cuantificación colorimétrica	224
8.8.1.1. Fundamento del método	224
8.8.1.2. Procedimiento experimental	225
Curva de calibrado	225
Análisis de la muestra	227
8.8.2. Valoración de la síntesis de colágeno tipo II mediante ELISA en sándwich	228
8.8.2.1. Fundamento del método	228
8.8.2.2. Procedimiento del método	229
Preparación de las muestras de colágeno	229
Preparación de los patrones de colágeno tipo II	231

Cuantificación del colágeno	231
8.9. Análisis estadístico	234
Capítulo 9.— Resultados	235
9.1. Cultivos primarios de fibroblastos	235
9.1.1. Análisis morfológico de los cultivos primarios de fibroblastos	235
9.1.1.1. Efecto de los suplementos de aminoácidos sobre la morfología de los fibroblastos en cultivo	238
9.1.2. Efecto de la glicina sobre el crecimiento de los fibroblastos	240
9.1.3. Efecto de la glicina sobre la producción de colágeno	241
9.1.4. Efecto de la prolina sobre el crecimiento de los fibroblastos	243
9.1.5. Efecto de la prolina sobre la producción de colágeno	244
9.1.6. Efecto de la lisina sobre el crecimiento de los fibroblastos	246
9.1.7. Efecto de la lisina sobre la producción de colágeno	247
9.1.8. Efecto de la isoleucina sobre el crecimiento de los fibroblastos	248
9.1.9. Efecto de la isoleucina sobre la producción de colágeno	250
9.1.10. Efecto del ácido aspártico sobre el crecimiento de los fibroblastos	251
9.1.11. Efecto del ácido aspártico sobre la producción de colágeno	252
9.2. Cultivos primarios de condrocitos	253
9.2.1. Análisis morfológico de los cultivos primarios de condrocitos	253
9.2.1.1. Efecto de los suplementos de aminoácidos sobre la morfología de los condrocitos en cultivo	255
9.2.2. Efecto de la glicina sobre el crecimiento de los condrocitos	256
9.2.3. Efecto de la glicina sobre la producción de colágeno	258
a) Cuantificación del colágeno tipo II depositado en la monocapa de células	258
b) Cuantificación del colágeno secretado al medio de cultivo	264
9.2.4. Efecto de la prolina sobre el crecimiento de los condrocitos	266
9.2.5. Efecto de la prolina sobre la producción de colágeno	268
a) Cuantificación del colágeno tipo II depositado en la monocapa de células	268
b) Cuantificación del colágeno secretado al medio de cultivo	273
9.2.6. Efecto de la lisina sobre el crecimiento de los condrocitos	275
9.2.7. Efecto de la lisina sobre la producción de colágeno	277
a) Cuantificación del colágeno tipo II depositado en la monocapa de células	277
b) Cuantificación del colágeno secretado al medio de cultivo	281
9.3. Estudio nutricional llevado a cabo por el Instituto del Metabolismo Celular (IMC)	283

Discusión y conclusiones	291
Capítulo 10. – Discusión	293
Selección de los tres aminoácidos estudiados	295
Optimización de la síntesis de colágeno	297
Efectos y concentraciones de los aminoácidos	299
Tratamiento de la artrosis con glucosamina	300
Nuestra crítica al tratamiento con glucosamina	303
Estudio nutricional llevado a cabo por el Instituto del Metabolismo Celular (IMC)	305
Capítulo 11. – Conclusiones	307
1. Revisión del concepto de aminoácidos esenciales	307
2. La glicina debe considerarse aminoácido esencial por razones de imposibilidad matemática	307
3. La glicina es esencialmente necesaria para la síntesis de colágeno	308
4. El enriquecimiento del medio de cultivo de fibroblastos y condrocitos con glicina, prolina y lisina activa la síntesis de colágeno	308
5. Funciones optimizables. La estimulación de la síntesis de colágeno por estos tres aminoácidos muestra una función optimizable	308
6. Datos del estudio nutricional llevado a cabo por el Instituto del Metabolismo Celular (IMC)	309
7. La causa de la artrosis se debe principalmente a una deficiencia de glicina	309
Bibliografía y apéndices	311
Bibliografía	313
Bibliografía general	313
Bibliografía citada	315
Apéndice I. – Abreviaturas y acrónimos	335

Apéndice II. – Aparatos de laboratorio	339
Apéndice III. – Productos químicos	341
Apéndice IV. – Glosario de términos	345

Introducción



Capítulo 1

El colágeno

El colágeno es la proteína más abundante del reino animal. Está presente en todos los *phyla* de metazoos estudiados y se encuentra en prácticamente todos los órganos y tejidos, a los que proporciona el armazón que les da forma y consistencia estructural. En los animales grandes, el colágeno puede llegar a suponer un tercio de la masa total de proteínas.

El colágeno constituye la mayor parte de la masa orgánica de la piel, los tendones, los vasos sanguíneos, los huesos, el cartílago, la córnea, el humor vítreo del ojo, los dientes y las membranas basales. Las fibras de colágeno forman la matriz de los huesos, sobre la que precipitan los constituyentes minerales; estas fibras constituyen la mayor parte de los tendones y son el principal componente de la piel. Básicamente, el colágeno mantiene unidas las células de la mayoría de los animales. Al comienzo de la evolución, la naturaleza tuvo que resolver la siguiente cuestión: ¿cómo pueden las células sostenerse entre sí para llegar a constituir un organismo multicelular? La respuesta principal a esta pregunta fue la formación de las fibras de colágeno extracelulares.

La importancia del colágeno queda patente por su alta concentración en todos los órganos, con porcentajes por peso de tejido, en algunos de los tejidos y órganos más representativos del ser humano, del 74% en la piel, 64% en la córnea, 50% en el cartílago, 23% en el hueso cortical entero, 12-24% en la aorta, 10% en el pulmón y 4% en el hígado [1].

Existen más de veinte tipos de proteínas de la familia del colágeno en el cuerpo humano con funciones y estructuras diferentes. El colágeno está especialmente concentrado en los tejidos que soportan peso, fundamentalmente el cartílago y los huesos. Las duras estructuras

del hueso y de los dientes, que se parecen al cemento, contienen colágeno y un polímero de fosfato cálcico. También existe colágeno concentrado en altas proporciones en las partes del organismo que transmiten fuerza, como los tendones, donde el colágeno forma haces de fibras con una gran resistencia a la tracción. El colágeno también aparece en abundante cantidad en lugares como la dermis o las fascias (láminas que recubren los músculos) donde sirven para proteger, o cuando es necesario un material que resista la tracción o los cambios de volumen. Finalmente, el colágeno constituye prácticamente un esqueleto de microfibrillas que sostiene la estructura de todos los órganos y vísceras del organismo, es decir, que encontramos pequeñas fibrillas de colágeno en el hígado, en el bazo, en el pulmón, en fin, no hay ninguna víscera que no tenga un almacén de colágeno.

En general, el colágeno aparece como un material altamente ordenado. En algunos lugares, las fibras de colágeno se disponen en forma estrictamente paralela. El ejemplo más típico es el de los tendones, en los que las fibrillas de colágeno se disponen en haces paralelos alineados con el eje longitudinal, que coincide con la dirección del esfuerzo. Los vasos sanguíneos mantienen su forma tubular gracias a que las fibras de colágeno se disponen alrededor de la pared formando redes helicoidales elásticas. En otros tejidos como la dermis, el colágeno forma fibras que se entrelazan sin mucha cohesión y se extienden en todas direcciones, lo cual permite la oposición a las tracciones ejercidas desde múltiples direcciones. En la córnea, el colágeno está tan perfectamente organizado en haces paralelos que es casi cristalino y, por tanto, transparente.

El conocimiento de la estructura molecular, la biosíntesis, el ensamblaje y la regeneración del colágeno resulta de gran importancia para lograr entender muchos pasos del desarrollo embrionario, así como procesos patológicos ligados con enfermedades humanas. La exploración de la expresión y la función de diferentes tipos de colágenos también contribuye a un mejor entendimiento de enfermedades basadas en defectos moleculares del colágeno como condrodisplasias, osteogénesis imperfecta, síndrome de Ehlers-Danlos o epidermolisis bullosa. Además, la degradación del colágeno y los defectos en su metabolismo son factores importantes en el curso de enfermedades como la artrosis y la osteoporosis [2]. Un profundo conocimiento de las propiedades de los diferentes tipos de colágenos puede aportar grandes beneficios en la terapia de estas enfermedades.

Estructura y composición de aminoácidos del colágeno

La unidad básica de la fibra de colágeno es la molécula de tropocolágeno (actualmente se tiende a sustituir este término por el de *monómero de colágeno*). El monómero de colágeno tiene la forma de una varilla, de unos 300 nm de longitud y solamente 1'5 nm de diámetro. Esta molécula está compuesta por tres hélices polipeptídicas levógiras (denominadas *cadena*s

α), cada una de ellas con aproximadamente mil residuos, enrolladas entre sí formando una superhélice dextrógira (figura 1.1). Como las hélices polipeptídicas y la superhélice de tropocolágeno están enrolladas en sentidos opuestos, la superhélice se encarga de evitar el desenrollamiento de las tres cadenas polipeptídicas. Este mismo principio se emplea en la construcción de los cables de acero que se utilizan en los puentes colgantes y en otras estructuras que requieren fibras fuertes y ligeras.

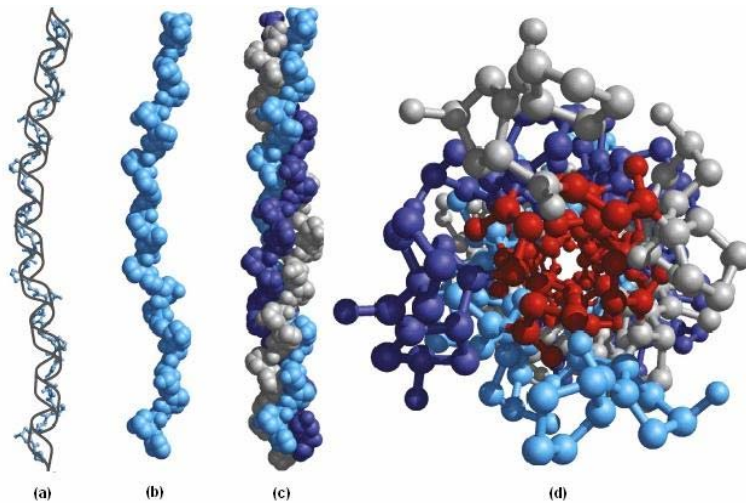


Figura 1.1. Estructura del colágeno. La hélice del colágeno posee una estructura secundaria especial que sólo se encuentra en esta proteína. La pauta helicoidal de su triple cadena es completamente distinta a la de la hélice α . Faltan los puentes de hidrógeno dentro de la cadena. En cambio, cada una de las tres hélices del colágeno se estabiliza por repulsión estérica de los anillos de pirrolidina pertenecientes a los residuos de hidroxiprolina. Los anillos de pirrolidina se separan unos de otros cuando la cadena polipeptídica adopta la forma helicoidal, lo cual la hace mucho más abierta que la hélice α fuertemente enrollada. **(a)** La secuencia repetitiva del tripéptido Gly-X-Y adopta una estructura helicoidal levógira con tres residuos por vuelta. **(b)** Modelo de esferas de la hélice de colágeno mostrada en **(a)**. **(c)** Tres de estas hélices se enrollan entre ellas de forma dextrógira. La molécula con estructura cuaternaria de tres cadenas resultante se conoce como *tropocolágeno*. **(d)** Superhélice de tres cadenas del colágeno vista desde un extremo, en una representación de bolas y varillas.

Una hélice polipeptídica de colágeno da una vuelta completa cada 3³ residuos y su paso de rosca es de 0'31 nm. Las tres hebras están unidas entre ellas mediante puentes de hidrógeno. Los donadores de hidrógeno son los grupos peptídicos -NH- de los residuos de glicina y los aceptores son los grupos peptídicos -CO- de los aminoácidos de otras hebras. Los grupos hidroxilo de los residuos de hidroxiprolina también participan en la unión por puentes de hidrógeno.

Las tres cadenas α tienen sus extremos alineados y, aunque la forma helicoidal se extiende a lo largo de la mayoría de la molécula, hay regiones en los extremos amino y carboxilo terminales, que implican a unos 15-20 aminoácidos, que no son helicoidales. Estas regiones, conocidas como *telopéptidos*, son susceptibles de proteólisis, mientras que la triple hélice es resistente al ataque de la mayoría de enzimas proteolíticas y en la forma nativa sólo es digerida por colagenasas específicas.

La molécula de colágeno posee una composición de aminoácidos característica e inusual (tabla 1.1), pues una tercera parte de sus aminoácidos son residuos de glicina y una cuarta parte, prolina. Además, muchos residuos de prolina y de lisina están modificados covalentemente, dando lugar a 4-hidroxi prolina (Hyp), 3-hidroxi prolina y 5-hidroxi lisina (Hyl) (figura 1.2). Hay que resaltar que en el código genético no aparecen codificadas ni la hidroxi prolina ni la hidroxi lisina, estos aminoácidos se incorporan en las cadenas polipeptídicas como prolina y lisina y son hidroxilados después de haber sido sintetizado el colágeno. En realidad, los polipéptidos del colágeno están formados por una secuencia que se repite de forma regular e ininterrumpida, en la que aparece un residuo de glicina cada tercer aminoácido. Esta secuencia se puede escribir como $(\text{Gly-X-Y})_n$, donde X es con frecuencia prolina, Y es con frecuencia 4-hidroxi prolina y $n \sim 340$.

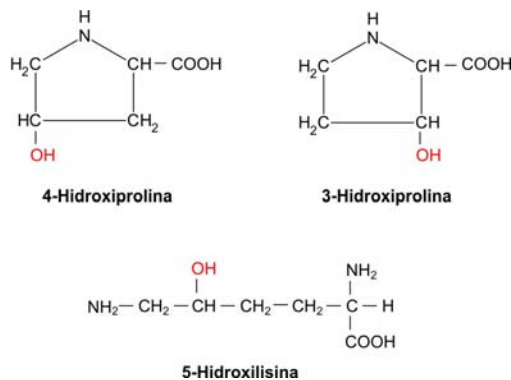


Figura 1.2. Aminoácidos derivados presentes en el colágeno. En el código genético no aparecen codificadas ni las hidroxi prolinas ni la hidroxi lisina. Estos aminoácidos proceden de la hidroxilación de residuos de prolina y lisina, una vez que éstos se han incorporado a la cadena que está siendo sintetizada.

Tabla 1.1. Composición de aminoácidos del colágeno tipo I de piel humana [3]. El colágeno es rico en glicina (33% de sus aminoácidos), prolina (13%), y en los aminoácidos derivados, 4-hidroxiprolina (9%) y 5-hidroxilisina (0'6%). Los residuos de glicina aparecen repetitivamente una vez cada tres posiciones en la forma Gly-X-Y, donde X e Y son aminoácidos distintos a la glicina, frecuentemente prolina y 4-hidroxiprolina, respectivamente. Por lo tanto, las secuencias Gly-Pro-Y y Gly-X-Hyp (donde la X y la Y representan cualquier aminoácido) se repiten en tándem varios cientos de veces a lo largo de la cadena polipeptídica.

Aminoácidos	Residuos / 1.000 residuos		
	Colágeno	$\alpha 1$	$\alpha 2$
Ala	110	115	105
Arg	51	50	51
Asp	45	43	47
Glu	73	77	68
Gly	330	333	337
Hys	4'8	3	9'7
Ile	9'5	6'6	14'8
Leu	24'3	19'5	30'1
Lys	26'9	30'0	21'6
Met	6'2	4'9	5'2
Phe	12	12'3	11'7
Pro	128	135	120
Ser	35'6	36'8	35'1
Thr	17'5	16'5	19'2
Tyr	2'8	2'1	4'6
Val	24'4	20'5	33'3
3-hidroxiprolina	1'1	0'8	0'9
4-hidroxiprolina	93	91	82
5-hidroxilisina	5'8	4'4	7'6

Como las cadenas de tropocolágeno forman hélices con tres residuos por vuelta, cada tercer residuo de una de las hélices se sitúa muy cerca de las otras dos cadenas. Estos contactos tan próximos, que se dan a lo largo del eje central de la triple hélice, dejan un espacio tan pequeño que solamente puede adaptarse allí el átomo de hidrógeno que constituye la cadena lateral de la glicina; cualquier otra cadena lateral más voluminosa separaría las tres hebras de la molécula de tropocolágeno. Este cruzamiento intercatenario explica la necesidad absoluta de que en cada tercera posición de una cadena polipeptídica de colágeno se halle un resto de

glicina. También precisa que las tres cadenas polipeptídicas se hallen alternadas de modo que los restos Gly, X e Y, de las tres cadenas, se encuentren a niveles semejantes (figura 1.3), de manera que los enlaces de hidrógeno intercatenarios se establecen entre los hidrógenos amídicos de los residuos de glicina de una cadena y el oxígeno carbonílico de un residuo, normalmente la prolina, en la posición X del triplete (Gly–X–Y) de una cadena adyacente. El pequeño tamaño de la glicina otorga a este residuo un papel esencial no sólo en el colágeno, sino también en otras muchas proteínas como el citocromo c.

Los residuos de prolina son también vitales para la estructura del tropocolágeno. Los anillos de pirrolidina de los residuos de prolina se repelen entre sí por impedimentos estéricos, situándose en la superficie de la molécula, y forzando a la cadena polipeptídica a formar una hélice levógira muy estirada y delgada.

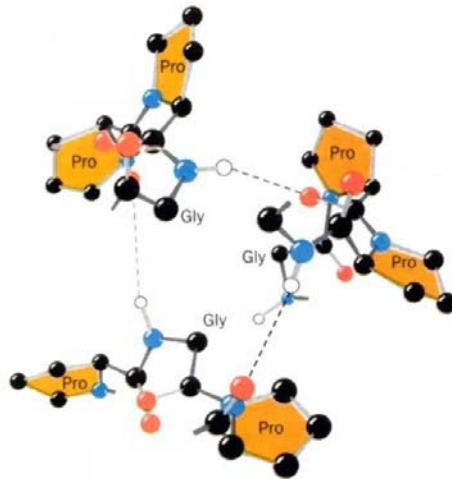


Figura 1.3. Importancia de la glicina en la estructura de la molécula de colágeno. Este esquema representa una proyección descendente del eje de la triple hélice del polímero (Gly–Pro–Pro)_n, análogo al colágeno, contemplada desde su extremo carboxilo. Los restos de cada cadena Gly–X–Y se hallan alternados verticalmente de modo tal que un resto Gly, un X y un Y de cadenas diferentes se hallan al mismo nivel a lo largo del eje de la hélice. Las líneas discontinuas representan enlaces de hidrógeno entre cada grupo NH de glicina y el oxígeno del resto X siguiente situado en una cadena vecina. Cada tercer residuo de cada cadena debe ser glicina ya que no hay espacio cerca del eje de la hélice para la cadena lateral de cualquier otro residuo. Gracias al pequeño tamaño de su cadena lateral, un residuo de glicina puede adoptar muchas conformaciones que estarían estéricamente prohibidas para otros aminoácidos. Las cadenas laterales voluminosas de los restos de prolina están situadas sobre la periferia de la triple hélice en donde no se hallan obstaculizadas espacialmente.

En otras proteínas raramente se encuentran residuos de hidroxiprolina y de hidroxilisina. ¿Por qué se hallan entonces en el colágeno? Se ha demostrado que estos aminoácidos especiales no se incorporan al colágeno durante la síntesis proteica, sino que se producen gracias a la acción de dos enzimas. Un residuo de prolina se convierte en otro de hidroxiprolina gracias a la acción de la prolil hidroxilasa, en presencia de α -cetoglutarato, Fe^{2+} , O_2 y ácido ascórbico (figura 1.4). El carbono δ de un residuo de lisina puede ser hidroxilado en una reacción catalizada por la enzima lisil hidroxilasa dando un residuo de hidroxilisina en una reacción muy similar a la hidroxilación de los residuos de prolina.

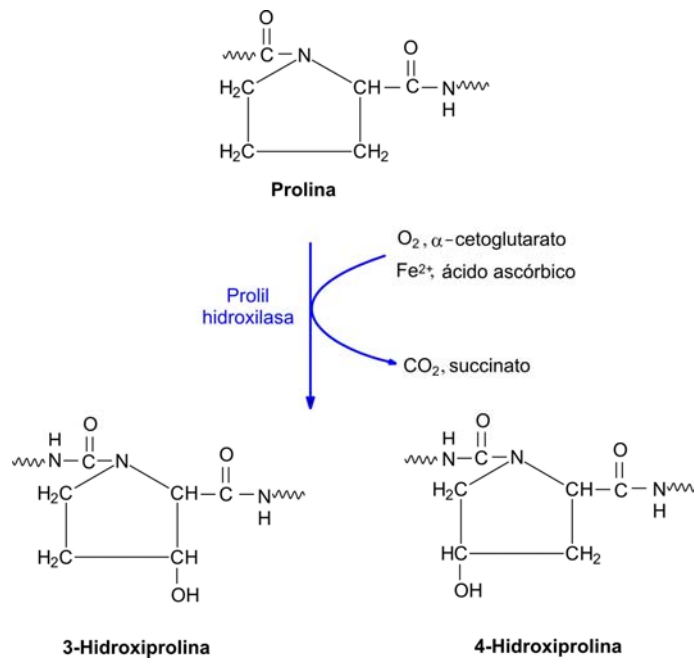


Figura 1.4. Conversión de la prolina en hidroxiprolina. La hidroxilación de residuos específicos de prolina por la prolil hidroxilasa se lleva a cabo en presencia de α -cetoglutarato. La prolil hidroxilasa activa la molécula de oxígeno. Un átomo de oxígeno se une a la prolina; el otro aparece en una molécula de succinato que se forma como producto de la reacción a partir del α -cetoglutarato. El ácido ascórbico (vitamina C) actúa como agente reductor en la reacción.

Existen evidencias de que los grupos hidroxilo de los residuos de hidroxiprolina confieren estabilidad a la triple hélice del colágeno formando enlaces de hidrógeno entre las diferentes cadenas. Así, por ejemplo, en condiciones en las que se inhibe la hidroxilación de la prolina (como cuando hay una deficiencia de vitamina C), la formación de hélices de colágeno resulta impedida. Cuando el colágeno se sintetiza en condiciones en las que se inhibe la prolil hidroxilasa, pierde su conformación nativa, es decir que se desnaturaliza a $24\text{ }^\circ\text{C}$, mientras

que el colágeno normal se desnaturaliza a 39 °C, por lo que no se forma la triple hélice a la temperatura corporal normal.

La hidroxilación de los residuos de lisina tiene una función diferente de la que tiene la de los residuos de prolina. Es necesaria para que tenga lugar el extenso entrecruzamiento que se produce en las fibras de colágeno mientras se ensamblan en el espacio extracelular. A diferencia de la hidroxiprolina, que sólo se encuentra en las regiones helicoidales de la molécula, la hidroxilisina está presente tanto en la región helicoidal como en las pequeñas regiones no helicoidales terminales, donde tiene un importante papel en la formación de puentes cruzados intermoleculares.

Algunos de los residuos de hidroxilisina de las moléculas de colágeno poseen hidratos de carbono unidos covalentemente. La cantidad de carbohidratos unidos al colágeno varía entre un 0.4 y un 12% del peso, dependiendo del origen tisular del colágeno. La unidad de hidrato de carbono que se encuentra con más frecuencia en el colágeno es un disacárido formado por un residuo de glucosa que está unido por un enlace glicosídico ($\alpha 1 \rightarrow 2$) a un residuo de galactosa (figura 1.5). El residuo de galactosa está acoplado al grupo hidroxilo de un residuo de hidroxilisina por un enlace glicosídico β . Estos azúcares se unen al colágeno gracias a la acción sucesiva de dos enzimas, una galactosil transferasa y una glucosil transferasa. Aunque la función de estos disacáridos en la molécula de colágeno es todavía desconocida, se cree que intervienen dirigiendo la ordenación de las fibrillas.

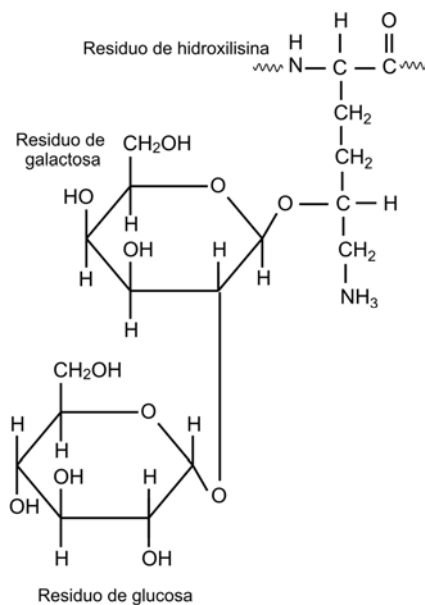


Figura 1.5. Estructura del hidrato de carbono que se une al colágeno. Un disacárido de residuos de glucosa y galactosa aparece frecuentemente unido al grupo hidroxilo de los residuos de hidroxilisina.

En el colágeno la resistencia de la estructura está aumentada por el enrollamiento de varias cadenas helicoidales formando una superhélice, de un modo muy similar a como las cuerdas se enrollan para formar un cable más resistente. La dirección de la hélice en el enrollamiento de orden superior es opuesta al giro de las cadenas polipeptídicas individuales, con lo que se consigue una conformación que permite el empaquetamiento más íntimo posible entre las múltiples cadenas polipeptídicas. El estrecho empaquetamiento de la triple hélice del colágeno proporciona una gran fuerza de tensión, sin ninguna capacidad de estiramiento. Las fibras de colágeno pueden soportar hasta 10.000 veces su propio peso, llegando a tener más fuerza de tensión que un cable de acero de idéntica sección. Al igual que las formas retorcidas de una cuerda, las cadenas extendidas y retorcidas polipeptídicas del colágeno convierten una fuerza de tensión longitudinal en una fuerza de compresión lateral que se soporta con mayor facilidad sobre la casi incompresible triple hélice.

Además, las moléculas de tropocolágeno se asocian para formar microfibrillas. La resistencia de estas estructuras se refuerza también gracias a entrecruzamientos covalentes entre las cadenas polipeptídicas y entre superestructuras adyacentes. Los enlaces que contribuyen a dar resistencia y rigidez a las moléculas de colágeno no son solamente los puentes de hidrógeno entre las hélices polipeptídicas de la triple hélice, sino que aparecen también enlaces covalentes entre las cadenas y entre las triples hélices de tropocolágeno que forman las microfibrillas. A diferencia de la mayoría de las proteínas, que están entrecruzadas por puentes disulfuro, las moléculas de colágeno, que no poseen residuos de cisteína, están entrecruzadas a través de las cadenas laterales de lisina e hidroxilisina que han sido modificadas covalentemente por acción de la enzima lisil oxidasa.

La enzima lisil oxidasa convierte algunos grupos ϵ -amino de las cadenas laterales de lisina o hidroxilisina en δ -aldehídos (figura 1.6). El aminoácido resultante se conoce como *al-lisina* que permite una gran variedad de entrecruzamientos entre los monómeros de colágeno. La cadena lateral con el grupo δ -aldehído de un residuo de al-lisina sufre espontáneamente reacciones de adición nucleofílica con grupos ϵ -amino no modificados de otras lisinas en una cadena adyacente, formando bases de Schiff que pueden originar puentes cruzados por unión covalente (figura 1.6).

También puede ocurrir que dos δ -aldehídos de la cadena lateral de al-lisina reaccionen por condensación aldólica y se genere otro tipo de entrecruzamiento covalente (figura 1.7). Además, el aldol de al-lisina también puede reaccionar con histidina y formar aldohistidina (figura 1.8). Este último puede reaccionar con 5-hidroxilisina para formar una base de Schiff (un enlace imina), con lo que se enlazan transversalmente cuatro cadenas laterales. Estas uniones covalentes pueden establecerse entre cadenas dentro de la estructura superhelicoidal o bien entre moléculas de colágeno superhelicoidales adyacentes en una fibrilla de colágeno.

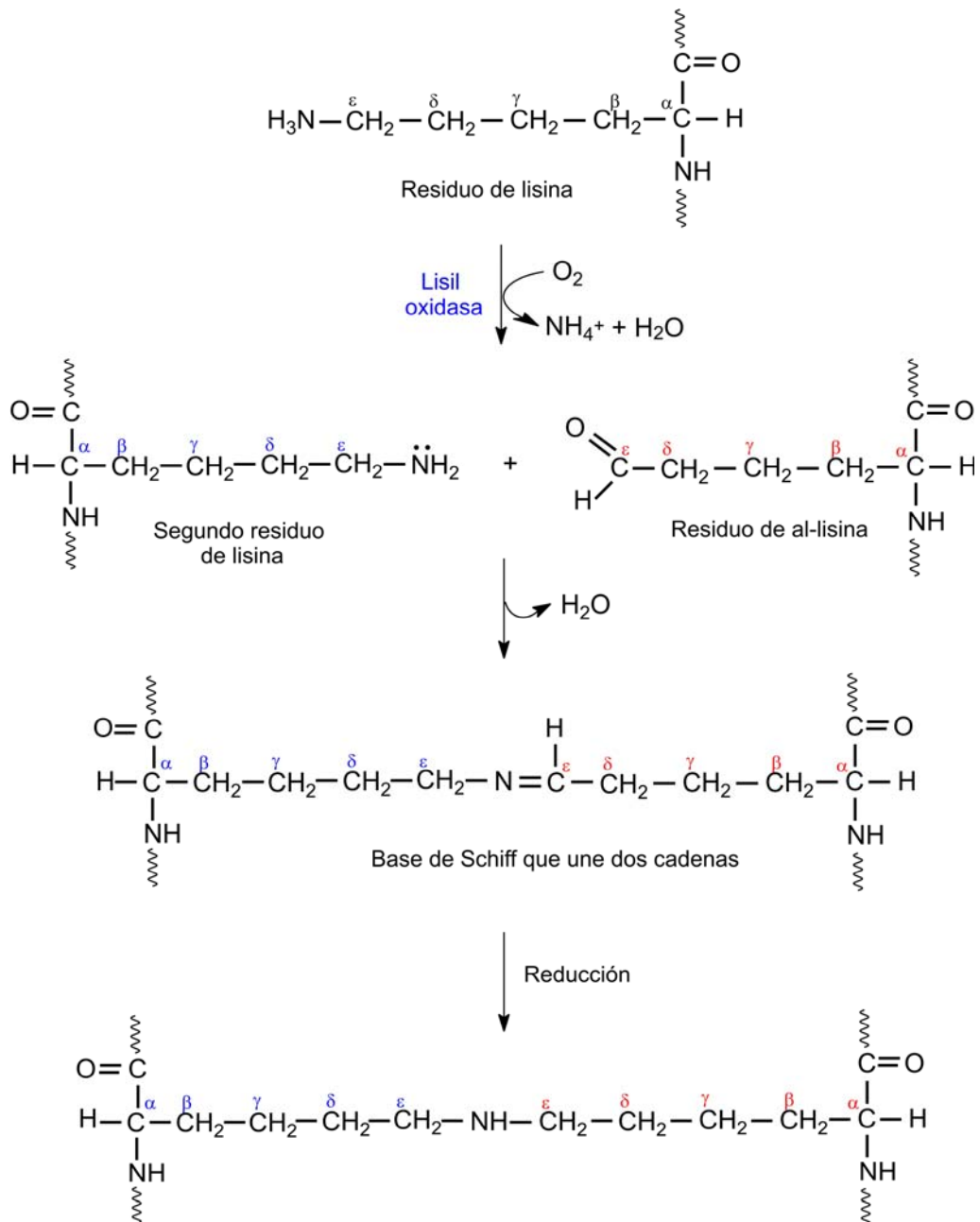


Figura 1.6. Oxidación de un residuo de lisina por la lisil oxidasa y su condensación con otro residuo de lisina para formar un enlace cruzado entre los monómeros de colágeno. Las uniones del colágeno se inician por oxidación de algunas de las cadenas laterales de la lisina e hidroxilisina bajo la acción de una oxidasa dependiente de cobre. Los grupos aldehído así formados participan en una variedad de reacciones que conducen a la unión covalente de los monómeros de colágeno y la formación de fibras insolubles.

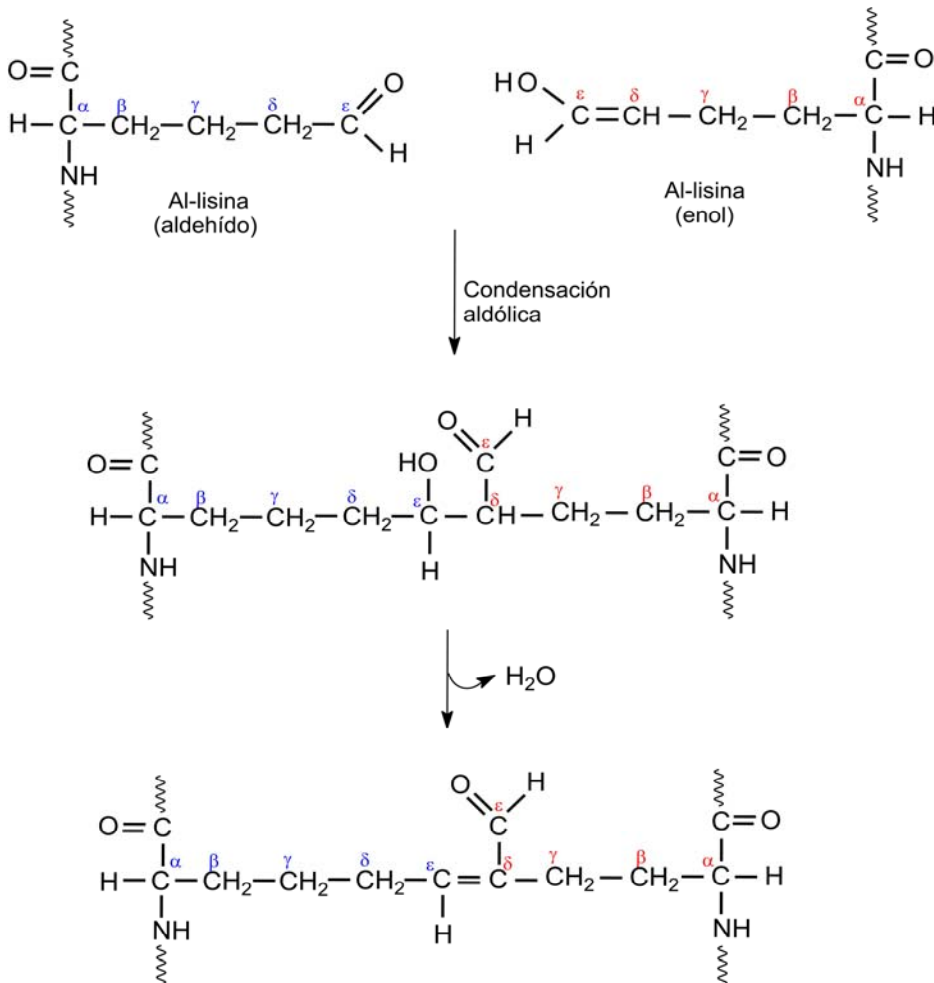


Figura 1.7. Enlace de entrecruzamiento del colágeno vía condensación aldólica entre dos residuos de al-lisina.

La importancia del entrecruzamiento mantenido por puentes cruzados covalentes en la función normal del colágeno está demostrada por el latirismo, enfermedad que aparece en los humanos y en otros animales como consecuencia de la ingestión regular de semillas de *Lathyrus odoratus* (guisante de olor). Entre los síntomas de esta enfermedad se encuentran serias anomalías de los huesos, las articulaciones y los grandes vasos sanguíneos, que ocurren como consecuencia de un aumento de la fragilidad de las fibras de colágeno. El agente causante del latirismo es el β -aminopropionitrilo, que inactiva a la lisil oxidasa al unirse covalentemente a su sitio activo. Ello ocasiona una notable reducción de los enlaces entrecruzados en el colágeno de los animales afectados.

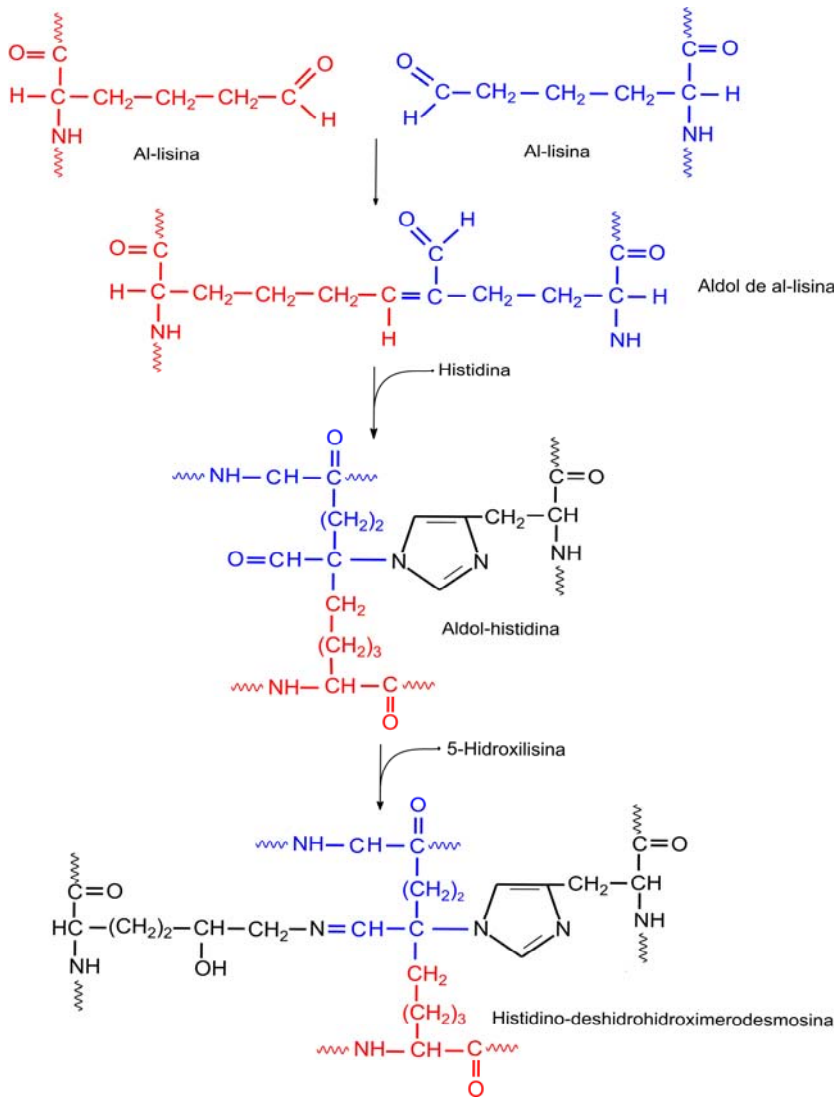


Figura 1.8. Ruta biosintética para la formación de enlaces transversales por las cadenas laterales de lisina, 5-hidroxislisina e histidina en el colágeno. Los grupos aldehído formados por la oxidación de las cadenas laterales de lisina o hidroxilisina pueden participar en una gran variedad de reacciones. Una de ellas es la condensación aldólica seguida de la eliminación de agua. Si uno de los dos aldehídos implicados en la condensación deriva de la hidroxilisina y el otro de la lisina, se forman dos productos isoméricos de condensación. El producto de la condensación aldólica puede reaccionar más tarde: un grupo imidazol de la cadena lateral de una histidina puede adicionarse al doble enlace carbono-carbono y (antes o después de esta reacción) otra cadena lateral de la lisina puede formar una base de Schiff con el aldehído libre. En otros casos, las bases de Schiff simples (aldiminas) se forman entre grupos aldehído y grupos ε-amino. Si existe otro grupo hidroxilo adyacente puede isomerizarse a cetoaminas. En esta reacción suelen estar implicados dos residuos de hidroxilisina, uno de los cuales está glicosilado.

Biosíntesis y ensamblaje del colágeno

La biosíntesis de las cadenas α del tropocolágeno y su ensamblaje para generar fibras de colágeno transcurre en una secuencia de etapas bien ordenadas que ilustran a la perfección el proceso de maduración de una proteína a través de la modificación química. Se trata de un complejo proceso que requiere de al menos ocho enzimas específicas y varias enzimas inespecíficas. La mayor parte de la información acerca de la biosíntesis y ensamblaje del colágeno proviene de estudios sobre la biosíntesis del colágeno tipo I, que probablemente sirve como paradigma para el resto de los colágenos.

1. Estructura del procolágeno

Todos los colágenos se sintetizan en forma de un precursor intracelular conocido como *procolágeno* [4-7], formado por polipéptidos (*cadena pro- α*) que son significativamente más grandes que las cadenas α de las fibrillas extracelulares. Los primeros estudios indicaron que la molécula de procolágeno difería del colágeno monomérico en que la proteína era soluble bajo condiciones fisiológicas, estaba compuesta por polipéptidos de mayor peso molecular que las cadenas α y era convertida en una proteína similar al colágeno mediante el tratamiento con pepsina, lo que sugería la presencia de secuencias de aminoácidos con una conformación diferente a la de la triple hélice, ya que la triple hélice de colágeno sólo puede ser atacada por la acción de colagenasas específicas.

Las cadenas α , que se asociarán posteriormente para generar la molécula de tropocolágeno, se sintetizan en la luz del retículo endoplásmico rugoso de las células, con largos extremos amino y carboxilo no helicoidales que deben ser eliminados para constituir la molécula de colágeno. Estas terminaciones extra se conocen como *propéptidos* o *extensiones peptídicas* y están constituidas por unos 100 residuos en el extremo amino terminal y unos 300 residuos en el extremo carboxilo terminal.

Las extensiones peptídicas tienen una composición más típica de proteínas globulares que el resto de la cadena α , pues contienen azúcares que no están presentes normalmente en el colágeno y es particularmente significativo su contenido en cisteína o cistina, residuos no presentes en los monómeros de colágeno tipo I y tipo III. Estos residuos permiten que las extensiones carboxilo terminales permanezcan unidas mediante puentes disulfuro, lo que asegura que las tres cadenas se mantengan juntas mientras el procolágeno se convierte en colágeno (figura 1.9).

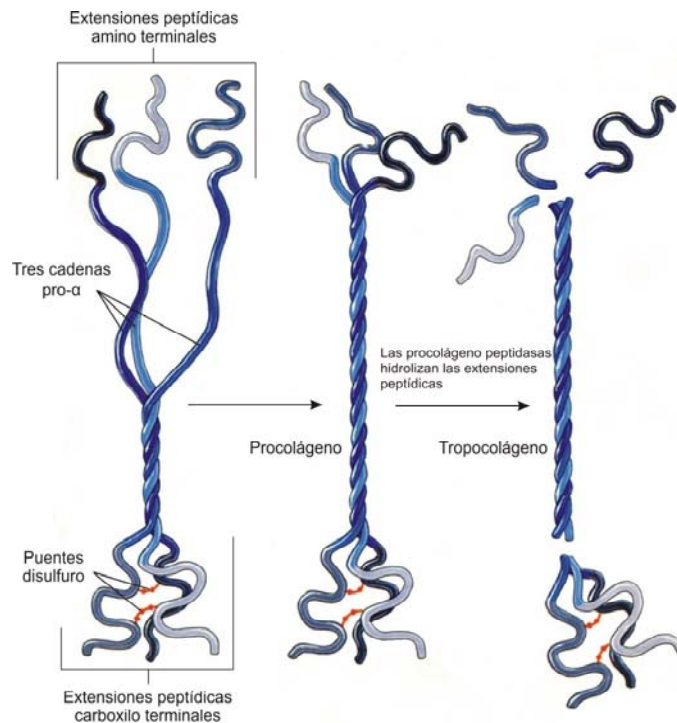


Figura 1.9. Formación de la molécula de tropocolágeno. El colágeno se sintetiza en la luz del retículo endoplásmico de las células, en forma de un precursor conocido como *procolágeno*. Las tres cadenas pro- α del procolágeno son más largas que las cadenas α del tropocolágeno, pues contienen largos extremos amino y carboxilo terminales conocidos como *propéptidos* o *extensiones peptídicas*. Las extensiones peptídicas carboxilo terminales de las cadenas pro- α contienen residuos de cisteína, que forman puentes disulfuro intercatenarios que ayudan a que las tres cadenas se alineen correctamente para formar la triple hélice (las cadenas pro- α que carecen de extensiones peptídicas no se asocian correctamente *in vitro*). Después, las procolágeno peptidasas extracelulares hidrolizan las extensiones peptídicas, generando así la molécula de tropocolágeno.

2. Hidroxilación de prolina y de lisina

Una vez sintetizadas, las moléculas de procolágeno sufren varias modificaciones postraduccionales. Los residuos de prolina y de lisina de la molécula de procolágeno son hidroxilados para dar 4-hidroxiprolina, 3-hidroxiprolina y 5-hidroxilisina (figura 1.2). Estas modificaciones ocurren mientras las cadenas peptídicas aún están unidas a los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso.

Aunque la hidroxiprolina supone alrededor del 10% de los residuos de la molécula de colágeno, y la hidroxilisina alrededor del 0.5-4%, dependiendo del origen del colágeno, los

RNA mensajeros no portan codones para estos aminoácidos. La hidroxiprolina y la hidroxilisina no son, por lo tanto, introducidos en la molécula mediante los pasos usuales de síntesis de polipéptidos, sino que son sintetizados por hidroxilación de los residuos de prolina y lisina que han sido previamente incorporados en las cadenas polipeptídicas. Las enzimas que catalizan estas reacciones son específicas de secuencia: la prolil 4-hidroxilasa y la lisil hidroxilasa actúan solamente sobre los restos Y de las secuencias Gly-X-Y, mientras que la prolil 3-hidroxilasa actúa sobre los restos X, pero sólo si la Y es hidroxiprolina.

Dado que el colágeno es la proteína más abundante de los vertebrados, la prolil hidroxilasa (EC 1.14.11.2), que está implicada en la formación de aproximadamente una décima parte del total de aminoácidos del colágeno, tiene una función fisiológica de gran importancia [8]. La prolil hidroxilasa necesita grupos sulfhidrilos libres para actuar. La reacción necesita hierro y la síntesis de una molécula de hidroxiprolina va acompañada por la descarboxilación estequiométrica de α -cetoglutarato para dar ácido succínico y dióxido de carbono (figura 1.4). El oxígeno del grupo hidroxilo procede del oxígeno molecular. El ascorbato también es necesario en esta reacción.

La reacción en la que la lisina es hidroxilada durante la biosíntesis de colágeno es similar a la de la hidroxilación de la prolina. Se ha aislado una lisil hidroxilasa que usa los mismos cofactores que la prolil hidroxilasa: oxígeno molecular, α -cetoglutarato, ión ferroso y un agente reductor como el ascorbato. La reacción de hidroxilación implica la descarboxilación estequiométrica del α -cetoglutarato a succinato y CO_2 , así como la necesidad de que existan grupos sulfhidrilos libres, tal y como ocurre con la prolil hidroxilasa.

La lisina hidroxilasa se encuentra unida a la membrana del retículo y asociada casi exclusivamente a las fracciones microsomales rugosas obtenidas de células sintetizadoras de colágeno. Esta localización es coherente con los análisis que demuestran que la hidroxilación de la lisina, como la de la prolina, normalmente comienza a medida que las cadenas pro- α están siendo ensambladas en los polirribosomas unidos a membrana.

En los colágenos que forman fibras, aproximadamente el 50% de los residuos de prolina contienen un grupo hidroxilo en la posición 4, y el grado de hidroxilación de la prolina depende de la especie animal. Los organismos que viven a temperaturas ambientales más bajas muestran un grado más bajo de hidroxilación. La presencia de 4-hidroxiprolina es esencial para la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares y de esta forma contribuye a la estabilidad térmica del dominio de triple hélice y a la integridad del monómero y la fibra de colágeno.

El grado de hidroxilación de lisina también varía en función del tejido y del tipo de colágeno. Los residuos de hidroxilisina son capaces de formar entrecruzamientos intermoleculares

estables entre moléculas de colágeno en fibras, y además representan lugares de unión de carbohidratos.

Es interesante el hecho de que a medida que aumenta la edad del animal, disminuye la hidroxilación de la lisina en el colágeno tipo I recién sintetizado, mientras que la hidroxilación de prolina permanece inalterada. En este contexto, se ha prestado especial atención al cambio en el grado de hidroxilación de la lisina de los telopéptidos no helicoidales amino-terminales de las cadenas α . Estos residuos, que tienen un papel importante en la formación eventual de los puentes intermoleculares que estabilizan las fibrillas extracelulares, se encuentran parcialmente hidroxilados (más del 50%) en tejidos embrionarios y neonatales, pero durante el desarrollo tiene lugar un descenso en la hidroxilación de estos residuos, especialmente en el colágeno de la piel.

3. Glicosilación de la hidroxilisina

Tras la hidroxilación tiene lugar la adición de azúcares sobre los residuos de hidroxilisina. Los principales monosacáridos presentes en los colágenos de vertebrados son la galactosa y la glucosa [9]. La glicosilación también tiene lugar en la luz del retículo endoplásmico. Las unidades de galactosa son transferidas a algunos grupos hidroxilo de las cadenas laterales de las hidroxilisinas y los grupos glicosilo son transferidos posteriormente a algunos de los grupos galactosilo (figura 1.5).

En la síntesis de estos glúcidos están implicadas dos enzimas, la UDP-galactosil-colágeno transferasa y la UDP-glucosil-colágeno transferasa, cuya presencia ha sido demostrada en varios tejidos conectivos. Ambas enzimas parecen requerir un cofactor metálico bivalente que suele ser el Mn^{2+} ; además, la activación por ditiotreitól y la inhibición por ρ -mercuribenzoato indican que los grupos sulfhidrilos libres están presentes en los centros activos de ambas enzimas.

Aunque no se conoce el papel de los carbohidratos en el colágeno, algunos autores piensan que la glicosilación puede intervenir para prevenir una incorrecta asociación de las moléculas de procolágeno.

4. Ensamblaje de la triple hélice

Las extensiones peptídicas carboxilo-terminales tienen una función esencial en el ensamblaje de las tres cadenas α para formar los monómeros de colágeno. La estructura globular de las extensiones carboxilo-terminales se estabiliza mediante enlaces disulfuro que se forman entre las tres cadenas. La formación de la triple hélice está precedida por el alineamiento de los

dominios carboxilo-terminales de las tres cadenas pro- α , desde donde se inicia la formación de la triple hélice que progresa hacia el extremo amino-terminal a modo de cremallera.

La relación entre la formación de puentes disulfuro entre las cadenas pro- α y el ensamblaje de la triple hélice fue sugerida en primer lugar en estudios sobre la biosíntesis de colágeno de la membrana basal de células del ojo del embrión de pollo. Las células contenían en su interior cadenas pro- α , pero sólo una pequeña proporción tenía la conformación de triple hélice como lo demostraba su resistencia a la acción de la pepsina. Además, sólo una mínima fracción de las cadenas pro- α estaba unida por puentes disulfuro. Por el contrario, todo el procolágeno secretado por estas células estaba unido por puentes disulfuro y tenía conformación de triple hélice. Estos resultados sugerían que la síntesis de puentes intercatenarios y la formación de la triple hélice sólo tenían lugar justo antes de que la proteína fuese secretada. En experimentos posteriores llevados a cabo con células de tendón y de cartílago se observó una estrecha relación entre el tiempo en que aparecían los puentes intercatenarios y el tiempo en que la proteína adquiría su conformación helicoidal. Estos experimentos, junto con estudios que indicaban que los puentes disulfuro intercatenarios facilitaban la renaturalización de la triple hélice tras la desnaturalización térmica, apoyaban la hipótesis de que los puentes disulfuro intercatenarios debían estar presentes a lo largo de las extensiones de cadenas pro- α para que estos polipéptidos llegaran a ser una triple hélice a una velocidad adecuada.

El plegamiento de los tres polipéptidos para formar la triple hélice del colágeno debe ser posterior a la hidroxilación y a la glicosilación, debido a que las hidroxilasas y las transferasas son incapaces de actuar sobre sustratos helicoidales. Las cadenas de procolágeno se agrupan formando haces de tres cadenas en la luz de las vesículas del aparato de Golgi. Tres moléculas de procolágeno enrollan sus regiones centrales formando una triple hélice, mientras que las regiones amino y carboxilo terminales se pliegan formando estructuras proteicas globulares (figura 1.9). Los polipéptidos del colágeno se asocian rápidamente, *in vitro* e *in vivo*, para formar una triple hélice de colágeno. Por el contrario, los polipéptidos extraídos del colágeno maduro sólo se reasocian, cuando lo hacen, tras un período de varios días. Las extensiones peptídicas evitan también la formación prematura de moléculas de tropocolágeno y de fibras de colágeno en el interior de las células, contribuyendo a la selección y alineamiento de los tres polipéptidos del colágeno, para que estos se plieguen correctamente.

La formación y el plegamiento de las cadenas de procolágeno depende de la presencia de otras enzimas como la peptidil-prolil cis-trans isomerasa (PPI) y chaperonas específicas del colágeno como la HSP47.

5. Secreción del procolágeno

Después del ensamblaje, las moléculas de procolágeno son empaquetadas en el aparato de Golgi en gránulos de secreción y son secretadas a la matriz extracelular (figura 1.10).

6. Procesamiento del procolágeno

Tras la secreción, las moléculas de procolágeno son procesadas. Las procolágeno peptidasas, que se encuentran en la matriz extracelular, eliminan las extensiones peptídicas de los haces de procolágeno: un péptido de 35 kDa del extremo carboxilo terminal y un péptido de 20 kDa del extremo amino terminal, dejando sólo la triple hélice de tropocolágeno con aproximadamente 1.000 residuos (figura 1.9). Ambas enzimas pertenecen a una familia de metalo-proteasas dependientes de Zn^{2+} . Los individuos que carecen de estas enzimas poseen moléculas de colágeno incorrectamente formadas, sufren de fragilidad en la piel y poseen articulaciones excesivamente flexibles. Un defecto congénito de la aminoprocolágeno peptidasa en vacas y ovejas provoca dermatosparaxis, una enfermedad caracterizada por una piel extremadamente frágil. En el hombre existe una enfermedad análoga, el síndrome VII de Ehlers-Danlos, que está provocada por una mutación en uno de los polipéptidos del procolágeno que inhibe la eliminación enzimática del aminopropéptido. Las moléculas de colágeno normalmente se agregan de forma espontánea para formar fibrillas de colágeno. Sin embargo, las micrografías electrónicas de la piel dermatosparáxica muestran fibrillas de colágeno escasas y desorganizadas. La retención de los aminopropéptidos del colágeno interfiere aparentemente con la formación correcta de las fibrillas (el gen de la dermatosparaxis fue introducido en algunas variedades de ganado vacuno porque los heterocigotos producen una carne más tierna).

7. Formación de microfibrillas

Una vez eliminadas las extensiones peptídicas se producen moléculas de tropocolágeno que se agregan para formar microfibrillas insolubles. Las fibras de colágeno inmaduras, o microfibrillas, se forman por agregación espontánea de las moléculas de tropocolágeno en la matriz extracelular, cerca de la superficie de las células, lo cual sugiere que los propéptidos también poseen un importante papel en la prevención de la formación de fibrillas en el interior de las células.

Este proceso de autoensamblaje se cree que es un fenómeno puramente físico-químico, en el que no interviene ninguna enzima auxiliar. La capacidad de autoensamblaje vendría determinada por la estructura del colágeno. Los monómeros de colágeno se agregan en fibras de cinco bandas y subsecuentemente en fibras mayores (figura 1.11), y esta estructura se

mantiene por interacciones hidrofóbicas y electrostáticas de los distintos monómeros de colágeno.

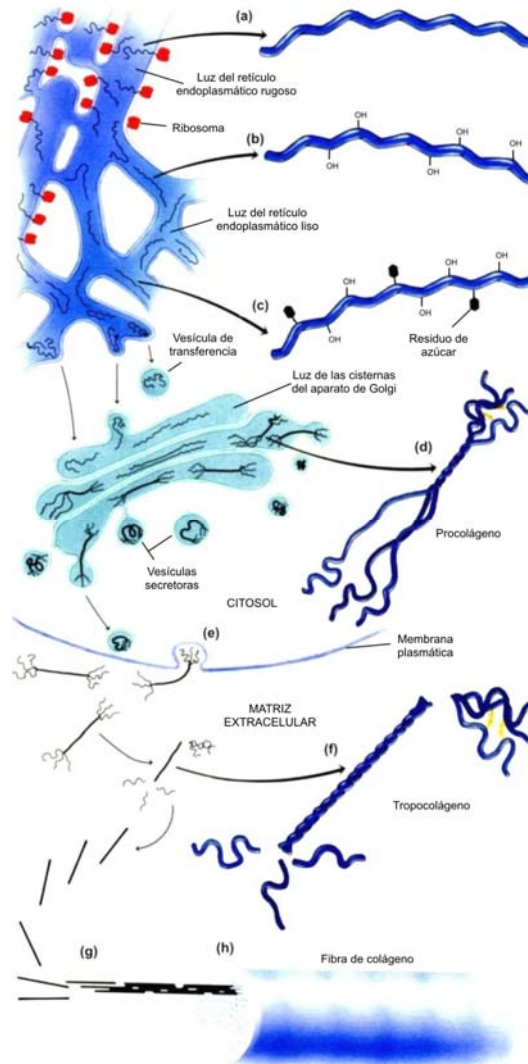


Figura 1.10. Biosíntesis y ensamblaje de una fibra de colágeno. (a) Síntesis de las cadenas pro- α en el retículo endoplasmático rugoso. (b) Hidroxilación de residuos de prolina y de lisina. (c) Unión de los residuos de azúcares. (d) Formación de puentes disulfuro intracatenarios, ensamblaje de las tres cadenas pro- α y formación de la triple hélice. (e) Secreción de la triple hélice (procolágeno) al exterior de la célula. (f) Eliminación de las extensiones peptídicas de la molécula de procolágeno por la acción de las procolágeno peptidasas y formación de la molécula de tropocolágeno. (g) Agregación de las moléculas de tropocolágeno y formación de la microfibrilla (ver figura 1.11). (h) Agregación de las microfibrillas y formación de la fibra de colágeno (ver figura 1.12).

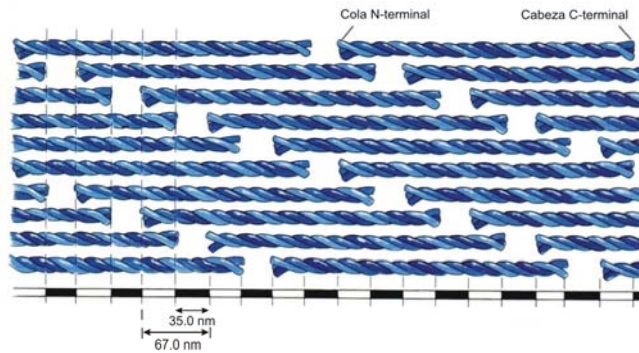


Figura 1.11. Diagrama de la disposición escalonada de las moléculas de tropocolágeno en una microfibrilla. El colágeno está formado por moléculas de tropocolágeno (monómeros de colágeno) empaquetadas juntas para formar fibras. Los monómeros se disponen alineados uno junto a otro de modo escalonado para formar la fibra de colágeno. Cada monómero está desplazado del adyacente aproximadamente un quinto de su longitud. En la preparación microscópica, el depósito de metales pesados en los huecos que se forman en los extremos de los monómeros genera las bandas oscuras que se observan en las micrografías electrónicas de las fibras de colágeno (figura 1.12). El ancho de la banda oscura es 35 nm. El conjunto de una banda clara y una oscura mide 67 nm.

8. Formación de entrecruzamientos y agrupación de las microfibrillas

La última parte de la síntesis del colágeno es el entrecruzamiento de las triples hélices de tropocolágeno, y la estabilización de las fibrillas mediante la formación de enlaces covalentes o puentes cruzados, constituyéndose las fibras maduras de colágeno. Muchas de las propiedades del tejido conectivo y del hueso, tales como la fuerza de tensión y la capacidad de soportar órganos adyacentes, son el resultado de los entrecruzamientos intermoleculares del colágeno [10].

La reacción que inicia la formación de estos puentes intermoleculares es la desaminación oxidativa de residuos de lisina o hidroxilisina, catalizada por la enzima extracelular lisil oxidasa (EC 1.4.3.13) (figura 1.6). Los aldehídos producidos se condensan con otros residuos de lisina, hidroxilisina o hidroxilisina glicosilada, estratégicamente colocados, para formar enlaces al-imina o ceto-imina que confieren a las fibrillas una alta resistencia a la tensión (figuras 1.7 y 1.8).

La lisil oxidasa es una amino oxidasa específica que cataliza la formación de ϵ -aldehídos reactivos en el colágeno y en la elastina a partir de ciertos residuos de lisina e hidroxilisina. Tras la formación de estos aldehídos, al-lisina e hidroxil-al-lisina, ocurren espontáneamente otras reacciones que conducen a la formación de entrecruzamientos intra e intermoleculares [11,12]. En el colágeno, la al-lisina y la hidroxil-al-lisina forman bases de Schiff con los grupos

ϵ -amino de ciertos residuos de lisina e hidroxilisina, para formar los principales entrecruzamientos intermoleculares, 6'-deshidro-5-hidroxi-lisino-norleucina y 6'-deshidro-5,5'-dihidroxi-lisino-norleucina (de DHLNL). Dos residuos de al-lisina también pueden formar un entrecruzamiento intramolecular mediante condensación aldólica, tanto en el colágeno como en la elastina (figura 1.7). La piridinolina se forma por la condensación no enzimática de hidroxilisina y de DHLNL.

La piridinolina es necesaria para la resistencia a la tensión normal del cartílago y del hueso. Sin embargo, algunos autores han demostrado que cantidades excesivas de piridinolina hacen que el tejido conectivo se endurezca, provocando el envejecimiento de las fibras de colágeno [13]. Además, se ha demostrado que la formación de piridinolina aumenta en cobayas sometidas a una dieta pobre en ácido ascórbico, lo que sugiere que el ácido ascórbico debe ayudar a prevenir la formación y acumulación excesiva de piridinolina evitando la rigidez anormal del cartílago. También se ha demostrado que el ácido ascórbico disminuye la reacción oxidativa de la lisina, controlando los cambios que se producen en los entrecruzamientos del colágeno con la edad [14]. Por tanto, el ácido ascórbico ayuda a regular la formación de piridinolina, es decir, aumenta la hidroxilación intracelular e inhibe la oxidación extracelular de los residuos del colágeno, protegiendo a los tejidos conectivos de la rigidez debida al exceso de piridinolina. Además, el ácido ascórbico también es importante en el metabolismo del tejido conectivo, pues es un cofactor de la lisil hidroxilasa y la prolil hidroxilasa en la hidroxilación de los residuos de lisina y prolina en la molécula de colágeno.

La microscopía electrónica del colágeno pone de manifiesto la existencia de unas bandas claras y oscuras que se repiten de forma regular y que son perpendiculares al eje de la fibra (figura 1.12). Estas bandas son debidas a la disposición escalonada de las moléculas de tropocolágeno dentro de la fibra. Cada molécula está desplazada de la molécula vecina en el haz un quinto de su longitud total, de tal forma que sólo se da un solapamiento completo a intervalos de cinco moléculas (figura 1.11). Esta disposición probablemente aumenta al máximo la resistencia a la tracción del agregado. Las bandas oscuras en las micrografías electrónicas tienen un ancho de 35 nm; el conjunto de una banda clara y oscura mide 67 nm. La distancia entre el extremo carboxilo terminal de una molécula y el extremo amino terminal de la siguiente es de 35 nm. En los huesos, este espacio resulta de gran importancia en el proceso de calcificación. El hueso contiene una fase orgánica, principalmente colágeno, y una fase inorgánica, principalmente hidroxapatita, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. Durante la formación del hueso, los cristales iniciales de hidroxapatita se forman a intervalos de 680 Å. Esta observación sugiere que las regiones espaciadas de las fibrillas de colágeno actúan como sitios de formación de núcleos de mineralización del hueso.

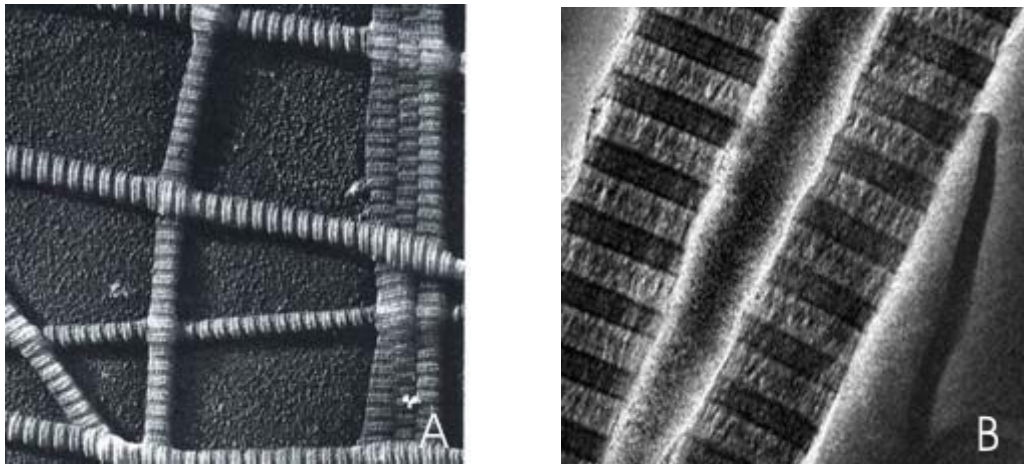


Figura 1.12. Micrografía electrónica de fibras intactas de colágeno. Una fotografía de microscopia electrónica del colágeno muestra claramente el patrón periódico de cada una de las fibras de colágeno. **A.** Visión general. **B.** Detalle.

El grado de entrecruzamiento del colágeno aumenta con la edad del animal. Por ello la carne de los animales más viejos es más dura que la de los jóvenes. En realidad, las moléculas individuales de colágeno sólo pueden extraerse de los tejidos de animales muy jóvenes.

Las fibras de colágeno están orientadas de diferente forma en los distintos tipos de tejidos de modo que reflejan ampliamente la función de los mismos. Así, los tendones (los 'cables' que unen los músculos a los huesos), la piel (una cubierta protectora exterior resistente a la agresión) y el cartílago (que desempeña la función de resistir la carga) deben soportar la tensión predominante en una, dos o tres dimensiones respectivamente, y las fibrillas componentes de su colágeno se hallan dispuestas de acuerdo con su función específica. En los tendones, las fibras de colágeno tipo I se alinean paralelas unas a las otras y forman haces de fibras, mientras que en la piel y el cartílago, la orientación es más aleatoria con la formación de una compleja red de fibrillas entrelazadas.

Los colágenos tipo I, II y III forman fibrillas con estructuras similares. Sin embargo, otros colágenos son mayores o menores y se agregan de diferentes maneras. Una parte resistente a la pepsina de las moléculas de colágeno tipo V se parece a los colágenos tipo I, II y III, pero contiene un segmento adicional no colágeno en el extremo amino terminal. Los colágenos tipo V y XI son componentes cuantitativamente minoritarios de la matriz extracelular pero se cree que proporcionan un núcleo alrededor del cual se forman las fibrillas de colágeno tipo I y III. Los colágenos tipo IX, XII, XIV y XVI contienen interrupciones en la hélice que provocan giros, sitios flexibles y zonas de mayor susceptibilidad proteolítica. Probablemente su función sea la de unir las fibrillas de colágeno a otros componentes de la matriz extracelular. El colágeno tipo IV de la membrana basal forma una red no fibrilar en la cual las moléculas de

400 nm de longitud se agregan a través de sus extremos: cuatro moléculas se mantienen juntas a través de sus extremos amino terminales, mientras que los dominios carboxilo terminales conectan pares de moléculas. El colágeno tipo IX también es un proteoglicano con una cadena de glicosaminoglicano unida a uno de sus dominios no helicoidales. Además, se une covalentemente al colágeno tipo II mediante un puente de hidroxipiridina.

Los fibroblastos del tejido conjuntivo determinan por sí mismos el tamaño y la organización de las fibrillas de colágeno. Estas células pueden expresar uno o más genes que codifican los diferentes tipos moleculares de procolágeno fibrilar y también pueden regular la disposición de las moléculas después de su secreción. Además, estas células pueden determinar, en su entorno más inmediato, la geometría y las propiedades de las fibrillas ejerciendo un control sobre el orden en el que los propéptidos amino y carboxilo terminal son escindidos secuencialmente, secretando diferentes tipos y cantidades de otras macromoléculas matriciales junto con el colágeno, o regulando la formación de las fibrillas de colágeno mediante su estrecha asociación con la membrana plasmática. Finalmente, el colágeno presentará mayor o menor número de puentes cruzados en función de las fuerzas de tracción a que se vaya a someter.

Existe otra vía mediante la cual las células secretoras de colágeno pueden determinar la organización espacial de la matriz que producen. Los fibroblastos actúan sobre el colágeno que han secretado ejerciendo tracciones y desplazándose sobre ellas, colaborando en su compactación en láminas y en la formación de fibras. Este papel mecánico que asumen los fibroblastos en la conformación de las matrices de colágeno se ha demostrado claramente en los cultivos celulares. Cuando los fibroblastos se cultivan en una placa en la que existe una matriz gelificada de fibrillas de colágeno distribuidas al azar, las células tiran de la matriz, ejerciendo tracción sobre el colágeno situado a su alrededor y provocando la contracción del gel hasta que alcanza una pequeña fracción de su volumen inicial; mediante actividades similares, un grupo de fibroblastos puede rodearse de una cápsula de fibras de colágeno densamente empaquetadas y orientadas en circunferencia.

Cuando dos pequeños fragmentos de tejido embrionario, que contienen fibroblastos, se colocan separados sobre un gel de colágeno, éste tiende a organizarse en forma de una estrecha banda de fibras alineadas que conectan ambos explantes (figura 1.13). A continuación, los fibroblastos migran a partir de dichos explantes a lo largo de las fibras de colágeno. En consecuencia, los fibroblastos ejercen una influencia sobre la alineación de las fibras de colágeno y, recíprocamente, las fibras de colágeno afectan a la distribución de los fibroblastos. Probablemente, los fibroblastos juegan un papel similar en la generación de un ordenamiento, de largo alcance, sobre la matriz extracelular del organismo –por ejemplo, colaborando en la formación de tendones y ligamentos, o en la de las densas y resistentes láminas de tejido conjuntivo que encapsulan y unen la mayoría de los órganos.

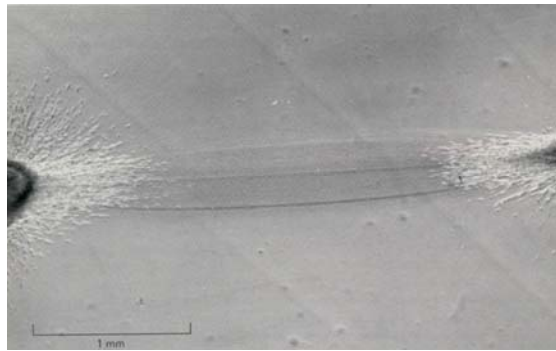


Figura 1.13. Micrografía de la región situada entre dos fragmentos de un corazón embrionario de pollo (rico tanto en fibroblastos como en fibras musculares) que han crecido en cultivo sobre un gel de colágeno durante cuatro días. Obsérvese la densa lámina de fibras de colágeno que se ha formado entre los explantes [15].

Tipos de colágeno y distribución tisular

El nombre de 'colágeno' [del griego κολλα (cola) y γεννω (engendrar)] se utiliza como un término genérico para denominar proteínas que forman una triple hélice característica de tres cadenas polipeptídicas. Todos los miembros de la familia del colágeno forman estas estructuras supramoleculares en la matriz extracelular, aunque su tamaño, función y distribución tisular varía considerablemente. De esta forma, se han descrito hasta 26 tipos de colágenos genéticamente distintos.

Por lo tanto, los colágenos pueden ser considerados como una familia de proteínas. La principal subclasificación de los colágenos se basa en los tipos 'fibrilar' y 'no fibrilar'. Los colágenos fibrilares forman fibrillas características que son rápidamente identificadas por sus estriaciones transversales y proporcionan la tensión requerida para mantener unidos a los tejidos. El colágeno no fibrilar forma una estructura reticular que sirve como armazón para la unión de células epiteliales y endoteliales o como barrera de filtración en tejidos como el riñón. La diferencia más importante entre el colágeno no fibrilar y el fibrilar es que los monómeros del primero contienen grandes unidades globulares, lo que implica que los monómeros de colágeno no fibrilar se autoensamblan formando estructuras más complejas que las que se encuentran ordinariamente dispuestas en el colágeno fibrilar.

Los colágenos de los tipos I, II y III son los principales colágenos fibrilares. El tipo I se encuentra en muchos tejidos conectivos, entre los que se incluyen la piel, los huesos, los tendones y los ligamentos. El tipo II es el principal tipo de colágeno del cartílago hialino. El tipo III es menos abundante que los tipos I y II, pero se pueden encontrar pequeñas cantidades en los tejidos que contienen el tipo I, con excepción del hueso y el tendón, y representa aproxi-

madamente la mitad del colágeno total en los principales tejidos del sistema cardiovascular, como las válvulas cardíacas y las principales arterias. El tipo V se encuentra en varios tejidos, particularmente en vasos sanguíneos y entre las células musculares lisas.

El colágeno tipo IV es el principal colágeno no fibrilar del cuerpo y es el mayor constituyente de las membranas basales. El tipo VI y otra familia de colágenos menores se encuentran en pequeñas cantidades en diversos tejidos.

A pesar de la gran diversidad estructural entre los diferentes tipos de colágeno, todos los miembros de esta familia tienen una característica común: la triple hélice dextrógira compuesta de tres cadenas α . Esta triple hélice puede estar compuesta por tres cadenas idénticas (homotrímeros) como en los colágenos II, III, VII, VIII, X y otros, o por dos o más cadenas diferentes (heterotrímeros) como en los colágenos de los tipos I, IV, V, VI, IX y XI. Así, las moléculas de colágeno tipo I presentes en tejidos como el hueso, el tendón, la dermis madura, la córnea y la dentina contienen dos tipos de cadenas α , la $\alpha 1(I)$ y la $\alpha 2(I)$, en una proporción de 2:1. Por esta razón, la composición de este colágeno debe ser designada como $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$ (tabla 1.2). Por el contrario, el colágeno tipo II presente en el cartílago está formado por moléculas que contienen tres cadenas α idénticas, designadas como $\alpha 1(II)$, que difieren de las cadenas $\alpha 1(I)$ y $\alpha 2(I)$ en su composición de aminoácidos y en su secuencia. Un tercer tipo de colágeno intersticial (colágeno tipo III) está compuesto por tres polipéptidos idénticos, cadenas $\alpha 1(III)$, que difieren en su estructura primaria de las cadenas α descritas arriba. El colágeno tipo IV también es un homotrímero compuesto por tres polipéptidos idénticos de estructura primaria característica; la cadena α se designa $\alpha 1(IV)$ y el colágeno como $[\alpha 1(IV)]_3$.

El tamaño de la parte helicoidal varía considerablemente entre los diferentes tipos de colágeno. La repetición Gly-X-Y es el motivo predominante en los colágenos que forman fibras (tipos I, II, III) lo que da lugar a la formación de dominios helicoidales de 300 nm de longitud –unos 1.000 residuos–. En otros tipos de colágeno, estos dominios son mucho más pequeños o contienen interrupciones en la triple hélice. Así, los colágenos tipo VI o X contienen triples hélices de alrededor de 200 ó 460 aminoácidos, respectivamente.

Además de las diferencias en la estructura primaria de los colágenos derivados de varios tejidos, el análisis de la composición de aminoácidos demuestra que existen diferencias en su contenido en hidroxilisina y, en menor medida, en hidroxiprolina. Asimismo, existen variaciones en el contenido total de glúcidos unidos a la hidroxilisina, tanto entre colágenos de diferentes tipos genéticos, como dentro de un único tipo genético, particularmente el tipo I.

Estas variaciones en la secuencia primaria y en las modificaciones secundarias pueden dar lugar a un gran número de moléculas de colágeno diferentes, cada una de las cuales puede formar estructuras con diferente organización arquitectónica y diferente función.

Tabla 1.2. Tipos de colágenos. Tabla en la que se muestran los principales tipos de colágenos, su composición molecular, los genes que los codifican, su localización genómica y su distribución tisular. Las moléculas de colágeno están formadas por tres cadenas α . Las diferentes cadenas en una molécula se distinguen mediante números arábigos, mientras que los diferentes tipos de colágeno se distinguen mediante números romanos entre paréntesis. La familia más abundante y extendida de colágenos, que llega a suponer alrededor del 90% del colágeno total, está representada por los colágenos formadores de fibrillas. Los colágenos tipo I y tipo V contribuyen a formar la matriz estructural del hueso y los colágenos de tipo II y XI contribuyen fundamentalmente a formar la matriz fibrilar del cartílago articular. El colágeno tipo IV, que posee una triple hélice más flexible, se asocia formando redes restringidas a las membranas basales. El colágeno microfibrilar tipo VI posee gran cantidad de puentes disulfuro y contribuye a la formación de redes de filamentos entremezclados con otras fibras. Los FACIT (del inglés, *Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triplehelices*), como los colágenos de los tipos IX, XII y XIV, se asocian como moléculas individuales con grandes fibras de colágeno y presumiblemente juegan un papel en la regulación del diámetro de las fibras de colágeno. Los colágenos de los tipos VIII y X forman redes hexagonales mientras que otros (tipos XIII y XVII) cruzan las membranas celulares.

Tipo	Composición molecular	Genes (localización genómica)	Distribución tisular
<i>Colágenos formadores de fibras</i>			
I	$[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$	COL1A1 (17q21.31-q22) COL1A2 (7q22.1)	La mayoría de tejidos conectivos: hueso, tendón, ligamentos, piel, pulmón, córnea, sistema vascular.
II	$[\alpha 1(II)]_3$	COL2A1 (12q13.11 – q13.2)	Cartílago, humor vítreo, córnea embrionaria, núcleo pulposo
III	$[\alpha 1(III)]_3$	COL3A1 (2q31)	Piel, pared vascular, fibras reticulares de la mayoría de tejidos (pulmón, hígado, bazo, etc.)
V	$\alpha 1(V), \alpha 2(V), \alpha 3(V)$	COL5A1 (9q34.2 – q34.3) COL5A2 (2q31) COL5A3 (1p13.2)	Pulmón, córnea, hueso, membranas fetales; siempre junto al colágeno tipo I
XI	$\alpha 1(XI) \alpha 2(XI) \alpha 3(XI)$	COL11A1 (1p21) COL11A2 (6p21.3) COL11A3 = COL2A1	Cartílago, humor vítreo
<i>Colágenos de las membranas basales</i>			
IV	$[\alpha 1(IV)]_2 \alpha 2(IV); \alpha 1- \alpha 6$	COL4A1 (13q34)	Membranas basales

		COL4A2 (13q34)	
		COL4A3 (2q36-q37)	
		COL4A4 (2q36-q37)	
		COL4A5 (Xq22.3)	
		COL4A6 (Xp22.3)	
<i>Colágenos microfibrilares</i>			
VI	$\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 3(VI)$	COL6A1 (21q22.3) COL6A2 (21q22.3) COL6A3 (2q37)	Dermis, cartílago, placenta, pulmones, paredes vasculares, discos intervertebrales
<i>Fibras de anclaje</i>			
VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	COL7A1 (3p21.3)	Piel, uniones dermis-epidermis, mucosa oral, cérvix
<i>Colágenos formadores de redes hexagonales</i>			
VIII	$[\alpha 1(VIII)]_2 \alpha 2(VIII)$	COL8A1 (3q12 – q13.1) COL8A2 (1p34.3 – p32.3)	Producido por células endoteliales y varias líneas celulares tumorales
X	$[\alpha 3(X)]_3$	COL10A1 (6q21 – q22.3)	Zona hipertrófica del cartílago
<i>Colágenos FACIT</i>			
IX	$\alpha 1(IX) \alpha 2(IX) \alpha 3(IX)$	COL9A1 (6q13) COL9A2 (1p33 – P32.2)	Cartílago, humor vítreo, córnea
XII	$[\alpha 1(XII)]_3$	COL12A1 (6q12 – q13)	Pericondrio, ligamentos, tendones
XIV	$[\alpha 1(XIV)]_3$	COL9A1 (8q23)	Dermis, tendones, pared vascular, placenta, pulmones, hígado
XIX	$[\alpha 1(XIX)]_3$	COL19A1 (6q12 – q14)	Rabdomiosarcosoma humano
XX	$[\alpha 1(XX)]_3$		Epitelio corneal, piel embrionaria, cartílago esternal, tendones
XXI	$[\alpha 1(XXI)]_3$	COL21A1 (6p12.3 – 11.2)	Pared de los vasos sanguíneos

<i>Colágenos transmembrana</i>			
XIII	$[\alpha 1(\text{XIII})]_3$	COL13A1 (10q22)	Epidermis, folículos pilosos, endomisio, intestino, condrocitos, pulmones, hígado
XVII	$[\alpha 1(\text{XVII})]_3$	COL17A1 (10q24.3)	Uniones dermis–epidermis
<i>Multiplexinas</i>			
XV	$[\alpha 1(\text{XV})]_3$	COL15A1 (9q21 – q22)	Fibroblastos, células musculares lisas, riñón, páncreas
XVI	$[\alpha 1(\text{XVI})]_3$	COL16A1 (1p34)	Fibroblastos, queratinocitos, amnión
XVIII	$[\alpha 1(\text{XVIII})]_3$	COL18A1 (21q22.3)	Pulmones, hígado

Basándonos en su estructura y organización supramolecular, los diferentes colágenos se pueden agrupar en colágenos formadores de fibrillas, colágenos asociados a fibrillas (FACIT, del inglés *Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple-helices*), colágenos formadores de redes, fibrillas de anclaje, colágenos transmembrana, colágenos de las membranas basales y otros con funciones únicas (tabla 1.2).

Colágenos I, II, III, V y XI –los colágenos formadores de fibrillas

Todos estos colágenos son similares en tamaño y se caracterizan por tener grandes dominios de triple hélice con alrededor de 1.000 residuos de aminoácidos o 330 repeticiones – Gly–X–Y– por cadena. Además, son sintetizados como grandes precursores, que necesitan ser procesados hasta colágenos mediante la intervención de las procolágeno peptidasas. Por último, estos colágenos se caracterizan por su capacidad para ensamblarse formando agregados supramoleculares altamente orientados con una estructura característica, la típica organización de fibras escalonadas con diámetros de entre 25 y 400 nm (figura 1.11). En el microscopio electrónico, las fibrillas se definen por un patrón de bandas característico con una periodicidad de aproximadamente 67 nm (llamada *periodo D*) debido a la disposición escalonada de los monómeros de colágeno individuales (figura 1.12).

El **colágeno tipo I** es el colágeno más abundante y estudiado de esta familia. Constituye más del 90% de la masa orgánica del hueso y es el principal colágeno de los tendones, la piel, los ligamentos, la córnea y muchos tejidos conectivos intersticiales con excepción del cartílago hialino, el cerebro y el humor vítreo. La triple hélice del colágeno tipo I es un heterotrímero formado por dos cadenas idénticas $\alpha 1(\text{I})$ y una cadena $\alpha 2(\text{I})$. Las fibras helicoidales, *in*

vivo, suelen encontrarse entremezcladas con las fibras de colágeno tipo III (en la piel y las fibras reticulares) o colágeno tipo V (en el hueso, los tendones y la córnea). En la mayoría de órganos, y fundamentalmente en los tendones, el colágeno tipo I proporciona rigidez a la tensión y, en el hueso, es responsable de las propiedades biomecánicas relacionadas con la resistencia a la carga y la tensión.

El **colágeno tipo II** es el componente característico y predominante del cartílago hialino. En comparación con el colágeno tipo I, las cadenas de colágeno tipo II muestran un contenido en hidroxilisina mayor, así como residuos de glucosa y galactosa que median la interacción con proteoglicanos, otro componente típico de la matriz del cartílago hialino. El colágeno tipo II forma una red de fibrillas entre las que se encuentran moléculas de proteoglicanos, y el aumento de la hidratación del cartílago articular observado en modelos experimentales de artrosis posiblemente se deba a un debilitamiento de esta red [16]. Sin embargo, no es exclusivo del cartílago, donde representa un 80% del colágeno total, ya que también se encuentra en el cuerpo vítreo, el epitelio de la córnea, la notocorda, el núcleo pulposo de los discos intervertebrales y el epitelio embrionario. La triple hélice del colágeno tipo II está formada por tres cadenas $\alpha 1$ (II) formando una molécula homotrimérica de tamaño y propiedades biomecánicas similares a las del colágeno tipo I. En el cartílago también se encuentran colágenos tipo IX y XI, los cuales se cree que actúan limitando el diámetro de las fibrillas de colágeno tipo II a 15-50 nm.

El **colágeno tipo III** es un homotrímero de tres cadenas $\alpha 1$ (III) y está ampliamente distribuido en todos los tejidos que contienen colágeno tipo I excepto en el hueso y en los tendones. Es un componente importante de las fibras reticulares en el tejido intersticial de los pulmones, el hígado, la dermis, el bazo y los vasos sanguíneos.

Los colágenos de los tipos V y XI son heterotrímeros formados por tres cadenas α diferentes ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$). Hay que destacar que la cadena $\alpha 3$ del colágeno tipo XI está codificada por el mismo gen que la cadena $\alpha 1$ del colágeno tipo II y sólo difiere de ésta por el grado de glicosilación e hidroxilación. El **colágeno tipo V** forma agregados con los colágenos tipo I y III y contribuye a la formación de la matriz orgánica del hueso, el estroma de la córnea y la matriz intersticial de músculos, hígado, pulmones y placenta. El **colágeno tipo XI** se distribuye ampliamente en el cartílago articular junto al colágeno tipo II. Estos colágenos parecen situarse en el centro de las fibras y no en su superficie. Así, el colágeno tipo V podría funcionar como una estructura central de las fibras, con los colágenos I y III polimerizando alrededor de este eje central. El colágeno tipo XI parece formar el núcleo de las heterofibras de colágeno tipo II.

Colágenos IX, XII y XIV –los colágenos FACIT

Los tipos IX, XII, XIV, XVI, XIX y XX pertenecen al grupo de colágenos conocido como FACIT (*Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple helices*). Estos colágenos no forman fibras por sí mismos, pero se encuentran asociados a la superficie de las fibras formadas por otros colágenos. Las estructuras de estos colágenos se caracterizan por presentar pequeños dominios colágenos interrumpidos por varios dominios no colágenos que actúan a modo de bisagras.

Al contrario que la triple hélice, que es una estructura altamente conservada, los dominios no colágenos están caracterizados por una mayor diversidad estructural y funcional entre las diferentes familias y tipos de colágeno. Las interrupciones de la estructura helicoidal pueden ocasionar flexibilidad intramolecular y permitir una rotura proteolítica específica. Las triples hélices nativas están caracterizadas por su resistencia a proteasas como la pepsina, la tripsina o la quimiotripsina y sólo pueden ser degradadas por diferentes tipos de colagenasas específicas. La *colagenasa A (MMP-1)* o *colagenasa intersticial*, es expresada por una gran variedad de células y se cree que está implicada en la regeneración tisular, como por ejemplo durante la curación de heridas. La *MMP-8 (colagenasa B)* es muy específica de los granulocitos neutrófilos y, por ello, se cree que está implicada en la destrucción tisular durante los procesos inflamatorios agudos. La *MMP-13 (colagenasa C)* es expresada por los condrocitos hipertróficos, así como por los osteoblastos y osteoclastos, por lo que se cree que interviene en la remodelación del cartílago y el hueso.

El **colágeno tipo IX** se distribuye juntamente con el colágeno tipo II en el cartílago y en el cuerpo vítreo. La molécula de colágeno tipo IX es relativamente corta, alrededor de 200 nm de longitud, y consiste en tres dominios de triple hélice salpicados entre cuatro dominios globulares (NC1, NC2, NC3 y NC4, por *No Colágeno*) [17]. Las tres cadenas [$\alpha 1$ (IX), $\alpha 2$ (IX) y $\alpha 3$ (IX)] son diferentes y están conectadas mediante puentes disulfuro. El colágeno tipo IX del cartílago humano se encuentra covalentemente unido al colágeno tipo II y a otras moléculas de colágeno tipo IX [18]. Las moléculas de colágeno tipo IX se localizan de manera periódica a lo largo de la superficie de las fibras de colágeno tipo II en sentido antiparalelo. Esta interacción está estabilizada mediante puentes derivados de lisina.

La característica más inusual del colágeno tipo IX es que a veces aparece como proteoglicano, en el que una única cadena del glicosaminoglicano dermatán sulfato se encuentra covalentemente unida a un residuo de serina del dominio NC3 de la cadena $\alpha 2$ (IX) [19-21]. El dominio globular NC4 de $\alpha 1$ (IX) tiene un pI aproximado de 10, por lo que es probable que este dominio se una a las cadenas ácidas de glicosaminoglicanos de la matriz del cartílago, mientras que la cadena de glicosaminoglicano del colágeno IX puede estabilizar su interacción con el colágeno tipo II.

El **colágeno tipo XII** es un colágeno cuantitativamente secundario presente en tejidos conectivos densos ricos en colágeno tipo I como los tendones y los ligamentos. La molécula está formada por tres cadenas $\alpha 1$ (XII), cada una de las cuales tiene dos dominios de triple hélice, uno de ellos fuertemente homólogo al colágeno tipo IX, y también posee un dominio globular similar al NC4 del colágeno tipo IX. El colágeno tipo XII es el colágeno de mayor tamaño en los vertebrados conocido hasta el momento. La mayoría de su secuencia está formada por varios dominios globulares, y los dominios colagenosos comprenden menos del 8% de la molécula completa, por lo que se cuestiona que esta proteína deba ser incluida en la familia del colágeno.

El **colágeno tipo XIV**, también se encuentra en la piel y en los tendones. Es más parecido al colágeno tipo XII en la triple hélice y en los dominios no colágenos cercanos.

La función de estos colágenos, así como la del colágeno tipo XIX y XX es prácticamente desconocida.

Colágeno VI –un colágeno microfibrilar

El **colágeno tipo VI** es un colágeno fibrilar relativamente ubicuo, constituido por tres cadenas α diferentes [$\alpha 1$ (VI), $\alpha 2$ (VI), $\alpha 3$ (VI)] con pequeños dominios de triple hélice y terminaciones globulares. Las fibras primarias forman, en primer lugar, dímeros antiparalelos, en los que las moléculas están solapadas en la mayor parte de su longitud y luego los dímeros se asocian de forma paralela para formar tetrámeros. Tras la secreción a la matriz extracelular, los tetrámeros de colágeno tipo VI se unen en sus extremos formando microfibrillas filamentosas, las cuales se asocian para constituir fibras con bandas de 110 nm de periodicidad, distintas a las de los colágenos fibrilares.

Colágenos VIII y X –colágenos de cadena corta

Los colágenos tipo VIII y tipo X son denominados *colágenos de cadena corta*. El **colágeno tipo X** es un componente característico del cartílago hipertrófico de la placa de crecimiento fetal y juvenil, en costillas y vértebras. Es un colágeno homotrimérico con un largo extremo carboxilo terminal y un corto dominio amino terminal. Los experimentos *in vitro* han indicado que sus fibras se asocian formando redes hexagonales. La función del colágeno tipo X no está determinada; se cree que está implicado en la osificación endocondral y la calcificación de la matriz. De hecho, las mutaciones en el gen COL10A1 son las causantes de la enfermedad conocida como *condrodiasplasia metafiseal tipo Schmid*, en la que se encuentra impedida la osificación endocondral en la placa de crecimiento metafiseal, lo que provoca una deficiencia en el crecimiento y deformidades esqueléticas con miembros más cortos.

El **colágeno tipo VIII** presenta una estructura altamente homóloga a la del colágeno tipo X, pero muestra una distribución distinta y, por lo tanto, se cree que puede tener diferentes funciones. Este colágeno es producido por células endoteliales y se ensambla formando redes hexagonales como en la membrana de Descemet del endotelio de la córnea.

Colágeno IV –el colágeno de las membranas basales

Las membranas basales son estructuras delgadas (30-40 nm), bastante amorfas, que se encuentran en la matriz extracelular bajo las capas de células epiteliales y endoteliales, adyacentes a sus membranas plasmáticas, en la interfase con el mesénquima, o alrededor de tipos celulares particulares como el músculo, la grasa o los nervios. Sus funciones son proporcionar soporte a las capas celulares, servir como filtros moleculares (por ejemplo en el glomérulo), actuar como barreras selectivas al paso de células inflamatorias o tumorales, y proporcionar sustratos para la adhesión, el crecimiento y la diferenciación celular. Entre los principales componentes macromoleculares de las membranas basales se encuentra el colágeno tipo IV.

La estructura de la molécula de **colágeno tipo IV** difiere en varios aspectos de los colágenos fibrilares. En primer lugar, la región central de triple hélice del colágeno tipo IV es aproximadamente un 25% más larga que la de los colágenos fibrilares con aproximadamente 1.400 aminoácidos, y está interrumpida en varias posiciones por pequeñas secuencias sin estructura triple helicoidal. Las posiciones de las interrupciones están conservadas en varias especies y se corresponden con sitios de mayor flexibilidad estructural. En segundo lugar, durante su formación, el colágeno tipo IV no sufre los procesos proteolíticos explicados arriba (figura 1.9), de forma que conserva los propéptidos; las moléculas secretadas interactúan a través de sus dominios no degradados, formando una red laminar estratificada.

Se han identificado hasta seis cadenas α , $\alpha 1(IV)$ - $\alpha 6(IV)$, que se asocian de distinta forma para constituir moléculas heterotriméricas. La forma predominante está representada por el heterotrímero $[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$ que forma redes en la mayoría de membranas basales embrionarias y adultas.

En la región amino terminal de la molécula (llamada 7S por su coeficiente de sedimentación) existe otra región triple helicoidal separada de la triple hélice principal por un rizo. Otra diferencia con los colágenos fibrilares es la presencia de glicosilaciones en las regiones de triple hélice (tanto en la región 7S como en la hélice principal) y el mayor grado de hidroxilación. En el extremo carboxilo terminal de la molécula de colágeno tipo IV hay un gran dominio globular (llamado *NC1*), de alrededor de 230 residuos de aminoácidos, que muestra una pequeña homología en su secuencia con el propéptido C de los colágenos fibrilares.

La asociación del colágeno tipo IV para formar estructuras reticulares implica interacciones intermoleculares que están mediadas por los dominios 7S y *NC1*. Los dominios *NC1* de

moléculas adyacentes se unen covalentemente para formar un dímero. Los dominios 7S también se asocian, mediante interacciones estabilizadas por puentes disulfuro y otros enlaces covalentes intermoleculares, para formar un tetrámero en el que dos pares de moléculas antiparalelas se solapan unos 30 nm. Un nivel adicional de asociación implica uniones laterales en las regiones de la triple hélice principal en las que también está implicado NC1.

El **colágeno tipo VII** se encuentra muy próximo a las membranas basales, bajo el epitelio escamoso estratificado (por ejemplo, en la unión dermis-epidermis de la piel) donde forma fibras de anclaje, estructuras simétricas de alrededor de 750 nm de longitud que unen la membrana basal a las placas de anclaje de la matriz extracelular. El colágeno tipo VII tiene la mayor región de triple hélice de los colágenos de vertebrados y una forma de autoasociación exclusiva. La molécula consiste en una región triple helicoidal de aproximadamente 420 nm de longitud, con una pequeña región globular en un extremo (probablemente el extremo carboxilo terminal), el cual parece ser eliminado proteolíticamente durante el ensamblaje intermolecular, y una gran estructura en tridente en el otro extremo. Al igual que el colágeno tipo IV, la región triple helicoidal del colágeno tipo VII contiene varias interrupciones no helicoidales. Las moléculas se asocian para formar dímeros antiparalelos estabilizados por puentes disulfuro y con un pequeño solapamiento en el pequeño extremo globular. Luego, los dímeros se asocian para formar la estructura de anclaje.

Enfermedades del colágeno

El colágeno se encuentra en prácticamente todos los tejidos y es la proteína más abundante en los seres humanos. El funcionamiento fisiológico de determinados órganos depende en gran medida de la estructura normal del colágeno, por lo que los problemas que puedan ocurrir durante su síntesis y cualquier causa que produzca una estructura anómala del colágeno puede provocar disfunciones de los órganos cardiovasculares (aneurisma aórtico y arterial y mal funcionamiento de las válvulas cardíacas), huesos (fragilidad y propensión a las fracturas), piel (cicatrización defectuosa y distensión inusual), articulaciones (hipermovilidad y artritis) y ojos (dislocación del cristalino). Estas enfermedades pueden ser consecuencia de defectos en los genes del colágeno, modificación postraduccional anormal del colágeno, deficiencia de cofactores necesarios para las enzimas que llevan a cabo la modificación postraduccional del colágeno, o simplemente escasez de aminoácidos esenciales necesarios para su síntesis.

Cualquier proteína principal del cuerpo puede estar asociada a varios problemas genéticos. En el caso del colágeno, la posibilidad de que se produzcan mutaciones dañinas está aumentada por la existencia de un gran número de genes que codifican más de veinte tipos de colágenos que son expresados en diferentes tejidos. Se conocen enfermedades humanas

resultado de defectos en la síntesis, secreción o estructura de los colágenos tipo I, II, III, IV, VII, IX, X y XI. Otros defectos implican a la lisil hidroxilasa y la aminoprocolágeno peptidasa. La lista de las enfermedades genéticas del colágeno incluye varias formas específicas de osteogénesis imperfecta, el síndrome de Ehlers-Danlos y otras alteraciones relacionadas (tabla 1.3). A pesar de que estas patologías son relativamente raras constituyen paradigmas para la comprensión de las enfermedades del tejido conectivo más comunes, puesto que muchas enfermedades degenerativas exhiben anomalías del colágeno en los tejidos afectados; son ejemplos de tales tejidos el cartílago en la artrosis, el fibroso en las placas ateroscleróticas de las arterias humanas, y el óseo en la osteoporosis.

Tabla 1.3. Enfermedades causadas por mutaciones en los genes del colágeno o por deficiencias en la actividad de enzimas de la síntesis del colágeno [22]. ^a En algunos pacientes, ^b demostrado en ratones transgénicos, ^c secundario a una anomalía en el metabolismo del cobre.

Gen o enzima	Enfermedad
COL1A1; COL1A2	Osteogénesis imperfecta Osteoporosis ^a Síndrome de Ehlers-Danlos tipo VIIA, VIIB
COL2A1	Varias condrodisplasias Artrosis ^a
COL3A1	Síndrome de Ehlers-Danlos tipo IV Aneurisma aórtico ^a
COL4A3; COL4A4	Síndrome de Alport
COL4A5	Síndrome de Alport
COL4A5 y COL4A6	Síndrome de Alport
COL7A1	Epidermolisis bullosa
COL9A1	Artrosis ^b
COL9A2	Displasia epifiseal
COL10A1	Condrodisplasia metafiseal de Schmid
COL11A2	Síndrome de Stickler
Lisil hidroxilasa	Síndrome VI de Ehlers-Danlos
Lisil oxidasa	Síndrome de Menkes ^c

Osteogénesis imperfecta

Las mutaciones en el gen que codifica el colágeno tipo I, que constituye la principal proteína estructural en la mayor parte de los tejidos humanos, normalmente producen osteogénesis imperfecta (*enfermedad de los huesos frágiles o huesos de cristal*). Se han caracterizado alrededor de 80 mutaciones en los genes del procolágeno I. La gravedad de esta enfermedad depende de la naturaleza y posición de la mutación; incluso el cambio de un solo aminoácido puede tener consecuencias letales. Todos los cambios de aminoácidos que se producen en la región de la triple hélice del colágeno tipo I dan lugar a anomalías, indicando que la integridad estructural de esta región es esencial para la correcta función del colágeno. La mayor parte de estas mutaciones son cambios de una base en los codones de glicina, lo que demuestra la estricta necesidad de glicina cada tercera posición en la triple hélice de colágeno.

A pesar de que la presencia de huesos frágiles es lo más característico de la osteogénesis imperfecta, se sabe que esta enfermedad involucra a muchos otros tejidos ricos en colágeno tipo I, como los ligamentos, los tendones, las fascias, las escleróticas y los dientes. La osteogénesis imperfecta afecta a uno de cada 10.000 individuos, con características clínicas que van desde la baja estatura, deformidades óseas, pérdida de audición y escleróticas azuladas.

Existen varios tipos de esquemas para la clasificación de las osteogénesis imperfectas, el más común es el esquema de cuatro tipos principales propuesto por Silence y cols. [23], que se basa en su presentación clínica en lugar de en su etiología. En esta clasificación, el tipo I es la forma más común y leve. Se conoce también como *enfermedad de Ekman Lobstein*, *síndrome de van der Hoeve* o *enfermedad de Adair Dighton*. Se caracteriza por poseer huesos moderadamente frágiles (alrededor del 10% de los lactantes afectados presentan ya algunas fracturas desde el nacimiento), estatura normal o casi normal, escleróticas azuladas, posible pérdida de audición unilateral, posible dentinogénesis imperfecta (dientes grisáceos y débiles con propensión a la caries) y múltiples fracturas. Por lo general, la mayor parte de las fracturas ocurren antes de la pubertad.

El tipo II, también conocido como *enfermedad de Vrolik*, es la forma más severa de la enfermedad; se manifiesta con reiteradas fracturas, las cuales pueden estar presentes desde la etapa intrauterina y severas deformaciones, pequeña estatura, el tejido conectivo es tan frágil que la enfermedad es usualmente letal en el nacimiento. La piel es fina, frágil y en ocasiones se desgarra durante el parto.

El tipo III es una forma moderadamente severa, que se manifiesta con gran cantidad de fracturas, pequeña estatura, escleróticas azuladas y deformidades óseas.

El tipo IV es una forma muy variable caracterizada por propensión a las fracturas, escleróticas blancas o casi blancas y pequeña estatura. Los pacientes que padecen este tipo de os-

teogénesis imperfecta tienen marcadas deformaciones óseas y generalmente no pueden caminar; también pueden presentar dentinogénesis imperfecta.

En la forma severa de osteogénesis imperfecta el colágeno tipo I contiene cadenas $\alpha 1$ que carecen de unos 100 residuos o tiene una cadena $\alpha 2$ más corta. En otros casos una cisteína, arginina u otro aminoácido ha sustituido a la glicina en la región triple helicoidal de una cadena $\alpha 1$. Algunos pacientes poseen deleciones en las cadenas pro- $\alpha 2$ del colágeno tipo I lo que ocasiona que la cadena sea incorporada en el colágeno sin que se haya eliminado el péptido amino-terminal o carboxilo-terminal dando una proteína con poca estabilidad. En otros casos, las sustituciones de aminoácidos en la cadena $\alpha 2$ provocan la formación de cadenas con excesivas modificaciones postraduccionales. Algunas veces, la cadena $\alpha 2$ no es incorporada en la triple hélice y el colágeno tipo I formado contiene tres cadenas $\alpha 1$.

Existe una correlación entre la posición de la mutación en la molécula de colágeno tipo I y la severidad de la osteogénesis imperfecta. Normalmente las mutaciones cercanas al extremo carboxilo terminal son letales, mientras que el fenotipo es más leve cuando la mutación tiene lugar en el extremo amino terminal. La razón de esto es que la formación de la triple hélice procede en forma de cremallera desde el extremo carboxilo terminal hasta el amino terminal. Cualquier mutación que interfiera con el plegamiento puede desestabilizar potencialmente la triple hélice y las regiones amino terminales a la mutación pueden permanecer más tiempo en conformación no helicoidal y por tanto sufrir más modificaciones postraduccionales (dado que las hidroxilasas y las glicosiltransferasas sólo son activas en cadenas no helicoidales). La extensión de tales sobremodificaciones es inversamente proporcional a la distancia de la mutación del extremo carboxilo terminal. Un hallazgo frecuente en las osteogénesis imperfectas es que el procolágeno tipo I está muy modificado; por ejemplo, el procolágeno presenta un alto contenido en hidroxilisina e hidroxilisina glicosilada. La explicación más probable para estas observaciones es que las cadenas pro- α tengan cambios en su estructura que retrasen el tiempo de enrollamiento para formar la triple hélice. Cualquier condición que retrase la formación de la hélice producirá *per se* una alteración estructural, ya que el plegamiento en una triple hélice normal termina y limita la extensión de las modificaciones postraduccionales.

La severidad del fenotipo también depende de la naturaleza del aminoácido que sustituye a la glicina. La mayoría de mutaciones disminuyen la temperatura de fusión (temperatura a la que se produce la disociación de la estructura cuaternaria de la triple hélice de colágeno) unos pocos grados, pero esto es suficiente para desnaturalizar la triple hélice a temperaturas fisiológicas y por tanto impedir que el colágeno se exporte a la matriz extracelular. Entonces, las moléculas desnaturalizadas se acumulan dentro de las células y son degradadas lentamente, por lo que se produce menos matriz extracelular.

Dermatosparaxis

La dermatosparaxis es una enfermedad que se presenta en el ganado y se caracteriza porque la piel se vuelve extremadamente frágil. Las cadenas de colágeno se encuentran desorganizadas y carecen de la capacidad para formar fibras. La procolágeno peptidasa que elimina el péptido del extremo amino terminal de las cadenas de procolágeno es aparentemente deficiente. Una enfermedad similar en humanos es el síndrome de Ehlers-Danlos, que en muchos casos está acompañado de dislocaciones articulares recurrentes y curvatura de la columna vertebral. La procolágeno peptidasa está en muchos casos ausente. En otros casos una persona sintetiza una cadena pro- $\alpha 2$ anormal que es resistente al ataque de la peptidasa porque existe una deleción en la diana habitual de esta enzima. En otros casos, el colágeno se forma en pequeñas cantidades y es degradado rápidamente. Algunos individuos carecen de la lisil hidroxilasa y otros tienen un defecto en el procesamiento del mRNA y sintetizan cadenas pro- $\alpha 2$ más cortas.

Síndrome de Ehlers-Danlos

El síndrome de Ehlers-Danlos (SED) agrupa a un conjunto heterogéneo de trastornos del tejido conectivo, caracterizados por hiperlaxitud articular, hiperextensibilidad de la piel, fragilidad de los tejidos, vasos sanguíneos que se deterioran fácilmente y, en pocas ocasiones, ruptura de órganos internos. El síndrome de Ehlers-Danlos ha sido clasificado en nueve tipos diferentes basados principalmente en sus manifestaciones clínicas (tabla 1.4). Algunas formas son causadas por defectos genéticos para los procolágenos tipo I y III, otras por defectos en las enzimas requeridas para el procesamiento del procolágeno tipo I.

El tipo IV del síndrome de Ehlers-Danlos es una enfermedad rara pero severa, ya que puede estar asociada con problemas cardiovasculares e incluso ruptura de grandes arterias y órganos. Debido a la fragilidad capilar, los pacientes que sufren esta enfermedad se caracterizan por presentar moretones frecuentes, a veces sin causa aparente. Entre otros problemas vasculares destacan el prolapso de la válvula mitral y condiciones más graves como aneurismas cerebrales y rupturas arteriales. En este tipo de SED por lo general las articulaciones no son hipermovibles. Estos enfermos tienen sólo hiperlaxitud en las pequeñas articulaciones de las manos. Son capaces de extender las articulaciones de los dedos más allá de lo normal. Como también tienen fragilidad de la mayoría de los tejidos, pueden tener otras complicaciones como problemas de columna, varices, hernias, escoliosis, pie plano, tendencia a la artrosis y osteoporosis a temprana edad, etc. Todos los pacientes presentan aparentemente un defecto en el procolágeno tipo III.

Un grupo de variantes tiene velocidad reducida de síntesis de cadenas pro- $\alpha 1$ (III) en fibroblastos cultivados. En otro grupo las cadenas de pro- $\alpha 1$ (III) son sintetizadas a velocidad

normal, pero la secreción de procolágeno tipo III está disminuida. Por analogía con los defectos vistos en la osteogénesis imperfecta, estas variantes probablemente involucren cambios en la estructura primaria de las cadenas pro- $\alpha 1$ (III), que evitan o retrasan el enrollamiento de las cadenas en una triple hélice y por lo tanto interfieren en la secreción normal de colágeno. Esta conclusión está sustentada por la observación de que los fibroblastos de algunos pacientes presentan cisternas ampliamente dilatadas en su retículo endoplásmico rugoso. En otra variante los fibroblastos secretan cantidades normales de procolágeno tipo III, pero la proteína contiene cadenas normales de pro- $\alpha 1$ (III) y cadenas pro- $\alpha 1$ (III) con movimiento electroforético más lento, a causa de una alteración en la secuencia de aminoácidos de la cadena. El procolágeno tipo III que contiene cadenas anormales es, habitualmente, sensible a la digestión por proteasas y por lo tanto se puede degradar rápidamente *in vivo*.

Tabla 1.4. Clasificación del síndrome de Ehlers-Danlos según las manifestaciones clínicas y el modo de herencia.

Tipo	Hipermovilidad articular	Extensibilidad de la piel	Fragilidad	Contusiones	Otros síntomas	Herencia
I	Marcada	Marcada	Marcada	Marcadas	Hernias, ruptura prematura de las membranas fetales	AD
II	Marcada	Moderada	Ausente	Moderadas		AD
III	Marcada	Mínima	Mínima	Mínimas		AD
IV	Limitada a las articulaciones pequeñas	Mínima	Marcada	Marcadas	Ruptura de grandes arterias e intestino; piel fina y trama venosa prominente	AD o AR
V	Mínima	Moderada	Moderada	Moderadas		XR
VI	Moderada	Moderada	Leve	Moderadas	Ruptura ocular; escleróticas azules y otras anomalías oculares; a veces escoliosis	AR
VII	Marcada	Moderada	Moderada	Moderadas	Dislocaciones múltiples	AR o AD
VIII	Moderada	Moderada	Moderada	Moderadas	Periodontitis avanzada	AD
IX	Leve	Leve	Ausente	Ausentes	Divertículos en la vejiga con ruptura espontánea, hernias y anomalías esqueléticas, laxitud cutánea	XR o AR

*AD: autosómico dominante; AR: autosómico recesivo; XR: ligado al cromosoma X.

El tipo III del síndrome de Ehlers-Danlos es uno de los más frecuentes. Para muchos autores se conoce como el *Síndrome de Hiper movilidad Articular*. En él predomina la laxitud articular, pero no siempre es generalizada.

Lo característico del tipo VI del síndrome de Ehlers-Danlos son los cambios oculares que con frecuencia conducen a la ruptura ocular. Son comunes también las deformidades esqueléticas severas y la hiperextensibilidad de la piel. En algunos casos se ha encontrado deficiencia en la enzima lisil hidroxilasa y un contenido disminuido de hidroxilisina en el colágeno tipo I de la piel y otros tejidos. El bajo contenido en hidroxilisina explica las manifestaciones clínicas, ya que este residuo es necesario para la formación de puentes transversales de colágeno más estables.

El tipo VII del síndrome de Ehlers-Danlos se caracteriza por la laxitud de las articulaciones, que es lo suficientemente severa como para producir dislocaciones de las rodillas y luxaciones irreductibles de las caderas.

En la forma VIIA los propéptidos N no se separan completamente del procolágeno tipo I a causa de una deficiencia en la aminoprocolágeno peptidasa. El procolágeno parcialmente procesado que contiene propéptido N forma fibrillas, pero éstas son delgadas y con morfología irregular.

El defecto molecular que presenta el tipo VIIB del síndrome es una alteración estructural de la cadena pro- $\alpha 2(I)$ que evita la escisión realizada por la aminoprocolágeno peptidasa. La consecuencia de este defecto es la persistencia de colágeno parcialmente procesado que contiene propéptido N de la cadena pro- $\alpha 2(I)$.

En el subtipo VIIC, las mutaciones disminuyen la actividad de la enzima procolágeno amino peptidasa.

Todas las variantes del tipo IX se caracterizan por presentar bajos niveles de cobre y ceruplasmina en el suero, pero con niveles elevados de cobre en la mayoría de las células. Los bajos niveles extracelulares de cobre probablemente disminuyan la formación de los puentes cruzados a causa de que la enzima catalizadora de esta reacción (la lisil oxidasa) requiere la presencia de este mineral. Los pacientes con este trastorno suelen presentar divertículos en la vejiga con rotura espontánea, hernia inguinal, moderados cambios cutáneos y anomalías esqueléticas.

El tipo V del síndrome de Ehlers-Danlos es un trastorno moderadamente severo en el que se han encontrado deficiencias en la lisil oxidasa en muchos pacientes; sin embargo, otras familias no presentan defecto alguno en esta enzima.

Latirismo

Algunos síntomas similares a los descritos en pacientes con síndrome de Ehlers-Danlos se observan en el latirismo, una enfermedad producida cuando los animales ingieren semillas de *Lathyrus odoratus*, el guisante de olor común. Dado que estas semillas también forman parte de la dieta de algunas personas, se han descrito casos de latirismo en humanos, en los que se observa la curvatura de la columna vertebral y la ruptura de la aorta. El problema bioquímico es la presencia de β -cianoalanina y su producto de descarboxilación β -aminopropionitrilo. Aunque el modo de acción no se conoce con certeza, este compuesto es un inhibidor de la lisil oxidasa, enzima esencial en el entrecruzamiento del colágeno y de la elastina.

Escorbuto

El escorbuto es una enfermedad carencial consecuencia de la deficiencia de vitamina C en la dieta. La vitamina C (ácido ascórbico) es un nutriente esencial de la dieta del hombre y otras pocas especies (primates, cobayas, algunos murciélagos y el perro dálmata) que carecen de la enzima L-gulonolactona oxidasa (EC 1.1.3.8), que es la última enzima en la ruta de biosíntesis del ácido ascórbico a partir de la glucosa.

El ácido ascórbico, además de actuar como un potente antioxidante, es esencial para la formación normal del colágeno, debido a que es un cofactor de la prolina hidroxilasa y la lisina hidroxilasa, que catalizan la conversión de prolina en 4-hidroxiprolina (o 3-hidroxiprolina) y de lisina en 5-hidroxilisina, respectivamente. Estas dioxigenasas requieren Fe^{2+} para catalizar la hidroxilación de estos residuos en el colágeno. La función del ácido ascórbico es proveer electrones para mantener en su estado ferroso al hierro que se encuentra en el sitio catalítico de las hidroxilasas y de esta forma estimular a la enzima.

Una vez terminados los procesos postraduccionales de hidroxilación y glicosilación se forma la triple hélice de procolágeno. La estabilización de ésta se logra mediante los diferentes puentes de hidrógeno que se forman entre las tres cadenas, los que se pueden establecer entre los grupos amino de los residuos de glicina y los grupos carbonilos de los residuos de la otra cadena, o bien entre los grupos hidroxilos de los residuos de hidroxiprolina y las moléculas de agua. De esta forma aparecen las interacciones cooperativas, ya que cada puente de hidrógeno es débil por sí solo, pero unidos logran la estabilización de la triple hélice.

Debido a esta función de los residuos de hidroxiprolina, la estabilidad térmica de la triple hélice está correlacionada con el contenido de aminoácidos (Pro e Hyp) en el colágeno. La temperatura de fusión del colágeno es aquella en la que se pierde la mitad de la estructura helicoidal y por tanto constituye un criterio de estabilidad. Se ha visto que la temperatura de fusión de un polipéptido artificial con la secuencia poli-(Gly-Pro-Pro) es de 24 °C, mientras

que la del poli-(Gly-Hyp-Pro) es de 58 °C, lo cual demuestra que la triple hélice está marcadamente estabilizada por la hidroxilación.

En condiciones normales, se forma la triple hélice después de la hidroxilación y entonces tiene lugar una rápida secreción del procolágeno. La inhibición de la formación de la hidroxiprolina, ya sea por la omisión del ascorbato o por adición de α,α' -dipiridil (sustancia que forma quelatos con el hierro) a un cultivo celular o de órganos conduce a un descenso en la secreción del colágeno.

Por esta razón, se supone que la deficiencia de vitamina C en la dieta produce fundamentalmente una disminución en la síntesis de procolágeno y una reducción en la hidroxilación de los residuos de prolina y lisina, obteniéndose una molécula menos estable a la temperatura corporal normal [24], lo que explica muchas de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. En el escorbuto, las procadenas α son defectuosas y no pueden formar la triple hélice, por lo que son degradadas inmediatamente. En consecuencia, debido a la pérdida progresiva del colágeno normal preexistente en la matriz, los vasos sanguíneos adquieren una extremada fragilidad produciéndose la rotura de capilares que conduce a la aparición de abundantes equimosis (moretones). Además, existe un defecto en la cicatrización de las heridas y se observa inflamación de las encías con pérdida de piezas dentarias, así como inflamación y dolor articular. Ello indica que en estos tejidos la degradación y la sustitución del colágeno son relativamente rápidas.

Durante mucho tiempo el escorbuto fue una enfermedad de origen desconocido típica de la tripulación de los barcos y se le atribuían los más curiosos orígenes, como por ejemplo, que era un mal debido a la sangre corrompida, se le echaba la culpa al frío de los mares e incluso a la madera verde de los barcos. Fue descrita por primera vez por Plinio al hablar de los soldados de Germánico en Flandes y más tarde por Estrabón en los ejércitos de Galio en Arabia, llegando a convertirse en una de las enfermedades epidémicas en la Edad Media que sufrían los navegantes que hacían grandes travesías en barco.

En 1498, la flota del portugués Vasco de Gama sufrió el escorbuto doblando el cabo de Buena Esperanza. En aquella época, a partir del comienzo de los largos viajes trasatlánticos, ningún marino se salvaba de esta enfermedad. Los navegantes españoles la llamaron 'la peste de las naos', los portugueses la conocían como 'mal de Loanda' y los ingleses 'peste del mar'. Ante el desconocimiento general de la época, surgieron numerosos y curiosos tratamientos con el fin de atajar la enfermedad, como el de suministrar sal, ácido fosfórico, mostaza, etc., a los marineros afectados, e incluso realizarles transfusiones con sangre de animales.

Los que verdaderamente se dieron cuenta del origen de la enfermedad, sin que sirviera de mucho en su momento, fueron Juan Federico Beachstrom, quien en la ciudad de Thorn (Polonia) en 1743 observó que tras una epidemia de escorbuto que produjo más de 5.000 víc-

timas, ésta desapareció al rendirse la plaza por lo que dedujo que era por la falta de frutas y verduras frescas, que era lo único que escaseaba en la ciudad. También John Pringue en 1763 llegó a la misma conclusión al observar el campo de prisioneros franceses de Sisinghurst-Castle en el condado de Kent.

Fue James Lind, médico de la marina inglesa, quien en 1747 descubrió el remedio del escorbuto. Este médico escogió a doce marineros afectados por la enfermedad e hizo seis grupos de dos marineros cada uno, a los que les suministró seis tratamientos diferentes para observar su evolución. Lind descubrió que sólo la pareja a la que se le suministraba zumo de limón y naranja como parte de la dieta evolucionaba favorablemente en su enfermedad. Aunque aún no se tenía identificado el agente causal de la enfermedad, sí que se conocía su remedio.

El descubrimiento de la vitamina C y su relación con el escorbuto se produjo en el siglo XX por el bioquímico Albert Szent-György (Premio Nobel de Medicina en 1937). En 1928, Albert Szent-György aisló el ácido ascórbico de la naranja, el limón, la col y la cápsula suprarrenal y lo obtuvo en forma cristalina, demostrando que su administración a cobayas, a las que se había inducido experimentalmente el escorbuto las curaba de la enfermedad. La denominación de ácido ascórbico otorgada a la vitamina C proviene justamente del vocablo inglés 'a-scurvy' que literalmente significa 'sin escorbuto'.

La vitamina C provoca un aumento de la transcripción, traducción y estabilidad del mRNA del procolágeno en una amplia variedad de tipos celulares [24]. Además, en estudios realizados en cobayas se ha visto que la síntesis de colágeno disminuye un 50% después de tres semanas bajo una dieta libre de ascorbato. Por otra parte, en el cartílago de las cobayas escorbúticas la síntesis de proteoglicanos disminuye al mismo tiempo que la síntesis de colágeno. Esta disminución de la síntesis del colágeno está acompañada por un descenso en la concentración del mRNA del procolágeno tipo II, mientras que en el hueso este efecto ocurre en el mRNA del procolágeno tipo I.

La importancia del ascorbato en la cicatrización de las heridas ha sido reconocida desde hace años. Dado que los humanos dependen de fuentes dietéticas de ascorbato, la deficiencia es común en personas mayores así como en personas enfermas o debilitadas. Tales pacientes necesitan un suplemento de ascorbato para una óptima cicatrización de sus heridas [25].

La información acerca de estas enfermedades del colágeno hace posible pensar que las enfermedades más comunes del tejido conectivo son 'multifactoriales' y que comprenden tanto componentes genéticos como ambientales [26].

De hecho, existen muchas razones que explican por qué las mutaciones en genes del colágeno podrían estar involucradas, como factores contribuyentes, en enfermedades relativamente comunes en la edad adulta y ancianos. Una es la consideración general de los tipos de

mutaciones en los genes del colágeno. Desde el ejemplo de unos pocos pacientes con osteogénesis imperfecta letal se podría pensar que en un extremo habría mutaciones en genes del procolágeno tipo I incompatibles con la vida. En el otro extremo es posible que un detallado examen de genes de distintos individuos revele 'mutaciones neutrales'; por ejemplo, cambios en los genes que modifiquen la secuencia de aminoácidos de la proteína pero que no tengan efectos sobre su normal funcionamiento. Entre estos dos extremos, de alguna manera, es posible que se encuentren mutaciones que tengan efectos sutiles y requieran un largo tiempo para manifestarse. Se pueden imaginar rápidamente mutaciones que no tengan manifestaciones aparentes durante la infancia y la juventud. Sin embargo, esas mutaciones podrían producir modificaciones en el tamaño o en otras características de las fibrillas de colágeno que hagan al tejido conectivo más o menos adaptable de lo normal para soportar las tensiones de 30 ó 40 años de confrontación con el medio. Estas mutaciones predispondrían a un individuo a sufrir una lenta manifestación de enfermedades crónicas como osteoporosis o artrosis [26]. De hecho, los defectos en el colágeno están relacionados con multitud de problemas esqueléticos incluyendo algunos casos de osteoartritis; la proteólisis de la red de colágeno forma parte del proceso de destrucción del cartílago y el daño articular en esta enfermedad.

Capítulo 2

El cartílago articular

El tejido cartilaginoso

El tejido cartilaginoso es una modalidad especializada de tejido conjuntivo de consistencia bastante rígida, que actúa como soporte de los tejidos blandos, reviste superficies articulares donde amortigua los choques, facilita los deslizamientos y es esencial para la formación y el crecimiento de los huesos largos.

Al igual que el resto de tejidos de la serie del conjuntivo, el cartílago está formado por un conjunto de células –los condrocitos– y una abundante matriz extracelular (figura 2.1). Los condrocitos contribuyen relativamente poco al volumen total del cartílago, normalmente alrededor del 10% o menos, y las principales propiedades funcionales del cartílago, como su rigidez, durabilidad o su capacidad para distribuir cargas están directamente relacionadas con la estructura y las propiedades de su matriz extracelular. El componente mayoritario de la matriz es el agua, junto a una elaborada red de macromoléculas, entre las que se incluyen colágenos, proteoglicanos y proteínas no colágenas, que organizan y mantienen el agua en la matriz. La función de las células es producir estas macromoléculas y renovarlas para mantener la matriz en estado normal.

En el embrión, los esbozos de los cartílagos aparecen en el mesénquima. Durante el desarrollo embrionario de los vertebrados, las células mesenquimatosas se redondean, retraen sus prolongaciones citoplasmáticas y se multiplican rápidamente formando conglomerados. Las células así formadas tienen un citoplasma muy basófilo y reciben el nombre de *condroblastos*. A continuación, estas células empiezan a sintetizar matriz extracelular, lo que las separa unas

de otras. La diferenciación de las células cartilaginosas procede del centro hacia la periferia, de modo que las células más centrales presentan ya las características de condrocitos, mientras que las más periféricas siguen siendo condroblastos típicos.

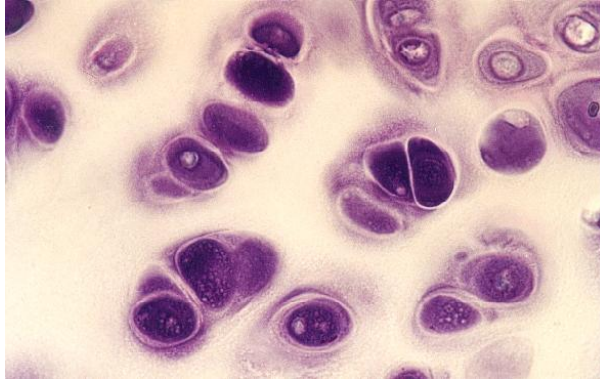


Figura 2.1. Microfotografía del cartílago con tinción de hematoxilina-eosina en la que se observa la escasa proporción de células de este tejido y la alta proporción de matriz extracelular. Los condrocitos se disponen formando los llamados *grupos isogénicos*.

El mesénquima que rodea la zona en la que se desarrolla el cartílago se mantiene estrechamente unido al cartílago que se está formando y se transforma en una capa de tejido conjuntivo denso conocida como *pericondrio*. En la parte externa de este mesénquima, las células mesenquimatosas tienden a diferenciarse en fibroblastos y formar fibras colágenas (*capa fibrosa del pericondrio*). En la parte interna del pericondrio, situada junto al tejido cartilaginoso, las células mesenquimatosas no se diferencian en fibroblastos, sino que quedan en estado relativamente indiferenciado, conservando su capacidad de formar condroblastos y condrocitos. Esta capa de células se denomina *capa condrógena del pericondrio* y es característica del cartílago joven, ya que, en la vida adulta, el pericondrio parece reducirse a su capa fibrosa.

Una vez constituido el cartílago, éste puede crecer de dos maneras diferentes: mediante crecimiento intersticial y crecimiento aposicional.

El crecimiento intersticial se produce por división mitótica de los condrocitos preexistentes, formándose así grupos de células, denominados *grupos isogénicos*, que pueden ser axiales (alineados) o coronarios (dispuestos en círculo), dependiendo de que el crecimiento sea en una dirección o en varias respectivamente. Los grupos isogénicos están formados por condrocitos que inicialmente están en contacto, ya que provienen de un mismo condrocito que se dividió por mitosis. Los nuevos condrocitos que se forman por este mecanismo pueden originar cada vez mayor proporción de sustancia intercelular. Con el crecimiento posterior, las células de los grupos isogénicos van quedando separadas entre sí por una franja de sustancia intercelular. La formación de nuevos condrocitos, con la consiguiente producción

de sustancia intercelular en el interior del cartílago, hace que éste aumente de volumen de dentro hacia fuera.

El segundo mecanismo en virtud del cual el cartílago puede aumentar de volumen es el que se denomina *crecimiento por aposición o acreción*. El crecimiento aposicional tiene lugar a partir de las células del pericondrio que se transforman en condroblastos y después en condrocitos, rodeándose de sustancia intercelular. Por este mecanismo se deposita una nueva capa de cartílago debajo del pericondrio y en la superficie del tejido cartilaginoso. Además, como las células profundas del pericondrio se dividen antes de diferenciarse, su número apenas disminuye en este proceso, por lo que quedan muchas en reserva por si es necesario un crecimiento adicional por este mecanismo. Cuando hay una fractura o solución de continuidad del cartílago, observamos una neoformación de tejido cartilaginoso a expensas del pericondrio, que empieza por formar un tejido rico en fibras, del tipo del fibrocartílago que se diferencia después hasta quedar constituido el cartílago.

En los dos casos, los nuevos condrocitos formados producen luego fibrillas colágenas y proteoglicanos, de modo que el crecimiento real es mucho mayor que el producido por el aumento en el número de células. El crecimiento intersticial es menos importante y prácticamente sólo tiene lugar en las primeras fases de vida del cartílago. A medida que la matriz se hace cada vez más rígida y densa, el crecimiento intersticial deja de ser viable, y el cartílago pasa a crecer únicamente por aposición.

El tejido cartilaginoso es avascular —no tiene vasos sanguíneos ni linfáticos—, por lo que debe nutrirse a través de los capilares del pericondrio o mediante difusión pasiva desde el líquido sinovial de las cavidades articulares. Dado que los cartílagos carecen de capilares sanguíneos, la oxigenación de los condrocitos es muy deficitaria, viviendo estas células con bajas tensiones de oxígeno. El tejido cartilaginoso degrada la glucosa principalmente por glicolisis anaeróbica, con formación de ácido láctico como producto final.

Para atender a las diversas necesidades funcionales del organismo, los cartílagos se clasifican en tres tipos: a) el **cartílago hialino**, que es el que se encuentra con más frecuencia y cuya matriz posee delicadas fibrillas formadas principalmente de colágeno tipo II; b) el **cartílago elástico**, que posee pocas fibras de colágeno (principalmente tipo II) y abundantes fibras de elastina, y c) el **cartílago fibroso** que presenta una matriz constituida principalmente por fibras de colágeno de tipo I.

El cartílago hialino

El cartílago hialino es el encontrado con más frecuencia, y por consiguiente el más estudiado, (figura 2.2). Forma el primer esqueleto del embrión que, posteriormente, es sustituido por un esqueleto óseo. En la vida adulta persiste en la pared de las fosas nasales, la tráquea, los

bronquios, en el extremo ventral de las costillas y recubriendo las superficies articulares de los huesos. Además, entre la diáfisis y la epífisis de los huesos largos en crecimiento se observa el disco epifisario de cartílago hialino, responsable del crecimiento del hueso en longitud.

Su nombre se debe a que, a simple vista, tiene un aspecto blanco-azulado, vidrioso (*hyalos*, vidrio) y traslúcido. Este aspecto se debe por completo a las características especiales de su matriz extracelular.

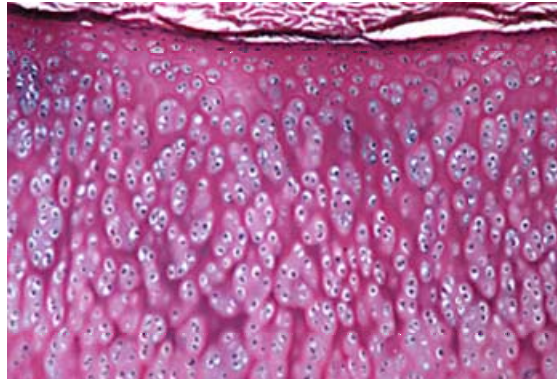


Figura 2.2. Cartílago hialino. El cartílago hialino se caracteriza por una matriz homogénea que envuelve a los condrocitos. El pericondrio rodea al cartílago hialino. Los condrocitos se forman en el pericondrio y, a medida que maduran, van profundizando en el tejido y secretando la matriz en la que quedan atrapados. Los grupos isogénicos resultan de la repetida división celular.

El colágeno constituye alrededor del 40% de los componentes orgánicos de la matriz cartilaginosa. Está formado principalmente por fibrillas de colágeno tipo II que se disponen como una red laxa en toda la matriz del cartílago hialino. Los principales glucosaminoglicanos son ácido hialurónico y proteoglicanos de condroitín y queratán-sulfato. En la matriz cartilaginosa, el ácido hialurónico se asocia con los proteoglicanos, por medio de proteínas de enlace formando agregados de gran tamaño. Los proteoglicanos interaccionan con el colágeno mediante uniones entre los grupos sulfato de los glucosaminoglicanos y los grupos básicos del colágeno. Esta asociación es responsable de la resistencia del cartílago a las presiones. El alto contenido de agua de solvatación unida a los grupos negativos de los glucosaminoglicanos actúa como un muelle biomecánico que absorbe los choques, lo que es de gran importancia funcional, especialmente en los cartílagos articulares. En el caso del cartílago hialino, la matriz extracelular está constituida por un 60-70% de agua.

Además de colágeno y proteoglicanos, la matriz contiene importantes glucoproteínas como la condronectina, responsable de la adherencia de los condrocitos a la matriz cartilaginosa.

Los condrocitos secretan colágeno y proteoglicanos a la matriz, la cual se renueva constantemente; presentan los orgánulos típicos para esta actividad, es decir, un retículo endoplásmico rugoso y un aparato de Golgi bien desarrollados.

Todas las piezas del cartílago hialino, excepto el cartílago articular, están envueltas por una capa de tejido conjuntivo, en su mayor parte denso –el pericondrio–, cuya integridad es fundamental para la vida del cartílago. Además de ser una fuente de nuevos condrocitos para el crecimiento, el pericondrio es responsable de la nutrición del cartílago, de su oxigenación y de la eliminación de los restos metabólicos, porque en él se localizan los vasos sanguíneos y linfáticos, inexistentes en el tejido cartilaginoso.

El cartílago fibroso o fibrocartílago

El cartílago fibroso o fibrocartílago no existe en el hombre más que en los discos intervertebrales, en la sínfisis del pubis, en los puntos de inserción de los tendones y en los meniscos.

Es un tejido con características intermedias entre el conjuntivo denso y el cartílago hialino. La matriz intercelular, muy parecida a la del cartílago hialino, se caracteriza por la abundancia de fibras colágenas, pero en este caso se trata de colágeno tipo I. Frecuentemente los condrocitos forman hileras alargadas (figura 2.3) y las fibras de colágeno tipo I constituyen haces que, o siguen una orientación aparentemente irregular entre los condrocitos, o una disposición paralela a lo largo de hileras de condrocitos, dependiendo de la dirección de la fuerza que actúa sobre el fibrocartílago, ya que los haces colágenos suelen disponerse paralelamente a las tracciones ejercidas sobre ellos.

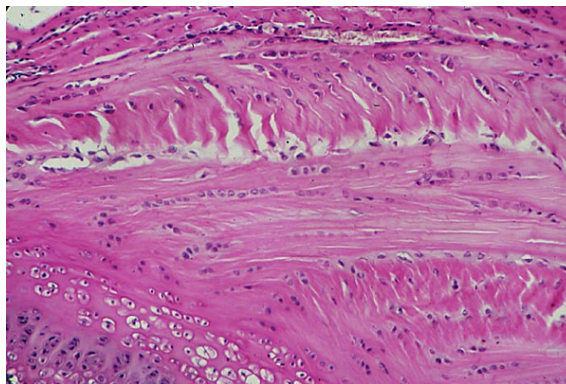


Figura 2.3. Cartílago fibroso o fibrocartílago. En esta variedad de tejido cartilaginoso los condrocitos son más escasos y más pequeños que en el cartílago hialino o en el cartílago elástico, y suelen disponerse formando hileras. Además, no hay grupos isogénicos ni pericondrio.

El cartílago elástico

La estructura del cartílago elástico es parecida a la del cartílago hialino aunque incluye, además de fibras de colágeno tipo II, una abundante red de fibras elásticas que se continúan con las del pericondrio. Además, hay mayor densidad celular que en el cartílago hialino. Las fibras de colágeno abundan sobre todo bajo el pericondrio, donde hay menos fibras elásticas.

El cartílago elástico es poco abundante. Se encuentra en lugares en los que se necesita un tejido resistente pero muy elástico, como en el pabellón de la oreja, en la trompa de Eustaquio, en la epiglotis y en el cartílago cuneiforme de la laringe.

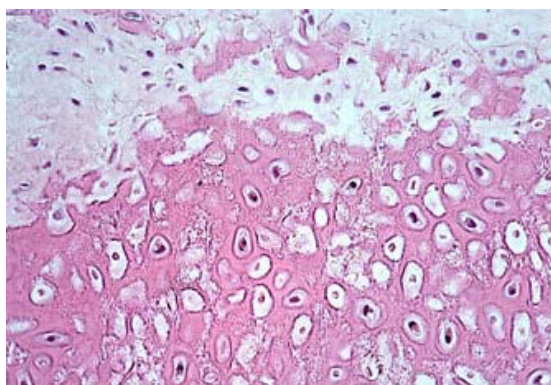


Figura 2.4. Cartílago elástico. Este cartílago se caracteriza por su mayor contenido en fibras elásticas y una mayor densidad celular con respecto a otras variedades de tejido cartilaginoso.

Las articulaciones sinoviales o diartrosis

La función de las articulaciones es proporcionar movilidad y estabilidad a los segmentos óseos que se relacionan en ellas. Las articulaciones humanas se clasifican, en general, según la amplitud de movimiento que permiten. De esta forma se distinguen tres tipos de articulaciones: las articulaciones inmóviles (*sinartrosis*), las levemente móviles (*anfartrosis*) y las móviles (*diartrosis*). Otra clasificación las ordena basándose en la naturaleza del tejido conectivo presente en la articulación. Las dos clasificaciones se relacionan porque los huesos constituyentes de las articulaciones inmóviles o levemente móviles están conectados por tejido cartilaginoso (*sincondrosis*) o por tejido conectivo fibroso (*sindesmosis*); mientras que los componentes óseos de las articulaciones móviles están, aunque revestidos por cartílago, separados completamente, y contienen entre ellos la cavidad articular revestida por la membrana sinovial (*articulaciones sinoviales*).

Las **articulaciones fijas o sinartrosis** no permiten prácticamente ningún tipo de movimiento a los segmentos óseos involucrados. Se encuentran por lo general en el cráneo donde las placas óseas que confluyen para articularse están unidas por elementos fibrosos o cartilaginosos.

Las **articulaciones semimóviles o anfartrosis** están caracterizadas por la presencia de discos aplanados de fibrocartílago que conectan las superficies articulares. Dichas articulaciones se ubican entre las vértebras, la articulación tibioperonea inferior y la sínfisis pubiana.

Las **articulaciones sinoviales** comprenden la mayoría de articulaciones del cuerpo y se caracterizan por el amplio rango de movimientos casi sin fricción. Las articulaciones sinoviales también reciben el nombre de diartrosis (*di*, separado; *arthrom*, articulación) porque los dos huesos que las constituyen están separados por un espacio, *el espacio articular o cavidad de la articulación*. Estas articulaciones están formadas por varios tejidos, entre los que se incluyen la cápsula articular, los ligamentos, los meniscos, el hueso subcondral, el tejido sinovial y el cartílago articular hialino (figura 2.5).

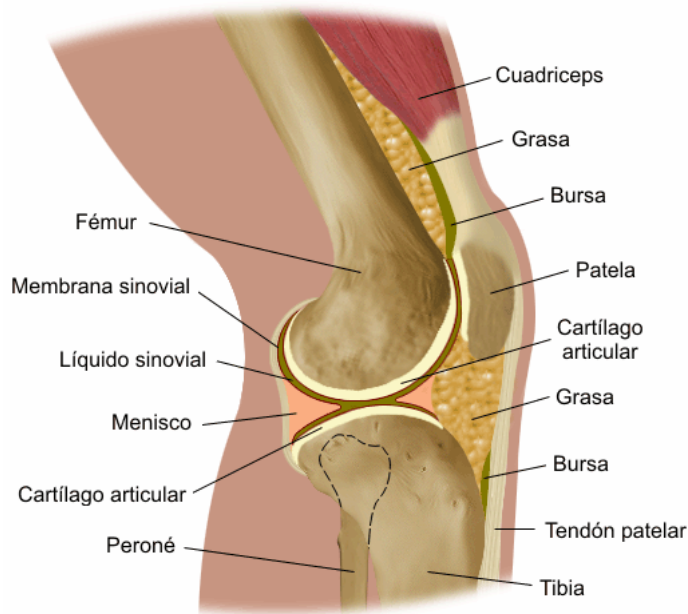


Figura 2.5. Esquema de una articulación sinovial o diartrosis. El cartílago articular cubre los extremos de ambos huesos permitiendo que el desplazamiento de las superficies óseas se realice con un bajo coeficiente de fricción. La cara interna de la cápsula de la articulación está formada por la membrana sinovial que secreta el líquido sinovial en la cavidad articular. Este líquido sinovial actúa como un lubricante, facilitando el movimiento, y como una sustancia nutritiva para el cartílago articular adyacente. En algunas articulaciones sinoviales un disco intraarticular de fibrocartílago, el menisco, divide la cavidad de la articulación parcial o completamente.

El tejido que más contribuye a las funciones de las articulaciones diartrodiales es el **cartílago articular**, pues permite el deslizamiento de las superficies óseas sin que se produzca fricción entre ellas.

El movimiento de las superficies cartilaginosas, la una sobre la otra, proporciona la movilidad articular, pero las articulaciones deben tener también estabilidad para prevenir movimientos en planos anormales o una fricción excesiva al soportar peso. La estabilidad es proporcionada por la configuración ósea de la articulación y los músculos que la controlan. Además, existen estructuras accesorias que ayudan a mantener la integridad de la articulación, como son la cápsula fibrosa y los ligamentos.

La **cápsula fibrosa** está formada por tejido conectivo que reviste totalmente a la articulación y se inserta en el hueso, usualmente cerca de las superficies articulares. Está constituida por láminas de fibras de colágeno que van desde el periostio de un hueso al del otro. Es relativamente poco elástica, gracias a lo cual contribuye a mantener la estabilidad de la articulación.

Los **ligamentos** de una articulación representan engrosamientos de la cápsula en forma de cordones formados por fibras de colágeno paralelas. Cerca de las inserciones, la estructura de los ligamentos se modifica y pasa a constituir fibrocartílago.

Aunque existe alguna variación, según el sitio que se estudie, los ligamentos articulares y la cápsula son muy uniformes en su aspecto histológico, composición química y organización tisular. Estas estructuras están formadas principalmente por haces paralelos o fascículos de colágeno, con escasa población de fibroblastos. Existen vasos sanguíneos entre los fascículos fibrosos e incluso puede aparecer alguna fibra nerviosa. El colágeno de los ligamentos y de la cápsula es principalmente de tipo I, similar, pero no idéntico en su composición bioquímica, grado de glicosilación y formación de puentes transversales, al encontrado en la dermis y en el hueso. El diámetro de las fibras de colágeno varía entre 150 y 1.500, y ocasionalmente se dispone entre ellas alguna fibra elástica. El conjunto de las proteínas fibrosas (colágeno y elastina) constituye más del 90% del peso seco del tejido; el resto está formado fundamentalmente por proteoglicanos. Los ligamentos y las cápsulas de los mamíferos están hiperhidratados con un contenido de agua cuya estimación llega aproximadamente al 70%.

La capa más interna de la cápsula articular constituye la **membrana sinovial**, que reviste toda la articulación excepto en el cartílago articular. Está abundantemente provista de vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. Este plexo de vasos sanguíneos que nutre la membrana sinovial es responsable de la transferencia de los constituyentes de la sangre a la cavidad articular, y de la formación del líquido sinovial. El líquido sinovial es un ultrafiltrado o dializado de la sangre secretado por las células sinoviales, que contiene ácido hialurónico, y que es responsable de la nutrición del cartílago articular y de la lubricación de la articulación, reduciendo las fricciones entre los extremos óseos. Todos los componentes del líquido sinovial, excepto

el ácido hialurónico, derivan del plasma que circula por los capilares de la membrana sinovial. La entrada de sustancias en el líquido sinovial y su salida dependen de las dimensiones moleculares. Los cristaloides difunden rápidamente en ambas direcciones; esto es importante para el tratamiento de las enfermedades articulares, ya que los fármacos solubles administrados a un paciente pueden alcanzar rápidamente sus líquidos sinoviales. Los gases también difunden rápidamente en ambas direcciones. Las proteínas abandonan el líquido sinovial siguiendo la vía linfática. Las partículas grandes tienen que eliminarse por fagocitosis. Aunque las células sinoviales tienen cierta capacidad fagocítica, la mayor parte de la fagocitosis corre a cargo de los macrófagos. El ácido hialurónico, gracias a su elevada viscosidad, confiere su carácter gelatinoso al líquido sinovial normal, convirtiéndolo en el lubricante ideal de las superficies articulares. Esta sustancia, cuyo peso molecular promedio excede el millón de daltons, es responsable del flujo tixotrópico característico del líquido sinovial (cuanto más viscoso, más lento fluye).

Ciertas articulaciones del organismo tienen dentro de sus cavidades porciones discoides fibrocartilaginosas completas o incompletas, planas, triangulares o de forma algo irregular, conocidas como *meniscos*. Los meniscos aparecen normalmente sólo en las articulaciones de la rodilla, temporomandibular, esternoclavicular, radiocubital distal y acromioclavicular. Los análisis de los tipos de articulaciones que contienen meniscos muestran que son básicamente articulaciones tipo 'bisagra' que además rotan. Para lograr este tipo de movilidad, los bordes de la bisagra han sido redondeados, y son los meniscos los que ocupan dichos huecos. Los meniscos actúan como 'arandelas' en las articulaciones, aumentando el área de contacto y la estabilidad. Los meniscos soportan carga y también actúan como absorbentes de la tensión.

La **placa subcondral** sobre la que se asienta el cartílago calcificado es más fina que el hueso cortical de la mayoría de las áreas y puede contener una cantidad variable de sistemas de Havers maduros. La distribución de estos sistemas parece ser paralela a la articulación en vez de paralela al eje mayor del hueso.

El cartílago articular

El cartílago articular es una variedad de cartílago hialino que recubre las superficies óseas en las articulaciones diartrodiales, y en gran medida es el responsable del movimiento, prácticamente sin fricción, de las superficies articulares una contra la otra. Aunque tan sólo tiene unos pocos milímetros de grosor (2-4 mm), posee una sorprendente resistencia a la compresión, una gran elasticidad, así como una excepcional habilidad para distribuir cargas. Esto proporciona una superficie con una inigualable baja fricción, que puede ser deformada y recuperar su forma original, absorber los impactos y soportar fuerzas de cizallamiento, y a

pesar de ello resistir el desgaste hasta un grado notable. Así se consigue minimizar los picos de estrés sobre el hueso subcondral.

El cartílago articular varía en grosor, densidad celular, composición y propiedades mecánicas en una misma articulación, entre articulaciones y entre especies; sin embargo, en todas las articulaciones sinoviales tiene los mismos componentes, la misma estructura general y desarrolla las mismas funciones. A simple vista, el cartílago articular adulto parece ser un tejido inerte. Sin embargo, el estudio detallado de la morfología y la biología del cartílago articular adulto demuestra que es un tejido elaborado, con una estructura altamente ordenada, y con una gran variedad de interacciones entre los condrocitos y la matriz que permiten el mantenimiento del tejido.

El cartílago articular no tiene vasos sanguíneos, linfáticos o nervios en su interior. La falta de vasos sanguíneos es una apreciable ventaja funcional. En condiciones fisiológicas, el cartílago puede ser comprimido hasta un nivel del 40% de su altura original; si lo atravesaran los vasos, quedaría inutilizado. De acuerdo con la velocidad de difusión del tejido y los requerimientos metabólicos de las células, se ha calculado que el grosor máximo del cartílago que asegura la viabilidad de los condrocitos es de 6 mm.

Algunos autores no hacen distinciones entre este cartílago y el hialino; sin embargo, el cartílago articular presenta algunas características propias. Consta de cuatro capas:

- Superficial: capa más externa con condrocitos aplanados y pequeños, dispuestos paralelamente a la superficie articular.
- Capa de transición: células redondeadas u ovaladas dispuestas al azar.
- Capa medial: células grandes y casi totalmente redondas, distribuidas en columnas perpendiculares a la superficie.
- Capa de cartílago calcificado: en la que la sustancia intercelular se encuentra calcificada. Durante el periodo de crecimiento esta capa es sustituida de manera más o menos constante por hueso, en tanto que las células cartilaginosas de las capas superiores proliferan por mitosis. A continuación viene la lámina ósea subcondral, resultante de la osificación del cartílago calcificado.

Además, el cartílago articular no está cubierto por pericondrio, de modo que su crecimiento sólo puede ocurrir por el mecanismo intersticial, y éste parece estar limitado al periodo de crecimiento del esqueleto.

Composición del cartílago articular

Como otros tejidos conectivos, el cartílago articular está formado por células y matriz extracelular, constituida por agua y un esqueleto de macromoléculas y, como otros tejidos conectivos, el cartílago articular debe sus propiedades mecánicas a su matriz extracelular. En los tejidos parenquimáticos, más del 95% del volumen del tejido está formado por células, mientras que en los tejidos conectivos, y en particular en el cartílago articular, más del 95% de su volumen está compuesto por matriz extracelular. Los condrocitos son el único tipo de célula y contribuyen muy poco al volumen total del tejido: menos del 5% del volumen del cartílago articular adulto; en otras especies, especialmente en animales pequeños como los ratones, ratas y conejos, la densidad celular es muy superior a la de los humanos. Cada condrocito puede considerarse como una unidad funcional desde el punto de vista metabólico, separada de otras células vecinas, y responsable de la síntesis y mantenimiento de la matriz extracelular que lo rodea.

Condrocitos

En el cartílago articular normal sólo existe un único tipo celular: el altamente especializado condrocito (figura 2.6). Los condrocitos de las distintas zonas del cartílago difieren en tamaño, forma y probablemente actividad metabólica. En la zona superficial se encuentran aplastados y paralelos a la superficie; en la zona de transición son más o menos ovoides y orientados al azar; en la zona perpendicular o radial, suelen ser más voluminosos y redondeados, y se disponen en cortas columnas. Todos contienen los orgánulos necesarios para la síntesis de la matriz, incluyendo el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Normalmente también contienen filamentos intracitoplasmáticos, lípidos, glucógeno y vesículas secretoras y al menos algunos condrocitos tienen pequeños cilios que se extienden desde la célula hacia la matriz. Estas estructuras deben tener un papel en la percepción de cambios mecánicos en la matriz.

Como otros tejidos cartilagosos, los cartílagos articulares son avasculares y alinfáticos. En los animales adultos, los condrocitos se alimentan de los nutrientes del fluido sinovial, los cuales, para llegar a las células, deben atravesar una doble barrera de difusión: primero el tejido sinovial y el fluido sinovial y luego la matriz del cartílago. Esta última barrera es bastante selectiva, con respecto al tamaño, la carga y otras características como la configuración molecular. La naturaleza de este sistema deja a los condrocitos con una baja concentración de oxígeno en comparación con la de otros tejidos, por lo que estas células dependen principalmente del metabolismo anaeróbico.

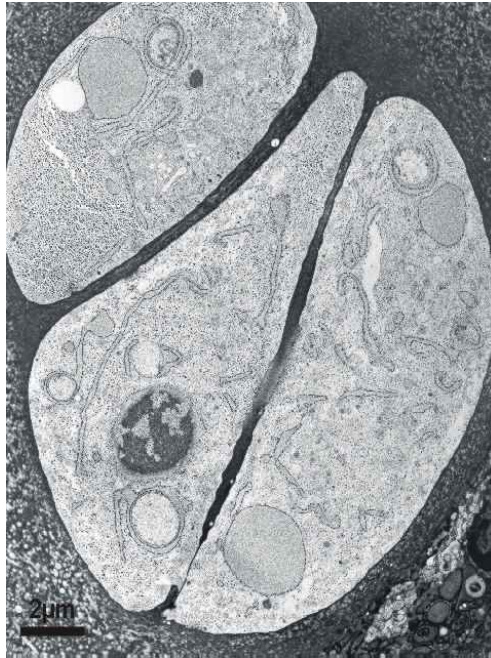


Figura 2.6. Micrografía electrónica de condrocitos del cartílago. El núcleo es fuertemente basófilo, mide de 2 a 4 micras y se sitúa excéntricamente. El retículo endoplásmico rugoso es prominente y forma grandes cisternas. Contiene un aparato de Golgi bien desarrollado, aunque este hecho está condicionado por el momento funcional del cartílago, así como por la longevidad del condrocito. El glucógeno se deposita en pequeños focos periféricos o en grandes lagunas.

Los condrocitos individuales son muy activos metabólicamente (poseen una alta actividad glicolítica), pero la actividad metabólica total del tejido es baja debido a la baja densidad celular. Aunque las células no lleguen a suponer más del 5% del cartílago no están carentes de importancia, pues son las responsables del mantenimiento de la matriz extracelular. La principal y quizás la única función del condrocito es la síntesis y mantenimiento de la matriz. La síntesis de colágeno tipo II, agregados de proteoglicanos y proteínas no-colágenas específicas, así como la organización de estas moléculas para formar una matriz cartilaginosa, son características que permiten distinguir a los condrocitos maduros de otras células.

Matriz extracelular

Las propiedades biológicas y mecánicas del cartílago articular están directamente relacionadas con la composición y estructura de una matriz extracelular altamente organizada, la cual puede ser considerada como una red macromolecular formada por dos componentes mayoritarios: el colágeno, que constituye aproximadamente el 60% del peso seco del cartílago, y los

proteoglicanos que suponen un 25-35%. En realidad, la mayor parte del peso fisiológico del cartílago articular corresponde al agua unida a los proteoglicanos que llega a alcanzar casi el 80% del peso del cartílago.

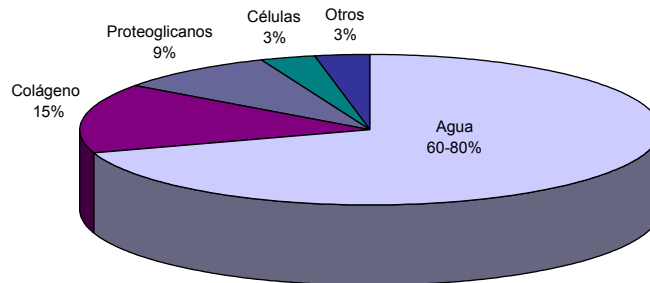


Figura 2.7. Representación esquemática de la composición molecular del cartílago articular. El agua es el componente mayoritario. Del resto de componentes el colágeno supone más del 50%. Otro importante constituyente del cartílago articular en términos de funcionalidad son los proteoglicanos, las principales moléculas que atrapan agua en la matriz del cartílago.

Fluido tisular

El líquido tisular supone un 60-80% del peso húmedo del cartílago articular y está compuesto por agua, intercambiable con el líquido sinovial, con gases disueltos, pequeñas proteínas, metabolitos y una alta concentración de cationes para equilibrar las cargas negativas de los proteoglicanos. El alto contenido en agua diferencia al cartílago de la mayoría de tejidos conectivos, proporcionando efectos esenciales para las propiedades materiales del tejido y participando en la lubricación de la articulación.

El volumen, concentración, organización y comportamiento de este fluido tisular depende de su interacción con las macromoléculas estructurales de la matriz, especialmente los grandes agregados de proteoglicanos que ayudan a mantener el fluido en la matriz y la concentración de electrolitos en el fluido. Dado que estas moléculas tienen un gran número de grupos sulfato y carboxilo cargados negativamente, que atraen iones cargados positivamente y repelen iones cargados negativamente, aumentan la concentración de iones positivos como el sodio y disminuyen la de iones negativos como el cloruro. El aumento en la concentración total de iones inorgánicos provoca un aumento en la osmolaridad del tejido. La red de colágeno resiste la presión osmótica provocada por los iones inorgánicos asociados con los proteoglicanos. Si estas macromoléculas no mantuviesen y organizarasen el líquido tisular e impidiesen que fluya a través de la matriz, el cartílago perdería su facultad para resistir la compresión, así como su capacidad para contribuir a la lubricación de la articulación. Como las células dependen de la difusión de nutrientes y metabolitos a través de la matriz, la función de los

condrocitos también depende de la interacción del líquido tisular y de las macromoléculas de la matriz.

Macromoléculas estructurales

Las macromoléculas estructurales del cartílago articular constituyen un 20-40% del peso húmedo del tejido e incluyen colágenos, proteoglicanos y proteínas no-colágenas. El colágeno supone aproximadamente un 50-60% del peso seco del cartílago, los proteoglicanos un 25-35% y las proteínas no colágenas un 15-20%. La red de colágeno fibrilar proporciona al cartílago su forma y fuerza de tensión. Los proteoglicanos y las proteínas no-colágenas se unen a la red de colágeno o quedan mecánicamente atrapados en ella y el agua llena los huecos de este esqueleto molecular. Algunas proteínas no colágenas favorecen la organización y estabilización de este soporte macromolecular, mientras que otras ayudan a los condrocitos a unirse a las moléculas de la matriz.

El cartílago articular también contiene otros materiales en pequeñas cantidades. Aproximadamente del 5 al 6% del tejido está en forma de constituyentes inorgánicos, la mayoría de los cuales son sales de calcio (fundamentalmente hidroxapatita). Los lípidos y la lisozima representan cada uno el 1% del peso seco.

Colágenos

El principal componente estructural del cartílago articular es el colágeno tipo II, pues supone un 90-95% del total del colágeno presente en este tejido. Además, existen otros colágenos cuantitativamente minoritarios, el colágeno tipo IX (1% del total del colágeno del cartílago), tipo XI (3%) y en menor cantidad los tipos VI (menos del 1%) y X, éste último restringido a las zonas hipertrófica y calcificada de la placa de crecimiento y la capa calcificada del cartílago articular maduro.

El colágeno tipo II está organizado en forma de una compleja red tridimensional que constituye el esqueleto del cartílago y le confiere su gran capacidad de tensión y fuerza, así como la habilidad de mantener su forma y volumen bajo presión, y contribuye a la cohesión del tejido al retener mecánicamente a los proteoglicanos.

La molécula de colágeno tipo II se compone de tres cadenas $\alpha 1(\text{II})$ idénticas, codificadas por el gen COL2A1, que se sintetizan y secretan como precursores solubles en forma de procolágeno. Después de que se eliminen los péptidos de sus extremos amino y carboxilo terminal por dos amino y carboxilo-proteasas respectivamente, se unen para formar las fibras triple helicoidales que se incorporan a la red de colágeno. Entre las moléculas de la familia intersticial de colágenos (tipos I, II y III), el colágeno tipo II es el más resistente a la acción degradativa de la colagenasa de los mamíferos.

La gran importancia del colágeno tipo II en la fisiología del cartílago se refleja en las consecuencias de las mutaciones del gen COL2A1, que originan alteraciones que van desde muertes intrauterinas, como la acondrogenesia tipo II, hasta displasias espondiloartropáticas con muy poca repercusión [27]. En estudios realizados en cartílagos de personas con mutaciones en este gen, se ha encontrado una gran proporción de las moléculas $\alpha 1$ (II) alteradas, que se unen entre sí formando fibrillas e incorporándose a la red, pero provocan una alteración estructural o metabólica de la matriz extracelular, que en algunos casos se debe a un aumento de susceptibilidad de estas fibras a las proteasas que no atacan a las fibras de colágeno II normales [28]. En muchos casos, estas alteraciones en el gen COL2A1 provocan la aparición temprana de artrosis.

El colágeno tipo IX es un heterotrímero compuesto por tres cadenas codificadas por genes distintos [$\alpha 1$ (IX) $\alpha 2$ (IX) $\alpha 3$ (IX)], cada una de ellas con cuatro dominios no colágenos (NC1-NC4) y tres dominios colágenos (COL1-COL3) [17]. Una o posiblemente dos cadenas de condroitín sulfato parecen estar localizadas el dominio NC3 de la cadena $\alpha 2$, por lo que el colágeno tipo IX se puede incluir también en el grupo de los proteoglicanos [20,21,29]. Las moléculas de colágeno tipo IX se unen covalentemente, entre sí y a la superficie de las fibras de colágeno II en dirección antiparalela, y así funcionan como puente de unión entre moléculas de colágeno y entre éstas y componentes no colágenos de la matriz, aumentando la estabilidad mecánica de la red tridimensional y la resistencia a los ataques enzimáticos, por lo que las mutaciones que originan alteraciones en esta conformación provocan importantes consecuencias en la fisiología articular [28]. Los ratones transgénicos que carecen del gen del colágeno tipo IX acaban desarrollando una degeneración del cartílago, similar a la observada en la artrosis humana.

El colágeno tipo XI representa solamente el 2-3% del colágeno presente en el cartílago adulto. Está compuesto por moléculas derivadas de tres genes [$\alpha 1$ (XI) $\alpha 2$ (XI) $\alpha 3$ (XI)]. Se localiza en el corazón de las fibrillas de colágeno tipo II y se cree que está implicado en la iniciación de la formación de las fibrillas, controlando la organización de las fibras de colágeno II, modulando su crecimiento lateral y limitando el diámetro de las fibras [29]. El colágeno tipo XI se une al condrocito y puede actuar controlando el procesamiento y la formación de fibrillas de colágeno tipo II en la superficie celular. Los ratones deficientes en colágeno tipo XI no pueden formar una red de colágeno funcional.

El colágeno tipo VI parece formar una parte importante de la matriz que rodea directamente a los condrocitos –matriz pericelular– y ayuda a mantenerlos sujetos a la matriz. El colágeno tipo X sólo aparece cerca de los condrocitos en la zona hipertrófica del cartílago, lo que sugiere su papel en la mineralización del cartílago.

Proteoglicanos

Los condrocitos también sintetizan proteoglicanos, los cuales, junto con el colágeno tipo II, constituyen los dos componentes principales de la matriz del cartílago articular. Los proteoglicanos del cartílago son macromoléculas constituidas por monómeros formados por una proteína lineal central, a la que se unen covalentemente muchas cadenas laterales de glucosaminoglicanos, fundamentalmente el condroitín 6-sulfato, el condroitín 4-sulfato y el queratán sulfato [30,31] (figura 2.8).

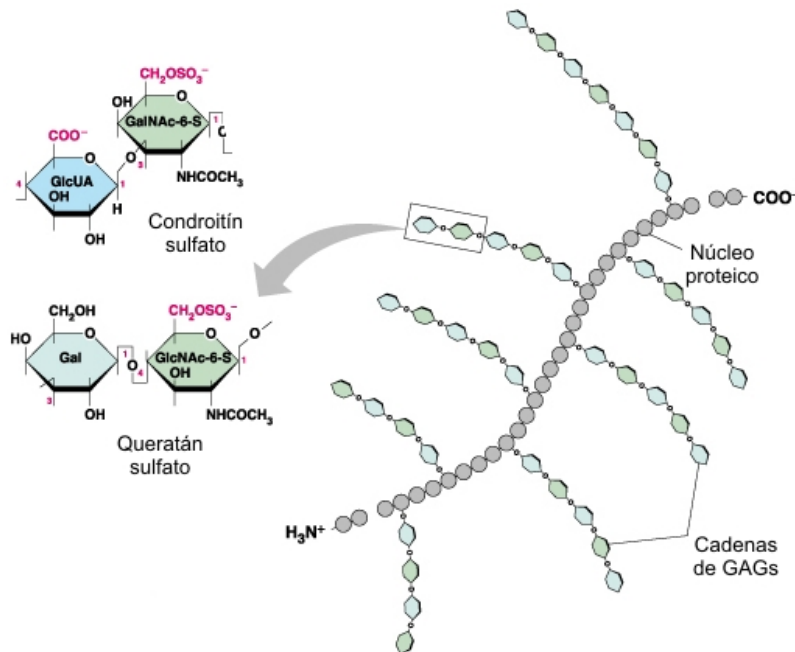


Figura 2.8. Modelo diagramático de la estructura de un monómero de proteoglicano del cartílago. Cada monómero está constituido por un centro proteico lineal al que se unen de forma covalente muchas cadenas laterales de glucosaminoglicanos.

El condroitín sulfato y el queratán sulfato son polímeros lineales compuestos por residuos glicosídicos. Pertenecen al grupo de polisacáridos denominados *glucosaminoglicanos* o *mucopolisacáridos* hallados en la sustancia fundamental de muchos tejidos conectivos. Los glucosaminoglicanos están compuestos por dos residuos glicosídicos diferentes que se alternan en la cadena polisacáridica (figura 2.9). Uno de los residuos es un amino-azúcar en el que el grupo hidroxilo del carbono 2 de la glucosa o la galactosa es reemplazado por un grupo amino acetilado; por lo tanto, en los glucosaminoglicanos un residuo glicosídico es la hexosamina N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina. El otro residuo glicosídico es general-

mente el ácido glucurónico, en el que el carbono 6 de la glucosa lleva un grupo carboxilo, y en ocasiones la galactosa (figura 2.9).

La estructura de la unidad repetitiva del condroitín 6-sulfato se muestra en la figura 2.9. El condroitín 6-sulfato está compuesto por aproximadamente 40 ó 60 unidades repetitivas que constan de ácido glucurónico que alterna con N-acetilgalactosamina. La N-acetilgalactosamina tiene un grupo éster sulfato en el carbono 6. Las cadenas de condroitín sulfato están unidas covalentemente a los residuos de serina del centro proteico a través de un trisacárido neutro de galactosa–galactosa–xilosa.

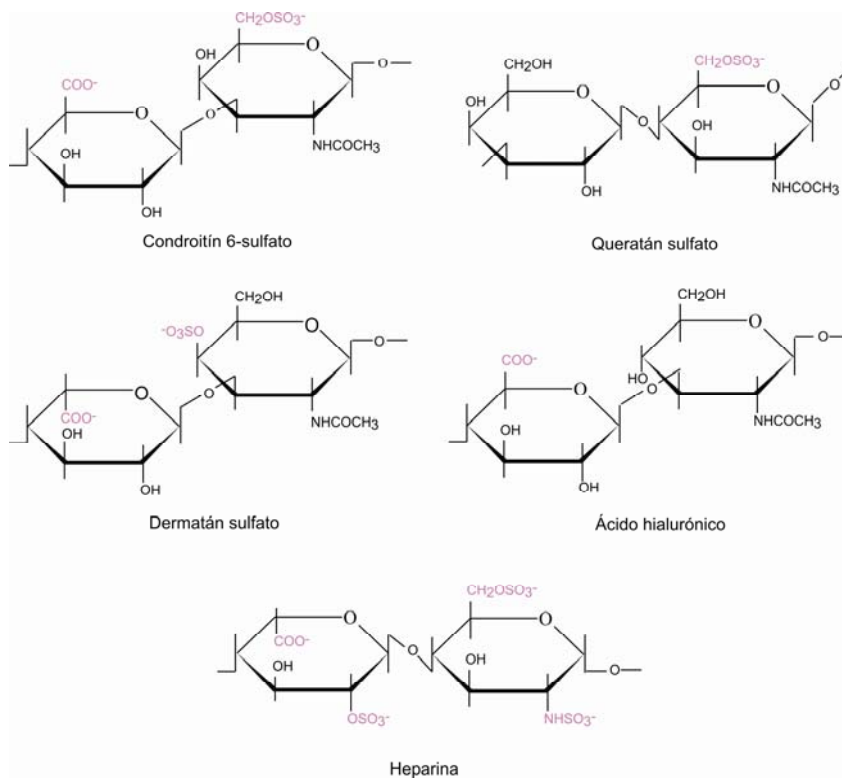


Figura 2.9. Principales unidades de glucosaminoglicanos presentes en las moléculas de proteoglicanos. La unidad repetitiva del disacárido del condroitín 6-sulfato consta de ácido glucurónico y N-acetilgalactosamina 6-sulfato; la del queratán sulfato es de galactosa y N-acetilglucosamina 6-sulfato; la del dermatán sulfato es de ácido idurónico y N-acetilgalactosamina; la del ácido hialurónico está formada por ácido glucurónico y N-acetilglucosamina; la de heparina por ácido glucurónico sulfatado y glucosamina 6-sulfato.

La estructura de la unidad repetitiva de queratán sulfato puede verse en la figura 2.9. El queratán sulfato está formado por residuos de galactosa que alternan regularmente con residuos de N-acetilglucosamina. El queratán sulfato posee grupos éster sulfato en el carbono 6 de los

residuos de N-acetilglucosamina y alguno o muchos de los residuos de galactosa también pueden estar sulfatados. Las cadenas de queratán sulfato constan de aproximadamente 10 a 20 unidades repetitivas covalentemente unidas a residuos de treonina o serina del centro proteico a través de una N-acetilgalactosamina.

La característica más importante de la estructura química del condroitín sulfato y del queratán sulfato es que las unidades repetitivas tienen grupos carboxilo o sulfato cargados negativamente muy poco espaciados, por lo que los glucosaminoglicanos constituyen largas cadenas de cargas negativas que repelen otras moléculas cargadas negativamente y que atraen cationes.

El centro proteico del monómero de proteoglicano consta de tres regiones o dominios globulares. La región amino terminal contiene dos de estos dominios globulares, G1 y G2, separados por un dominio interglobular. Entre el dominio G2 y el otro dominio globular denominado G3 y situado en el extremo carboxilo terminal se encuentra la región interglobular a la que se unen los glicosaminoglicanos. Junto al dominio G2 se encuentra la *región rica en queratán sulfato*. Entre esta región y el dominio G3 se encuentra la *región rica en condroitín sulfato*. Varios monómeros de agrecano se unen al ácido hialurónico a través de sus dominios G1, *región de unión al ácido hialurónico*, para formar enormes agregados que quedan atrapados en la red de colágeno.

Los monómeros de proteoglicanos de los diferentes cartílagos varían mucho en cuanto a su peso molecular y su composición química, especialmente en las cantidades relativas de condroitín sulfato y queratán sulfato. Incluso los monómeros de proteoglicanos del mismo cartílago pueden variar en longitud y en composición. Sin embargo, un promedio representativo de monómeros de proteoglicanos tendría un centro proteico cuyo peso molecular sería aproximadamente de 200.000 y mediría alrededor de 300 nm. A este centro proteico estarían unidas en ángulo recto aproximadamente 100 cadenas laterales de condroitín sulfato, cada una de ellas de 50 a 60 nm de largo. Las cadenas de queratán sulfato, con un peso molecular de 5.000 a 10.000 y de 10 a 20 nm de largo, estarían también unidas al centro proteico. El monómero de proteoglicano entero alcanzaría aproximadamente los 2-3 millones de daltons de peso molecular.

En la matriz del cartílago articular, la mayoría de proteoglicanos se asocian constituyendo agregados de alto peso molecular formados por la asociación no covalente de monómeros de proteoglicano, ácido hialurónico y proteínas de unión denominados *agrecanos*. Estos grandes agregados de proteoglicanos representan el 90% del total de proteoglicanos del cartílago. La arquitectura molecular de uno de estos agregados se muestra en la figura 2.10. El ácido hialurónico es una cadena polisacáridica lineal formada por la repetición de unidades de ácido glucurónico y acetilglucosamina que constituye la columna filamentosa del agregado a la que se unen los monómeros de proteoglicano. Una proteína de unión de bajo peso molecular

forma también parte del agregado. Esta proteína estabiliza la asociación entre los monómeros y el ácido hialurónico, y parece intervenir dirigiendo el montaje de los agregados. La formación de estos agregados ayuda a anclar los proteoglicanos en la matriz, previniendo su desplazamiento durante la deformación del tejido, y ayudan a organizar y estabilizar la relación entre los proteoglicanos y la red de colágeno.

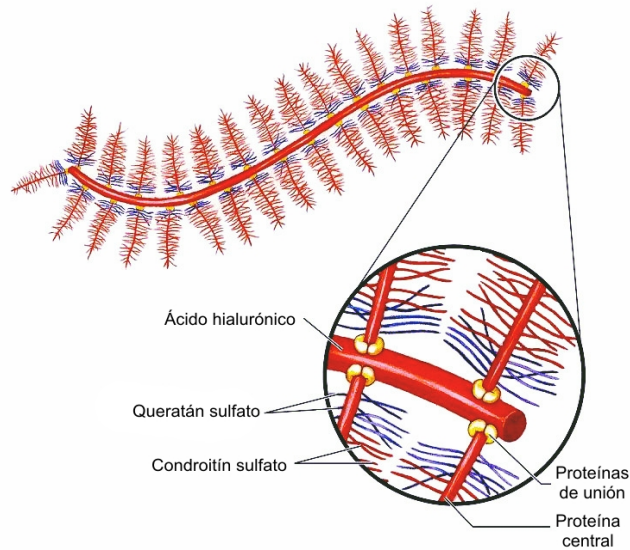


Figura 2.10. Esquema de un agregado de proteoglicanos del cartílago (agregado). La columna filamentososa del agregado es el ácido hialurónico. Los monómeros de proteoglicano de tamaño variable se disponen a intervalos regulares en los dos lados de la cadena de ácido hialurónico. Un extremo del centro proteico del monómero de proteoglicano presenta una conformación globular y contiene la región de enlace al ácido hialurónico. El otro extremo del centro proteico presenta una conformación extendida y tiene los lugares de fijación para el condroitín sulfato y el queratán sulfato.

Los agregados de proteoglicanos de diferentes tejidos varían mucho de tamaño y composición debido a diferencias en la longitud de las cadenas de ácido hialurónico, y a diferencias de tamaño, composición química y cantidad de monómeros de proteoglicano unidos al ácido hialurónico. Incluso los agregados de proteoglicanos aislados de un cartílago en particular son marcadamente variables. De cualquier manera, un agregado de proteoglicano representativo del cartílago articular consta de más de 100 monómeros de proteoglicanos (cada uno de dos millones de daltons de peso molecular) unidos no covalentemente mediante proteínas de unión a una cadena de ácido hialurónico de 4.000 nm de longitud, con un peso molecular superior a los 200 millones de daltons.

Los proteoglicanos son moléculas hidrofílicas que, debido a su alto contenido en grupos cargados negativamente, tienden a expandirse en solución, y cuando se encuentran en un

volumen menor de solución resisten la compresión, confiriéndole al cartílago la capacidad de deformación reversible, es decir, su elasticidad [32]. El volumen de solución ocupado por los agregados de proteoglicanos *in vitro* es mucho mayor que el hallado en el cartílago *in vivo*, donde la malla circundante de fibras colágenas limita la expansión de los agregados. Los agregados en el cartílago *in vivo* muestran fuerzas elásticas que están equilibradas por fuerzas de tracción de las fibras colágenas. Cuando el cartílago articular se halla sujeto a una fuerza de compresión, el agregado es temporalmente comprimido en una extensión menor y el cartílago elimina agua en ese momento desde su interior. Cuando la fuerza cesa, el agregado se expande, simultáneamente el cartílago articular capta agua y el volumen de éste aumenta hasta que las fibras colágenas impiden un mayor aumento de volumen. Este movimiento de agua hacia dentro y hacia fuera de estos agregados de proteoglicanos proporciona las propiedades elásticas del cartílago.

Por lo tanto, la capacidad del cartílago para soportar las grandes presiones generadas durante la carga reside en las complejas interacciones entre los distintos componentes de la matriz extracelular. La elevada concentración de proteoglicanos, con su enorme capacidad para almacenar moléculas de agua, hace que cuando se ejerce una presión sobre el cartílago, aunque ésta se produzca de manera instantánea, la deformación del tejido ocurra gradualmente, a medida que las moléculas de agua se desplazan desde el interior de los proteoglicanos hacia la superficie articular. Cuando la fuerza cesa, estas moléculas de agua vuelven a su localización inicial, atraídas por la estructura del cartílago. Esta capacidad de amortiguación, ejercida por los proteoglicanos, hace que las fuerzas lleguen parcialmente disipadas y frenadas a la red de colágeno, que es la responsable final del mantenimiento de la estructura tridimensional del cartílago, gracias a su gran resistencia física a la tensión. Un factor esencial en el mantenimiento de las propiedades de esta red de colágeno es el efecto aglutinador de otras moléculas (proteoglicanos, otros colágenos, otras proteínas de la matriz extracelular, etc.) sobre el colágeno tipo II. La alteración de estas delicadas interacciones intermoleculares puede ser un factor importante en la patogénesis de la artrosis [33].

Además de los grandes agregados de proteoglicanos o agrecanos, en el cartílago articular también se encuentran pequeños proteoglicanos, entre los que se incluyen la decorina, el biglicano y la fibromodulina. Estos pequeños proteoglicanos tienen núcleos proteicos más pequeños que las moléculas de agrecanos y, a diferencia de éstos, no llenan un gran volumen tisular ni contribuyen directamente al comportamiento mecánico del tejido; en lugar de eso se unen a otras macromoléculas y probablemente ejerzan algún tipo de influencia en la función celular. La decorina y la fibromodulina se unen al colágeno tipo II y juegan un papel en la organización y estabilización de la red de colágeno tipo II. El biglicano y la decorina se concentran en la matriz pericelular e interactúan con el colágeno tipo VI [34,35].

Proteínas no colágenas

Las proteínas no colágenas del cartílago articular no son tan conocidas como los colágenos y los proteoglicanos. Hay una gran variedad de estas moléculas en el cartílago articular normal, pero sólo han sido estudiadas unas pocas. Al menos algunas de estas moléculas parecen ayudar a organizar y mantener la estructura macromolecular de la matriz. La *ancorina II*, una proteína presente en la superficie del condrocito, puede ayudar a mantener a los condrocitos unidos a la red de colágeno de la matriz [36]. La proteína oligomérica del cartílago *COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein)*, una proteína de la familia de la trombospondina, se concentra principalmente en la matriz territorial del condrocito y parece estar presente sólo en el cartílago y tener la capacidad de unirse a otros componentes de la matriz, principalmente colágeno tipo II y tipo IX. Esta molécula puede tener valor como marcador de la renovación del cartílago y la progresión de la degeneración de este tejido en pacientes con artrosis [37,38]. La proteína que une al colágeno tipo II con los condrocitos es la *condronectina*, que constituye un puente entre la red fibrilar y las integrinas de la superficie celular que intervienen en la mecanotransducción, permitiendo de esta forma a la célula responder a cambios en la matriz.

También se han descrito en muy pequeñas cantidades proteasas, inhibidores de proteasas, factores de crecimiento, citoquinas y otras pequeñas moléculas importantes en la homeostasis y la integridad articular.

Claramente, la integridad de la matriz del cartílago depende de muchas interacciones intermoleculares, por lo que la pérdida de cualquiera de ellas puede conducir al debilitamiento de la matriz, que podría acabar desencadenando un proceso artrósico.

Estructura del cartílago articular

La composición, organización y propiedades mecánicas de la matriz, la morfología celular y, probablemente, la función celular, varían de acuerdo con la profundidad desde la superficie articular. La composición, organización y función de la matriz también varía de acuerdo con la distancia desde la célula.

Zonas del cartílago articular

Los cambios morfológicos en los condrocitos y en la matriz desde la superficie articular hasta el hueso subcondral hacen posible identificar cuatro capas o zonas, denominadas zona superficial o zona I, zona de transición o zona II, zona media o zona III y la zona de cartílago calcificado o zona IV, siendo la I la zona más alejada del hueso subcondral y en contacto directo

con la cavidad articular, y la zona IV donde se encuentra la región de osificación (figura 2.11).

La matriz extracelular de las diferentes zonas difiere con respecto a su concentración de agua, proteoglicanos, colágeno y tamaño de los agregados. Las células de las distintas zonas se diferencian no sólo en forma, tamaño y orientación con respecto a la superficie articular, sino también en su actividad metabólica.

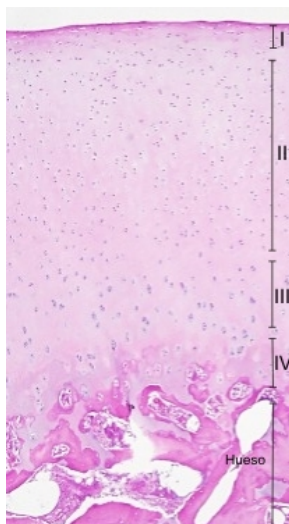


Figura 2.11. Corte histológico del cartílago articular con tinción de hematoxilina-eosina. La zona más alejada del hueso y en contacto con la cavidad articular recibe el nombre de *zona superficial*, en la que los condrocitos se disponen aplanados y paralelos a la superficie articular. A continuación se encuentra la *zona tangencial*, con células dispuestas al azar. La última capa de cartílago no calcificado se denomina *zona medial*. La capa del cartílago articular más cercana al hueso subcondral recibe el nombre de *zona de cartílago calcificado*, pues su matriz extracelular está fuertemente mineralizada.

Zona superficial

La superficie de la articulación está cubierta por una lámina acelular de fibras de colágeno paralelas a la superficie de la articulación. Esta porción de la zona superficial, a menudo identificada como *lámina clara* o *lámina splendens*, contribuye en el establecimiento de las propiedades mecánicas del tejido e influye en el movimiento de moléculas hacia dentro y hacia fuera del cartílago. Estas fibrillas proporcionan a esta zona más resistencia a la tensión que las zonas profundas. La eliminación de esta capa aumenta la permeabilidad del tejido; la disrupción o reestructuración de la densa matriz de colágeno de la zona superficial es uno de los primeros cambios estructurales detectables en la degeneración experimental del cartílago

articular, lo que sugiere que las alteraciones en esta zona pueden contribuir al desarrollo de la artrosis al perturbar el comportamiento mecánico del tejido. Las fibrillas de colágeno densamente empaquetadas también crean una especie de piel para el cartílago articular que puede limitar la entrada de grandes moléculas como anticuerpos u otras proteínas y la salida de grandes moléculas del cartílago. Actuando como una barrera al paso de grandes moléculas entre el líquido sinovial y el cartílago, esta lámina de la zona superficial puede aislar efectivamente al cartílago del sistema inmune. Así, la disrupción de esta zona no sólo puede alterar la estructura y las propiedades mecánicas del cartílago articular, sino también liberar moléculas del cartílago que estimulen una respuesta inmune o inflamatoria.

Bajo esta lámina acelular, nos encontramos con la mayor densidad celular del cartílago articular. Los condrocitos son relativamente pequeños y elipsoidales y se orientan con su eje mayor paralelo a la superficie articular. Esta organización también refleja la orientación tangencial de los haces de fibras de colágeno. Los condrocitos sintetizan una matriz con una alta concentración de colágeno y una baja concentración de proteoglicanos en comparación con otras zonas del cartílago.

Zona transicional

Como su nombre indica, la zona transicional muestra características intermedias entre las de la zona superficial y la medial. En esta zona las células son más grandes que las de la zona superficial y adquieren morfología esférica; además, tienen una mayor concentración de orgánulos, retículo endoplásmico y membranas de Golgi. Se distribuyen aleatoriamente en una matriz en la que las fibras de colágeno se disponen de forma oblicua. La matriz contiene fibrillas de colágeno de gran diámetro, una alta concentración de proteoglicanos y menor concentración de agua y colágeno que la matriz de la zona superficial.

Zona medial

En esta zona las células aumentan aún más de tamaño, son esféricas y tienden a alinearse en columnas perpendiculares a la superficie de la articulación. Esta forma de agrupamiento refleja la prevalencia de una dirección radial en las fibras de colágeno. Esta zona contiene las fibrillas de colágeno de mayor diámetro, la mayor concentración de proteoglicanos y la menor concentración de agua.

Zona de cartílago calcificado

En la zona calcificada, la matriz extracelular está fuertemente mineralizada, siendo rica en hidroxapatita. Las células en esta zona son más pequeñas que las de la zona medial y su retículo endoplásmico y aparato de Golgi están poco desarrollados.

Las fibras colágenas de la región basal del cartílago articular se disponen verticalmente, conectando el cartílago articular con el hueso subyacente, previniendo así su destrucción durante el movimiento de la articulación.

Regiones de la matriz

La matriz extracelular, sintetizada y mantenida por los condrocitos, presenta tres regiones, según su localización respecto al condrocito y su composición de macromoléculas: región pericelular, territorial e interterritorial. Estas tres regiones están presentes en las tres zonas del cartílago no calcificado [39].

Región pericelular

La matriz que rodea al condrocito se conoce como *matriz pericelular*. Esta región es rica en proteoglicanos, mientras que presenta muy poco o nada de colágeno fibrilar. El colágeno tipo VI es el principal colágeno presente. De hecho, en el cartílago articular hialino, el colágeno tipo VI está concentrado en la matriz pericelular. Éste se une a integrinas de la membrana del condrocito. Además, se une a otras proteínas de la matriz pericelular tales como decorina, fibromodulina y condronectina. Por lo tanto, el colágeno tipo VI se cree que actúa como puente de unión entre la matriz territorial del cartílago y los condrocitos. Las extensiones citoplásmicas de los condrocitos se proyectan a través de la matriz pericelular hasta la matriz territorial.

Región territorial

Una envoltura de matriz territorial rodea la matriz pericelular individual de cada condrocito y, en algunas localizaciones, a pares de condrocitos y sus matrices pericelulares. En la zona medial, una matriz territorial rodea cada columna de condrocitos.

Las finas fibrillas de colágeno de la matriz territorial más cercanas a la célula parecen adherirse a la matriz pericelular. A cierta distancia de las células, se cruzan e intersectan en varios ángulos, formando una cesta fibrilar alrededor de las células. Esta cesta colagenosa puede proporcionar protección mecánica a los condrocitos durante la carga y deformación del tejido. La frontera entre las matrices territorial e interterritorial está marcada por un aumento abrupto de las fibrillas de colágeno, y por una transición de las mismas desde la orientación en forma de cesta a una disposición más paralela.

Tanto en la región pericelular como en la territorial, los proteoglicanos se unen al colágeno, siendo éstos de menor tamaño que los de la región interterritorial [39].

Región interterritorial

La matriz interterritorial constituye la mayor parte del volumen del cartílago articular maduro y contiene fibrillas de colágeno de mayor diámetro. A diferencia de las fibrillas de colágeno de la matriz territorial, éstas no están organizadas alrededor de los condrocitos y cambian su orientación con respecto a la superficie articular 90 grados desde la zona superficial hasta la zona medial. En la zona superficial, las fibrillas tienen un diámetro relativamente pequeño y generalmente se encuentran paralelas a la superficie articular; en la zona transicional, las fibrillas interterritoriales adquieren ángulos más oblicuos con respecto a la superficie articular; y, en la zona medial, generalmente se disponen perpendicularmente (o radialmente) a la superficie articular.

Síntesis y renovación del cartílago articular

Como ya se ha mencionado, la principal y quizás la única función del condrocito es la síntesis y mantenimiento de la matriz del cartílago. Si no hay mitosis en el cartílago articular del adulto, debe asumirse que sus condrocitos, en su mayor parte, tienen una vida muy prolongada, y compensan cualquier desgaste que ocurra mediante la producción de sustancia intercelular durante toda la vida. Se ha demostrado que el número de células en el cartílago articular disminuye en relación con la cantidad de sustancia intercelular durante la vida. Como el cartílago articular se mantiene, esto sugiere que todo desgaste es compensado por las células que persisten mediante producción de más sustancia intercelular.

Este mantenimiento del tejido cartilaginoso a lo largo de la vida es posible gracias a la estrecha interdependencia entre los condrocitos y la matriz que los rodea. Los condrocitos no presentan contactos célula-célula y se rodean con su propia matriz extracelular, por lo que esta ausencia de comunicación intercelular sugiere un grado de independencia de cada condrocito, influido más por las señales de la matriz para la síntesis de macromoléculas y por señales de factores solubles para la degradación de la matriz que por señales de otros condrocitos.

La matriz protege a los condrocitos del daño mecánico durante el uso normal de la articulación, ayudando a mantener su forma y fenotipo. Los nutrientes, sustratos para la síntesis de moléculas de la matriz, los productos de desecho metabólico y las moléculas que ayudan a regular la función celular, como las citoquinas y los factores de crecimiento, pasan a través de la matriz y en algunos casos son almacenados en ella. Los tipos de moléculas que pueden atravesar la matriz y la velocidad a la cual pueden hacerlo dependen de la composición y organización de la misma, principalmente la concentración, composición y organización de los grandes proteoglicanos. La matriz también actúa como transductor de señales para los

condrocitos. Transmite señales respondiendo a la carga mecánica de la superficie articular y los condrocitos responden a estas señales alterando la matriz. Se desconocen los detalles de cómo el trabajo mecánico de las articulaciones influye en la función de los condrocitos, pero la deformación de la matriz produce señales mecánicas, eléctricas y fisicoquímicas, que pueden desempeñar un papel importante en la estimulación de las células. La compresión de la superficie articular deforma la matriz y puede deformar directamente a los condrocitos. La deformación de la matriz produce un flujo de fluido tisular y de los iones unidos a los grupos cargados de las macromoléculas de la matriz. Este flujo altera la densidad de carga alrededor de las células y produce un potencial. Los cambios en la densidad de carga en la matriz alteran el equilibrio osmótico de Gibbs-Donnan y los gradientes de presión osmótica. Este flujo del líquido tisular puede también acelerar el flujo de nutrientes y metabolitos a través de la matriz.

El mantenimiento de la superficie articular requiere el recambio de las macromoléculas de la matriz. Teóricamente, si están adecuadamente estimulados, unos pocos condrocitos pueden tanto sintetizar como destruir grandes áreas de cartílago. Los estudios sobre el metabolismo del cartílago han demostrado un alto grado de síntesis y degradación de los materiales de la matriz. Específicamente, estudios con marcadores radiactivos han demostrado que por lo menos una pequeña parte de los proteoglicanos sufre un recambio de rápida velocidad. El colágeno es también sintetizado localmente por las células cartilaginosa, pero es considerablemente más estable que los proteoglicanos [40]. Para llevar a cabo este recambio, las células deben ser capaces de percibir los cambios en la composición de la matriz que son debidos a la degradación de macromoléculas, y deben responder sintetizando los tipos y cantidades apropiadas de macromoléculas. Los condrocitos también producen una proporción significativa de moléculas degradadoras de la matriz, tales como miembros de la familia de las metaloproteasas –como la colagenasa y la estromelina– así como enzimas de la familia ADAMTS (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) como las agregasas, tanto en situaciones normales como bajo condiciones patológicas. Además, los condrocitos son una fuente de muchas citoquinas y factores de crecimiento de relevancia en la activación y desactivación de los procesos anabólicos y catabólicos en el cartílago. De hecho, muchos de ellos parecen ser activos en una forma paracrina e incluso autocrina en el cartílago articular.

La actividad y función de los condrocitos del cartílago articular durante el crecimiento esquelético es diferente a la que ocurre tras la conclusión del crecimiento. En los individuos en crecimiento, los condrocitos producen nuevo tejido para aumentar y remodelar la superficie articular; en individuos maduros, los condrocitos no cambian sustancialmente el volumen del tejido, sino que reemplazan las macromoléculas de la matriz que han sido degradadas, y reorganizan la superficie articular. En un principio el cartílago se forma a partir de células mesenquimales indiferenciadas que se agrupan y sintetizan colágeno, proteoglicanos y proteínas no-colágenas. El tejido comienza a ser reconocible como cartílago cuando una acumula-

ción de matriz extracelular separa las células y éstas adoptan una forma esférica. Durante la formación y crecimiento del cartílago articular, la densidad celular es alta y las células alcanzan su máximo nivel de actividad metabólica, mientras que los condrocitos proliferan rápidamente y sintetizan grandes volúmenes de matriz extracelular. Con la maduración esquelética, decaen la actividad metabólica de las células, la síntesis de matriz y la división celular. Una vez completado el crecimiento esquelético, la mayoría de los condrocitos probablemente no volverán a dividirse, pero continúan sintetizando colágeno, proteoglicanos y proteínas no colágenas. Esta continua actividad biosintética sugiere que el mantenimiento del cartílago articular requiere la continua reestructuración del esqueleto de macromoléculas de la matriz.

Envejecimiento del cartílago articular

Las propiedades de tensión del cartílago articular alcanzan un máximo a la edad de 30 años. Después comienzan a deteriorarse progresivamente en articulaciones como las rodillas y las caderas. Con la edad, la capacidad de las células para sintetizar algunos tipos de proteoglicanos y colágenos, y su respuesta a los estímulos –entre los que se incluyen factores de crecimiento– disminuye. Estos cambios relacionados con la edad deben limitar la capacidad de las células para mantener el tejido contribuyendo de esta forma a la degeneración del cartílago articular.

El envejecimiento modifica las fibrillas de colágeno con la acumulación de productos de glucosilación no enzimática que aumentan la rigidez de la red de colágeno [41]. Además existen evidencias de daños en el colágeno en la superficie articular, extendiéndose con la edad más profundamente en el cartílago y más hacia fuera en las regiones territorial e interterritorial, lejos de los condrocitos.

Capítulo 3

La artrosis

La degeneración o la pérdida progresiva de la estructura y la función normal del cartílago articular es la principal causa del síndrome clínico de la artrosis, también conocida como *osteoartrosis*, *enfermedad degenerativa de la articulación*, *artritis degenerativa* y *artritis hipertrófica* [42].

La artrosis es una afección común de las diartrosis y, en cierta medida, de las articulaciones anfiartrodiales, caracterizada por un deterioro predominantemente no inflamatorio, y pérdida progresiva y generalizada de cartílago articular, junto con el sobrecrecimiento, la remodelación y la esclerosis del hueso subcondral en las superficies articulares y los márgenes de la articulación y, en muchos casos, la formación de quistes de hueso subcondral y osteofitos marginales. Estos cambios en la articulación sinovial van acompañados de la presencia de signos y síntomas de dolor, rigidez articular, restricción de la movilidad, crepitación con el movimiento, efusiones articulares y deformidad.

El sufijo *itis*, utilizado en los términos *artritis degenerativa* y *artritis hipertrófica*, implica que la enfermedad tiene un componente inflamatorio. Sin embargo, aunque la evidencia de sinovitis es frecuente, la inflamación no es un componente principal de la enfermedad, por lo que el término *artrosis* refleja con más precisión la patogénesis de este trastorno.

La artrosis puede aparecer en cualquier articulación del organismo pero ocurre con más frecuencia en las zonas sujetas a una carga mayor como las rodillas, la cadera y la columna, aunque las articulaciones de los dedos y la articulación en la base del pulgar, a menudo también resultan afectadas. La prevalencia de la artrosis sintomática de rodilla en la población adulta española es del 10'2%. La artrosis de otras articulaciones como los hombros, los codos o las muñecas es poco frecuente y cuando aparece, suele ser consecuencia de un trauma-

tismo, o de otra enfermedad articular anterior como la artritis, o de un uso indebido de las articulaciones. ¿Por qué la artrosis se desarrolla preferentemente en unas articulaciones y no en otras? Se ha propuesto que una posible explicación podría ser que las articulaciones más propensas a sufrir una enfermedad degenerativa fuesen aquéllas que han sufrido un cambio evolutivo en su función recientemente –articulaciones fundamentalmente relacionadas con la locomoción bípeda y con la habilidad manual–, sin que haya transcurrido tiempo suficiente para que se adapten a su nueva función adecuadamente [43]. Esta interpretación nos parece interesante, pues es cierto que el desarrollo de esas dos propiedades en la especie humana ha sido muy rápida y muy intensa, en comparación con el resto de la evolución. Sin embargo, esto explicaría por qué aparece con más intensidad en esos puntos y por qué esos puntos son más débiles, pero queda por explicar cuál es el origen del problema general, pues la artrosis existe también en animales salvajes con mucha anterioridad a la aparición del hombre.

La artrosis se desarrolla con frecuencia sin que exista una causa conocida (*artrosis primaria o idiopática*) y, menos frecuentemente se desarrolla como resultado de una lesión, infección, o una variedad de enfermedad hereditaria, metabólica o neurológica (*artrosis secundaria*) (tabla 3.1) [42,44].

La artrosis ha estado presente desde los orígenes del hombre; de hecho ha afectado a otros animales antes de que el hombre y sus ancestros hubieran aparecido, como lo demuestra la presencia de osteofitos en esqueletos de dinosaurios de los géneros *Diplodocus*, *Ceratopsaurus* y *Platycarpus* que vivieron hace 150-100 millones de años [45,46]. El primer ejemplo conocido de artrosis múltiple en un vertebrado fósil fue hallado en un esqueleto de un *Platycarpus*, que vivió hace unos cien millones de años [46]. Este esqueleto está expuesto en el Museo de Historia Natural de la Universidad de Kansas.

Se han encontrado restos de individuos neandertales, fundamentalmente en el yacimiento de La Chapelle-aux-Saints (Francia), que muestran lesiones osteoartrosicas en la articulación de la cadera, en la temporo-maxilar y en las falanges [47,48]. Asimismo, se han descubierto lesiones artrósicas en restos humanos del Paleolítico Superior y del Neolítico [47,49] y en los restos fósiles humanos del yacimiento de Atapuerca [50]. También se han encontrado lesiones osteoartrosicas en los antiguos egipcios y en los indios precolombinos de América [51-54].

En la actualidad, la artrosis se ha convertido en uno de los principales problemas mundiales de salud. El envejecimiento progresivo de la población, especialmente en países industrializados, agrava este problema, dado que la edad es el factor de riesgo más importante en la progresión de la enfermedad. El dolor articular y la pérdida de movilidad se encuentran entre las causas más frecuentes de deterioro en las personas mayores y de mediana edad [42]. Los procesos reumáticos son la segunda causa de episodios de baja laboral, después de las infecciones respiratorias agudas, encabezadas por los síntomas gripales, pero las enfermedades

reumáticas son las primeras en los días de duración de la baja laboral, siendo la artrosis la patología específica que ocasiona un mayor número de bajas laborales y también un mayor número total de días [55]. El 35% de los pacientes atendidos en las consultas de medicina general son de origen reumático y también tienen ese origen entre el 65 y el 80% de los pacientes que consultan con los traumatólogos.

Tabla 3.1. Causas conocidas de degeneración articular (artrosis secundaria) [42].

Causa	Posible mecanismo
Fractura intraarticular	Daño en el cartílago articular y/o incongruencia de la articulación
Impacto de alta intensidad en la articulación	Daño en el cartílago articular y/o en el hueso subcondral
Lesiones de los ligamentos	Inestabilidad de la articulación
Displasia de la articulación y el cartílago	Forma anormal de la articulación y/o del cartílago articular
Necrosis aséptica	La necrosis del hueso conduce al colapso de la superficie articular y a la incongruencia de la articulación
Acromegalia	Sobrecrecimiento del cartílago articular produce incongruencia articular y/o cartílago anormal
Enfermedad de Paget	Alteración o incongruencia de la articulación debido a remodelación ósea
Síndrome de Ehlers-Danlos	Inestabilidad de la articulación
Enfermedad de Gaucher	Necrosis ósea o fracturas patológicas conducen a incongruencia de la articulación
Síndrome de Stickler	Desarrollo anormal de la articulación y/o del cartílago articular
Infección de la articulación	Destrucción del cartílago articular
Hemofilia	Múltiples hemorragias articulares
Hemocromatosis	Mecanismo desconocido
Ocronosis	Deposición de polímeros de ácido homogentísico en el cartílago articular
Enfermedad por deposición de pirofosfato cálcico	Acumulación de cristales de pirofosfato cálcico en el cartílago articular
Artropatía neuropática	Pérdida de propiocepción

Aunque aún no se hayan descubierto medicamentos que sean capaces de alterar el curso de la artrosis, se está invirtiendo mucho esfuerzo y dinero para obtener avances en nuestro conocimiento de la enfermedad que se espera que puedan ayudar a prevenirla, retardarla o

procurar su remisión en un futuro. Sin embargo, hemos de decir que la investigación farmacológica en este sentido se está preocupando casi exclusivamente en buscar medicamentos para combatir el dolor y/o la inflamación, pero no en combatir la causa del problema.

Síntomas y signos de artrosis

Los principales síntomas de la artrosis son el dolor y la rigidez articular. Además, existe una merma en la libertad de las superficies articulares para moverse entre ellas con facilidad, así como una pérdida de estabilidad articular. Estos síntomas comienzan gradualmente y la progresión es lenta. Al principio el dolor aparece cuando se exige esfuerzo a la articulación enferma, bien sea de movimiento o de carga, mientras que desaparece con el reposo, pero con el tiempo, y a medida que la artrosis se va haciendo más severa, el mínimo movimiento produce dolor y éste suele permanecer incluso con el reposo o el descanso nocturno.

El cartílago articular es aneural y consecuentemente no es una fuente de dolor, por lo que éste procede de estructuras no cartilaginosas intra y periarticulares, como el hueso subcondral, los ligamentos, la cápsula articular, la sinovia, los tendones o las fascias.

La rigidez articular es habitual y dura pocos minutos, siempre menos de media hora, lo que ayuda a distinguir esta artropatía de otras como la artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias del tejido conectivo, en las que la rigidez suele ser más prolongada. Cuando está presente, la rigidez articular es más notable al levantarse por las mañanas o tras un periodo de actividad.

En casos de enfermedad severa o avanzada el paciente puede quejarse de un sonido crujiante al mover la articulación, que indica que el cartílago está desgastado y se mueve hueso contra hueso sin ninguna protección. Con la progresión de la enfermedad, el paciente nota una limitación en el movimiento.

En ocasiones, debido al reposo y a la falta de ejercicio, los músculos que rodean la articulación se atrofian, mientras que en otras el dolor y las deformidades óseas producen contracturas musculares. En ambos casos, la alteración de los músculos produce más dolor, trastornos en la movilidad normal de la articulación y mayor tendencia a la progresión de la enfermedad.

Otros de los síntomas de la osteoartrosis son el agrandamiento, hinchazón y deformidad de la articulación provocados por el crecimiento de los extremos del hueso. Efectivamente, en las articulaciones de los dedos de las manos puede aparecer este fenómeno (figura 3.1), así como en las rodillas, lo que provoca que los dedos se desvíen y que las piernas se arqueen hacia fuera o hacia dentro.

Algunos enfermos con artrosis pueden notar episodios de hinchazón y derrame en las articulaciones, con acumulación de líquido, pues aunque la membrana sinovial no suele resultar afectada en la artrosis, en determinados momentos de la evolución de la enfermedad y en ciertos lugares, puede irritarse y originar un cierto grado de inflamación.

Además de estos síntomas generales, se pueden distinguir síntomas específicos en función de la articulación afectada. De esta forma, la artrosis en los dedos de las manos se caracteriza por la presencia de pequeños bultos duros (nódulos), que se denominan *nódulos de Heberden*, si aparecen en las articulaciones interfalángicas distales y *nódulos de Bouchard*, si aparecen en las articulaciones interfalángicas proximales (figura 3.1), y que son consecuencia del crecimiento del hueso subcondral. Son más frecuentes en mujeres y hay tendencia a que estén presentes en varios miembros de la misma familia. Aparecen primero en una articulación y progresivamente se van extendiendo a las demás de manera bilateral. Los pacientes notan dolor e inflamación que va siendo menor a medida que van apareciendo los nódulos. Cuando la deformación se completa suelen desaparecer todas las molestias. Generalmente sólo crean un problema estético y funcional, ya que la articulación puede quedar ligeramente flexionada o desviada hacia los lados.



Figura 3.1. Radiografía de la mano derecha de un paciente con artrosis. En esta radiografía puede observarse la presencia de los nódulos de Heberden, en las articulaciones interfalángicas distales, y los nódulos de Bouchard, en las articulaciones interfalángicas proximales, producidos por el crecimiento anómalo del hueso subcondral.

La artrosis del pulgar, también conocida como *rizartrrosis*, es más frecuente en mujeres que en hombres y se caracteriza por la presencia de una deformidad en la base del pulgar; suele provocar dolor, sobre todo al realizar labores manuales, dificultando así el uso normal de la mano, fundamentalmente en los movimientos de prensión.

En la artrosis de la cadera aparece dolor en la ingle y en la región interna del muslo. A veces el dolor puede sentirse en la rodilla sin tener ninguna molestia en la ingle (es lo que lla-

man *dolor referido*). Si la artrosis es importante puede existir dolor nocturno o dificultad para flexionar la pierna en movimientos que aparentemente no requieren un gran esfuerzo (como abrocharse los zapatos o ponerse los calcetines), así como cojera al caminar.

La artrosis de la rodilla produce dolor en la parte anterior o interna de la rodilla que predomina al subir y bajar las escaleras y al levantarse de una silla. Puede acompañarse de chasquidos durante la marcha y si es severa provoca cojera.

Epidemiología

La artrosis es la alteración osteoarticular más frecuente en el mundo [55] y la que genera un mayor gasto sanitario. Su prevalencia está basada en la presencia de cambios articulares degenerativos sintomáticos y asintomáticos radiográficos, siendo estos últimos los considerados como criterio más fiable en la actualidad [56]. Los cambios radiográficos artrósicos aparecen en más del 50% de la población a partir de los 65 años y en el 80% de la población con 75 años o más [55].

Factores de riesgo

Se piensa en la actualidad que la artrosis es una enfermedad multifactorial y heterogénea con múltiples mecanismos patogénicos implicados en su desarrollo y progresión (figura 3.2). Nosotros pensamos que debe revisarse esta conclusión, pues no está basada en un conocimiento causal del desarrollo y progreso de la enfermedad, sino en suposiciones basadas en un espectro amplio de manifestaciones, y en la suposición de que manifestaciones diferentes deben obedecer a causas diferentes, y es posible que exista una causa única, general, que pueda manifestarse de forma diferente por motivos estocásticos, dependiendo de las interacciones particulares que puedan existir en el desarrollo del problema.

Las investigaciones realizadas hasta la fecha sugieren que existen determinados factores que aumentan el riesgo de padecer esta enfermedad. Estos factores pueden agruparse en tres clases: factores sistémicos no modificables, factores sistémicos con alguna posibilidad de modificación, y factores locales, que sí son modificables (tabla 3.2) [55].

La edad en la que puede presentarse la artrosis secundaria depende de su causa, por lo que puede aparecer en jóvenes e incluso en niños, así como en ancianos. Sin embargo, existe una estrecha relación entre la prevalencia de la artrosis primaria y la edad; de hecho, la edad es el factor que más influye sobre la aparición de esta patología [42]. Todos los grados de artrosis radiográfica de las extremidades aumentan proporcionalmente con la edad, desde menos de un 5% en personas menores de 25 años, hasta más del 80% entre los individuos mayores de 75 años de edad [42,56]. El desgaste de la articulación producido por su uso

continuado durante años, junto con una menor capacidad de regeneración de los tejidos al aumentar la edad, son factores que influyen en este aumento de la incidencia de la enfermedad con el envejecimiento.

Tabla 3.2. Factores de riesgo asociados a la artrosis [55]. Hasta hoy en día estos son los principales factores de riesgo asociados a la artrosis; sin embargo, los resultados de esta Tesis cambian este panorama haciendo que una nutrición inadecuada pueda ser reconocida como el principal factor etiológico de la artrosis.

-
- **GRUPO 1. Factores sistémicos no modificables**
 - Edad
 - Sexo
 - Raza
 - **GRUPO 2. Factores sistémicos con posibilidad de modificación**
 - Predisposición genética
 - Factores metabólicos-endocrinos, incluyendo condrocalcinosis
 - **GRUPO 3. Factores locales con posibilidad de modificación**
 - Obesidad
 - Estrés mecánico
 - Sedentarismo
 - Alteraciones óseas congénitas con disfunciones articulares
 - Enfermedades articulares inflamatorias
-

Antes de los 50 años, la prevalencia de la artrosis en la mayoría de articulaciones es mayor en hombres que en mujeres; sin embargo, después de esta edad, la relación hombre-mujer se invierte, siendo las mujeres el principal grupo de riesgo en la prevalencia e incidencia de la artrosis de rodilla y de manos [57,58].

Dentro de las muchas causas que pueden provocar la artrosis, los factores hereditarios han sido implicados desde las primeras descripciones de la enfermedad debido a la asociación familiar de muchos de estos procesos; sin embargo, en muchos casos no es fácil separar el componente o la predisposición genética de otros factores ambientales como son la dieta, la obesidad o la sobrecarga mecánica [28]. De hecho, una persona puede tener predisposición genética a padecer la enfermedad, pero sólo la desarrollará si confluyen otros factores de riesgo [57,59].

Los genes relacionados con el desarrollo de artrosis hereditarias son los que codifican las moléculas presentes en mayor cantidad, principalmente los colágenos y los proteoglicanos [28]. El colágeno es el componente más numeroso de la matriz extracelular y las interaccio-

nes entre los distintos tipos de colágenos del cartílago articular son fundamentales para la conservación de las propiedades biomecánicas del tejido. Su arquitectura es muy compleja y cualquier mínima modificación, como el cambio de una base en el gen que lo codifica, puede originar moléculas no funcionales –fenómeno conocido como *suicidio del procolágeno*– o alteraciones morfológicas importantes [28]. Estos datos se ven corroborados por la evidencia de que ciertas alteraciones en los genes de los colágenos tipo I y tipo III, los más importantes del tejido conectivo, originan enfermedades hereditarias como la osteogénesis imperfecta o el síndrome de Ehlers-Danlos. Existen evidencias de que mutaciones en el gen del procolágeno tipo II (*COL2A1*), el precursor de la principal proteína del cartílago, están asociadas con artrosis primaria generalizada [60]. En estudios realizados en cartílagos de personas con mutaciones en este gen, se ha encontrado una gran proporción de moléculas alteradas en el tejido lesionado que se unen entre sí formando fibrillas, capaces de incorporarse a la red, pero que provocan una alteración estructural o metabólica de la matriz extracelular, que en algunos casos se debe a un aumento de la susceptibilidad de estas fibras a las proteasas que no atacan a las fibras de colágeno tipo II normales. Asimismo se han encontrado mutaciones en los genes que codifican los proteoglicanos que también podrían estar implicadas en el desarrollo del proceso artrósico.

La obesidad se reconoce como un importante factor de riesgo para la artrosis de caderas y rodillas, ya que el exceso de peso puede conducir a la sobrecarga y degeneración del cartílago articular [61]. Se ha comprobado que en personas obesas, la pérdida de peso puede reducir notablemente el riesgo de padecer artrosis [43,57].

El exceso de uso de una articulación también puede propiciar el desarrollo de artrosis temprana o en lugares poco frecuentes. Las investigaciones sobre los efectos del ejercicio físico sobre las articulaciones indican que una actividad regular y moderada no provoca o acelera el desarrollo de la artrosis en articulaciones normales, sino más bien todo lo contrario, el movimiento articular estimula la síntesis de la matriz, mientras que la ausencia de movimiento causa su degradación y, en algunos casos, la degeneración de la articulación. Sin embargo, a pesar de la importancia de la actividad física para el mantenimiento del cartílago articular, algunos tipos de movimientos repetitivos aceleran el desarrollo de la enfermedad degenerativa de la articulación. De esta forma, en trabajadores con sobrecargas físicas importantes y mantenidas es más frecuente la aparición de artrosis [28,42,57]. Además, se ha demostrado que la participación en ciertos deportes de competición aumenta el riesgo de padecer la enfermedad, sobre todo deportes en los que existe un sobreesfuerzo articular, como es el caso del hombro en jugadores de balonmano o las rodillas en futbolistas [57].

Cuando la forma de una articulación o de un miembro no es la normal, por ejemplo cuando las piernas están torcidas o cuando una pierna es más larga que la otra, se produce un

desgaste mayor en toda la articulación o en la parte de ella que soporta más peso y existe un mayor riesgo de padecer artrosis.

El daño articular es otro de los factores de riesgo aceptados. Cuando se producen fracturas, golpes importantes o inflamaciones de diversa índole en una articulación, la recuperación nunca es completa y el cartílago tiene predisposición a alterarse pronto.

Parece que existe una relación inversa entre la densidad ósea y el riesgo de padecer osteoartritis [62,63]. Se ha visto que las mujeres con artrosis tienen más hueso y el hueso es significativamente más rígido y duro, tiene mayor fuerza a la compresión y más osteocalcina [63].

Un importante factor que puede contribuir a la patogénesis de la artrosis es la dieta [64]. La deficiencia y/o el desequilibrio nutricional, obesidad y diabetes, pueden resultar en trastornos metabólicos y sistémicos que aumentan la susceptibilidad a padecer artrosis debido a sus efectos directos sobre el cartílago [64]. Se ha comprobado que la acumulación de productos glicosilados puede afectar negativamente a la renovación del cartílago [65] y que las deficiencias vitamínicas (vitaminas B₁, B₆, B₁₂ y E) provocan daños metabólicos en el cartílago articular [66]. Las evidencias indican que la exposición continuada a agentes oxidantes contribuye al desarrollo de muchas enfermedades degenerativas, incluida la artrosis. Más aún, los condrocitos son potentes fuentes de especies reactivas de oxígeno, que pueden afectar negativamente a la estructura e integridad del colágeno y provocar la despolimerización del ácido hialurónico del fluido sinovial [57,67-69]. Dado que los micronutrientes antioxidantes pueden proteger frente al daño tisular, se ha propuesto que una alta ingesta de estos micronutrientes podría proteger frente a la artrosis [60,64,70]. De hecho, se ha observado una reducción en el riesgo de osteoartritis en personas con una ingesta alta de vitamina C comparada con la de otras personas con una ingesta inferior de esta vitamina [57,71]. Además de ser un antioxidante, la vitamina C desarrolla funciones bioquímicas que pueden resultar de importancia clínica en el tratamiento de la enfermedad artrósica [71]. En primer lugar, la vitamina C es necesaria para la hidroxilación postraslacional de los residuos de prolina y lisina en el procolágeno, una modificación esencial para la estabilización de las fibrillas maduras de colágeno; también parece ser necesaria en el transporte de grupos sulfato durante la síntesis de glucosaminoglicanos [72]; además, es capaz de estimular la síntesis de colágeno tipo II en condrocitos de cartílago articular en cultivo [73].

Además, los niveles bajos de vitamina D pueden dificultar la capacidad del hueso para responder óptimamente al proceso artrósico y predisponer a su progresión. La vitamina D también debe ejercer algún efecto directo sobre los condrocitos del cartílago artrósico, pues se ha observado que éstos desarrollan receptores para la vitamina D [74]. Se ha demostrado que el riesgo para la progresión de la enfermedad aumenta en personas con una baja ingesta de vitamina D y que niveles adecuados de vitamina D protegen frente a la artrosis [57,71].

Por lo tanto, se acepta en general que una dieta bien equilibrada, pobre en grasas y moderada en hidratos de carbono junto a suplementos nutricionales, vitaminas o minerales esenciales puede resultar beneficiosa para individuos susceptibles de sufrir una enfermedad articular degenerativa [64]. Más aún, los suplementos nutracéuticos condroprotectores pueden aportar en un futuro estrategias para la prevención, tratamiento y cura de la artrosis [64]. Se considera que un nutracéutico es un alimento o parte de él que proporciona beneficios médicos o saludables incluyendo la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad [75].

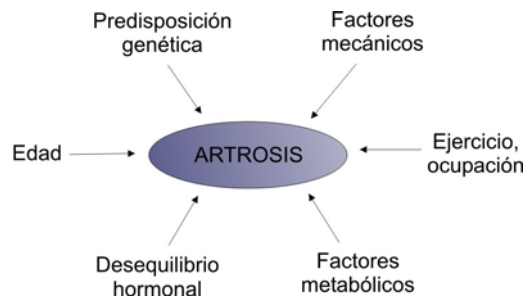


Figura 3.2. Factores que predeterminan la susceptibilidad a padecer artrosis. Cualquier combinación de factores mecánicos, nutricionales, bioquímicos, ambientales, sistémicos y genéticos podría estar implicada en la formación de lesiones iniciales; sin embargo, los factores causales de la artrosis se desconocen.

La articulación artrósica

La artrosis es una enfermedad articular muy compleja que afecta principalmente al cartílago articular, aunque también al hueso subcondral y, secundariamente, a otras estructuras que rodean la articulación como la membrana sinovial, la cápsula articular o los ligamentos, e incluso a los músculos implicados en el movimiento de la articulación (figura 3.3).

Degeneración del cartílago articular en la artrosis

Parece claro que aunque las alteraciones en la cápsula, la sinovia y el hueso subcondral están presentes en las articulaciones artrósicas, los cambios principales y mayoritarios se producen en el cartílago articular hialino. De hecho, la mayoría de investigadores considera la osteoartritis como una enfermedad del cartílago.

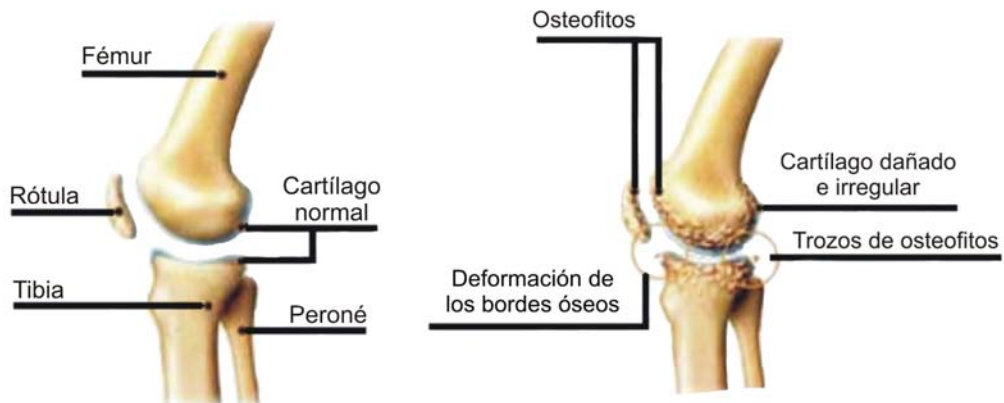


Figura 3.3. Anatomía de una articulación de rodilla sana y artrósica. Obsérvese la pérdida de cartílago articular en la articulación artrósica, así como la formación de osteofitos y la deformación de los bordes óseos.

La pérdida progresiva del cartílago en la artrosis tiene lugar en varias fases consecutivas: la disrupción o alteración de la matriz extracelular; la respuesta condrocítica a la lesión del tejido, mediante la cual las células intentan reparar la matriz extracelular dañada; y la disminución de la respuesta sintética condrocítica y la pérdida progresiva del tejido [42,76-80] (tabla 3.3).

Tabla 3.3. Etapas en el desarrollo y la progresión de la degeneración del cartílago articular en la artrosis [42]. Una de las primeras características del cartílago artrósico es la alteración de su matriz. Cuando los condrocitos detectan esta alteración intentan reparar el daño aumentando la síntesis de colágeno y proteoglicanos. Si la reparación fracasa o es incompleta, el daño progresará conduciendo a la degeneración del cartílago articular.

Etapa	Descripción
I. Disrupción o alteración de la matriz del cartílago	Disrupción o alteración del marco macromolecular de la matriz asociada con un aumento en la concentración de agua que puede ser originado por daños mecánicos, degradación de macromoléculas de la matriz o alteraciones en el metabolismo de los condrocitos. La concentración de agreganos y el grado de agregación de los proteoglicanos decae y la red de colágeno resultada dañada.
II. Respuesta de los condrocitos a la disrupción o alteración de la matriz	Cuando los condrocitos detectan una disrupción o alteración de su matriz responden aumentando su tasa metabólica y proliferativa. Su respuesta puede restaurar el tejido, mantenerlo en estado alterado o aumentar el volumen de cartílago. Pueden mantener un nivel aumentado de actividad durante años.
III. Disminución en la respuesta de los condrocitos	El fallo de la respuesta condrocítica para restaurar o mantener el tejido conduce a la pérdida irremediable del cartílago articular.

En la primera etapa de la artrosis la red macromolecular de la matriz del cartílago es desestabilizada o alterada a nivel molecular y el contenido de agua aumenta. Disminuye la agregación de proteoglicanos, la concentración de proteoglicanos y la longitud de las cadenas de glucosaminoglicanos, al mismo tiempo que aumenta el contenido de agua y la integridad de la red de colágeno resulta alterada [81-83]. Estos cambios aumentan la permeabilidad –la facilidad con la que el agua y otras moléculas se mueven a través de la matriz– y disminuyen la rigidez de la matriz, lo que puede aumentar la vulnerabilidad del tejido a cualquier daño mecánico. Estos mismos cambios en la estructura molecular y la composición del cartílago ocurren después de lesiones articulares que conducen a la pérdida o disrupción de las macromoléculas de la matriz [83].

Se cree que esta primera fase puede ocurrir como resultado de una variedad de daños mecánicos como fuertes impactos o cargas de la articulación, la aceleración en la degradación de macromoléculas de la matriz como resultado de un proceso inflamatorio o como resultado de cambios metabólicos en el tejido, que interfieren con la capacidad de los condrocitos para mantener la matriz [42].

El primer signo visible de la degeneración característica de la artrosis es la fibrilación de la superficie del cartílago articular [42,84] a medida que las fibras de colágeno van siendo dañadas [81] (figura 3.4). Con el tiempo aparecen grietas verticales y fisuras que llegan a ser progresivamente más profundas, proporcionándole al cartílago una apariencia irregular, fibrilada.

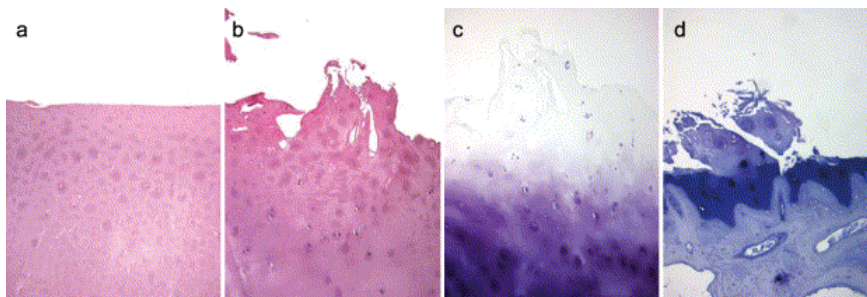


Figura 3.4. Cambios histológicos durante la degradación del cartílago articular en la artrosis. El cartílago articular normal (a) está constituido fundamentalmente por matriz extracelular, con muy pocos condrocitos. El primer cambio histológico de la degeneración del cartílago visible desde la superficie es el deshilachamiento o fibrilación de la zona superficial (b). Además, la zona superficial pierde la mayor parte de los proteoglicanos (c: tinción con azul de toluidina para los glucosaminoglicanos). A medida que la enfermedad progresa, las irregularidades de la superficie se convierten en grietas, la mayor parte de la superficie articular se vuelve áspera e irregular y la fibrilación se extiende más profundamente en el cartílago hasta que las fisuras alcanzan el hueso subcondral (d). A medida que las fisuras del cartílago se hacen más profundas, los picos superficiales de cartílago fibrilado se rasgan, liberando fragmentos en el espacio articular y disminuyendo la viscosidad y el grosor del cartílago (d).

Los primeros cambios se producen sin que el paciente note ningún síntoma, ya que el cartílago, al no estar inervado, no tiene capacidad para producir dolor. En esta fase el cartílago todavía puede recuperarse y la enfermedad es potencialmente reversible.

La segunda etapa comienza cuando los condrocitos detectan el daño en el tejido (alteraciones en la osmolaridad, en la densidad de carga o en la tensión), y liberan mediadores que estimulan una respuesta celular, que consiste tanto en la estimulación de la actividad catabólica como de la anabólica [42]. Este estado hipermetabólico es interpretado como un intento de los condrocitos por reparar el daño en la matriz extracelular.

En esta segunda etapa del desarrollo de la artrosis, la respuesta de reparación –el aumento en la síntesis de macromoléculas de la matriz– contrarresta los efectos catabólicos de las proteasas y puede, en algunos casos, restaurar el tejido. La respuesta reparadora puede durar años, y en algunos pacientes puede revertir el curso de la artrosis al menos temporalmente [85]. Por esta razón, la degeneración de la superficie articular no es uniformemente progresiva y la velocidad de la degeneración varía dependiendo del individuo y de la articulación afectada. A veces la degeneración ocurre rápidamente, pero en la mayoría de las articulaciones la enfermedad progresa lentamente durante muchos años, aunque puede estabilizarse e incluso disminuir espontáneamente, con una restauración, al menos parcial, de la superficie articular y una disminución de los síntomas. Sin embargo, cuando el cartílago desaparece totalmente, la enfermedad pasa a ser severa y el proceso se hace irreversible. En este estado, los condrocitos no son capaces de reemplazar los componentes de la matriz.

El fallo en la estabilización o restauración del tejido conduce a la tercera etapa en el desarrollo de la artrosis: una pérdida progresiva de cartílago articular así como una disminución de la respuesta anabólica de los condrocitos.

Parece ser que los condrocitos pierden su capacidad para restablecer los proteoglicanos perdidos cuando la red de colágeno está alterada o interrumpida, o cuando el número de células viables se reduce hasta el punto de que las células remanentes no pueden sintetizar suficiente matriz como para reparar el daño. Cuando esto ocurre, el deterioro de la superficie articular puede progresar hasta la fibrilación y la fragmentación del cartílago articular. A medida que progresa el deterioro de la matriz, los fragmentos de cartílago se desgarran, dejando las zonas más profundas expuestas. Finalmente, se pierde el cartílago quedando expuesto el hueso subcondral (figura 3.3).

Alteraciones en otros tejidos de la articulación artrósica

A medida que desaparece el cartílago articular, el hueso que está debajo reacciona. Entre las alteraciones del hueso subcondral que acompañan a la degeneración del cartílago se incluye el aumento en la densidad del hueso subcondral (*esclerosis subcondral*). En el periodo final de la enfermedad, el cartílago articular ha desaparecido por completo, dejando una superficie

ósea desnuda. La remodelación del hueso junto a la pérdida del cartílago articular cambia la forma de la articulación y puede llevar a un acortamiento, deformidad e inestabilidad del miembro implicado.

En la mayoría de articulaciones sinoviales, el crecimiento de nódulos prominentes osteocondrales conocidos como *osteofitos* (también llamados *osteocondrofitos* o *condroosteofitos*) acompaña a los cambios en el cartílago articular y en el hueso subcondral (figura 3.5). Estas prominencias fibrocartilagosas y óseas se forman normalmente a partir de tejido asociado con la sinovia o a partir de células progenitoras del pericondrio [86], desarrollándose alrededor de la periferia de la articulación (*osteofitos marginales*), en la interfase cartílago-hueso (*osteofitos centrales*), pero también pueden aparecer a lo largo de las inserciones de la cápsula articular (*osteofitos capsulares*). Aunque se desconoce el significado funcional de los osteofitos, se consideran como un intento de reparación de la articulación osteoartrósica [84] que podría ayudar a estabilizar las articulaciones afectadas [87].



Figura 3.5. Radiografía de la mano de un paciente con artrosis en la que se aprecian claramente los osteofitos.

La localización de los osteofitos es característica de cada articulación. En las articulaciones interfalángicas distales, los osteofitos (*nódulos de Heberden*) son prominentes en las caras dorsal y palmar de ambas superficies articulares. En la articulación metacarpofalángica del dedo gordo del pie el osteofito se sitúa en el margen medial de la articulación (*hallux valgus*). En la cadera, aunque los osteofitos están presentes alrededor de todo el margen de la articulación, existe un gran osteofito característico en la superficie medial de la articulación que se extiende hasta la fovea.

La pérdida de cartílago articular también provoca cambios secundarios en tejidos como la membrana sinovial, los ligamentos, la cápsula articular y los músculos que mueven la articulación implicada. La membrana sinovial se engrosa y produce un líquido sinovial alterado. Los fragmentos aislados de cartílago que se han soltado y que flotan libres en la cavidad articular pueden originar una inflamación de la membrana (*sinovitis*) y la producción de sustancias que

al pasar a la cavidad articular aceleran la destrucción del cartílago. Los estudios histológicos han demostrado que existe similitud entre la respuesta inflamatoria de algunos casos de artrosis severa y la observada en la artritis reumatoide. Sin embargo, en la artrosis la inflamación sinovial es el *resultado* de la rotura del cartílago, mientras que en la artritis reumatoide la inflamación sinovial es la *causa* de la rotura del cartílago.

Bajo condiciones normales la membrana sinovial es responsable de la nutrición del cartílago articular. Por lo tanto, es de esperar que la membrana sinovial inflamada y llena de cicatrices de la articulación artrósica funcione defectuosamente en relación con la membrana sinovial de una articulación sana. El fluido sinovial normal, un dializado del plasma al que las células sinoviales añaden ácido hialurónico, es viscoso y de color amarillo pálido. El volumen de este fluido, incluso en grandes articulaciones, es pequeño. El examen del líquido sinovial es de gran ayuda en el diagnóstico de la artrosis, en la determinación tanto de su causa como de la etapa de la enfermedad, pues el líquido sinovial se verá alterado cualquiera que sea la causa de la artrosis.

En la artritis inflamatoria, hay un aumento en el volumen de líquido sinovial y el contenido en ácido hialurónico disminuye apreciablemente conduciendo a un típico descenso en la viscosidad. Sin embargo, en las formas degenerativas de artrosis, la cantidad de ácido hialurónico aumenta, lo que produce un líquido sinovial extremadamente viscoso. Algunas veces se observa un aumento de volumen, aunque no en el mismo grado que el observado en la artritis reumatoide.

El uso disminuido de la articulación dolorida y una limitación en el rango de movimiento origina la pérdida de masa muscular o a la atrofia muscular. En muchos casos, se desarrollan tendinitis y bursitis acompañando a la enfermedad, tal vez por la sobrecarga mecánica de la articulación.

Características bioquímicas y metabólicas del cartílago artrósico

Cambios en el contenido de agua

Los proteoglicanos son los responsables de retener agua en la matriz extracelular del cartílago articular; sin embargo, a pesar de que la concentración de proteoglicanos se encuentra significativamente reducida en el cartílago artrósico, existe un aumento en la concentración de agua, así como un aumento en la avidéz con la que el tejido retiene agua al compararlo con tejidos normales [32,77,88].

Se han propuesto diferentes explicaciones a este aumento temprano en el contenido acuoso en el cartílago enfermo. La más aceptada es que está provocado por la rotura de la red de colágeno y la consiguiente exposición de los proteoglicanos captadores de agua. El tratamien-

to del cartílago normal con colagenasa produce un cambio similar, lo que apoya la idea de que las anomalías intrínsecas en la red de colágeno deben ser una parte muy significativa de la lesión artrósica [89].

Cambios en los proteoglicanos

Varios autores [90-93] han descrito que el cartílago articular pierde proteoglicanos durante el proceso artrósico y que esta disminución en la concentración de proteoglicanos parece ser directamente proporcional a la severidad de la enfermedad.

Como explicamos más arriba, los proteoglicanos del cartílago, que consisten en una proteína central y cadenas laterales de glucosaminoglicanos, se encuentran normalmente como agregados constituidos por subunidades que están unidas de forma no covalente a sitios específicos de una larga cadena de ácido hialurónico en una interacción que es estabilizada por proteínas de unión. En la artrosis, el cartílago pierde agregados de proteoglicanos aumentando la proporción de monómeros de proteoglicanos [94,95].

Otros cambios importantes en la estructura bioquímica de los proteoglicanos del cartílago articular incluyen: acortamiento de la proteína central de la subunidad de proteoglicanos, acortamiento de las cadenas de glucosaminoglicanos y disminución en el tamaño del polímero de ácido hialurónico.

Cambios en el colágeno

En el cartílago articular, la red de colágeno es el componente clave que mantiene la estructura tridimensional del tejido. En particular, la zona superficial del cartílago articular contiene fibras de colágeno orientadas paralelas a la superficie articular que ejercen gran influencia en la calidad biomecánica del cartílago.

En los primeros estudios en los que se determinó la concentración de colágeno en el tejido normal y artrósico [76,90,96] no se encontró una alteración significativa en la cantidad de colágeno por unidad de peso de tejido o por unidad de DNA, lo que sugería que la concentración de colágeno en el cartílago artrósico permanecía invariable. Sin embargo, actualmente se acepta que la degradación del colágeno tipo II es una característica fundamental de la artrosis [79,82,97-102].

Muchos estudios han destacado la degradación temprana de los agregados en el cartílago articular osteoartrósico, y una posterior degradación del colágeno tipo II; sin embargo, los estudios más recientes han cuestionado este hecho proporcionando evidencias de que la degradación del colágeno del cartílago es una de las primeras alteraciones estructurales en la artrosis [82,103-109]. De hecho, actualmente se considera que la activación de las vías de

degradación proteolítica del colágeno tipo II es tan rápida como la de los agreganos y otros componentes de la matriz del cartílago [82,98,100,109,110]. Sin embargo, no existe aún un acuerdo sobre la secuencia de eventos que conduce a la degradación del cartílago en la osteoartrosis [111].

Las primeras alteraciones en el colágeno tipo II, al igual que las de los proteoglicanos, ocurren en la zona superficial del cartílago, al mismo tiempo que ésta sufre fibrilación, extendiéndose progresivamente a medida que progresa la enfermedad, hacia las zonas intermedia y profunda del cartílago [98,100,112]. El daño inicial siempre se observa con más intensidad alrededor de los condrocitos, y más moderadamente en la región territorial, lo que sugiere que en la mayoría de los casos esta degradación está mediada por el condrocito [98-100].

La degradación del colágeno tipo II en la artrosis implica un aumento en la actividad de la colagenasa [40,97,113] y un aumento en la síntesis de moléculas de la matriz, incluido el colágeno tipo II, en un intento de reparación del cartílago dañado [76,79,97,112,114-117] (tabla 3.4). Sin embargo, las moléculas recién sintetizadas están a menudo dañadas [101], comprometiendo cualquier intento de reparación de la matriz del cartílago.

Tabla 3.4. Cambios en la tasa de degradación y síntesis del colágeno tipo II a lo largo del curso de la artrosis [118].

	OA temprana	OA intermedia	OA tardía
Degradación de colágeno tipo II	↑↑↑	↑↑	↑
Síntesis de colágeno tipo II	↑↑	↑↓	↓

También se ha descrito un aumento en el contenido de colágenos menores, que raramente están presentes en el cartílago articular, como los tipos I y III [119-122], lo que sugiere la existencia de una alteración en el patrón normal de síntesis de colágeno por parte de los condrocitos en la artrosis. Además, se ha demostrado que los condrocitos articulares humanos del cartílago afectado por artrosis expresan procolágeno tipo IIA [123]. Existen dos formas de procolágeno tipo II. El tipo IIA incluye un dominio globular de 69 aminoácidos, rico en cisteína, ausente en el tipo IIB. El tipo IIB del procolágeno se expresa en gran cantidad por los condrocitos bien diferenciados, formando la red de colágeno del cartílago articular adulto. Por el contrario, el tipo IIA se expresa en el cartílago inicial [124] y puede expresarse más tarde en el cartílago hipertrófico.

También se han observado que existen variaciones en los colágenos de tipo V, VI, IX, X y XI en la artrosis, lo que podría explicar algunas características de la enfermedad y quizás su influencia en el contenido de agua y la distribución de proteoglicanos en el cartílago articular. Existe un aumento en la síntesis y la degradación del colágeno tipo VI de la matriz pericelular, lo que puede impedir las interacciones célula-matriz, y la célula puede perder su protección frente a fuerzas de compresión. Las alteraciones en el colágeno tipo VI también pueden influir

en el aumento en la actividad sintética y proliferativa de los condrocitos que conduce a la formación de las agrupaciones de células típicas del cartílago osteoartrósico.

Existe también un aumento en la degradación del colágeno tipo I (principal componente estructural del hueso, ~90% de la matriz orgánica) [125] y un aumento en su tasa de síntesis, fundamentalmente en la zona subcondral [126].

Finalmente, la degradación de colágeno y proteoglicanos conduce a la pérdida neta de estas moléculas. Se ha sugerido que si pudiera prevenirse el daño al colágeno y pudiera promoverse su reparación, entonces sería posible que el cartílago se reparara a sí mismo, pues el cartílago artrósico tiene una gran capacidad para renovar el componente proteoglicano de la matriz extracelular [98,127].

Cambios en otros materiales

Existe un considerable número de datos que demuestran un aumento en el contenido de cristales de pirofosfato cálcico [128-130] en el cartílago artrósico, así como una acumulación de fibronectina de 10 a 40 veces superior en la matriz extracelular del cartílago articular y en el líquido sinovial artrósico con respecto a los controles sanos [131-135], fundamentalmente en la región pericelular de la zona superficial [135].

Enzimas de degradación del cartílago articular

Quizás uno de los temas más controvertidos en el análisis bioquímico del cartílago en la artrosis es el estudio de la actividad metabólica del tejido comparada con la del tejido normal. La idea de que la artrosis consiste en un proceso de desgaste del cartílago hizo pensar en un primer momento que las células presentaban una actividad anabólica disminuida. Sin embargo, diversos estudios demuestran que el cartílago de las articulaciones osteoartrósicas humanas es considerablemente más activo metabólicamente que el cartílago articular normal [93,136,137]. A pesar de la pérdida global de componentes de la matriz extracelular del cartílago, su síntesis se encuentra aumentada, al menos en los estadios iniciales de la enfermedad, dado que los condrocitos intentan reparar la matriz dañada aumentando su actividad anabólica; posteriormente, cuando la artrosis se hace suficientemente intensa, la capacidad de los condrocitos para la síntesis proteica disminuye. Sin embargo, se desconoce si estos procesos degradativos son eventos primarios o una reacción secundaria.

De esta forma se postula que la destrucción del cartílago en la artrosis se debe a un desequilibrio entre los procesos de degradación y de renovación de la matriz extracelular, de manera que los procesos anabólicos se hacen relativamente ineficientes en comparación con los catabólicos. Aunque se desconoce el mecanismo exacto por el que se desarrolla la artro-

sis, existen amplias evidencias de que las metaloproteasas (MMPs, del inglés *Matrix Metalloproteinases*), en especial las colagenasas, están implicadas en la patogénesis de la enfermedad [97,98,101,115,138].

Las metaloproteasas son consideradas como las principales enzimas implicadas en la renovación de la matriz extracelular del cartílago tanto bajo condiciones fisiológicas como patológicas [139] debido a que son capaces de degradar todos sus componentes. Además, se han relacionado con la enfermedad artrósica dado que su expresión y síntesis aumenta en pacientes enfermos [140-142].

Las metaloproteasas (MMPs) constituyen una familia de endopeptidasas dependientes de zinc. Actualmente se conocen hasta 25 metaloproteasas que pueden ser clasificadas en cinco grupos principales, de acuerdo con la especificidad por su sustrato, su estructura primaria y su localización celular: colagenasas, gelatinasas, estromelisininas, matrilisininas y MT-MMPs (del inglés, *Membrane-Type Matrix Metalloproteinase*) (tabla 3.5).

Las **colagenasas** (colagenasa-1 o MMP-1, colagenasa-2 o MMP-8 y colagenasa-3 o MMP-13) son las únicas proteasas de vertebrados capaces de iniciar la degradación de la triple hélice del colágeno a pH neutro. La rotura se produce en un único punto de la triple hélice próximo al extremo N-terminal, originando dos fragmentos, uno de ellos del 75% de la longitud original del colágeno y el otro de un 25% [143]. A temperatura fisiológica, la triple hélice rota se desnaturaliza siendo susceptible al ataque de otras proteasas entre las que se incluyen gelatinasas y estromelisininas [139].

Se han encontrado niveles aumentados de muchas metaloproteasas en el cartílago osteoartrósico, entre las que se incluyen MMP-2, MMP-7, MMP-8, MMP-13 y MMP-14, así como otras enzimas proteolíticas como agreganasa-1 y agreganasa-2 [84]. Sin embargo, se desconoce qué proteasas son realmente cruciales para la degradación de los componentes de la matriz del cartílago, aunque la MMP-13 es un firme candidato para explicar la degradación primaria de las fibrillas de colágeno [97,102,110,138,144]. Se ha demostrado que MMP-13 se expresa fundamentalmente en el cartílago artrósico [97,101,138,142,145-148] existiendo una relación directa entre la degradación del colágeno y los niveles de MMP-13 [97,101], además posee más actividad colagenolítica sobre el colágeno tipo II que otras colagenasas como MMP-1 [149].

La colagenasa MMP-13 es la que probablemente interviene en la patología de la artrosis degradando las fibras de colágeno más alejadas de la célula en la matriz territorial e interterritorial [100], mientras que la MMP-1 es más importante que la MMP-13 en una minoría de pacientes y se cree que está más implicada en la degradación del colágeno que está siendo sintetizado [100].

Tabla 3.5. Metaloproteasas de la matriz (MMPs) y sus sustratos [139]. Las MMPs pueden ser clasificadas en cinco grupos principales, de acuerdo con la especificidad por su sustrato, estructura primaria y localización celular: colagenasas, gelatinasas, estromelinas, matrilisinas y MT-MMPs. Sin embargo, existen algunas MMPs, tales como la elastasa de macrófagos (MMP-12), estromelina-3 (MMP-11), MMP-19, enamelinina (MMP-20), CA-MMP (MMP-23) y epilina (MMP-14), que no parecen caer en ninguna de estas categorías. Además, algunas enzimas, tales como MT1-MMP (MMP-14), que presenta actividad colagenolítica y está asociada a membrana, podría ser clasificada en más de una categoría. En negrita se resaltan las principales MMPs implicadas en la degradación de la matriz del cartilago en la osteoartritis.

MMP	Enzima	PM latente	PM activa	Sustratos
MMP-1	Colagenasa-1	55.000	45.000	Colágenos I, II, III, VII, VIII y X, gelatina, agregano, proteína de unión de los proteoglicanos, caseína, proMMP-2, proMMP-9
MMP-2	Gelatinasa A	72.000	66.000	Colágenos I, IV, V, VII, X, XI y XIV, gelatina, elastina, fibronectina, agregano, proteína de unión, proMMP-9, proMMP-13
MMP-3	Estromelina-1	57.000	45.000	Colágeno III, IV, IX y X, gelatina, agregano, proteína de unión, fibronectina, elastina, proMMP-1, proMMP-7, proMMP-8, proMMP-9, proMMP-13
MMP-7	Matrilina-7 (PUMP-1)	28.000	19.000	Colágeno IV y X, gelatina, agregano, proteína de unión, fibronectina, proMMP-1, proMMP-2, proMMP-9
MMP-8	Colagenasa-2	75.000	58.000	Colágeno I, II, III, V, VII, VIII y X, gelatina, agregano, fibronectina
MMP-9	Gelatinasa B	92.000	86.000	Colágeno IV, V, VII, X y XIV, gelatina, elastina, agregano, proteína de unión, fibronectina
MMP-10	Estromelina-2	57.000	44.000	Colágeno III, IV y V, gelatina, agregano, elastina, proteína de unión, fibronectina, proMMP-1, proMMP-8
MMP-11	Estromelina-3	51.000	44.000	Inhibidor de la proteasa- α_1
MMP-12	Metaloelastasa de macrófagos	54.000	45.000/ 22.000	Colágeno IV, gelatina, elastina, fibronectina, vitronectina, lamina

MMP-13	Colagenasa-3	60.000	48.000	Colágeno I, II, III y IV, gelatina, agregano, tenascina
MMP-14	MT1-MMP	66.000	56.000	Colágeno I, II y III, gelatina, elastina, fibronectina, vitronectina, agregano, proteoglicanos de dermatán sulfato, MMP-2, MMP-13
MMP-15	MT2-MMP	72.000	60.000	proMMP-2, gelatina, fibronectina, laminina
MMP-16	MT3-MMP	64.000	52.000	proMMP-2
MMP-17	MT4-MMP	57.000	53.000	
MMP-18	Colagenasa de Xenopus	55.000	42.000	
MMP-19		54.000	45.000	Colágeno IV, gelatina, laminina, tenascina, fibronectina, agregano, COMP
MMP-20	Enamelisina	54.000	22.000	
MMP-21	XMMP (Xenopus)	70.000	53.000	
MMP-22 (MMP-27)	CMMP (pollo)	52.000	43.000	Gelatina
MMP-23	CA-MMP	?	?	
MMP-24	MT5-MMP	63.000	45.000	proMMP-2, proMMP-9, gelatina
MMP-25	MT6-MMP, leucolisina		56.000	Colágeno IV, gelatina, fibronectina
MMP-26	Matrilisina-2, endometasa	28.000		Colágeno IV, fibronectina, gelatina, proMMP-9
MMP-28	Epilisina	59.000 (55.000)		Caseína

Las **gelatinasas** tienen una gran especificidad y pueden contribuir, junto con las colagenasas, a la degradación de los colágenos fibrilares [44, 150] y otras moléculas de la matriz extracelular como la fibronectina. Estudios sobre la expresión de metaloproteasas han demostrado que la expresión de gelatinasa es más pronunciada en las zonas superficiales del cartílago donde se observa la degradación de colágeno tipo II [150].

Las **estromelisin**as (estromelisin-1 [MMP-3] y estromelisin-2 [MMP-10]) tienen uno de los más amplios espectros de sustratos de las MMPs y pueden degradar la mayoría de componentes de la matriz extracelular, tales como la gelatina, la fibronectina, la elastina o el agre-

cano [151-153]; la proteína de unión [152]; y, además, la MMP-3 puede romper el dominio no helicoidal amino telopeptídico del colágeno tipo II [154], así como colágenos de los tipos IV, V, VII y IX. Sin embargo, la principal función de la estromelina en los tejidos conectivos es la activación de las colagenasas.

Tanto la estromelina, como las colagenasas y las gelatinasas son sintetizadas y secretadas en forma de precursores inactivos que para ser totalmente activadas (en el caso de la estromelina) o parcialmente activadas (en el caso de la colagenasa) deben sufrir la rotura de su región amino terminal por una proteasa como la plasmina. La total activación de la colagenasa, sin embargo, precisa una rotura adicional por la estromelina en su extremo carboxilo terminal [155,156].

Las proteasas **ADAMTs** (*A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs*) también están implicadas en la patología de la artrosis. Entre sus sustratos se incluyen componentes de la matriz del cartílago como el colágeno, los agreganos, la decorina o la fibromodulina. Se han identificado hasta 19 tipos de ADAMTs en humanos, de las cuales el cartílago normal las expresa todas exceptuando las ADAMTs-7 y -8 [157]. Al igual que las MMPs, las ADAMTs juegan un papel fundamental en la renovación de agreganos del cartílago humano normal así como en su degradación en el cartílago osteoartrosico [158].

Las proteasas responsables de la degradación del colágeno tipo II y de la degradación del agregano en la artrosis son diferentes; pues aunque la mayoría de metaloproteasas son capaces de degradar el agregano son mucho menos eficientes degradando este sustrato que degradando colágeno, así como menos potentes que las agreganasas degradando agregano. Las metaloproteasas de la matriz son principalmente responsables de la rotura del colágeno tipo II, mientras que las agreganasas, ADAMT-4 y ADAMT-5, han sido implicadas en la degradación del agregano [159,160].

Regulación de las enzimas de degradación del cartílago articular

La expresión y la síntesis de las enzimas implicadas en el catabolismo de la matriz extracelular parecen estar sometidos a una estricta regulación, que puede resultar comprometida en el cartílago osteoartrosico provocando un desequilibrio en la homeostasis de este tejido.

Se han caracterizado varios inhibidores de metaloproteasas que actúan *in vivo*, TIMPs (6-tiosina monofosfato): TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. TIMP-1 y TIMP-2 son capaces de inhibir la actividad de la mayoría de metaloproteasas conocidas por lo que desempeñan un importante papel en el mantenimiento del equilibrio entre la síntesis de matriz extracelular y su degradación [161-163]. Se ha demostrado que estos productos inhiben el crecimiento tumoral y la metástasis gracias a su actividad sobre las MMPs [163].

Existe un estrecho equilibrio entre la actividad metaloproteasa y los niveles de TIMP en el cartílago sano. En condiciones normales existe un exceso de TIMP sobre las metaloproteasas, mientras que en la artrosis, la concentración de TIMP no está aumentada en el mismo grado que la de proteasas; de hecho, existen resultados que demuestran que la cantidad de inhibidor se encuentra disminuida en el cartílago osteoartrosico [140], lo que puede conducir a un desequilibrio en el que las proteasas escapan al control del inhibidor y se produce una degradación excesiva de la matriz. Esta hipótesis puede ofrecer una explicación razonable de por qué el tejido llega a dañarse en la artrosis, mientras que en los tejidos normales, las mismas enzimas sólo dan cuenta de la renovación normal de la matriz [140].

Además, tanto la estromelisin, como las colagenasas y las gelatinasas son sintetizadas y secretadas como enzimas latentes que para ser activadas necesitan la intervención de la plasmina. El plasminógeno, precursor de esta enzima, es una serín proteasa presente en el plasma y en el líquido sinovial. El activador tisular del plasminógeno (TPA) es responsable de la conversión del plasminógeno en plasmina. El regulador que previene esta activación en el cartílago es el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI 1) [164].

Por lo tanto, el equilibrio homeostático del sistema descansa en al menos dos inhibidores: TIMP [161] y PAI-1 [164], los cuales sirven para limitar la actividad degradativa de las metaloproteasas neutras activas y del activador del plasminógeno, respectivamente.

La liberación de proteasas por parte de los condrocitos también está regulada en gran parte por citoquinas como la interleuquina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). Existen amplias evidencias que implican a estas citoquinas como importantes agentes en la etiopatogénesis de la enfermedad [33,44,165]. La IL-1 es una citoquina que activa la cascada degradativa en el cartílago provocando una drástica pérdida de los componentes de la matriz, hasta el punto de que uno de los nombres iniciales de esta citoquina fue *factor catabólico del cartílago* o *catabolina*. La IL-1 es sintetizada activamente por condrocitos artrósicos y también ha sido identificada en la membrana sinovial de pacientes enfermos. De manera similar el TNF- α está presente tanto en los condrocitos como en los sinoviocitos de la artrosis. La IL-1 estimula la síntesis de las siguientes enzimas en el cartílago: estromelisin latente, gelatinasa latente, colagenasa latente [41,44,99,138,145,149,158,166-169] e inhibe la síntesis de los principales componentes del cartílago: colágeno y proteoglicanos [44,120,170]. La tabla 3.6 recoge las principales funciones de las citoquinas y los factores de crecimiento implicados en el metabolismo del cartílago.

En condiciones normales, la homeostasis cartilaginosa se mantiene por la acción de los factores de crecimiento, IGF-1, FGF y TGF- β fundamentalmente, que aseguran la reposición de la matriz extracelular lentamente degradada en estas condiciones. Sin embargo, ante el efecto de un posible agente inductor de artrosis, ya sea físico –sobrecarga biomecánica articular, traumatismo, etc.– o químico –microcristales, metabolitos tóxicos como ácido homogentísico, escasez de nutrientes, etc.–, el equilibrio metabólico se desplazaría a favor de la

degradación cartilaginosa por efecto de proteasas liberadas por los condrocitos. Esto es consecuencia de la acción sobre los condrocitos de citoquinas como la IL-1 y el TNF- α , producidas por ellos mismos. En estadios iniciales es posible que la acción reparadora de los factores de crecimiento IGF-1, FGF y TGF- β pueda restablecer la integridad del tejido, pero ante la continuación del estímulo negativo, estos factores de crecimiento serían incapaces de frenar el proceso degenerativo del cartílago.

Tabla 3.6. Efecto de las citoquinas sobre el metabolismo del cartilago [33]. Entre las citoquinas más estudiadas por su posible función en el metabolismo cartilaginosa se encuentran la IL-1, el TNF- α y los factores de crecimiento de células mesenquimales TGF- β , IGF-1 y FGF. En azul se resaltan las principales citoquinas implicadas en la degradación del cartílago durante el proceso artrósico.

Citoquina	Proliferación condrocitos	Síntesis MEC	Metaloproteasas
IGF	++	++	-
FGF	+++	+	-
TGF- β	+++	++	-
IL-1	-	-	+
TNF-α	-	-	+

También se ha demostrado que el daño oxidativo debido a la sobreproducción de óxido nítrico y otras especies reactivas de oxígeno puede estar implicado en la patogénesis de la artrosis [67,69,171-173]. Los condrocitos son capaces de producir radicales libres como el óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS) [57,67,69,174]. Este estrés oxidativo afecta a la longitud de los telómeros y la capacidad de replicación de los condrocitos [172], así como a la producción de proteoglicanos [172] y colágeno [173]. Esta capacidad del NO para inhibir la síntesis de los dos principales constituyentes macromoleculares de la matriz cartilaginosa lo convierten en un agente potencialmente poderoso en la patología del cartílago en la artrosis y otras enfermedades articulares.

Criterios diagnósticos

Actualmente el diagnóstico de la artrosis se lleva a cabo mediante el análisis de los síntomas y signos descritos por el paciente –dolor, rigidez, inflamación, etc.– y, fundamentalmente, mediante evidencias radiográficas como la disminución del espacio articular, debida a la pérdida de cartílago, la presencia de osteofitos y la esclerosis del hueso subcondral (tabla 3.7).

Tabla 3.7. Correlación entre las lesiones estructurales de la artrosis y la imagen radiográfica.

Lesión estructural	Imagen en radiología
Degradación del cartílago	Disminución del espacio articular
Compactación del hueso	Hueso articular más blanco y eburnizado
Crecimiento del hueso marginal	Osteofito
Engrosamiento de la membrana sinovial	Aumento de las partes blandas

En 1950 se realizaron los primeros estudios de población general para evaluar la prevalencia de la artrosis por Lawrence y Kellgren y son estos autores los que, en 1957, establecieron unos criterios radiográficos que han sido ampliamente utilizados hasta la actualidad y que permiten distinguir cinco grados de enfermedad artrósica (tabla 3.8). En el grado 0 la articulación no muestra cambios morfológicos degenerativos con una superficie no fibrilada y reflectante; las articulaciones de grado 1 presentan mínima fibrilación; las articulaciones de grado 2 tienen profundas fisuras y/o surcos en el cartílago y pequeños osteofitos; las articulaciones de grado 3 presentan abundantes fisuras, prominentes osteofitos y un 30% o menos de la superficie de cartílago articular erosionada; las de grado 4 tienen osteofitos prominentes y más del 30% de la superficie articular erosionada hasta el hueso subcondral.

Tabla 3.8. Criterios radiográficos de la artrosis según la escala de Kellgren-Lawrence [55].

Grado	Criterios
0	Normal
1	Dudosa disminución del espacio articular; posibles osteofitos
2	Osteofitos definidos; posible disminución espacio articular
3	Osteofitos moderados, disminución del espacio articular, discreta esclerosis, posible deformidad de los contornos óseos
4	Grandes osteofitos, notable disminución del espacio articular, esclerosis severa, deformación definida de los contornos óseos

Sin embargo, aunque la radiografía sigue siendo la técnica de uso preferente para el diagnóstico de la artrosis, presenta varias limitaciones. Cuando existe evidencia radiológica de artrosis ya ha ocurrido un daño significativo en la articulación, por lo que los cambios precoces del cartílago, del hueso subcondral y los bordes articulares no se observan en las radiografías [43]. Otros métodos para detectar pérdida focal de cartílago son la artrografía con medio de contraste, ya casi en desuso, y la artroscopia, pero son técnicas invasivas que rara vez se utilizan en la práctica clínica. Actualmente, se tienden a utilizar métodos de diagnóstico por

imagen tales como la resonancia magnética nuclear (RMN) o la tomografía axial computerizada (TAC).

Por otro lado, gracias al mayor entendimiento de los procesos moleculares involucrados en esta patología, cada vez se tiende más al empleo de marcadores bioquímicos en el diagnóstico de la artrosis. Mientras que se necesita un intervalo de 1 ó 2 años para observar cualquier cambio significativo en las radiografías, los marcadores bioquímicos pueden proporcionar evidencias de cambios en la articulación en tan sólo unos pocos meses [79,82,100,106,107,175,176]. Además, existe un gran potencial en el uso de marcadores bioquímicos para identificar pacientes con alto riesgo de padecer la enfermedad, diagnosticar la enfermedad en una etapa temprana, determinar su severidad y monitorizar el efecto de cualquier tratamiento.

Los marcadores moleculares son fragmentos de algún constituyente de la matriz del cartílago –como la piridinolina, que es uno de los principales productos resultantes del entrecruzamiento del colágeno– o enzimas o citoquinas que intervienen en su metabolismo –como MMPs–, que son liberados a los fluidos corporales durante el proceso de síntesis y regeneración tisular, y pueden ser detectados mediante inmunoensayos. La velocidad de renovación de la matriz del cartílago, normalmente muy baja, aumenta en la artrosis, así como en las lesiones articulares [97,112]. Este aumento en la velocidad de recambio tisular implica la liberación de moléculas y fragmentos moleculares en el líquido sinovial, la sangre y la orina, que pueden ser detectados con técnicas analíticas de rutina [82].

La especificidad tisular debería ser una de las principales características de un marcador bioquímico. Además, un buen marcador bioquímico también debe especificar si está teniendo lugar la degradación o la síntesis de la molécula en cuestión (tabla 3.9). Dado que la pérdida de cartílago articular es el resultado de un aumento en la velocidad de degradación de colágeno tipo II [97,99,100,105] y esta molécula, además de ser la proteína más abundante en el cartílago, es prácticamente exclusiva de este tejido, la determinación de su síntesis y degradación puede resultar de gran utilidad en el diagnóstico de la enfermedad. Afortunadamente, se han desarrollado inmunoensayos para detectar productos de la degradación y la síntesis del colágeno tipo II en fluidos corporales como la sangre, la orina o el líquido sinovial.

Durante la síntesis del colágeno y antes de su incorporación en la matriz del cartílago, los propéptidos carboxilo y amino terminales son eliminados en reacciones catalizadas por enzimas específicas y liberados hacia el líquido sinovial y la sangre. Por esta razón se cree que los niveles séricos de estos propéptidos son un buen índice de la tasa de síntesis de colágeno [79,106,177]. Varios autores [79,106,176,177] han demostrado que los niveles séricos del propéptido carboxilo terminal se encuentran aumentados en pacientes con osteoartritis, excepto en las etapas más avanzadas.

Para determinar la degradación del colágeno tipo II se han desarrollado inmunoensayos que reconocen epítopes de dominios de triple hélice desnaturalizados [100] o productos resultantes del entrecruzamiento del colágeno, como la piridinolina –compuesto derivado de lisina o hidroxilisina que liga los cruces de las cadenas del colágeno maduro– o secuencias del extremo carboxílico del telopéptido, como CTX-2 [105-107,175,178]. Mediante estas técnicas se ha demostrado que existe un aumento en la velocidad de degradación del colágeno tipo II tras lesiones articulares (menisco y/o ligamento cruzado anterior) y en la osteoartritis [82,97,98,105,106,178].

Para determinar la precisión de estos marcadores bioquímicos se suelen correlacionar con el grado de destrucción articular mediante la escala de Kellgren-Lawrence (tabla 3.8). Uno de los que mejor correlación muestra es CTX-II [105,175], un epítape específico derivado del telopéptido carboxilo del colágeno tipo II. Los niveles de CTX-II aumentan significativamente en enfermedades en las que la velocidad de renovación del cartílago está aumentada, tales como la artrosis y la artritis reumatoide [106], y estos niveles se correlacionan con las lesiones radiográficas, el dolor y la función articular en pacientes con artrosis de rodilla [105,106,179].

Tabla 3.9. Potenciales marcadores bioquímicos de artrosis [179].

Marcadores	Especificidad tisular	Proceso detectado
Propéptidos N/C del colágeno	Hueso (tipo I) Cartílago (tipo II) Sinovia (tipo I, III)	Formación de colágeno
Entrecruzamientos de piridinolina		Degradación del colágeno
Telopéptidos N/C del colágeno	Hueso (tipo I) Cartílago (tipo II) Sinovia (tipo I, III)	Degradación de colágeno
Epítapos del colágeno tipo II generados tras la actuación de la colagenasa	Cartílago	Degradación de colágeno
Fosfatasa alcalina del hueso	Hueso	Formación
Osteocalcina	Hueso	Formación
Sialoproteína ósea	Hueso (subcondral)	Mineralización
Fragmentos de proteoglicano	Cartílago	Degradación
Queratán sulfato (5D4, AN9P1)	Cartílago	Degradación
Condroitín sulfato	Cartílago	Degradación
COMP		Degradación
Hialuronano	Sinovia	Inflamación
YKL-40		Inflamación sinovial
CRP		Inflamación sinovial
MMPs y TIMPs		Inflamación sinovial

Otros marcadores de artrosis incluyen marcadores de la renovación de los proteoglicanos [142,180-185]; marcadores de inflamación sinovial, tales como la proteína C reactiva (CRP) [186], hialuronano [187,188], metaloproteasas (MMPs) e inhibidores de proteasas (TIMPs) [99,149]; y marcadores de la renovación ósea, tales como la sialoproteína ósea (BSP) [179] (tabla 3.9).

Tratamiento de la artrosis

La artrosis no tiene cura en la actualidad. Hasta hoy en día sólo se dispone de tratamiento sintomático para la artrosis. Los tratamientos utilizados están encaminados simplemente a aliviar los síntomas y el dolor, pero no reparan el daño producido en el cartílago articular ni influyen en la progresión de la enfermedad [189].

Tratamiento no farmacológico

El tratamiento no farmacológico consiste en terapia física y cambios en el estilo de vida de los pacientes, que provoquen una disminución de la carga sobre la articulación. A los pacientes con artrosis se les recomienda, en primer lugar, corregir, cuando sea posible, los factores desencadenantes o agravantes. En este sentido es importante procurar no someter a las articulaciones a sobrecargas que pueden ocasionar un aumento del dolor. En la artrosis de los miembros inferiores es necesario limitar el uso de las articulaciones (paseos largos, carreras, cargar peso, etc.), pero nunca es recomendable la inmovilidad. El uso de bastones o muletas en el lado sano puede ayudar a reducir el peso que soportan las articulaciones. Asimismo, se recomienda eliminar o atenuar la obesidad, cuando ésta está presente, para ayudar a reducir la progresión de la artrosis por sobrecarga [43].

Se recomienda que el paciente aprenda que es preferible usar la articulación, que protegerla evitando toda actividad, ya que el movimiento suave favorecerá la correcta distribución del líquido sinovial mejorando así la nutrición del tejido. Se le recomienda que realice ejercicios ligeros a diario, con objeto de mantener la masa muscular y el rango de movilidad de la articulación afectada.

Los tratamientos con frío y calor pueden aliviar el dolor y la sensación de rigidez articular, al menos temporalmente. Al levantarse por las mañanas, se recomienda realizar un masaje con el chorro de agua caliente en las zonas afectadas para eliminar la sensación de rigidez. El frío local puede aliviar el dolor en algunas personas.

Cirugía

En pacientes con artrosis avanzada e incapacitante se llegan a practicar procedimientos quirúrgicos como:

a) La artroplastia (reemplazo total o parcial de la articulación deteriorada por una prótesis artificial); que ha evolucionado espectacularmente en los últimos años gracias a las mejoras en los materiales de fricción y los diseños de las prótesis.

b) La cirugía artroscópica (para eliminar el cartílago artificial fibrilado y deshilachado dejando una superficie articular lisa).

c) La osteotomía (cambio en la alineación de un hueso para aliviar la tensión sobre la articulación).

d) Perforación o abrasión del hueso subcondral (penetración del hueso subcondral para interrumpir vasos sanguíneos y estimular la proliferación de células y la formación de tejido de reparación fibrocartilaginoso).

e) El lavado articular (evacuación de detritus intraarticulares y partículas de microcristales, dilución de las enzimas degradantes del cartílago, así como de citoquinas implicadas).

Tratamiento farmacológico

El tratamiento farmacológico de la artrosis es de tipo sintomático. Los medicamentos que habitualmente se recetan para el tratamiento de la artrosis son analgésicos y antiinflamatorios, que persiguen aliviar el dolor y reducir la duración de la rigidez, pero no pueden corregir ni detener el proceso artrósico progresivo, y menos aún revertirlo.

Los analgésicos, fundamentalmente el paracetamol, la aspirina y similares, se utilizan para tratar el dolor de poca intensidad en las etapas iniciales de la enfermedad. Si el dolor del paciente no se resuelve con analgésicos se le suelen recetar antiinflamatorios no esteroideos (AINE) más específicos. Sin embargo, nosotros pensamos que estos medicamentos no son adecuados para tratar la artrosis, pues no se trata de una patología inflamatoria sino degenerativa, y la inflamación es una manifestación de la respuesta inmune que acontece cuando se ha desencadenado el problema degenerativo. Asimismo, existen varios trabajos que demuestran el efecto tóxico de muchos AINE sobre el cartílago, que pueden acelerar la degradación del cartílago articular, produciendo un empeoramiento anatómico de la enfermedad [190,191].

La artrosis es una enfermedad de una alta incidencia y de un coste socioeconómico elevado. Por estos motivos, paralelamente al tratamiento sintomático, realizado con analgésicos y/o AINE, se mantiene una investigación acelerada, en busca de fármacos capaces de alterar su curso. Los recientes avances en el entendimiento de la fisiopatología de la artrosis han

conducido a la exploración de nuevos enfoques en el tratamiento de esta enfermedad, como son los inhibidores de metaloproteasas, inhibidores de citoquinas (diacereína), inhibidores de la síntesis de óxido nítrico y antioxidantes, promotores del crecimiento de los condrocitos y el hueso, trasplantes e injertos de cartílago, terapia génica, etc. [192].

Actualmente se tiende a diferenciar entre fármacos modificadores de los síntomas y fármacos modificadores de la estructura (STMOADs, del inglés *Structure Modifying OA Drugs*), existiendo un gran interés sobre los fármacos condroprotectores, capaces de prevenir, retardar y reparar las lesiones morfológicas del cartílago humano.

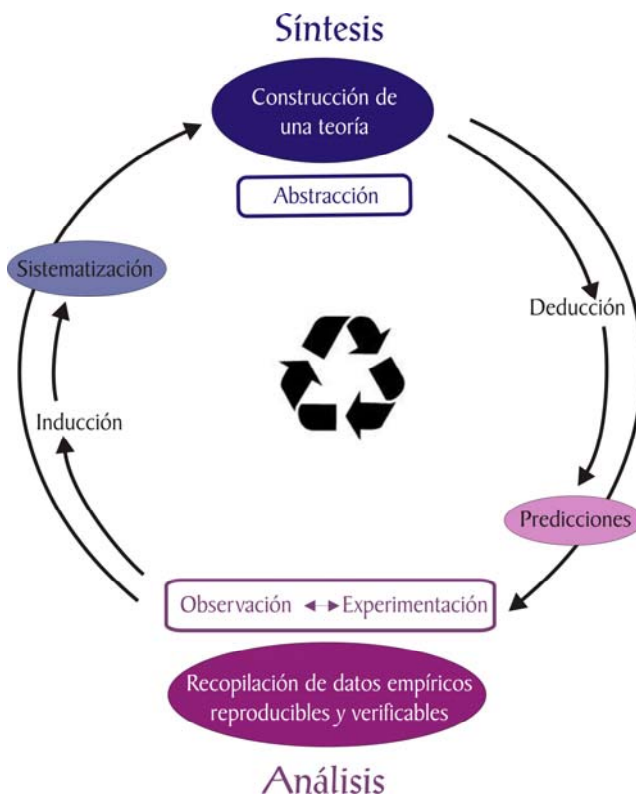
Tratamiento nutracéutico

Desde la década de 1990 hay un creciente interés por los llamados agentes antiartrosicos, entre los que se incluyen el sulfato de glucosamina, el condroitín sulfato (CS), el piascledine (una mezcla de aceites insaponificables de soja y aguacate) y el ácido hialurónico, clasificados como agentes modificadores de la enfermedad de acción lenta y considerados como nutracéuticos o suplementos nutritivos.

La glucosamina es un amino monosacárido sintetizado a partir de la glucosa, precursor de la biosíntesis de glucosaminoglicanos en el cartílago articular. Tanto los grandes agregados de proteoglicanos (agrecanos) como los pequeños proteoglicanos no agregados (biglicano, decorina y fibromodulina) del cartílago articular están compuestos por grandes cadenas de glucosaminoglicanos.

La base para la utilización de nutracéuticos es la provisión de precursores de la matriz del cartílago en cantidades en exceso para favorecer la síntesis de matriz y la reparación del cartílago articular. Los suplementos con sulfato de glucosamina han sido prescritos para tratar la artrosis desde la década de los 80 [64]. Existe, sin embargo, en la actualidad, una profunda controversia sobre el uso de la glucosamina. Diversos estudios parecen demostrar que la glucosamina se absorbe y difunde por diferentes órganos y tejidos, con una especial predisposición por el cartílago articular, donde puede ser efectiva en la estimulación de la síntesis de proteoglicanos, la reducción del dolor articular y la mejora de la movilidad articular [193]. Sin embargo, hay estudios recientes que parecen demostrar lo contrario. Nosotros pensamos que el tratamiento con glucosamina no puede ser muy eficaz, porque carece de suficiente soporte teórico, y tampoco ha aportado los resultados esperados, y nos inclinamos a pensar que la principal causa de la artrosis probablemente no esté en la dificultad del cartílago para fabricar glicosaminoglicanos, sino en la fabricación del colágeno. En la sección del estudio teórico (capítulo 7) justificamos esta hipótesis, y en el capítulo 10 presentamos una revisión crítica del tratamiento de glucosamina.

Hipótesis y objetivos



Capítulo 4

Hipótesis generales de la investigación bioquímica

Una teoría, en general, es un conjunto de axiomas que definen un sistema abstracto. Una *teoría científica* es más específica, pues se propone explicar una parte que se considera importante o trascendente del funcionamiento de la Naturaleza, como, por ejemplo la termodinámica, la mecánica cuántica, la teoría cinético-molecular de los gases, la geometría plana de Euclides, o la teoría de probabilidades.

Un modelo es una teoría 'menor', más simple, más concreta, que sólo pretende explicar un determinado aspecto de la Naturaleza. Ejemplos de modelos clásicos en Bioquímica son el modelo de cinética enzimática de Michaelis y Menten, y el modelo del operón de Jacob y Monod. La diferencia entre una teoría y un modelo es, pues, solamente que la teoría es más general, y más ambiciosa, mientras que el modelo es más particular. Además, a diferencia de una teoría, un modelo siempre se propone la explicación o la descripción teórica de un aspecto concreto de la Naturaleza, no puede ser totalmente abstracto, sino que sus elementos siempre tienen un significado físico.

Hipótesis y axiomas

Los axiomas son proposiciones que se aceptan *a priori*, sin más justificación, y sirven como punto de partida para construir el razonamiento lógico que constituye el desarrollo de la teoría. En un modelo, los axiomas se suelen denominar *hipótesis*, de manera que la única

diferencia entre hipótesis y axiomas es la misma que las que hemos señalado que hay entre modelos y teorías. La definición de los axiomas o hipótesis constituye la formalización o definición de la teoría. Cuando, en el desarrollo de una teoría se analizan casos particulares, dentro del ámbito general definido por los axiomas, la descripción de las nuevas condiciones se hace mediante proposiciones adicionales (siempre más restrictivas) que también se denominan hipótesis. Las hipótesis son, siempre, proposiciones restrictivas que se imponen para estudiar casos particulares.

En la matemática pura, los axiomas son simplemente proposiciones que definen un sistema abstracto delimitado por un marco teórico y no necesitan ninguna justificación. Así, no hay en principio ninguna restricción sobre qué axioma debe o no estar en la teoría, ni tiene sentido tratar de refutarlo.

En principio, los axiomas deben cumplir siempre las tres condiciones que exponemos a continuación. Cuando se trata de una teoría científica han de cumplir una cuarta condición que exponemos más abajo:

(a) *Tienen que ser consistentes.* Ninguno de ellos puede establecer una proposición que entre en conflicto con cualquier otro.

(b) *Deben ser independientes.* Tiene que ser posible eliminar cualquiera de ellos sin hacer ninguna modificación en los restantes.

(c) *No pueden ser repetitivos.* Si se eliminase un axioma, el sistema debería quedar libre de la restricción correspondiente.

Axiomas de las teorías científicas

Los axiomas son siempre restricciones del sistema abstracto –como *las reglas del juego*–, y así, la teoría debe tener siempre una formulación lo más abstracta posible. En la matemática pura, los axiomas se imponen ‘arbitrariamente’ sin necesidad de justificarlos. En una ciencia de la Naturaleza, como la biología, la bioquímica, la biofísica o la medicina, el concepto de teoría es el mismo desde un punto de vista formal (puramente matemático), es decir, un conjunto de proposiciones que marcan el punto de arranque para una investigación posterior. Sin embargo, como el desarrollo de estas ciencias intenta hacer un progreso, no en el desarrollo de sistemas abstractos, sino en el conocimiento de la Naturaleza, los axiomas deben formar parte del método científico, y por tanto deben tener otra condición adicional:

(d) *Los axiomas de una teoría científica no deben ser sólo proposiciones abstractas, sino propiedades reales del sistema, establecidas como consecuencia de observaciones empíricas.* Por lo tanto, cualquier teoría científica –cualquier investigación científica– debe apoyarse en resultados obtenidos en una investigación previa, para constituir sus hipótesis de trabajo.

Es propósito general de la investigación teórica encontrar una explicación racional de los axiomas. Cuando eso se consigue, el axioma deja de ser una proposición impuesta arbitrariamente, y queda convertido en teorema. También un axioma puede ser, o no, sustituido por otro más general, y la teoría antigua pasa a ser un caso particular de otra más general.

En la investigación científica, los axiomas de la teoría, precisamente por no estar impuestos arbitrariamente, sino porque ya pretenden ser en sí mismos abstracciones de resultados empíricos previos, no se aceptan incondicionalmente, sino que siempre se intenta probarlos con nuevas pruebas experimentales, ya sea para confirmarlos del mismo modo que se han formulado, para analizar su extensión y campo de aplicación real, o para encontrar su explicación como consecuencia de otros más generales, pues la rueda del conocimiento de la figura 4.1 debería girar sin descanso. Sin embargo, cuando una teoría está muy formalizada y muy desarrollada, este objetivo llega a considerarse poco menos que inalcanzable, y pocos o nadie se dedican a la investigación de los axiomas fundamentales de la Ciencia (por ejemplo, encontrar la explicación del primer principio de la termodinámica). La Ciencia avanza lentamente porque muy pocos buenos científicos se dedican a investigar problemas realmente trascendentes.

Una forma de progresar en la investigación de una teoría es tratar de eliminar un axioma y explorar cómo quedaría la teoría sin esa restricción, pero cuando un científico trata de hacer algo así, no significa que no esté de acuerdo con tal axioma o que pretenda refutarlo, sino simplemente que se propone analizar cómo podría ser la teoría sin esa restricción. En 1829 Nicolai Lobachevski, profesor de Matemáticas de la Universidad de Kazán (Rusia) demostró que la eliminación del quinto axioma de Euclides (el axioma de las paralelas) no destruye la geometría, sino que da lugar a las geometrías curvas, que son, sin embargo, tan consistentes como las euclídeas. Pero no es que Lobachevski no estuviese de acuerdo con el planteamiento inicial de Euclides, sino que pretendía investigar cómo podría ser la geometría si se pudiese quitar esa restricción. Después se vio que esa nueva geometría tenía grandes aplicaciones prácticas, por ejemplo, para calcular distancias y ángulos sobre la superficie esférica de la Tierra, o en el universo de Einstein, pero no era ése el propósito de Lobachevski, porque esos problemas no preocuparon hasta el siglo XX. Sin embargo, Lobachevski fue acusado de hereje de la Ciencia, y fue expulsado de su universidad. Gauss había llegado a las mismas conclusiones que Lobachevski pero no se atrevió a publicarlas, y sólo las reconoció cuando, más tarde, todos aceptaron esas conclusiones. Cuando se comprueba que un axioma determinado puede suprimirse sin que se desbarate la teoría original, esto significa haber encontrado la explicación de ese axioma, pues lo que antes era una proposición obligatoria que se imponía sin más explicación, ahora pasa a ser una determinada propiedad que puede aceptarse, o no, pero que al no ser obligatoria no necesita justificarse.

Proposiciones, teoremas y demostraciones

En matemáticas, la demostración de un teorema es inalterable porque es un resultado teórico, basado en unas hipótesis de partida y logrado sólo con el empleo de técnicas deductivas que siguen un razonamiento estrictamente lógico. Si más adelante se descubre una segunda demostración del mismo teorema, usando otra línea de razonamiento diferente, u otra herramienta matemática, no por ello queda más reforzado el resultado anterior, sino que lo nuevo que se ha logrado es poco más que una curiosidad. Pero en una ciencia de la Naturaleza, cuando la demostración de una proposición tiene un componente empírico, siempre queda reforzada por nuevos trabajos experimentales cuyos resultados sean consistentes con los anteriores.

La demostración de una propiedad de la Naturaleza se lleva a cabo con técnicas experimentales, necesariamente diferentes de las demostraciones matemáticas. ¿Puede hablarse entonces de 'demostración' en el mismo sentido que en matemáticas? ¿Puede un único resultado experimental demostrar una teoría, como una sola prueba deductiva demostrar un teorema? ¿Cuántos resultados serían necesarios para demostrarla?

Para contestar a estas preguntas hay que reflexionar otra vez sobre el método científico, representado en la figura 4.1. Si la construcción de una teoría es una improvisación para explicar unos resultados experimentales, no puede decirse, en absoluto, que esos resultados demuestren la teoría. Pero otra cosa muy distinta es que el desarrollo de la teoría produzca una conclusión que se puede comprobar en el laboratorio; entonces, si el resultado del experimento es positivo, sí puede considerarse que es una demostración, pues la proposición no es una consecuencia del laboratorio, sino una predicción de la teoría.

El trabajo de esta Tesis se sustenta en varias proposiciones. En primer lugar, presentaremos lo que consideramos que son los axiomas generales de la investigación bioquímica. Después presentaremos las hipótesis específicas de nuestra investigación. Estas hipótesis nos llevan a desarrollar un trabajo teórico, cuyas conclusiones son predicciones que nos llevan al trabajo experimental, que constituye la segunda parte de este trabajo.

Axiomas generales de la investigación bioquímica

1. El método científico.— El método científico debe ser la principal hipótesis de trabajo de cualquier disciplina científica, y por ello la primera de este trabajo. Es una hipótesis tan evidente que podría parecer innecesario recordarla aquí. Sin embargo, hemos considerado pertinente recordarla, porque existe la tendencia cada vez más extendida de encasillar una investigación —e incluso a un investigador— como '*teórico*' o como '*experimentalista*'. El método científico nos enseña que esta clasificación no tiene sentido. Una investigación científica no

puede pretender ser exclusivamente teórica o exclusivamente experimental –aunque eso sea práctica muy extendida, por desgracia–, pues una investigación científica consiste en una continua interacción entre el empirismo y la teoría, como puede verse en la figura 4.1, y no puede nunca dejar fuera a ninguna de estas partes. En el curso de este trabajo hemos procurado ser fieles a este principio, de forma que cada tipo de resultado pudiese ser criticado por la otra parte y ser útil a su desarrollo.

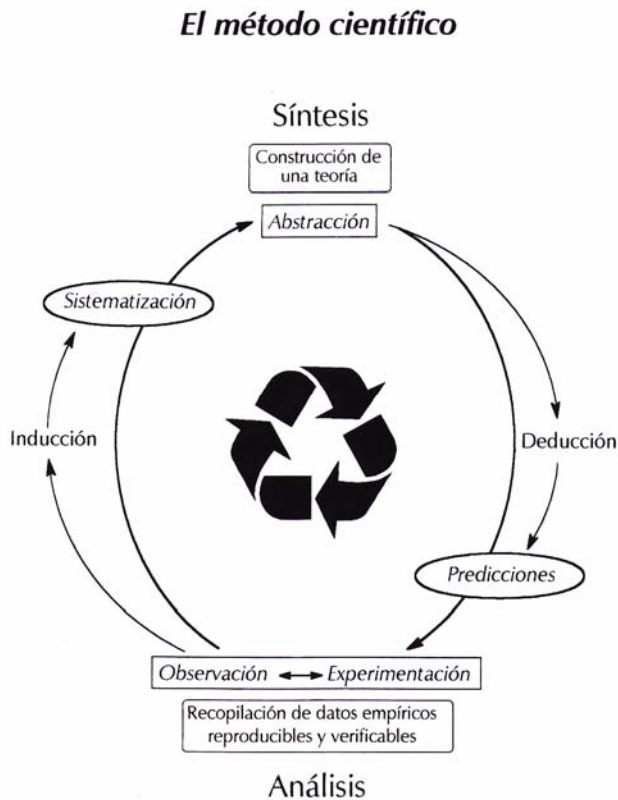


Figura 4.1. Esquema del método científico. El método científico consiste en una interacción continua entre la abstracción teórica y la comprobación empírica, dando vueltas a esta rueda –que deberíamos llamar *rueda general del conocimiento*–, hasta que la concordancia entre la teoría y la realidad sea lo más ajustada posible. Los resultados empíricos pueden ser observaciones directas de la Naturaleza, pero es más frecuente que se hayan obtenido en el laboratorio trabajando con sistemas reducidos, y siempre deben usarse para construir o modificar la teoría; la cual siempre debe estar basada en los resultados empíricos y debe explicarlos todos; y el desarrollo matemático de la teoría debe originar predicciones comprobables en el laboratorio [194].

2. La evolución biológica.— La evolución biológica es la ley fundamental de la biología y, como tal, debe ser considerada como una hipótesis imprescindible en cualquier trabajo sobre esta parte de la ciencia. El genetista norteamericano Theodosius Dobzhanski expresó esta

idea en 1973 con su famosa proposición '*Nada en biología tiene sentido si no es a la luz de la evolución*' [195]. Esta máxima debe marcar el pensamiento biológico, y el quehacer de toda investigación biológica. Todo el contenido de la biología debería revisarse con arreglo a este principio. Pero este principio no debería ser considerado como un deber duro que hay que cumplir, sino más bien, como una hipótesis de trabajo que debe hacer más fácil el razonamiento, el estudio y la investigación.

3. La selección natural.— La selección natural darwiniana es el mecanismo básico de la evolución biológica [196-199]. Hay tres características de la selección natural que interesa destacar aquí:

(a) Mecanismo de optimización. La selección natural es un algoritmo de búsqueda rápida y muy eficaz —el único que se ha comprobado que funciona—, que permite encontrar el máximo de la función de optimización en un tiempo muy corto [196]. La selección natural también explica el origen de la vida, ya que si no existiese este algoritmo de búsqueda tan eficaz, la aparición de la vida habría sido imposible. La selección natural produce la optimización de un sistema complejo para un determinado propósito, que en última instancia significa una ventaja reproductora. Esta hipótesis establece una reciprocidad e identidad entre selección natural y optimización de forma que la una puede ser reconocida a partir de la otra.

(b) Igualdad de optimización. Una estructura, un órgano o una función, cuya construcción depende de un conjunto de genes independientes, se optimiza al mismo nivel en cada una de sus partes. Nunca puede ocurrir que una parte alcance un grado de optimización superior a las demás. Esta hipótesis dice que si un conjunto se ha optimizado para conseguir una determinada función, el grado de optimización conseguido en cada una de sus partes debe ser igual. El fundamento de esta hipótesis es muy obvio. Las diferentes partes de una estructura no pueden tener un grado distinto de optimización, porque la optimización de la parte más lograda no podría cumplir su función si fallan las demás, de forma que la presión de selección para su ajuste fino no habría tenido razón de ser existiendo otras más prioritarias sin atender. Es la aplicación biológica del proverbio que dice que de nada sirve que haya eslabones muy fuertes en una cadena mientras siga habiendo uno débil.

(c) La selección natural no sigue un plan estratégico. La selección natural se diferencia de la selección artificial en que produce la optimización de un sistema complejo en todo su conjunto, es decir, optimiza una función compleja con todas sus variables para el propósito biológico global —que en última instancia siempre significa maximizar la descendencia con capacidad reproductora—, y su mecanismo está basado en la competencia. A diferencia de ello, la selección artificial es un fenómeno totalmente programado desde fuera, donde la especie es manipulada individualmente, seleccionando qué individuos se van a reproducir y cuáles no, con un criterio impuesto por motivos ajenos al de la capacidad de supervivencia de la especie viviendo en libertad (es decir, teniendo que soportar las condiciones de competencia), y por

tanto al margen de la organización biológica global del individuo. Por este motivo, la selección artificial no puede producir estructuras optimizadas en un sentido biológico global, sino estructuras más dotadas para una conveniencia específica del criador, pero por lo general, poco útiles para la supervivencia fuera de los cuidados del propio seleccionador. La elección arbitraria de un carácter como pauta selectiva para reproducirse no garantiza en absoluto la persistencia espontánea de la especie.

La selección natural, al ocuparse de resolver el problema presente, sin ninguna previsión de futuro, puede provocar que ciertas estructuras o funciones queden atrapadas en un callejón sin salida con muy mal arreglo, y eso puede ser la causa de extinciones masivas. Así ha ocurrido con la Rubisco, cuyo mecanismo de fijación de CO₂ no estaba programado para trabajar en las condiciones de la atmósfera actual, y en esta Tesis veremos otro caso muy similar que afecta a la síntesis del colágeno.

4. Oportunismo.— El oportunismo es una ley de la evolución, también formulada por Darwin en su descripción de los pinzones de las islas Galápagos. Consiste en que una estructura que ya existía, que se había seleccionado para una determinada función, se aprovecha para un propósito diferente. Véase una descripción más detallada de esta ley y ejemplos de su aplicación en el metabolismo en [199-202].

5. Termodinámica.— La termodinámica es la ley físico-química general más importante para comprender la Biología. Es una ley general de evolución según la cual los sistemas evolucionan espontáneamente hacia un aumento de entropía que suele implicar una diversificación de las especies y, en general, de todas las estructuras [202].

6. Filogenia de las especies biológicas.— Todas las especies biológicas, actuales y extinguidas, tienen un origen filogenético común, y tienen por tanto una relación de parentesco. Cuando se desea estudiar una propiedad biológica de una especie, siempre es posible encontrar otra muy próxima filogenéticamente, que pueda usarse como modelo experimental de la primera. Esta hipótesis es la base de la generalización de las leyes biológicas, descubiertas y estudiadas inicialmente en un caso particular, para luego aplicarlas en casos más generales. Representa el fundamento de usar un animal como un modelo experimental de otro. En particular, esta hipótesis es la base de la medicina experimental, pues establece la unidad de organización funcional y estructural de los seres vivos, desde sus aspectos más macroscópicos hasta el complejo mundo microscópico del metabolismo celular. El parentesco filogenético entre la especie diana y su modelo experimental hace que ni siquiera sea necesario que se trate siempre de individuos del mismo *phylum*. No hay que olvidar que las leyes de la herencia, que se aplican perfectamente en el hombre, fueron descubiertas por Mendel en el guisante. En esta Tesis hemos utilizado tejidos de ratón y de bóvido como modelos animales para deducir propiedades de los tejidos humanos.

7. El soporte químico de las funciones biológicas.— Una hipótesis general de este trabajo, que también debería aceptarse como axioma fundamental de la Biología, es que cualquier actividad macroscópica de los seres vivos está soportada químicamente por un sistema metabólico específico. De acuerdo con esta hipótesis, el diseño de un sistema bioquímico debe estar en buena concordancia con su función fisiológica. Esto debe considerarse como un axioma fundamental en la Biología, ya que todos los aspectos de la vida están basados en las reacciones químicas. Esta hipótesis, llevada a su último extremo, dice que no puede haber biología sin química.

Esta hipótesis no significa que el metabolismo pueda explicarlo todo, es decir, que los seres vivos sean exclusivamente sistemas químicos. Hay muchas funciones y propiedades de los sistemas biológicos en los que intervienen procesos puramente físicos (sin modificaciones de estructuras covalentes), como por ejemplo la difusión de sustancias a través de membranas, o la propagación de la despolarización a lo largo de la membrana celular, pero esta hipótesis dice que cualquiera de estos procesos no es independiente de algún proceso metabólico. La química no explica toda la vida, pero no hay función biológica independiente de la química.

No es necesario expresar una hipótesis equivalente que haga alusión a un soporte físico, pues todo lo que existe tiene un obvio soporte físico. De acuerdo con esta proposición el estudio del metabolismo es un método muy directo para estudiar las propiedades de los seres vivos.

8. Estudios en los sistemas reducidos.— Siempre es posible encontrar un sistema más simple que el organismo entero *in vivo* donde pueda demostrarse una determinada propiedad macroscópica (fisiológica). Esta hipótesis es la base de la experimentación bioquímica, y abre la puerta hacia el trabajo del laboratorio *in vitro*.

Es obvio que los sistemas biológicos se dañan severamente cuando se rompen las células o los tejidos para llegar a obtener modelos experimentales de extractos *in vitro*, y que ese daño puede hacer que se pierdan ciertas propiedades del sistema completo original. Y también se distorsiona el sistema original cuando se separan las células de un tejido y se hacen crecer aisladas en un medio *in vitro*. Esta proposición no afirma que cualquier propiedad general pueda demostrarse en cualquier fragmento del sistema original, sino que siempre es posible encontrar un cierto fragmento del original —un sistema más simple, experimentalmente accesible, con menos variables externas— donde esa propiedad pueda estudiarse con un grado satisfactorio de aproximación.

El nacimiento de la Bioquímica 'dinámica' (el estudio del metabolismo) está marcado por el famoso experimento de Eduard Buchner en la Universidad Humboldt de Berlín, en 1897, cuando demostró que un extracto de levaduras, libre de células, era capaz de realizar la fermentación completa transformando glucosa en etanol. Aquel experimento marcó un hito en la

historia de la Biología, y abrió la puerta al campo de la experimentación con extractos *in vitro*. El experimento de Buchner acabó definitivamente con la doctrina del vitalismo, que ya estaba muy mal parada desde la síntesis química de la urea por Wöhler, casi setenta años antes, pero amenazaba con despertar la doctrina del reduccionismo, pues como ha comentado muy acertadamente Asimov, el experimento de Buchner causó tal impacto, que demostrar que un homogeneizado de levaduras fuese capaz de producir la transformación completa de glucosa en etanol, era como si se hubiese demostrado que un homogeneizado de neuronas fuese capaz de pensar. El comentario caricaturesco de Asimov es un recurso retórico para ridiculizar la corriente reduccionista que amenazaba con resurgir.

Esta hipótesis no es reduccionista, y no debe, por tanto, interpretarse como la aceptación del reduccionismo. El reduccionismo es una doctrina totalmente descartada en el paradigma fundamental de la biología, según la cual el funcionamiento de un sistema complejo se puede explicar como la suma del funcionamiento independiente de sus partes. El reduccionismo es una doctrina errónea porque no tiene en cuenta la principal característica de los sistemas biológicos, como sistemas complejos que son: las interacciones entre sus partes. Esta hipótesis no es reduccionista, pues no afirma que un sistema reducido pueda exhibir la función que le corresponde en el sistema completo con idéntica extensión, sino que tal función macroscópica *puede demostrarse* en el sistema reducido, con un cierto grado de aproximación; es decir, que la función que exhibe el sistema completo puede reconocerse y demostrarse, y en consecuencia estudiar muchos de sus aspectos, en un sistema reducido. La hipótesis no afirma que en un determinado sistema reducido pueda estudiarse todo lo que le concierne en el sistema completo, sino que para estudiar cualquier función del sistema completo siempre puede encontrarse un sistema reducido donde sea posible ese estudio.

El trabajo con sistemas reducidos es inherente a toda investigación científica, pues es la única forma de controlar las variables externas (independientes) y saber cuáles operan en cada mecanismo. El trabajo con el sistema completo es muy limitado, por muy sofisticadas que sean las técnicas no invasivas de análisis, y por eso es imprescindible el trabajo con sistemas reducidos, pues la principal razón formal para reducir el sistema no es sólo poder analizar su resultado, sino ante todo poder controlar las variables; y una de las grandes cualidades que tiene la bioquímica es la gran facilidad que tiene para trabajar con sistemas reducidos. La mayor parte de la doctrina actual de la bioquímica, si no toda, se ha logrado trabajando con sistemas reducidos.

En esta Tesis nos hemos propuesto estudiar la influencia de diversos factores nutritivos en la formación del colágeno en varios tejidos. Para ello, hemos utilizado sistemas reducidos en los que podemos reproducir *in vitro* la biosíntesis y secreción de colágeno: los cultivos de células animales –fibroblastos de ratón y condrocitos articulares bovinos.

9. Concordancia bioquímica y biofísica.— Tiene que existir concordancia entre todas las partes bioquímicas y biofísicas de los sistemas biológicos. No pueden obtenerse resultados

contradictorios estudiando partes diferentes del sistema entero por separado. Esto nos permite estudiar una pequeña parte del metabolismo para demostrar un determinado efecto, y también dice que si se estudia una propiedad determinada mediante dos experimentos diferentes, los resultados que se obtengan no pueden ser contradictorios.

Existirán, obviamente, partes más representativas que otras de un proceso dado, en las cuales puedan descubrirse más fácilmente las propiedades que se estudian, pero no pueden existir sistemas inconsistentes; es decir, el análisis de una parte reducida del sistema completo no puede producir resultados que contradigan los que se hayan obtenido en otro sistema experimental, más simple o más complejo.

Este axioma debe servir también como control experimental. Si estudiando dos sistemas reducidos se llegase a resultados contradictorios, ello significaría que los modelos experimentales no son correctos. Por el contrario, si los resultados son consistentes, se refuerza el valor de los modelos. Por ello es muy conveniente, cuando se trabaja con sistemas reducidos, buscar diferentes sistemas experimentales para comprobar la validez de los resultados. Así, el cumplimiento de esta hipótesis refuerza la anterior.

Capítulo 5

Objetivos y Modelos experimentales

Objetivos teóricos

La principal hipótesis de este trabajo es que la artrosis puede ser una enfermedad carencial, sea en sentido absoluto, como lo es el escorbuto con la vitamina C, o bien que la carencia de algún nutriente específico pueda ser una importante causa desencadenante de la enfermedad.

La segunda hipótesis es que el material cuya fabricación debe padecer más esta carencia es el colágeno (no los proteoglicanos, como piensan otros investigadores). De acuerdo con esta proposición, la causa original de la artrosis (que afecta a los condrocitos) podría ser la misma que la de otros problemas degenerativos o similares que estarían afectando a otros tejidos, como la incapacidad de reparar ciertas lesiones físicas o la osteoporosis. En principio, pensamos que la causa podría ser la carencia de algún aminoácido, por lo que nos proponemos como principal punto de partida, revisar el concepto de aminoácidos esenciales.

1. Revisión del concepto de aminoácidos esenciales

El primer objetivo teórico es una revisión del concepto de aminoácidos esenciales. En la literatura hay abundantes datos empíricos que demandan que la lista de los ocho esenciales clásicos (valina, leucina, isoleucina, treonina, lisina, metionina, fenilalanina y triptófano) debe ampliarse. En general se sugiere que deben añadirse la arginina, la histidina, la tirosina y la cisteína, y hay algunos datos que sugieren que la glicina también podría ser considerada un aminoácido esencial. Sin embargo, esas sugerencias se han hecho basándose exclusivamente en observaciones empíricas. El estatus de los ocho esenciales clásicos citados arriba tiene una

base teórica: se conoce el mecanismo que los hace esenciales, que es, simplemente, que sus rutas de biosíntesis no son operativas en animales. No ocurre así con los otros cinco citados. Entonces, este tema se encuentra en una situación sin salida, pues la investigación empírica ya no puede avanzar más, sino seguir repitiendo los mismos datos. Falta una explicación teórica, y nosotros nos hemos propuesto que ese análisis sea uno de los objetivos de esta Tesis.

Nuestras conclusiones en este punto son, pues, exclusivamente teóricas; es decir, proceden de estudios cualitativos y cuantitativos sobre la estructura del metabolismo. La conclusión es que la lista de aminoácidos esenciales debe ampliarse añadiendo varios más, por diferentes motivos, y presentamos, como base principal de esta conclusión, lo que hemos llamado la '*teoría de los puntos débiles del metabolismo*'.

2. Estudio del caso particular de la glicina

La glicina constituye un caso muy especial, dentro de los 'nuevos aminoácidos esenciales' que definimos aquí. Las primeras consideraciones teóricas lo sitúan como aminoácido *esencial condicionado*. Esto significa que su disponibilidad está condicionada a otros procesos metabólicos. Es preciso, pues, un estudio teórico cuantitativo sobre la importancia de esos otros procesos, a fin de calcular su disponibilidad real. La conclusión de este estudio demuestra que la necesidad de glicina se hace más acuciante a medida que aumenta la cantidad de colágeno en la estructura del cuerpo, en relación con otros procesos, como la biosíntesis de ácido úrico o la síntesis de porfirinas; pero esas relaciones pueden ser directas o inversas, según explicamos en el capítulo 7. La conclusión general es que la necesidad nutritiva de glicina es mucho mayor en los vertebrados, y especialmente en los vertebrados de gran tamaño que en los animales pequeños, y prácticamente inexistente en los insectos.

Objetivos experimentales

En este trabajo nos hemos propuesto llevar a la práctica los principales resultados de la teoría; es decir, si el estudio teórico demuestra que un determinado aminoácido debe ser considerado esencial, y es un aminoácido importante para la síntesis de colágeno, procederemos a estudiar su influencia sobre las células fabricadoras de colágeno en un rango determinado de concentraciones, siempre comparándolo con otros no esenciales 'absolutos' (véase capítulo 7) que podremos usar como control.

No obstante, nuestra intención también es obtener datos teóricos y empíricos por separado. No sólo hacer los experimentos que pida la teoría, sino también probar el efecto de nutrientes no previstos por la teoría, sea para que sirvan de control a aquéllos, o para descubrir efectos nuevos, no previstos por la teoría, pues de la misma forma que los datos experimenta-

les deben poner a prueba las predicciones teóricas, también pueden ser una fuente independiente de información para descubrir nuevos aspectos que no estaban previstos en la teoría, y así contribuir a su desarrollo y generalización.

El principal objetivo experimental de esta Tesis –como principal conclusión del estudio teórico– ha sido analizar el efecto de la glicina sobre la biosíntesis de colágeno. Nosotros consideramos que los tres aminoácidos más característicos de la estructura del colágeno son la glicina, la prolina y la lisina. Los dos primeros son los más abundantes, mientras que la lisina, aunque no más abundante que muchos otros, es también muy característico ya que, como la prolina, se modifica covalentemente en el seno de la proteína, y su incorrecta hidroxilación, por motivos de escasez durante la síntesis, puede provocar alteraciones en la estructura del colágeno. Hay acuerdo general entre los distintos autores sobre la importancia de estos tres aminoácidos. La característica diferencial de nuestro planteamiento es que nosotros consideramos (basándonos en las conclusiones teóricas) que la glicina es un nutriente *esencial*, cuya necesidad se manifiesta específicamente en la síntesis de colágeno, muy por encima de otros requerimientos metabólicos, por motivos de cantidad.

Por este motivo, el objetivo central de esta Tesis es estudiar la influencia de estos nutrientes –y en especial, la glicina– sobre la síntesis de colágeno.

1. Modelos experimentales

Los primeros objetivos experimentales de esta Tesis son de tipo metodológico: la puesta a punto del cultivo de células animales *in vitro*, y las técnicas adicionales para el desarrollo de estos modelos. Esto ha supuesto la apertura de una línea experimental totalmente nueva en nuestro grupo de investigación. Hemos tenido que instalar un laboratorio completo de cultivos de células, con todo el equipamiento necesario, y poner a punto todas las técnicas de cultivos, controles del crecimiento y controles de la síntesis de colágeno. Pretendemos con esto abrir nuevas líneas en la investigación del metabolismo, para el trabajo futuro de nuestro grupo.

El principal objetivo del estudio experimental de esta Tesis era comprobar la principal conclusión del estudio teórico, que es que a efectos prácticos, la glicina debe ser considerada un aminoácido esencial, y puesto que se consume masivamente en la biosíntesis de colágeno, su carencia podría limitar mucho el funcionamiento normal de este proceso, provocando el deterioro de la matriz extracelular. Por tanto, el principal objetivo experimental era comprobar esta conclusión teórica en el laboratorio, comparándola con otras posibilidades (otros aminoácidos) cuyo efecto sería interesante para compararlo con el de la glicina, como controles.

La primera condición que había que cumplir para investigar en esta línea, y por ello, el primer objetivo experimental que había que cubrir era definir un sistema experimental en el

que se pudieran controlar rigurosamente las condiciones ambientales —y en particular los nutrientes que se habrían de aportar al sistema—, y en el que se pudiera cuantificar la síntesis de colágeno bajo diversas condiciones, siempre asegurando que tal sistema fuese representativo de lo que ocurre en el ser humano.

Nos hemos decidido por los cultivos de células animales como modelo experimental. Los sistemas desarrollados de esta forma presentan muchas ventajas obvias para el propósito de esta investigación. La primera ventaja es que son homogéneos (muy limpios), pues están formados por células iguales, de manera que no hay problema en atribuir a cada tipo de célula una actividad metabólica determinada, como puede ocurrir con determinados homogeneizados de órganos o tejidos. Además, al ser sistemas *in vitro*, son fáciles de manipular, se pueden desarrollar bajo diferentes condiciones, añadiendo diversos nutrientes al medio, con la certeza de poder observar su efecto directo sobre la actividad metabólica de las células. Y no sólo se puede estudiar la influencia de los nutrientes sobre la actividad metabólica, sino también su influencia sobre el crecimiento. En fin, presentan muchas ventajas para el propósito de este trabajo. Los inconvenientes es que son sistemas mucho más frágiles y vulnerables, y se necesita extremar todas las precauciones de esterilidad y limpieza para evitar contaminaciones. Requieren, pues, un montaje experimental especial, con un laboratorio específico sólo para desarrollar estos experimentos, que reúna condiciones extremas de limpieza y esterilidad, y el experimentador ha de tener mucha experiencia para trabajar, conociendo bien todas las características peculiares de estos sistemas. Para nosotros, la principal dificultad era que había que empezar desde el principio, montando un laboratorio completo de cultivos de células, poner a punto las técnicas específicas de cultivo de los tipos de células objeto de nuestro interés, y las técnicas de valoración del colágeno. Esto ha supuesto una gran inversión económica, de tiempo y de esfuerzo personal, ya que fue preciso adquirir todo el material necesario para instalar un laboratorio de cultivos celulares: cabina de flujo laminar, incubador de CO₂, microscopio invertido, autoclave, instrumentos sofisticados específicos como el contador de células y analizador de viabilidad, el lector de microplacas, la microcentrífuga, y otro material más sencillo, como aspiradores, agitadores, baños, bomba de vacío; finalmente, el gasto importante de consumibles, como frascos de cultivos, botellas de vidrio autoclavables, pipetas estériles desechables, etc. Hemos tardado varios años en conseguir que todo esto estuviese puesto a punto, funcionando y produciendo resultados, y en esta Tesis presentamos los primeros obtenidos en esta línea.

2. Cultivos de fibroblastos *in vitro*

El sistema experimental básico que hemos desarrollado para estudiar la síntesis de colágeno es el cultivo de fibroblastos, incluyendo las técnicas de valoración del crecimiento celular, y las técnicas de valoración del colágeno producido por estas células. La combinación de estas

técnicas nos permite disponer de un modelo experimental muy completo, que puede ser, en principio, representativo de otros tejidos. En efecto, debe entenderse que este sistema no es sólo un modelo experimental para comprobar la actividad del tejido conjuntivo, sino que, como pretendemos estudiar la influencia de nutrientes sobre la capacidad de las células para fabricar colágeno, podríamos sacar conclusiones generales sobre otros tejidos.

Siendo el cultivo de fibroblastos un sistema vivo productor de colágeno, podríamos, en principio, usarlo como modelo que simula la actividad de cualquier otro tipo de células productoras de colágeno, aunque, por supuesto, siempre es nuestra intención añadir más modelos experimentales a nuestra investigación, a fin de comprobar la extensión de estos resultados. Por ello, otro objetivo de esta Tesis ha sido extender el estudio inicial de fibroblastos al cultivo de condrocitos, y trataremos en el futuro, de hacerlo también con osteoblastos.

El sistema básico experimental es el cultivo primario de fibroblastos obtenidos de fetos de ratón CD-1. Nuestras células proceden de ratones normales y sanos (que no arrastran ningún gen mutado ni tienen malformaciones ni enfermedades). Las células se cultivan en un medio estándar (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) que reproduce las condiciones nutritivas del líquido intersticial normal, y que permite la adición de productos complementarios cuya influencia en el crecimiento celular y en la producción de colágeno pretendemos estudiar.

Hemos de decir que el poner a punto estas técnicas nos ha permitido un avance importante en nuestros estudios sobre el metabolismo *in vitro*, pasando de los extractos de homogeneizados celulares, a los cultivos de células intactas. Por esta razón, resulta obvio que los objetivos iniciales de este trabajo hayan sido de tipo metodológico, pues hemos tenido que montar un laboratorio de cultivos celulares y desarrollar las técnicas necesarias para el cultivo de células animales, la valoración de su crecimiento, y la cuantificación de la producción de colágeno.

3. Cultivos de condrocitos *in vitro*

El cultivo de condrocitos articulares era otro objetivo importante de este trabajo, ya que este sistema debe ser un modelo más directo del metabolismo del cartílago (objetivo final de esta Tesis). De hecho, muchos autores consideran que el cultivo de condrocitos es un excelente modelo experimental para estudiar la fisiología de este tejido, pues los condrocitos en cultivo son capaces de sintetizar los componentes de la matriz extracelular del cartílago y reproducen con mucha exactitud las características del tejido de origen. El cultivo de condrocitos exige técnicas diferentes a las del cultivo de fibroblastos, que complican mucho el abordaje experimental. Para empezar, su aislamiento es más difícil; el rendimiento a partir del tejido original es menor —se obtienen menos células—; no hacemos subcultivos, para evitar que los condrocitos se desdiferencien; su crecimiento es más lento; y los condrocitos fabrican un coláge-

no (tipo II) distinto del de los fibroblastos (tipo I), por lo que hay que utilizar kits de anticuerpos diferentes para su valoración.

4. Cuantificación del colágeno producido por las células en cultivo

Una vez que estaba en marcha el laboratorio de cultivos celulares, con las técnicas de cultivos de células *in vitro* puestas a punto, el siguiente objetivo era cuantificar la producción de colágeno. Debíamos elegir y poner a punto varias técnicas (siempre mejor que una sola) para cuantificar el colágeno, a fin de poder estudiar la influencia de los factores nutritivos sobre esta actividad. Teniendo en cuenta los distintos tipos de colágeno producidos por los fibroblastos y los condrocitos, la capacidad que tiene cada célula de segregarlo al exterior, y la naturaleza soluble o insoluble de los mismos, hemos elegido y llevado a cabo varias técnicas diferentes para valorar el colágeno. Los fibroblastos fabrican principalmente colágeno tipo I, que secretan al medio donde queda solubilizado; los condrocitos fabrican principalmente colágeno tipo II que secretan al medio y queda formando parte de la matriz extracelular en la monocapa de células —además, sintetizan algo de colágeno soluble que secretan al medio de cultivo.

Para cuantificar la biosíntesis y secreción del colágeno producido por los fibroblastos y los condrocitos en cultivo se han utilizado diversos métodos descritos con detalle en el capítulo 8. Hemos utilizado, en primer lugar, un ensayo colorimétrico para cuantificar el colágeno en disolución, basado en la unión del colorante rojo Sirio al colágeno liberado por los fibroblastos y los condrocitos al medio de cultivo. Además, el colágeno tipo II producido por los condrocitos y que queda retenido en la monocapa de células ha sido valorado mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA).

5. Efecto de la glicina y de otros nutrientes sobre el crecimiento celular y sobre la síntesis de colágeno

Una vez que habíamos conseguido cultivar células productoras de colágeno —fibroblastos y condrocitos— y cuantificar el colágeno producido por dichos cultivos, el siguiente objetivo era investigar si las células cultivadas en el medio estándar podrían trabajar mejor si se les suministra más cantidad de los nutrientes apropiados —aminoácidos esenciales, y en especial, glicina—, estudiando también la influencia de otros nutrientes como control. En principio, hay dos tipos de respuestas que nos interesa estudiar: el crecimiento celular y la fabricación de colágeno, y nuestro propósito es determinar la influencia de cada nutriente sobre cada una de ellas, en los dos tipos de células.

En principio, se trata de comprobar si la glicina es capaz de estimular la síntesis de colágeno sin alterar la morfología, el fenotipo, ni la velocidad de crecimiento de los fibroblastos o los condrocitos articulares (valorada con respecto al control sin adición de glicina).

Para desarrollar este objetivo hemos tratado los cultivos de fibroblastos y condrocitos articulares con distintas concentraciones de glicina y seguidamente determinamos la biosíntesis y secreción de colágeno por las células en cultivo.

Además de la glicina, hemos probado el efecto de otros aminoácidos (prolina, lisina, isoleucina y ácido aspártico) sobre la síntesis y secreción de colágeno por las células cultivadas, en intervalos determinados de tiempo, y con distintas concentraciones. Es importante resaltar que, aparte de la glicina y la prolina, utilizamos tanto aminoácidos claramente esenciales, como la lisina y la isoleucina, como otros que no lo son, en absoluto, como el ácido aspártico. Nos interesaba comprobar si lo que podía influir en el cultivo era el hecho de añadir una fuente adicional de esqueletos carbonados, o si realmente lo que importaba era la cadena específica de cada aminoácido. Para ello hemos modificado la concentración de los nutrientes, objeto de interés, en el medio de cultivo, comprobando si así se producen variaciones en el crecimiento y en la producción de colágeno.

Como hemos señalado arriba, nuestros experimentos han sido dirigidos por las conclusiones teóricas, pues entre los miles de nutrientes y metabolitos que participan en el metabolismo humano siempre que hemos probado alguno es porque había una razón teórica consistente detrás. Esto es una constante en nuestra línea de investigación, que al reducir el campo de experimentación nos permite reducir costes y tiempo. Como también hemos señalado arriba, hemos hecho experimentos con nutrientes que la teoría no define como esenciales, y que podemos usar como control, o incluso para probar la teoría con experimentos independientes.

Capítulo 6

Hipótesis específicas de este trabajo

Aparte de las hipótesis generales para la investigación bioquímica expuestas en el capítulo 4, este trabajo se sustenta sobre un conjunto de hipótesis específicas que debemos precisar.

Concepto de enfermedades degenerativas

Antes de exponer las hipótesis relativas a la práctica clínica de nuestros resultados, debemos precisar el concepto de enfermedades degenerativas. Entendemos por enfermedades degenerativas aquéllas que reúnen las dos condiciones siguientes:

(a) Se producen espontáneamente, sin la intervención de un agente causal obvio, sea externo (infeccioso, tóxico o traumático)—, o interno (genético, como el daltonismo, la hemofilia, glucogenosis o la galactosemia).

(b) Se produce el deterioro de alguna estructura o función orgánica que va empeorando progresivamente.

Ejemplos de enfermedades degenerativas típicas son: la artrosis, la diabetes de tipo 2, la obesidad, la hipertensión —en general las distintas patologías que se suelen agrupar bajo la denominación de *síndrome metabólico*. Un grupo importante dentro de esta clase son las enfermedades neurodegenerativas, entre las que están la enfermedad de Alzheimer y la esclerosis múltiple. Se excluyen de esta definición las enfermedades autoinmunes y el cáncer.

Las enfermedades autoinmunes se caracterizan porque en ellas ocurre una reacción aparentemente incontrolada del sistema inmune, que ataca a un órgano o a un tejido —en gene-

ral, a una estructura orgánica—, provocando la carencia o la debilidad de la función correspondiente. Una de las enfermedades autoinmunes más típicas es la diabetes de tipo I; esta enfermedad se produce porque el sistema inmune ataca a las células β del páncreas ocasionando una mutilación que priva al individuo de la glándula secretora de insulina. La esclerosis múltiple se considera una enfermedad autoinmune debido a que se trata de un proceso en el cual hay una destrucción progresiva de la mielina del cerebro y de la médula espinal, causada por un ataque del sistema inmune. De todas formas, en muchos casos se desconoce el motivo por el cual el sistema inmune deja de reconocer una estructura propia y la ataca. No hay que descartar que al conocer mejor los mecanismos de su etiología, se descubra que el fenómeno de la autoinmunidad no sea la causa sino una consecuencia de un proceso degenerativo provocado por otras causas que hoy nos son desconocidas.

Excluimos también el cáncer de este grupo porque el cáncer es una enfermedad diferente, que no puede clasificarse con ninguna otra. Una característica inherente a las enfermedades degenerativas es que las células afectadas se van deteriorando, siendo cada vez más débiles, con una merma progresiva de su función, pero el cáncer no es así. Una célula cancerosa no es ya una célula especializada de un tejido, sino una célula indiferenciada, transformada, que ha perdido muchas de las características originales, y que en la mayoría de los casos no se puede reconocer la estirpe celular de la que procede; además, las células cancerosas no son débiles, ni su actividad se va deteriorando progresivamente, sino que son células extremadamente resistentes, muy invasivas y agresivas que van desplazando a las de otros tejidos y agrediendo gravemente las estructuras que encuentran a su paso. El cáncer es ciertamente una enfermedad completamente diferente de todas las demás, que necesita un grupo especial de clasificación.

De todas formas, hay que tener en cuenta que la Biología es la ciencia de lo complejo. Por eso, las clasificaciones deben considerarse más bien como abstracciones —puntos extremos de referencia—, y hay que contar con que puede existir una amplia gama de casos intermedios. Así, ocurre con frecuencia que alguna de las enfermedades no degenerativas es, a su vez, la causa desencadenante de un proceso degenerativo. Por ejemplo, una infección bacteriana puede causar el deterioro de cartílagos o tendones, originando un proceso reumático que luego puede seguirse agravando aunque se elimine la infección. También, una lesión física, o el abuso de un determinado ejercicio —práctica normal en los deportes de alta competición— puede ser causa de que aparezcan con el tiempo procesos artrósicos en rodillas (fútbol), tobillos (baloncesto), brazos y hombros (tenis, baseball), etc. Consideraremos esos casos también dentro de nuestra definición, como enfermedades degenerativas. Por otra parte, también es posible que algunas de las hipótesis que definimos aquí como específicas para las enfermedades degenerativas puedan ser de aplicación para otras fuera de este grupo. Eso, obviamente, no invalida las hipótesis; al contrario, les da mayor rango de validez.

Una vez descartadas las causas citadas arriba podríamos preguntarnos ¿cuál es la causa de las enfermedades degenerativas? Puede haber causas internas 'remotas' (como predisposiciones genéticas) o externas como la alimentación, y otros hábitos de vida, que no provoquen la aparición inmediata de la enfermedad (en cuyo caso la relación directa sería obvia), pero que hagan más vulnerable al organismo aumentando la probabilidad de que se desencadene un proceso degenerativo.

Hipótesis sobre las enfermedades degenerativas

Hemos de insistir en que las hipótesis no son proposiciones que describan propiedades generales de los sistemas, sino proposiciones restrictivas que delimitan el sistema, y que siempre uno de los objetivos de la Ciencia es revisar sus propias hipótesis. Nuestro enfoque en este trabajo se basa en una serie de hipótesis que relacionan las enfermedades degenerativas con el metabolismo. Vamos a enfocar el estudio de las enfermedades degenerativas, y su posible tratamiento a través de sus posibles causas metabólicas. Nuestro enfoque es, pues, diferente de otros como el tratamiento mediante trasplantes de células madre, y cualquier otro tipo de cirugía, y del uso de fármacos antiinflamatorios, terapia génica, etc.

HI. En las enfermedades degenerativas hay un desajuste metabólico, cuyas consecuencias macroscópicas son las manifestaciones visibles de la enfermedad.— Esta hipótesis afirma que en todas las enfermedades degenerativas hay algún problema metabólico que consiste en un desajuste, una falta de acuerdo entre dos o más reacciones del metabolismo, que provoca que falte o que se acumule algún metabolito intermedio. Esta hipótesis puede parecer muy fuerte, pero realmente no lo es tanto, pues no es sino la aplicación de la hipótesis general número 7 (pág. 114) que dice que 'toda actividad macroscópica de los seres vivos está soportada químicamente por un sistema metabólico específico'; por tanto, no es aventurado afirmar que un trastorno observable macroscópicamente que no obedezca a una causa directa, sino que se vaya manifestando progresivamente sea la consecuencia de un trastorno metabólico.

El desajuste metabólico consiste en la falta de coordinación entre al menos dos reacciones enzimáticas, lo que produce la acumulación o la escasez de algún producto intermedio, y esto lógicamente provoca, o bien problemas de escasez de suministro dejando en condiciones precarias a una ruta, o bien la excesiva acumulación de un producto, que puede ser causa de intoxicaciones, produciendo, en cualquier caso, trastornos estructurales y funcionales en el organismo.

Las enfermedades genéticas clasificadas en el grupo de 'errores congénitos del metabolismo' tienen una clara causa genética, pero son, sin embargo, un buen ejemplo para comprender este concepto. Estas enfermedades, se deben siempre a la pérdida de una enzima por causa de una mutación que inhabilita el gen correspondiente, o que causa una alteración

estructural tal que afecta gravemente la función de la enzima [203,204]. Así, al perderse la enzima o disminuir su afinidad por el sustrato, o su capacidad catalítica o su capacidad de regulación, o cualquier otro aspecto de su función, se pierde, o se deteriora gravemente, la función metabólica correspondiente, y esto produce una situación grave que tiene muy mala solución. Tales enfermedades tienen cierto parecido con las degenerativas que estudiamos aquí. La diferencia es que en éstas la pérdida de la función metabólica no es tan brusca como en aquéllas, sino que se va perdiendo progresivamente y las manifestaciones macroscópicas se van agravando con el tiempo. Las enfermedades genéticas del metabolismo pueden considerarse, pues, casos extremos de enfermedades degenerativas.

La diabetes de tipo 2 es una enfermedad degenerativa típica. Esta enfermedad se caracteriza porque las células cuyo transporte de glucosa es sensible a la insulina (músculo, corazón y adiposo) van perdiendo esa sensibilidad y no responden a ese estímulo, y esto provoca profundas alteraciones metabólicas que se manifiestan en una serie de síntomas macroscópicos (síntomas observables) que definen la enfermedad.

De todas formas, no debe olvidarse que, como ya hemos dicho en el capítulo 4, las hipótesis para una ciencia como la Biología, y en particular, las hipótesis del trabajo experimental, no son proposiciones establecidas o demostradas formalmente (en cuyo caso serían teoremas), ni axiomas que deban aceptarse obligatoriamente, sino más bien puntos de partida que acotan el campo de una investigación. Establecer una hipótesis de partida significa fijar el campo en el que se va a desarrollar la investigación. Las hipótesis deben ser razonables, es decir, debe haber suficientes indicios empíricos o teóricos previos que justifiquen su establecimiento, porque así queda determinado el campo específico de la investigación. Es decir, la formalización de las hipótesis de partida obliga a un análisis previo de los precedentes para fijar los puntos de partida y el rumbo de la investigación. Y, siempre, uno de los objetivos de toda investigación científica debe ser verificar las hipótesis con los propios resultados.

En principio podemos suponer dos tipos de causas que puedan haber provocado el desajuste metabólico específico de la enfermedad: causas funcionales y causas estructurales. Las primeras consisten en la actividad anómala de alguna enzima, o en un problema de regulación metabólica, y las segundas pueden estar provocadas por un problema de diseño estructural del metabolismo que sufre una demanda superior a lo que es capaz de responder.

¿Cuál puede ser la causa originaria de esos problemas? Una vez descartadas las causas internas o externas que puedan tener una relación obvia con el problema, quedan aquéllas cuyo origen puede ser igualmente interno o externo (es decir, genético o ambiental), pero cuyo efecto no sea inmediato, sino que venga desencadenado por una sucesión de hechos —normalmente ambientales— cuyos efectos puedan ser acumulativos. Una causa general podría ser el abuso persistente de una práctica que pone a prueba el metabolismo, y que ejercitada persistentemente puede provocar finalmente el agotamiento de una función. Por

ejemplo, la exposición continuada a una sustancia tóxica (por ejemplo, a la sílice, al hollín, a gases o al tabaco), o la exposición continua a bajas temperaturas, o a altas o bajas presiones, la práctica persistente de un ejercicio físico excesivo, y, desde luego, principalmente, como posible causa más probable y frecuente, una dieta inadecuada. Es evidente que de todas las causas mencionadas, la dieta inadecuada es la más probable ya que es la que tiene una relación más directa con el metabolismo, y además la que puede darse con mayor probabilidad. El metabolismo tiene gran capacidad de adaptación, pero una dieta inadecuada mantenida durante mucho tiempo, podría indudablemente producir graves daños.

Conviene recordar que esta proposición, que relaciona las enfermedades degenerativas con problemas metabólicos, se cumple para todos los casos en los que se dispone de datos bioquímicos. En todas las enfermedades degenerativas hay descritas multitud de anomalías metabólicas, por ejemplo, exceso de colesterol, triglicéridos, resistencia a la insulina, descalcificación de los huesos, etc.

Estas alteraciones metabólicas suelen ir asociadas a la modificación en la actividad de una o varias enzimas, transportadores de membrana, concentraciones de metabolitos, neurotransmisores, etc., que evidentemente se produce por un desajuste en el sistema de regulación, ya sea por causas genéticas, dietéticas o ambientales. El objetivo del tratamiento de estas enfermedades debería ser corregir esa alteración restaurando el normal funcionamiento del metabolismo.

Hipótesis teóricas

Variables de la actividad celular

Desde un punto de vista matemático, una célula puede considerarse un conjunto de elementos que interaccionan entre sí de diversas formas. Hay cinco tipos de elementos: (a) estructurales, como la bicapa lipídica de las membranas y los microtúbulos; (b) informativos (ácidos nucleicos); (c) catalizadores (enzimas, coenzimas y transportadores de membrana); (d) metabolitos; y (e) reguladores (cAMP, hormonas, receptores, etc.). Las concentraciones de estos elementos, las actividades catalíticas de las enzimas y los flujos de transformación son algunas de las variables del sistema; y la mayor parte de ellas, incluyendo todas las actividades enzimáticas y la mayoría de las concentraciones de metabolitos, son *variables internas* (gobernadas por la actividad global del sistema). Los metabolitos que se intercambian con el exterior son productos externos, y las concentraciones de muchos de éstos son *variables externas*. Desde un punto de vista estrictamente matemático, el genoma (con toda la información que contiene) es también un conjunto de variables externas.

En un organismo multicelular, la definición de la clase de variable también depende del nivel de complejidad que se considere; los tres niveles básicos son: ecosistema, organismo y

célula, y para ciertas funciones pueden considerarse otros, tales como órgano y orgánulo. En general, en un organismo multicelular hay dos tipos de productos externos: los nutrientes (de entrada) y los productos de excreción (de salida). En determinadas circunstancias, cuando se acumula un metabolito interno por encima de ciertos límites, puede salir de las células, o eventualmente del organismo, y aparecer como producto de excreción, normalmente en la orina, o en el sudor, como ocurre, por ejemplo, con la glucosa en la diabetes, o con el ácido láctico tras un ejercicio físico intenso.

Vitaminas y nutrientes esenciales

Los nutrientes se pueden clasificar en dos grupos, desde el punto de vista de las posibilidades y necesidades del metabolismo: los que el organismo puede sintetizar (y por ello, en principio, su administración externa no es imprescindible), y los que no puede sintetizar (y su administración es obligatoria).

Por otro lado, hay que distinguir dos tipos de productos esenciales: los que tienen actividad catalítica, y los que desempeñan una función estructural. Los primeros son las vitaminas precursoras de coenzimas y de hormonas, y los segundos los ácidos grasos esenciales y los aminoácidos esenciales; las necesidades dietéticas de éstos son obviamente mayores que las de los primeros.

En determinadas circunstancias, un producto no esencial puede hacerse necesario, porque la maquinaria metabólica no sea capaz de cubrir las necesidades del momento, de manera que el concepto de nutriente esencial debe ser abierto, y siempre atendiendo a las necesidades específicas que pueda haber en cada caso (por ejemplo, en el estado del desarrollo), de acuerdo con la actividad fisiológica que se esté haciendo. Los *nutrientes esenciales 'estrictos'* son muy pocos, entre los más de mil metabolitos; y, según la mayoría de los textos básicos de nutrición y de bioquímica son, en principio, los siguientes:

(a) Las ocho vitaminas del complejo B: tiamina (B₁), riboflavina (B₂), ácido nicotínico o niacina (B₃), ácido pantoténico (B₅), piridoxal o piridoxina (B₆), biotina (B₇, o B₈, también llamada *vitamina H*), ácido fólico (B₉ o B₁₁), y cobalamina (B₁₂); el ácido ascórbico (vitamina C), y las vitaminas liposolubles (A, D, E y K). No hay que descartar que en el futuro se amplíe esta lista.

(b) Los tres ácidos grasos esenciales: ácido linolénico u Omega-3, ácido linoleico u Omega-6 y ácido araquidónico, siendo también conocido el conjunto de los tres como *vitamina F*.

(c) Los aminoácidos esenciales: valina, leucina, isoleucina, treonina, metionina, lisina, fenilalanina y triptófano. Este último apartado merece una consideración especial, según explicamos más abajo.

Enfermedades carenciales

La carencia persistente de cualquiera de los nutrientes esenciales en la dieta, durante un tiempo que puede ser más o menos largo, según la función metabólica que desempeñe, origina serios problemas de salud que por lo general están bien caracterizados como enfermedades específicas. Así, la carencia de vitamina C produce el escorbuto, la de tiamina el beriberi, la de niacina la pelagra, la de cobalamina la anemia perniciosa, etc. Todas estas enfermedades se curan con la ingestión del nutriente correspondiente, y el organismo recupera la normalidad, a excepción de las lesiones irreversibles que tales carencias pudieran haber provocado. Algunos de estos casos son complejos. La causa más frecuente de la anemia perniciosa no es simplemente la falta de la vitamina B₁₂ en la dieta, sino la falta del *factor intrínseco*, que es una glicoproteína que se segrega en el estómago, la cual debe interactuar con la vitamina B₁₂ de la dieta para que ésta se pueda absorber.

También el uso de nutrientes *no esenciales* ha demostrado en muchas ocasiones ser capaz de solucionar problemas diversos de salud. La glucosa (nutriente no esencial, que el organismo puede fabricar sin problemas) se usa para combatir estados de inanición y de hipoglucemia.

Hay que citar, por último, que a algunos de estos compuestos, calificados inicialmente como vitaminas, se les ha encontrado una ruta de biosíntesis, por lo que se ha sugerido que pierdan esta calificación, y han dejado de ser considerados como vitaminas. Así ha ocurrido con la vitamina D, y con el ácido nicotínico, que se puede sintetizar a partir del triptófano. Sin embargo, debemos hacer una crítica a esta clasificación, según explicamos más abajo.

Nuestro estudio teórico sobre la búsqueda de la causa de la artrosis está basado en dos hipótesis: la primera (H2) se refiere a nuestro conocimiento del metabolismo, y es una hipótesis general que podría ser de aplicación en todas las enfermedades degenerativas. La segunda (H3) establece una relación entre las enfermedades degenerativas y la nutrición; es una hipótesis más particular cuyo ámbito de aplicación podría ser más restringido, pero que pensamos que puede cumplirse en el caso que nos ocupa. La tercera (H4) es una observación empírica sobre las condiciones en que operan las enzimas. Las dos últimas sugieren inmediatamente una línea de acción terapéutica que queda expresada en la hipótesis H5.

H2. La estructura bioquímica y biofísica del metabolismo conocida hasta el momento es suficiente para comprender la causa de muchas enfermedades degenerativas.— Esta hipótesis establece que conocemos todas las interacciones del metabolismo necesarias para comprender la causa de muchas enfermedades degenerativas. Quizá no de todas, pero sí de las suficientes para poder progresar en esta línea. Esta hipótesis significa que esta investigación no va a consistir en la búsqueda de nuevas interacciones metabólicas sino en investigar rutas bien comprobadas que brindan grandes aplicaciones para el tratamiento nutricional de las enfermedades degenerativas. Como textos básicos donde estas reacciones están descritas con

detalle pueden tomarse el atlas de los mapas metabólicos del Prof. Gerhard Michal [205], o el texto de Metzler [206] y bases de datos de Internet [207-209].

H3. La causa de muchas enfermedades degenerativas es una dieta inadecuada.— El problema puede haber sido causado por la falta de un nutriente específico, en cuyo caso la enfermedad es similar a una enfermedad carencial, o por el exceso de un determinado nutriente, en cuyo caso se trata de una intoxicación. Esta hipótesis, en los casos en que puede demostrarse que se cumple, sugiere inmediatamente una línea de actuación terapéutica mediante las correcciones pertinentes de la dieta. De hecho, la evidencia de que la dieta es un factor ambiental clave en la incidencia de muchas enfermedades crónicas está creciendo [210].

H4. La mayoría de las enzimas trabajan en el metabolismo con un grado muy bajo de saturación.— Ésta es una hipótesis bien comprobada que ofrece grandes aplicaciones para el tratamiento nutricional de las enfermedades degenerativas.

Por ejemplo, datos de la glicolisis en levadura, obtenidos por el grupo de Hess, muestran que el porcentaje medio de saturación de las enzimas es del orden del 20% [211]. Esto significa que de cada diez moléculas de enzima sólo trabajan dos o tres. Estos datos han sido confirmados reiteradamente por otros investigadores en diversas rutas metabólicas [212].

Esta situación tiene una clara explicación fisiológica, significa que el metabolismo tiene un amplio margen de reserva para afrontar situaciones de emergencia. En el caso particular que nos ocupa, frente a un problema metabólico por incapacidad de una enzima, esta característica nos ofrece una línea de actuación terapéutica, incluso en casos en los que un problema degenerativo pueda tener una causa genética, pues ofrece, en principio, posibilidades para aumentar la actividad de una enzima que pudiese ser deficitaria aumentando su grado de saturación.

Hipótesis terapéutica

H5. Es posible resolver el problema metabólico específico de un cierto número de enfermedades degenerativas a través de la dieta, con la administración de nutrientes específicos.—

Los motivos de esta hipótesis se han explicado suficientemente en las dos anteriores. La conclusión hasta donde pueda generalizarse esta proposición es que muchas enfermedades catalogadas como *degenerativas* podrían tratarse como si fuesen enfermedades carenciales o como el resultado de una 'intoxicación alimentaria'. Por tanto, según sea el caso, se podrán plantear las actuaciones específicas pertinentes. Lo interesante de esta línea de actuación, y el aspecto en que queremos insistir, es que, en general, esta línea ofrece una alternativa diferente al uso de fármacos, que siempre son productos tóxicos que se introducen en el metabolismo.

Hipótesis experimentales

Debemos señalar que existe una diferencia importante entre las hipótesis generales de una disciplina, como las que hemos expuesto en el capítulo 4 para la Bioquímica, y las hipótesis experimentales específicas de este trabajo, que vamos a exponer aquí. Aquéllas son proposiciones generales aceptadas por consenso entre los especialistas, que establecen el rango de validez de la disciplina, y que por tanto definen las premisas del trabajo experimental en ese campo de la Ciencia.

Las hipótesis experimentales son proposiciones más particulares, más locales, o 'domésticas', que se refieren a un tipo determinado de modelos experimentales. Son límites a los que hay que ceñirse en una determinada línea de investigación. Es obligación del experimentador diseñar los experimentos de tal forma que estén siempre dentro de esas hipótesis, y su correcto cumplimiento es lo que le dará rigor a la experimentación.

Las hipótesis experimentales específicas de nuestro trabajo, que presentamos aquí son, pues, límites que deben marcar las pautas del trabajo de laboratorio que presentamos en esta Tesis. Su definición formal es un compromiso de mantener nuestro trabajo experimental dentro de esos límites. En este grupo consideramos dos hipótesis: la primera (H6) define el fundamento del modelo experimental, y la segunda (H7) el protocolo de investigación que vamos a aplicar en ese modelo.

H6. Las células de un tejido cultivadas *in vitro* reproducen las mismas funciones que cuando están en el tejido.— Esta es la hipótesis básica de nuestro trabajo, pues es la que define nuestros modelos experimentales.

Hemos desarrollado dos tipos de cultivos celulares: fibroblastos de ratón y condrocitos bovinos. Ambos sistemas están bien ensayados, y se conocen suficientes datos de ellos para garantizar la correcta aplicación de los modelos. Aparte de los cuidados y precauciones que deben tenerse en cuenta en los cultivos celulares (limpieza, esterilidad, control del crecimiento, renovación del medio de cultivo, etc.), estos modelos pueden presentar un problema general: cuando se mantiene el crecimiento de las células cultivadas, haciendo subcultivos mediante pases a un nuevo frasco, las células pueden transformarse, perdiendo sus características diferenciales propias del tejido original, y adoptando características típicas de las células transformadas, como la pérdida de su morfología o de su capacidad de inhibición por contacto, y así el modelo experimental pierde su significado. Este fenómeno suele ocurrir cuando el cultivo se mantiene mucho tiempo, después de hacer muchos pases, pero también puede depender de otras variables, como el número de células de partida, y otras condiciones ambientales.

Los fibroblastos son las células típicas del tejido conjuntivo, productoras de colágeno tipo I, que, en general, se cultivan muy bien, y soportan varios pases (hasta cinco o seis sin problemas), sin perder su morfología y manteniendo su función básica que es la síntesis y secre-

ción del colágeno tipo I [213]. Por su parte, los condrocitos son células mucho más sensibles a estos cambios, y se ha descrito que en pocos pases (tres o cuatro), o tras tres semanas de cultivo pueden perder su estado de diferenciación original, y este hecho se reconoce porque sufren cambios morfológicos, dejan de fabricar colágeno tipo II y comienzan a fabricar el tipo I (propio de los fibroblastos) [173]. Por otra parte, guardando las debidas precauciones, los cultivos de condrocitos son un buen modelo experimental para estudiar la biosíntesis de colágeno tipo II, propio del cartílago, pero deben hacerse pocos pases o ninguno, y siempre llevando un control de la calidad de las células [149,171,214-216]. Por eso es muy importante, para garantizar la fidelidad del modelo, delimitar los pases que se van a hacer con cada tipo de células, llevar un control morfológico con el microscopio, y un control bioquímico de su función valorando el tipo de colágeno que producen. De acuerdo con estos datos, en nuestros experimentos hemos tenido especial cuidado en controlar rigurosamente las condiciones de cultivo —siempre hemos trabajado con cultivos primarios, obteniendo muestras directamente del tejido original en cada experimento. Sólo hemos hecho un pase con los fibroblastos; no fueron necesarios más, pues con esto ya obteníamos el número de células necesarias. Con los condrocitos no hemos hecho ningún pase, limitando nuestro modelo a las células que podíamos obtener directamente del tejido en la primera fase del cultivo, a fin de no exponernos a distorsionar el modelo. En todos los casos hemos comprobado que cada uno de estos dos tipos de células mantenía su morfología típica diferenciada, y producía exclusivamente el tipo de colágeno que fabrica en el tejido original, según puede verse en los resultados (capítulo 9).

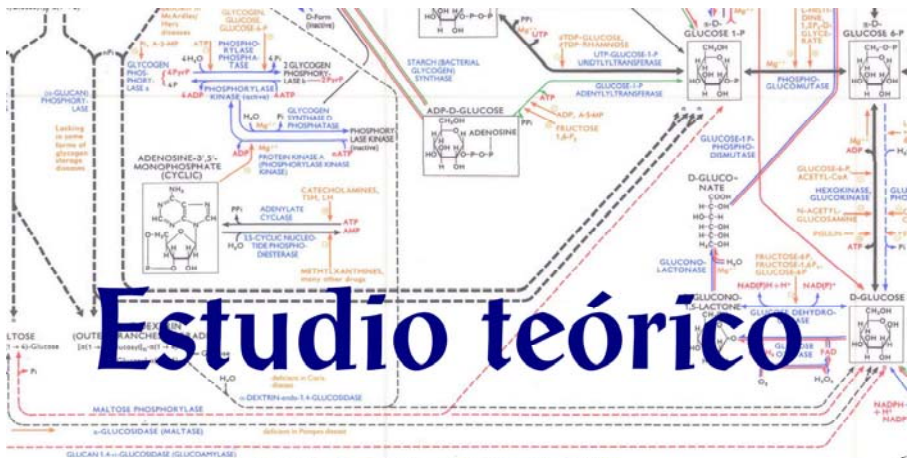
H7. Cuando se tienen células en cultivo y se añaden nutrientes elementales al medio, el efecto que puede observarse sobre la actividad de esas células es el mismo que el que pueda producirse si esos nutrientes se ingieren directamente como tales en la dieta.

Un concepto fundamental para poder comprender e interpretar adecuadamente esta hipótesis es el concepto de biodisponibilidad. La **biodisponibilidad** es la fracción de la dosis de un nutriente, medicamento, o cualquier sustancia, administrada a un organismo que llega a la circulación sistémica. Cuando esta sustancia se administra por vía intravenosa, la biodisponibilidad es del 100%; cuando se administra por otra vía, por ejemplo, por vía oral, su biodisponibilidad es menor debido a que se puede degradar en el tracto digestivo, o a que su absorción puede ser incompleta. La biodisponibilidad es un concepto esencial en farmacocinética, y debe tenerse en cuenta para calcular las dosis para una administración que no sea intravenosa, según la concentración que pretenda conseguirse en sangre, el tiempo que deba permanecer esta sustancia disponible para la actividad celular, etc. En general, los nutrientes básicos ingeridos libres (monosacáridos, ácidos grasos, vitaminas, iones minerales, aminoácidos, etc.) se absorben directamente en una proporción muy alta y por eso su biodisponibilidad es grande. Cuando las células diana sobre las que tiene que actuar la sustancia administrada no están en contacto directo con la sangre, o con el líquido intersticial, sino con algún

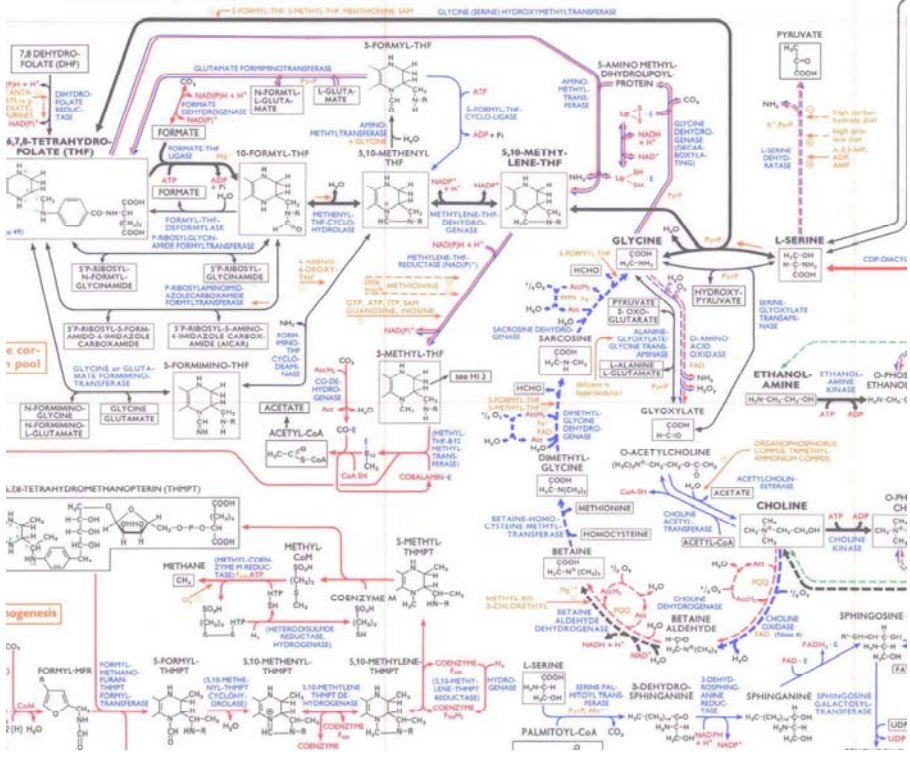
compartimento más selectivo, como el líquido cefalorraquídeo, entonces la biodisponibilidad debe referirse obviamente a su presencia en ese medio.

Lo que afirma esta hipótesis es que, de acuerdo con la biodisponibilidad que corresponda, el efecto de una determinada sustancia que se administra y que actúa sobre un determinado tipo de células puede observarse directamente incluyéndola en el medio de cultivo en la concentración adecuada. Nuestros experimentos se han diseñado de acuerdo con esta hipótesis, y admitiendo que la biodisponibilidad de los nutrientes básicos es muy alta. Así, combinando esta hipótesis con la anterior (H6) podemos admitir que la forma más directa de investigar el efecto de un determinado nutriente sobre una función fisiológica específica que realiza un tipo determinado de células es estudiando su efecto sobre el medio en el que se cultivan esas células.

Las concentraciones de glicina en el plasma sanguíneo humano están entre 0'8 y 5'4 mg/100 mL [216]. En un trabajo reciente, Oesser y Seifert [217] han investigado el efecto de hidrolizados de colágeno sobre la biosíntesis y secreción de colágeno en cultivos de condrocitos bovinos, probando concentraciones entre 0'05 y 10 mg/mL, y han observado un efecto estimulador de este preparado sobre el control, con una concentración de hidrolizado entre 0'1 y 5 mg/mL. La glicina representa el 22% en masa del hidrolizado (33% de los residuos, pero el porcentaje en masa es menor debido a que la masa molecular de la glicina es menor que los demás). Por tanto, el contenido de glicina en esas cantidades de hidrolizado están entre 2'2 y 110 mg/100 mL, es decir, han ensayado unas concentraciones hasta 20 veces superiores a las que hay en sangre. Todos estos datos nos dan una orientación sobre las concentraciones que debemos usar en nuestros experimentos. La diferencia entre nuestro trabajo y el de Oesser y Seifert es que ellos han probado el efecto del hidrolizado total del colágeno; es decir, han añadido al medio de cultivo la mezcla de todos los aminoácidos de la proteína, en su misma proporción, mientras que nosotros hemos hecho una selección basada en el estudio teórico previo, que presentamos en el capítulo 7.



Estudio teórico



Capítulo 7

Estudio teórico

Aminoácidos esenciales

Las rutas de biosíntesis de ocho de los veinte aminoácidos proteicos (valina, leucina, isoleucina, treonina, metionina, lisina, fenilalanina y triptófano) sólo son operativas en bacterias y plantas verdes. Esos aminoácidos son, pues, esenciales para la alimentación humana, y deben ser incluidos obligatoriamente en la dieta. El concepto de aminoácidos esenciales ha permanecido así muchos años, incluyendo exclusivamente a estos ocho en la lista. Sin embargo, con los años se han ido acumulando indicios y pruebas que obligan a replantear el tema. Nosotros queremos contribuir a esta revisión aportando nuevos datos y tratando de ordenar otros ya conocidos. La conclusión general es que la lista de aminoácidos esenciales debe ampliarse por diferentes motivos. Comenzaremos nuestro estudio clasificando los aminoácidos en cuatro grupos, considerando sus necesidades dietéticas teóricas de acuerdo con las posibilidades y necesidades del metabolismo.

Grupo 1. Aminoácidos esenciales absolutos. Valina, leucina, isoleucina, treonina, metionina, lisina, fenilalanina y triptófano son aminoácidos esenciales ya que ni el organismo humano ni los animales —hasta donde alcanzan nuestros conocimientos— pueden sintetizarlos a partir de ningún otro producto de la dieta.

Grupo 2. Aminoácidos no esenciales absolutos. Serina, alanina, ácido aspártico y ácido glutámico son los aminoácidos menos esenciales de todos, ya que su esqueleto carbonado se sintetiza directamente a partir de un producto del metabolismo energético básico procedente directamente de la glucosa, a través de la glicolisis y el ciclo de Krebs: la serina, a partir del

3-P-glicerato; la alanina, del piruvato; el ácido aspártico, del oxalacetato; y el ácido glutámico, del α -cetoglutarato (figura 7.1).

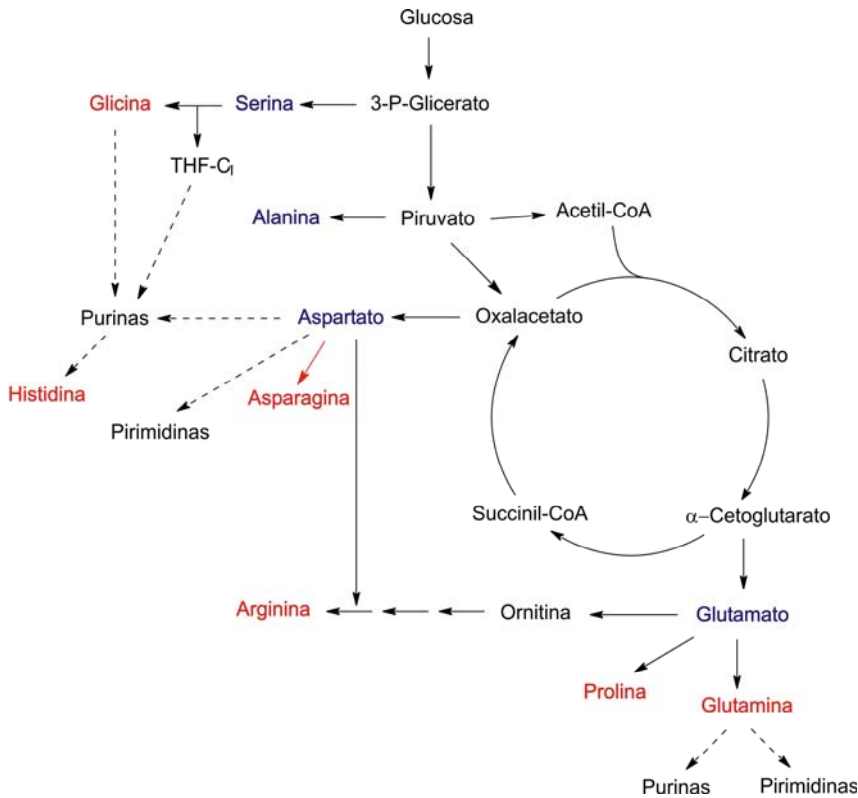


Figura 7.1. Rutas metabólicas de síntesis de los aminoácidos considerados clásicamente como no esenciales. El primer grupo (azul) lo constituyen los que proceden directamente de las rutas centrales del metabolismo (glicolisis y ciclo de Krebs); en el segundo grupo (rojo) están los que proceden de los primeros. El esquema muestra también las relaciones entre los aminoácidos y las bases nitrogenadas de los nucleótidos.

Grupo 3. Aminoácidos que podrían ser esenciales. Un tercer grupo está formado por glutamina, asparagina, prolina, arginina, histidina y glicina. Las rutas de biosíntesis de cada uno de ellos parten de alguno de los cuatro del grupo anterior (o de este mismo). Dado que los aminoácidos de partida para estas rutas no son esenciales, tampoco sería de esperar que estos cinco lo fuesen, en principio, aunque veremos que tres de ellos (histidina, arginina y glicina) sí van a serlo por diferentes motivos.

Grupo 4. Aminoácidos esenciales por dependencia bioquímica. Finalmente, un cuarto grupo está formado por cisteína y tirosina. Se trata de dos aminoácidos que el organismo humano y todos los animales pueden sintetizar, pero sólo a partir de otro que es esencial: la tirosina de la fenilalanina, y la cisteína de la metionina (pues, aunque en este último el esqueleto carbonado es suministrado por la serina, el átomo de azufre sólo puede ser aportado por

la metionina). Considerando estos casos, desde el punto de vista dietético, resulta obvio que estos dos aminoácidos debieran incluirse en el grupo de los esenciales, en el mismo grado que sus precursores, ya que si en la dieta sólo existiesen los ocho del primer grupo, el aporte de fenilalanina debería dar cuenta de sus propias necesidades más las de tirosina, e igualmente, la metionina debería cubrir las suyas más las de cisteína. Por decirlo en otras palabras, es obvio que o bien añadimos la cisteína y la tirosina a la lista, o contamos la fenilalanina y la metionina dos veces.

La lista de aminoácidos esenciales debe revisarse por motivos empíricos y teóricos, es decir, porque así lo demuestre o lo sugieran los resultados de una investigación experimental, o porque se trate de la conclusión del estudio de un mecanismo de reacción o del conocimiento más profundo de una ruta metabólica, y éste es el propósito de este capítulo.

El estudio básico de las rutas de biosíntesis de aminoácidos se dio por concluido en la década de 1930, con el descubrimiento de la ruta de la treonina [218]. Con posterioridad, se fueron acumulando datos empíricos que indicaban que a los ocho aminoácidos esenciales para la especie humana, citados arriba, se deberían añadir otros; en especial la histidina y la arginina [219].

Por otra parte, la extensión de estos estudios a una gama amplia de animales demostró dos hechos: (a) que la esencialidad de esos ocho es una característica universal de todos los animales; no se conoce ningún animal para el que alguno de ellos no sea esencial; (b) sí existen, en cambio, en algunos animales aminoácidos esenciales específicos [220].

Teoría de los puntos débiles del metabolismo

En una red de transformaciones metabólicas pueden existir nudos (metabolitos intermediarios conectados con varias enzimas) en los que se produzca un desajuste entre la cantidad que se produce, y la que se necesita para surtir a otros procesos. Entonces esto provocará un punto de colapso en el metabolismo, que puede manifestarse como la acumulación masiva de ciertos productos, o como vacíos metabólicos con la consiguiente falta de suministro.

Una observación cuidadosa del mapa metabólico señala a primera vista algunos de estos puntos:

(a) La fenilalanina es un aminoácido cuyo destino metabólico (aparte de su incorporación a las proteínas) es exclusivamente su transformación en tirosina. Sin embargo, la tirosina tiene asignada una elevada responsabilidad metabólica, ya que es el precursor de varios productos, algunos de los cuales son de uso abundante: las catecolaminas (dopa, dopamina, adrenalina y noradrenalina), la tiroxina y otros productos, como la melanina. Si quisiésemos cubrir todas esas necesidades partiendo exclusivamente de la fenilalanina, estaríamos sobrecargando la reacción de conversión de fenilalanina en tirosina (fenilalanina hidroxilasa), una reacción com-

pleja que depende de la coenzima tetrahidrobiopterina (la cual quizá sea también una vitamina), y al ser una oxidasa que trabaja con oxígeno molecular puede ser fuente de radicales libres de oxígeno, con el consiguiente riesgo de estrés oxidativo. No tiene sentido, pues, nutrir la fuente de todos esos procesos con un precursor que se usaría minoritariamente como tal, cuando su principal aplicación puede ser suministrada directamente incorporando la cantidad pertinente de tirosina en la dieta. Además, la sobrecarga de fenilalanina, podría provocar que parte de ella se desviase hacia los ácidos fenilpirúvico y fenilacético, y estos productos pueden provocar trastornos metabólicos bien conocidos. Es fácil evitar este problema si en la dieta hay suficiente cantidad de tirosina.

(b) Con la cisteína ocurre un fenómeno similar. La ausencia de cisteína en la dieta obligaría a duplicar la cantidad de metionina, y esto sería un esfuerzo inútil pues la conversión obligada de metionina en cisteína produciría un exceso de homoserina como producto residual, que se tendría que transformar en α -cetobutirato; en principio, esa ruta no parece tener problemas, pero vuelve a ser, una forma de forzar el metabolismo.

(c) El triptófano es un aminoácido esencial, así que su disponibilidad depende estrictamente de su aporte en la dieta. El triptófano es el aminoácido más escaso de todos en la composición de las proteínas, y sin embargo, al igual que la tirosina tiene asignado un importante cometido en el metabolismo, como precursor de varios productos, y entre ellos varios neurotransmisores y hormonas, como la serotonina y la melatonina. El riesgo de deficiencia de triptófano como precursor de serotonina es un hecho bien probado, hasta el punto de que el sistema nervioso ha desarrollado un sistema de recaptación de serotonina a fin de reciclar el neurotransmisor para ahorrar triptófano. Hace unos años se descubrió que el metabolismo humano puede sintetizar el ácido nicotínico (vitamina B₃) a partir de triptófano, y esto ha hecho que esta vitamina deje de considerarse como tal. Si procediésemos en consecuencia, omitiendo el ácido nicotínico de los suplementos vitamínicos, estaríamos agravando el punto débil del metabolismo del triptófano que estamos comentando, pues estaríamos sobrecargando aún más el uso del triptófano, que, como hemos visto es el aminoácido menos abundante en la dieta.

La estrategia correcta para diseñar la dieta idónea no debería ser reducir la lista de vitaminas y compuestos esenciales al mínimo indispensable fijándonos sólo en el mapa metabólico, sino aumentarla todo lo que sea posible. El concepto de aminoácido esencial y de vitamina no debería ser sólo 'académico', para consideraciones de papel y lápiz. La estrategia de confeccionar la dieta buscando lo mínimo imprescindible sobre el papel es mala porque puede provocar importantes problemas de circulación en el metabolismo, y la estrategia lógica no debe ser la de aportar la dieta mínima, como si la nutrición fuese un *tour de force* al metabolismo, para ponerlo a prueba y ver hasta dónde es capaz de resistir, sino muy al contrario, darle las cantidades idóneas de sus requerimientos para que trabaje en las mejores condiciones posibles. Por tanto, la tirosina y la cisteína deberían añadirse a la lista de aminoácidos esenciales,

y el triptófano debería añadirse a la dieta con regularidad, al menos, cuando se vea que puede haber trastornos neurológicos, problemas de sueño y relajación, intranquilidad persistente, hiperactividad, etc. Esta última conclusión no cambia la clasificación del triptófano como aminoácido esencial.

Revisión crítica del concepto de aminoácidos esenciales

A partir de estas consideraciones, revisaremos el concepto de aminoácidos esenciales, estableciendo cinco grupos, de acuerdo con los siguientes criterios.

1. Imposibilidad bioquímica. Aminoácidos estrictamente esenciales. En este grupo están los ocho citados arriba: valina, leucina, isoleucina, treonina, metionina, lisina, fenilalanina y triptófano, ya que existe una imposibilidad bioquímica para su biosíntesis, al no contar el metabolismo animal con las enzimas necesarias para convertir los precursores en los correspondientes aminoácidos.

2. Incapacidad bioquímica. La histidina ha estado mucho tiempo sin considerarse aminoácido esencial, ya que su ruta de biosíntesis es operativa en los animales, al menos, en algunos de ellos, incluido el hombre, pero no en la rata.

Sin embargo, se ha descrito que en la infancia, el metabolismo humano no tiene suficiente capacidad para sintetizar toda la histidina que necesita. En la actualidad hay muchos autores que reconocen que la histidina es esencial, por motivos empíricos, y que debe estar, por tanto, presente en la dieta [221]. En cualquier caso, nosotros preferimos resolver esta controversia añadiéndolo a la lista, por las razones apuntadas arriba.

3. Dependencia bioquímica. La cisteína y la tirosina sólo pueden sintetizarse a partir de otro aminoácido que es esencial: la cisteína de la metionina, y la tirosina de la fenilalanina.

4. Imposibilidad biofísica. Arginina. En principio, podría pensarse —y así figura en los libros de texto— que el metabolismo puede usar la ruta de síntesis de urea también para fabricar arginina, sin más que desviándola de la ruta; véase, por ejemplo, el mapa clásico del Prof. Michal [205].

Sin embargo, la biosíntesis de urea no es tan sencilla como lo muestran los textos básicos, donde el ciclo de la urea aparece como una ruta secuencial en la que las enzimas que participan son independientes y están distribuidas aleatoriamente en el espacio, de forma que los productos intermedios han de pasar de una a otra por difusión libre al medio. Si eso fuese así, cualquiera de estos intermediarios podría intercambiarse libremente con el *pool* libre externo, de forma que el flujo de carbono podría desviarse hacia otros destinos partiendo de cualquier intermediario, o bien, cualquier intermediario de esta ruta producido en otra, o procedente del exterior, podría incorporarse directamente a ésta.

Sin embargo, esto no es así. A finales de los años ochenta, el grupo de Luisa Raijman, en la *University of Southern California (USC)*, estudiando la organización biofísica del ciclo de la urea, demostró por primera vez, con unos elegantes experimentos, la existencia del fenómeno de *channelling* en el metabolismo celular [222].

El *channelling* es una asociación física ordenada de enzimas que participan secuencialmente en una ruta de transformación, de forma que el producto de una, y sustrato de la siguiente, se traspaasa directamente de la primera a la segunda, sin tener que difundir al medio. Es decir, el *channelling* significa un alto grado de organización estructural biofísica del metabolismo, en el campo de la *arquitectura molecular de las células* [223]. Una ruta metabólica con *channelling* tiene ventajas cinéticas obvias: tiene menor tiempo de transición, ya que los metabolitos intermedios no tienen que difundir para encontrarse con la siguiente enzima, y esto reduce evidentemente el tiempo para alcanzar el estado estacionario; además, esto significa un ahorro de espacio y de electrolitos, de manera que las enzimas pueden trabajar con una concentración local de sustratos elevada sin que aumente la osmolaridad general del medio, y se consigue, en definitiva mayor flujo, pues las enzimas actúan con el máximo grado de saturación.

En general, las enzimas, como proteínas que son, tienen tendencia a asociarse. La cuestión es si una determinada asociación específica entre dos enzimas particulares puede tener ventajas selectivas en la evolución, que lleven a determinar su consistencia. Y puesto que el *channelling* significa una mejora cinética, es de esperar, desde el punto de vista evolutivo, que su consecución sea un objetivo de la selección natural.

Por otra parte, la formación de un *channelling* entre dos enzimas significa que el sustrato intermedio no estará disponible para otras rutas divergentes que pudiesen formarse en ese posible punto de bifurcación, o para otras rutas convergentes, puesto que el *channelling* encierra el metabolito. Por tanto, el *channelling* puede tener obvias ventajas selectivas cuando se trata de aumentar el rendimiento cinético de una ruta, pero aísla esa ruta quitándole versatilidad al metabolismo, igual que una autovía tiene muy pocos puntos de comunicación con el exterior, mientras que en una calle se puede entrar o salir por cualquier encrucijada.

Luisa Raijman estudió el funcionamiento del ciclo de la urea en hepatocitos aislados de rata permeabilizados con α -toxina de *Staphylococcus aureus*. Esta toxina ataca a las membranas plasmáticas de las células eucarióticas formando pequeños poros que permiten el libre intercambio de metabolitos pero no de macromoléculas, de forma que las células mantienen su integridad, pero su metabolismo es accesible desde fuera, pudiéndose controlar las concentraciones de intermediarios como si fuesen variables externas. El grupo de Luisa Raijman puso en marcha el ciclo de la urea en las células permeabilizadas, con bicarbonato, como fuente de CO_2 , marcado isotópicamente con ^{14}C . El sistema trabajando en estado estacionario producía urea con un determinado marcaje en el carbono. Cuando el sistema estaba en estado estacionario añadieron arginosuccinato frío a una concentración 200 veces superior a

la que habían determinado en el medio, y en otro experimento separado añadieron arginina fría en la misma proporción; estando las células permeabilizadas no había problema para que cualquiera de estos dos productos (en especial el arginosuccinato) pudiese atravesar la membrana plasmática y llegase hasta la ruta, ya que estas reacciones ocurren en el citoplasma. Si cada uno de estos productos intermedios (radiactivos) de la ruta estuviese difundiendo libremente al medio, los añadidos se mezclarían con ellos y podrían incorporarse libremente al sistema, siendo atrapados por las enzimas correspondientes como sustratos. Entonces, su concentración extremadamente alta, al mezclarse con el intermediario radiactivo de la ruta apagaría la radiactividad de éste, y se observaría un descenso en el conteo de la urea final. Los resultados mostraron que la adición de arginosuccinato frío provocó la disminución de la radiactividad de la urea en un 25%, mientras que la adición de arginina fría no provocó ningún descenso de la radiactividad. La conclusión es que hay un channelling del 75% entre la arginosuccinato sintasa (EC 6.3.4.5) y la arginosuccinato liasa (EC 4.3.2.1), y un channelling del 100% entre esta última y la arginasa (EC 3.5.3.1).

A finales de la década de 1980 había datos que sugerían la existencia de channelling en varias rutas metabólicas, pero eran sólo indicios indirectos, como balances estequiométricos de flujos que no cuadraban [224,225]. Sin embargo, hasta el trabajo de Luisa Raijman no se habían presentado datos experimentales que lo demostrasen, y por ello, este trabajo marca un hito en el conocimiento del metabolismo.

La arginina y el arginosuccinato (los dos intermediarios ensayados y en los que Luisa Raijman demostró el *channelling*) se han quedado, pues, atrapados en el ciclo de la urea, evidentemente con el fin de mejorar el rendimiento cinético de esta ruta que es con toda evidencia una de las más activas del metabolismo, y en concreto, una de las más activas de los hepatocitos. Pero el precio que ha habido que pagar por esta mejora cinética es que, al perder la arginina la comunicación con el exterior, esa ruta ha dejado de cumplir su primitiva función, que era, sin duda, la síntesis de arginina. Y la consecuencia dramática es que la arginina, a pesar de que el metabolismo la produce en grandes cantidades, se ha convertido en un aminoácido esencial para los animales donde haya ocurrido esto; en general —admitiendo que la rata sea un buen modelo experimental— es de esperar que haya ocurrido así al menos en todos los vertebrados ureotélicos, es decir, en todos los mamíferos. En consecuencia, aunque el hígado humano fabrica diariamente hasta más de 100 gramos de arginina, ésta no queda a disposición del metabolismo para sus usos, entre ellos la incorporación a la estructura de las proteínas como aminoácido proteico.

De los resultados del trabajo de Luisa Raijman se deduce, pues, que la arginina debe ser clasificada como aminoácido esencial, por causas de *imposibilidad biofísica*. Estos resultados vienen a confirmar un buen número de observaciones empíricas que se habían ido haciendo desde hacía cerca de treinta años, sobre la necesidad de que la dieta contuviese una cierta cantidad de arginina. Véase, en particular, la revisión, muy bien documentada de Willard Visek, publicada en 1984 en *Annual Review of Nutrition* [219]. En ese trabajo, Visek afirma

que 'se ha hecho aparente que el criterio clásico de esencialidad (indispensabilidad) o no esencialidad (dispensabilidad) tiene importantes limitaciones, al ir aumentando el conocimiento de la nutrición y su aplicación. Los datos que soportan estas conclusiones proceden principalmente de estudios con histidina y arginina'.

Once meses después de la publicación del trabajo de Luisa Raijman, un trabajo del grupo de Daly, de la Universidad de Pensilvania [226], reconoce la necesidad de enriquecer la dieta con arginina para el tratamiento de ciertos tumores, y comenta que la clasificación de arginina como no esencial es sólo una cuestión de definición (no de necesidades metabólicas).

La evidente repercusión práctica de los experimentos de Luisa Raijman hace que sus resultados no pueden quedarse exclusivamente como una curiosidad para los estudiosos del metabolismo, sino que deben trascender al campo de la nutrición y de la dietética, pues demuestran que la arginina es un aminoácido esencial. Es difícil creer que a estas alturas no se disponga de tablas de composición de alimentos donde vengan las cantidades de *todos* los aminoácidos (no sólo los ocho esenciales clásicos) en los alimentos comunes —y en especial, en los ricos en proteínas. Los especialistas en metabolismo llevan más de veinte años insistiendo en que la lista de aminoácidos esenciales debe ampliarse, y no sólo la lista, sino sobre todo el concepto, y esas conclusiones no acaban de cuajar en los textos ni en la práctica de los especialistas en nutrición. En este trabajo nosotros presentamos pruebas teóricas y experimentales que demuestran que la glicina debe incorporarse a la lista de aminoácidos esenciales, y proponemos un criterio cuantitativo para ampliar el concepto de esencialidad, con base teórica y experimental.

La Glicina como aminoácido esencial por motivos de imposibilidad matemática

Finalmente, nuestra proposición en esta Tesis es que la glicina debe añadirse a la lista de aminoácidos esenciales en un quinto grupo, por motivos que definimos de *imposibilidad matemática*.

El motivo de haber considerado, hasta ahora, la glicina como aminoácido *no esencial* es, según hemos explicado arriba, que la glicina se produce en el metabolismo a partir de la serina, que es un aminoácido claramente no esencial (figura 7.1). Sin embargo, como veremos, la realidad es que su biosíntesis es muy difícil y compleja, ya que en ella están implicados muchos otros procesos —la mayoría de ellos independientes del uso de la glicina— cuyo funcionamiento determina, sin embargo, las posibilidades de síntesis de este aminoácido. Esto determina que sea difícil —y virtualmente imposible para ciertos organismos— fabricar toda la glicina que necesitan. Veamos primero la síntesis de serina.

Biosíntesis de serina

La ruta de biosíntesis de serina está representada con detalle en la figura 7.2, se trata una rama lateral de la glicolisis que parte del 3-fosfoglicerato (3-PGA). La primera reacción es la de la fosfoglicerato deshidrogenasa (EC 1.1.1.95), dependiente de NAD^+ , que cataliza la conversión del 3-PGA en 3-fosfohidroxipiruvato; la segunda es la de la fosfoserina transaminasa (EC 2.6.1.52), dependiente de ácido glutámico, y finalmente la tercera la fosfoserina fosfatasa (EC 3.1.3.3), que cataliza la hidrólisis del enlace éster-fosfato, y rinde serina. Esta ruta es un punto de bifurcación de la glicolisis, y como tal no tiene ningún problema de diseño. El uso del 3-PGA hacia esa ruta es un uso alternativo de la PGA-mutasa glicolítica (EC 5.4.2.1). Por tanto, el flujo de carbono de la glicolisis se puede desviar en ese punto sin más restricción que la capacidad catalítica de las enzimas implicadas. En principio, hay que admitir que esas actividades deben estar en concordancia con las necesidades de serina, de forma que la serina no tiene especiales motivos para ser esencial, y así la hemos clasificado arriba en el grupo de los aminoácidos no esenciales absolutos.

Ruta de biosíntesis de glicina

La síntesis de glicina se resuelve en un solo paso, a partir de la serina, mediante la enzima *glicina (serina) hidroximetil transferasa* (EC 2.1.2.1), en la que intervienen el piridoxal-fosfato y el tetrahidrofolato (THF) como coenzimas. La reacción produce la rotura de la molécula de la serina para dar glicina más un *fragmento* C_1 en forma del radical catiónico $[\text{CH}_2^{2+}]$, que queda unido covalentemente al THF en forma de metilén-THF.

Esta reacción es un nuevo punto de bifurcación con respecto a otras rutas para diversos usos de la serina (por ejemplo, para la síntesis de colina), pero cada uno de los dos ramales que salen de la serina (hacia glicina y hacia THF- C_1 , respectivamente) no constituyen una bifurcación. Sería una bifurcación si la serina pudiese rendir alternativamente glicina o THF- C_1 , pero eso no es posible, pues se trata de una *rotura con estequiometría fija*, y este tipo de diseño condiciona fuertemente el funcionamiento de todas las rutas que se derivan de este punto.

El diseño está representado simbólicamente en la figura 7.3. La ruta $A \rightarrow C$ tiene un punto de *bifurcación* en el metabolito intermedio B , de forma que a partir de ahí, el flujo que procede de A se puede distribuir hacia C o hacia D , según convenga, sin más que regular la actividad de las enzimas correspondientes. Las cantidades relativas, las proporciones del flujo de la rama principal que se van a desviar a cada ramal, son las que uno desee, pues no hay restricciones estequiométricas que condicionen una relación entre esos dos flujos, a excepción de la regla obvia $J_1 = J_2 + J_3$. Sin embargo, la reacción $D \rightarrow E + F$ no es una bifurcación, sino una *rotura con estequiometría fija*: D se rompe en dos mitades, rindiendo E y F con una estequiometría dada; una molécula de D produce una de E más una de F , y esta

proporción no puede alterarse porque viene obligada obviamente por la estructura química de los tres componentes de la reacción. Después, *E* y *F* se usan independientemente, cada una para una serie particular de procesos.

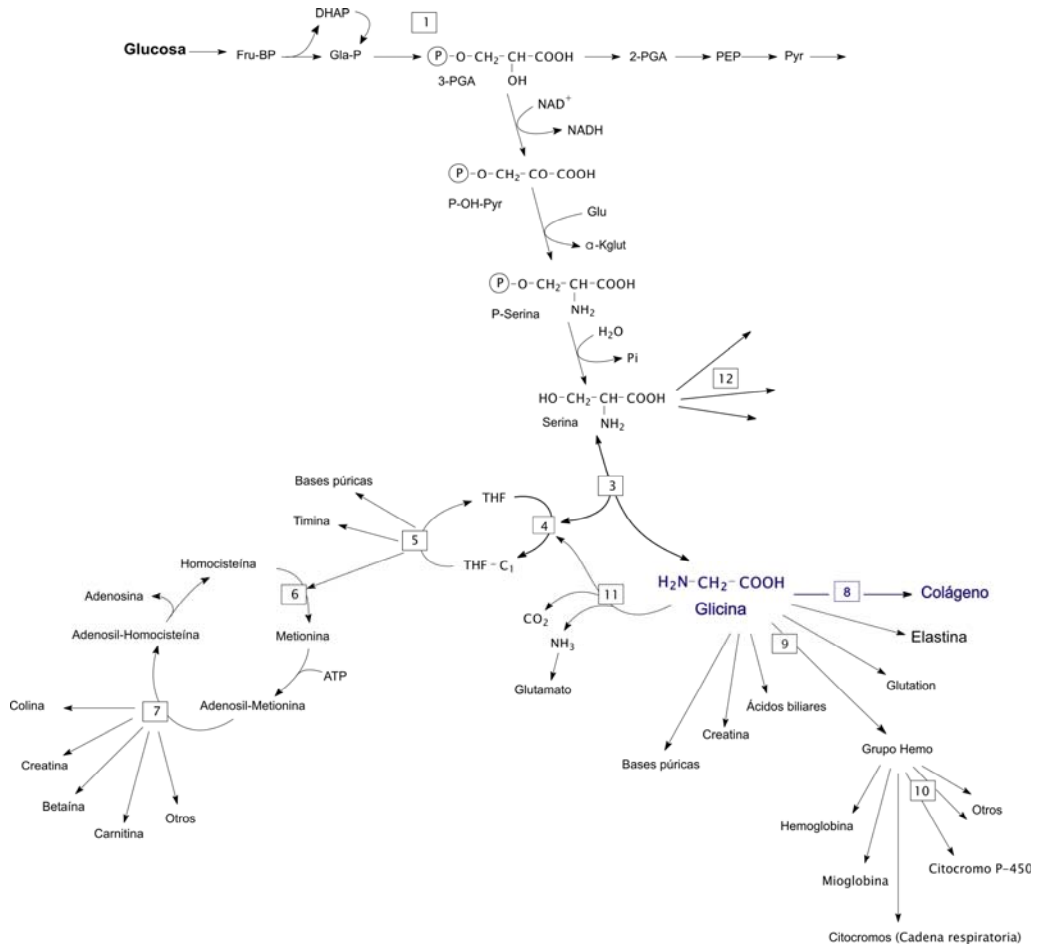


Figura 7.2. Rutas metabólicas implicadas en la biosíntesis de glicina y en su uso para diferentes funciones metabólicas. Rutas numeradas: (1) glicolisis, ruta central del metabolismo de los carbohidratos; (2) rama específica que sale de la glicolisis para la síntesis de serina y glicina; (3, 4) reacción de la serina hidroximetil transferasa (EC 2.1.2.1) que convierte serina en glicina con la transferencia de la unidad C₁ al tetrahidrofolato (THF); (5, 6, 7) conjunto de reacciones que conducen a otros procesos necesarios en la síntesis de glicina para descargar la unidad C₁ del THF, y recuperar así el THF libre para participar de nuevo en la reacción (3, 4); (8, 9, 10) conjunto de reacciones de procesos de biosíntesis en los que participa la glicina; (11) reacción irreversible de la enzima glicina deshidrogenasa (decarboxilante) (EC 1.4.4.2/2.1.2.10) que convierte la glicina en la unidad C₁; (12) conjunto de reacciones que usan serina para otros procesos.

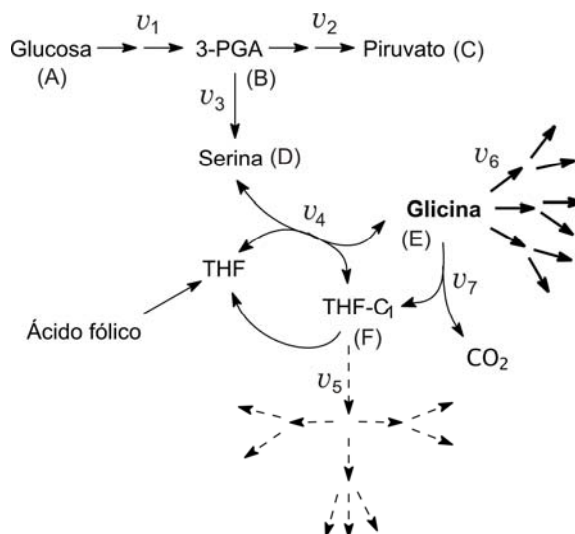


Figura 7.3. Esquema simplificado de las rutas metabólicas implicadas en la biosíntesis y utilización de glicina, con los símbolos usados en el desarrollo de las ecuaciones de la demostración del teorema (véase el texto).

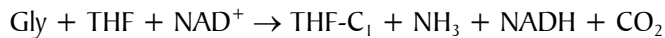
Este diseño le quita versatilidad al metabolismo. Cuando un producto se rompe en dos, cada uno de los cuales se incorpora a un proceso metabólico diferente, el transcurso de la reacción de rotura queda condicionado por la circulación de las dos ramas en conjunto, de tal forma que si hay un desfase entre ellas, el cumplimiento de las necesidades metabólicas de los productos de cada conjunto, producirá la detención retroactiva en la rama correspondiente, produciendo finalmente la inhibición de la reacción de escisión inicial (4), y esto provocará el consiguiente corte de suministro para la otra rama. Por tanto, este diseño obliga a que la reacción (4) sólo pueda ocurrir mientras la misma relación estequiométrica de la reacción se mantenga entre la actividad total de cada una de las dos ramas. Sin embargo, si la función específica que desempeña cada una en el metabolismo es independiente, puede haber diferencias importantes en el uso de cada una y una de ellas puede frenar la reacción sin que se hayan cumplido los requerimientos de la otra.

Supongamos, por ejemplo, según se representa en la figura 7.3, que E se use mucho y F muy poco. Esto provoca inevitablemente un grave problema de flujo metabólico que coloca en precario la rama de E , cuya causa es el diseño de la red, pues por mucha actividad que tengan las enzimas de esa rama, la ruta acabará colapsada por la acumulación de F . Esto genera un punto débil del metabolismo cuya causa es el diseño de la red. Las necesidades de F se satisfacen pronto, porque su demanda metabólica es muy baja, sin que se haya hecho lo propio con E ; y la regulación de la producción de F (por lo general, por efecto retroactivo sobre las enzimas de la ruta) producirá la detención de la reacción (3), sin que se hayan cubierto las necesidades de E , de manera que el problema no se puede solucionar modificando

las actividades de las enzimas con inhibidores, activadores, o cualquier otro tipo de fármacos o manipulación genética, pues ninguna de esas estrategias puede alterar la estequiometría de la reacción (3). Por tanto, es inevitable que se produzca una carencia de E , a no ser que haya otra ruta alternativa para su producción, o que E sea un nutriente que se pueda incorporar directamente a través de la dieta.

La forma lógica y más conveniente de corregir este problema de diseño sería con una ruta de desvío (*bypass*), que permitiese el libre intercambio entre los dos flujos de carbono. En la glicolisis hay un punto con diseño similar: la rotura de la fructosa 1,6-bisfosfato por la aldolasa que rinde las dos triosas: gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona-fosfato. Allí existe esa ruta de *bypass* con la reacción de la enzima triosa-fosfato isomerasa (TIM), que cataliza la interconversión de las dos triosas. Como la reacción de isomerización es reversible, la glicolisis no pierde versatilidad para el uso de cada triosa, ya que ambas se pueden interconvertir libremente y cada una de sus rutas específicas se puede usar más o menos, según convenga, permitiendo que cada rama pueda funcionar con independencia de la otra.

En el caso de la glicina también existe una reacción así, como puede verse en la figura 7.2. Se trata de la reacción (11), catalizada por la *glicina deshidrogenasa (descarboxilante)*, también conocida como *sistema de rotura de glicina* (EC 1.4.4.2, ó EC 2.1.2.10), que cataliza la reacción global:



Sin embargo, las características termodinámicas de esta reacción, debido a la liberación de CO_2 y de amonio, hacen que sea irreversible en condiciones fisiológicas, hacia THF-C_1 , por lo que la reacción no sirve para fabricar glicina, sino, al contrario, para usar la glicina como fuente de unidades C_1 , es decir, que sólo sirve para darle libertad a la rama del fragmento C_1 , no a la rama de la glicina.

Algunos textos muestran esta reacción como reversible. No parece haber datos disponibles de su constante de equilibrio, pero es evidente que es irreversible en condiciones fisiológicas, debido al desprendimiento de CO_2 y de amonio, dos productos cuya concentración en las células es muy baja, especialmente el amonio, debido a su toxicidad. La reacción aparece, sin embargo, como reversible en los textos clásicos de Bioquímica [227-229]. Sin embargo, en el atlas del Prof. Michal [205], y en el texto de Metzler [206], que son, sin duda, los dos más especializados y documentados, y por ello, los más fiables, la reacción figura como irreversible en el sentido lógico en que está escrita arriba. Esta reacción permite, pues, que una molécula de serina pueda rendir dos unidades C_1 , pero no dos glicinas, de forma que no sirve para corregir la potencial carencia de glicina.

Teorema: en los organismos donde la ruta metabólica de síntesis de glicina sea la representada en la figura 7.2, y estando el metabolismo funcionando en cualquier condición, se cumple

que el flujo metabólico de producción de glicina no puede ser superior al consumo de unidades C_1 transferidas por el tetrahidrolato.

Prueba: El esquema de la figura 7.3 representa todos los flujos metabólicos relacionados con la producción y el gasto de glicina. En estado estacionario, el flujo de producción neta de glicina es igual a la suma de todos los flujos de consumo, representada en la figura por v_6 , y el consumo total de unidades C_1 está representado por v_5 . El sistema completo queda descrito por el siguiente conjunto de ecuaciones diferenciales:

$$\frac{dB}{dt} = v_1 - v_2 - v_3 \quad (1)$$

$$\frac{dD}{dt} = v_3 - v_4 \quad (2)$$

$$\frac{dE}{dt} = v_4 - v_6 - v_7 \quad (3)$$

$$\frac{dF}{dt} = v_4 + v_7 - v_5 \quad (4)$$

Que en estado estacionario se convierten en el sistema de ecuaciones algebraicas:

$$\frac{dB}{dt} = v_1 - v_2 - v_3 = 0 \quad (5)$$

$$\frac{dD}{dt} = v_3 - v_4 = 0 \quad (6)$$

$$\frac{dE}{dt} = v_4 - v_6 - v_7 = 0 \quad (7)$$

$$\frac{dF}{dt} = v_4 + v_7 - v_5 = 0 \quad (8)$$

Despejando v_4 de (7):

$$v_4 = v_6 + v_7 \quad (9)$$

Por tanto, $v_6 = v_4 - v_7$

De (8):

$$v_5 = v_4 + v_7 = v_6 + 2v_7 \quad (10)$$

$$v_6 = v_5 - 2v_7 \quad (11)$$

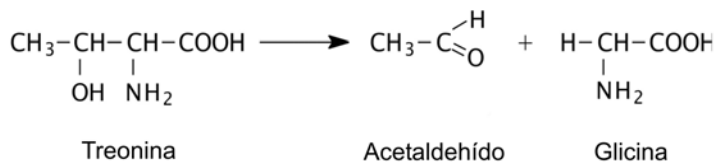
Luego v_6 no puede ser mayor que v_5 , pues su límite máximo sería precisamente v_5 , si $v_7 = 0$.

Esto prueba la proposición para el caso de que el sistema esté trabajando en estado estacionario. Sin embargo, dado que la restricción de la reacción (4) es estequiométrica, no un punto de bifurcación, la relación de flujos debe cumplirse en cualquier condición, ya que el estado estacionario no puede alterar las restricciones estequiométricas, las cuales vienen impuestas por el mecanismo químico de la reacción, y así queda probado el teorema.

La biosíntesis de glicina depende, pues, estequiométricamente del conjunto total de reacciones dependientes de THF- C_1 (reacciones 5-7 en la figura 7.2). Puesto que cada una de ellas está implicada en un proceso fisiológico diferente, independiente de las necesidades de glicina que demanda el otro conjunto, a excepción de la biosíntesis de bases púricas (que discutiremos más adelante), el acoplamiento entre ellas no es nada obvio, en absoluto. Entonces, un fuerte requerimiento de glicina, que fuese necesario para la biosíntesis de otros productos (reacciones 8-10 en la figura 7.2), tendría que forzar a que se produjese una producción equivalente de unidades C_1 llevadas por tetrahidrofolato. Esto, obviamente, no es posible, pues la producción del intermediario THF- C_1 no puede depender del trabajo de otra ruta diferente, sino que tiene que hacerse de acuerdo con las necesidades específicas de este producto en el metabolismo.

Treonina aldolasa

Hay otra ruta alternativa que sí podría actuar para la biosíntesis de glicina. Se trata de la reacción de rotura de la treonina:



Esta reacción, catalizada por la enzima serina hidroximetil-transferasa (EC 2.1.2.1), tampoco es buena como vía de síntesis de glicina, ya que la treonina es un aminoácido esencial, y sus

necesidades en el metabolismo son del mismo orden que su aporte en la dieta, pues la concentración de treonina es muy semejante en todas las proteínas. Por tanto, la importancia de esta reacción como fuente de glicina es mínima ya que no hay suficiente treonina en la dieta como para dar cuenta de las necesidades de treonina y de glicina.

Además, el acetaldehído es un producto muy tóxico, y es la causa principal de la toxicidad del etanol. El etanol ingerido en la dieta se transforma en acetaldehído de paso hacia acetato, y la enorme reactividad química del acetaldehído es la causa principal de la toxicidad del etanol (no la única, pues el etanol interacciona con receptores de membranas provocando una somnolencia similar a la de los anestésicos). Por tanto, si la biosíntesis de glicina tuviese que depender de la rotura aldólica de la treonina, su necesidad obligaría al metabolismo no sólo a degradar treonina, sino también a producir acetaldehído, y esto, aparte del daño que produciría por merma de un aminoácido esencial, sería un foco de intoxicación. Por otra parte, la vía normal para la desintoxicación del acetaldehído es su rápida conversión en etanol (como una ruta de vía muerta), y luego su transformación lenta, en acetato pasando nuevamente por acetaldehído.

La reacción de la treonina aldolasa es muy reversible, como otras aldolasas; en caso de abundancia de glicina se desplazaría en sentido contrario facilitando la eliminación de acetaldehído (y consiguientemente, de etanol), al tiempo que serviría como fuente de treonina.

Usos de la glicina

La estructura química de la glicina, $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$, aunque aparentemente trivial, tiene dos propiedades importantes que la hacen vital —virtualmente insustituible— en el metabolismo: como pieza estructural clave para el plegamiento de las proteínas, y como reactivo químico para la síntesis de otras moléculas más complejas.

Estructura de proteínas

La glicina no es un aminoácido especialmente abundante en las proteínas (aproximadamente sólo el 4% de promedio). Sin embargo, su papel en la estructura de las proteínas es crítico debido a su pequeño tamaño, por la carencia de un residuo carbonado en el carbono α . El metileno de la glicina $[-\text{CH}_2-]$ es una estructura tan pequeña, que permite que las proteínas tengan en ese punto la máxima capacidad de plegamiento, de forma que cuando cumple esa función estructural en las proteínas, la glicina es un residuo insustituible, y como tal, uno de los aminoácidos que menos admite una mutación. Por ello, los residuos de glicina son quizá los más conservados en la evolución neutral de la secuencia de aminoácidos en las proteínas. Podemos tomar como ejemplo, el citocromo c, cuya evolución es una de las más estudiadas y documentadas, de forma que ha sido el paradigma para construir los relojes moleculares de la

evolución. El citocromo c humano tiene 13 residuos de glicina. Un estudio comparado de la secuencia de esta proteína entre 20 especies incluyendo animales, vegetales y hongos [230], muestra que nueve de esos residuos (gly-9, 14, 37, 42, 45, 49, 53, 85 y 92) son invariables en todas las especies; dos (gly-31 y 45) varían en uno de los tres hongos estudiados; dos (gly-32 y 64) varían sólo en un hongo y el trigo (la única planta de la serie), y sólo un residuo (gly-68) presenta variaciones además en algunos pocos animales. El papel estructural insustituible de los residuos de glicina se ha demostrado experimentalmente. La mutación producida en el laboratorio de la glicina-34 de *Rhodobacter capsulatus* (que corresponde a gly-42 en la notación utilizada arriba) conduce a un citocromo c mal plegado que en su estado oxidado es inestable y pierde su actividad [231]. Un efecto similar se ha descrito en la citocromo c oxidasa con la mutación de gly-226 por arginina [232]. Hay muchos más ejemplos de este fenómeno, por ejemplo, en la evolución de las globinas, y prácticamente en todas las proteínas cuya evolución se ha estudiado con detalle [233,234].

Reactivo para síntesis química

La glicina es uno de los aminoácidos más utilizados en el metabolismo para la síntesis de otras moléculas. La razón de esta utilidad es que el metileno ($-\text{CH}_2-$) puede considerarse como una unidad monocarbonada (C_1) unida a dos grupos reactivos ($-\text{NH}_2$ y $-\text{COOH}$), lo que le confiere un alto potencial de reacción. El metabolismo lo utiliza en la fabricación de bases púricas, porfirinas (el grupo hemo de la hemoglobina, mioglobina y citocromos), creatina, glutatión y sales biliares, entre otros, aparte de que la propia glicina es a su vez, fuente de unidades C_1 para el ácido tetrahidrofólico. Comentaremos aquí dos de ellos por ser los que más pueden influir en el gasto y en la producción de glicina.

Biosíntesis de bases nitrogenadas (purinas y pirimidinas). La biosíntesis de bases púricas es uno de los procesos más críticos del uso de unidades C_1 y de glicina. En la síntesis del esqueleto carbonado de una base púrica se gasta una molécula de glicina y dos unidades C_1 (figura 7.4), y en la biosíntesis de pirimidinas se gasta una unidad C_1 para el metilo de la timina. La síntesis de ácidos nucleicos es, pues, una *fuentes de glicina* (a pesar de que gasta glicina). Se gastan dos serinas en la síntesis de cada par GC, y tres en el par AT, del DNA, y dos para cualquier purina del RNA, mientras que sólo se gasta una glicina en cada caso, de manera que la síntesis de ácidos nucleicos y de otros nucleótidos es un proceso que rinde una producción neta de glicina, que queda a disposición de otras reacciones, y de no gastarse, siempre se puede resolver mediante la reacción de la glicina deshidrogenasa descarboxilante, lo que significará un ahorro de serina.

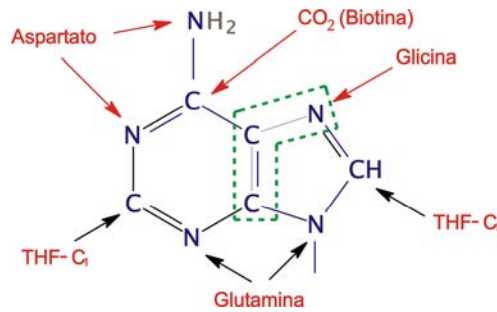


Figura 7.4. Origen metabólico de los átomos del anillo de purina.

Porfirinas. La síntesis de las porfirinas es uno de los procesos que más glicina consume, pues se emplean ocho moléculas de glicina en la síntesis de cada grupo hemo (ferroporfirina) (figura 7.5), y esta estructura está presente en muchas estructuras celulares, en especial los citocromos de la cadena respiratoria, aparte de algunas enzimas como la catalasa.

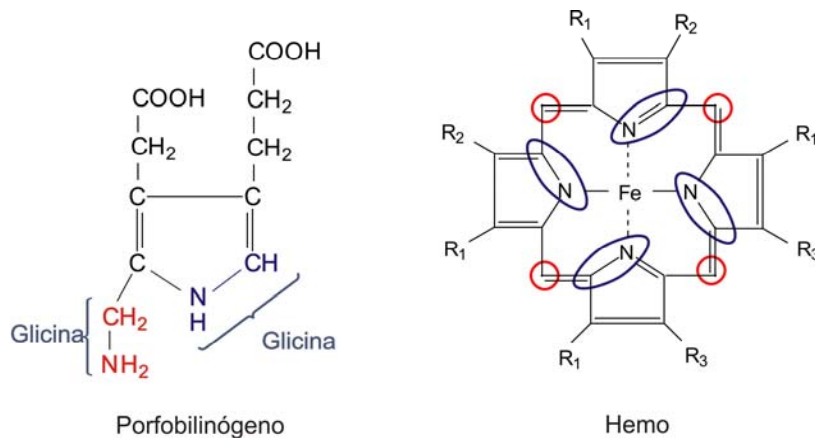


Figura 7.5. Participación de la glicina en la biosíntesis del grupo hemo (ferroporfirina). Se gastan ocho moléculas de glicina en la formación de cada grupo hemo.

Cálculos cuantitativos de la producción y gasto de glicina

Porfirinas. Se puede estimar la cantidad de porfirinas que hay en el organismo a partir de la cantidad de hierro. La cantidad total del hierro es de 50 mg/kg en el hombre, y 42 mg/kg en la mujer. Un hombre de 75 kg de peso tiene, por tanto, 3'75 g en total (67'14 milimoles), mientras que una mujer normal de 55 kg tiene 2'31 g (41'36 milimoles). El 70% del hierro es hierro 'funcional', y el 30% restante está en otras proteínas (ferritina, hemosiderina y transferrina). Por tanto, el hierro funcional en el hombre supone 47 milimoles, y hay la misma cantidad de grupos hemo en total, en el cuerpo.

El 80% del hierro funcional está en la hemoglobina, y el 20% restante en la mioglobina, los citocromos y otras proteínas con grupo hemo. En un hombre de 75 kg la hemoglobina contiene, pues 37'6 milimoles de hierro funcional. El recambio diario de grupos hemo se ha calculado a partir de datos de recambio de hemoglobina, administrando ^{15}N -glicina, durante dos días en dosis múltiples, y analizando el contenido de ^{15}N en los eritrocitos, y en los productos de excreción correspondientes, y en otros productos, como la albúmina, no relacionados con las porfirinas, como control. Los resultados mostraron que el recambio diario del grupo hemo es el 0'85% del total. Por otra parte, otros experimentos demostraron que la vida media de los eritrocitos es de 126 días en el hombre, lo que equivale a un recambio diario del 0'79%. La diferencia entre estos dos datos (0'06%) es, obviamente, el recambio de mioglobina y citocromos, que es mucho más lento porque las células que las contienen tienen una vida media más larga.

Tomemos el valor medio de 0'85% para el recambio de la totalidad de grupos hemo que corresponde a $47 \times 0'85/100 = 0'40$ milimoles de grupos hemo que sintetiza diariamente un hombre de 75 kg. La síntesis de cada mol de grupos hemo gasta ocho moles de glicina; por tanto, el gasto diario de glicina que se usa para el recambio de las porfirinas es de $0'40 \times 8 = 3'2$ milimoles. Puesto que la masa molecular de la glicina es 75'06, el gasto diario de glicina para la síntesis de porfirinas es de $3'2 \times 75'06 = 240'20$ mg.

Purinas. Veamos ahora la capacidad de síntesis de glicina. La síntesis de purinas es la principal fuente de glicina, según hemos visto. El catabolismo de purinas en el hombre conduce a ácido úrico, que se excreta en la orina. La cantidad de ácido úrico en orina, en raras ocasiones desciende por debajo de 0'5 a 0'6 g/día, incluso en dietas sin purinas [216], luego 550 mg es el recambio diario de purinas, y por tanto, la cantidad que se sintetiza diariamente cuando la dieta no contiene purinas. Esta es la síntesis máxima, pero puede ser menor con dietas ricas en purinas (entonces la cantidad de ácido úrico en la orina de 24 horas puede llegar a ser superior a 1 g, pero la mayor parte se excreta directamente, y apenas interfiere en la biosíntesis de purinas para el recambio normal). Una producción de purinas equivalente a 550 mg de ácido úrico (masa molecular 168'11) significa la fabricación de 3'27 milimoles; esto significa una producción igual de glicina (masa molecular 75'06), es decir, aparte de que la síntesis de purinas implica un gasto de glicina, arroja una producción neta de 245 mg/día de glicina que está disponible para otros usos. Como puede verse, la producción de glicina debida a la síntesis de purinas (245 mg/día) puede hacerse cargo del gasto que supone la síntesis de porfirinas calculado arriba (240 mg). Como el resto de los procesos que consumen unidades C_1 transportados por el THF o por la adenosil metionina son también fuentes de glicina, el gasto total de glicina en estos procesos está compensado.

Creatina. El recambio de creatina es otro proceso consumidor importante de glicina. El hombre excreta una media de 20 mg/kg de creatinina (masa molecular 113'11) en 24 horas. Un hombre de 75 kg excreta, pues, 1'5 g (13 milimoles)/día. La síntesis de la creatina corres-

pondiente implica un uso equimolar de glicina, es decir, $13 \times 75'06 = 976$ mg/día, lo cual sería un gasto importante. Sin embargo, ese gasto no influye en la necesidad neta de glicina, pues la síntesis de creatina es un proceso metabólico perfectamente compensado, ya que en la síntesis de cada molécula se gasta una glicina y también un metilo (figura 7.6), y, como sabemos, la producción de metilos es una fuente equimolar de glicina. Es tentador pensar que quizá ésta sea la razón de la presencia de ese metilo en la estructura de la creatina. No hay que olvidar, sin embargo, que la síntesis de creatina implica un gasto neto de arginina, que también es un aminoácido esencial, según hemos visto.

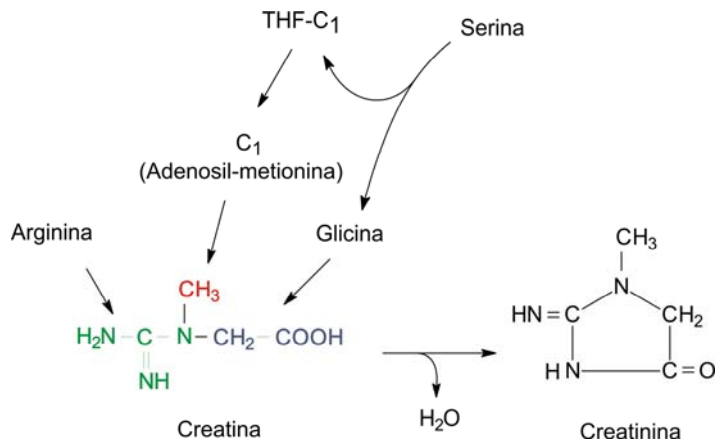


Figura 7.6. Participación de la glicina y de la unidad C₁ en la síntesis de creatina. Se gasta una molécula completa de serina en la síntesis de cada molécula de creatina, de forma que este proceso no genera un gasto descompensado de glicina.

Colágeno. Donde el problema de la escasez de glicina se hace más acuciante es en la extraordinaria demanda impuesta para la síntesis de colágeno. El colágeno es la proteína más abundante en los vertebrados, y también la más singular de todas, con respecto a su estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria, según hemos expuesto en el capítulo 1. Lo que interesa destacar ahora del colágeno es su abundancia en los vertebrados, incluido el hombre, la abundancia de glicina en su estructura, y la necesidad de un gran aporte diario de este aminoácido para su recambio.

En un hombre normal (no obeso), de 75 kg de peso, las proteínas constituyen aproximadamente el 18% de la masa corporal, y de ellas, una tercera parte es colágeno. Por tanto, un individuo normal de 75 kg tiene aproximadamente 13'5 kg de proteínas, de las cuales la tercera parte (4'5 kg) es colágeno; el 22% de la masa del colágeno (990 g) corresponde a *residuos* de glicina, (masa molecular = 57'05), que equivalen a 1'31 kg de glicina (masa molecular = 75'06). La proporción de glicina en el resto de las proteínas ($13'5 - 4'5 = 9'0$ kg) es aproximadamente un 4%, esto es, 360 g de residuos de glicina, equivalentes a 474 g

de glicina. La cantidad de residuos de glicina en la estructura de todas las proteínas corporales es, pues, 1'36 kg, que equivalen a ~1'79 kg de glicina.

Olvidemos, de momento, las otras proteínas. La vida media del colágeno, sacando un valor medio entre los distintos tipos, es de 80 días, aproximadamente; la gran excepción es el colágeno tipo II del cartílago, que se renueva muy despacio, con una vida media estimada de 2-4 años. Cada día se renueva, por tanto, el 1'25% de esta proteína (56'0 g), es decir, la síntesis de colágeno consume 16'4 gramos diarios de glicina. En el recambio normal de proteínas, se recicla una cierta fracción de los aminoácidos que constituían las proteínas antiguas, de manera que, en general, parte de los aminoácidos que resultan de la degradación de esas proteínas viejas se reutilizan para fabricar proteínas nuevas. Sin embargo, esto ocurre significativamente con las proteínas intracelulares, y mínimamente con el colágeno ya que al ser una proteína extracelular es degradada por los macrófagos, que no son las células que fabrican colágeno [235]. Se ha descrito síntesis de colágeno por macrófagos cultivados *in vitro*, pero esto, caso de que ocurra *in vivo*, sería en circunstancias muy especiales [236]. Por tanto, la mayor parte de los 16 gramos de glicina que se requieren para la síntesis del colágeno diariamente debe ser suministrada por síntesis metabólica o por la dieta.

La capacidad de síntesis metabólica no puede dar cuenta, en absoluto, de esa demanda, según hemos visto arriba, pues es suficiente para atender a la síntesis de porfirinas, pero poco más. Por otra parte, la glicina procedente de la dieta tampoco es suficiente, pues se ha determinado que la ingesta media de glicina en una persona que sigue una dieta normal, es de 2 g aproximadamente [237]; en algunos casos, esta cantidad puede ser superior, pero nunca mayor de 5 g, suponiendo que se digiera todo el colágeno de la ingesta proteica (70 g/día como máximo), y que se absorba toda la glicina (22% del colágeno). Queda, por tanto, un déficit permanente de glicina de más de 10 gramos diarios.

Carencia de glicina. Repercusiones patológicas de la escasez de glicina

En principio, la carencia de glicina puede manifestarse provocando una debilidad funcional en cualquiera de los procesos que usan glicina. Puesto que la síntesis de colágeno es el proceso donde más se necesita, ése es el punto más probable en donde podría repercutir su carencia, pero también pueden resentirse otros procesos, como, por ejemplo, la síntesis de porfirinas o de sales biliares, e incluso de creatina.

El retraso en la síntesis de colágeno debido a la escasez de glicina puede ser causa no sólo de un recambio más lento —y el consiguiente envejecimiento de la estructura mecánica— sino de otros problemas estructurales. En el capítulo I hemos anotado un dato que puede ser crítico para este problema: la síntesis de colágeno es un proceso más complejo que el de otras proteínas, puesto que no sólo depende de la correcta incorporación de los aminoácidos en el orden debido (la cual depende obviamente del mensaje contenido en la secuencia del

mRNA) sino que con una cierta regularidad hay una hidroxilación de residuos de prolina y de lisina, catalizados por sendas enzimas específicas (véase capítulo 1). Se ha descrito que si la síntesis del procolágeno tipo I ocurre a una velocidad más lenta de la que le habría de corresponder, se pueden producir alteraciones en estas reacciones, produciéndose un exceso de hidroxilisina, y de hidroxilisina glicosilada. En general, cualquier condición que retrase el tiempo de enrollamiento para formar la triple hélice puede provocar estas anomalías, ya que el correcto enrollamiento de la molécula determina y limita la extensión de las modificaciones covalentes postraduccionales. La escasez de glicina (su baja concentración) provocará inevitablemente que la síntesis de colágeno sea más lenta, y por tanto puede ser causa no sólo de que el colágeno se renueve más lentamente contribuyendo al envejecimiento prematuro del tejido, sino también de que se produzca un colágeno con importantes anomalías estructurales, que puede ser causa de diversas patologías.

El déficit de glicina puede ser, por tanto, la causa de una gama muy extensa de patologías. La incapacidad para fabricar todo el colágeno necesario, o incluso su alteración estructural debido a la falta de glicina, puede provocar una debilidad generalizada en la estructura mecánica del cuerpo, la cual está formada básicamente por huesos, cartílagos y tendones. Su carencia debe originar, pues, multitud de problemas de construcción, resistencia y regeneración de esos materiales. Probablemente la artrosis es el problema más extendido de esta gama, pero igual puede ocurrir con diversos tipos de artritis, osteoporosis, lesiones de cartílagos y de tendones que no llegan a repararse debidamente por escasez de materiales, etc.

Origen del problema de la escasez de glicina

¿Cuál es el origen del problema responsable del punto débil del metabolismo de la escasez de glicina? ¿Cómo se ha podido diseñar la estructura del metabolismo con un problema tan evidente? ¿Cómo es posible que la glicina, un producto tan importante en el metabolismo, sea tan escaso y tan difícil de obtener? Para contestar a estas preguntas hay que comprender bien las reglas de la evolución.

Se suele pensar que la selección natural es un mecanismo capaz de resolver cualquier problema en el diseño general de la vida, dotando a las especies de una capacidad prácticamente ilimitada de adaptación; que es capaz de generar todas las estructuras y funciones que se vayan necesitando, y de ir eliminando las que ya no tengan utilidad. Por eso, cuando se ve que existe algún problema (por exceso o por defecto de algo), o una estructura que aparentemente no desempeña ninguna función, pero que permanece sin eliminarse, se suele pensar que han fallado los mecanismos evolutivos.

Sin embargo, sabemos bien que esto no es así, según hemos explicado en el capítulo 4. La selección natural no es un mecanismo omnipotente, capaz de todo, sino un mecanismo de optimización que sólo puede actuar cuando se dan tres condiciones. La primera condición es

que la función sea optimizable, pues el algoritmo no tiene sentido para otros problemas. Esto significa que el problema debe admitir varias soluciones y, al menos una de ellas debe ser mejor que las demás. Si sólo admite una solución, ya sea porque las leyes de la química no permiten más, o porque la especie no ha tenido oportunidad de encontrar otras, o incluso porque habiendo varias no hay diferencia de calidad entre ellas, entonces la solución del problema no es optimizable, y en consecuencia, queda fuera del campo de acción de la selección natural. La segunda condición es que las soluciones más optimizadas sean físicamente posibles y alcanzables. Y finalmente, la tercera es que se han de dar las condiciones específicas necesarias de la selección natural (variación aleatoria en la descendencia, diferencia de calidad entre ellas, y competencia entre las unidades reproductoras) para que pueda funcionar el algoritmo [197,199,202,238].

La selección natural puede conducir a situaciones de callejón sin salida en una línea filogenética, produciendo una especialización del metabolismo basada en un conjunto determinado de condiciones ambientales, o soportables bajo esas condiciones; entonces, si cambian esas condiciones, por motivos ambientales, o por el desarrollo posterior de una ruta metabólica (por ejemplo, lo que ocurrió con la síntesis de urea), las especies de esa rama pueden quedar atrapadas en un problema sin solución. Así ha ocurrido con la Rubisco en la fotosíntesis que se ha ido intoxicando con el aumento progresivo de oxígeno y la escasez consiguiente de CO₂ en la atmósfera. Puede ocurrir que el problema se agrave llegando a condiciones extremas en que la única solución sea la extinción de esa rama evolutiva, con el predominio de otras donde el metabolismo se haya desarrollado de otra forma y no se haya producido ese problema. Por tanto, la selección natural funciona, pero el algoritmo también incluye la extinción de las ramas donde la optimización es necesaria cuando se endurecen las condiciones, y sin embargo no es posible.

Por lo que respecta al problema específico de la glicina, debemos considerar dos etapas: primero la aparición de este punto débil en el diseño del metabolismo, y luego su recrudescimiento al producirse la gran necesidad de glicina que ha originado su escasez y en consecuencia, su grave carencia.

Aparición del problema—El código genético y el origen de la vida

Es evidente que tanto la unidad C₁ como la glicina fueron productos útiles que existieron desde el origen de la vida, puesto que los dos participan en la síntesis de bases púricas, que es un material necesario para la síntesis de ácidos nucleicos. Por tanto, la reacción de la enzima serina hidroximetil transferasa y sus coenzimas tuvieron que existir antes de la ruta de síntesis de bases púricas. Es interesante observar que el THF, la coenzima que recoge la unidad C₁ en la síntesis de glicina, es la misma que la transfiere en la síntesis de bases púricas.

Con la glicina, los primeros aminoácidos que tuvieron que existir son los que participan en la síntesis de purinas y pirimidinas: serina (como fuente de glicina), glutamina, ácido aspártico y ácido glutámico (figura 7.1).

En el código genético (figura 7.7) los aminoácidos que son codificados por cuatro tripletes son obviamente los más primitivos, pues hay consenso en que probablemente el código primitivo funcionó con 16 aminoácidos (o 15, si admitimos un espacio para el codon de terminación, que podría ser UAX, siendo X cualquiera de las cuatro bases). En este código primitivo, los aminoácidos serían codificados sólo por las dos primeras bases, quedando la tercera inoperante, pues los anticodones de los tRNA primitivos podrían estar más sometidos a la ambigüedad de la tercera base por efecto de un bamboleo aún más intenso que el actual. Los más probables en este código podrían ser: CUX, leucina; AUX, isoleucina; GUX, valina; UCX, serina; CCX, prolina; ACX, treonina; GCX, alanina; CGX, arginina; y GGX, glicina, y a ellos habría que añadir: CA-Pur, glutamina; GA-Pir, ácido aspártico; y GA-Pur, ácido glutámico. Estos podrían ser los tripletes (en su mayoría, *dobletes*) primitivos, y los aminoácidos respectivos que fueron operativos en el origen del código genético. Tres de ellos (leucina, serina y arginina) tienen seis tripletes en el código actual. Hay muchas otras conclusiones que se pueden deducir del estudio del código genético en este sentido, pero ahora sólo nos interesa destacar que tanto la glicina como la serina (su fuente metabólica) están en esta lista del código primitivo, lo que demuestra que el desarrollo del metabolismo ha ido a la par que el uso de sus productos para fabricar materiales. La prolina (el segundo aminoácido más abundante en el colágeno) también está en la lista de los aminoácidos primitivos. La tirosina, cisteína y metionina, aminoácidos que se incorporarían más tarde, son los que están presentes en menor cantidad; el triptófano, el último en incorporarse a la lista (sólo codificado con un triplete) es el menos abundante en todas las proteínas, y no está en el colágeno.

Agravamiento del problema—Aparición del colágeno

El problema de diseño metabólico que provoca la escasez de glicina probablemente no apareció al principio, con la síntesis de purinas y de timina, pues, como ya hemos visto, las rutas que gastan unidades C_1 son fuentes de glicina. En este punto, con la síntesis de bases nitrogenadas sobra glicina, y esa descompensación en la distribución de los carbonos se resuelve con la reacción de la glicina deshidrogenasa descarboxilante, que convierte el exceso de glicina en más unidades C_1 , ahorrando serina.

Pero tras esa primera función de la glicina y de la unidad C_1 , el oportunismo —una de las propiedades más importantes de la evolución, según hemos destacado también en el capítulo 4— le fue encontrando muchas otras utilidades a ambos productos. Al principio, en los organismos unicelulares, el único gasto importante de glicina fue la fabricación de las porfirinas, y en especial, para los citocromos, pero como la fabricación de ácidos nucleicos es una buena fuente de glicina, probablemente en esa etapa las dos rutas estuvieron compensadas, de

acuerdo con los cálculos que hemos expuesto arriba, y probablemente con predominio del uso de unidades C₁, sobrando glicina. Es importante insistir en que mientras que en el metabolismo haya una mayor necesidad de unidades C₁ que de glicina, no aparece el problema de diseño que estamos comentando, ya que esta proporción puede ajustarse, pues siempre es posible convertir la glicina sobrante en unidades C₁.

		Segunda letra				
		U	C	A	G	
Primera letra	U	UUU	UCU	UAU	UGU	U
		UUC	UCC	UAC	UGC	C
		UUA	UCA	UAA	UGA	A
		UUG	UCG	UAG	UGG	G
	C	CUU	CCU	CAU	CGU	U
		CUC	CCC	CAC	CGC	C
		CUA	CCA	CAA	CGA	A
		CUG	CCG	CAG	CGG	G
	A	AUU	ACU	AAU	AGU	U
		AUC	ACC	AAC	AGC	C
		AUA	ACA	AAA	AGA	A
		AUG	ACG	AAG	AGG	G
G	GUU	GCU	GAU	GGU	U	
	GUC	GCC	GAC	GGC	C	
	GUA	GCA	GAA	GGA	A	
	GUG	GCG	GAG	GGG	G	
						Tercera letra

Figura 7.7. El código genético. * AUG es también codon de iniciación de la cadena

El problema aparece cuando surge una mayor necesidad de glicina que de unidades C₁, y esto ocurre cuando aparece la síntesis de colágeno, es decir, con la aparición de los animales (*Metazoa*).

El colágeno es la proteína que ha permitido la vida multicelular para construir la rama filogenética de los animales. Al ser una proteína extracelular, los fibroblastos, condrocitos y osteoblastos pueden fabricarla sin limitación de espacio, constituyendo el material básico de la matriz extracelular, que es responsable de la unión de células para formar tejidos compactos o 'sólidos', y, por tanto, ha sido el material clave para el desarrollo de los *Metazoa* (*Animalia*), y así podemos decir que, en realidad, la historia del colágeno es la historia de los animales. El colágeno es una de las proteínas más antiguas. Su aparición se remonta a la

explosión del Cámbrico [239], que es el episodio donde se sitúa la aparición de los Metazoos [240]. El colágeno se encuentra ya en los primeros invertebrados, desde las esponjas, cuyo endoesqueleto (las espículas) está formado por un colágeno primitivo denominado *espongina* [241]. A partir de ahí se han ido produciendo muchos tipos diferentes de colágeno, según hemos explicado en el capítulo 1. La evolución del colágeno se puede seguir a través de la evolución de todos los Metazoos: en los invertebrados [242] y en los cordados [243].

El colágeno, como soporte principal de la estructura mecánica del cuerpo (huesos, cartílagos y tendones), ha permitido el crecimiento grande de los animales, y, en especial, de los terrestres y aéreos. Por motivos físicos obvios, el sistema mecánico —y, en particular, el esqueleto—, aumenta de tamaño en mayor proporción que las dimensiones corporales: en el hombre representa el 33% de las proteínas totales (6% de la masa corporal), y en los mamíferos grandes llega a ser el 40% (7·2% de la masa corporal) [tabla 7.1]. Un elefante de 4.000 kg de masa corporal tiene 640 kg de masa ósea, que contiene 112 kg de colágeno, siendo la cantidad total de colágeno en el cuerpo 288 kg (7·2% de su masa corporal); esto significan 83·2 kg de glicina, y se necesita un aporte de aproximadamente 1 kg de glicina diaria para su renovación.

Tabla 7.1. Gasto diario de glicina que deben hacer diversos animales de tamaño diferente, de acuerdo con su masa ósea.

	Masa corporal	Masa ósea	Colágeno óseo	Colágeno Total	Glicina total*	Gasto diario de glicina
Ratón	30 g	1'68 g (5'6%)	462 mg	1'5 g	433 mg	5'41 mg
Rata	200 g	11'6 g (5'8 %)	3'2 g	11 g	3'18 g	40 mg
Gato	3'5 kg	245 g (7%)	67'3 g	192 g	55'5 g	693 mg
Perro	40 kg	3'6 kg (9%)	990 g	2'4 kg	694 g	8'67 g
Hombre	70 kg	8'4 kg (12%)	2'30 kg	4'2 kg	1'21 kg	15 g
Elefante	4.000 kg	640 kg (16'0%)	112 kg	288 kg	83'2 kg	1'04 kg
Tiranosaurio	6.000 g	1.050 kg (17'5%)	288 kg	432 kg	125 kg	1'56 kg
Diplodocus	15.000 g	2.700 kg (18'0%)	742 kg	1.080 kg	312 kg	3'90 kg

El colágeno ha permitido el desarrollo de vertebrados grandes (peces, reptiles y mamíferos), pues tiene unas propiedades físicas excepcionales: es un material extremadamente fuerte, ligero y resistente, ideal para la estructura del conjuntivo, cartílago y hueso (como soporte de

la calcificación mineral), lo que permitió el desarrollo de animales grandes sin hacerlos demasiado pesados, pues el esqueleto es sólo una pequeña fracción de su masa total: menos del 6% en un vertebrado pequeño de 30 gramos, como un ratón, o un lagarto pequeño; 7% en un gato de 3'5 kg; 9% en un perro de 40 kg; 12% en una mujer de 70 kg; 14'5% en un hombre de 90 kg; y no más del 18% en un elefante de 4.000 kg, o en cualquier otro animal mayor, pero nunca llega a ser superior al 18% (figura 7.8).

El aumento de tamaño de los animales tiene obvias ventajas selectivas, pues un animal grande es más poderoso, puede conquistar nuevos nichos, y tienen menos depredadores, o ninguno, y esos grandes tamaños sólo han sido posibles en los vertebrados, y gracias al desarrollo del esqueleto, cuyo responsable, en definitiva es el colágeno.

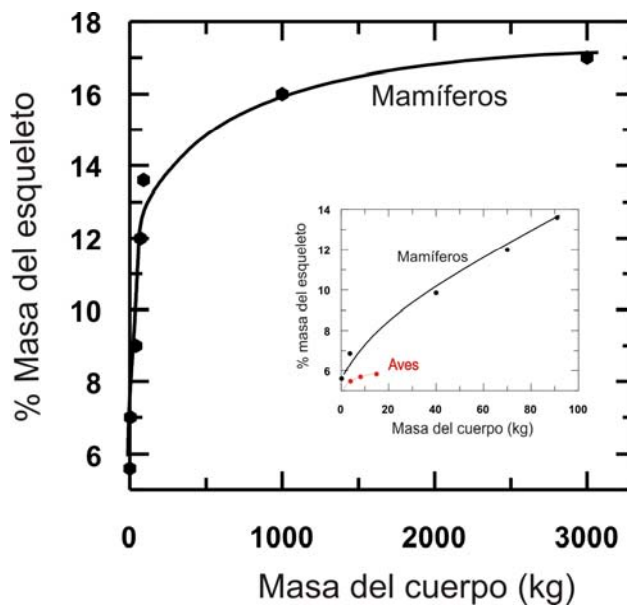


Figura 7.8. Relación entre la masa del cuerpo y la masa del esqueleto óseo en mamíferos y aves. La gráfica pequeña insertada muestra los detalles de la primera fase de la curva. La masa del esqueleto óseo es significativamente mucho menor en las aves.

Sin embargo, ese crecimiento ha sido también la causa principal que ha originado el punto débil del metabolismo de la glicina que estamos presentando en esta Tesis. Admitiendo que la velocidad de recambio (*turnover*) del colágeno sea la misma en todos los animales, un ratón necesita un aporte diario de 5'41 mg de glicina, un gato 693 mg, un perro 8'67 g, un hombre 15 g, un elefante algo más de 1 kg, y un gran dinosaurio necesitaba 4 kg. Como el metabolismo no puede hacerse cargo de esta producción, según hemos visto, la correcta renovación del colágeno queda a expensas de la dieta. En principio, el problema puede no ser grave en los animales carnívoros, ya que pueden disponer de una buena fuente de glicina en la dieta, siempre que se garantice la total digestión del colágeno, que ya hemos visto que no

es fácil. El problema es, por supuesto, mucho más grave en los animales herbívoros no rumiantes, pues las plantas no son una buena fuente de glicina. La consecuencia es que, en condiciones de escasez de glicina, el recambio del colágeno tiene que hacerse más lento agravándose el envejecimiento del material, y con ello, aumenta la propensión a enfermedades degenerativas del hueso y del cartílago.

Así, con el aumento de tamaño corporal, han ido creciendo los problemas degenerativos del cartílago y de los huesos, pues a la necesidad de tener que soportar grandes pesos se añade la necesidad aumentada de glicina, ya que al aumentar el volumen, y la masa total del cuerpo, el porcentaje de la estructura de soporte ha de aumentar en mayor proporción. El desarrollo evolutivo de los vertebrados fue creando y agravando el problema, que finalmente se hizo crítico con la aparición de los vertebrados de gran tamaño (como los dinosaurios y los proboscídeos). El problema es también menos grave en los vertebrados acuáticos pues dentro del agua, el sistema mecánico tiene que soportar menos peso, y eso puede explicar la tendencia de que muchos animales grandes sean o hayan sido acuáticos, incluidos (aparte, por supuesto, de los cetáceos y los grandes reptiles acuáticos), muchos dinosaurios grandes, como los estegosaurios y los diplodocus, y mamíferos grandes como los hipopótamos.

En cualquier caso, la consecuencia dramática de este proceso es la aparición de la artrosis, que es la única enfermedad degenerativa que existe en la selva. En efecto, hay pruebas documentales que demuestran que esta enfermedad apareció mucho antes de la civilización, pues, se ha descrito incluso en fósiles de dinosaurios que vivieron hace entre 150 y 100 millones de años [45,46,244,245].

Los cambios de alimentación a que ha estado sometida la especie humana desde que empezó la civilización confirman la relación que existe entre el desarrollo de la artrosis y la dieta. En efecto, la artrosis es una enfermedad común que se puede detectar en los fósiles humanos primitivos. Por ejemplo, en los restos de los yacimientos de Atapuerca [50]. Es evidente que el correcto mantenimiento de la estructura mecánica del cuerpo en el hombre depende del colágeno de la dieta, y de su digestión completa, y así, la transición a la alimentación vegetal, como consecuencia del desarrollo de la agricultura trajo consigo una disminución de la principal fuente de glicina.

Reptiles y aves

Las aves son un caso especial en cuanto al peso. Su esqueleto es muy ligero y no sobrepasa el 5% de la masa corporal, que es menor que la de las plumas; el peso máximo de las grandes aves voladoras actuales no pasa de 15 kg, de los cuales sólo el 5% (700 g) es esqueleto. Esto significa una necesidad menor de glicina, lo cual es también probablemente una ventaja selectiva. Lo cierto es que no ha habido extinciones importantes de grupos de aves, como sí las ha habido de mamíferos y de reptiles.

Desde hace varios años, algunos autores habían advertido que en ciertas situaciones fisiológicas podría producirse una necesidad especial de glicina, llegando incluso a sugerir (sólo basándose en datos empíricos) que la glicina debería añadirse a la lista de los esenciales [221]. Siguiendo en esta línea, algunos autores han pensado que la necesidad especial de glicina podría ser mucho mayor en las aves, ya que al canalizar la excreción del nitrógeno por la vía del ácido úrico tendrían una mayor demanda de glicina para fabricarlo, y se ha sugerido la conveniencia de añadir glicina a los piensos de los pollos, como suplemento nutricional. Sin embargo, el análisis matemático de la estequiometría del proceso presentado arriba demuestra justamente lo contrario: la síntesis de ácido úrico es una fuente neta de glicina que queda disponible para fabricar el colágeno. Por tanto, a pesar de que las aves gastan más glicina que los mamíferos, el problema de la escasez de glicina en ellas es mucho menos grave, si es que existe.

Otro tanto ocurre con los reptiles, que también fabrican ácido úrico como vía de excreción de nitrógeno. Por tanto, el problema de la escasez de glicina debería ser menos grave también en este grupo. No nos olvidemos, sin embargo, que lo que conocemos como Reptiles es en realidad un grupo polifilético que engloba tres grupos claramente diferentes y sin relación filogenética directa entre ellos: arcosaurios (cocodrilos, dinosaurios y otros reptiles fósiles), Quelonios (tortugas) y Saurios (lagartos y serpientes). Las tortugas excretan urea, mientras que los saurios y los cocodrilos excretan ácido úrico igual que las aves, y también en ellos el problema de la escasez de glicina será menor. De todas formas, el problema siempre se agrava en los animales grandes, donde el esqueleto representa un porcentaje mucho mayor de la masa total, y donde, en consecuencia, las necesidades de glicina son mucho mayores. Por tanto, con independencia del grupo filogenético de vertebrados, la escasez de glicina siempre será más acusada en los animales grandes. En efecto, ese tipo de animales siempre ha estado más expuesto a extinciones masivas, y la artrosis se ha encontrado también en fósiles de dinosaurios grandes [45,46,244,245].

Artrópodos

En los insectos —y en general, en los artrópodos— no tiene por qué ocurrir este problema por dos motivos: porque nunca han alcanzado gran tamaño, y —más importante— porque su esqueleto no está basado en el colágeno, sino en la quitina, un polímero derivado de la glucosamina. Al contrario de lo que ocurre con la glicina, en el metabolismo no hay, en principio, ningún problema para fabricar glucosamina, ni sus derivados. La síntesis de N-acetilglucosamina (monómero de la quitina) es una ruta lineal que parte de la fructosa 6-P de la glicolisis, como un punto de bifurcación, con la intervención de glutamina y acetyl-CoA. Finalmente, el polímero de quitina se fabrica incorporando monómeros de N-acetilglucosamina que se activan con UTP, para dar el monómero precursor UDP-N-acetil-

glucosamina, y en esa ruta no hay ningún paso que pueda constituir un punto débil similar al de la síntesis de glicina (figura 7.9).

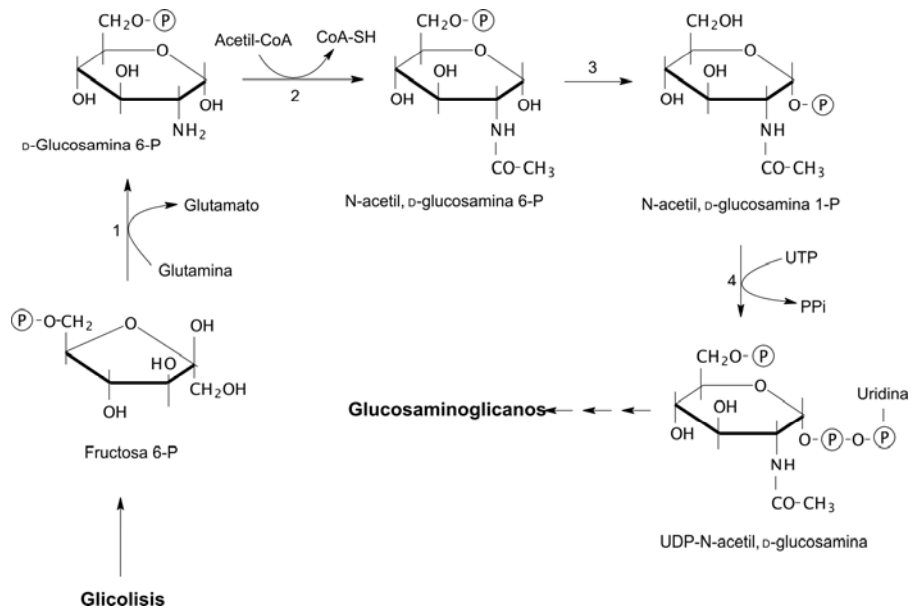
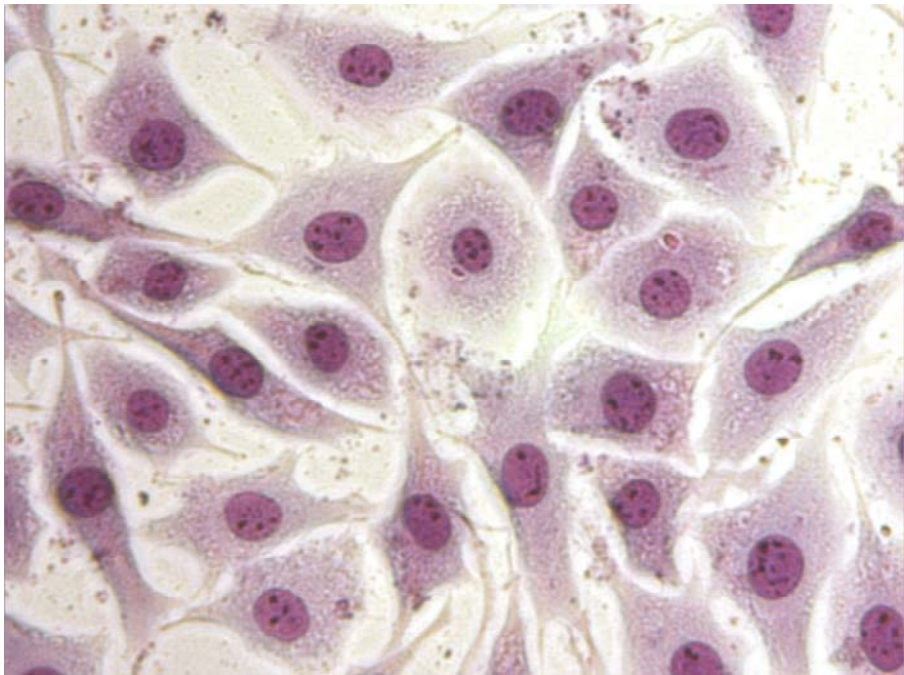


Figura 7.9. Ruta de biosíntesis de glucosamina, precursor de los glucosaminoglicanos. Es una ruta lineal, sin problemas topológicos de diseño, que comienza con la fructosa 6-P, intermediario de la glicolisis. Enzimas: 1, transaminasa; 2, acetiltransferasa; 3, mutasa; 4, UDP-pirofosforilasa.

Estudio experimental



Capítulo 8

Material y Métodos

8.1. Disoluciones y medios generales de trabajo

A lo largo de este capítulo detallamos la composición de todas las disoluciones empleadas en nuestros experimentos. En los apéndices II y III se incluye una lista completa de todos los productos químicos utilizados, con su marca y referencia comerciales, así como los aparatos y el instrumental empleados en esta investigación.

8.1.1. Disoluciones generales de trabajo

Agua. El agua es el reactivo más importante de cualquier laboratorio de Química y es fundamental el control riguroso de su calidad, ya que es la materia prima con la que se elaboran todas las disoluciones, pero en un laboratorio de Bioquímica la calidad del agua debe ser primordial, debido a que siempre se trabaja con mezclas acuosas muy complejas y muy diluidas. En Bioquímica, más que en ninguna otra disciplina, la calidad del agua es la principal condición para que los experimentos salgan bien y los resultados sean reproducibles.

La calidad del agua se evalúa midiendo su resistividad (ohmios/cm) o bien su conductividad (siemens/cm), que dependen de la ausencia o presencia de compuestos que puedan conducir la corriente eléctrica. La resistividad ρ es la resistencia que ofrece el agua para que la corriente pase a su través, mientras que la conductividad σ es justamente lo contrario, siendo $\sigma = 1/\rho$. A una mayor cantidad de contaminantes corresponde una mayor conductividad o, lo que es lo mismo, menor resistividad.

En nuestro laboratorio obtenemos agua de gran calidad sometiendo al agua del grifo a cambios sucesivos de fase mediante un sistema clásico de destilación, aunque mejorando mucho la técnica y dotándola de una serie de accesorios que garantizan su calidad y su economía. El agua corriente llega a nuestro laboratorio con una conductividad de entre 200 y 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$, y contiene distintos tipos de contaminantes que pueden agruparse en sólidos y gases ionizables (CaCO_3 , Cl_2 , CO_2), sólidos y gases no ionizables (compuestos orgánicos, arena, sedimentos, O_2), microorganismos (bacterias, virus, paramecios, etc.) y pirógenos (lipopolisacáridos de la pared de bacterias gram negativas).

Lo primero que hacemos es pasarla por un filtro y por una resina intercambiadora de iones para eliminar las sales de calcio. Esto es importante no sólo como primer paso para limpiar el agua que utilizamos en el laboratorio, sino también para evitar depósitos calcáreos en los circuitos de refrigeración. El filtro se cambia cada tres o cuatro meses, dependiendo de la cantidad de agua que se gaste. A continuación, el agua descalcificada se desmineraliza por ósmosis inversa, y seguidamente se somete a la destilación en aparatos de vidrio, en un proceso de dos etapas.

La primera etapa consiste en una destilación simple y rápida de flujo continuo, en la que no sólo las altas temperaturas y los cambios de fase contribuyen a eliminar contaminantes del agua, sino también la adición de permanganato potásico (K_2MnO_4) en el agua en ebullición. Este potentísimo oxidante reacciona con los compuestos orgánicos precipitándolos, de forma que evitamos que sean arrastrados por el vapor de agua y contaminen el agua destilada. Así, obtenemos un agua muy purificada con una conductividad inferior a 3 $\mu\text{S}/\text{cm}$. A pesar de esta drástica purificación, esta agua posee aún una elevada conductividad como para que sea válida para preparar disoluciones de trabajo, por eso la utilizamos para lavar el instrumental de laboratorio, para llenar los baños de agitación, la camisa de agua del incubador de CO_2 , el autoclave y para cualquier otro trabajo que no requiera una pureza extrema. Además, es la materia prima para el segundo paso de purificación.

Esta agua volvemos a destilarla, en una segunda fase, para obtener el agua bidestilada de calidad con la que preparamos todas las disoluciones de trabajo, pero esta vez mediante una destilación en circuito cerrado. Se trata de un destilador de vidrio cerrado compuesto por un matraz de seis litros de capacidad y una columna de evaporación de 1 metro de longitud, rellena con canalillos de vidrio con el objetivo de contener muchos platos teóricos. Normalmente se descarta como cabeza el primer litro de agua bidestilada que suele alcanzar una conductividad de entre 2 y 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$, lo que demuestra el buen funcionamiento de la destilación fraccionada. El agua bidestilada que se recoge a continuación tiene una conductividad igual o inferior a 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Esta agua bidestilada, de un grado extremo de pureza, es la que utilizamos para preparar todas las disoluciones: medios de cultivo, disoluciones salinas, disolución de antibióticos, disolución de tripsina, disoluciones amortiguadoras del pH, etc.

El agua bidestilada se conserva en un recipiente de vidrio transparente de 25 litros de capacidad perfectamente cerrado y se va renovando a medida que se gasta. Es importante hacer chequeos de la calidad del agua almacenada con el conductímetro cada dos semanas como máximo, así como comprobar que está siempre transparente, especialmente el conducto del grifo de vidrio. Asimismo, todas las conducciones de los destiladores, especialmente las mangueras de silicona, se someten a revisiones, lavados y recambios para evitar que crezcan algas y hongos.

La comparación de estos resultados con los métodos más modernos que invaden hoy el mercado nos demuestra que la conductividad de nuestra agua destilada ($3 \mu\text{S}/\text{cm}$) es mucho menor que la de los sistemas de ósmosis inversa ($8 \mu\text{S}/\text{cm}$), y que la del agua pura –bidestilada– producida en nuestro laboratorio ($< 0.8 \mu\text{S}/\text{cm}$) es también menor que la de los sistemas de filtrado MilliQ ($1-3 \mu\text{S}/\text{cm}$, dependiendo de si los cartuchos se han renovado recientemente o están ya en los últimos días de uso). En suma, concluimos que con los sistemas más modernos puede haberse ganado en comodidad, pues permiten la producción de grandes volúmenes de agua en periodos relativamente cortos de tiempo, pero no en calidad ni en economía.

El inconveniente que se le atribuye a los sistemas de destilación es que gastan una gran cantidad de agua para la refrigeración. En efecto, este es un gasto que no se puede permitir hoy en día en ningún sitio, independientemente del precio del agua, y menos un laboratorio situado en Canarias. Para solucionar este problema, en nuestro laboratorio hemos instalado un sistema de reciclaje del agua de refrigeración, con un condensador para disipar el calor, manteniendo el agua de refrigeración a 10°C . El sistema está conectado independientemente a los destiladores, que están en serie, así como a la máquina de fabricación de heladas, que también tiene un sistema de refrigeración por agua, de forma que no la desperdiciamos. El sistema incluye un depósito de cincuenta litros como reservorio de agua de refrigeración, conectado a la calle a través del filtro que elimina la cal, con una alimentación automática con llave de flotador, de forma que únicamente entre el agua que se consume, ya sea para fabricar hielo o para la destilación. Todo el sistema funciona automáticamente, con dos bombas independientes gobernadas por tres termostatos.

Disoluciones de HCl para ajustar el pH. Las disoluciones de HCl de diferente concentración se utilizan para ajustar el pH de las disoluciones, como los medios de cultivo, el PBS, la solución de Hank, etc. Utilizamos disoluciones de diferente concentración para realizar un ajuste del pH lo más fino posible. En la tabla 8.1 se resumen las disoluciones utilizadas con este fin. Para preparar 100 mL de una disolución de HCl se disuelve el volumen especificado en la tabla 8.1 de HCl comercial (35%, $\rho = 1.185 \text{ g/L}$, $\text{PM} = 36.47$) en un matraz aforado y se enrasa hasta 100 mL con agua bidestilada. Estas disoluciones se renuevan mensualmente y se mantienen a temperatura ambiente en frascos de vidrio topacio.

Tabla 8.1. Preparación de las disoluciones de HCl utilizadas para ajustar el pH. Para preparar 100 mL se disuelve el volumen adecuado de HCl comercial (35%, $\rho = 1'185$ g/L, PM = 36'47) en agua bidestilada y se ajusta el volumen hasta 100 mL en un matraz aforado. Las disoluciones se almacenan en un frasco de vidrio topacio a temperatura ambiente durante aproximadamente un mes.

Disolución de HCl	Volumen de HCl comercial (mL)
6 N	52'8
1 N	8'8
0'5 N	4'4
0'25 N	2'2
0'1 N	0'88

Disoluciones de NaOH para ajustar el pH. Se utilizan para ajustar el pH de diferentes disoluciones, como el buffer de TRIS (TBS 10x). Al igual que las disoluciones de HCl, se preparan disoluciones de diferente concentración para realizar un ajuste del pH lo más fino posible. Para preparar 100 mL se disuelve la masa de NaOH (PM = 40) indicada en la tabla 8.2 en 80 mL de agua bidestilada en un vaso de precipitados con una agitador magnético, y luego se enrasa con agua bidestilada hasta 100 mL en un matraz aforado. Al igual que las disoluciones de HCl, éstas se conservan bien a temperatura ambiente en frascos de vidrio topacio (siempre con tapón de rosca de plástico, pues el NaOH ataca al vidrio esmerilado) durante aproximadamente un mes.

Tabla 8.2. Preparación de las disoluciones de NaOH para ajustar el pH. Normalmente se preparan 100 mL de cada una de estas disoluciones disolviendo la masa de NaOH (PM = 40) indicada en 80 mL de agua bidestilada y enrasando luego hasta 100 mL en un matraz aforado.

Disolución de NaOH	Masa (g)
6 N	24
1 N	4
0'5 N	2
0'25 N	1
0'05 N	0'2

8.1.2. Disoluciones empleadas en el cultivo de células

Alcohol 70% (v/v). Se utiliza para esterilizar la superficie de trabajo en la cabina de flujo laminar, las manos del operador que trabajará en la cabina, y cualquier objeto que vaya a ser

introducido en ella; también se emplea para esterilizar la superficie ventral de los ratones antes de proceder a su disección.

Antibióticos. Los antibióticos que hemos utilizado para evitar la contaminación en los cultivos primarios de fibroblastos y de condrocitos son la penicilina-G y la estreptomina, pues la combinación de ambos cubre un amplio espectro de microorganismos contaminantes. La concentración de penicilina en los medios de cultivo es de 100 U/mL y la de estreptomina de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Generalmente se prepara una disolución *stock* de 25.000 U/mL de penicilina y 25.000 μg de estreptomina, a partir de la cual se obtienen alícuotas de 1 mL que se mantienen congeladas hasta el momento de su adición al medio de cultivo.

Para la preparación de la disolución *stock* de antibióticos se disuelven 1'5 g de penicilina-G (SIGMA, 1663 U/mg) y 2'5 g de estreptomina sulfato (Fluka) en 90 mL de agua bidestilada (tabla 8.3). Tras ajustar el volumen a 100 mL en un matraz aforado, se preparan alícuotas de 1 mL en tubos de microcentrífuga autoclavados, esterilizando la disolución mediante filtración con jeringa y prefiltro de 0'22 μm (Millipore, Durapore PVDF Membrane) en la cabina de flujo laminar. Estos viales se almacenan a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su adición al medio de cultivo.

Tabla 8.3. Preparación de la disolución *stock* de los antibióticos penicilina y estreptomina utilizada para evitar la contaminación microbiana en cultivos primarios. Una vez preparada la disolución *stock* de antibióticos se preparan alícuotas de 1 mL que se mantienen congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su adición al medio de cultivo o al PBS.

Producto	Concentración inicial	Concentración <i>stock</i>	Volumen <i>stock</i> (mL)	Concentración final
Penicilina-G	1.663 U/mg	25.000 U/mL	100	100 U/mL
Estreptomina sulfato	-	25.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Azul Tripán. La tinción con azul Tripán es uno de los principales métodos utilizados para determinar la proporción de células viables que quedan tras un proceso traumático como la disgregación primaria, la tripsinización durante los subcultivos o la congelación-descongelación. El azul Tripán es un colorante coloidal que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en su membrana. De esta forma, las células que tras el tratamiento con azul Tripán se observan de color azul no son viables, mientras que las células viables, impermeables al colorante, se observarán brillantes, refringentes y no coloreadas (figura 8.1).

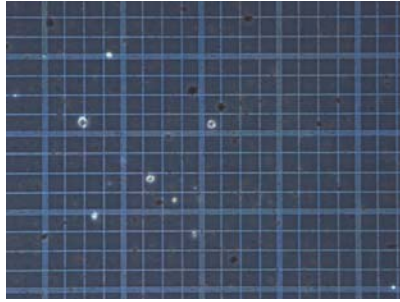


Figura 8.1. Microfotografía (10x) de la cámara del hemocitómetro cargada con células tratadas con azul Tripán. Las células viables son incolores y brillantes, mientras que las células no viables en las que ha penetrado el colorante se observan de color azul.

Para preparar la disolución del colorante se disuelven 0'4 g de azul Tripán, 0'81 g de cloruro sódico y 0'66 g de fosfato potásico monobásico (KH_2PO_4) en unos 95 mL de agua bidestilada. Esta disolución se calienta hasta ebullición y, tras atemperar y ajustar el pH a 7'2-7'3 con NaOH 1 N, se ajusta el volumen a 100 mL con agua bidestilada en un matraz aforado. Por último se disuelven 0'05 g de 4-hidroximetilbenzoato, como conservante, y se preparan alícuotas de 100 μL que se mantienen congeladas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta el momento de su utilización.

Medio DME (DMEM, del inglés *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*).

El DMEM es un medio rico, con una alta concentración de aminoácidos y vitaminas (tabla 8.4), desarrollado por Dulbecco para el crecimiento de fibroblastos de ratón en sus estudios de transformación y propagación de virus [246], a partir del BME (del inglés, *Eagle's Basal Medium*). Contiene el doble de concentración de aminoácidos que el MEM (del inglés, *Eagle's Minimal Essential Medium*), cuatro veces la concentración de vitaminas de éste, y necesita el doble de HCO_3^- y CO_2 para alcanzar una mejor estabilización del pH.

En nuestro caso, utilizamos el DMEM en polvo, comercializado por la compañía GIBCO, con 1 mg/mL de D-glucosa, L-glutamina, 110 mg/L de piruvato sódico, pero sin bicarbonato sódico. Para preparar un litro de medio DMEM se disuelven 9'986 g del medio en polvo en aproximadamente 900 mL de agua bidestilada, en un vaso de precipitados con un agitador magnético a temperatura ambiente ($\sim 20\text{-}22\text{ }^\circ\text{C}$). A continuación, se añaden 3'7 g de bicarbonato sódico y, mientras se agita, se ajusta el pH a 0'1-0'3 unidades por debajo del pH deseado, es decir, a pH 7'2, añadiendo gotitas de HCl primero 1 N y posteriormente 0'5 N. Se enrasa en un matraz aforado de un litro con agua bidestilada e, inmediatamente, se esteriliza mediante filtración utilizando una membrana con una porosidad de 0'2 μm en la cabina de flujo laminar, repartiéndolo asépticamente en botellas estériles.

El medio se puede almacenar refrigerado (2-6 °C) en la oscuridad durante unas tres semanas. En el momento de su utilización, se le añade una alícuota de suero bovino fetal y una alícuota de antibióticos según hemos explicado arriba.

Tabla 8.4. Comparación entre la composición del MEM y el DMEM.

Componentes	MEM	DMEM
L- Arginina	0'6 mM	0'4 mM
L-Cisteína	0'1 mM	0'2 mM
L-Glutamina	2 mM	4 mM
Glicina	-	0'4 mM
L-Histidina	0'2 mM	0'2 mM
L-Isoleucina	0'4 mM	0'8 mM
L-Leucina	0'4 mM	0'8 mM
L-Lisina · HCl	0'4 mM	0'8 mM
L-Metionina	0'1 mM	0'2 mM
L-Fenilalanina	0'2 mM	0'4 mM
L-Serina	-	0'4 mM
L-Treonina	0'4 mM	0'8 mM
L-Triptófano	0'049 mM	0'078 mM
L-Tirosina	0'2 mM	0'4 mM
L-Valina	0'4 mM	0'8 mM
Colina cloruro	0'0071 mM	0'029 mM
Ácido fólico	0'0023 mM	0'0091 mM
Mio-inositol	0'011 mM	0'04 mM
Nicotinamida	0'0082 mM	0'033 mM
D-Ca pantotenato	0'0042 mM	0'017 mM
Piridoxal · HCl	0'0049 mM	0'02 mM
Riboflavina	0'00027 mM	0'0011 mM
Tiamina	0'003 mM	0'012 mM
CaCl ₂	1'8 mM	1'8 mM
KCl	5'3 mM	5'3 mM
MgSO ₄	0'81 mM	0'81 mM
NaCl	120 mM	110 mM
NaHCO ₃	26 mM	44 mM
NaH ₂ PO ₄	1 mM	0'91 mM
Fe (NO ₃) ₃ · 9H ₂ O	-	2'5 E-04 mM
D-glucosa	5'6 mM	25 mM
Piruvato sódico	-	1 mM
Ácido linoleico	-	3 E-04 mM
Rojo fenol	0'027 mM	0'04 mM

Medio Ham F12. El medio Ham F12 es un medio rico que se desarrolló inicialmente para permitir el crecimiento de varios clones de células CHO (*Chinese Hamster Ovary*), así como clones de HeLa y células L de ratón [247]. Este medio se ha utilizado para el cultivo primario de hepatocitos de rata y para células epiteliales de próstata de rata, así como para el cultivo y proliferación de condrocitos bovinos [217,248-251].

Tabla 8.5. Composición del medio Ham F12 comercial (Sigma). Para la preparación de 1 L de medio se disuelven 10'6 g de medio comercial y 1'18 g de bicarbonato sódico en un 80-90% del volumen final; se ajusta el pH a 7'2 con HCl 1 N y 0'5 N; se enrasa hasta 1 L y se dispensa asépticamente en botellas estériles. Puede mantenerse unas tres semanas conservado a 4 °C.

Componentes	Masa (mg / L)
Cloruro cálcico (anhidro)	33'3
Sulfato cúprico · 5H ₂ O	0'0025
Sulfato ferroso · 7H ₂ O	0'834
Cloruro de magnesio (anhidro)	57'6
Cloruro de potasio	224
Cloruro sódico	7599
Fosfato sódico dibásico (anhidro)	142'04
Sulfato de zinc · 7H ₂ O	0'863
L-Alanina	9
L-Arginina · HCl	211
L-Asparagina · H ₂ O	15'01
Ácido L-Aspártico	13'3
L-Cisteína · HCl · H ₂ O	35
Ácido L-Glutámico	14'7
L-Glutamina	146
Glicina	7'51
L-Histidina · HCl · H ₂ O	20'96
L-Isoleucina	3'94
L-Leucina	13'1
L-Lisina · HCl	36'5
L-Metionina	4'48
L-Fenilalanina	4'96
L-Prolina	34'5
L-Serina	10'5
L-Treonina	11'9
L-Triptófano	2'04
L-Tirosina 2Na · 2H ₂ O	7'78
L-Valina	11'7
L-Biotina	0'0073
Colina cloruro	13'96
Ácido fólico	1'32
Mio-inositol	18
Niacinamida	0'037
Ácido D-Pantoténico	0'48
Piridoxina · HCl	0'062
Riboflavina	0'038
Tiamina · HCl	0'34
Vitamina B12	1'36
D-Glucosa	1802
Hipoxantina	4'08
Ácido linoleico	0'084
Rojo fenol · Na	1'3
Ácido pirúvico · Na	110
Putrescina dihidrocloruro	0'161
Ácido tióctico	0'21
Timidina	0'73

El medio comercial (Sigma) se adquiere en polvo con L-glutamina, pero sin bicarbonato sódico (tabla 8.5). Para preparar un litro de medio Ham F12 se pesan 10'6 g de medio comercial y se añaden en un vaso de precipitados de un litro, al que se han adicionado entre 800 y 900 mL de agua bidestilada a temperatura ambiente. Dado que el medio no contiene bicarbonato sódico, deben añadirse 1'18 g. Mientras se mantiene la disolución en agitación, ajustamos el pH a 7'2 con HCl y posteriormente enrasamos con agua bidestilada hasta un litro. A continuación, en condiciones asépticas, filtramos la solución salina a través de filtros de 0'2 μm pasándola a botellas estériles en la cabina de flujo laminar. Las botellas se almacenan a 4 °C correctamente rotuladas con la fecha de preparación. La solución puede mantenerse viable durante aproximadamente tres semanas. En el momento de su utilización añadimos los antibióticos y el suero bovino fetal.

Solución de Dulbecco o PBS (del inglés *Phosphate Buffered Saline*). El PBS es una disolución salina compuesta por sales orgánicas, que puede incluir bicarbonato sódico y, en algunos casos, glucosa. Las disoluciones salinas constituyen la base de muchos medios completos y también son utilizadas como diluyente para preparar *stocks* de aminoácidos y vitaminas, como disolución de lavado o de disección y para incubaciones cortas de menos de cuatro horas.

El PBS puede prepararse con Ca^{2+} y Mg^{2+} o sin estos cationes. El primero se conoce como PBS-B, el segundo como PBS-A. El que preparamos en nuestro laboratorio, cuya composición está descrita en la tabla 8.6, es PBS-A (sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}) pues estos cationes podrían interferir en el proceso de subcultivo o tripsinización. Para preparar 1 litro de PBS-A se disuelven secuencialmente 8 g de cloruro sódico, 0'2 g de cloruro potásico, 1'44 g de fosfato bisódico y 0'2 g de fosfato monopotásico (tabla 8.6) en 800 mL de agua bidestilada en un vaso de precipitados con un agitador magnético. El pH debe encontrarse en el intervalo de 7'1 a 7'3, si se esteriliza mediante filtración; mientras que si se esteriliza en autoclave debe ajustarse a 7'6. En nuestro caso, siempre esterilizamos mediante filtración y ajustamos el pH a 7'2, mientras mantenemos la disolución en agitación. Para ello utilizamos en primer lugar HCl 1 N y, a continuación, HCl 0'5 N para el ajuste fino. Posteriormente, enrasamos a 1.000 mL en un matraz aforado y filtramos a través de filtros de 0'2 μm de diámetro de poro, pasando la disolución a botellas de vidrio pyrex estériles en la cabina de flujo laminar. El PBS, una vez esterilizado, se puede almacenar en el frigorífico durante aproximadamente tres semanas. En el momento de su utilización, se añade 1 mL de la disolución *stock* de antibióticos (ver tabla 8.3).

Tabla 8.6. Composición del PBS-A. En la preparación del PBS-B se añaden, además, 0'1 g de MgCl₂ y 0'1 g de CaCl₂. Cantidades para un volumen total de 1.000 mL.

Producto	PM	% pureza	Moles H ₂ O	PM corregido	Molaridad (mM)	Gramos/litro
NaCl	58'44	99'5	-	58'73	136'2	8
KCl	74'55	99'5	-	74'92	2'67	0'2
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	177'99	99'5	2	214'9	6'7	1'44
KH ₂ PO ₄	136'09	99'5	-	136'8	1'46	0'2

Solución de Hank (HBSS, del inglés *Hank's Balanced Salt Solution*). Se trata de una disolución salina compuesta por sales inorgánicas, bicarbonato sódico y glucosa. La composición detallada de esta disolución salina se expone en la tabla 8.7. Esta disolución se usa para lavar los fragmentos de cartílago después de la disección y para lavar las monocapas de condrocitos cuando se lleva a cabo el cambio de medio.

Tabla 8.7. Composición de la solución salina equilibrada de Hank (HBSS).

Producto	PM	% pureza	Moles H ₂ O	PM corregido	Molaridad (mM)	Masa (g/L)
NaCl	58'44	99'5	-	58'73	136'9	8'04
CaCl ₂	110'99	95	-	116'83	1'3	0'15
KCl	74'55	99'5	-	74'92	5'4	0'40
KH ₂ PO ₄	136'09	99'5	-	136'77	0'4	0'05
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	203'30	100	6	311'30	0'5	0'16
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	246'48	100	7	372'48	0'4	0'15
NaHCO ₃	84'01	100	-	84'01	4'2	0'35
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	177'99	99'5	-	178'88	0'3	0'05
D-glucosa	180'20	100	-	180'20	5'5	0'99
Rojo fenol	354'40	100	-	354'40	-	0'01
HEPES, sal de Na	260'30	99'5	-	261'61	8'0	2'09
Penicilina						0'06
Estreptomina						0'10
Gentamicina						0'05

La solución salina de Hank contiene los tres cationes más abundantes del líquido extracelular: sodio, potasio y calcio. Además, contiene Mg²⁺ y Cl⁻ a la misma concentración que el líquido

extracelular; contiene rojo fenol como indicador de pH y antibióticos para evitar el crecimiento bacteriano.

Para preparar un litro de solución salina de Hank se pesan todos los productos indicados en la tabla 8.7 por separado y se mezclan en un vaso de precipitados de 1.000 mL, al que se han añadido previamente entre 800 y 900 mL de agua bidestilada. El vaso se coloca sobre un agitador magnético y en él se van añadiendo los componentes secuencialmente. Una vez que éstos se hayan disuelto, se ajusta el pH a 7'0 añadiendo gotas de HCl con una pipeta Pasteur, primero 6 N, y luego —a medida que nos acercamos al pH deseado— con HCl 2 N ó 1 N, mientras se mantiene la disolución en agitación. Una vez ajustado el pH, se pasa la disolución a un matraz aforado de un litro con ayuda de un embudo, y se enrasa con agua bidestilada hasta un litro. A continuación, en condiciones asépticas, se filtra la solución salina a través de filtros de 0'2 μm pasándola a botellas estériles en la cabina de flujo laminar. Las botellas se almacenan a 4 °C correctamente rotuladas con la fecha de preparación. La solución puede mantenerse viable durante aproximadamente tres semanas.

Solución de tripsina 0'25%-EDTA 0'02%. Esta disolución se emplea durante la disgregación enzimática de los tejidos o para despegar las células del frasco de cultivo en los pases o subcultivos. Para preparar 100 mL se disuelven 250 mg de tripsina y 20 mg de EDTA en 90 mL de PBS-A en un vaso de precipitados con un agitador magnético. A continuación, se hace pasar la disolución a través de doble papel de filtro. Se ajusta el pH a 7'5 con NaOH 1 N y se enrasa hasta un volumen final de 100 mL en un matraz aforado con PBS-A. Para su esterilización se filtra la disolución a través de membranas de 0'20 μm de diámetro de poro y se divide en alícuotas de 10 mL en tubos Falcon estériles de 15 mL. Las alícuotas se mantienen congeladas a -20 °C hasta el momento de su uso.

Solución de hialuronidasa y pronasa. Esta disolución se emplea para disgregar la matriz extracelular del cartílago durante el aislamiento de los condrocitos. Las concentraciones de enzimas en esta disolución son 2.000 U/mL de hialuronidasa y 30 U/mL de pronasa. Para preparar 15 mL de esta disolución se pesan 0'0113 g de hialuronidasa (Sigma, 2.660 U/mL) y 0'0849 g de pronasa (Fluka, 5'3 U/mg) y se disuelven en 15 mL de solución de Hank. Antes de su utilización se esteriliza utilizando una jeringa y un filtro de 0'22 μm (Millipore, Durapore PVDF Membrane).

Solución de colagenasa. Dado que el colágeno es la proteína más abundante de la matriz extracelular del cartílago, la colagenasa es especialmente interesante para lograr la disgregación de este tejido y el aislamiento de sus células, los condrocitos.

La concentración de colagenasa empleada es de 8 U/mL. Para preparar 15 mL de esta disolución se disuelven 0'4 mg de colagenasa (Collagenase Type IV de *Clostridium histolyticum*, Sigma, 338 U/mg) en 15 mL de medio Ham F12 enriquecido con 10% de suero bovino

fetal y 1% de antibióticos. Una vez disuelta la colagenasa se procede a su esterilización mediante filtración con jeringa y filtro de 0'22 μm (Millipore, Durapore PVDF Membrane).

Solución salina. NaCl 0'85% (p/v) en agua bidestilada. Para preparar 1.000 mL se disuelven 8'5 g de NaCl en 800 mL de agua bidestilada en un vaso de precipitados con un agitador magnético y, posteriormente, se enrasa en un matraz aforado de 1.000 mL. Siempre se tiene un frasco lavador con esta disolución en la cámara fría, a ~ 4 °C. Se utiliza para limpiar la articulación de restos celulares, líquido sinovial, sangre, etc. durante la disección del cartílago.

Suero bovino fetal (FBS, del inglés *Fetal Bovine Serum*). El suero que utilizamos para enriquecer los medios de cultivo es el suero bovino fetal. Generalmente, lo adquirimos congelado en botellas de medio litro y, tras descongelarlo, lo dispensamos en tubos Falcon estériles bajo condiciones asépticas, en la cabina de flujo laminar en alícuotas de 25 mL, que se mantienen congeladas a -20 °C hasta el momento de su utilización. Para cada experimento se utilizan alícuotas del mismo lote de suero.

8.1.3. Disoluciones empleadas en la inmunofluorescencia

Gelatina 0'5% (p/v). Se utiliza para gelatinizar los cubreobjetos de vidrio con los que se realiza la inmunofluorescencia para que las células puedan crecer adheridas sobre ellos. Para preparar 100 mL se disuelven 0'5 g de gelatina granulada en un vaso de precipitados con 80-90 mL de agua bidestilada a unos 40 °C. Una vez disuelta la gelatina se enrasa el volumen a 100 mL en un matraz aforado con agua bidestilada. Seguidamente se pasa la disolución a una botella de vidrio para esterilizarla en el autoclave. Una vez atemperada, la disolución se puede mantener en el frigorífico a 4 °C durante aproximadamente dos semanas.

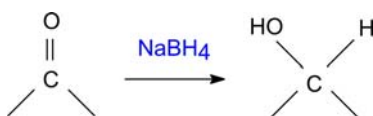
Azida sódica 10% (p/v). Esta disolución se utiliza para preparar la disolución de PBS-azida. La azida sódica retarda el crecimiento bacteriano y se emplea para evitar que las disoluciones se estropeen. Para prepararla se disuelven 10 g de azida sódica en 80 mL de agua bidestilada y se ajusta el volumen hasta 100 mL con agua bidestilada en un matraz aforado. La disolución se conserva indefinidamente a temperatura ambiente.

PBS-azida. Disolución de azida sódica 0'01% en PBS-A, empleada para lavar la capa de células. Para su preparación se añaden 100 μL de la disolución de azida sódica 10% a 100 mL de PBS-A. Esta disolución se conserva bien a temperatura ambiente. Normalmente se prepara cada dos semanas.

Buffer fosfato 2x (buffer fosfato concentrado). Se utiliza para preparar la disolución de fijación. Se prepara disolviendo 7'7 g de NaOH y 33'6 g de NaH_2PO_4 en un litro de agua bidestilada.

Disolución de fijación (paraformaldehído 4%). Esta disolución se utiliza para conservar a las células en su forma original, protegiéndolas de los efectos dañinos que puede ejercer el procesamiento de la técnica sobre las mismas. Para preparar 500 mL de esta disolución se calientan 250 mL de buffer fosfato 2x a 60 °C en un agitador magnético y se añaden 20 g de paraformaldehído, agitando hasta su completa disolución. Una vez disuelto se añaden 250 mL de agua bidestilada y se filtra la disolución con doble papel de filtro. Cuando alcanza la temperatura ambiente se comprueba que el pH está entre 7'0 y 7'4. Generalmente esta disolución se prepara el día antes del experimento y se mantiene a 4 °C —si se prepara el mismo día no hace falta enfriarla—.

Disolución de borohidruro sódico. Se utiliza para eliminar la autofluorescencia debida a la presencia de ciertas sustancias, como flavinas y coenzimas en la muestra. Debe prepararse en el momento de su utilización disolviendo 1 mg de NaBH_4 en 1 mL de PBS-A. El borohidruro sódico es un donador de hidruros muy bueno y, por lo tanto, un excelente agente reductor que convierte aldehídos y cetonas en sus alcoholes correspondientes.



Disolución de permeabilización (Tritón X-100 0'2% en PBS). Esta disolución se utiliza para facilitar el acceso de los anticuerpos al interior de las células. El procedimiento más común es el tratamiento con una disolución de detergente (Tritón X-100, saponina o Tween-20) al 0'1-2%. En nuestro caso empleamos Tritón X-100 al 0'2% en PBS que se prepara disolviendo 200 μL de Tritón X-100 en 100 mL de PBS.

Disolución de bloqueo (BSA 3% en PBS/Tritón X-100 0'1%). Se utiliza para saturar las uniones inespecíficas de los anticuerpos, ya que la albúmina de suero bovino (BSA) compite con el anticuerpo primario por los lugares inespecíficos de unión al tejido y el detergente también reduce las uniones inespecíficas además de permeabilizar el tejido. Para preparar 25 mL se disuelven 750 mg de BSA en 12'5 mL de la disolución de Tritón X-100 0'2%; una vez disueltos se enrasa a 25 mL con PBS-A en un matraz aforado.

Disolución de incubación de los anticuerpos (3% BSA en PBS). Se utiliza como medio de incubación de los anticuerpos. Para preparar 25 mL se disuelven 750 mg de BSA en 20 mL de PBS y se enrasa hasta 25 mL con PBS utilizando un matraz aforado.

8.1.4. Disoluciones empleadas en la cuantificación colorimétrica del colágeno

Reactivo colorante. El colorante rojo Sirio que hemos utilizado es el comercializado por la compañía Biocolor (Sircol Collagen Assay, Biocolor Ltd., Irlanda), que lo suministra disuelto en ácido pícrico y con surfactantes.

Patrón de colágeno. El patrón de colágeno se utiliza para preparar una serie de diluciones que se emplean en la confección de la curva de calibrado. Este patrón es comercializado por la compañía Biocolor. Se trata de una disolución estéril de 1 mg/mL de colágeno de piel bovina en ácido acético 0'5 M.

Reactivo alcalino. Disolución de NaOH 0'5 N utilizada para resuspender el complejo colorante-colágeno. Para preparar 500 mL de esta disolución se diluyen 10 g de NaOH en pastillas en 400 mL de agua bidestilada en un vaso de precipitados con un agitador magnético y se enrasa a 500 mL en un matraz aforado. Esta disolución se puede almacenar a 4 °C durante aproximadamente un mes.

Ácido acético 0'5 M. Esta disolución se utiliza como reactivo blanco en la realización de la curva de calibrado y para preparar las disoluciones del patrón de colágeno. Para preparar 100 mL se disuelven 2'9 mL de ácido acético glacial en un matraz aforado en la campana extractora de gases y se ajusta el volumen a 100 mL con agua bidestilada.

8.1.5. Disoluciones empleadas en la cuantificación de colágeno mediante ELISA

Ácido acético 0'05 M (pH 2'8-3'0 con ácido fórmico). Se utiliza para disolver la pepsina y solubilizar el colágeno existente en la capa de células en cultivo. Para preparar 100 mL se disuelven 299 μ L de ácido acético comercial (98'5%, $\rho = 1'052$ g/mL, PM = 60'05) en un vaso de precipitados que contiene unos 80 mL de agua bidestilada. A continuación, se ajusta el pH a 2'8 con ácido fórmico y se enrasa hasta 100 mL con agua bidestilada. Esta disolución se conserva a 4 °C durante aproximadamente un mes.

Disolución de pepsina. Se emplea para solubilizar el colágeno. Se prepara en el momento de su utilización disolviendo 10 mg de pepsina en 1 mL de ácido acético 0'05 M.

Disolución de elastasa. Se utiliza para monomerizar el colágeno presente en la capa de células en cultivo. Para preparar 1 mL se disuelve 1 mg de elastasa pancreática en 1 mL de TBS 1x.

Buffer TRIS 10x (TBS 10x, del inglés *TRIS-Buffered Saline*). El buffer TRIS concentrado 10 veces se utiliza para parar la reacción de digestión con pepsina y para preparar el buffer TRIS 1x en el que se disuelve la elastasa pancreática que monomeriza el colágeno. Para preparar 50 mL de este buffer se disuelven secuencialmente los compuestos indicados en la tabla 8.8 en agua bidestilada.

Tabla 8.8. Composición del TBS 10x. Para preparar 50 mL de TBS 10x se disuelven secuencialmente los productos indicados en la tabla en unos 40 mL de agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.9 con HCl 6 N y se enrasa hasta 50 mL con agua bidestilada.

Producto	PM	% pureza	PM corregido	Molaridad	Masa (g)
TRIS	121.1	100	-	1 M	6.055
NaCl	58.44	99.5	58.73	2 M	5.87
CaCl ₂	110.99	95	116.83	50 mM	0.292

Buffer TRIS 1x (TBS 1x). Este buffer se prepara disolviendo 5 μ L del TBS 10x en 45 μ L de agua bidestilada.

8.2. Cultivo de células animales —características generales

El cultivo de tejidos fue desarrollado por primera vez a comienzos del siglo XX para estudiar el comportamiento de células animales exentas de las variaciones sistémicas que puedan tener lugar en el organismo entero *in vivo*, tanto bajo condiciones normales como bajo el estrés de un experimento. Como su nombre indica, la técnica se desarrolló en primer lugar con fragmentos de tejidos sin disgregar, a partir de los cuales podían migrar y crecer células aisladas. Dado que el cultivo de células a partir de tales explantes de tejido dominó en este campo durante más de cincuenta años, no es sorprendente que el nombre *cultivo de tejidos* haya permanecido a pesar de que, durante la segunda mitad del siglo XX, se utilizaran cultivos de células dispersas. Por esta razón, se considera que el *cultivo de tejidos* es el término que engloba al cultivo de células, órganos o tejidos propiamente dichos, que podemos mantener *in vitro* durante al menos veinticuatro horas. Al principio, los cultivos se llevaban a cabo en recipientes de vidrio, de ahí el término *in vitro*.

Actualmente, los cultivos de células constituyen una de las herramientas más útiles en la investigación biológica. Son utilizados en estudios sobre la bioquímica y la fisiología de las células (fenómenos de metabolismo y transporte celular); en virología (cultivo de virus, relaciones huésped-parásito); genética (localización y control de la expresión de genes); estudios sobre el desarrollo embrionario (fenómenos de diferenciación y desdiferenciación); carcinogénesis (transformación maligna); obtención de clones (producción de anticuerpos monoclonales).

les, células madre, etc.) (figura 8.2). Entre las principales aplicaciones prácticas de los cultivos celulares destacan los estudios de toxicidad (productos químicos, farmacéuticos); el diagnóstico de enfermedades (genéticas, metabólicas, infecciosas, tumorales); la reproducción asistida (inseminación artificial, fecundación *in vitro*); la obtención de productos farmacéuticos (hormonas, vacunas, anticuerpos); la cirugía reconstructiva y la medicina regenerativa (terapia génica, trasplantes de células) (figura 8.2).

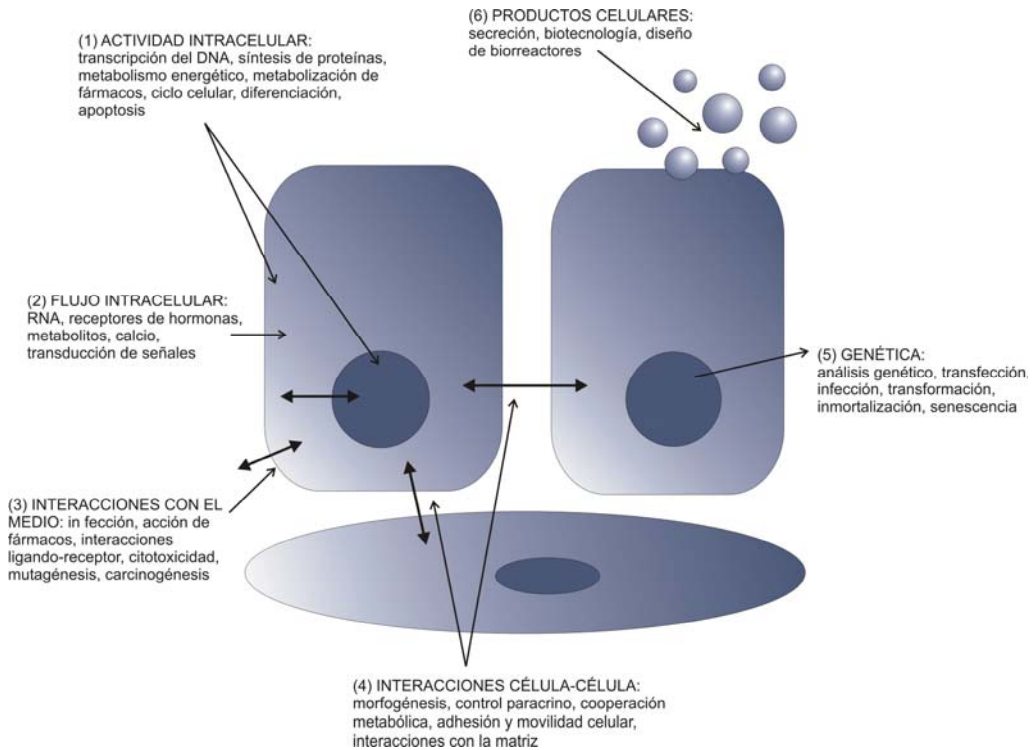


Figura 8.2. Aplicaciones de los cultivos de tejidos. Entre las principales aplicaciones de los cultivos de células destacan: estudios sobre (1) la actividad intracelular, como la replicación y transcripción del DNA, síntesis de proteínas, metabolismo energético y metabolización de fármacos; (2) flujo intracelular, translocación de complejos receptores de hormonas y procesos de transducción de señales, así como el transporte a través de la membrana; (3) interacciones con el ambiente, tales como la nutrición, infección, fenómenos de citotoxicidad, carcinogénesis, acción de fármacos e interacciones ligando-receptor; (4) interacciones célula-célula en la morfogénesis, control paracrino, proliferación celular, cooperación metabólica, adhesión celular y movilidad, interacciones matriciales; (5) genética, incluyendo análisis del genoma en condiciones normales y patológicas, manipulación genética, transformación e immortalización; (6) productos celulares y secreción, biotecnología, etc.

8.2.1. Ventajas e inconvenientes de los cultivos celulares como modelos experimentales

Son muchas las ventajas de los modelos *in vitro* frente a la experimentación con animales:

- Mayor control de las condiciones físico-químicas: pH, temperatura, presión osmótica, tensión de O₂ y CO₂.
- Mayor control de las condiciones fisiológicas: control de las concentraciones de hormonas y nutrientes.
- Permiten trabajar con células vivas.
- Permiten trabajar con células humanas.
- Economía y rapidez en los ensayos.
- Homogeneidad en la muestra, ya que dominará un tipo celular determinado.
- Se simplifican las cuestiones legales, morales y éticas.

Sin embargo, los modelos *in vitro* también presentan ciertas limitaciones:

- Es necesario un cierto grado de experiencia para manipular los cultivos de células. Los cultivos deben ser llevados a cabo bajo las condiciones más estrictas, dado que las células animales crecen mucho más lentamente que la mayoría de los microorganismos contaminantes, como las bacterias y los hongos. Además, a diferencia de los microorganismos, las células de animales multicelulares no existen normalmente aisladas y, consecuentemente, no son capaces de sostener una existencia independiente sin la provisión de un medio complejo que simule el plasma sanguíneo o el líquido intersticial. Estas condiciones implican un nivel de capacidad y conocimiento por parte del operador que le permitan apreciar los requerimientos del sistema y resolver los problemas que puedan surgir.
- Cantidad de células. Una de las principales limitaciones del cultivo de células es la gran inversión de esfuerzo y materiales que se requieren para producir relativamente poca cantidad de un tipo celular determinado.
- Pérdida de las propiedades diferenciadas. A menudo, el comportamiento de las células en cultivo puede verse modificado con respecto al que presentan las mismas células *in vivo*. Las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular disminuyen porque las líneas celulares carecen de la heterogeneidad y la arquitectura tridimensional que hay *in vivo*, y el medio de cultivo y las condiciones hormonales están alteradas. Esto crea un ambiente que puede favorecer la diseminación, migración y proliferación de células no especializadas, en lugar de las que expresan las funciones diferenciadas. La provisión de un ambiente adecuado, incluyendo la naturaleza del sustrato, los nutrientes y las hormonas, es fundamental para la expresión de las funciones especializadas.
- Inestabilidad genética en las líneas celulares. La inestable constitución cromosómica es uno de los principales problemas de muchas líneas celulares continuas.

8.2.2. Requerimientos de los cultivos celulares

El material básico esencial que se requiere en un laboratorio de cultivos celulares es: una cabina de flujo laminar, un incubador de CO₂, un autoclave, un baño termostático, neveras, congeladores y un microscopio invertido. Para el desarrollo de las técnicas de cultivo de células en nuestro laboratorio fue necesario llevar a cabo la instalación de todo este equipamiento, así como la adquisición de todos los consumibles requeridos, como pipetas, pipeteadores de aspiración mecánica, placas o frascos de cultivo, jeringas y filtros, filtros de esterilización y botellas para los medios, ya que ésta ha sido la primera vez que en este laboratorio se realizan experimentos con células cultivadas *in vitro*.

8.2.2.1. Asepsia

Hay que tener en cuenta que el principal requerimiento que distingue el cultivo de células de la mayoría de las técnicas de un laboratorio es la necesidad de mantener unas condiciones asépticas. Por esta razón, es importante que el laboratorio de cultivos celulares esté libre de polvo y se sitúe en una zona apartada del resto del laboratorio que sólo se utilice para cultivos celulares. En nuestro caso, el trabajo con cultivos de células se desarrolla en una habitación aislada del resto, en cuyo interior se encuentra la cabina de flujo laminar (figura 8.3), el incubador de CO₂ (figura 8.4), una pequeña nevera, un congelador, el baño calefactor y el microscopio invertido.

Para mantener las condiciones asépticas, el trabajo con cultivos de células animales se desarrolla en cabinas de flujo laminar. Este dispositivo protege la zona de trabajo de partículas, especialmente de posibles contaminantes que puedan acceder al cultivo, mediante un flujo de aire estéril, constante y estable. Esto se consigue con ventiladores centrífugos de alta eficacia, que disponen de un sistema automático de regulación de la velocidad, que fuerzan el paso del aire a través de filtros HEPA (del inglés, *High Efficiency Particulate Air*) o filtros absolutos, situados en el techo (cabinas de flujo laminar vertical) o en la pared frontal (cabinas de flujo laminar horizontal) y que, con una eficiencia del 99'999%, retienen las partículas por debajo de un cierto calibre que es, en general, de 0'2 μm . El flujo de aire que llega a la superficie de trabajo es laminar, sin turbulencias en las que puedan quedar retenidas partículas contaminantes, gracias a la gran superficie del filtro HEPA y a la velocidad constante del aire.

Tal como hemos indicado, en este tipo de cabinas la dirección del flujo laminar puede ser horizontal o vertical. En el primer caso, un flujo de aire horizontal estéril atraviesa la superficie de trabajo hacia el operador. Estas cabinas tienen la ventaja de que las partículas contaminantes procedentes del equipo o del operador no caen sobre la superficie de trabajo. Sin embargo, el flujo horizontal no protege ni al operador ni al ambiente. En el segundo caso, el flujo de aire estéril se proyecta verticalmente sobre la superficie de trabajo. Si este aire se

recircula aspirando en la superficie de trabajo y después de un nuevo filtrado se devuelve al ambiente, tenemos una cabina de seguridad biológica.

Las cabinas de flujo laminar horizontal son muy adecuadas para una buena protección del producto, pero no son apropiadas para el trabajo con materiales peligrosos o con algún tipo de riesgo, pues el operador queda completamente expuesto a ellos. En las cabinas de flujo vertical, más sofisticadas, se asegura una buena protección del producto y, dependiendo de su diseño, se puede asegurar una protección total del operador. Son por ello más adecuadas para el trabajo con agentes peligrosos. En nuestro laboratorio optamos por adquirir una cabina de flujo laminar vertical que asegura la protección estéril en la zona de trabajo, así como una protección básica del operador y del medio ambiente (figura 8.3).



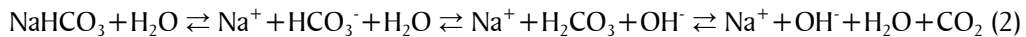
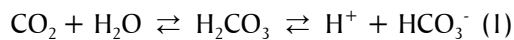
Figura 8.3. Cabina de flujo laminar vertical Telstar PV-100 instalada en nuestro laboratorio de cultivos para garantizar las condiciones de asepsia que requieren los cultivos de células animales.

8.2.2.2. Requerimientos físico-químicos

Oxígeno. No todos los cultivos necesitan la misma cantidad de oxígeno. Generalmente las necesidades de la mayoría de células están en torno al 21%, que es lo que existe en la atmósfera, aunque a los frascos de los cultivos sólo difunde un 5%. Si trabajamos con frascos cerrados se acabará por consumir todo el oxígeno, por ello lo mejor es trabajar con tapones permeables o semiabiertos. Además es importante no añadir exceso de medio porque se dificulta la difusión de los gases, la altura media del medio de cultivo debe ser de 2-5 mm

(0'2-0'5 mL/cm²). Este volumen de medio de cultivo proporciona un equilibrio entre la disponibilidad de nutrientes y la concentración de metabolitos celulares que pueden acumularse durante el cultivo, además de que asegura el correcto intercambio de oxígeno y dióxido de carbono. Cuando se utilizan cantidades muy altas de O₂ se producen una serie de problemas: peroxidación de proteínas y de lípidos, radicales libres de O₂, etc. Para evitarlos se pueden utilizar sistemas de protección antioxidantes que se añaden al medio como la catalasa, la superóxido dismutasa, la vitamina E, el selenio, el zinc, etc.

Dióxido de carbono. El dióxido de carbono atmosférico juega un complejo papel debido a que influye en la cantidad de CO₂ disuelto, el pH y la cantidad de iones HCO₃⁻ del medio de cultivo. Las reacciones que tienen lugar en el medio son:



De modo que para establecer un pH determinado se deben tener en cuenta los niveles de bicarbonato sódico y la tensión de CO₂, ya que si sube la concentración de CO₂ aumenta la concentración de protones y por tanto disminuye el pH (1). Cada medio tiene una concentración recomendada de bicarbonato y una tensión de CO₂ determinada para alcanzar el pH correcto. Sin embargo, en la actualidad se emplean otras sustancias amortiguadoras del pH en la formulación de muchos medios, lo que permite una mayor estabilidad: HEPES, Tricina (N-tris[Hidroximetil]-metil-glicina), etc.

Se suele utilizar CO₂ al 5% en la atmósfera de incubación, aunque, como hemos visto, esto dependerá de la concentración de NaHCO₃ del medio de cultivo (2).

Temperatura. La temperatura tiene gran influencia en la velocidad de crecimiento de las células; por tanto es importante controlarla durante la incubación. Las células deben incubarse a la temperatura corporal del animal del cual proceden: humanos y roedores: 37 °C; aves: 39-49 °C; perros y gatos: 38-38'5 °C; peces de agua fría: 15-20 °C; peces de agua templada: 22-27 °C; insectos: 23-37 °C; etc.

Sin embargo, las células en cultivo son capaces de soportar, sin daños importantes, variaciones de temperatura, siempre que sean por debajo de la temperatura corporal del animal del que proceden. Así pues, las células humanas soportan incubaciones a 4 °C durante días y pueden ser congeladas a -196 °C durante años (con sustancias protectoras); sin embargo, no sobreviven unas pocas horas a 2 °C por encima de 37 °C y mueren rápidamente a 40 °C. Las células procedentes de animales poiquilotermos soportan mejor un amplio intervalo de temperaturas de incubación.

El objetivo del incubador de CO₂ es el mantenimiento de la temperatura en una atmósfera con una tensión controlada de CO₂ y, adicionalmente, de humedad elevada (figura 8.4). Las

células de animales homeotermos suelen crecer bien entre 33 y 37 °C, pero en los extremos de ese margen presentan importantes variaciones en su velocidad de crecimiento. En un incubador de células es por tanto más importante la consistencia de la temperatura (invariabilidad durante prolongados periodos de tiempo, con oscilaciones inferiores a 0'5 °C) que su precisión a fin de mantener las células en condiciones en las que las tasas de crecimiento sean constantes. Por ello, los incubadores llevan bandejas perforadas para que difundan los gases y la temperatura sea más homogénea.



Figura 8.4. Incubador de CO₂ utilizado en nuestro laboratorio para mantener unas condiciones térmicas, de tensión de CO₂ y de humedad constantes durante el cultivo de células animales.

Las necesidades de asepsia en el incubador son considerablemente menores que en el área de trabajo (cabina de flujo laminar) pero sin embargo es imprescindible mantener una estricta limpieza y desinfección periódica del incubador y, especialmente, no introducir en él cultivos contaminados o eliminarlos inmediatamente.

Los incubadores modernos disponen de:

- Dispositivos de control de temperatura, con un termostato de seguridad que desconecta la función en caso de anomalía. La estabilidad de la temperatura es una característica esencial del incubador, y por ello suelen estar equipados con camisas de agua que aumentan notablemente la inercia térmica.
- Dispositivo de inyección de una mezcla de aire y CO₂, en la proporción deseada, entre el 4 y el 7%. El CO₂ de elevada pureza se suministra en botellas presurizadas, y se

mezcla en el dispositivo de inyección con el aire del ambiente. El control de la mezcla se realiza fundamentalmente mediante un dispositivo *IRGA* (del inglés *Infra-Red Gas Analyzer*). En incubadores modernos este dispositivo analiza constantemente el porcentaje de CO_2 presente en la cámara de incubación, realizando automáticamente las correcciones necesarias.

– Dispositivo de control de la humedad ambiente. Para mantener el cultivo se requiere una humedad ambiente elevada, a fin de reducir la evaporación de agua del medio de cultivo. En los incubadores menos sofisticados esto se consigue mediante bandejas de agua en el fondo del incubador. En los últimos años, se están comercializando instrumentos más modernos que disponen de dispositivos que controlan la humedad atmosférica, inyectando agua filtrada y estéril.

– Dispositivo de recircularización de aire. Es importante una recirculación del aire en el interior del incubador, a fin de homogeneizar la temperatura. Si además, en el circuito de circulación de aire, se intercala un filtro HEPA, se consiguen eliminar las posibles partículas contaminantes y se asegura la esterilidad del ambiente.

pH y capacidad amortiguadora. El pH óptimo de crecimiento para la mayoría de tipos celulares es 7'4, aunque existen algunas excepciones: ciertas líneas normales de fibroblastos crecen mejor a un pH de entre 7'4 y 7'7, y células transformadas lo hacen en el margen de pH de 7'0 a 7'4, mientras que las células epidérmicas pueden ser mantenidas a un pH de 5'5. En general, las células toleran mejor un pH ácido que uno básico, de hecho cuando el pH aumenta a 8 las células mueren, mientras que cuando baja a 5 las células lo soportan aunque disminuye su crecimiento.

El medio de cultivo debe estar tamponado, a fin de evitar los cambios bruscos de pH, el cual se controla en la mayoría de cultivos con un buffer de bicarbonato sódico 24 mM y una atmósfera de CO_2 5%. El bicarbonato, a pesar de su baja capacidad amortiguadora a pH fisiológico, sigue siendo la solución más empleada en la mayoría de medios para este efecto debido a su bajo coste, baja toxicidad y beneficios nutricionales para el cultivo.

El buffer HEPES (N-[2-hidroxietil]-piperazina-N'-[láctico 2-etano-sulfónico]) es más efectivo en el intervalo de pH de 7'2 a 7'6, y se emplea a una concentración de 10 a 20 mM. Cuando se usa conjuntamente con CO_2 externo debe estar a una concentración doble de la de bicarbonato para conseguir un tamponamiento adecuado. Tiene el inconveniente de que es citotóxico y degrada la riboflavina, por lo que las células no deben estar expuestas a él durante mucho tiempo.

Otros tampones que se pueden utilizar son algunos aminoácidos como la L-Arginina, proteínas y sustancias sintéticas como Tris, Tricina o Bes.

En el medio de cultivo se añade además un indicador de pH a fin de conocer el estado del medio. El indicador de pH utilizado con más frecuencia es el rojo fenol, que presenta color

rojo a pH 7'4, naranja a pH 7'0, amarillo a pH 6'5, azul-rojo a pH 7'6 y púrpura a pH 7'8. Si está amarillo es porque existe mucho ácido láctico, se ha consumido la glucosa y con ella el resto de los nutrientes y por lo tanto hay que cambiar el medio. Este cambio de pH puede deberse a que las células hayan crecido en exceso, a que haya poco volumen de medio o a contaminaciones de microorganismos.

Osmolaridad. Muchas células en cultivo tienen una amplia tolerancia a cambios en la osmolaridad del medio, creciendo bien en el intervalo de 260 a 320 mOsm/kg, con pequeñas variaciones, dependiendo de la especie considerada. La osmolaridad depende del equilibrio entre la concentración de iones Na^+ , Cl^- , HCO_3^- , K^+ , Mg^{2+} , PO_4^{3-} , proteínas del medio de cultivo y del interior celular. Para controlar la osmolaridad se debe evitar la evaporación, utilizando un incubador que regule la humedad o cambiando el medio de cultivo con frecuencia.

Viscosidad. La viscosidad del medio viene determinada fundamentalmente por el contenido en suero y tiene poca influencia sobre el crecimiento de las células. Sí es importante, sin embargo, para evitar el daño celular cuando se agita una suspensión de células (a más viscosidad menor daño) o cuando se disocian las células tras la tripsinización. Para evitar el posible daño celular bajo estas condiciones se puede aumentar la viscosidad, especialmente en medios libres de suero, añadiendo carboximetilcelulosa (CMC) o polivinilpirrolidona (PVP).

Tensión superficial. La tensión superficial se ha de mantener baja y, en general, sólo se ve alterada por la aparición de espuma en los cultivos en suspensión donde se burbujea CO_2 . En estos casos es recomendable emplear un agente antiespumante de silicona, pues de lo contrario puede provocar la desnaturalización de proteínas con riesgo de contaminación si la espuma alcanza el cuello del recipiente de cultivo.

8.2.2.3. Requerimientos nutritivos

Los medios de cultivo son soluciones salinas tamponadas que contienen todos los nutrientes que necesitan las células. Las funciones de los medios de cultivo son el mantenimiento de las constantes físico-químicas (pH, osmolaridad, etc.) y el aporte de nutrientes. Los primeros medios utilizados en los cultivos celulares fueron líquidos biológicos como la sangre, el plasma o la linfa. A medida que se han ido determinando los requerimientos de las células han ido surgiendo medios sintéticos (enriquecidos con pequeñas cantidades de suero).

El BME (*Eagle's Basal Medium*) fue la primera fórmula diseñada para el cultivo de la línea celular HeLa. Se trata de un medio elemental que sólo contiene los aminoácidos esenciales. Luego se fueron incorporando más sales y aminoácidos surgiendo medios como el MEM (*Minimum Essential Medium*), con sus dos variantes: EMEM (MEM con sales de Earle) y HMEM (MEM con sales de Hank). Dulbecco modificó el MEM añadiendo más aminoácidos y

vitaminas (DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), que actualmente es el medio de cultivo más utilizado, sobre todo para cultivos primarios.

Hoy en día todo medio de cultivo está constituido por una mezcla de sales inorgánicas, iones minerales, aminoácidos, vitaminas, otros suplementos orgánicos de bajo peso molecular, hormonas y factores de crecimiento (suero) e inhibidores del crecimiento de los contaminantes (antibióticos y antifúngicos).

Iones minerales y sales inorgánicas. Entre las principales sales minerales constituyentes de la mayoría de los medios se encuentran las de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} (NaCl , KCl , CaCl_2 , NaHCO_3 , MgSO_4 , NaH_2PO_4). Estos iones y sales minerales participan en ciertas funciones metabólicas como cofactores de enzimas, en el metabolismo energético (PO_4^{3-}), o en procesos de síntesis metabólica (SO_4^{2-}), así como en el mantenimiento de la presión osmótica, en el potencial de membrana, en los fenómenos de transporte celular y en la adhesión celular (Ca^{2+} , Mg^{2+}).

Aminoácidos. Es necesario enriquecer el medio basal con los aminoácidos considerados esenciales (isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina). Sin embargo, esta lista debe aumentarse pues en las células en cultivo algunos aminoácidos se convierten en esenciales aunque *in vivo* no lo sean, como es el caso la tirosina, la arginina y la histidina, por lo que obligatoriamente hay que incorporarlos en el medio de cultivo. Asimismo, puede ser necesario enriquecer el medio con otros aminoácidos, pues los requerimientos pueden variar de unas células a otras.

Los principales aminoácidos presentes en todos los medios son: arginina, histidina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, leucina, isoleucina, lisina·HCl, cistina, tirosina y glutamina. Otros aminoácidos, aunque no son considerados esenciales, también se añaden a la mayoría de medios de cultivo: glicina, serina, alanina, asparragina, ácido aspártico, ácido glutámico y prolina.

La glutamina es fundamental en los medios de cultivo por tratarse de un nutriente crítico, ya que interviene en el metabolismo del ATP (el 70% del ATP que utilizan las células procede de la glutamina, que puede ser utilizada como fuente de carbono mediante su oxidación a glutamato por la glutaminasa y su entrada en el ciclo de Krebs mediante la transaminación a 2-oxoglutarato), la síntesis de purinas, AMP, RNA, DNA, etc.

La glutamina es un factor limitante del crecimiento celular, pero es muy inestable en solución acuosa dando lugar a la producción de amonio, potente inhibidor del crecimiento celular. La degradación de la glutamina está determinada por la temperatura y el pH. A 4 °C los niveles de glutamina se mantienen durante tres semanas mientras que a temperatura ambiente descienden rápidamente. A pH 7 la glutamina es muy estable, pero a pH ácido o básico se degrada rápidamente.

Para evitar la degradación de los medios se deben almacenar en recipientes de vidrio tipo pyrex o poliestireno a 4 °C evitando la formación de cámaras de aire, es decir, que conviene llenarlos al máximo y cerrarlos correctamente.

Vitaminas. Entre las vitaminas consideradas indispensables en los cultivos celulares destacan la tiamina (B₁), la riboflavina (B₂), la niacina (B₃), el piridoxal (B₆), el ácido pantoténico (B₅) y el ácido fólico (B₉ o B₁₁).

Glucosa. La mayoría de los medios de cultivo contiene glucosa como fuente de energía. La glucosa se metaboliza preferentemente vía glicolisis hasta piruvato, que puede ser convertido en lactato o acetoacetato, o entrar en el ciclo de Krebs y generar CO₂. La acumulación de ácido láctico en el medio, particularmente evidente en el medio de células embrionarias y transformadas, parece indicar un funcionamiento diferente del ciclo de Krebs en estas células respecto al modelo *in vivo* y los datos más recientes parecen indicar que el origen de gran parte del carbono del CO₂ desprendido procede de la glutamina en vez de la glucosa. Este hecho explicaría la excepcionalmente alta necesidad de glutamina en algunos cultivos de células.

Otros suplementos orgánicos de bajo peso molecular. Algunos medios muy complejos, que se utilizan para cultivar células muy especializadas o poca cantidad de células, no llevan suero, pero contienen aditivos especiales como lípidos (ácido linoleico y araquidónico), nucleótidos o sus precursores (ribosa, desoxirribosa, adenina, adenosina, AMP, etc.), intermediarios del ciclo de Krebs, piruvato, proteínas y péptidos (bactopeptona), glutatión reducido, etc.

La adición de piruvato al medio permite al cultivo aumentar su producción endógena de CO₂ haciéndole independiente de la aportación exógena de éste. El medio de Leibovitz L15 contiene una concentración superior de piruvato y no contiene bicarbonato sódico, por lo que no requiere aporte de CO₂ en la fase gaseosa.

Hormonas y factores de crecimiento: suero. Para que las células se dividan es necesario que en el medio existan sustancias que estimulen el crecimiento y la diferenciación, las cuales son aportadas por el suero. Lo ideal es utilizar suero procedente de la misma especie con la que se trabaja, aunque esto no siempre es posible. Entre los principales tipos de suero destacan el suero bovino fetal (FBS, *Fetal Bovine Serum*), el suero de ternera (CS, *Calf Serum*), el suero de caballo (HS, *Horse Serum*) y el suero humano; otros, como los de ratón, pollo, conejo, oveja, mono, cabra, cerdo, etc. son muy poco habituales. El FBS es el más usado. Se caracteriza porque tiene pocos anticuerpos al ser de origen fetal, tiene un bajo contenido en lípidos, pudiéndose usar en grandes cantidades, su riesgo de contaminación es bajo porque se extrae por punción cardíaca del feto y tiene un uso universal, pues todas las células crecen bien con este suero.

El suero aporta factores de adherencia y extensión, factores estimulantes del crecimiento, proteínas transportadoras (hormonas, vitaminas y lípidos) e iones minerales. En la composición del suero destacan:

- Factores de adherencia y extensión: proteínas con muchas cargas como la vitronectina y fibronectina, que tienen gran afinidad por el plástico y favorecen la adhesión de las células al fondo del recipiente de cultivo.

- Factores de crecimiento. En la actualidad se han identificado algunos polipéptidos de actividad mitogénica: FGF (*Fibroblast Growth Factor*), EGF (*Epidermal Growth Factor*), PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), presentes en el suero.

- Hormonas: insulina, hormonas tiroideas, corticoides, etc.

- Proteínas transportadoras: albúmina, transferrinas, etc.

- Lípidos: fosfolípidos, ácido linoleico, colesterol, etc.

- Vitaminas.

- Minerales: Fe, Cu, Zn, Se, etc.

- Otras sustancias: inhibidores de proteasas, sustancias detoxificadoras, poliaminooxidasa (sobre todo en el suero bovino fetal). Es común añadir poliaminas a los cultivos para estimular el crecimiento de las células, sin embargo, si se usa suero, la enzima poliaminooxidasa (PAO) las oxida generando compuestos tóxicos que matan a las células, en estos casos se debe añadir aminoguanidinio que inhibe a la PAO.

La utilización de suero es problemática pues, a pesar de que se conoce su composición principal contiene gran cantidad de componentes en cantidades variables que pueden influir notablemente en el cultivo; además, las características del suero pueden variar de un lote a otro. Por todo ello se realizan importantes esfuerzos para el establecimiento de medios químicamente definidos para el crecimiento celular. Para conseguir reemplazar el suero completamente de un medio será necesario adicionar:

- Los factores de adhesión como la fibronectina. Las células que crecen en medios libres de suero requieren el suplemento de fibronectina (25-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o laminina (1-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en el medio, o bien el tratamiento de las placas con polilisina (1 mg/mL) antes de la siembra.

- Inhibidores de proteasas. Después de la tripsinización de un cultivo, la actividad de la tripsina es inhibida gracias a los inhibidores de proteasas del suero añadido a los medios de cultivo. En ausencia de suero deben utilizarse inhibidores de proteasas como el inhibidor de tripsina de soja.

- Hormonas. El complemento hormonal dependerá fundamentalmente del tipo celular que se cultive.
- Factores peptídicos de crecimiento.
- Micronutrientes: Fe, Cu, Se y otros minerales.
- Proteínas y poliaminas. Se recomienda el uso de albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos (1-10 mg/mL); la transferrina (10 ng/mL) se requiere como portador de Fe, y se piensa que puede tener actividad mitógena; la putrescina se usa a una concentración de 0.1 mM.

Antibióticos y antifúngicos. Con el fin de evitar el crecimiento de microorganismos contaminantes en el cultivo, se suele enriquecer el medio con antibióticos de diferente espectro de acción. Esto ha de ser estrictamente controlado para evitar efectos nocivos sobre el cultivo.

Es importante tener especial cuidado cuando se combinan dos o más antibióticos. Lo habitual es usar una mezcla de penicilina y estreptomina porque se complementan bien y resultan bastante inocuos para las células. La penicilina es efectiva contra bacterias gram positivas y la estreptomina lo es contra gram positivas y gram negativas y estos dos antibióticos tienen poco poder de penetración en las células de mamíferos. Se suelen utilizar concentraciones de 100 U/mL para la penicilina y de 100 μ g/mL para la estreptomina.

La gentamicina presenta una serie de ventajas: es bastante estable ante variaciones de pH y temperatura, tiene un gran espectro de acción (bacterias gram positivas, gram negativas y micoplasmas) y es activa tanto en medios con suero como en medios sin suero (la penicilina pierde un 30% de actividad en medios con suero). El principal inconveniente de la gentamicina es que penetra en las células y puede afectar a la fisiología celular. Se suele utilizar alternada con la combinación penicilina-estreptomina a una concentración de 50 μ g/mL.

8.2.2.4. El sustrato de cultivo

La mayor parte de las líneas celulares crecen en monocapa sobre un soporte más o menos sólido; el crecimiento en suspensión está usualmente restringido a algunas líneas celulares, fundamentalmente de células hematopoyéticas y tumores ascíticos. Según que la línea celular precise o no unirse al sustrato para proliferar, se dice que es dependiente o independiente de anclaje.

Vidrio. El vidrio fue el primer material utilizado, es barato, se recicla muy bien porque es muy fácil de limpiar, tiene radicales químicos en su superficie que facilitan que las biomoléculas de la membrana celular se unan a él; además, es especialmente útil para su posterior observación al microscopio por su alta calidad óptica. Sin embargo, actualmente se utiliza muy poco de-

bido a que en su superficie existen polianiones, como el ácido salicílico, que pueden ser tóxicos para las células.

Plástico desechable. Actualmente es el material más utilizado como sustrato para las células que crecen *in vitro*, esterilizado mediante radiación γ de cobalto. Los plásticos no son materiales inertes, son sustratos físico-químicos complejos tratados para favorecer la adhesión de las células. Los radicales presentes en la superficie de los frascos de cultivo ($=O$, $-NH_2$; $-OH$; $-N$; $=NH$) permiten la adhesión de biomoléculas de la superficie celular principalmente mediante puentes de hidrógeno.

El plástico más empleado es el poliestireno, que tiene buena calidad óptica. Sin embargo, debido a que es hidrofóbico, requiere un tratamiento químico, con rayos γ , o mediante descargas eléctricas para que las células se adhieran a él.

Superficies tratadas. En ocasiones puede ser útil tratar los frascos con proteínas de la matriz extracelular para mejorar la adhesión y el crecimiento de las células: colágeno, poli D-lisina (indicada para neuronas y células endoteliales; se usa la forma D al no ser metabólicamente activa); condronectina (para la adhesión de condrocitos); laminina (indicada para células epiteliales, neuronales, hepatocitos); vitronectina (usada en el cultivo de melanomas, fibroblastos, células endoteliales) o gelatina (células musculares).

Células nodriza ('feeder layers'). Se ha descrito que algunos tipos celulares precisan de suplementos específicos para crecer en cultivo y expresar sus características diferenciadas. Una manera de obtener estos suplementos es hacerlos crecer sobre los restos de monocapas de otros tipos celulares, a los que se les ha inhibido su crecimiento, normalmente mediante rayos X o rayos γ . Una de las monocapas más empleadas es la constituida por fibroblastos de ratón 3T3 irradiados, las células de pulmón crecen bien sobre células de intestino fetal, y las neuronas sobre células de glía.

Microsoportes ('microcarriers'). Se trata de soportes de plástico, de sephadex y de poliacrilamida en forma de pequeñas bolas de 90-300 μm a las que se unen las células dependientes de anclaje. Estas bolas con las células adheridas se mantienen suspendidas en agitación.

Sustratos metálicos. Se han desarrollado técnicas para crecer células de glía en sustratos metálicos, de paladio o en discos de acero.

Matrices tridimensionales. Se trata de sustratos, como geles de colágeno, celulosa o alginato, en los que las células penetran, crecen y se establecen de una manera análoga a como lo hacen en el tejido de origen.

Sustratos no adherentes. Son sustratos que no permiten la adhesión celular, por ejemplo agar, agarosa o metilcelulosa de alta viscosidad, útiles en situaciones en las que no conviene que exista dispersión de las células derivadas de una originaria, por ejemplo en los procesos de aislamiento de colonias infectadas por virus.

Haces microcapilares permeables. Son cámaras de crecimiento de células formadas por un recipiente cilíndrico en cuyo interior se dispone un haz de capilares plásticos permeables, adecuados para que las células se adhieran, que ofrecen una gran superficie de crecimiento. Los capilares se encuentran conectados a un circuito de recambio de medio.

8.2.3. Líneas celulares primarias y líneas celulares continuas

Las células animales que se utilizan generalmente en cultivos son de dos tipos: primarias y transformadas. Un *cultivo primario* es un cultivo establecido a partir de tejidos u órganos tomados directamente de un organismo, que se mantiene un periodo de tiempo determinado, con reproducción de las células en el cultivo. Estas células tienen una vida limitada, mueren al poco tiempo: las células sanguíneas, por ejemplo, a los 3-4 días, las neuronas pueden mantenerse 3-4 meses en cultivo, los macrófagos un mes, etc.

Cuando estas células comienzan a dividirse llega un punto en el que ocupan toda la superficie del frasco de cultivo por lo que será necesario hacer un *pase* o *subcultivo*. Cuando se ha hecho un pase se tiene una *línea celular primaria*. La mayoría de las veces esta línea no crece indefinidamente en un cultivo; sólo se divide unas cuantas veces, llegando a mantenerse a lo largo de 50 ó 100 generaciones, después de lo cual alcanza una crisis y si no detiene su crecimiento crece muy lentamente durante unas pocas generaciones más y posteriormente su crecimiento cesa totalmente. Sin embargo, en ocasiones, tiene lugar un proceso conocido como *transformación*, la cual puede ser espontánea o inducida, que hace que las células sean capaces de dividirse indefinidamente dando lugar a una *línea celular continua* o *establecida*. El proceso de transformación se da en el genoma, ocurren mutaciones que dan lugar a células distintas a las iniciales aunque mantienen muchas de las propiedades originales.

Por lo tanto, una *línea celular continua* o *establecida* es un cultivo de células inmortales que se establece a partir de un tejido u órgano –en muchos casos de un tumor–, y se mantiene en cultivo un tiempo ilimitado. Todas las células de mamíferos que son capaces de crecer indefinidamente en un cultivo proceden o bien de células tumorales aisladas directamente de un animal o bien de cultivos celulares que han sufrido algún cambio, lo que hace que se comporten como células tumorales. Estas células se llaman *transformadas*, término que se utiliza para designar a todas las células que son ‘inmortales’. Uno de los cultivos celulares indiferenciados más utilizado es el de las células HeLa, la primera célula humana que creció de forma continuada en el laboratorio. La célula HeLa se obtuvo en 1952 a partir de tumor maligno, un carcinoma de cérvix uterino.

Tabla 8.9. Principales diferencias entre las líneas celulares primarias y las líneas celulares continuas. Las líneas establecidas, también denominadas continuas o transformadas, están constituidas por células que se dividen indefinidamente *in vitro*. Pueden surgir espontáneamente o ser inducidas experimentalmente, generalmente mediante la utilización de virus. Al contrario que las células de los cultivos primarios, que presentan una dotación cromosómica diploide normal, las células transformadas son generalmente heteroploides y presentan gran variación en el número de cromosomas, mostrando algunos de ellos anomalías estructurales. Además, estas células suelen precisar menor cantidad de nutrientes, pueden crecer con inóculos más bajos y, con frecuencia, muchas de ellas presentan resistencia a virus.

	Línea primaria	Línea continua
Ploidía	Diploide/Euploide	Heteroploide/Aneuploide
Transformación	Normal	Transformada
Tumorigenicidad	No-tumorigénica	Tumorigénica
Dependencia de anclaje	Sí	No
Inhibición por contacto	Sí	No
Limitación de crecimiento por contacto	Sí	No
Mantenimiento	Cíclico	Es posible mantenerlas quiescentes
Requerimientos de suero	Elevados	Bajos
Eficiencia de clonaje	Baja	Elevada
Marcadores	Pueden expresar marcadores específicos	Cromosómicos, enzimáticos se pierden
Funciones especializadas	Se mantienen	Se suelen perder
Tasa de crecimiento	Baja (24 a 96 h tiempo de replicación)	Rápida (12 a 24 h)
Rendimiento en cultivo	Bajo ($<10^6$ células/mL, $<10^5$ células/cm ²)	Alto ($>10^6$ células/mL, $>10^5$ células/cm ²)

8.2.4. Establecimiento de cultivos primarios

El desarrollo de los cultivos primarios consta de tres etapas: 1) aislamiento del tejido, 2) disección o disgregación y 3) siembra en el frasco apropiado. Una vez aislado el tejido se puede obtener un cultivo primario permitiendo que las células migren desde fragmentos del tejido adheridos a un sustrato adecuado, o mediante su disgregación mecánica o enzimática hasta obtener una suspensión de células, algunas de las cuales se adherirán al sustrato. Para la mayoría de las células normales no transformadas, a excepción de las células hematopoyéticas, es normal adherirse a una superficie lisa para poder sobrevivir y proliferar con la máxima

eficiencia. Por el contrario, las células transformadas, particularmente las células obtenidas de tumores animales, suelen ser capaces de proliferar en suspensión.

8.2.4.1. Técnica de los explantes

La técnica de los explantes fue la primera utilizada para obtener cultivos de tejidos y, con algunas modificaciones, su uso es todavía muy corriente. Se trata de un método mecánico que consiste en cortar fragmentos de tejido de 1 a 3 mm³ que permitan la nutrición de las células del interior del explante mediante difusión, una vez emplazados en el frasco de cultivo con el medio apropiado. A partir de estos explantes migrarán las células, por lo que este método sólo sirve para seleccionar células capaces de migrar. Los fragmentos de tejido se pueden sembrar en cubreobjetos colocados en tubos Leighton o también en frascos de plástico o de cristal. El explante debe quedar adherido a la superficie para que las células puedan migrar. Existen distintas formas de conseguir que se adhiera el explante. Al sembrar se pueden recubrir los explantes con plasma y extracto embrionario de pollo que al formar una fina película de fibrina facilitan su adhesión. La adherencia también puede ser favorecida tratando la superficie con polilisina, fibronectina o 'feeder layers'.

Los inconvenientes de esta técnica son múltiples: los fragmentos de tejidos, por pequeños que sean, tienen, además de las células especializadas que se desean cultivar, otras células pertenecientes al tejido conectivo, gran variedad de células de vasos sanguíneos, y células reticulendoteliales. Por esta razón puede que migren células sanguíneas, fibroblastos, células epiteliales, y que no lo hagan las células que nos interesan. Al realizar la siembra de un fragmento, todas las células pueden sobrevivir un día o dos. Luego, algunas empiezan a emigrar desde el tejido hacia fuera y las primeras son, si se presentan, células epiteliales, que tienen un crecimiento característico en forma de lámina. Más tarde surgen los fibroblastos que migran en forma radial desde el fragmento original (figura 8.5).

8.2.4.2. Disgregación enzimática

La disociación de los tejidos se logra generalmente mediante el uso de enzimas proteolíticas. De esta forma se obtienen células aisladas a partir de tejidos tras la proteólisis de la matriz proteica que las mantiene unidas. Las enzimas utilizadas con más frecuencia son preparaciones de tripsina, colagenasa, elastasa, hialuronidasa, DNAsa, pronasa o dispasa. La tripsina y la pronasa proporcionan la disgregación más completa, pero tienen el inconveniente de que pueden dañar las células. La colagenasa y la dispasa, por otro lado, proporcionan disgregaciones incompletas, pero son menos dañinas. La hialuronidasa puede ser utilizada en conjunción con la colagenasa para digerir la matriz extracelular, y la DNAsa se emplea para dispersar el DNA liberado por las células lisadas, ya que tiende a perjudicar la proteólisis y promover la reagregación.

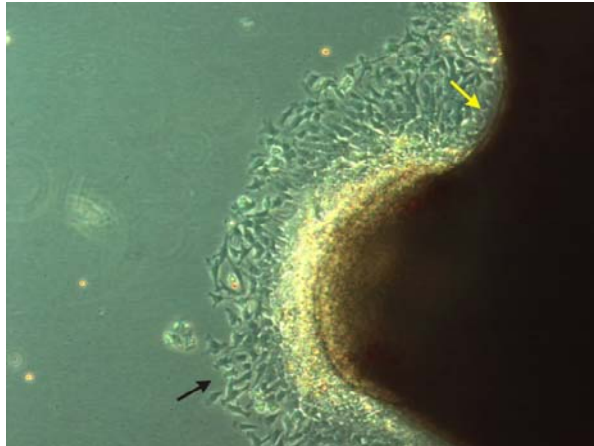


Figura 8.5. Fotografía del explante de una pata de embrión de ratón. A partir de fragmentos de tejidos (flecha amarilla) que quedan adheridos a la superficie del frasco de cultivo comienzan a migrar células como los fibroblastos (flecha negra).

La adhesión célula-célula en los tejidos está mediada por una gran variedad de glicopéptidos CAM (del inglés *Cell Adhesion Molecules*), algunos de los cuales son calcio-dependientes (cadherinas), y por ello sensibles a agentes quelantes como el EDTA o el EGTA. Las integrinas también presentan dominios de unión a Ca^{2+} y resultan afectadas por la privación de este ión. Por esta razón, se suelen utilizar combinaciones enzimáticas a las que se añaden agentes quelantes que eliminan cationes como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} .

La tripsina es, con mucho, la enzima más utilizada en la disgregación tisular, pues segrega bastante bien las células sin lisarlas y es efectiva en muchos tejidos. Además, presenta la gran ventaja de que su actividad se neutraliza bien con suero del medio de cultivo o con inhibidores de tripsina cuando se utiliza un medio libre de suero. Esta enzima cataliza la hidrólisis de las uniones peptídicas en las que un residuo de arginina o lisina participa con su grupo carboxilo. Su temperatura óptima es 37 °C, su pH óptimo es 8'0, aunque es muy activa en el intervalo de 6'5 a 9'0. El rendimiento de este tratamiento es menor con tejidos adultos que con tejidos embrionarios. Los tejidos adultos se deben incubar con tripsina durante toda la noche a 4 °C (la enzima es virtualmente inactiva a esta temperatura) para que se introduzca en los intersticios del tejido sin disgregarlo. De esta forma, al día siguiente, al aumentar la temperatura a 37 °C, la tripsina no va a trabajar desde fuera hacia dentro, sino desde todas las partes del tejido por igual. Habitualmente se utiliza EDTA con la solución de tripsina a fin de potenciar su actividad, ya que el Ca^{2+} interviene en muchas interacciones célula-célula mediadas por glicopéptidos calcio-dependientes (cadherinas).

Es importante minimizar la exposición de las células a la tripsina para preservar la máxima viabilidad celular. Por ello, cuando se tripsiniza el tejido completo a 37 °C, las células

disociadas deben recogerse en el menor tiempo posible y la tripsina debe ser eliminada mediante centrifugación y neutralizada añadiendo medio de cultivo con suero.

La disgregación con tripsina puede ser dañina (por ejemplo, para algunas células epiteliales), o inefectiva (lo que ocurre en tejidos muy fibrosos, como el tejido conectivo fibroso). En esos casos hay que utilizar otras enzimas. Dado que la matriz extracelular contiene gran cantidad de colágeno, especialmente en tejidos conectivos y músculo, la colagenasa parece la mejor solución para disgregar estos tejidos. Existen distintos tipos de colagenasas –la colagenasa más utilizada es la de *Clostridium histolyticum*–, y cada una de ellas está indicada para distintos tejidos: por ejemplo la de tipo I para tejido adiposo, adrenal e hígado; la de tipo II para hígado, hueso, tiroides, corazón y glándulas salivares; la de tipo III para tejido mamario; la de tipo IV para tejido pancreático, etc.

La pronasa, compuesta por una mezcla no específica de proteasas neutras y alcalinas, actúa más rápidamente que la tripsina y proporciona células menos agrupadas. La concentración de trabajo suele ser de 0'5 a 2 mg/mL. Al no existir inhibidores de la pronasa comparables a las potentes antitripsinas presentes en el suero, esta enzima precisa de lavados muy cuidadosos de las células para eliminarla por completo antes de iniciar los cultivos.

La participación de los carbohidratos en la adhesión intercelular ha conducido al uso de hialuronidasa y neuraminidasa en conjunción con la colagenasa. La hialuronidasa, obtenida de tejido bovino, ovino o de *Streptomyces hyalurolyticus*, es una polisacaridasa que actúa sobre el ácido hialurónico. Se suele utilizar a una concentración de 0'1-1 mg/mL para la disociación de diferentes tipos celulares, combinada con colagenasa y neuraminidasa.

La elastasa es una proteasa sérica que hidroliza elastina y otros sustratos proteicos. Se obtiene de páncreas bovino. La concentración de trabajo usual oscila entre 0'1 y 0'5 mg/mL. Se suele utilizar en combinación con otras enzimas.

8.2.4.3. Disgregación mecánica

El crecimiento de células a partir de explantes primarios es un proceso relativamente lento y puede ser altamente selectivo. La disgregación enzimática es un trabajo muy laborioso, aunque potencialmente proporciona un cultivo más representativo del tejido. Debido al alto riesgo que existe de que las células resulten dañadas durante la digestión enzimática, muchos investigadores prefieren la disgregación mecánica; por ejemplo, recogiendo las células que son liberadas del tejido cuando éste se hace pasar a través de filtros con un diámetro de poro cada vez más pequeño, o forzando a los fragmentos de tejido a pasar a través de una jeringa o simplemente pipeteando repetidamente.

8.3. Cultivos primarios de fibroblastos

A pesar de que resulta más cómodo trabajar con líneas establecidas, ya que no es necesario llevar a cabo todo el proceso de la extracción de las células a partir del organismo, y la velocidad de crecimiento y el rendimiento en cultivo son mucho más altos, nosotros hemos optado por trabajar con células en cultivos primarios dado que éstas reproducen con más precisión las propiedades de las células del organismo original *in vivo*, pues no pierden sus funciones especializadas como ocurre con las líneas establecidas. El principal objetivo de este trabajo es comprobar el efecto de diversos nutrientes sobre la producción del colágeno; por lo tanto es fundamental que las células en cultivo mantengan su capacidad para sintetizar esta proteína.

Las principales células productoras de colágeno en el organismo son los fibroblastos, que además presentan la ventaja de que son bastante fáciles de cultivar –de hecho, en la mayoría de cultivos se debe realizar algún tratamiento para evitar que proliferen estas células–. Por estas razones hemos comenzado nuestros experimentos poniendo a punto las técnicas de cultivos de células animales en nuestro laboratorio, cultivando fibroblastos.

8.3.1. Material biológico

La calidad del material biológico es un factor muy importante para que los experimentos salgan bien. A la hora de escoger el material biológico adecuado para este estudio tuvimos claro que éste debía estar lo más cercano posible, desde el punto de vista filogenético, al ser humano, con el objetivo de que los resultados obtenidos en esta investigación pudiesen ser extrapolados al ser humano. Por esta razón, optamos por utilizar en todos los casos tejidos obtenidos de mamíferos.

Existen muchas características que hacen que los ratones resulten atractivos como animales de experimentación. Los ratones son pequeños y fáciles de manipular, con una alta frecuencia de reproducción, su esperanza de vida es de 2-3 años y su costo de mantenimiento, aunque alto, es menor que el de animales mayores como las ratas. Así, hemos establecido el cultivo primario de fibroblastos a partir de embriones de ratón CD-1, ratón convencional que se caracteriza por tener gran cantidad de crías por camada (figura 8.6). Los embriones de ratón son una fuente muy apropiada para el cultivo de células fibroblásticas indiferenciadas [252], pues el tejido embrionario se dispersa más fácilmente y proporciona un mayor rendimiento de células proliferativas que el tejido adulto. El aumento en la dificultad para obtener células proliferativas viables a medida que aumenta la edad es debido a varios factores, incluyendo la diferenciación celular, el aumento del tejido conectivo fibroso y de la matriz extracelular y la reducción de las células proliferativas indiferenciadas.

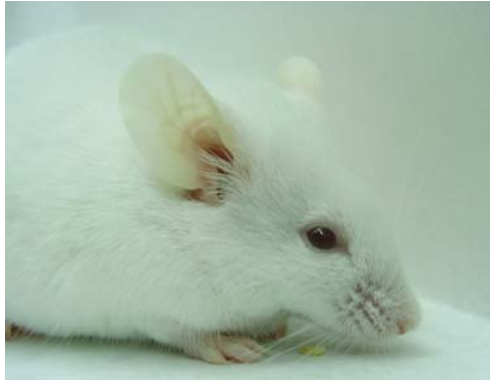


Figura 8.6. Ratón CD-1. Para el cultivo de fibroblastos se han empleado embriones de ratón, por tratarse de mamíferos, de fácil mantenimiento en el laboratorio, y constituir un material muy útil para la obtención de células indiferenciadas como los fibroblastos.

La gestación de los ratones dura entre 19 y 21 días. El momento óptimo para obtener cultivos a partir de la disgregación completa del embrión es alrededor del día 13 de gestación, cuando los fetos son relativamente grandes, pero aún contienen una alta proporción de mesénquima indiferenciado, que supone la principal fuente del cultivo. En nuestro laboratorio mantenemos las hembras y los machos de ratón en jaulas separadas hasta el momento del apareamiento. Generalmente, si los machos y las hembras se mantienen en jaulas separadas, cuando se disponen juntos, el estro será inducido en la hembra en los tres días siguientes. Con el objetivo de saber si la hembra ha quedado preñada, comprobamos la aparición de un tapón mucoso en la entrada de la vagina a primera hora de la mañana, indicativo de que ha tenido lugar la cópula. El momento en el que se detecta el tapón en la vagina es el día 0, y el desarrollo de los embriones se cuenta a partir de esta fecha. Este proceso nos permite planificar la producción de embriones en el tiempo.

8.3.2. Procedimiento experimental

Las hembras de ratón con 13 días de gestación se sacrifican mediante dislocación cervical, mientras se sujeta al animal por la cola, se apoya un lápiz u objeto similar en el cuello y se tira en ambos sentidos, provocando el menor sufrimiento posible al animal (figura 8.7). Las hembras preñadas de las que obtenemos los embriones suelen tener un peso que oscila entre 26 y 72 gramos, y el número de fetos puede variar de 5 a 18, aunque lo normal es que esté entre los 11 y los 13 fetos.



Figura 8.7. Sacrificio de una hembra de ratón preñada en el día 13 de gestación mediante dislocación cervical.

Durante el proceso de obtención de los embriones es fundamental mantener las máximas condiciones de asepsia. Para diseccionar asépticamente el útero de la hembra de ratón debemos, en primer lugar, esterilizar la superficie ventral del animal con alcohol al 70%.

Todo el material quirúrgico empleado debe estar estéril. Para extraer el útero se separa la piel con ayuda de unas pinzas y se realiza una incisión longitudinal en la piel con unas tijeras, dejando expuesto el útero lleno de embriones en la cavidad abdominal (figura 8.8). Este proceso se realiza bajo las condiciones asépticas que nos proporciona el área de trabajo de la cabina de flujo laminar.



Figura 8.8. Aspecto del útero de una hembra preñada, durante la disección. Una vez sacrificada la hembra gestante mediante dislocación cervical se procede a la disección y la extracción del útero con los embriones. Se realiza un corte en el abdomen y se retira la piel con la ayuda de unas pinzas y unas tijeras estériles. De esta forma, el útero queda visible, se lava con PBS y se procede a la extracción de los embriones.

El útero se extrae con unas tijeras y unas pinzas estériles, con mucho cuidado para evitar ejercer demasiada presión sobre los embriones (figura 8.9). Es importante conservar la humedad del tejido una vez que se ha extraído, por lo que debe mantenerse en un buffer o en el medio de cultivo. En nuestro caso, una vez recogido el útero lo colocamos en una placa

de Petri estéril que contiene unos 20-25 mL de PBS enriquecido con antibióticos, precalentado a 37 °C, para conservar el tejido y eliminar los restos de sangre.



Figura 8.9. Dissección del útero de una hembra de ratón preñada.

El siguiente paso consiste en liberar los embriones de las paredes uterinas y de las placentas (figura 8.10), y disponerlos en otra placa de Petri estéril con PBS enriquecido con antibióticos. Generalmente, las hembras de ratón CDI gestantes tienen alrededor de 11-13 fetos, y se recogen todos.



Figura 8.10. Liberación de un embrión de ratón del útero materno.

Una vez liberados los fetos tenemos que obtener una suspensión de sus células. Para ello existen tres métodos posibles: la disgregación mecánica, la disgregación enzimática o la técnica de los explantes. Generalmente, empleamos la disgregación mecánica por ser la técnica más rápida y la que proporciona mayores porcentajes de viabilidad.

Utilizando un bisturí que permita realizar un corte preciso para causar el menor daño posible a las células, se elimina la cabeza y las patas del embrión. El resto se pasa a una placa de Petri con medio de cultivo DMEM, precalentado a 37 °C y enriquecido con antibióticos y un 10% de suero, y posteriormente se prensa pasándolo a través de una jeringuilla de plástico estéril de 10 mL (figura 8.11).



Figura 8.11. Obtención de la pulpa embrionaria mediante presión de los embriones a través de una jeringa estéril de 10 mL.

Sobre un tamiz de 100 μm de diámetro de poro se coloca la pulpa obtenida y, vertiendo sobre ella gotas de medio de cultivo, se tamiza presionando con el émbolo de otra jeringa (figura 8.12). La suspensión celular así obtenida se recoge en un tubo de centrifuga de 35 mL estéril y se centrifuga a 1.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 25 mL de medio de cultivo se estiman la viabilidad y el número de células.

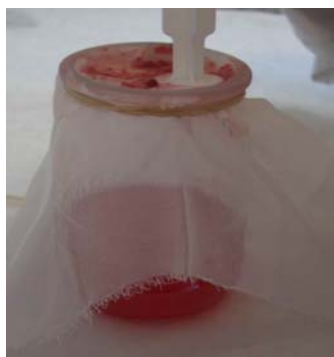


Figura 8.12. Establecimiento de cultivos primarios mediante disgregación mecánica. La pulpa embrionaria obtenida tras forzar el paso de los embriones a través de una jeringuilla de 10 mL es tamizada y recogida en el medio de cultivo.

Para el recuento y la estimación de la viabilidad celular se emplea el método de tinción con azul Tripán para el que sólo se necesita una cámara de recuento celular, por ejemplo la cámara de Neubauer, y un microscopio. Una cámara de recuento celular es un dispositivo en el que se coloca una muestra de la suspensión celular a evaluar. El dispositivo presenta unas señales que determinan un volumen conocido. Al contar bajo el microscopio el número de partículas presentes en ese volumen se puede determinar la densidad de partículas en la suspensión de origen.

En nuestro caso utilizamos la cámara de Neubauer, que es una cámara de recuento adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con un diamante una cuadrícula como la que se muestra en la figura 8.13. Es un cuadro de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0'25 mm. Así pues, el área sombreada y marcada como L, y que en el microscopio se ve como una cuadrícula de 16 pequeños cuadros de 0'25 mm de lado, corresponde a 1 milímetro cuadrado. Ya que la altura entre cubre y cámara es de 0'1 mm, el número de células por mL se obtiene al multiplicar por 10^4 el número de células contadas. Si contamos las cuatro áreas sombreadas (L) observando un total de x células entre las cuatro áreas, la concentración en la suspensión celular (células/mL) será $(10.000 \cdot x) / 4$.

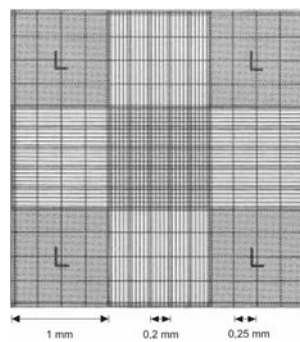


Figura 8.13. Cámara de recuento celular. Existen numerosas cámaras de contaje celular adaptadas a su uso en microscopía. En la imagen se observa una cámara de Neubauer.

Tras resuspender bien el precipitado mediante pipeteo vigoroso, se toman $100 \mu\text{L}$ de la suspensión celular y se depositan en un tubo de microcentrífuga que contiene una alícuota de $100 \mu\text{L}$ de la disolución de azul Tripán, agitando suavemente durante unos minutos para dar tiempo a que el colorante penetre en las células muertas. A continuación se llena la cámara de recuento tocando el borde del cubreobjetos con la punta de la pipeta y permitiendo que la muestra penetre por capilaridad entre la cámara y el cubre, pero sin que este espacio rebose. En caso de utilizar colorante, a la hora de estimar el número de células tendremos que tener en cuenta la dilución practicada y multiplicar por 2 el resultado del recuento para obtener el número de células viables por mililitro de la muestra inicial. El porcentaje de células viables será: $(\text{número de células viables} / \text{número de células totales}) \times 100$.

Una vez conocida la concentración de células de la suspensión original, se ajusta la concentración del cultivo a 10^5 células/mL diluyendo con medio DMEM con 10% FBS y 1% de antibióticos, y se siembran 18 mL de esta nueva suspensión en frascos de cultivo de 75 cm^2 o 5 mL en frascos de 25 cm^2 . En el extracto embrionario obtenido también se encuentran células sanguíneas, células epiteliales, etc. además de los fibroblastos. Sin embargo, la gran

abundancia de fibroblastos en el tejido embrionario y su gran velocidad de crecimiento en cultivo permitirá obtener cultivos altamente homogéneos de estas células en unas pocas generaciones. Los fibroblastos se mantienen a 37 °C en una atmósfera de CO₂ 5%, O₂ 5% y N₂ 90%, con 85% de humedad.

8.4. Cultivos primarios de condrocitos

Para comprobar mejor nuestras hipótesis de trabajo era fundamental desarrollar cultivos primarios de condrocitos con objeto de estudiar la influencia de diversos factores nutritivos sobre la biosíntesis de colágeno tipo II, el principal constituyente del cartílago articular.

Los condrocitos aislados, sembrados a una alta densidad, forman una monocapa sobre superficies de plástico. Aproximadamente, el 60-70% de células se adhieren a la superficie del cultivo y forman una monocapa a las 24 horas [249]. Una vez que se han adherido a la superficie de cultivo comienzan a resintetizar matriz extracelular, que queda totalmente establecida después de 3-4 días de cultivo y es morfológicamente indistinguible de la normalmente sintetizada por los condrocitos *in vivo*, formada por proteoglicanos dispersos en una densa red de colágeno [36,249].

Los condrocitos se mantienen fenotípicamente estables en cultivo primario durante varias semanas (figura 8.14), sintetizando y acumulando colágeno tipo II y proteoglicanos, tanto monoméricos como agregados, característicos del tejido de origen [250,253,254]. Por lo tanto, el cultivo de condrocitos bovinos es un buen modelo experimental para estudiar los componentes de la matriz extracelular del cartílago, ya que los condrocitos aislados *in vitro* son capaces de producir una matriz similar a la del cartílago *in vivo* [249,250].

8.4.1. Material biológico

Para el cultivo de condrocitos se necesita una fuente adecuada de cartílago articular. Nosotros escogimos las articulaciones metacarpofalángicas de bovinos jóvenes por varias razones. En primer lugar, por su tamaño, pues siempre es mucho más fácil extraer muestras de cartílago de las grandes articulaciones de un novillo, que de las pequeñas articulaciones de un ratón o de una rata. En segundo lugar, por la relativa facilidad con la que podíamos adquirirlas, ya que el matadero insular, donde sacrifican el ganado vacuno de Tenerife, nos queda a tan sólo unos 20 minutos del laboratorio y, afortunadamente, las patas de las que obtenemos la articulación metacarpofalángica son descartadas durante la matanza. En tercer lugar, necesitábamos una fuente de condrocitos que produjera colágeno tipo II para el que existiesen anticuerpos comerciales, para llevar a cabo los ensayos de determinación de la cantidad de colágeno.

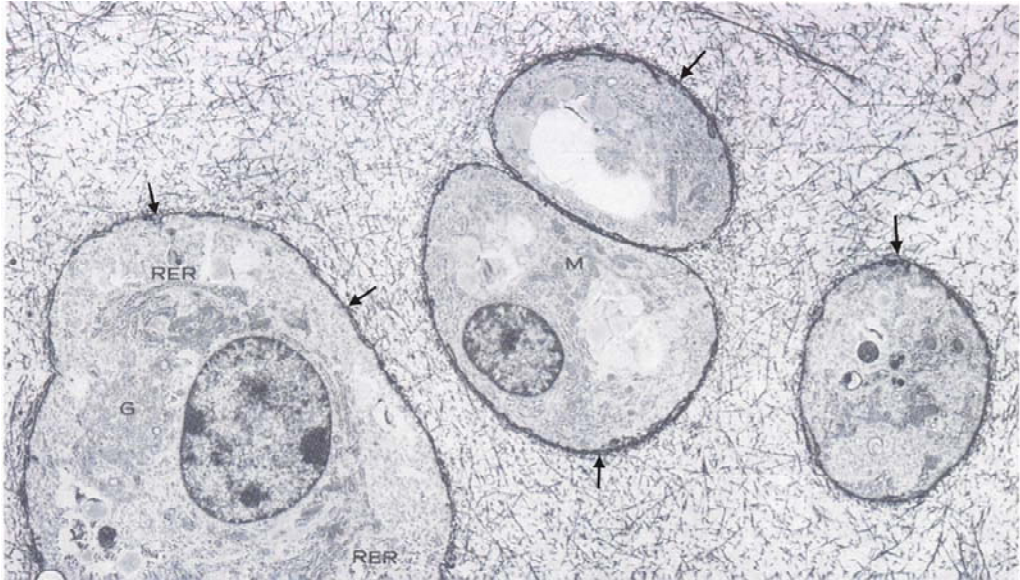


Figura 8.14. Condrocitos del cartilago articular bovino cultivados *in vitro* [251]. Estas células muestran un retículo endoplásmico rugoso (RER) y un complejo de Golgi (G) bien desarrollados. Los condrocitos están rodeados por una matriz pericelular (flechas). La matriz extraterritorial es abundante y está compuesta por una densa red de colágeno fibrilar. Los proteoglicanos se encuentran a intervalos regulares a lo largo de las fibrillas de colágeno.

En el matadero se realiza el sacrificio de ganado vacuno dos días a la semana, sobre las 6.00 de la mañana. En ese momento es preciso estar allí para controlar las condiciones de obtención de las muestras y evitar en lo posible la degeneración del tejido. Todas las muestras de cartilago fueron tomadas lo más asépticamente posible de las articulaciones (figura 8.15) de bovinos de menos de doce meses de edad. En el mismo matadero limpiamos bien con agua caliente a presión la piel de la pata y la pezuña y la esterilizamos con alcohol de 96°. Los empleados del matadero, que siempre mostraron un gran afán y disposición de colaboración con nuestro trabajo, retiraban la piel a las muestras, una vez limpia y estéril, con mucho cuidado para no llegar a descubrir el hueso y el cartilago, y rápidamente las introducíamos en bolsas limpias que eran transportadas inmediatamente al laboratorio en neveras portátiles con hielo. Por lo general, cada vez que realizábamos un cultivo de condrocitos utilizábamos cuatro articulaciones.

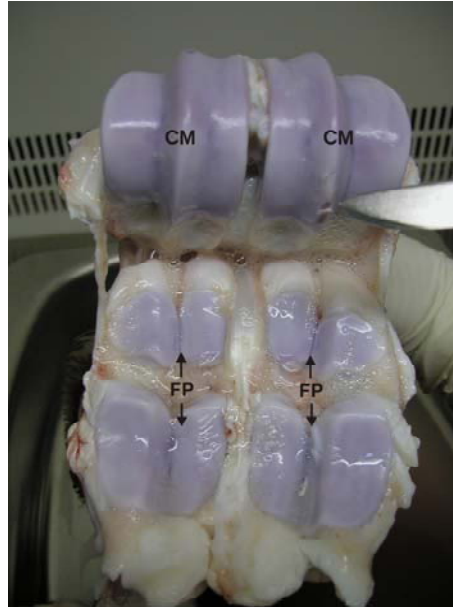


Figura 8.15. Fotografía en la que se muestra el cartílago de la articulación metacarpofalángica de un novillo de menos de 12 meses de edad. La articulación metacarpofalángica de un bovino fue abierta y el hueso metacarpiano fue inclinado hacia atrás. Están expuestas las superficies articulares de la cabeza metacarpiana (CM) y el hueso de las dos falanges proximales (FP). El cartílago se escinde de las superficies articulares con un bisturí.

8.4.2. Procedimiento experimental

El protocolo para el aislamiento y cultivo de condrocitos bovinos ha sido parcialmente modificado a partir del utilizado por otros autores [149,171,172,214,217,248,249].

El aislamiento de los condrocitos se lleva a cabo con relativa facilidad, ya que los fragmentos de cartílago no contienen pericondrio ni otros tejidos conectivos no cartilagosos. Este procedimiento de aislamiento emplea digestiones secuenciales de los fragmentos de cartílago con hialuronidasa, pronasa y colagenasa.

Una vez en el laboratorio, lavamos los restos de sangre y pelos que han podido quedar en la pata, con solución salina, y la introducimos en una bandeja metálica dentro de la cabina de flujo laminar. Con un bisturí estéril vamos eliminando capas musculares hasta descubrir la superficie articular, tal y como se muestra en la figura 8.15. Para eliminar restos celulares y el abundante líquido sinovial lavamos la superficie articular con solución salina de Hank. Los fragmentos de cartílago se recogen raspando con un bisturí estéril las superficies articulares y, seguidamente, se lavan exhaustivamente en una placa de Petri que contiene solución salina de Hank con antibióticos: penicilina (100 U/mL), estreptomina (100 μ g/mL) y gentamicina (50

$\mu\text{g/mL}$); en la cabina de flujo laminar. Posteriormente, troceamos el cartílago en piezas de 1 a 3 mm^2 , que a continuación son digeridas en una disolución estéril de HBSS enriquecido con hialuronidasa (2.000 U/mL) y pronasa (30 U/mL) durante 60 minutos a 37 °C en un baño con agitación suave. Esta digestión inicial con pronasa y hialuronidasa es clave en este protocolo de aislamiento, ya que de esta forma se digieren los proteoglicanos dejando al descubierto una red de fibrillas de colágeno parcialmente desenmascaradas y, por tanto, más susceptibles a la digestión posterior con colagenasa.

A continuación, los fragmentos de cartílago se lavan tres veces con HBSS para retirar la hialuronidasa y la pronasa, y son transferidos a un vaso de precipitados que contiene 15 mL de la disolución de colagenasa (8 U/mL) en medio Ham F12 con un 10% de suero bovino fetal, 100 U/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomina a 37 °C durante siete horas en un baño con agitación suave. Durante estas siete horas la red de colágeno extracelular es digerida y las células son liberadas al medio de cultivo. Además, los fibroblastos no resisten este tratamiento prolongado con colagenasa, con lo que conseguimos eliminar su posible contaminación.

Transcurridas las siete horas de incubación con colagenasa filtramos la suspensión celular a través de una malla de nylon de unos 90 μm de diámetro de poro, en la que quedan retenidos los restos de cartílago sin digerir. La suspensión celular así obtenida se centrifuga a 400 g durante 10 minutos para eliminar los restos de colagenasa. El sobrenadante, con la colagenasa, se descarta, y el precipitado celular se resuspende en 10 mL de medio basal (Ham F12 con un 10% de FBS y un 1% de antibióticos).

El recuento de células viables en la suspensión final se realiza mediante el método de exclusión con azul Tripán con el hemocitómetro (cámara de Neubauer). Las células se siembran a una densidad de 15^5 células/mL en cubreobjetos gelatinizados dispuestos en placas de Petri de 60 mm Ø para los estudios de caracterización celular, y en los pocillos de una placa de 24 pocillos para los estudios de crecimiento celular y de estimulación de la síntesis de colágeno. Los condrocitos se mantienen en el incubador de CO_2 a 37 °C en una atmósfera de CO_2 5%, O_2 5%, N_2 90% y 85% de humedad. A las veinticuatro horas se realiza el primer cambio de medio, una vez que las células han tenido tiempo para adaptarse y adherirse al sustrato.

Estas células pierden su fenotipo cuando permanecen demasiado tiempo en cultivo, pasando a producir colágeno tipo I en lugar del colágeno tipo II característico de los condrocitos [214,255-257]. El alcance de este fenómeno puede verse influido por diversos factores, tales como la densidad de siembra, la edad de las células en el cultivo y la composición del medio de cultivo [258]. Debido a estos cambios, los condrocitos en este trabajo fueron cultivados a una alta densidad, con una baja tensión de oxígeno (O_2 5%) y el tiempo de cultivo se limitó a 15 días; de forma que nunca llegamos a observar cambios fenotípicos en nuestros cultivos.

8.5. Experimentos de estimulación

En estos experimentos hemos modificado las condiciones de cultivo, con el fin de determinar la forma de estimular la síntesis de colágeno modificando las concentraciones de aminoácidos del medio. Para ello hemos estudiado los aminoácidos más abundantes de la molécula de colágeno, que son la glicina, la prolina y la lisina, aunque también hemos probado otros aminoácidos, como el ácido aspártico o la isoleucina.

8.5.1. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento de fibroblastos

Los fibroblastos se siembran como se detalla más arriba en frascos de cultivo de 75 cm², a una concentración de 10⁵ células/mL, y se mantienen a 37 °C en una atmósfera de O₂ 5%, CO₂ 5% y N₂ 90%, con 85% de humedad.

Los cambios de medio se realizan cada 48 horas; de esta forma se eliminan residuos y se aporta medio fresco para las células. El medio usado se aspira con la ayuda de una pipeta Pasteur conectada a una bomba de aspiración. A continuación, se añaden 18 mL de PBS-A a 37 °C, con antibióticos, para limpiar bien los restos de medio; después se retira el PBS-A y se añaden 18 mL de medio fresco a cada frasco de cultivo.

Para obtener suficientes fibroblastos para llevar a cabo los experimentos se deja que las células se reproduzcan. Cuando los cultivos alcanzan el 90% de confluencia, transcurridos siete días aproximadamente, se realiza el subcultivo, o pasaje de las células a otro recipiente de cultivo.

8.5.1.1. Subcultivo de células

Las células que crecen en monocapa sobre superficies de vidrio o plástico han de ser suspendidas periódicamente por medio de diversos agentes como tripsina y/o EDTA, y ser transferidas a nuevos frascos, doblando o triplicando el volumen de medio.

Para el subcultivo de células se debe retirar cuidadosamente el medio del frasco de cultivo que contiene la línea celular, mediante aspiración, evitando que queden restos, ya que la presencia de suero podría inhibir la acción de la tripsina. Por ello, tras retirar el medio de cultivo, se lava la capa celular con 18 mL de PBS-A enriquecido con antibióticos y precalentado a 37 °C. Tras retirar el PBS-A, se añaden 5 mL –un volumen suficiente como para cubrir la monocapa de células– de la disolución de tripsina a 37 °C, y se mantiene en la capa celular durante 2 minutos para dar tiempo a que penetre entre las células. A continuación se retira la tripsina, dejando tan sólo unas gotas en el frasco de cultivo, y se incuba a 37 °C durante 15 minutos en el incubador de CO₂ para que la tripsina actúe hidrolizando las proteínas. El tiempo necesario para despegar las células de la superficie de cultivo depende del

tipo y la densidad celular, la concentración de suero en el medio de cultivo, la actividad de la tripsina, y el tiempo transcurrido desde el último subcultivo.

Tras esta incubación de 15 minutos, se golpea ligeramente el frasco de cultivo contra la palma de la mano para separar las células de la superficie y se comprueba con el microscopio que las células se han soltado del frasco. Inmediatamente se añaden 5 mL de medio de cultivo con suero a 37 °C en el recipiente donde se ha realizado la tripsinización para inactivar la acción de la tripsina. Con una pipeta Pasteur, se lava el frasco tomando el medio de cultivo y proyectándolo sobre la capa de células para favorecer su separación. La suspensión de células así obtenida se recoge en un tubo de centrifuga estéril y se centrifuga a 1.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, para decantar el sobrenadante y eliminar cualquier resto de tripsina. El precipitado celular se resuspende en 5 mL de medio de cultivo precalentado a 37 °C y se determina su viabilidad mediante el método de tinción con azul Tripán. Entonces se siembran 10^5 células/mL en los pocillos de una placa de 24 pocillos para los experimentos de proliferación y estimulación de la síntesis de colágeno, y en placas de Petri de 60 mm, que contienen cubreobjetos tratados con gelatina, para los experimentos de caracterización celular.

Transcurridas 24 horas tras el subcultivo, se cambia el medio de cultivo basal por medio basal enriquecido con diferentes concentraciones de aminoácidos, con el fin de caracterizar el papel de los mismos en la proliferación celular y en la síntesis de colágeno. Las concentraciones utilizadas para cada aminoácido en experimentos independientes fueron de 0'025 mg/mL, 0'05 mg/mL, 0'1 mg/mL, 0'5 mg/mL, 1 mg/mL, 5 mg/mL y 10 mg/mL; además del control basal, sin suplemento alguno.

8.5.1.2. Medios de cultivo enriquecidos

Para elaborar los medios enriquecidos se preparan, en primer lugar, 3 litros de medio DMEM basal. A continuación, se añaden 80 mL de este medio en un vaso de precipitados en un agitador magnético y se añade la cantidad adecuada del aminoácido objeto de estudio. Se vuelve a ajustar el pH a 7'2 y se enrasa con medio basal hasta el volumen final de 100 mL en un matraz aforado. Inmediatamente las disoluciones se disponen en botellas estériles de 100 mL a través de filtros de 0'2 μ m, trabajando siempre en la cabina de flujo laminar. Las disoluciones se conservan a 4 °C hasta su utilización; entonces se añaden 400 μ L del *stock* de antibióticos y 10 ó 5 mL de suero bovino fetal, en función del experimento que se vaya a realizar.

Las células se incuban durante 7 días más con los medios enriquecidos. A lo largo de este periodo se recogen muestras de las células para estudiar la influencia de los distintos suplementos en la proliferación celular. Al final del periodo de estimulación, en el día 8 de cultivo, se determina la cantidad de colágeno producida con cada tratamiento.

8.5.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento de condrocitos

Utilizamos cultivos de condrocitos sin realizar ningún pase, ya que se ha demostrado que la expresión de moléculas características de estas células, como el colágeno tipo II y los agreganos, disminuye a medida que se realizan subcultivos [215,254]. Por lo tanto, para evitar que las células pierdan su fenotipo hemos utilizado cultivos de condrocitos obtenidos directamente del tejido, sin realizar ningún pase.

Los condrocitos se cultivan tal y como se ha descrito más arriba. La concentración usual de sembrado es tan alta (150.000 células/mL) debido a que se ha descrito que los condrocitos cultivados a una alta densidad continúan sintetizando colágeno tipo II, mientras que si se siembran a baja densidad pierden gradualmente su capacidad para sintetizar colágeno tipo II y pasan a sintetizar colágenos tipo I y tipo III [256]. Al cabo de 24 horas, se cambia el medio basal (Ham F12 con un 10% de FBS y un 1% de antibióticos) por medio basal enriquecido con distintas concentraciones de glicina, prolina o lisina. Las concentraciones de cada uno de estos aminoácidos fueron las mismas que las utilizadas en los cultivos de fibroblastos y la preparación de medio Ham F12 enriquecido se hace siguiendo el mismo esquema que para la preparación de medio DMEM enriquecido.

Las células se incuban durante 2, 4, 6, 8, 10, 12 ó 14 días más con los medios enriquecidos. Al final del periodo de estimulación, en el día 3, 5, 7, 9, 11, 13 ó 15 de cultivo, se determina la cantidad de colágeno en el medio de cultivo y en la capa de células.

8.6. Caracterización de los cultivos celulares mediante inmunofluorescencia indirecta

La observación de la morfología celular es la técnica más simple y directa para identificar las células. El hecho de que las muestras a observar se encuentren en recipientes de un cierto grosor hace que un microscopio convencional no sea adecuado (por su pequeña distancia frontal), por lo que se utilizan microscopios en los que la fuente de iluminación y los objetivos se encuentran invertidos respecto a la platina de un microscopio óptico convencional. La fuente de luz y el condensador están sobre la plataforma apuntando hacia abajo. Los objetivos y la torrecilla están debajo de la plataforma apuntando hacia arriba. Las únicas partes que están en disposición normal son el tubo binocular o trinocular, y la muestra que se coloca sobre la plataforma o platina mecánica.

A diferencia de los microscopios electrónico y óptico, el microscopio invertido permite observar organismos o tejidos en cultivo sin una preparación previa, favoreciendo la monitorización del estado de crecimiento, comportamiento y demás parámetros involucrados en el desarrollo del cultivo.

La segunda característica que condiciona el instrumento óptico utilizado en los cultivos celulares es la ausencia de color, es decir se trata de muestras vivas y con poco contraste. Por ello el microscopio se equipa con el dispositivo de contraste de fases (diafragmas anulares en el condensador y placa de fases entre las lentes del objetivo). De esta forma aumenta el contraste de la imagen y la calidad obtenida es muy superior. Además, es de gran utilidad disponer asimismo de un dispositivo de captación de imágenes, fotográfico o de video, acoplado al microscopio a fin de documentar el estado de los cultivos.

En nuestro laboratorio hemos adquirido un microscopio de contraste de fases invertido (Leica DM IL), con una lámpara de fluorescencia y un bloque de filtros para fluorescencia, que lleva adaptado una cámara digital (Leica DC 180).

Sin embargo, la identificación de las células mediante la observación de su morfología presenta ciertos inconvenientes que deben ser tenidos en cuenta, pues la morfología de las células en cultivo varía con la etapa del crecimiento, la densidad celular, el medio y el sustrato de cultivo. Por estas razones hemos optado por utilizar la inmunofluorescencia para la caracterización de nuestras células.

Existen anticuerpos específicos para el colágeno tipo I sintetizado por fibroblastos de ratón y anticuerpos específicos para el colágeno tipo II sintetizado por los condrocitos bovinos. Si nuestros cultivos expresan estas proteínas específicas y podemos detectarlas con anticuerpos podremos asegurar que se trata de fibroblastos y de condrocitos respectivamente.

8.6.1. Fundamento de la inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica inmunohistoquímica, o más concretamente inmunocitoquímica (la detección de antígenos en los tejidos se conoce como *inmunohistoquímica*, mientras que la detección en células en cultivo se denomina generalmente *inmunocitoquímica*) empleada para identificar antígenos específicos, que consiste en conjugar colorantes fluorescentes con anticuerpos, exponiendo después este conjugado a los antígenos correspondientes en cortes de tejidos, frotis de microorganismos o de células, o cultivos de tejidos en monocapa. Cuando la reacción es positiva y se expone a la luz de longitud de onda adecuada, se produce fluorescencia con emisión de luz visible.

El fenómeno se observa con el microscopio de fluorescencia, el cual es similar al microscopio convencional, a excepción de que la luz incidente, procedente de una potente lámpara, atraviesa dos series de filtros —uno para interceptar la luz antes de que llegue a la muestra y otro para filtrar la luz obtenida a partir de la muestra. El primer filtro se selecciona de manera que sólo permita el paso de las longitudes de onda que excitan a un determinado colorante fluorescente, mientras que el segundo filtro bloquea esta luz y permite el paso de las longitudes de onda emitidas cuando el colorante emite fluorescencia.

La inmunofluorescencia puede desarrollarse de forma directa o indirecta. La inmunofluorescencia directa es una técnica que consiste en demostrar la presencia de un antígeno mediante reacción directa con un anticuerpo específico marcado con un colorante fluorescente (fluorocromo). En el método indirecto se utilizan dos anticuerpos en lugar de uno: el primero (sin marcaje) es destinado al reconocimiento antigénico, mientras que el segundo (marcado) es dirigido contra epítopes del primero, a los que se une. De esta manera se consigue abaratar costes, ya que así se puede disponer de una misma gama de anticuerpos secundarios marcados que pueden ser usados contra distintos antígenos. Asimismo, se introduce la posibilidad de unir dos anticuerpos marcados dirigidos contra el mismo anticuerpo primario, aumentando la sensibilidad de la técnica.

Existen infinidad de fluorocromos y, a medida que avanza el desarrollo del campo, aparecen más y mejores, pero entre los más conocidos podemos destacar la rodamina o el isotiocianato de fluoresceína (FITC) (tabla 8.10).

Tabla 8.10. Diferentes tipos de marcadores fluorescentes utilizados en técnicas inmunocitoquímicas como la inmunofluorescencia.

Fluorocromo	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Apariencia
Cy3	550	680	Naranja, rojo
Cy5	650	680	Naranja, rojo
Fluoresceína (FITC/DATF)	495	528	Verde
Rodamina	539/574	602	Rojo
Texas Red	558/594	623	Rojo

8.6.2. Procedimiento

Para los experimentos de inmunofluorescencia, las células deben crecer sobre superficies de vidrio fácilmente manejables. En nuestro caso utilizamos cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro (Afora).

Los cubres sobre los que van a crecer las células se deben esterilizar pasándolos por alcohol y por una llama en la cabina de flujo laminar. Una vez estériles se colocan en el fondo de una placa de Petri de 60 mm utilizando unas pinzas para cubreobjetos y procurando que queden adheridos al fondo de la placa.

Como ya hemos explicado arriba, las células crecen muy bien sobre soportes de plástico tratado, pero para lograr que se adhieran al vidrio, éste debe ser previamente gelatinizado añadiendo 5 mL de la disolución de gelatina 0'5% en la placa que contiene los cubreobjetos, e incubando a 4 °C durante toda la noche.

Al día siguiente se retira el exceso de gelatina con una pipeta Pasteur conectada a un aspirador, en la cabina de flujo laminar, y se inoculan las células a una concentración de 10^5 células/mL para los fibroblastos y de 15×10^5 células/mL para los condrocitos. Tras la siembra, las células se incuban a 37°C en una atmósfera con CO_2 5% y 85% de humedad hasta que alcanzan la confluencia, realizando cambios de medio cada 48 horas.

Antes de iniciar las incubaciones con los anticuerpos se han de realizar diversas preincubaciones y lavados a fin de facilitar la penetración de los anticuerpos y disminuir el marcaje inespecífico. Una vez que los cultivos alcanzan la densidad adecuada se lavan los cubres con PBS-azida, teniendo la precaución de que la cara del cubre sobre la que están las células esté siempre hacia arriba (figura 8.16).

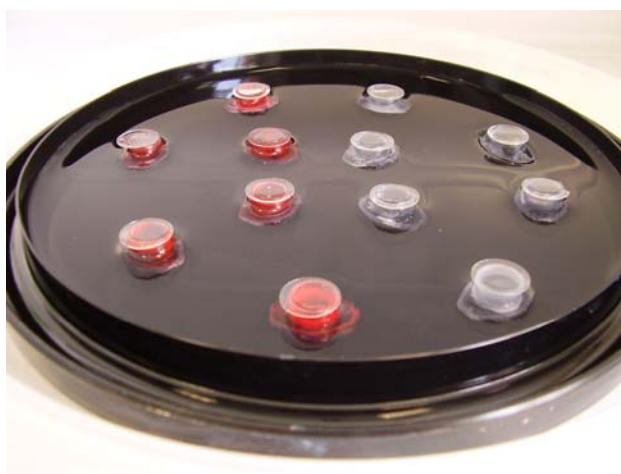


Figura 8.16. Dispositivo de incubación diseñado en nuestro laboratorio para realizar las incubaciones en la inmunofluorescencia. Las tapas de viales de microcentrifuga nos sirven como soporte para apoyar los cubreobjetos con la cara que contiene las células mirando hacia arriba.

El primer paso en la inmunofluorescencia es fijar la estructura original de las células, para lo cual se incuban los cubres con $100\ \mu\text{L}$ de la disolución de fijación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Debido a que el tratamiento de los cubres requiere de un cuidado exquisito tuvimos que idear un sistema que nos facilitase su procesamiento. Para las incubaciones diseñamos un soporte utilizando tapas de tubos de microcentrifuga pegadas a una superficie plástica, tal y como se observa en la figura 8.16. Los cubreobjetos se colocan sobre estos soportes con la cara que contiene las células siempre hacia arriba.

Tras tres lavados de 30 segundos en PBS eliminamos la solución de fijación y procedemos a eliminar la autofluorescencia tratando las células con la disolución de borohidruro sódico durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los lavados se hacen en una cubeta, también diseñada en nuestro laboratorio con el soporte de una placa multipocillo en la que se realizan

las incisiones precisas para adaptar los cubreobjetos (figura 8.17). Tras eliminar el borohidruro con tres lavados en PBS se permeabilizan las células mediante tratamiento con la disolución de permeabilización durante 10 minutos a temperatura ambiente.

A continuación se elimina la disolución de permeabilización lavando con PBS y se incuban las células con 100 μL de la disolución de bloqueo durante 10 minutos a temperatura ambiente para minimizar la adsorción inespecífica de los anticuerpos.

Tras el bloqueo se realizan tres lavados con PBS y se incuban 1 hora a temperatura ambiente con 50 μL /cubre de la disolución apropiada del anticuerpo primario diluido en PBS/3% BSA. Siempre se deja algún cubre sin incubar con anticuerpo primario (sólo con 50 μL de PBS/3% BSA) como control del anticuerpo secundario.

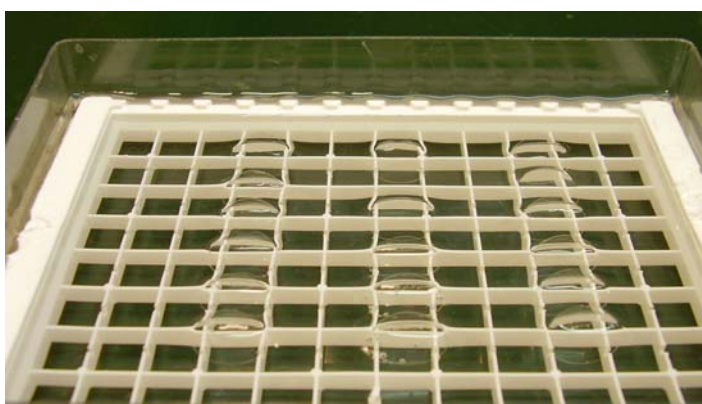


Figura 8.17. Soporte para realizar los lavados de las células durante la inmunofluorescencia. Se trata de un dispositivo diseñado en nuestro laboratorio utilizando el soporte de una placa de 96 pocillos en el que se han realizado varios cortes para adaptar los cubreobjetos.

En la inmunofluorescencia de los fibroblastos se emplea un anticuerpo primario de conejo anti-colágeno tipo I/III de ratón (Calbiochem) diluido 1:20 en PBS/3% BSA. Este anticuerpo policlonal producido en el conejo es una inmunoglobulina G que reconoce el colágeno tipo I y el tipo III de humanos, ratón y rata. En el caso de los condrocitos se utiliza un anticuerpo primario de ratón específico para el colágeno tipo II (LabVision) a una dilución 1:25 en PBS/3% BSA. Una vez preparada la dilución del anticuerpo se centrifuga durante 5 minutos a 10.000 rpm en la microcentrífuga a 4 °C para eliminar agregados y reducir fondo.

La dilución del anticuerpo es un aspecto fundamental en la secuencia inmunocitoquímica. Las concentraciones han de ser lo más elevadas posible sin aumentar el marcaje inespecífico: cuando la concentración de anticuerpo es muy elevada se une demasiado anticuerpo inespecíficamente, lo que aumenta el ruido de fondo. Si por el contrario, la concentración de anticuerpo es muy baja, la señal es demasiado débil, y no se puede medir con exactitud.

Otros factores de gran importancia, que influyen en la dilución, en la eficiencia en la detección y en la sensibilidad de los protocolos inmunocitoquímicos, son el tiempo de incubación con el anticuerpo y la temperatura. El anticuerpo primario puede estar en contacto con la muestra entre 1 y 72 horas, dependiendo del grosor de la muestra, del grado de permeabilización, del título del anticuerpo y de la afinidad. Los efectos beneficiosos del aumento del tiempo de incubación varían entre los diferentes anticuerpos, pero en algunos casos producen un aumento en el marcaje de 100 veces respecto a las incubaciones de tiempo corto. Sin embargo, es necesario tener presente que, con anticuerpos de baja afinidad, los tiempos largos de incubación pueden aumentar el ruido de fondo. Respecto a la temperatura, se recomienda trabajar a temperaturas bajas (4 °C) para incubaciones largas (> 12 h) y a temperatura ambiente (20-22 °C) o superior (37 °C) para incubaciones cortas.

Tras la incubación con el anticuerpo primario se realizan tres lavados de 10 minutos todos ellos en PBS, para eliminar el exceso de anticuerpo no unido, y se procede a realizar la incubación con el anticuerpo secundario marcado. En el caso de los fibroblastos se utiliza un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo conjugado a FITC (Calbiochem), a una dilución 1:100 y, en el caso de los condrocitos, un anticuerpo secundario de oveja anti-IgG de ratón conjugado a FITC (Stressgen) a una dilución 1:100. Se añaden 50 μ L de la disolución del anticuerpo secundario sobre cada cubreobjetos y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda y oscuridad.

Por último, se realizan tres lavados de 10 minutos cada uno en PBS. Se pasan los cubres por agua destilada, secando el exceso de agua con papel de filtro, se pasan por etanol, se seca el exceso sobre papel de filtro y se procede al montaje de los cubreobjetos. Para ello se deposita una gota del medio de montaje (Fluoromount-G, SouthernBiotech) con la ayuda de una punta de pipeta sobre el portaobjetos; se coloca suavemente el cubre con las células boca abajo sobre la gota de medio, y se presiona el cubre y el porta entre dos capas de papel de filtro para que quede exclusivamente una fina capa de medio de montaje entre ambos. Se deja secar una noche, y al día siguiente se sellan los bordes del cubreobjetos con laca de uñas y se observa bajo el microscopio de fluorescencia (Leica, DM IL) con un filtro específico para FITC (L5, Leica). En el caso de que exista una reacción positiva es posible detectar fluorescencia verde de 528 nm tras la excitación de la muestra con luz azul de 442 nm. Los cubres así tratados pueden guardarse a 4 °C en oscuridad durante varios meses.

8.7. Determinación del crecimiento celular

Dado que hemos utilizado suplementos nutritivos a concentraciones no descritas hasta ahora se compararon las curvas de crecimiento de las células control no tratadas con las curvas de crecimiento de las células tratadas con las diferentes concentraciones de aminoácidos. Para saber si nuestros suplementos nutritivos afectan a la capacidad proliferativa de las células es

necesario evaluarla determinando el número de células que existen en los cultivos a lo largo del tiempo y comprobando si existen diferencias entre la velocidad de proliferación de las células que han recibido diferentes tratamientos. Para ello adquirimos en el laboratorio un contador de células automático (Analizador de viabilidad de células V-CCELL™, Beckman Coulter) (figura 8.18).

8.7.1. Fundamento

El crecimiento de las células en cultivo se caracteriza por tener lugar en tres fases. Al principio, cuando se siembra, existe un periodo o fase de latencia de duración variable (5-24 horas), en función del tipo celular, durante el cual hay muy poca evidencia de un aumento en el número de células. Se trata de un periodo de adaptación durante el cual las células resintetizan los elementos de la superficie celular y la matriz extracelular perdidos durante la tripsinización, se anclan al sustrato, y se extienden o se diseminan.

Si las condiciones son favorables, las células entran en fase de crecimiento exponencial, durante la cual inician su multiplicación y la capacidad metabólica es máxima. La duración de esta fase depende de la densidad de la siembra, la velocidad de crecimiento de las células y la densidad que inhibe la proliferación celular. En la fase de crecimiento exponencial o fase logarítmica, la fracción de crecimiento es alta (normalmente 90-100%), y el cultivo está en su forma más reproducible. Se encuentra en el momento óptimo para tomar muestras, dado que la población es casi uniforme y la viabilidad es muy alta.

Hacia el final de la fase de crecimiento exponencial, el cultivo se hace confluyente —es decir, que toda la superficie de crecimiento disponible queda ocupada, y todas las células están en contacto con las células que las rodean—. En este momento comienza la fase estacionaria, en la que existen diferencias en función de si se trata de un cultivo primario o una línea transformada. En las líneas transformadas si cambiamos el medio vuelven a adaptarse observándose una nueva fase de latencia, crecimiento exponencial, etc.; en el caso de las células de un cultivo primario, que presentan la propiedad de inhibirse por contacto, esto no ocurre; tras la confluencia, la velocidad de crecimiento de las células se ve reducida y, en algunos casos, la proliferación celular cesa casi por completo. En esta etapa las células en crecimiento se reducen al 0 ó 10%.

Se cuentan las células totales y las células viables en los cultivos, a intervalos regulares, tanto en los controles que no reciben tratamiento alguno como en las células que han sido tratadas con los suplementos. De esta forma, se pueden obtener curvas de crecimiento después de tratar a las células con diferentes concentraciones de los suplementos nutritivos para comprobar si existen o no diferencias entre las tasas de proliferación de los diferentes cultivos.

El sistema de recuento que empleamos utiliza un sistema de obtención de imágenes por vídeo para analizar células en medio de cultivo o en suspensión, automatizando el ampliamente aceptado protocolo de exclusión del colorante azul Tripán.



Figura 8.18. Analizador de viabilidad celular. El Vi-Cell automatiza el método manual de determinación de viabilidad por el método de tinción con azul Tripán. El Vi-Cell aspira la muestra colocada en un vial en el automuestreador y la mezcla con azul Tripán al 0.4%. Las células se hacen pasar entonces por una celda de flujo mientras se toman imágenes con una cámara en tiempo real. Una serie de algoritmos desarrollados por Beckman Coulter determinan si las células han absorbido el tinte o no. Las células que absorben el azul Tripán aparecen más oscuras y proporcionan un valor menor en la escala de grises. Las células con valores en la escala de grises mayores se consideran viables.

Las ventajas del contador automático de células frente al método manual del hemocitómetro, descrito y comentado más arriba, son varias: permite contar miles de células por lo que los resultados son mucho más exactos y precisos, es más rápido, se evita el error producido por el operador al llenar la cámara del hemocitómetro, etc. El contador de células de nuestro laboratorio, utilizando la tecnología puntera en captura de vídeo y en tratamiento de la muestra, toma la muestra, la mezcla con azul Tripán, la envía a la celda de flujo y a la cámara para la obtención de imágenes, capturando hasta 100 imágenes para determinar la viabilidad de la muestra. El software determina qué células han absorbido el colorante y cuáles no. Las células que han absorbido el colorante aparecen más oscuras; por lo tanto, tienen valores inferiores en la escala de grises. Las células con valores superiores en la escala de grises se consideran viables.

8.7.2. Procedimiento

Los fibroblastos se siembran a una concentración de 10^5 células/mL y los condrocitos a una densidad de 15×10^5 células/mL en varias placas de 24 pocillos. Las células se incuban a 37 °C en una atmósfera húmeda del 5% de CO_2 durante 24 horas para permitir que se adhieran

y se distribuyan en los pocillos. En el primer cambio de medio se les adiciona medio enriquecido con los diferentes nutrientes (véase sección *Experimentos de estimulación*).

Después de 24, 72, 120 y 168 horas de tratamiento se determina el número de células y la viabilidad celular utilizando el contador automático de células.

Para determinar la capacidad proliferativa de cada grupo, las células se tripsinizan y se resuspenden en medio de cultivo con un 10% de FBS. En primer lugar se retira medio de cultivo de los pocillos aspirando con una pipeta Pasteur estéril en la cabina de flujo laminar y se lavan los restos de medio con solución salina estéril a 37 °C. A continuación se añaden 250 μ L de solución de tripsina a 37 °C en cada pocillo y se mantiene 2 minutos a temperatura ambiente. Luego se elimina la solución de tripsina dejando que queden unas gotas en cada pocillo y se incuba a 37 °C durante 15 minutos en el incubador de CO₂. Tras golpear el frasco ligeramente con la palma de la mano y observar que las células se sueltan del plástico se recogen añadiendo 1 mL de medio (DMEM 10% FBS en el caso de los fibroblastos y Ham F12 10% FBS en el caso de los condrocitos) en cada pocillo, y se agita con la pipeta para soltar y dispersar bien todas las células hasta conseguir una suspensión celular homogénea. Esta suspensión celular es la que se lleva al contador de células electrónico para determinar la cantidad de células viables.

8.8. Valoración de la síntesis de colágeno

En los cultivos de fibroblastos de ratón valoramos la síntesis y secreción de colágeno mediante un ensayo colorimétrico basado en la unión específica de un colorante al colágeno secretado por las células al medio de cultivo. En los cultivos de condrocitos bovinos cuantificamos la síntesis y secreción de colágeno al medio de cultivo de las células mediante el ensayo colorimétrico, así como la síntesis y secreción de colágeno tipo II a la matriz extracelular mediante un ELISA en sándwich.

8.8.1. Valoración de la síntesis de colágeno mediante cuantificación colorimétrica

8.8.1.1. Fundamento del método

El ensayo colorimétrico para cuantificar la secreción de colágeno al medio de cultivo se basa en la unión específica del colorante rojo Sirio al colágeno producido por las células cultivadas *in vitro* y liberado al medio de cultivo, sin que interfieran otras proteínas de la matriz extracelular como los proteoglicanos o la tropoelastina [213,248,259-261].

El colorante rojo Sirio es un colorante aniónico con cadenas laterales con grupos sulfónicos (figura 8.19). Estos grupos reaccionan con los grupos de las cadenas laterales de los aminoácidos básicos presentes en el colágeno. La afinidad específica del colorante por el colágeno, bajo condiciones adecuadas, se basa en que las largas moléculas del colorante se alinean paralelamente a la rígida y larga estructura de los colágenos nativos que mantienen su estructura triple helicoidal intacta.

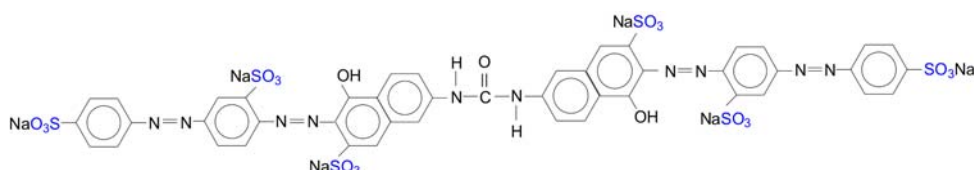


Figura 8.19. Estructura molecular del colorante rojo Sirio (Direct Red 80). El colorante rojo Sirio se une específicamente a la estructura helicoidal del colágeno. La gran afinidad de este colorante por el colágeno está basada en la presencia de cadenas laterales con grupos sulfónicos (azul) que reaccionan con los grupos de las cadenas laterales de los aminoácidos básicos presentes en el colágeno.

El rojo Sirio puede detectar todos los tipos de colágenos de mamíferos, ya que se une específicamente a la estructura helicoidal $[\text{Gly-X-Y}]_n$ que es común a todos ellos. De hecho, la afinidad específica del colorante por el colágeno disminuye cuando la proteína es desnaturada por efecto de la temperatura (temperaturas superiores a 45 °C) o cuando es expuesto a la acción de colagenasas bacterianas.

8.8.1.2. Procedimiento experimental

Curva de calibrado. En primer lugar se confecciona una curva de calibrado desarrollando la reacción de tinción con disoluciones de concentraciones conocidas de la proteína patrón, y se representa gráficamente la absorbancia a 540 nm frente a la concentración de ese patrón. Después, se lleva a cabo la misma reacción con la muestra problema, y se mide igualmente la absorbancia a la misma longitud de onda para interpolar en la curva de calibrado.

La curva de calibrado se confecciona con disoluciones del patrón de colágeno (Sircol collagen assay, Biocolor Ltd., Irlanda) a distintas concentraciones, entre 0'025 mg/mL y 0'75 mg/mL. Los patrones de colágeno se preparan añadiendo alícuotas del patrón comercial de 1 mg/mL en distintos tubos de microcentrifuga según se indica en la tabla 8.11. Para los volúmenes más pequeños (2'5, 5, 7'5, 10, 12'5 y 25 μL) se utiliza una microjeringa Hamilton y para el resto una micropipeta graduable de 200 μL . El volumen se completa en todos los casos hasta 100 μL con ácido acético 0'5 M. El blanco se prepara con 100 μL de ácido acético 0'5 M, sin proteína.

Tabla 8.11. Preparación de los patrones y el blanco para confeccionar la recta de calibrado del ensayo de cuantificación colorimétrica de colágeno.

Volumen de patrón de colágeno(μL)	Volumen de ácido acético 0'5 M (μL)	Concentración final de colágeno (mg/mL)
0'0	100'0	0'000
2'5	97'5	0'025
5'0	95'0	0'050
7'5	92'5	0'075
10'0	90'0	0'100
12'5	87'5	0'125
15'0	85'0	0'150
25'0	75'0	0'250
50'0	50'0	0'500
75'0	25'0	0'750

A continuación, se repite el proceso dos veces más para obtener tres valores de cada concentración y se añade 1 mL del reactivo colorante a todos los tubos. Las mezclas se agitan durante 30 minutos en un agitador orbital a 1.000 rpm para dar tiempo a que el colorante reaccione con el colágeno. Transcurrido ese tiempo se centrifuga a 13.000 rpm y 20 °C durante 15 minutos para recoger el precipitado o *pellet* que contiene el complejo colorante-colágeno desechando el sobrenadante. Para resuspender este complejo colorante-colágeno se añade 1 mL de reactivo alcalino y se disuelve mediante agitación en un agitador de tubos *Vortex*.

Por último, se mide la absorbancia de cada disolución patrón a 540 nm con el lector de microplacas (Anthos, Zenyth 3100). Los valores de absorbancia de una curva de calibrado obtenida en nuestros experimentos están representados en la figura 8.20. A partir de esta curva de calibrado podemos determinar la concentración de colágeno de nuestras muestras conociendo su absorbancia a 540 nm.

No es necesario repetir el proceso de elaboración de la recta de calibrado cada vez que se analiza una nueva muestra. Por lo general, la curva de calibrado es válida para cada juego de reactivos, y para hacer una valoración sólo es preciso desarrollar la reacción con la muestra y el blanco. Es imprescindible confeccionar una nueva curva cada vez que se cambia de reactivos.

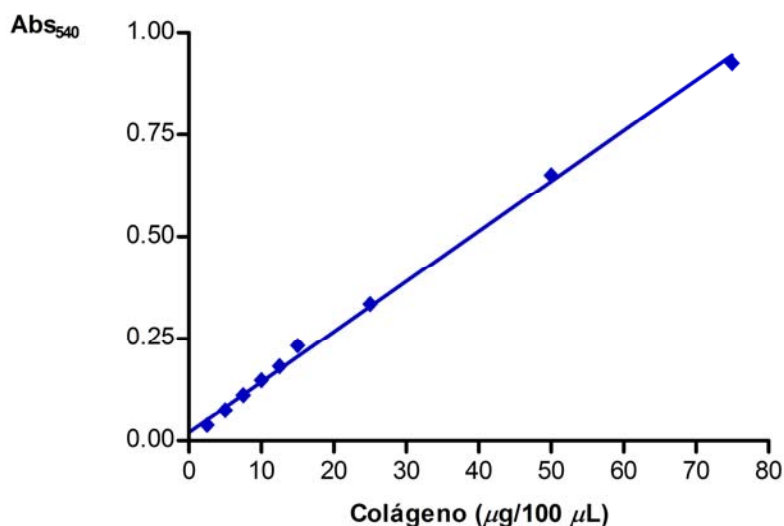


Figura 8.20. Curva de calibrado del ensayo colorimétrico para cuantificar colágeno. La ecuación de esta recta, a partir de la cual calculamos la concentración de colágeno de nuestras muestras, es la siguiente: $y=0'01232x + 0'02030$.

Análisis de la muestra. Las células se cultivan en medio basal (DMEM para los fibroblastos y Ham F12 para los condrocitos) con FBS 10% y antibióticos 1%, en una placa de 24 pocillos a 37 °C y una atmósfera de CO₂ 5%, O₂ 5%, N₂ 90% y 85% de humedad. A las 24 horas se cambia el medio inicial por medio enriquecido con distintas concentraciones de glicina, prolina, lisina, isoleucina o ácido aspártico, realizándose los sucesivos cambios de medio cada 48 horas. Los medios de cultivo enriquecidos con hasta un 5% de suero bovino fetal no interfieren con el ensayo colorimétrico; sin embargo, cuando se utilizan suplementos mayores de suero la cantidad de proteínas séricas, en relación con la cantidad de colágeno presente, puede ocasionar artefactos en la tinción que nos llevarían a un error al cuantificar el colágeno. Para evitar que esas proteínas interfieran en la unión colorante-colágeno se reduce la cantidad de suero al 5% en el medio de cultivo que vaya a utilizarse para el análisis. De esta forma, 48 horas antes de recolectar el medio de cultivo para el ensayo se lleva a cabo un cambio de medio sustituyendo el medio que tenía un 10% de suero por otro con un 5% de suero, siempre enriquecido con el aminoácido objeto del experimento.

Transcurridas esas 48 horas, se recoge el medio de cultivo con un 5% de FBS en el que han crecido las células, en un tubo de microcentrífuga, se homogeneiza su contenido agitando en un agitador *Vortex* y se recogen tres alícuotas de 100 μL cada una en viales de microcentrífuga. A continuación se añade 1 mL de reactivo colorante en cada vial y se agita en

un agitador orbital a 1.000 rpm durante 30 minutos para que el colorante se una al colágeno.

Transcurridos los 30 minutos de agitación, la muestra se centrifuga a 13.000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente, para forzar la precipitación del complejo colorante-colágeno. El exceso de colorante no unido permanece en el sobrenadante y se decanta mediante una cuidadosa inversión del tubo. Las pequeñas gotas que permanecen en la mitad superior del tubo se eliminan utilizando tiras de papel de filtro, con cuidado para no perder el precipitado.

Para liberar el colorante unido al colágeno se añade 1 mL de reactivo alcalino y se agita en un agitador de tubos *Vortex*. Cuando el colorante unido ha sido disuelto transferimos alícuotas de 200 μL desde los tubos a una placa de 96 pocillos y se mide la absorbancia con el lector de multiplacas a 540 nm. Para valorar la absorbancia de la muestra siempre se hacen tres réplicas de cada una.

8.8.2. Valoración de la síntesis de colágeno tipo II mediante ELISA en sándwich

8.8.2.1. Fundamento

La técnica ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción, cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser cuantificado espectrofotométricamente; es decir, esta técnica combina la especificidad de los anticuerpos con la sensibilidad de un ensayo enzimático simple, utilizando anticuerpos o antígenos acoplados a una enzima. Este principio tiene muchas de las propiedades de un inmunoensayo ideal: es versátil, robusto, simple en su realización, utiliza reactivos económicos y consigue, mediante el empleo de una fase sólida, una rápida separación entre la fracción retenida y la fracción libre.

Uno de los inmunoensayos más utilizados para determinar la concentración desconocida de un antígeno en diversas muestras es el ELISA en sándwich. Este ELISA requiere dos anticuerpos que se unan a dos epítopes diferentes del antígeno.

Para utilizar este ensayo, el anticuerpo de captura debe ser purificado y unido a una fase sólida, generalmente al fondo de los pocillos de una placa multipocillo (figura 8.21). Después de eliminar el exceso de anticuerpo no unido a la fase sólida se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno que quedará retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después del segundo lavado, que elimina el antígeno no retenido, se aplica el anticuerpo de detección, el cual se une al antígeno completando así el sándwich. Así

pues, cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y a un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. El ensayo es cuantificado midiendo la cantidad de anticuerpo secundario marcado unido al antígeno, mediante la utilización de un sustrato colorimétrico. Las principales ventajas de esta técnica son que el antígeno no necesita ser purificado antes de su utilización, y que presenta una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo. Sin embargo, presenta la desventaja de que se deben utilizar anticuerpos que reconozcan epítopes separados en el antígeno de manera que la unión de uno no impida la unión del otro.

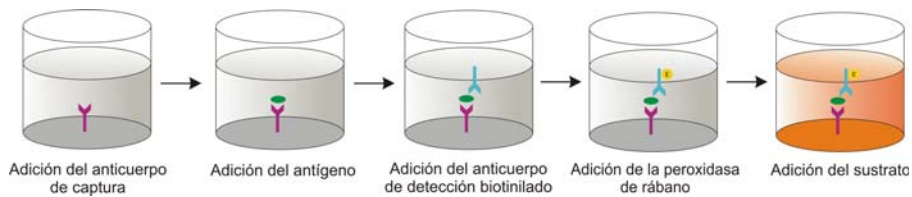


Figura 8.21. Esquema general de las fases de un ELISA en sándwich. Tras permitir que el anticuerpo de captura se adhiera al fondo del pocillo, se incuba la muestra problema y posteriormente se añade el anticuerpo de detección, que reconoce nuestro antígeno en otro epítipo diferente al del anticuerpo de captura. A continuación, se añade la peroxidasa, y por último el sustrato de la enzima (OPD) que dará lugar a un producto soluble de color anaranjado. La densidad óptica es directamente proporcional a la cantidad de colágeno tipo II en la muestra.

Los sustratos que se utilizan en el ELISA deben ser estables, seguros y, preferiblemente, económicos. Las enzimas más utilizadas son las que convierten un sustrato incoloro en un producto coloreado. La tabla 8.12 muestra las combinaciones enzima-sustrato más utilizadas.

8.8.2.2. Procedimiento

Para determinar la concentración de colágeno tipo II nativo producido por los condrocitos en cultivo hemos utilizado un kit de ELISA en sándwich comercializado por la compañía Chondrex (*Native Type II Collagen Detection Kit*, ArthroGenCIA[®], Chondrex Inc.) que ya han usado otros autores con este mismo propósito [217].

Preparación de las muestras de colágeno. Los condrocitos se siembran a una densidad de 15×10^5 células/mL en placas de 24 pocillos y se incuban a 37 °C en una atmósfera húmeda con CO₂ 5% durante 24 horas para permitir que las células se adhieran al fondo de la placa de cultivo. Transcurrido este tiempo se cambia el medio basal (Ham F12 con FBS 10% y 1% de antibióticos) por medio basal enriquecido con diferentes concentraciones de glicina, prolina o lisina, FBS 10% y 1% de antibióticos. Este medio se renueva cada 48 horas.

Tabla 8.12. Enzimas más utilizadas en el ELISA y sus sustratos más habituales.

Sustrato	Buffer/ sustrato se- cundario	Disolu- ción de parada	Producto	Color del producto	λ (nm)
Fosfatasa alcalina					
p-nitrofenil fosfato (pNPP)	Na ₂ CO ₃ , pH 9'8 con MgCl ₂	NaOH 2M	Soluble	Amarillo	405
Bromocloroindolil fosfato / nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT)	NaCl, MgCl ₂ , dietanolamina	EDTA purple	Insoluble	Negro	N/A
Peroxidasa de rábano					
3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB)	30% peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	H ₂ SO ₄ 1M	Soluble	Amarillo	450
o-fenilendiamina (OPD)	Buffer citrato fosfato, 0'02% H ₂ O ₂	H ₂ SO ₄	Soluble	Naran- ja/marrón	492
4-cloro-1-naftol	30% H ₂ O ₂	PBS	Insoluble	Azul-negro	N/A
3,3'-diaminobencidina (DAB)	30% H ₂ O ₂	PBS	Insoluble	Marrón	N/A

Para poder determinar la cantidad de colágeno producido por las células en cultivo es necesario en primer lugar solubilizarlo y monomerizarlo. El colágeno tipo II recién sintetizado por las células en cultivo se incorpora a la matriz extracelular y permanece en forma fibrilar; por lo tanto, en el medio de cultivo permanece muy poco colágeno soluble monomérico. Por esta razón, para determinar la producción de colágeno por las células, éste debe ser en primer lugar solubilizado con pepsina bajo condiciones ácidas, y posteriormente digerido con elasa pancreática a pH neutro para convertir el colágeno polimérico en colágeno monomérico.

Tras retirar el medio de cultivo y lavar la capa celular con HBSS se añade ácido acético 0'05 M a la capa de células. En nuestro caso añadimos 250 μ L en cada pocillo de una placa de 24 pocillos. A continuación, las células son transferidas a un tubo de microcentrifuga raspando la capa de células con un raspador.

Seguidamente se añaden 25 μ L de solución de pepsina en cada vial y se digiere el colágeno a 4 °C durante 24 horas en un agitador orbital a 1.000 rpm. La pepsina digiere los telopeptidos de las regiones amino y carboxilo terminales de la molécula de colágeno y solubiliza el colágeno de las fibras, ya que no puede digerir las uniones intra e intermoleculares.

Transcurridas las 24 horas, se añaden 25 μ L de TSB 10x para detener la reacción de digestión y se ajusta el pH a 8 con NaOH 6 N (2'5 μ L por vial). Se añaden 25 μ L de la disolu-

ción de elastasa pancreática y se incuba a 4 °C durante 24 horas en el agitador orbital. Este paso permite monomerizar el colágeno polimérico remanente al digerir las uniones inter e intramoleculares de la molécula de colágeno polimérico. La elastasa digiere la molécula de colágeno por la región amino terminal que contiene las uniones intra e intermoleculares. Como resultado de esta digestión, los dímeros y trímeros de colágeno se convierten en monómeros. Debido a que la elastasa es capaz de digerir el colágeno desnaturalizado en pequeños fragmentos, debe evitarse que aumente la temperatura de la muestra.

Por último, se centrifuga la muestra a 10.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, se recoge el sobrenadante y se mantiene a 4 °C si se va a realizar el ensayo inmediatamente, o se guarda congelado a -20 °C para hacer el ensayo en otro momento.

Preparación de los patrones de colágeno tipo II. Para determinar la concentración de colágeno en una muestra problema debemos comparar los resultados de densidad óptica de la muestra con los de la curva de calibrado. La curva de calibrado se confecciona con disoluciones del patrón de colágeno tipo II (Chondrex Inc.) a distintas concentraciones, en el intervalo de 0'003 y 0'2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El conjunto se prepara haciendo diluciones seriadas a partir de una disolución *stock* de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de colágeno tipo II (tabla 8.13). Los patrones se cuantifican por duplicado para asegurar la precisión de nuestras mediciones.

A partir de la disolución *stock* de colágeno tipo II (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) preparamos una disolución de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diluyendo 100 μL en 900 μL de buffer B (Chondrex Inc.). Tras agitar el vial en el agitador de tubos *Vortex* se recogen 100 μL y se diluyen en 900 μL de buffer B para obtener una disolución de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El proceso se repite según se indica en la tabla 8.13. El blanco se prepara con 1 mL de buffer B, sin proteína. La figura 8.22 muestra la curva de calibrado que se obtiene.

Cuantificación del colágeno. En primer lugar se debe preparar la disolución del anticuerpo de captura (Chondrex Inc.) diluyendo 100 μL del anticuerpo (1 mg/mL) en 10 mL del buffer de dilución del anticuerpo de captura (Chondrex Inc.). A continuación se añaden 100 μL de la disolución del anticuerpo (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos (High binding multiwell plates, Greiner) y se deja que el anticuerpo se adhiera al fondo de cada pocillo (figura 8.21) incubando la placa durante toda la noche a 4 °C. Después se elimina el exceso de anticuerpo no unido mediante seis lavados consecutivos con buffer de lavado (Chondrex Inc.).

Tabla 8.13. Diluciones seriadas para confeccionar la curva de calibrado para el ELISA. La disolución de partida tiene una concentración de colágeno tipo II de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Concentración de colágeno tipo II ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Volumen de la disolución anterior (μL)	Volumen de buffer B (μL)
100	-	-
10	100	900
1	100	900
0.5	500	500
0.2	400	600
0.1	500	500
0.07	700	300
0.02	286	714
0.01	500	500
0.007	700	300
0.003	428	572

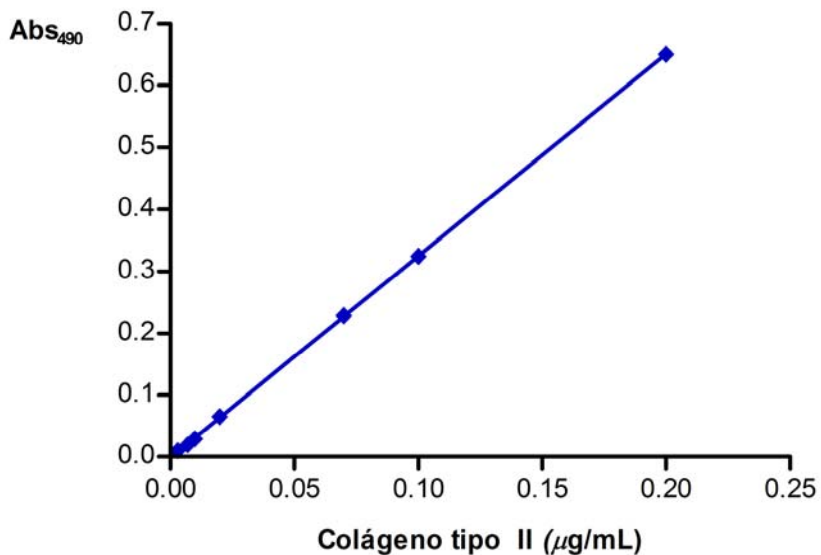


Figura 8.22. Ejemplo de una curva de calibrado del ELISA. Representación gráfica de los valores de absorbancia de las disoluciones de colágeno tipo II. Cada vez que se utilizan reactivos de diferente lote se tiene que elaborar una nueva curva de calibrado. En este caso, la ecuación de la recta a partir de la cual se calcula la concentración de colágeno tipo II en las muestras es: $y = 3.256x - 0.0008338$.

Tras eliminar el exceso de anticuerpo de captura se añaden 100 μL , a cada pocillo, de los patrones de colágeno tipo II y de la muestra, cada uno por duplicado y se incuban a temperatura ambiente durante 2 horas para dar tiempo a que el colágeno tipo II sea capturado por el anticuerpo anclado en el fondo del pocillo. Transcurrido este tiempo deben realizarse seis lavados con buffer de lavado, sin dejar que la placa se seque, para eliminar el exceso de antígeno no unido.

En ese momento, se prepara la disolución del anticuerpo de detección (Chondrex Inc.) diluyendo 50 μL del anticuerpo (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en 10 mL de buffer de dilución del anticuerpo de detección (Chondrex Inc.). Se añaden 100 μL de disolución del anticuerpo de detección (0,025 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en cada pocillo y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. Durante este tiempo el anticuerpo de detección reconoce otro epítipo diferente del colágeno tipo II y se une a él. Para eliminar los anticuerpos no unidos se realizan otros seis lavados con buffer de lavado.

A continuación se añade la enzima peroxidasa de rábano conjugada a la estreptavidina (Chondrex Inc.) para que se una al anticuerpo de detección biotinilado: 100 μL por pocillo y se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora.

La estreptavidina es una proteína de 60 kDa procedente de *Streptomyces avidinii*, con alta afinidad por la biotina. La biotina (vitamina H) es una coenzima de bajo peso molecular (244 kDa) soluble en agua que tiene un grupo carboxílico con el que se une a los restos amino libres de las proteínas. La biotinización es una reacción bioquímica que permite unir biotina a una gran variedad de moléculas como enzimas, lectinas, anticuerpos, ácidos nucleicos, etc. El pequeño tamaño de la proteína hace que la adición de biotina no modifique drásticamente las propiedades de la molécula.

Tras la incubación con la enzima conjugada se realizan seis lavados y se añade el sustrato de la enzima: 100 μL de una disolución de OPD (*o*-fenilendiamina) el cual se transforma en un producto soluble de color anaranjado. A los 30 minutos se detiene la reacción añadiendo 50 μL de ácido sulfúrico 2 N en cada pocillo, respetando el mismo orden de los pocillos en el que se adicionó la disolución de OPD y controlando muy bien los tiempos utilizando una pipeta multicanal, y se leen los resultados de absorbancia a 490 nm en el lector de microplacas (Anthos, Zenyth 3100).

En la figura 8.23 se muestra la apariencia típica de una placa de 96 pocillos en la que se ha realizado un ELISA.

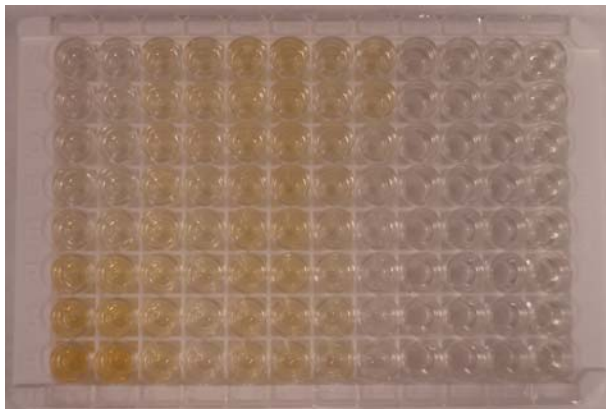


Figura 8.23. Placa de 96 pocillos en la que se ha realizado un ELISA para detectar la cantidad de colágeno tipo II producido por condrocitos en cultivo. Las dos primeras columnas corresponden a los patrones de colágeno tipo II y en las siguientes seis columnas se han incubado muestras de cultivos de condrocitos que han crecido con diferentes tratamientos.

8.9. Análisis estadístico

Todos los experimentos se desarrollaron por duplicado o triplicado. Todos los datos bioquímicos se expresan como valores medios \pm S.D. y fueron analizados con un análisis de la varianza (ANOVA) utilizando el programa GraphPad Prism 4. La significancia estadística fue definida como un p -valor menor de 0'05. Cuando el ANOVA muestra alguna diferencia estadísticamente significativa entre los valores control y los experimentales se desarrolla un t -test con corrección de Tukey para comparaciones múltiples.

Capítulo 9

Resultados

9.1. Cultivos primarios de fibroblastos

9.1.1. Análisis morfológico de los cultivos primarios de fibroblastos

Una vez montado el laboratorio de cultivos celulares, el primer objetivo de este trabajo era disponer de un sistema experimental en el que fuera posible valorar la biosíntesis y la secreción de colágeno. Con este objetivo pusimos a punto en nuestro laboratorio el cultivo de fibroblastos de fetos de ratón mediante las técnicas descritas en el capítulo 8. Los fibroblastos son las células más comunes del tejido conjuntivo y las principales responsables de la formación de fibras de la matriz extracelular. Estas células son consideradas como las malas hierbas del jardín de los cultivadores de células. Sobreviven a la mayoría de técnicas de disgregación mecánica y enzimática y pueden ser cultivadas en muchos medios simples. Además, los fibroblastos en cultivo producen colágeno tipo I y tipo III que liberan al medio de cultivo en grandes cantidades.

Las hembras de ratón CD-1 tienen un promedio de 11 a 13 crías por camada. En nuestros experimentos de cultivo solemos utilizar los embriones de una sola hembra, y obtenemos a partir de estos embriones unos 10-15 mL de una disolución de $2-8 \times 10^6$ células/mL. Mediante la técnica de disgregación mecánica obtenemos una viabilidad muy alta, del 97-75-99-50%.

Determinamos la concentración de siembra idónea con un barrido de concentraciones de cultivo de entre 10.000 y 100.000 células/mL (figura 9.1) y observamos que sembrando a una concentración de 100.000 células/mL obtenemos la mejor curva de crecimiento.

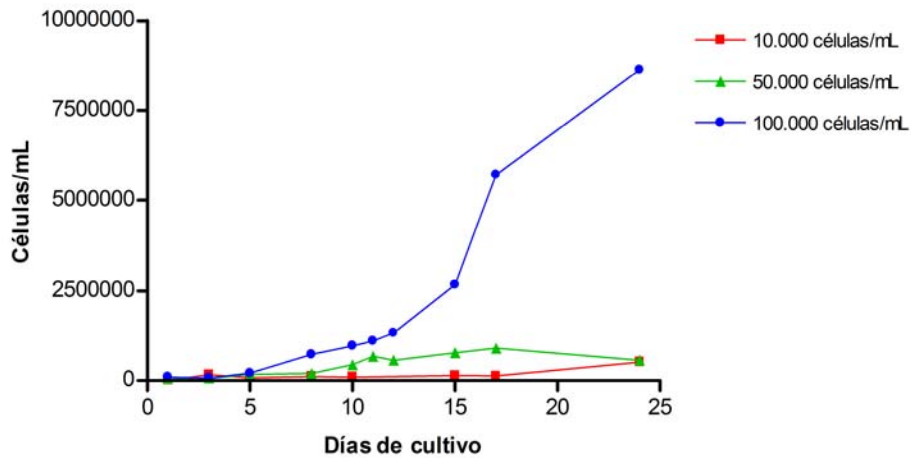


Figura 9.1. Curvas de crecimiento de fibroblastos con distintas concentraciones de siembra. Como se puede observar en la gráfica se obtienen más células en menos tiempo con un inóculo inicial de 100.000 células/mL.

Cuando estas células alcanzan la confluencia recubriendo toda la superficie del frasco de cultivo (figura 9.2), a los 7 días aproximadamente, realizamos el primer pase o subcultivo, transfiriendo las células al sustrato de cultivo adecuado en función del experimento que vamos a realizar. Los experimentos los realizamos siempre con células en fase I.

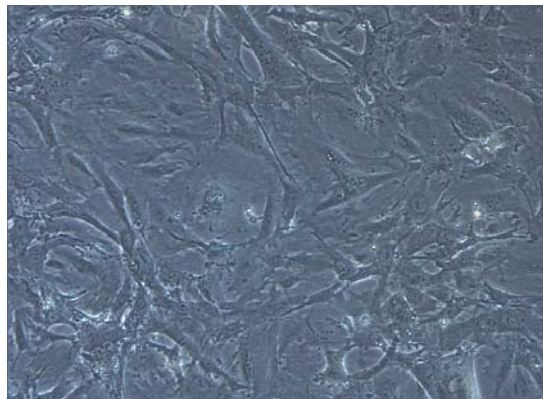


Figura 9.2. Cultivo de fibroblastos de ratón que ha alcanzado la confluencia tras 7 días de cultivo primario (objetivo 10x).

En este punto tenemos ya un cultivo celular, pues las células se adhieren al frasco de cultivo y se multiplican eficazmente. El siguiente paso es determinar el tipo de células que estamos

cultivando, comprobando si son fibroblastos o si se trata de otro tipo celular. La observación de la morfología es la técnica más simple y directa utilizada para identificar células. Los fibroblastos suelen asumir una forma bipolar o multipolar y tienden a extenderse sobre toda la superficie de cultivo (figuras 9.3 y 9.4).



Figura 9.3. Morfología típica de un fibroblasto de ratón en cultivo (objetivo 40x).

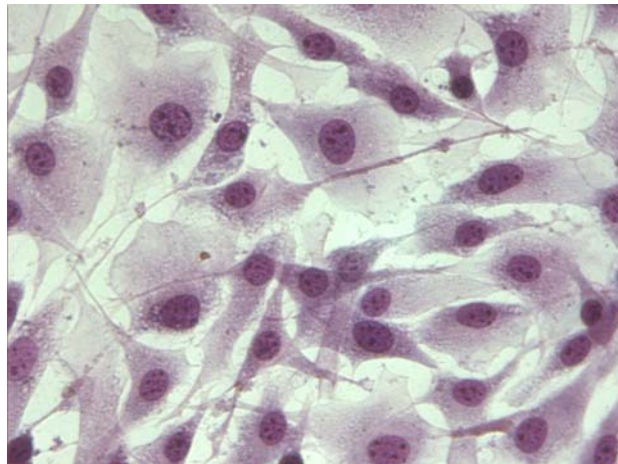


Figura 9.4. Cultivo de fibroblastos de feto de ratón tras el primer subcultivo. Fibroblastos subconfluentes de ratón teñidos con Giemsa (objetivo 10x).

Sin embargo, la observación de la morfología como técnica para identificar un cultivo presenta una serie de inconvenientes, ya que la forma celular puede variar dependiendo de la etapa de crecimiento, la densidad celular, el medio de cultivo o el sustrato utilizado. Por ejemplo,

las células epiteliales que crecen en el centro de una lámina confluyente son normalmente regulares, poligonales y con un borde claramente definido, mientras que las mismas células que crecen en el borde de la lámina pueden ser más irregulares y distendidas y, si se transforman, pueden adquirir una morfología similar a la de los fibroblastos. Por esta razón, las observaciones comparativas de las células siempre deben realizarse en la misma etapa de crecimiento y densidad celular y en el mismo medio y creciendo en el mismo sustrato. Entre las técnicas más útiles disponibles para la caracterización de líneas celulares destacan las tinciones inmunológicas y los ensayos ELISA. En el caso de nuestros cultivos de fibroblastos hemos utilizado la técnica de la inmunofluorescencia para caracterizarlos, haciendo uso de un anticuerpo específico para el colágeno tipo I y III sintetizado por estas células (figura 9.5).

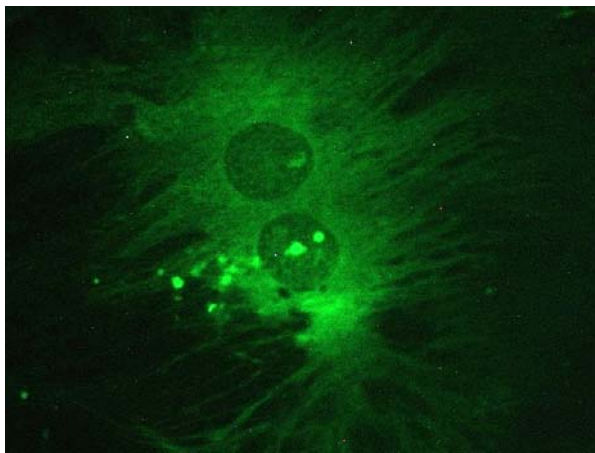


Figura 9.5. Inmunofluorescencia indirecta en cultivos de fibroblastos de ratón empleando un anticuerpo específico anti-colágeno tipo I/III de ratón (objetivo 40x). Mediante esta técnica comprobamos que nuestras células en cultivo son efectivamente fibroblastos de ratón.

9.1.1.1. Efecto de los suplementos de aminoácidos sobre la morfología de los fibroblastos en cultivo

Hemos enriquecido los medios de cultivo de células productoras de colágeno (fibroblastos y condrocitos) con distintas concentraciones de aminoácidos y hemos analizado la morfología, la viabilidad, la tasa de crecimiento celular y la producción de colágeno. En estos experimentos, el primer paso era determinar la concentración máxima de los aminoácidos en el medio de cultivo, compatible con el crecimiento celular.

En primer lugar cultivamos fibroblastos de ratón en presencia de glicina. Observamos que incluso las células tratadas con las dosis máximas utilizadas en este estudio (10 mg/mL) (figura 9.7) mantenían una morfología similar a la de las células sin suplementos de glicina (figura 9.6) y continuaban sintetizando colágeno tipo I. Por lo tanto, con una dosis máxima de 10

mg/mL, la glicina carece de efectos tóxicos sobre los fibroblastos. El mismo efecto se comprobó con la prolina (figura 9.8), ya que la inmunofluorescencia de fibroblastos tratados con 10 mg/mL de prolina demuestra que éstos mantienen la misma morfología y continúan sintetizando colágeno tipo I. Sin embargo, la lisina a una alta concentración (10 mg/mL) inhibe el crecimiento de los fibroblastos (figura 9.9), por lo que reducimos la concentración máxima de lisina en el medio de cultivo a 5 mg/mL (figura 9.9).

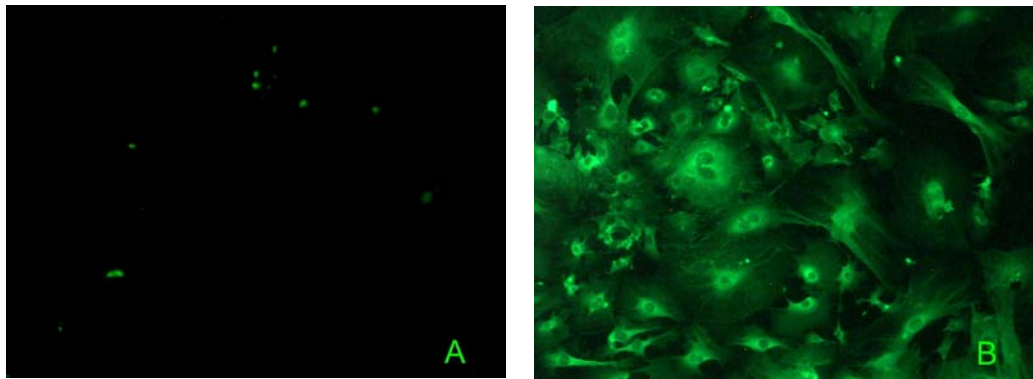


Figura 9.6. Inmunofluorescencia indirecta en cultivos de fibroblastos de ratón. A: Control del anticuerpo secundario (objetivo 10x). En este experimento se han incubado los fibroblastos con anticuerpo secundario, pero sin anticuerpo primario. **B: Fibroblastos cultivados en medio basal durante 9 días (objetivo 10x).**

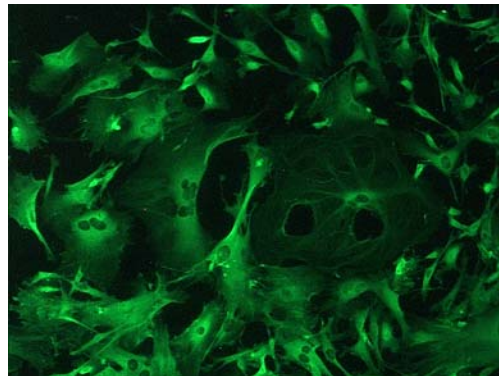


Figura 9.7. Inmunofluorescencia indirecta en cultivos de fibroblastos de ratón cultivados durante 9 días en medio enriquecido con 10 mg/mL de glicina (objetivo 10x). Las células tratadas con la dosis más alta de glicina utilizada en este estudio (10 mg/mL) presentan una morfología similar a la de las células cultivadas en medio basal (véase figura 9.6), y continúan sintetizando colágeno tipo I.

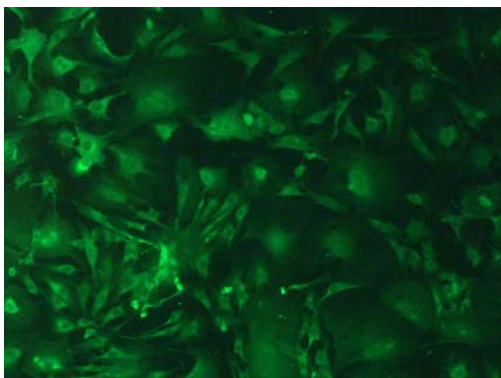


Figura 9.8. Inmunofluorescencia indirecta en cultivos de fibroblastos de ratón cultivados durante 9 días en medio enriquecido con 10 mg/mL de prolina (objetivo 10x). Las células tratadas con la dosis más alta de prolina utilizada en este estudio (10 mg/mL) presentan una morfología similar a la de las células cultivadas en medio basal, y continúan sintetizando colágeno tipo I.

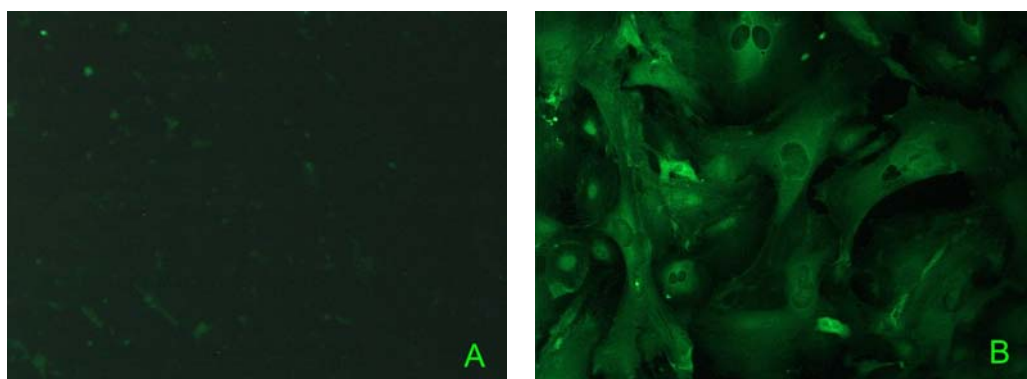


Figura 9.9. Inmunofluorescencia indirecta en cultivos de fibroblastos de ratón cultivados durante 9 días en medio enriquecido con 10 mg/mL de lisina (A) y con 5 mg/mL (B) (objetivo 10x). Las células tratadas con lisina 5 mg/mL (B) presentan una morfología similar a la de las células cultivadas en medio basal (figura 9.6), y continúan sintetizando colágeno tipo I; mientras que con lisina 10 mg/mL (A), los fibroblastos no crecen adecuadamente.

9.1.2. Efecto de la glicina sobre el crecimiento de los fibroblastos

Hemos enriquecido el medio de cultivo con diferentes concentraciones de glicina en el intervalo de 0'025 a 10 mg/mL midiendo la cantidad de células cada 48 horas durante 7 días (figura 9.10). Como control utilizamos células cultivadas con medio de cultivo sin enriquecer.

La glicina no afecta al crecimiento de los fibroblastos en el rango de concentraciones de 0'025 a 5 mg/mL, pues no existen diferencias estadísticamente significativas con el grupo

control; sin embargo, la concentración más alta de glicina (10 mg/mL) sí afecta negativamente al crecimiento de los fibroblastos a las 168 horas de tratamiento (figura 9.10).

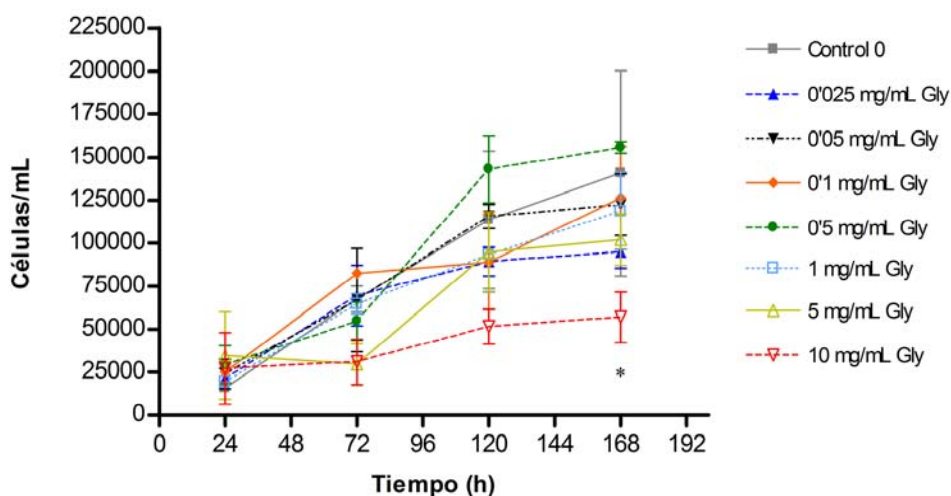


Figura 9.10. Efecto de la glicina sobre el crecimiento de los fibroblastos. En la gráfica se muestran los valores medios \pm S.D. de tres curvas de crecimiento de fibroblastos tratados con glicina a una concentración de 0.025; 0.05; 0.1; 0.5; 1; 5 y 10 mg/mL y células no tratadas con glicina. El análisis estadístico de los resultados muestra que la única concentración de glicina que influye negativamente en el crecimiento celular es la más alta (10 mg/mL). Los asteriscos indican valores significativamente diferentes del control (* $P < 0.05$). Hay que tener presente en todo el proyecto que el reducido tamaño de las muestras limita el abanico de herramientas inferenciales que pueden ser utilizadas y, en cualquier caso, hace que las conclusiones derivadas del análisis inferencial deban tomarse con cautela, puesto que las hipótesis sobre las que se construye el test no pueden ser adecuadamente contrastadas.

Por otro lado, también hemos evaluado la viabilidad de las células tratadas con diferentes concentraciones de glicina midiendo el porcentaje de células viables con el analizador de viabilidad celular Vi-Cell (Beckman Coulter). La absorción de azul Tripán no aumenta significativamente en los fibroblastos tratados con glicina con respecto a las células no tratadas (tabla 9.1). Por lo tanto, podemos afirmar que la adición de glicina, a una concentración de 0.025-10 mg/mL al medio de cultivo, no influye sobre la viabilidad de los fibroblastos.

9.1.3. Efecto de la glicina sobre la producción de colágeno

Hemos valorado la producción de colágeno mediante la incorporación del colorante rojo Sirio al colágeno liberado por los fibroblastos al medio de cultivo. Los fibroblastos del primer subcultivo se mantuvieron durante 8 días cultivados en placas de 24 pocillos, con cambios de medio cada 48 horas. A partir del primer cambio de medio se mantuvieron con el tratamiento de glicina.

Tabla 9.1. Resultados de viabilidad celular tras el tratamiento de los fibroblastos con diferentes concentraciones de glicina durante 7 días. En la tabla se muestra la media del porcentaje de viabilidad celular de tres experimentos \pm S.D. No existen diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular de los fibroblastos tratados con glicina y los fibroblastos no tratados.

Tiempo (h)	Control 0	0'025 mg/mL	0'05 mg/mL	0'1 mg/mL	0'5 mg/mL	1 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL
24	87'90 (7'75)	92'00 (2'26)	89'47 (3'53)	86'67 (9'20)	93'93 (5'62)	89'10 (12'15)	87'77 (4'41)	87'37 (7'89)
72	86'70 (3'50)	89'27 (2'95)	87'30 (1'56)	92'83 (0'64)	93'00 (1'51)	90'90 (2'59)	88'20 (4'95)	85'57 (10'86)
120	84'87 (4'75)	83'43 (8'08)	88'47 (1'06)	88'03 (2'97)	90'80 (1'51)	91'70 (1'49)	90'70 (1'59)	88'33 (2'84)
168	86'43 (3'05)	87'73 (5'55)	91'63 (4'37)	90'87 (1'68)	88'30 (4'07)	90'83 (4'73)	90'07 (4'24)	92'60 (7'56)

A baja concentración de glicina (0'025 mg/mL) ya existen diferencias estadísticamente significativas en la síntesis y secreción de colágeno entre las células tratadas y las células control. El tratamiento con esta concentración de glicina provoca un aumento en la síntesis y secreción de colágeno al medio de cultivo de los fibroblastos del 27'46% en comparación con las células control (tabla 9.2).

Sin embargo, la máxima estimulación se produce con 0'05 mg/mL de glicina (tabla 9.2); el tratamiento de los fibroblastos en cultivo con 0'05 mg/mL de glicina durante un periodo de cultivo de 8 días induce un notable incremento en la secreción de colágeno en el medio de cultivo, con concentraciones de colágeno significativamente mayores comparadas con las de las células control que no reciben suplemento alguno (figura 9.11). Al final del periodo de cultivo (8 días), la secreción de colágeno fue un 43'14% mayor en los cultivos estimulados con 0'05 mg/mL de glicina en comparación con las células control (tabla 9.2).

Una concentración de glicina 0'1 mg/mL en el medio también continúa estimulando la síntesis de colágeno en los cultivos de fibroblastos, siendo ésta un 25'40% superior a la de los cultivos control (tabla 9.2).

Concentraciones superiores de glicina no estimulan significativamente la síntesis de colágeno. Más aún, concentraciones muy altas de glicina (5-10 mg/mL) reducen significativamente la secreción de colágeno en este modelo experimental (tabla 9.2 y figura 9.11).

Tabla 9.2. Biosíntesis y secreción de colágeno en cultivos de fibroblastos tras el tratamiento con glicina durante 8 días. Los datos representan la media \pm S.D. de tres experimentos independientes (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, comparado con el control).

[Glicina]	$\mu\text{g colágeno}/10^6$ células	% colágeno
Control	295'80 (3'20)	100'00
0'025	377'02** (11'14)	127'46
0'05	423'40*** (42'20)	143'14
0'1	370'93** (13'08)	125'40
0'5	335'36 (10'36)	113'37
1	262'91 (13'13)	88'88
5	169'18*** (20'10)	57'19
10	84'68*** (8'55)	28'63

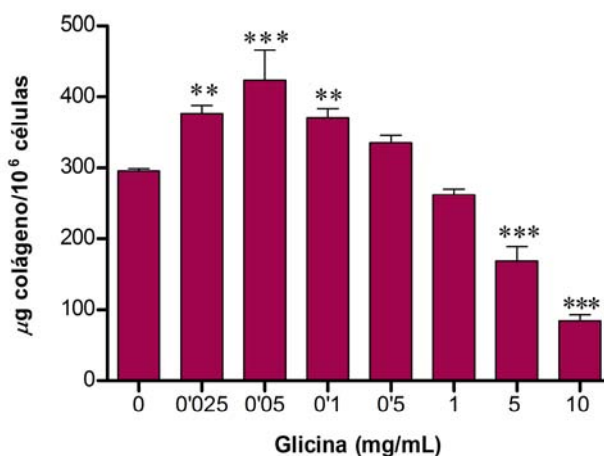


Figura 9.11. Biosíntesis y secreción de colágeno al medio de cultivo de fibroblastos de 8 días tratados con glicina. Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, comparado con el control).

9.1.4. Efecto de la prolina sobre el crecimiento de los fibroblastos

El análisis del crecimiento de los fibroblastos de ratón en cultivo con diferentes concentraciones de prolina demostró que no existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos y el control negativo (figura 9.12).

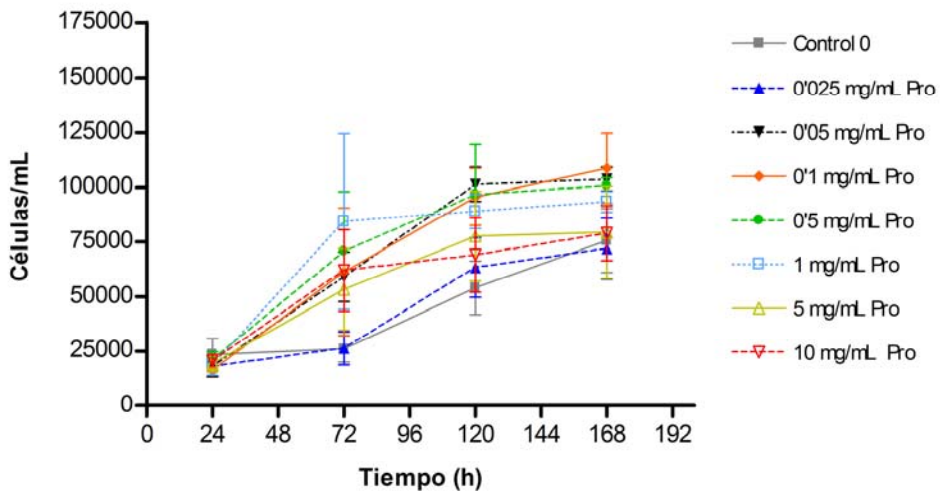


Figura 9.12. Efecto del tratamiento con prolina sobre el crecimiento de los fibroblastos en cultivo. En la gráfica se muestran los valores medios \pm S.D. de tres curvas de crecimiento de fibroblastos tratados con prolina a una concentración de 0.025; 0.05; 0.1; 0.5; 1; 5 y 10 mg/mL y células no tratadas con prolina. El análisis estadístico de los resultados muestra que la prolina no afecta al crecimiento celular.

Asimismo, comprobamos que la prolina no afecta a la viabilidad de los fibroblastos en cultivo, pues las diferentes dosis de prolina no provocaron alteraciones en la absorción de azul Tripán por los fibroblastos en cultivo (tabla 9.3).

Tabla 9.3. Resultados de viabilidad celular tras el tratamiento de los fibroblastos con diferentes concentraciones de prolina durante 7 días. En la tabla se muestra la media del porcentaje de viabilidad celular de tres experimentos \pm S.D.

Tiempo (h)	Control 0	0.025 mg/mL	0.05 mg/mL	0.1 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL
24	93'37 (3'58)	89'30 (3'76)	88'13 (10'71)	87'57 (11'84)	92'40 (3'13)	91'17 (8'90)	83'47 (3'74)	87'30 (7'91)
72	89'27 (4'18)	92'13 (3'50)	94'70 (0'53)	94'07 (1'86)	93'17 (3'66)	90'67 (3'46)	91'30 (0'72)	93'73 (1'91)
120	93'23 (8'00)	89'40 (3'69)	88'63 (2'25)	92'97 (2'78)	94'53 (3'16)	91'47 (0'97)	94'93 (2'70)	93'17 (3'50)
168	88'07 (4'58)	86'73 (2'94)	86'57 (2'71)	92'53 (1'53)	89'60 (5'54)	89'20 (2'21)	92'87 (1'04)	92'07 (2'60)

9.1.5. Efecto de la prolina sobre la producción de colágeno

La síntesis de colágeno en células cultivadas con prolina 0.025 y 0.05 mg/mL no es significativamente diferente de la del grupo control. Sin embargo, el tratamiento de los fibroblastos en cultivo con 0.1 y 0.5 mg/mL de prolina provoca un claro aumento en la síntesis y secreción

de colágeno al medio de cultivo, con concentraciones de colágeno de un 96'33% y un 93'96% superiores a las de las células control no tratadas, respectivamente (tabla 9.4).

Tabla 9.4. Biosíntesis y secreción de colágeno en cultivos de fibroblastos tras el tratamiento con prolina. Los datos representan la media \pm S.D. de tres experimentos independientes (* $P < 0'05$, *** $P < 0'001$, comparado con el control).

[Prolina]	$\mu\text{g colágeno}/10^6$ células	% colágeno
Control	318'02 (14'06)	100'00
0'025	316'82 (18'27)	99'62
0'05	356'93 (14'92)	112'24
0'1	624'37*** (36'87)	196'33
0'5	616'83*** (26'93)	193'96
1	380'91* (12'93)	119'78
5	256'40* (6'41)	80'62
10	252'27* (15'23)	79'32

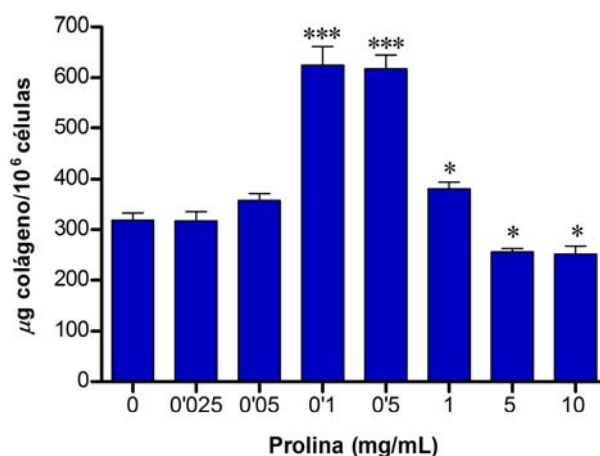


Figura 9.13. Biosíntesis y secreción de colágeno al medio de cultivo de fibroblastos de 8 días tratados con prolina. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes (* $P < 0'05$, *** $P < 0'001$, comparado con el control).

Aunque la síntesis de colágeno llega a ser superior incluso a la de las células tratadas con glicina, se necesitan concentraciones superiores de este aminoácido para observar este efecto. Las concentraciones altas de prolina (5 y 10 mg/mL) provocan una disminución en la

síntesis de colágeno en comparación con la síntesis y secreción de las células control (tabla 9.4 y figura 9.13).

9.1.6. Efecto de la lisina sobre el crecimiento de los fibroblastos

La adición de lisina al medio no afecta al crecimiento de los fibroblastos, excepto la concentración más alta (10 mg/mL), que disminuye drásticamente el crecimiento de los fibroblastos con respecto al de las células control no tratadas (figura 9.14).

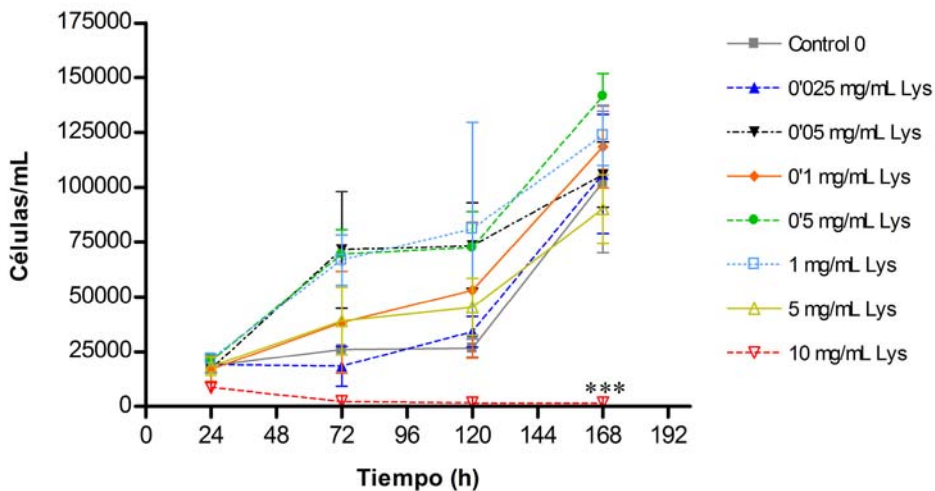


Figura 9.14. Efecto del tratamiento con lisina sobre el crecimiento de los fibroblastos en cultivo. En la gráfica se muestran los valores medios \pm S.D. de tres curvas de crecimiento de fibroblastos tratados con lisina a una concentración de 0.025; 0.05; 0.1; 0.5; 1; 5 y 10 mg/mL y células no tratadas con lisina. Las dosis bajas de lisina no provocan ningún efecto perjudicial sobre el crecimiento de los fibroblastos en cultivo, sin embargo, una concentración tan elevada como 10 mg/mL de lisina inhibe el crecimiento de los fibroblastos (***) $P < 0.001$ comparado con el control).

El análisis de la viabilidad celular demostró que la lisina sólo reduce la viabilidad de los fibroblastos con la concentración más alta analizada (10 mg/mL) tras 72, 120 y 168 horas de tratamiento (6.67%, 16.67% y 0% de viabilidad, respectivamente). La tinción con azul Tripán no aumentó significativamente en las células tratadas con lisina a una concentración de 0.025-5.00 mg/mL en ningún momento del cultivo analizado (tabla 9.5). Por esta razón, la concentración máxima de lisina utilizada en experimentos posteriores fue de 5 mg/mL.

Tabla 9.5. Resultados de viabilidad celular tras el tratamiento de los fibroblastos con diferentes concentraciones de lisina durante 7 días. En la tabla se muestra la media del porcentaje de viabilidad celular de tres experimentos \pm S.D. La única concentración de lisina que altera la viabilidad de los fibroblastos en cultivo es la más alta (10 mg/mL) a partir de las 72 horas de tratamiento (** $P < 0'01$, *** $P < 0'001$, comparado con el control).

Tiempo (h)	Control 0	0'025 mg/mL	0'05 mg/mL	0'1 mg/mL	0'5 mg/mL	1 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL
24	85'77 (3'23)	88'03 (10'83)	93'87 (6'90)	89'63 (4'38)	90'97 (1'00)	82'93 (4'52)	80'67 (9'23)	90'57 (10'05)
72	93'93 (0'91)	88'90 (3'02)	92'60 (0'36)	92'67 (1'91)	91'60 (3'10)	92'87 (3'20)	94'87 (2'16)	6'67*** (11'55)
120	89'77 (2'83)	87'80 (12'58)	91'77 (2'64)	90'27 (5'61)	91'13 (1'36)	65'53 (48'75)	92'43 (1'58)	16'67** (28'87)
168	89'47 (3'06)	88'37 (1'06)	90'90 (3'38)	90'37 (2'82)	93'17 (0'55)	92'57 (2'00)	94'83 (2'26)	0'00*** (0'00)

9.1.7. Efecto de la lisina sobre la producción de colágeno

Con respecto a la producción de colágeno en las células tratadas con 0'025 mg/mL de lisina no existen diferencias significativas comparadas con las células control no tratadas (figura 9.15); sin embargo, a concentraciones mayores (0'05 mg/mL, 0'1 mg/mL y 0'5 mg/mL), la producción de colágeno en el medio aumenta significativamente, un 16'34%, un 68'25% y un 27'99%, respectivamente, en comparación con las células sin tratamiento de lisina (tabla 9.6).

Tabla 9.6. Biosíntesis y secreción de colágeno en cultivos de fibroblastos tras el tratamiento con lisina. Los datos representan la media \pm S.D. de tres experimentos independientes (** $P < 0'01$, *** $P < 0'001$, comparado con el control).

[Lisina]	μg colágeno/ 10^6 células	% colágeno
Control	302'15 (13'33)	100'00
0'025	306'46 (11'60)	101'43
0'05	351'53** (17'09)	116'34
0'1	508'38*** (4'30)	168'25
0'5	386'71*** (16'24)	127'99
1	240'11** (22'61)	79'47
5	137'66*** (4'43)	45'56

La concentración más alta de lisina (5 mg/mL) provoca una disminución estadísticamente significativa en la secreción de colágeno por los fibroblastos en cultivo en comparación con las células control no tratadas (tabla 9.6 y figura 9.15).

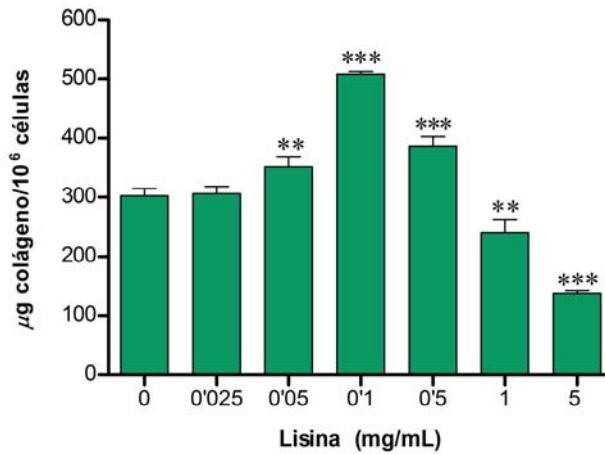


Figura 9.15. Biosíntesis y secreción de colágeno al medio de cultivo de fibroblastos de 8 días tratados con lisina. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, comparado con el control).

9.1.8. Efecto de la isoleucina sobre el crecimiento de los fibroblastos

También hemos estudiado el crecimiento de los fibroblastos con diferentes concentraciones de isoleucina (0.025-10 mg/mL) en los medios de cultivo midiendo la cantidad de células a lo largo del tiempo (figura 9.16). Como control utilizamos células cultivadas con medio sin enriquecer.

Las concentraciones más altas de isoleucina (5 y 10 mg/mL) disminuyen ligeramente el crecimiento de los fibroblastos con respecto a las células no tratadas, aunque esta disminución en el crecimiento no es estadísticamente significativa (figura 9.16).

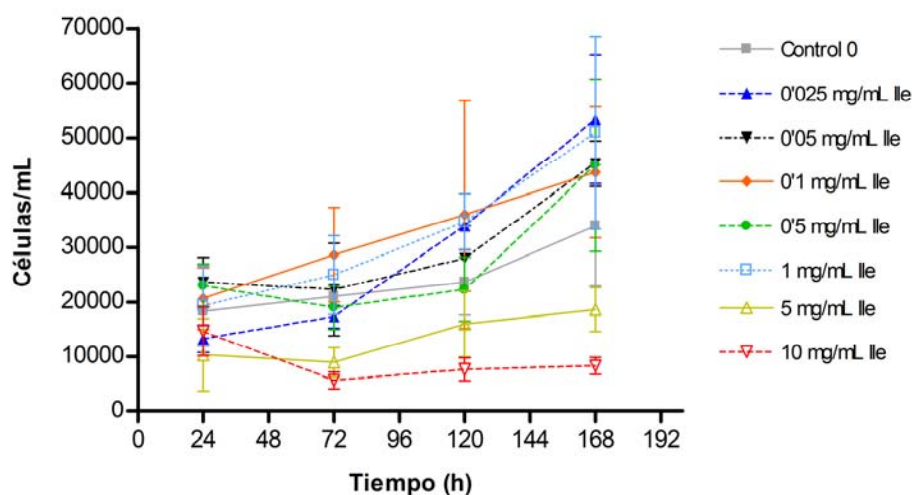


Figura 9.16. Efecto del tratamiento con isoleucina sobre el crecimiento de los fibroblastos en cultivo. En la gráfica se muestran los valores medios \pm S.D. de tres curvas de crecimiento de fibroblastos tratados con isoleucina a una concentración de 0'025; 0'05; 0'1; 0'5; 1; 5 y 10 mg/mL y células no tratadas con isoleucina. El análisis estadístico de los resultados muestra que no existen diferencias en el crecimiento de las células tratadas con diferentes concentraciones de isoleucina y las células control no tratadas; sin embargo, parece existir una tendencia a la disminución del crecimiento celular con altas dosis de isoleucina (5 y 10 mg/mL).

El método de exclusión de azul Tripán demuestra que la isoleucina reduce la viabilidad celular sólo a la mayor concentración ensayada (10 mg/mL) tras 168 horas de tratamiento, mientras que la tinción con azul Tripán no aumenta significativamente con el resto de concentraciones en ningún momento ensayado (tabla 9.7). Por esta razón, la concentración máxima de isoleucina utilizada en experimentos posteriores fue de 5 mg/mL.

Tabla 9.7. Resultados de viabilidad celular tras el tratamiento de los fibroblastos con diferentes concentraciones de isoleucina durante 7 días. En la tabla se muestra la media del porcentaje de viabilidad celular de tres experimentos \pm S.D. El único tratamiento que disminuye la viabilidad celular es el de 10 mg/mL de isoleucina (* $P < 0'05$ comparado con el control).

Tiempo (h)	Control 0	0'025 mg/mL	0'05 mg/mL	0'1 mg/mL	0'5 mg/mL	1 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL
24	81'93 (16'77)	85'13 (9'18)	86'10 (3'72)	78'87 (3'71)	85'00 (9'79)	80'30 (8'75)	71'10 (20'09)	83'53 (12'95)
72	89'63 (2'88)	87'47 (4'33)	83'20 (16'02)	86'90 (3'00)	80'00 (5'29)	82'43 (9'65)	78'20 (12'05)	70'93 (9'57)
120	92'37 (3'63)	84'93 (8'38)	84'93 (3'81)	91'70 (3'67)	92'30 (6'68)	84'97 (11'11)	85'60 (4'93)	77'70 (10'12)
168	90'40 (6'88)	91'57 (1'79)	88'20 (5'53)	91'73 (4'98)	84'43 (6'40)	93'77 (3'97)	87'83 (4'01)	72'33* (4'75)

9.1.9. Efecto de la isoleucina sobre la producción de colágeno

El tratamiento de los fibroblastos de ratón en cultivo con diferentes concentraciones de isoleucina (0'025-10 mg/mL) no provoca ninguna alteración estadísticamente significativa en la síntesis y secreción de colágeno al medio de cultivo (tabla 9.8 y figura 9.17).

Tabla 9.8. Biosíntesis y secreción de colágeno en cultivos de fibroblastos con el tratamiento con isoleucina. Los datos representan la media \pm S.D. de tres experimentos independientes. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos y el control.

[Isoleucina]	$\mu\text{g colágeno}/10^6$ células	% colágeno
Control	454'04 (14'99)	100'00
0'025	452'37 (10'68)	99'63
0'05	442'04 (19'11)	97'36
0'1	414'02 (8'87)	91'18
0'5	432'21 (13'76)	95'19
1	462'79 (18'56)	101'93
5	493'33 (16'24)	108'65

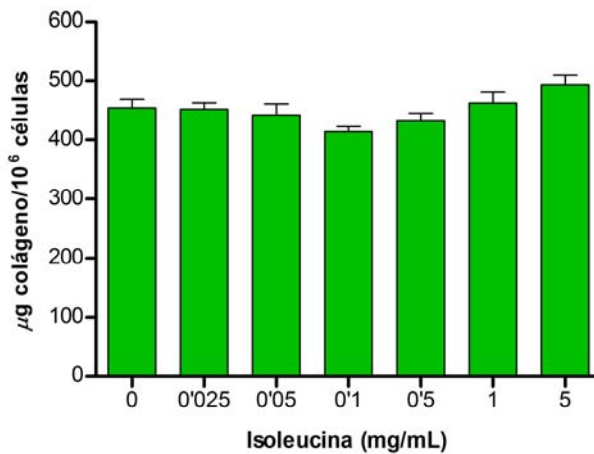


Figura 9.17. Biosíntesis y secreción de colágeno al medio de cultivo de fibroblastos de 8 días tratados con isoleucina. Los datos representan la media \pm S.D. de tres experimentos independientes. No se observan diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de colágeno secretado al medio de cultivo de los fibroblastos tratados con diferentes concentraciones de isoleucina.

9.1.10. Efecto del ácido aspártico sobre el crecimiento de los fibroblastos

Se desarrollaron curvas de crecimiento con diferentes concentraciones de ácido aspártico (0'025; 0'05; 0'1; 0'5 y 1 mg/mL) en los medios de cultivo midiendo la cantidad de células a lo largo del tiempo (figura 9.18). Como control se utilizaron células cultivadas con medio de cultivo sin enriquecer.

El tratamiento con diferentes concentraciones de ácido aspártico no afecta a la capacidad de crecimiento de los fibroblastos en cultivo, pues no existen diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento de las células tratadas y las no tratadas con ácido aspártico (figura 9.18). Podemos concluir que el ácido aspártico, en concentraciones comprendidas entre 0'025 y 1 mg/mL, no afecta a la capacidad de crecimiento de los fibroblastos.

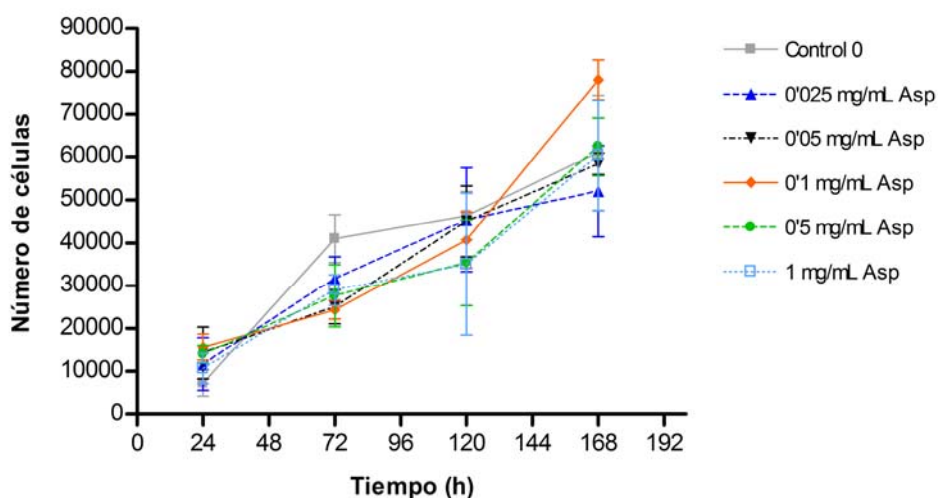


Figura 9.18. Efecto del tratamiento con ácido aspártico sobre el crecimiento de fibroblastos de ratón en cultivo. En la gráfica se muestran los valores medios \pm S.D. de tres curvas de crecimiento de fibroblastos tratados con ácido aspártico a una concentración de 0'025; 0'05; 0'1; 0'5 y 1 mg/mL y células no tratadas con ácido aspártico. El análisis estadístico de los resultados muestra que no existen diferencias significativas en el crecimiento de las células tratadas con diferentes concentraciones de ácido aspártico y las células control no tratadas.

La viabilidad celular no disminuye significativamente en los fibroblastos tratados con diferentes concentraciones de ácido aspártico con respecto a la viabilidad de las células no tratadas (tabla 9.9). Por lo tanto, la adición de ácido aspártico al medio de cultivo, hasta una concentración de 1 mg/mL, no influye sobre la viabilidad de los fibroblastos de ratón en cultivo.

Tabla 9.9. Resultados de viabilidad celular tras el tratamiento de los fibroblastos con diferentes concentraciones de ácido aspártico durante 7 días. En la tabla se muestra la media del porcentaje de viabilidad celular de tres experimentos \pm S.D. No existen diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular de los fibroblastos tratados con ácido aspártico y los fibroblastos no tratados.

Tiempo (h)	Control 0	0'025 mg/mL	0'05 mg/mL	0'1 mg/mL	0'5 mg/mL	1 mg/mL
24	55'00 (27'84)	79'10 (21'91)	75'83 (11'88)	83'83 (12'80)	78'17 (5'86)	68'43 (16'40)
72	75'77 (3'56)	89'03 (3'16)	88'33 (5'25)	82'40 (10'49)	89'77 (6'94)	84'17 (3'21)
120	90'43 (6'31)	89'30 (12'08)	83'77 (5'49)	86'37 (3'58)	81'00 (10'99)	90'03 (3'67)
168	80'83 (5'40)	83'37 (5'30)	86'57 (5'16)	91'10 (4'92)	87'60 (4'72)	91'10 (3'60)

9.1.11. Efecto del ácido aspártico sobre la producción de colágeno

El tratamiento con diferentes concentraciones de ácido aspártico no provoca una estimulación en la síntesis de colágeno, exceptuando la concentración más baja (0'025 mg/mL de ácido aspártico) que produce un ligero aumento en la secreción de colágeno al medio de cultivo, de un 14'72% con respecto a las células control no tratadas (tabla 9.10 y figura 9.19).

Tabla 9.10. Biosíntesis y secreción de colágeno en cultivos de fibroblastos tras el tratamiento con ácido aspártico. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de seis experimentos desarrollados por triplicado (* $P < 0'05$ comparado con el control).

[Ácido aspártico]	μg colágeno/ 10^6 células	% colágeno
Control	369'37 (8'82)	100'00
0'025	423'75* (2'87)	114'72
0'05	401'67 (36'11)	108'74
0'1	364'79 (8'94)	98'76
0'5	386'25 (18'41)	104'57
1	358'95 (17'02)	97'18

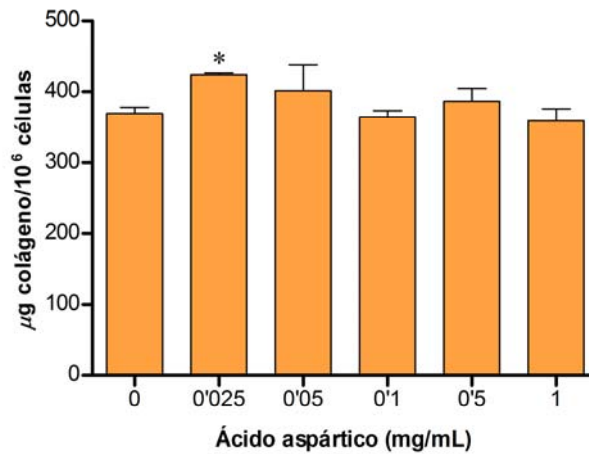


Figura 9.19. Biosíntesis y secreción de colágeno al medio de cultivo de fibroblastos de 8 días tratados con ácido aspártico. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes (* $P < 0.05$ comparado con el control).

9.2. Cultivos primarios de condrocitos

9.2.1. Análisis morfológico de los cultivos primarios de condrocitos

Para cultivar condrocitos utilizamos cuatro articulaciones metacarpofalángicas de bóvidos de menos de 12 meses de edad. A partir del raspado y procesado del cartílago de estas articulaciones obtenemos una suspensión de alrededor de 10^6 células/mL en 15 mL de medio de cultivo, que diluimos hasta obtener una concentración de 15×10^5 células/mL. Estas células se siembran directamente en el soporte adecuado para realizar el experimento, pues los condrocitos no se subcultivan para evitar que pierdan sus características fenotípicas.

Como se observa en las siguientes fotografías, los condrocitos en cultivo son de tamaño más pequeño que los fibroblastos y de morfología poligonal (figura 9.20).

El principal tipo de colágeno presente en el cartílago hialino y en la matriz extracelular de los cultivos de condrocitos es el colágeno tipo II [249]. De hecho, la producción de colágeno tipo II por células mesenquimales en cultivo se toma generalmente como una evidencia de la expresión de un fenotipo condrocítico. Por esta razón, para caracterizar nuestros cultivos de condrocitos bovinos empleamos un ELISA en sándwich que utiliza anticuerpos específicos contra el colágeno tipo II (ver resultados ELISA), así como inmunofluorescencia con anticuerpos anti-colágeno tipo II (figura 9.21). Esta técnica ha sido utilizada ampliamente por otros

autores para comprobar si los condrocitos en cultivo en monocapa continúan produciendo colágeno tipo II y durante cuánto tiempo lo hacen [214].

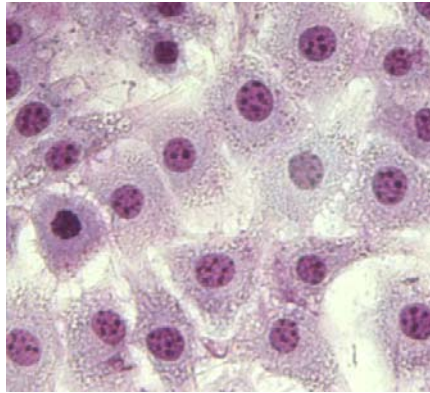


Figura 9.20. Cultivo de condrocitos bovinos de 7 días teñido con Giemsa (objetivo 40x).

Los resultados del ELISA (ver resultados ELISA en este mismo capítulo) y de la inmunofluorescencia demuestran que efectivamente cultivamos condrocitos bovinos, pues las células producen colágeno tipo II (figura 9.21).

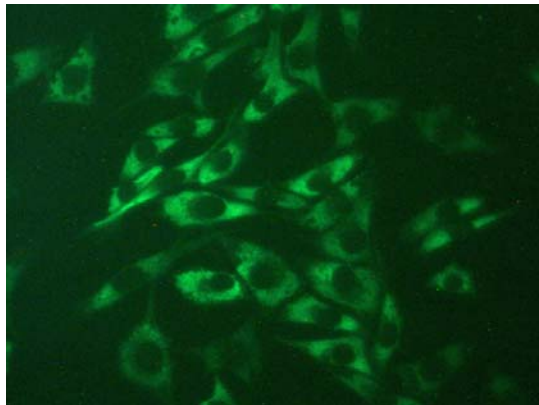


Figura 9.21. Tinción de inmunofluorescencia de condrocitos cultivados en monocapa (objetivo 40x). Las células fueron fijadas y teñidas tras 7 días de cultivo con anticuerpos específicos contra colágeno tipo II. Las células cultivadas son efectivamente condrocitos pues sintetizan colágeno tipo II.

9.2.1.1. Efecto de los suplementos de aminoácidos sobre la morfología de los condrocitos en cultivo

Con la dosis más alta de glicina utilizada en este estudio (figura 9.23), la morfología de los condrocitos bovinos en cultivo es similar a la de las células sin tratamiento de glicina (figura 9.22). Lo mismo ocurre con las células tratadas con la dosis más alta de prolina (figura 9.24). Sin embargo, la lisina, a una concentración de 10 mg/mL, afecta a la morfología y capacidad de proliferación de los condrocitos en cultivo, pues su número decrece y pierden su morfología poligonal característica; mientras que a una concentración de 5 mg/mL no existen diferencias apreciables con los cultivos control (figura 9.25).

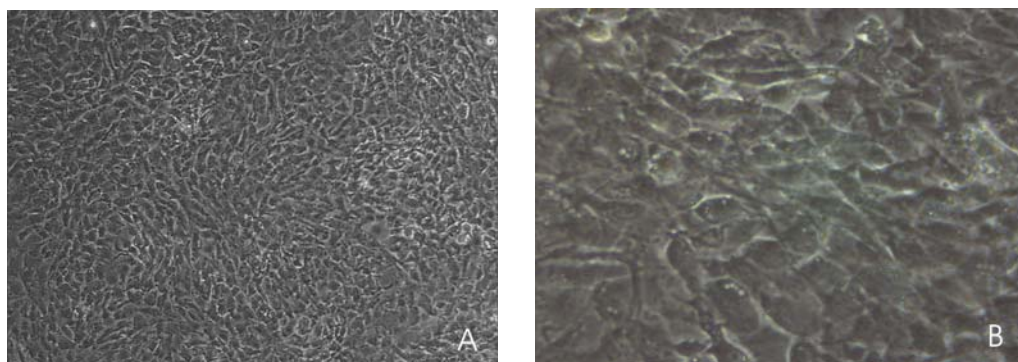


Figura 9.22. Condrocitos bovinos de 13 días de cultivo en medio basal. **A.** Objetivo 10x. **B.** Objetivo 40x.

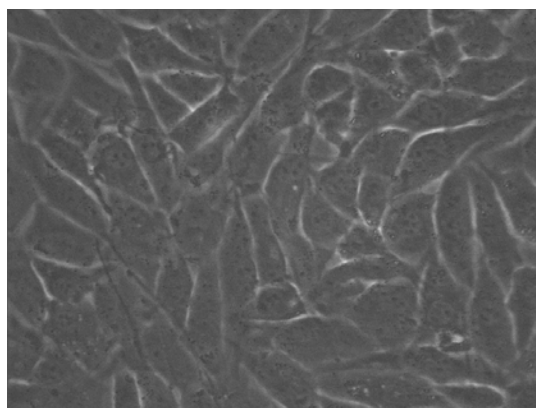


Figura 9.23. Condrocitos bovinos cultivados en presencia de 10 mg/mL de glicina durante 11 días (objetivo 40x). La morfología de los condrocitos tratados con la dosis más alta de glicina es similar a la de los condrocitos no tratados (figura 9.22).

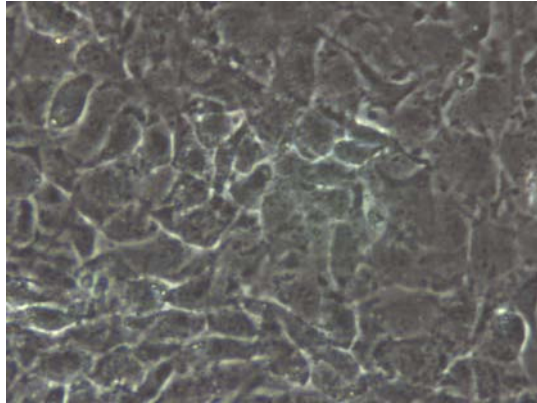


Figura 9.24. Condrocitos bovinos cultivados en presencia de 10 mg/mL de prolina durante 11 días (objetivo 40x). Como se observa en la fotografía, la morfología de los condrocitos tratados con la dosis más alta de prolina es similar a la de los condrocitos no tratados (figura 9.22).

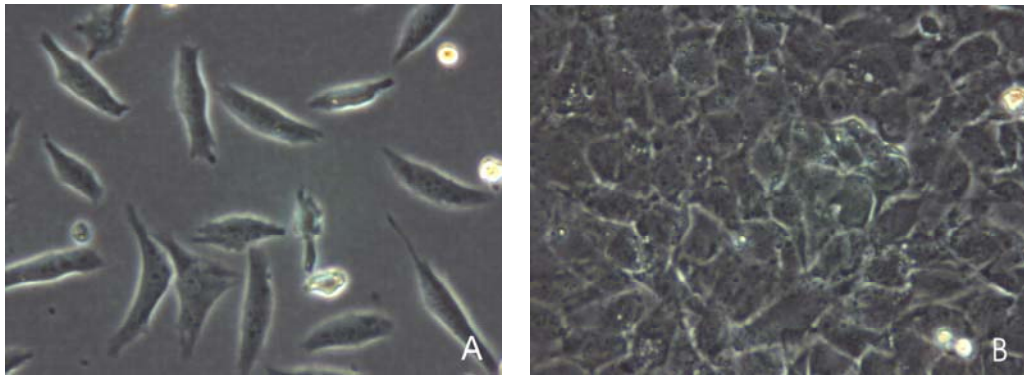


Figura 9.25. Condrocitos bovinos cultivados en presencia de lisina durante 11 días. A. 10 mg/mL de lisina (objetivo 40x). B. 5 mg/mL de lisina (objetivo 40x). Como se aprecia en la fotografía, los condrocitos bovinos cultivados en presencia de 10 mg/mL de lisina (A) no proliferan adecuadamente y pierden su morfología poligonal característica. Sin embargo, esto no ocurre con el tratamiento de 5 mg/mL de lisina (B).

9.2.2. Efecto de la glicina sobre el crecimiento de los condrocitos

Al igual que con los fibroblastos, hemos analizado el crecimiento y la viabilidad de los condrocitos tratados con glicina, comparándolos con los de los condrocitos cultivados en medio sin enriquecer, para observar si alguna concentración de este aminoácido provocaba algún efecto sobre la capacidad de proliferación o la viabilidad de los condrocitos en cultivo. Para ello, se mantuvieron las células con diferentes concentraciones de glicina (0'025-10 mg/mL) durante 7 días, evaluando el número de células/mL y el porcentaje de viabilidad celular cada 48 horas.

Los condrocitos bovinos crecen adecuadamente ante la presencia de glicina, incluso a concentraciones tan elevadas como 10 mg/mL, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento de los condrocitos tratados con glicina y los condrocitos del grupo control no tratados, a lo largo de los 7 días del experimento (figura 9.26).

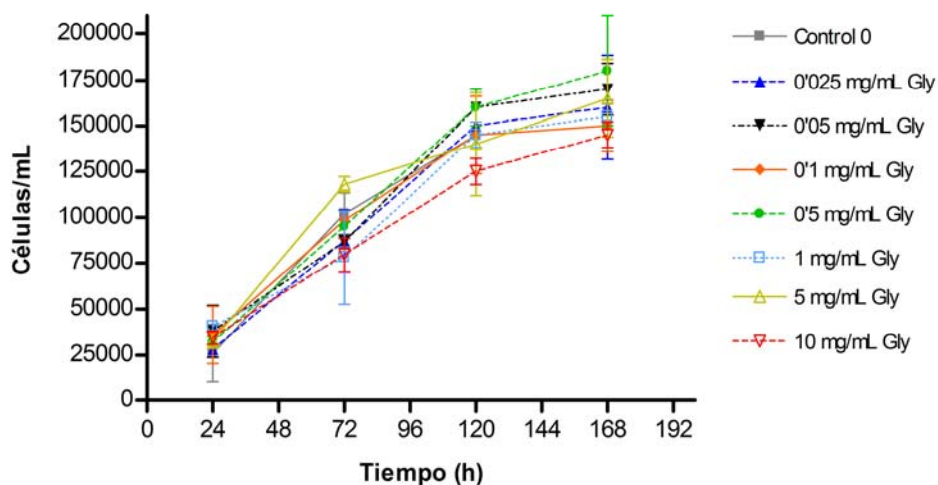


Figura 9.26. Efecto del tratamiento con glicina sobre el crecimiento de los condrocitos en cultivo. En la gráfica se muestran los valores medios \pm S.D. de dos curvas de crecimiento de condrocitos bovinos tratados con diferentes concentraciones de glicina y condrocitos mantenidos en medio basal (Ham's F12) sin enriquecer. El análisis estadístico de los resultados demuestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos y el grupo control. Por lo tanto, podemos concluir que la glicina, incluso a altas concentraciones (10 mg/mL), no afecta al crecimiento de los condrocitos en cultivo.

Asimismo, hemos medido la viabilidad de los condrocitos en cultivo, tras su tratamiento con diferentes concentraciones de glicina durante 7 días, midiendo la captación de azul Tripán con el analizador de viabilidad celular. Se observa que la viabilidad de los condrocitos tratados con glicina durante 7 días no difiere significativamente de la de los cultivos control (tabla 9.11); es decir, que la glicina a una concentración de hasta 10 mg/mL no afecta a la viabilidad de los condrocitos en cultivo.

Tabla 9.11. Resultados de viabilidad celular tras el tratamiento de los condrocitos con diferentes concentraciones de glicina durante 7 días. En la tabla se muestra la media del porcentaje de viabilidad celular de dos experimentos \pm S.D. Podemos observar que no existen diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular de los condrocitos tratados con glicina y los condrocitos no tratados.

Tiempo (h)	Control 0	0'025 mg/mL	0'05 mg/mL	0'1 mg/mL	0'5 mg/mL	1 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL
24	77'50 (1'98)	70'00 (10'04)	75'85 (5'87)	70'20 (8'06)	84'00 (6'93)	81'30 (6'22)	68'00 (4'38)	72'15 (4'03)
72	83'35 (3'04)	88'65 (2'33)	80'80 (1'41)	82'85 (5'59)	77'55 (4'46)	76'05 (1'77)	75'90 (9'33)	71'90 (2'69)
120	84'00 (3'25)	83'70 (0'42)	82'95 (3'04)	81'50 (1'84)	79'25 (6'72)	84'50 (1'84)	80'60 (0'28)	80'20 (2'40)
168	76'10 (7'35)	82'90 (0'57)	81'20 (1'27)	80'50 (3'11)	82'65 (5'30)	83'90 (0'14)	82'50 (0'14)	73'05 (8'27)

9.2.3. Efecto de la glicina sobre la producción de colágeno

a) Cuantificación del colágeno tipo II depositado en la monocapa de células

Hemos determinado la deposición del colágeno tipo II en la capa de células y en la matriz mediante un ELISA en sándwich con anticuerpos contra el colágeno tipo II (Chondrex Inc.) (véase capítulo 8).

Para cada experimento hemos utilizado lotes de reactivos diferentes, por lo que es fundamental confeccionar una nueva curva de calibrado con cada experimento. Una vez obtenida esta curva podemos extrapolar los resultados de densidad óptica con la concentración de colágeno tipo II en nuestras muestras.

Cada vez que realizamos un experimento tomamos réplicas de cada muestra, así como de los estándares para comprobar que nuestros resultados son reproducibles. Además, realizamos cada experimento dos o tres veces. En las gráficas se muestran los resultados de las medias de los experimentos y la desviación estándar.

Para comprobar si los aminoácidos añadidos al medio de cultivo son capaces de estimular la síntesis de colágeno en los cultivos de condrocitos debemos contar con un cultivo en el que no adicionamos ningún aminoácido y sólo crece con el medio de cultivo estándar. A este cultivo lo denominamos control (control 0).

Tratamiento con glicina 0'025 mg/mL.— La figura 9.27 muestra la producción de colágeno tipo II a lo largo del tiempo en cultivos de condrocitos bovinos que no han recibido tratamiento alguno y siempre han crecido con medio Ham F12 estándar con un 10% de FBS y un 1% de antibióticos (control). En estos cultivos, el contenido de colágeno tipo II aumenta progresivamente desde el comienzo del cultivo hasta el día 13, momento en el que la canti-

dad de colágeno secretado es máxima, con una media de 0'0535 $\mu\text{g/mL}$. A partir de este momento, la cantidad de colágeno tipo II secretado comienza a decaer.

En las células tratadas con glicina 0'025 mg/mL los niveles de colágeno tipo II también alcanzan valores máximos en el día 13 de cultivo, al igual que ocurre con las células control. Prácticamente no existen diferencias entre la cantidad de colágeno secretada por las células tratadas con 0'025 mg/mL de glicina y las células control que no han recibido tratamiento alguno (figura 9.27), con una media de 0'060 $\mu\text{g/mL}$ de colágeno tipo II el día 13 cuando se añaden 0'025 mg/mL de glicina en el medio de cultivo.

Tratamiento con glicina 0'05 mg/mL.– La cantidad de colágeno tipo II secretada por las células que han sido tratadas con 0'05 mg/mL de glicina es superior a la secretada por las células control, desde el día 5 hasta el día 13 de cultivo (figura 9.28). El aumento en la biosíntesis y secreción de colágeno se observa ya desde comienzos del cultivo y alcanza su punto máximo en el día 13 de cultivo, con una media de colágeno tipo II de 0'0795 $\mu\text{g/mL}$.

Tratamiento con glicina 0'1 mg/mL.– También existe una mayor biosíntesis y secreción de colágeno tipo II a lo largo del tiempo en las células tratadas con 0'1 mg/mL de glicina con respecto a las células control no tratadas. Además, la producción de colágeno tipo II se prolonga un poco más en el tiempo cuando las células reciben un tratamiento de 0'1 mg/mL de glicina, no decayendo la producción de colágeno tras el día 13 de cultivo y alcanzando una media de colágeno tipo II de 0'1045 $\mu\text{g/mL}$ el día 15 de cultivo (figura 9.29).

Tratamiento con glicina 0'5 mg/mL.– En este caso también hay una gran diferencia entre la producción de colágeno de las células tratadas con 0'5 mg/mL de glicina y las no tratadas (figura 9.30). El valor más alto en la producción de colágeno tipo II también se alcanza en el día 13 de cultivo con una media de colágeno tipo II producido de 0'0935 $\mu\text{g/mL}$.

Tratamiento con glicina 1 mg/mL.– Con este tratamiento los condrocitos sintetizan también más colágeno que el control (figura 9.31), alcanzando un valor máximo hacia los días 13 y 15 de cultivo de 0'0735-0'0745 $\mu\text{g/mL}$.

Tratamiento con glicina 5 mg/mL.– La adición de 5 mg/mL de glicina al medio de cultivo no provoca ningún efecto sobre la síntesis y secreción de colágeno tipo II por los condrocitos en cultivo (figura 9.32), siendo el valor máximo de colágeno tipo II producido de 0'0645 $\mu\text{g/mL}$ el día 13, que no representa ninguna diferencia significativa con el control, aunque sí se aprecian diferencias estadísticamente significativas el día 15 de cultivo (figura 9.32).

Tratamiento con glicina 10 mg/mL.– En los cultivos de condrocitos tratados con 10 mg/mL de glicina a lo largo del tiempo no se observa estimulación de la síntesis y secreción de colágeno tipo II (figura 9.33), sino una disminución en la producción de colágeno.

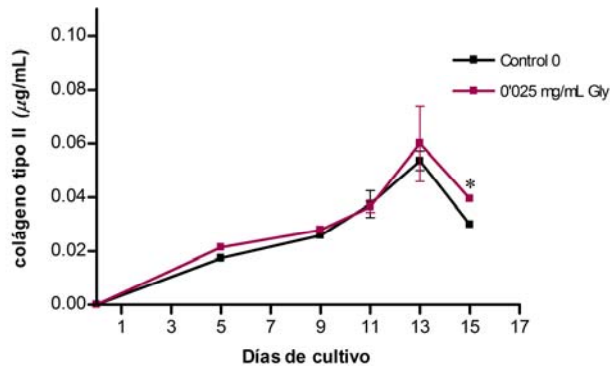


Figura 9.27. Biosíntesis de colágeno tipo II a lo largo del tiempo en cultivos de condrocitos bovinos tratados con 0'025 mg/mL de glicina. Los condrocitos fueron cultivados a una concentración de 15^5 células/mL en una placa de 24 pocillos. El ELISA se desarrolló en la capa de células con los anticuerpos apropiados descritos en la sección de material y métodos. Los resultados muestran el contenido de colágeno tipo II en la capa de células tratadas con 0'025 mg/mL de glicina y en células cultivadas con medio basal a lo largo del tiempo, y representan la media \pm la desviación estándar de cinco preparaciones desarrolladas por duplicado. Obsérvese que prácticamente no existe un incremento en la síntesis de colágeno tipo II en las muestras tratadas con 0'025 mg/mL de glicina con respecto a las células control, excepto tras 15 días de cultivo (* $P < 0'05$ comparado con el control).

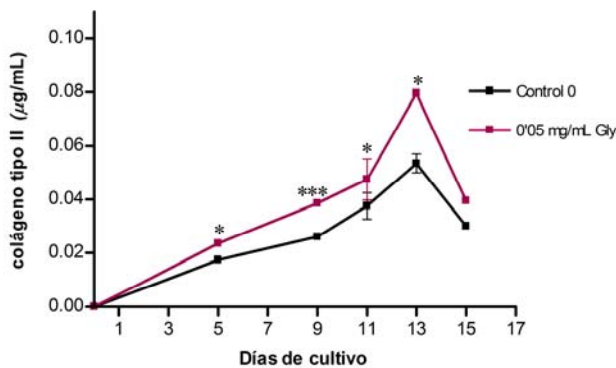


Figura 9.28. Biosíntesis de colágeno tipo II a lo largo del tiempo en cultivos de condrocitos bovinos tratados con 0'05 mg/mL de glicina. Se representa el contenido de colágeno tipo II en la capa de células tratadas con 0'05 mg/mL de glicina y en células cultivadas con medio estándar sin enriquecer a lo largo del tiempo. Como se puede observar, la síntesis de colágeno tipo II es superior en los cultivos de condrocitos tratados con glicina que en los condrocitos que ha crecido en medio basal (* $P < 0'05$, *** $P < 0'001$, comparado con el control).

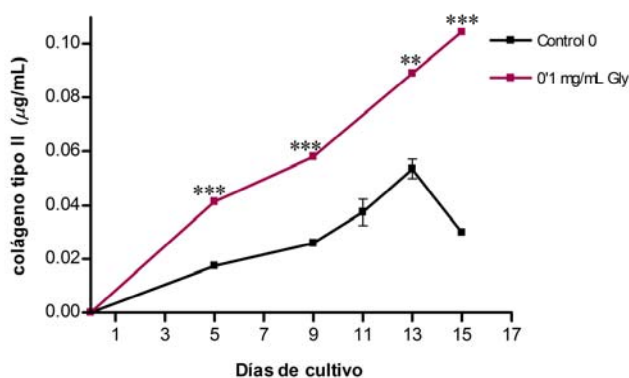


Figura 9.29. Biosíntesis de colágeno tipo II a lo largo del tiempo en cultivos de condrocitos bovinos tratados con 0.1 mg/mL de glicina. La adición de 0.1 mg/mL de glicina a los condrocitos en cultivo estimula la producción de colágeno tipo II a lo largo del tiempo, con respecto a las células control no tratadas con glicina (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, comparado con el control).

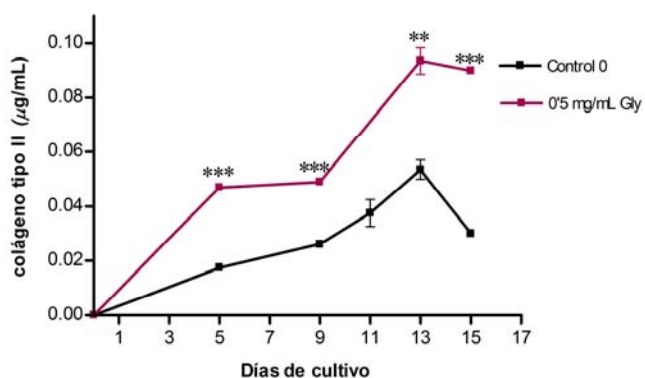


Figura 9.30. Biosíntesis de colágeno tipo II a lo largo del tiempo en cultivos de condrocitos bovinos tratados con 0.5 mg/mL de glicina. Se observa una estimulación de la síntesis de colágeno tipo II en los cultivos de condrocitos tratados con 0.5 mg/mL de glicina frente a los condrocitos no tratados (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, comparado con el control).

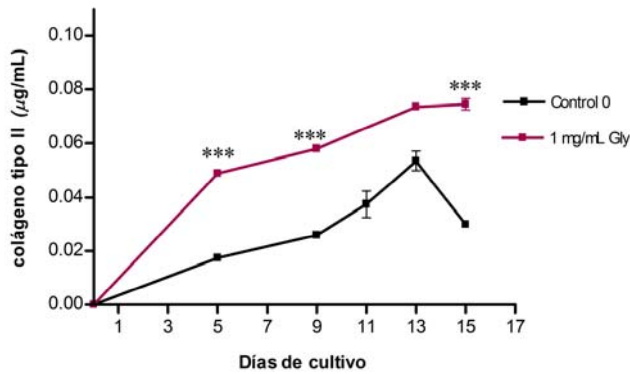


Figura 9.31. Biosíntesis de colágeno tipo II a lo largo del tiempo en cultivos de condrocitos bovinos tratados con 1 mg/mL de glicina. La glicina a una concentración de 1 mg/mL estimula la síntesis de colágeno en los cultivos de condrocitos bovinos (** $P < 0.001$ comparado con el control).

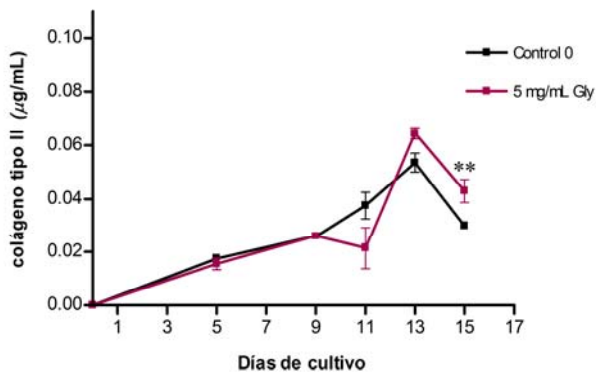


Figura 9.32. Biosíntesis de colágeno tipo II a lo largo del tiempo en cultivos de condrocitos bovinos tratados con 5 mg/mL de glicina. La biosíntesis y secreción de colágeno tipo II por los condrocitos bovinos tratados con 5 mg/mL de glicina no es significativamente diferente de la de los condrocitos control no tratados (** $P < 0.01$ comparado con el control).

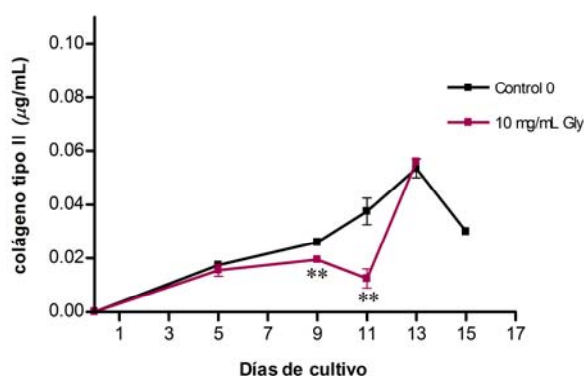


Figura 9.33. Biosíntesis de colágeno tipo II a lo largo del tiempo en cultivos de condrocitos bovinos tratados con 10 mg/mL de glicina. El tratamiento de los condrocitos bovinos con 10 mg/mL de glicina no provoca ningún aumento en la producción de colágeno tipo II (** $P < 0.01$ comparado con el control).

Los resultados muestran una acumulación progresiva de colágeno tipo II en los cultivos de condrocitos bovinos. Esta síntesis y deposición de colágeno tipo II es estimulada por algunas concentraciones de glicina, concretamente por las concentraciones intermedias (0.05 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.5 mg/mL y 1 mg/mL). Mientras que la concentración más baja (0.025 mg/mL) y las más altas (5 y 10 mg/mL) no estimulan la síntesis de colágeno tipo II.

Tabla 9.12. Biosíntesis y secreción de colágeno en cultivos de condrocitos de 13 días tras el tratamiento con glicina. Los datos representan la media \pm S.D. de dos experimentos independientes. Además, se muestra el incremento producido en la síntesis de colágeno como porcentaje de colágeno con respecto al control (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, comparado con el control).

[Glicina]	μg colágeno/mL	% colágeno
Control	0.054	100.00
0.025	0.060	111.11
0.05	0.080*	148.15
0.1	0.089**	164.81
0.5	0.094**	174.07
1	0.073	135.18
5	0.065	120.37
10	0.056	103.70

En la mayoría de los casos la producción máxima de colágeno se produce el día 13 de cultivo, que supondría el fin del periodo de estimulación. En este momento del cultivo se produce más colágeno con concentraciones intermedias de glicina, entre 0'05 y 0'5 mg/mL (tabla 9.12 y figura 9.34).

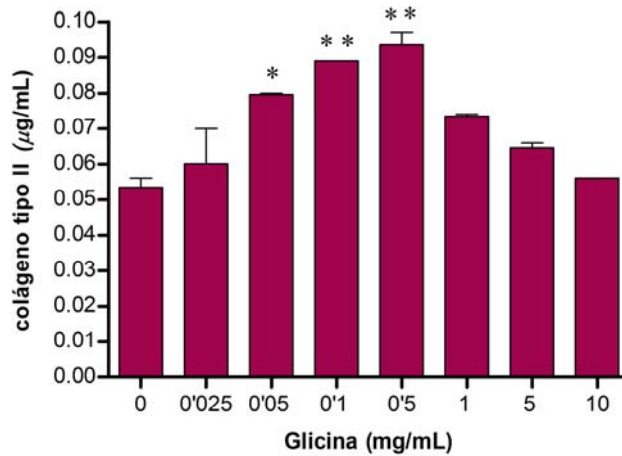


Figura 9.34. Secreción de colágeno tipo II medida en la monocapa de cultivos de condrocitos bovinos de 13 días tras el tratamiento con glicina. Los datos representan la media \pm SD de ocho preparaciones de condrocitos desarrolladas por duplicado (* $P < 0'05$, ** $P < 0'01$, comparado con el control).

b) Cuantificación del colágeno secretado al medio de cultivo

La cuantificación del colágeno producido por los condrocitos bovinos y secretado al medio de cultivo se llevó a cabo mediante el ensayo colorimétrico basado en el colorante rojo Sirio (Biocolor Ltd) (véase capítulo 8). Al usar esta técnica, es importante confeccionar una nueva curva de calibrado cada vez que se cambie de lote de reactivos.

Las medidas se desarrollan en cultivos por triplicado. En las gráficas se muestran las medias de los experimentos y la desviación estándar.

Como siempre, para contrastar el efecto de la adición de aminoácidos al medio de cultivo, debemos tener un cultivo control que no se enriquece con ningún aminoácido y crece con medio basal.

A los tres días de iniciar el tratamiento de los condrocitos bovinos en cultivo con diferentes concentraciones de glicina observamos que el colágeno secretado al medio de cultivo ha aumentado significativamente sólo en los cultivos tratados glicina 0'1 mg/mL, un 37'70% más de colágeno que en los cultivos control, mientras que las concentraciones más altas del aminoácido (5 y 10 mg/mL) ejercen un efecto negativo sobre la síntesis y secreción de colágeno al medio (tabla 9.13 y figura 9.35).

Tabla 9.13. Biosíntesis y secreción de colágeno al medio de cultivo de condrocitos de 3 días tratados con glicina. Los datos representan la media \pm S.D. de tres experimentos independientes. Además, se muestra el incremento producido en la síntesis de colágeno como porcentaje de colágeno con respecto al control (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, comparado con el control).

[Glicina]	μg colágeno/mL	% colágeno
Control	77'49	100'00
0'025	96'60	124'66
0'05	101'78	131'34
0'1	106'70*	137'70
0'5	85'91	110'86
1	67'97	87'71
5	39'23**	50'62
10	25'39**	32'76

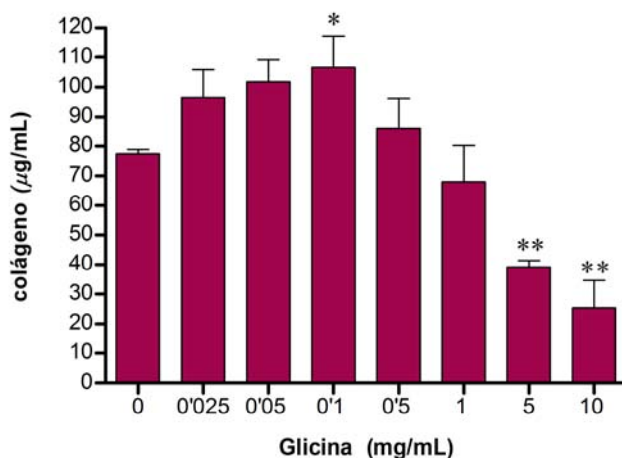


Figura 9.35. Biosíntesis y secreción de colágeno al medio de cultivo de condrocitos de 3 días tratados con glicina. Los datos representan la media \pm S.D. de tres experimentos. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, comparado con el control).

A los 13 días de cultivo seguimos observando el mismo comportamiento (tabla 9.14 y figura 9.36). Una concentración de 0.1 mg/mL de glicina ejerce un efecto positivo sobre la síntesis de colágeno soluble, mientras que la concentración más alta (10 mg/mL) disminuye mucho la síntesis de colágeno.

Tabla 9.14. Biosíntesis y secreción de colágeno al medio de cultivo de condrocitos de 13 días tratados con glicina. Los datos representan la media \pm S.D. de tres experimentos independientes. Además, se muestra el incremento producido en la síntesis de colágeno como porcentaje de colágeno con respecto al control (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, comparado con el control).

[Glicina]	μg colágeno/mL	% colágeno
Control	60'86	100'00
0'025	60'04	98'65
0'05	61'69	101'36
0'1	89'36*	146'83
0'5	74'11	121'77
1	72'43	119'01
5	42'76	70'26
10	12'42***	20'41

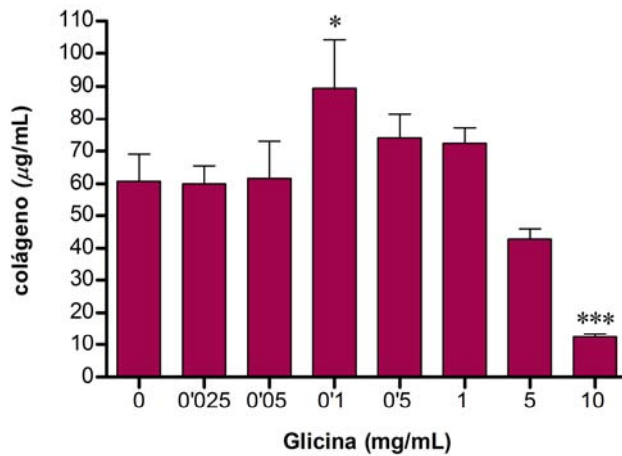


Figura 9.36. Biosíntesis y secreción de colágeno al medio de cultivo de condrocitos de 13 días tratados con glicina. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, comparado con el control).

9.2.4. Efecto de la prolina sobre el crecimiento de los condrocitos

Las diferentes concentraciones de prolina utilizadas en este estudio no afectan al crecimiento de los condrocitos bovinos en cultivo pues no se observan diferencias estadísticamente signi-

ficativas en el crecimiento de las células tratadas y el grupo control no tratado con prolina (figura 9.37).

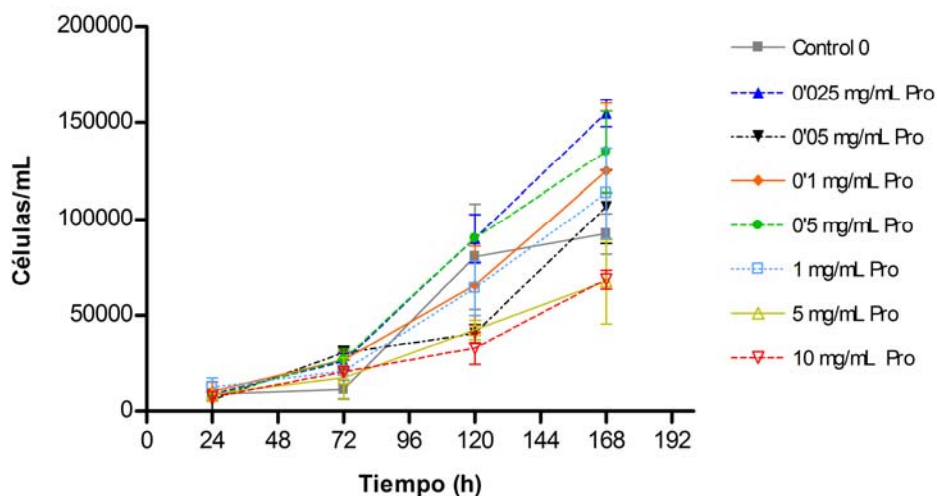


Figura 9.37. Efecto del tratamiento con prolina sobre el crecimiento de los condrocitos en cultivo. En la gráfica se muestran los valores medios \pm S.D. de dos curvas de crecimiento de condrocitos tratados con diferentes concentraciones de prolina. La prolina no afecta al crecimiento de los condrocitos en cultivo.

En cuanto al análisis de la viabilidad celular, observamos que el tratamiento de los condrocitos bovinos en cultivo con diferentes concentraciones de prolina (0'025-10 mg/mL) no afecta a la viabilidad de estas células (tabla 9.15).

Tabla 9.15. Resultados de viabilidad celular tras el tratamiento de los condrocitos con diferentes concentraciones de prolina durante 7 días. En la tabla se muestra la media del porcentaje de viabilidad celular de dos experimentos \pm S.D. No existen diferencias estadísticamente significativas entre la viabilidad de las células tratadas con prolina y las células control no tratadas.

Tiempo (h)	Control 0	0'025 mg/mL	0'05 mg/mL	0'1 mg/mL	0'5 mg/mL	1 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL
24	49'60 (39'88)	25'40 (7'64)	28'20 (7'21)	45'75 (1'91)	79'80 (2'83)	61'35 (16'05)	61'90 (11'46)	47'75 (3'18)
72	56'30 (5'23)	67'85 (1'63)	83'30 (7'50)	77'85 (3'04)	83'90 (3'25)	70'90 (11'88)	86'15 (7'85)	70'40 (14'71)
120	50'40 (19'94)	83'15 (1'48)	81'35 (7'42)	82'55 (8'98)	83'60 (7'07)	79'00 (0'14)	79'30 (10'46)	79'90 (4'81)
168	89'90 (3'11)	89'35 (2'62)	78'70 (11'88)	91'35 (1'06)	84'35 (7'85)	83'75 (0'64)	82'50 (2'69)	83'20 (6'36)

9.2.5. Efecto de la prolina sobre la producción de colágeno

a) Cuantificación del colágeno tipo II depositado en la monocapa de células

Tratamiento con prolina 0'025 mg/mL.– La adición de 0'025 mg/mL de prolina al medio de cultivo provoca una estimulación en la biosíntesis de colágeno desde los primeros días de cultivo (figura 9.38). Esta estimulación alcanza el máximo el día 13 con un valor medio de 0'0905 $\mu\text{g/mL}$.

Tratamiento con prolina 0'05 mg/mL.– La prolina a una concentración de 0'05 mg/mL también estimula la biosíntesis y secreción de colágeno tipo II, pero en este caso la diferencia en la producción de colágeno entre las células tratadas y las células control sólo se hace patente en el día 13 de cultivo (figura 9.39), momento en el que alcanza una producción media de 0'107 $\mu\text{g/mL}$.

Tratamiento con prolina 0'1 mg/mL.– La cantidad de colágeno tipo II secretado es superior en los condrocitos tratados con 0'1 mg/mL de prolina que en las células control no tratadas, esta diferencia se acentúa hacia el final del periodo de cultivo (figura 9.40), alcanzando un valor máximo de 0'1 $\mu\text{g/mL}$ de colágeno el día 15 de cultivo.

Tratamiento con prolina 0'5 mg/mL.– La prolina continúa estimulando la producción de colágeno tipo II con una concentración de 0'5 mg/mL (figura 9.41) y esa estimulación parece mantenerse en el tiempo con respecto a los cultivos control.

Tratamiento con prolina 1 mg/mL.– Sigue existiendo una estimulación en la biosíntesis de colágeno tipo II con la adición de prolina 1 mg/mL en el medio de cultivo (figura 9.42).

Tratamiento con prolina 5 mg/mL.– Con 5 mg/mL de prolina en el medio de cultivo no existen diferencias significativas entre la cantidad de colágeno tipo II sintetizado por las células tratadas y las células control no tratadas (figura 9.43).

Tratamiento con prolina 10 mg/mL.– Las concentraciones altas de prolina no estimulan la biosíntesis ni la secreción de colágeno tipo II (figura 9.44).

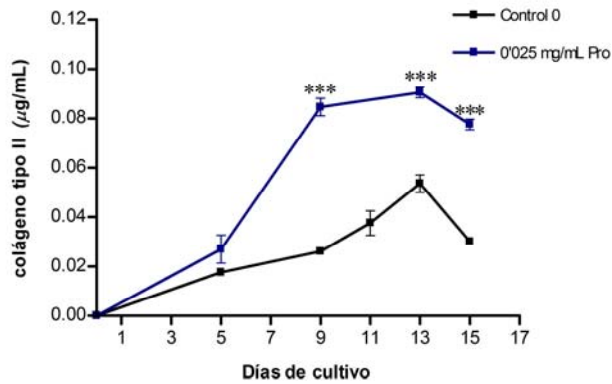


Figura 9.38. Biosíntesis de colágeno tipo II a lo largo del tiempo en cultivos de condrocitos bovinos tratados con 0.025 mg/mL de prolina. La prolina a una concentración de 0.025 mg/mL provoca una estimulación en la biosíntesis de colágeno tipo II por los condrocitos en cultivo (***) $P < 0.001$ comparado con el control).

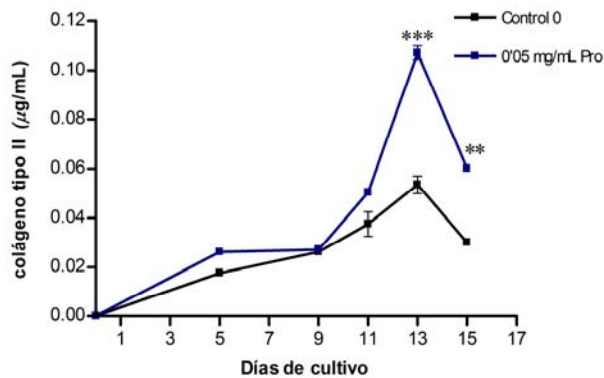


Figura 9.39. Biosíntesis de colágeno tipo II a lo largo del tiempo en cultivos de condrocitos bovinos tratados con 0.05 mg/mL de prolina. La prolina a una concentración de 0.05 mg/mL estimula la biosíntesis y secreción de colágeno tipo II en el día 13 de cultivo (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ comparado con el grupo control).

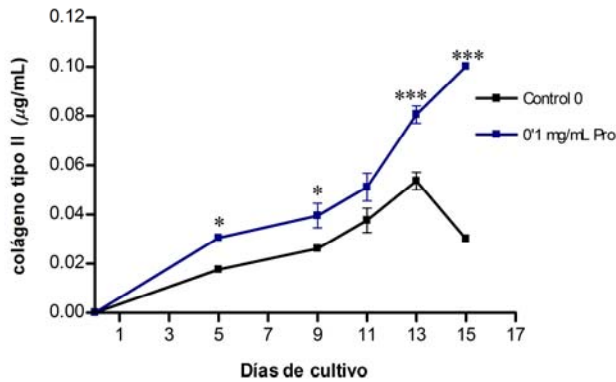


Figura 9.40. Biosíntesis de colágeno tipo II a lo largo del tiempo en cultivos de condrocitos bovinos tratados con 0.1 mg/mL de prolina. La biosíntesis y secreción de colágeno tipo II por los condrocitos bovinos resulta estimulada mediante la adición de 0.1 mg/mL de prolina, además la estimulación máxima se produce el día 15 de cultivo (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, comparado con el control).

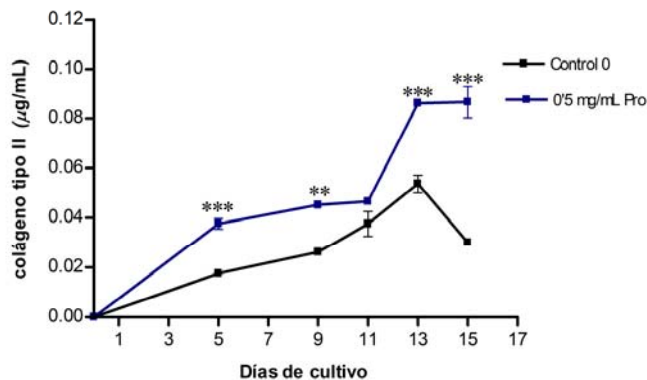


Figura 9.41. Biosíntesis de colágeno tipo II a lo largo del tiempo en cultivos de condrocitos bovinos tratados con 0.5 mg/mL de prolina. La adición de 0.5 mg/mL de prolina al medio de cultivo provoca una estimulación en la biosíntesis y secreción de colágeno tipo II por los condrocitos bovinos en cultivo (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, comparado con el control).

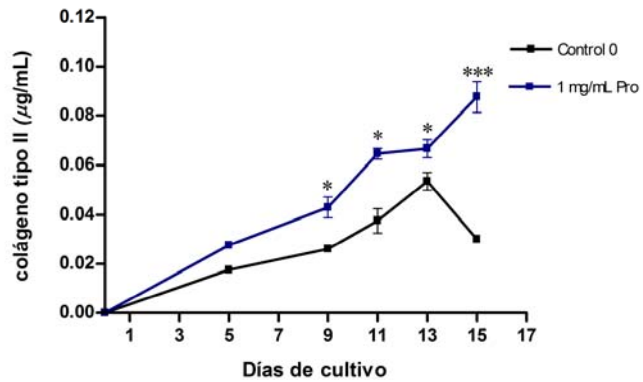


Figura 9.42. Biosíntesis de colágeno tipo II a lo largo del tiempo en cultivos de condrocitos bovinos tratados con 1 mg/mL de prolina. La prolina, a una concentración de 1 mg/mL, estimula la síntesis de colágeno tipo II en los cultivos de condrocitos bovinos (* $P < 0'05$, *** $P < 0'001$, comparado con el control).

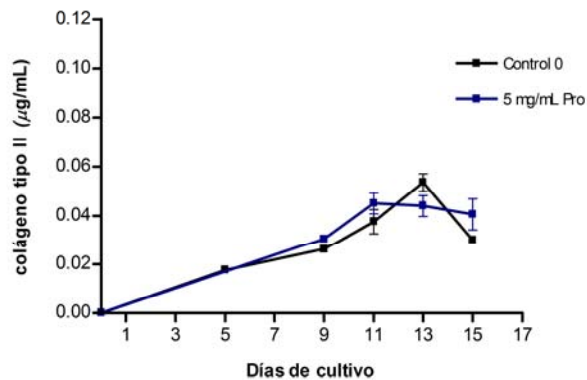


Figura 9.43. Biosíntesis de colágeno tipo II a lo largo del tiempo en cultivos de condrocitos bovinos tratados con 5 mg/mL de prolina. En este caso, el tratamiento de los condrocitos con 5 mg/ml de prolina no estimula la síntesis y secreción de colágeno tipo II.

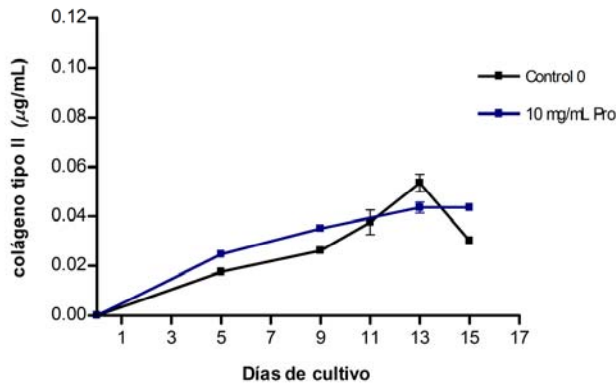


Figura 9.44. Biosíntesis de colágeno tipo II a lo largo del tiempo en cultivos de condrocitos bovinos tratados con 10 mg/mL de prolina. Al igual que en el caso anterior, la concentración de 10 mg/mL de prolina no estimula la síntesis de colágeno tipo II por los condrocitos bovinos en cultivo.

Al igual que ocurre con la glicina, el efecto de las distintas concentraciones de prolina sobre la biosíntesis de colágeno tipo II por los condrocitos bovinos en cultivo a lo largo del tiempo es una función optimizable (figuras 9.38-9.44). La prolina estimula la biosíntesis y secreción de colágeno tipo II desde una concentración de 0.025 mg/mL hasta 1 mg/mL. Sin embargo, las concentraciones más altas de 5 y 10 mg/mL dejan de provocar este efecto.

Tabla 9.16. Biosíntesis y secreción de colágeno en cultivos de condrocitos de 13 días tras el tratamiento con prolina. Los datos representan la media \pm S.D. de dos experimentos independientes. Además, se muestra el incremento producido en la síntesis de colágeno como porcentaje de colágeno con respecto al control (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, comparado con el control).

[Prolina]	μg colágeno/mL	% colágeno
Control	0.054	100.00
0.025	0.087***	161.11
0.05	0.107***	198.15
0.1	0.080***	148.15
0.5	0.086***	159.26
1	0.066*	122.22
5	0.044	81.48
10	0.044	81.48

En la tabla 9.16 y la figura 9.45 se muestra la producción de colágeno en el día de máxima estimulación con distintas concentraciones de prolina. Las concentraciones de 0'025-0'5 mg/mL de prolina provocan una clara estimulación en la biosíntesis de colágeno tipo II con respecto al control negativo.

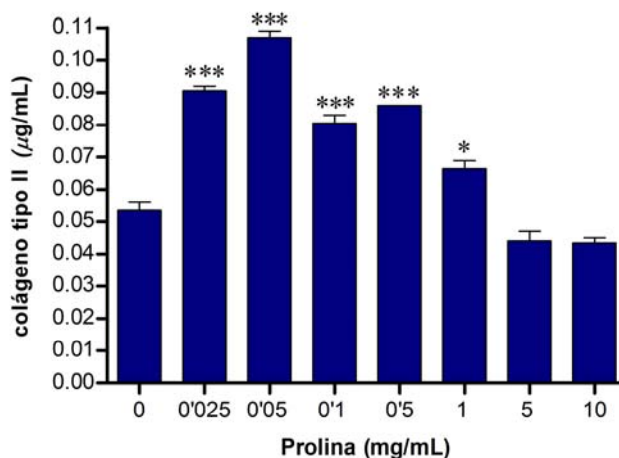


Figura 9.45 Secreción de colágeno tipo II medida en la monocapa de cultivos de condrocitos bovinos de 13 días tras el tratamiento con prolina. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de ocho preparaciones de condrocitos desarrolladas por duplicado (* $P < 0'05$, *** $P < 0'001$, comparado con el control).

b) Cuantificación del colágeno secretado al medio de cultivo

El efecto de la prolina sobre la síntesis y secreción de colágeno al medio en los cultivos de condrocitos es mucho más sutil que el de la glicina. A los 3 días de cultivo no existen diferencias estadísticamente significativas entre la secreción de colágeno en los cultivos control y la secreción en cultivos tratados con prolina (tabla 9.17 y figura 9.46). Tienen que transcurrir varios días de cultivo y tratamiento con prolina para que se vea algún efecto sobre la secreción de colágeno al medio de cultivo; a los 13 días de cultivo se observa un incremento en la síntesis de colágeno de los cultivos de condrocitos tratados con 0'05 y 0'1 mg/mL de prolina (del 46'88% y el 55'59%, respectivamente) (tabla 9.18 y figura 9.47).

Tabla 9.17. Biosíntesis y secreción de colágeno al medio de cultivo de condrocitos de 3 días tratados con prolina. Los datos representan la media \pm S.D. de tres experimentos independientes.

[Prolina]	μg colágeno/mL	% colágeno
Control	67'11	100'00
0'025	69'11	102'98
0'05	71'10	105'94
0'1	58'99	87'90
0'5	59'40	88'51
1	61'25	91'27
5	49'03	73'06
10	50'57	75'35

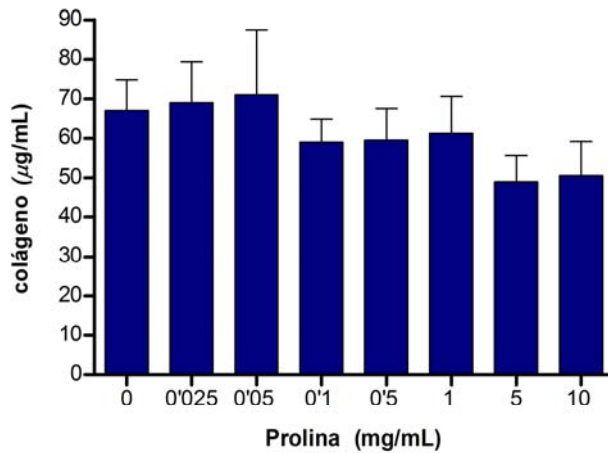


Figura 9.46. Biosíntesis y secreción de colágeno al medio de cultivo de condrocitos de 3 días tratados con prolina. Los datos representan la media \pm S.D. de tres experimentos independientes. Como se puede observar no existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos y el control.

Tabla 9.18. Biosíntesis y secreción de colágeno al medio de cultivo de condrocitos de 13 días tratados con prolina. Los datos representan la media \pm S.D. de tres experimentos independientes. Además, se muestra el incremento producido en la síntesis de colágeno como porcentaje de colágeno con respecto al control (* $P < 0.05$ comparado con el control).

[Prolina]	μg colágeno/mL	% colágeno
Control	60'86	100'00
0'025	72'97	119'90
0'05	89'39*	146'88
0'1	94'69*	155'59
0'5	87'64	144'00
1	86'08	141'44
5	81'86	134'50
10	74'96	123'17

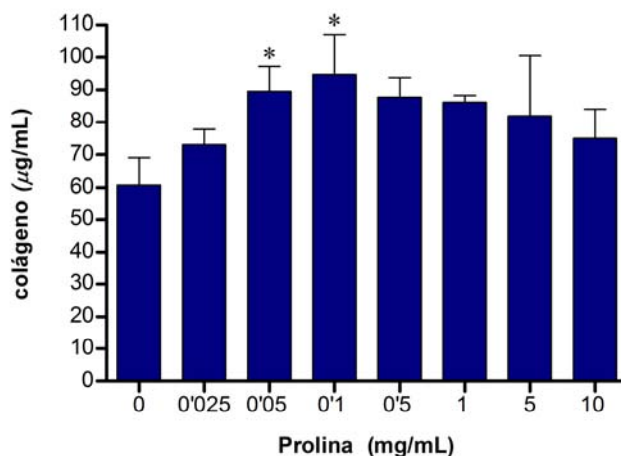


Figura 9.47. Biosíntesis y secreción de colágeno al medio de cultivo de condrocitos de 13 días tratados con prolina. Los datos representan la media \pm S.D. de tres experimentos independientes. El tratamiento de los condrocitos en cultivo con 0.05 y 0.1 mg/mL de prolina durante 13 días provoca una estimulación de la síntesis de colágeno (* $P < 0.05$ comparado con el control).

9.2.6. Efecto de la lisina sobre el crecimiento de los condrocitos

En este caso, al igual que ocurría con los cultivos de fibroblastos de ratón, el tratamiento con lisina no afecta a la capacidad de crecimiento de los condrocitos, excepto con la concentra-

ción más elevada del aminoácido (10 mg/mL) que afecta negativamente al crecimiento celular, pues se observan diferencias estadísticamente significativas entre el número de células de los cultivos tratados con 10 mg/mL de lisina y el de los cultivos control sin tratar (figura 9.48). La cantidad de células/mL disminuye drásticamente a partir de las 120 horas en tratamiento con 10 mg/mL de lisina. Sin embargo, el resto de concentraciones del aminoácido no provocan ningún efecto sobre el crecimiento de los condrocitos en cultivo.

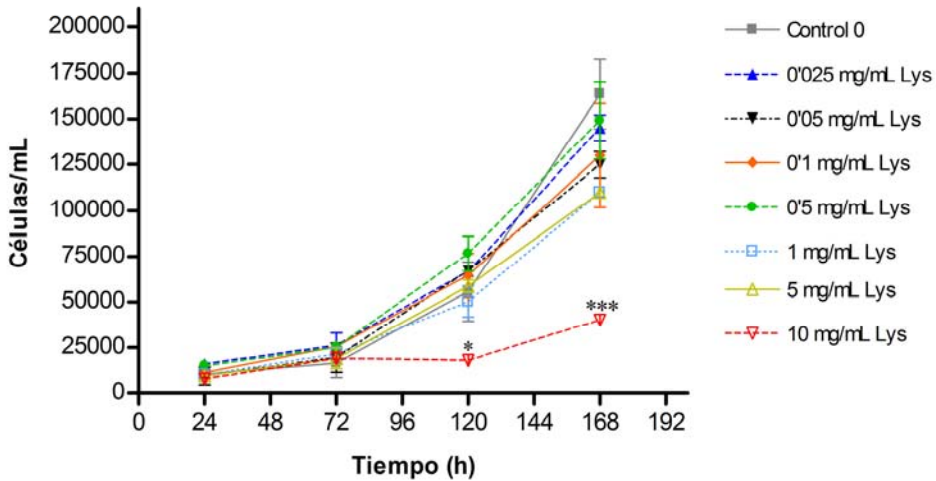


Figura 9.48. Efecto del tratamiento con lisina sobre el crecimiento de los condrocitos bovinos en cultivo. En la gráfica se representa la media de dos curvas de crecimiento de condrocitos tratados con diferentes concentraciones de lisina y células no tratadas con lisina durante 7 días. Se puede observar que la lisina no afecta al crecimiento de los condrocitos, excepto a concentraciones tan altas como 10 mg/mL (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, comparado con el control)

En cuanto al análisis de la viabilidad celular, se comprobó que la lisina no afecta a la viabilidad de los condrocitos bovinos en cultivo (tabla 9.19).

Tabla 9.19. Resultados de viabilidad celular tras el tratamiento de los condrocitos con diferentes concentraciones de lisina durante 7 días. En la tabla se muestra la media del porcentaje de viabilidad celular de dos experimentos \pm S.D.

Tiempo (h)	Control 0	0.025 mg/mL	0.05 mg/mL	0.1 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL
24	69.70 (4.24)	73.40 (17.40)	59.40 (22.06)	74.85 (22.70)	59.80 (17.54)	61.35 (16.05)	70.25 (9.40)	50.00 (0.00)
72	83.75 (7.28)	84.95 (15.91)	85.75 (11.81)	70.00 (4.67)	77.20 (3.11)	59.90 (4.81)	77.85 (7.71)	52.20 (22.34)
120	83.95 (0.50)	81.25 (0.35)	79.50 (5.09)	83.95 (2.19)	80.05 (0.92)	82.80 (6.36)	79.50 (2.69)	84.85 (7.99)
168	80.90 (0.71)	77.80 (5.94)	75.90 (13.01)	84.15 (3.46)	85.20 (0.42)	75.15 (2.05)	84.05 (3.32)	66.95 (7.85)

9.2.7. Efecto de la lisina sobre la producción de colágeno

a) Cuantificación del colágeno tipo II depositado en la monocapa de células

Tratamiento con lisina 0'025 mg/mL.– Los niveles de colágeno tipo II siguen alcanzando valores máximos el día 13 de cultivo, con estimulación de la síntesis y secreción ante el tratamiento de los condrocitos con 0'025 mg/mL de lisina frente a los condrocitos no tratados con el aminoácido (figura 9.49).

Tratamiento con lisina 0'05 mg/mL.– La adición de 0'05 mg/mL de lisina en el medio de cultivo de condrocitos estimula la síntesis y secreción de colágeno tipo II desde comienzos del cultivo, con un máximo en la producción de colágeno tipo II el día 13 de cultivo (figura 9.50).

Tratamiento con lisina 0'1 mg/mL.– También se observa una estimulación en la síntesis de colágeno al añadir 0'1 mg/mL de lisina en el medio de cultivo de condrocitos (figura 9.51).

Tratamiento con lisina 0'5 mg/mL.– La secreción de colágeno tipo II aumenta en los estadios iniciales del cultivo con respecto a las células control que no reciben tratamiento alguno (figura 9.52); sin embargo, el tratamiento prolongado con 0'5 mg/mL de lisina parece provocar una disminución en la secreción de colágeno tipo II.

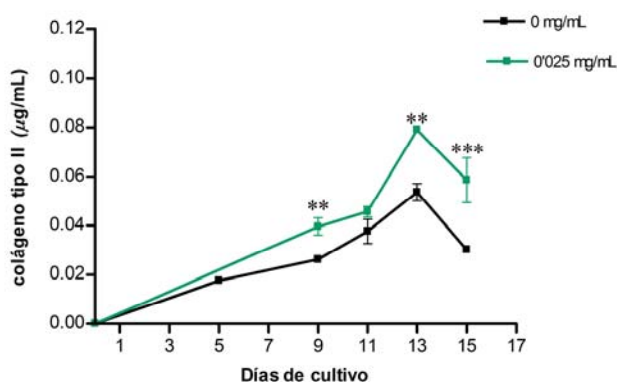


Figura 9.49. Biosíntesis de colágeno tipo II a lo largo del tiempo en cultivos de condrocitos bovinos tratados con 0'025 mg/mL de lisina.

Los resultados muestran el contenido de colágeno tipo II en la capa de células tratadas con 0'025 mg/mL de lisina y en células cultivadas con medio basal a lo largo del tiempo, y representan la media \pm la desviación estándar de cinco preparaciones desarrolladas por duplicado. Obsérvese que existe un ligero aumento en la síntesis de colágeno tipo II en las muestras tratadas con 0'025 mg/mL de lisina con respecto a las células control (** $P < 0'01$, *** $P < 0'001$, comparado con el control).

Tratamiento con lisina 1 mg/mL.– La adición de 1 mg/mL de lisina al medio de cultivo no estimula la biosíntesis y secreción de colágeno tipo II por los condrocitos con respecto a los cultivos control no tratados con lisina (figura 9.53).

Tratamiento con lisina 5 mg/mL.– Una concentración alta de lisina (5 mg/mL) disminuye la síntesis de colágeno tipo II e incluso acaba inhibiéndola finalizando la producción de colágeno el día 11 de cultivo (figura 9.54).

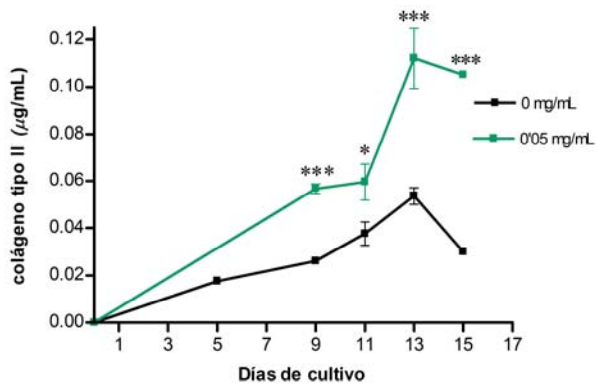


Figura 9.50. Biosíntesis de colágeno tipo II a lo largo del tiempo en cultivos de condrocitos bovinos tratados con 0,05 mg/mL de lisina. Como puede observarse en la gráfica, el tratamiento de los condrocitos con 0,05 mg/mL de lisina provoca una estimulación en la síntesis y secreción de colágeno tipo II, siendo esta estimulación máxima el día 13 de cultivo (* $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, comparado con el control).

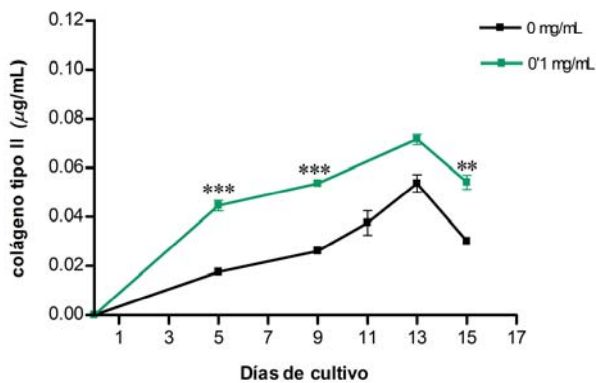


Figura 9.51. Biosíntesis de colágeno tipo II a lo largo del tiempo en cultivos de condrocitos bovinos tratados con 0,1 mg/mL de lisina. La lisina a una concentración de 0,1 mg/mL estimula la síntesis y secreción de colágeno tipo II en los condrocitos bovinos en cultivo (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, comparado con el control).

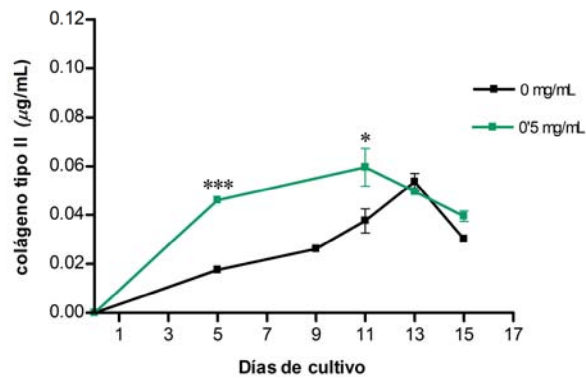


Figura 9.52. Biosíntesis de colágeno tipo II a lo largo del tiempo en cultivos de condrocitos bovinos tratados con 0.5 mg/mL de lisina. La lisina a 0.5 mg/mL estimula la síntesis de colágeno tipo II durante los 11 primeros días de cultivo, mientras que la producción de colágeno desciende a partir del día 11 con respecto al control (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, comparado con el control).

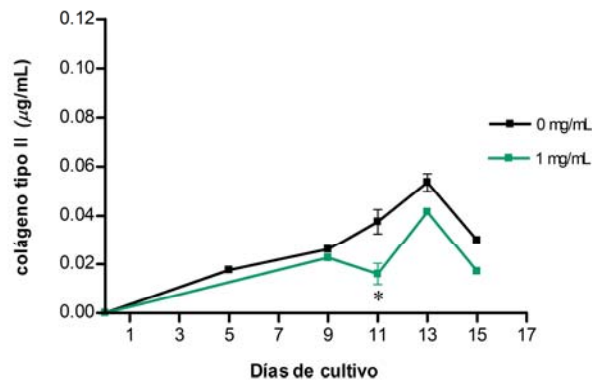


Figura 9.53. Biosíntesis de colágeno tipo II a lo largo del tiempo en cultivos de condrocitos bovinos tratados con 1 mg/mL de lisina. La adición de lisina a una concentración de 1 mg/mL al medio de cultivo no estimula la producción de colágeno tipo II por los condrocitos en cultivo (* $P < 0.05$ comparado con el control).

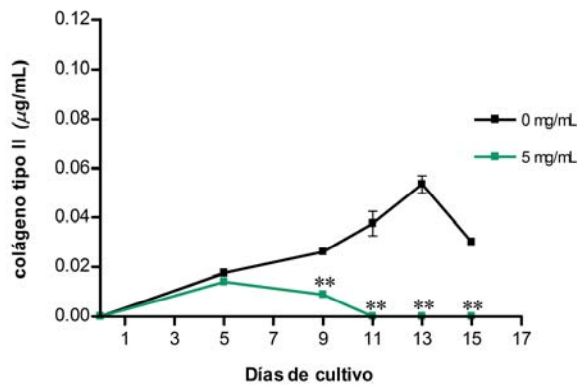


Figura 9.54 Biosíntesis de colágeno tipo II a lo largo del tiempo en cultivos de condrocitos bovinos tratados con 5 mg/mL de lisina. El tratamiento de los condrocitos con 5 mg/mL de lisina provoca una disminución en la secreción de colágeno tipo II (** $P < 0.01$ comparado con el control).

Los resultados muestran una acumulación progresiva de colágeno tipo II en los cultivos de condrocitos bovinos. Como puede observarse en las figuras 9.49-9.54, la lisina estimula la biosíntesis de colágeno tipo II desde una concentración de 0.025 mg/mL hasta 0.5 mg/mL, mientras que las concentraciones más altas (1 y 5 mg/mL) provocan un descenso en la producción de colágeno tipo II con respecto a los cultivos control.

En la tabla 9.20 y la figura 9.55 se muestra la producción de colágeno en el día de máxima estimulación con distintas concentraciones de lisina. Las concentraciones dentro del intervalo de 0.025-0.5 mg/mL de lisina provocan una clara estimulación en la biosíntesis de colágeno tipo II con respecto al control.

Tabla 9.20. Biosíntesis y secreción de colágeno en cultivos de condrocitos de 13 días tras el tratamiento con lisina. Los datos representan la media \pm S.D. de dos experimentos independientes. Además, se muestra el incremento producido en la síntesis de colágeno como porcentaje de colágeno con respecto al control (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ comparado con el control).

[Lisina]	$\mu\text{g colágeno/mL}$	% colágeno
Control	0.054	100.00
0.025	0.079**	147.30
0.05	0.112***	207.41
0.1	0.072	133.33
0.5	0.050	92.59
1	0.042	77.78
5	0.000***	0.00

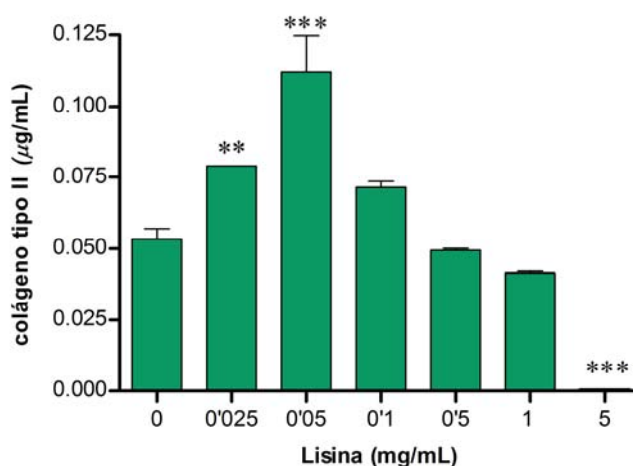


Figura 9.55. Secreción de colágeno tipo II medida en la monocapa de cultivos de condrocitos bovinos de 13 días tras el tratamiento con lisina. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de siete preparaciones de condrocitos desarrolladas por duplicado (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, comparado con el control). El tratamiento con las dosis más bajas de lisina (0.025 y 0.05 mg/mL) estimula la síntesis de colágeno, mientras que las dosis más altas (5 mg/mL y 10 mg/mL –no representada en la gráfica–) inhiben totalmente la síntesis de colágeno.

b) Cuantificación del colágeno secretado al medio de cultivo

La cuantificación del colágeno producido y secretado por los condrocitos en cultivo nos indica que la lisina no estimula la biosíntesis del colágeno soluble. A los tres días de cultivo no ejerce ninguna influencia sobre la biosíntesis de colágeno, sólo la concentración más alta (5 mg/mL) inhibe la producción de colágeno con respecto al control (tabla 9.21 y figura 9.56). A medida que transcurre el tiempo de cultivo en tratamiento con lisina, también las dosis más bajas de este aminoácido ejercen un efecto inhibitorio de la síntesis de colágeno soluble en los cultivos de condrocitos bovinos (tabla 9.22 y figura 9.57).

Tabla 9.21. Biosíntesis y secreción de colágeno al medio de cultivo de condrocitos de 3 días tratados con lisina. Los datos representan la media \pm S.D. de tres experimentos independientes. Además, se muestra el incremento producido en la síntesis de colágeno como porcentaje de colágeno con respecto al control (* $P < 0.05$ comparado con el control).

[Lisina]	μg colágeno/mL	% colágeno
Control	60'86	100'00
0'025	66'77	109'71
0'05	60'90	100'06
0'1	52'15	85'69
0'5	52,15	85'69
1	51'40	84'46
5	36'68*	60'27

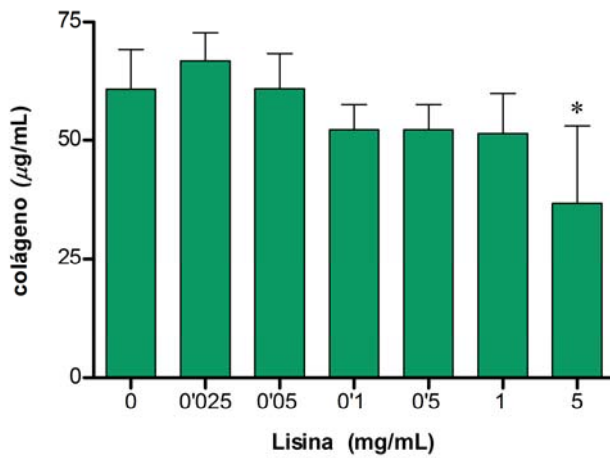


Figura 9.56. Biosíntesis y secreción de colágeno al medio de cultivo de condrocitos de 3 días tratados con lisina. Los datos representan la media \pm S.D. de tres experimentos independientes (* $P < 0.05$ comparado con el control).

Tabla 9.22. Biosíntesis y secreción de colágeno al medio de cultivo de condrocitos de 13 días tratados con lisina. Los datos representan la media \pm S.D. de tres experimentos independientes. Además, se muestra el incremento producido en la síntesis de colágeno como porcentaje de colágeno con respecto al control (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, comparado con el control).

[Lisina]	μg colágeno/mL	% colágeno
Control	77'49	100'00
0'025	69'95	90'27
0'05	72'01	92'93
0'1	64'66*	83'44
0'5	68'17*	87'98
1	55'29***	71'35
5	41'51***	53'57

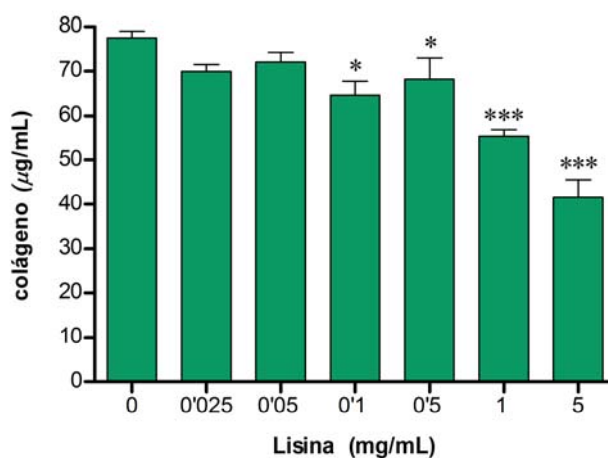


Figura 9.57. Biosíntesis y secreción de colágeno al medio de cultivo de condrocitos de 13 días tratados con lisina. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, comparado con el control).

9.3. Estudio nutricional llevado a cabo en el Instituto del Metabolismo Celular (IMC)

En estrecha colaboración con el trabajo de esta Tesis, y basándose en los resultados expuestos aquí, en el Instituto del Metabolismo Celular hemos llevado a cabo un proyecto de inves-

tigación nutricional sobre el efecto de la glicina usado como suplemento nutricional para combatir la artrosis, osteoporosis, lesiones físicas, y otros problemas relacionados con el deterioro de la estructura mecánica del cuerpo, incluyendo varios casos de implantes dentarios, degeneración de encías, y un caso de osteogénesis imperfecta.

Los resultados presentados aquí corresponden a un primer grupo experimental de 600 personas (347 mujeres y 253 hombres) de edades comprendidas entre 4 y 85 años, afectados por diferentes enfermedades y lesiones físicas, que participaron voluntariamente en esta investigación. La tabla 9.23 muestra la lista completa de enfermedades, y el número total de pacientes afectados con cada una. La figura 9.58 muestra la distribución de edades en el grupo total, y en los afectados por los dos problemas mayoritarios de los pacientes: artrosis y lesiones físicas.

Todas estas personas participaron voluntariamente en esta investigación. El fundamento del tratamiento fue explicado con todo el detalle necesario de modo que todos pudieran entenderlo. Todos convinieron en dar cuenta periódicamente de los resultados relatando los cambios que pudiesen notar en los síntomas, y sometiéndose a las pruebas analíticas que fuesen precisas, para el correcto seguimiento de cada enfermedad, así como a dejar de tomar analgésicos o antiinflamatorios cuando vieses que les desaparecía el dolor. Muchos pacientes afectados con artrosis y lesiones físicas habían seguido un tratamiento con sulfato de glucosamina, y todos ellos declararon que ese tratamiento no les había producido ningún resultado beneficioso.

La glicina es un producto autorizado para el consumo humano como aditivo alimentario. La glicina usada en estos experimentos fue suministrada por la compañía *Quimipur* (Madrid), con el grado de calidad de *aditivo alimentario* (productos que satisfacen las especificaciones indicadas en el código alimentario y en las disposiciones legales que regulan la calidad de los productos que pueden usarse como aditivos nutricionales en España y en la Comunidad Europea), para el consumo humano.

La dosificación normal recomendada por los protocolos del IMC a los pacientes era en principio de 10 gramos de glicina. Esta dosis se ha deducido de nuestros resultados descritos en el capítulo 7, y su ingesta se repartía en dos tomas de 5 gramos cada una, por la mañana después del desayuno, y por la noche, después de cena; la glicina podía tomarse disuelta en leche, yogur, jugo de naranja, o cualquier otro vehículo similar; la glicina es fácilmente soluble, y tiene un gusto agradable, ligeramente dulce.

La toxicidad de la glicina se ha determinado en numerosos estudios, siendo en rata la dosis tóxica de 7'93 g/kg, lo que equivale a 555 g en una dosis única para una persona de 70 kg de peso, es decir, 110 veces superior a la dosis recomendada en los protocolos del IMC. En realidad, la glicina es uno de los productos menos tóxicos presentes en el metabolismo, y así se ha usado como nutriente natural de células en situaciones de extrema debilidad, llegando incluso a dosis de 90-120 gramos en un periodo de dos horas sin que

aparezcan síntomas de toxicidad. Puede, pues, administrarse sin problemas en las dosis citadas de 5 gramos dos veces al día. La lisina y la prolina son también productos de muy baja toxicidad, prácticamente equivalente a la de la glicina.

Los resultados han estado muy claros: todos los pacientes han visto reducidos o eliminados sus dolores; y pueden doblar otra vez las articulaciones sin dolor. En algunos casos, las deformaciones en los dedos también se han reparado y algunos de ellos están recuperando su forma normal. A continuación presentamos un breve resumen de los resultados más destacables.

Artrosis y artritis. La artrosis y varias clases de artritis fueron las enfermedades más frecuentes de este grupo, afectando a un total de 378 pacientes, de entre 20 y 85 años de edad, estando la mayoría de ellos entre 40 y 65 años, y siendo 46 de ellos mayores de 60 años (véase la tabla 9.23). El número de mujeres de este grupo era aproximadamente el doble que de hombres. Los daños específicos eran diferentes en cada caso, pero entre todos cubrían prácticamente todas las posibilidades: articulaciones interfalángicas con nodos de Heberden y de Bouchard, muñecas, hombros, codos, cuello, columna vertebral, caderas, rodillas, tobillos y pies. Muchos de ellos tenían dolores severos desde hacía años y estaban sometidos a tratamiento con analgésicos y antiinflamatorios. Algunos de ellos también habían sido tratados con sulfato del glucosamina. El tratamiento con glicina demostró para ser eficaz en todos los casos, en un periodo de entre dos semanas y cuatro meses, según la edad de la persona y la naturaleza de la articulación. La mayoría de los pacientes menores de 40 años notó una clara mejoría en las primeras semanas del tratamiento, mientras que algunos de más de 60 años necesitaron más de cuatro meses para ver los primeros resultados, después de este tiempo, la mejora aumentó hasta la recuperación total y la pérdida total de dolor en todas las articulaciones dañadas, sin tomar ningún medicamento analgésico o antiinflamatorio.

Lesiones físicas. 320 pacientes tenían lesiones físicas. Éstos incluyen a deportistas profesionales y aficionados, niños, personas adultas que habían tenido un accidente hacía varios años, etc. Algunos de ellos habían sido prescritos con el tratamiento de glucosamina sin resultados apreciables en ningún caso. Con el tratamiento de glicina, todos consiguieron ver resueltos sus problemas en pocas semanas, incluso aunque algunos de ellos llevaban 40 años padeciéndolos. En general, los jóvenes de menos de 30 años de edad se recuperaron en un tiempo medio de dos semanas, mientras que en los mayores de 40 años la recuperación fue más lenta. Es también importante indicar que, en general, la reparación de lesiones fue más rápida que la de la artrosis, aunque la mayoría de estas lesiones se habían producido varios años antes del tratamiento, y se habían intentado reparar quirúrgicamente sin éxito.

Osteoporosis. En este grupo había 65 casos, todas mujeres, con un diagnóstico bien documentado, que presentaban una pérdida de masa ósea entre el 5 y el 20%. En varios meses bajo tratamiento de glicina todas recuperaron los valores normales o mejoraron sensiblemente su situación. Estos resultados demuestran que la causa principal de la

osteoporosis que se pensó inicialmente que era debida a la deficiencia del calcio, podría ser más bien debida a una deficiencia de glicina, como materia prima básica para la síntesis de colágeno, que constituye el soporte orgánico donde han de alojarse los depósitos óseos de calcio.

Dientes débiles y problemas de las encías. Este estudio incluyó 146 casos de pacientes con problemas de dientes y de encías, tales como dolores permanentes de dientes, dientes débiles, encías sangrantes y alta tendencia a padecer caries. El tiempo de tratamiento necesario para conseguir resultados apreciables fue diferente en cada caso, según el tipo y la gravedad del problema. En algunos casos se obtuvieron resultados a las dos semanas de tratamiento, mientras que otros requirieron hasta dos años. Hubo varios casos de pacientes mayores de 50 años, que habían sufrido estos problemas durante toda la vida, con hemorragias continuas en las encías cada vez que se cepillaban los dientes, y también con caries frecuentes. Todos estos problemas desaparecieron después de un tiempo de tratamiento de entre seis meses y un año. Estos resultados a largo plazo demuestran que algunas partes del cuerpo tienen una regeneración muy lenta, pero también demuestran que muchas partes del cuerpo pueden regenerarse incluso a esta edad.

Ortodoncia. 27 pacientes del grupo mencionado en el párrafo anterior estaban bajo tratamiento de ortodoncia y al unir ese tratamiento al nuestro de glicina se obtuvieron unos resultados mucho mejores de lo habitual, y en mucho menos tiempo, según declaraciones de los dentistas que los trataban.

Anemia. 96 pacientes de los 600 de este estudio este grupo padecían algún tipo de anemia, de las cuales, la más frecuente era la anemia ferropénica (deficiencia del hierro). El tratamiento de glicina también demostró ser eficaz en todos estos casos. Estos resultados demuestran que algunas clases de anemia consideradas inicialmente como deficiencia de hierro podrían deberse más bien a una deficiencia de glicina, que puede hacer difícil la síntesis de porfirinas, según hemos explicado en el capítulo 7.

Voz. 27 personas de este grupo padecían voz fatigada, y este problema también fue mejorado en todos los casos. El tiempo medio para conseguir este resultado fue entre dos y cuatro meses, siempre menor en personas jóvenes. Así, podemos concluir que las cuerdas vocales pueden ser uno de los órganos beneficiados más directamente por este tratamiento. La ingesta de glicina debería ser habitual en los profesionales cuyo trabajo dependa de su voz, tales como los profesores, los actores y los cantantes.

Problemas de audición. 20 pacientes tenían diversos problemas de audición, algunos de ellos muy severos. Los resultados después del tratamiento con glicina demostraron mejoras en la mayoría de ellos.

Asma y otros problemas del pulmón. En este grupo había 31 casos con problemas de pulmón, la mayoría de ellos asma. El tratamiento con glicina también demostró ser eficaz en

la mayoría de ellos. Varios de los casos eran chicos y chicas jóvenes de 10-15 años de edad, que padecían frecuentes crisis de respiración ruidosa, no pudiendo practicar deportes, ni correr, y con grandes dificultades para subir la ladera de un monte, una escalera larga, o incluso una rampa, teniendo que estar con frecuencia bajo tratamiento de corticosteroides. Después de 30-60 días de tratamiento con glicina, las crisis de asma fueron mucho menos frecuentes, y durante los primeros meses del tratamiento, cuando era necesario, el tratamiento de corticosteroides no hubo que prolongarlo más de un día. Después de cinco meses de tratamiento con glicina no volvieron a aparecer crisis importantes de asma, incluso en la llegada de la primavera que es la estación más dura para los que padecen esta enfermedad. En este grupo había también varios adultos con el mismo problema, y todos mejoraron.

Piel: problemas de pigmentación y lentigo. Después de pocas semanas de tratamiento, muchas personas notificaron espontáneamente (sin que se les hubiese hablado de ello), dos resultados sobre su piel: (a) mejora de la suavidad y del brillo, así como la reparación de grietas; (b) mejora de problemas en la pigmentación de la piel, incluyendo el lentigo que se vió reducido. Muchos pacientes que estaban bajo otro programa del IMC para reducir peso consiguieron resultados muy buenos en la adaptación de la piel al nuevo volumen del cuerpo con el tratamiento de glicina. También fue notable la recuperación de la piel dañada con estrías y arrugas.

Uñas. Los 137 casos de uñas débiles o frágiles fueron mejorados claramente, lo que demuestra que el origen de muchos problemas de las uñas se deben a una debilidad en el lecho de la piel.

Además, en el grupo de pacientes aquejados de dolencias en las articulaciones se hicieron varios ensayos complementarios, cada uno en un grupo de 30 pacientes que aceptaron voluntariamente someterse a estas pruebas, dando los siguientes resultados:

(a) La interrupción del tratamiento en 50 pacientes (entre 20 y 65 años) provocó la reaparición del dolor en las articulaciones después de algunas semanas. Con la vuelta al tratamiento, el dolor fue eliminado otra vez después de un tiempo medio de dos semanas de tratamiento.

(b) La reducción de la dosis de glicina a la mitad (4-5 g/día), después de varios meses de tratamiento, con el fin de comprobar la dosis óptima, provocó una regresión moderada al dolor en los pacientes que tenían dolencias más graves; estos dolores remitieron de nuevo al retornar a la dosis inicial (10 g/día).

(c) El cambio de glicina por prolina en la misma dosis ocasionó la reaparición de los síntomas en la mayoría de los casos.

(d) En los pacientes con dolores que no habían remitido con el tratamiento de glicina, la ingesta adicional de prolina 5 g/día no produjo ninguna mejoría.

(e) En los pacientes con dolores que no habían remitido con el tratamiento de glicina, la ingesta adicional de lisina 5 g/día produjo la desaparición de dolores que no se habían conseguido eliminar sólo con la administración de glicina.

En ningún caso se produjeron resultados negativos. Todos los pacientes tratados notaron una mejoría clara en las manifestaciones de la enfermedad, y la mayoría de ellos declararon que los dolores habían desaparecido definitivamente en todas las partes afectadas. Por otra parte, ningún paciente se quejó por la sensación de efectos adversos; ninguno mencionó algún problema gástrico o intestinal, o mareos o cualquier otra sensación inconveniente, lo que suele ocurrir en algunos tratamientos prolongados. Es importante insistir en que todos los pacientes que se sometieron a este tratamiento fueron dejando el uso de analgésicos y antiinflamatorios a medida que advertían la mejoría de su salud. Por lo tanto, las mejorías observadas se deben estrictamente a la regresión de la enfermedad, no la ocultación de sus síntomas macroscópicos.

Así, este estudio demuestra que con la ingesta de glicina como aditivo nutricional en la dosis indicada se consigue una mejoría significativa en las enfermedades mencionadas, logrando que desaparezca el dolor sin necesidad de analgésicos. Los resultados son permanentes y se recomienda mantener el suplemento de glicina en la dieta, de igual forma que se recomienda, por ejemplo, mantener la ingesta de vitaminas para combatir y evitar los problemas carenciales correspondientes. Así, los resultados presentados aquí demuestran empíricamente –corroborando nuestras conclusiones teóricas– que la glicina debe considerarse como alimento esencial, ya que el organismo no tiene suficiente capacidad para producirla, y tampoco hay suficiente cantidad en la dieta; por lo tanto, tiene que ser agregado diariamente para evitar las enfermedades degenerativas y la debilidad de las articulaciones mencionadas aquí, y también para acelerar y mejorar la reparación de lesiones deportivas, así como para prevenirlas. Se ha presentado la solicitud de la patente de uso de la glicina para estos resultados [262] y en la actualidad estamos preparando una segunda patente incluyendo el uso de la lisina y su combinación con glicina [263].

La conclusión de este estudio es que la glicina, administrada en dosis de 10 gramos diarios repartidos en dos tomas de 5 g cada una, por la mañana con el desayuno y por la noche con la cena, produce una mejoría general de estas dolencias en un plazo de tiempo que, en la mayoría de los casos, está entre dos semanas y cuatro meses. El enriquecimiento adicional de la dieta con lisina en cantidades de entre 2'5 y 5'0 gramos diarios ocasiona una notable mejoría en los casos más resistentes al tratamiento con glicina exclusivamente. La administración de prolina no ha producido resultados dignos de mención.

Tabla 9.23. Lista completa de casos con enfermedades degenerativas y otros problemas en el grupo de 600 pacientes que participaron en este estudio. Dado que muchos pacientes tenían varios problemas diferentes, el número total de afecciones fue mucho mayor que el número total de personas. Algunos problemas con pocos casos documentados, tales como osteogénesis imperfecta, no están incluidos en esta lista.

Enfermedad/problema	Número de casos
Artrosis y artritis	378
Lesiones físicas	320
Piel débil y psoriasis	150
Dientes y encías débiles	146
Uñas débiles y frágiles	137
Anemia	96
Osteoporosis	65
Hernia discal	63
Exceso de colesterol	54
Asma	31
Cuerdas vocales, voz fatigada	27
Problemas de oído	20
Infertilidad	12
Total de casos	1499

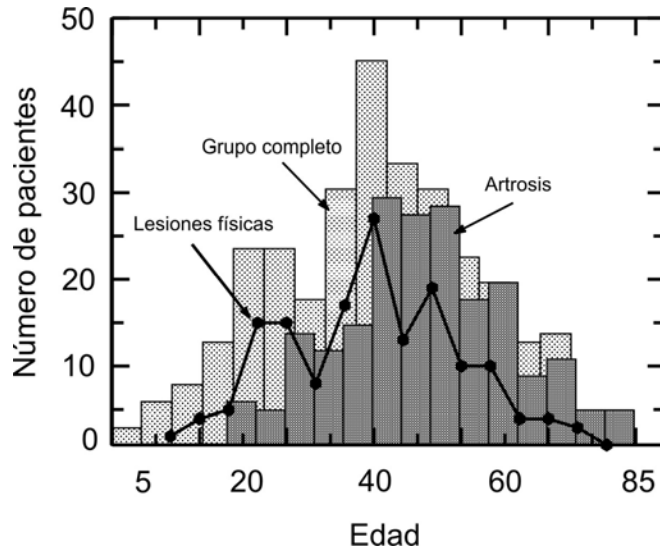


Figura 9.58. Edad de los primeros 600 pacientes que han participado en esta investigación, y edad de los dos grupos principales: afectado por artrosis y por lesiones físicas. La edad media en todos era alrededor 45 años. Obsérvese que había una cantidad importante de personas menores de 30 años con artrosis. El tratamiento con glicina tuvo éxito en todos los casos, para la artrosis y para lesiones físicas, tanto en mujeres como en hombres de cualquier edad, aunque la respuesta fue más rápida en los pacientes con menos de 55 años, y muy rápida en los menores de 45 años. Los mismos resultados fueron obtenidos en la reparación de lesiones físicas.

Discusión y conclusiones



Capítulo 10

Discusión

La Tesis principal que defendemos en este trabajo es que el problema central de la degeneración del cartílago –origen del problema artrósico– es un fallo en la síntesis del colágeno. En este sentido, varios autores [82,98-100,103,105,107,109,110,114] ya han descrito que la degradación del colágeno del cartílago es un proceso central en el desarrollo de la artrosis y una de las primeras alteraciones de la enfermedad. Otros grupos ya han sugerido que si se pudiera prevenir el daño al colágeno y promover su reparación, sería posible que el cartílago se reparara a si mismo, ya que este tejido tiene una gran capacidad para renovar los proteoglicanos de la matriz extracelular [98,127].

Dentro de este mismo trabajo defendemos también que el problema de la síntesis de colágeno no se debe a problemas de regulación o desequilibrio entre síntesis y degradación, sino simplemente a la carencia de aminoácidos esenciales.

Así, para empezar, el primer paso fue una revisión del concepto de aminoácidos esenciales. Desde la definición de los ocho esenciales clásicos (valina, leucina, isoleucina, treonina, metionina, lisina, fenilalanina y triptófano) hasta la actualidad se habían acumulado evidencias de que la lista debía ampliarse, y se había sugerido que a esa lista habría que añadir la tirosina, la cisteína, la histidina y la arginina. En este punto se advierte que hay buen consenso entre los especialistas, y también se había hecho alguna alusión aislada a la glicina, indicando que podría ser conveniente añadirla a la dieta en ciertos casos.

Puesto que se había llegado a estas conclusiones con estudios empíricos era preciso aceptarlas, aunque no se dispusiese de un fundamento teórico que pudiese justificarlas todas. En particular, quedaba por explicar la necesidad de arginina, cuando el organismo humano –y todos los mamíferos– fabrican grandes cantidades de arginina diariamente, como intermedia-

rio del ciclo de la urea. Sobre la glicina no había ningún indicio teórico que pudiese justificar su necesidad y, por ello, los datos empíricos no parecían tener mucha consistencia. La glicina siempre se ha considerado un típico aminoácido no esencial y no se le ha dedicado especial atención.

Así, nuestra primera tarea en este trabajo ha sido revisar la organización y el diseño de las rutas biosintéticas de estos aminoácidos tratando de encontrar los motivos teóricos que pudiesen dar cuenta de esta situación. El primer resultado que nos interesa destacar aquí es el caso de la arginina. Para ello nos basamos en el trabajo del grupo de Luisa Raijman, quien al demostrar la existencia y funcionalidad del channelling en el ciclo de la urea, en el cual la arginina está completamente encerrada en la ruta, sin posibilidad de intercambio con el medio, nos proporciona una buena explicación del fenómeno. En sus trabajos, Luisa Raijman no concluye claramente que la arginina sea un aminoácido esencial, aunque hace algunas alusiones al respecto. Sin embargo, en el *VIII Congreso Hispano-Luso de Biofísica*, celebrado en Tenerife, en el año 2002, tuvimos oportunidad de hacerle a Luisa Raijman esa pregunta directamente y nos contestó que sí, que salvo una pequeña capacidad del riñón y el intestino para fabricar arginina (sin quedar comprometida en el ciclo de la urea), el organismo humano no tenía suficiente capacidad para fabricarla, y por tanto sus necesidades debían ser cubiertas mayoritariamente por la dieta.

El caso de la glicina –tema central de esta Tesis– es diferente. En la bibliografía no había indicios teóricos o experimentales que pudiesen orientarnos para resolver el problema. El estudio teórico que presentamos en el capítulo 7 de esta Tesis da una clara explicación al problema, cuya conclusión debe ser que la glicina debe considerarse un aminoácido esencial. Presentamos además un cálculo de las necesidades reales, cuyo resultado es que, por lo general, el organismo humano está padeciendo un déficit de este aminoácido. La conclusión inevitable es que la dieta debe suplementarse diariamente con este aminoácido.

Con este resultado es muy tentador pensar que esa carencia de glicina podría ser precisamente la causa de la artrosis. La artrosis, considerada hasta el momento una enfermedad degenerativa no dejará de serlo con nuestro resultado, pero podríamos tener una explicación de la causa de la degeneración del cartílago, así como de otros procesos degenerativos que pudiesen igualmente relacionarse con el papel del colágeno en los diferentes tejidos. Así, hemos de llegar a la conclusión, que es la proposición central de esta Tesis, de que la artrosis, y una posiblemente extensa serie de enfermedades degenerativas, en las que se observan problemas de construcción y regeneración de la matriz extracelular, deberían considerarse enfermedades carenciales, principalmente por deficiencia de glicina, y que esa deficiencia puede compensarse desde la dieta, sin más que enriquecerla con la cantidad necesaria de glicina.

Esta investigación no podía quedarse ahí, evidentemente. Era preciso comprobar esta conclusión, y para ello había que recorrer varios caminos. Los más obvios eran comprobar el

resultado de enriquecer la dieta de esa forma y estudiar el efecto de la glicina sobre la síntesis de colágeno.

La parte experimental de esta Tesis ha consistido en desarrollar modelos experimentales de cultivos de células productoras de colágeno a fin de poder comprobar el efecto de la glicina y de otros aminoácidos sobre la síntesis de colágeno, tanto en el tejido conjuntivo como en el cartílago articular. Los modelos experimentales que hemos desarrollado han sido cultivos de fibroblastos y de condrocitos haciendo un seguimiento muy completo de su crecimiento y de su capacidad de síntesis de colágeno. Para ello tuvimos que poner a punto todas las técnicas necesarias, ya que ésta era la primera vez que se incorporaba este tipo de trabajo a nuestro grupo de investigación. El desarrollo de todas estas técnicas, incluido el montaje del laboratorio específico y la puesta a punto de todo lo necesario nos ha llevado la mayor parte de nuestro tiempo. Hemos tenido éxito en este desarrollo y en la actualidad, como resultado de este trabajo, nuestro grupo de investigación cuenta con toda esta tecnología, que ahora continúa con nuevos trabajos de investigación en esta línea. También los resultados teóricos tienen su continuación. En este campo, nuestro grupo de investigación tenía ya mucha experiencia, pero nuestro trabajo ha abierto la línea de los estudios teóricos del metabolismo de los aminoácidos, que era un campo que no habíamos explorado antes.

Nuestro trabajo experimental ha consistido en estudiar la influencia de los aminoácidos más necesarios para la síntesis del colágeno (glicina, prolina y lisina) en los dos modelos experimentales mencionados: fibroblastos de ratón y condrocitos articulares bovinos. Hemos cultivado las células con medio estándar y hemos comparado su actividad cuando crecían en esos medios, y cuando esos medios los hemos enriquecido con los aminoácidos objeto de nuestro interés.

Selección de los tres aminoácidos estudiados

Los tres aminoácidos seleccionados para nuestro estudio son glicina, prolina y lisina. El criterio para su elección se basa en nuestro estudio teórico previo, expuesto en el capítulo 7, y en los datos estructurales del colágeno, expuestos en el capítulo 1. Nuestro estudio teórico demuestra que la glicina es un aminoácido esencial, cuya necesidad se hace especialmente importante en la síntesis de colágeno. Hemos seleccionado la lisina por ser un aminoácido clásica y correctamente reconocido como estrictamente esencial, y cuya concentración también debe ser crítica en la síntesis de colágeno debido a las reacciones de hidroxilación comentadas en el capítulo 1. Finalmente, hemos seleccionado la prolina por ser el segundo aminoácido más abundante en el colágeno, después de la glicina, jugar un papel relevante como sustrato de hidroxilaciones, siendo, sin embargo, un aminoácido no esencial. Como controles para evaluar estos efectos hemos investigado también la influencia de otros dos

aminoácidos: la isoleucina, también esencial, pero cuyo gasto es menor, y el ácido aspártico, no esencial y también con menor presencia en la estructura del colágeno.

La necesidad de concentraciones óptimas de los aminoácidos en el proceso de biosíntesis puede ser crítica para la correcta fabricación del colágeno. Ciertos resultados obtenidos por diversos autores con anterioridad a este trabajo nos llevan a pensar que la velocidad de síntesis del colágeno puede desempeñar un papel crítico para que se consiga la estructura correcta de la proteína. Una velocidad lenta podría ocasionar un exceso de hidroxilaciones, mientras que una velocidad excesivamente rápida podría producir menos. Es, pues, previsible que haya una velocidad óptima en la cual influirán obviamente, entre otras variables, la disponibilidad de los sustratos. La escasez de un sustrato (el aminoacil-tRNA que corresponda) no producirá –o no debería producir– una codificación incorrecta de la proteína con el consiguiente error de traducción, pero sin duda provocará una lentitud en el proceso, y esto puede afectar a la correcta realización de las hidroxilaciones, que son el proceso inmediatamente posterior de modificación covalente.

Los resultados muestran que el enriquecimiento del medio de cultivo con los tres aminoácidos seleccionados favorece la síntesis del colágeno, tanto en fibroblastos como en condrocitos. Los resultados específicos del efecto de cada aminoácido están expuestos con detalle en el capítulo 9, y en la tabla 10.1 presentamos un resumen de los datos más destacables.

Si nos mantenemos en los límites del rango fisiológico, con una concentración de 5'5 mg/100 mL (máximo normal de ese rango), la glicina produce un aumento del 27% en los fibroblastos y del 48% en los condrocitos, considerablemente mayor que el que producen los otros dos aminoácidos en los fibroblastos, pero del mismo orden de los otros dos en los condrocitos.

En los cultivos de fibroblastos, el enriquecimiento del medio con cualquiera de los tres aminoácidos seleccionados aumenta claramente la síntesis de colágeno. La glicina, a una concentración de 5'5 mg/100 mL provoca un aumento del 27%, que llega a ser del 43% con 8 mg/100 mL. Este efecto se observa también con la adición de prolina y de lisina al medio. Los efectos de la prolina y de la lisina llegan a ser mayores, con máximos del 96% para la prolina y del 68% para la lisina. Sin embargo, aunque la glicina quedaría en tercer lugar, ejerce su efecto máximo dentro del rango de concentraciones fisiológicas, mientras que las concentraciones de lisina y de prolina que producen el mayor efecto quedan fuera de ese rango, por lo que no pueden tenerse en cuenta por estar lejos de la realidad. El efecto de la prolina dentro del rango fisiológico es muy pobre: un aumento de tan sólo un 12%. El efecto mayor de la lisina se produce a una concentración de 22 mg/100 mL, muy lejos del rango fisiológico; con una concentración menor (16 mg/100 mL), pero aún el triple del límite fisiológico, la lisina sólo produce un aumento del 16%. Para que se produzca un aumento con la lisina hay que salir del rango fisiológico, mientras que el efecto de la glicina, siempre dentro de ese rango es realmente dramático.

Tabla 10.1. Efecto de los aminoácidos sobre la síntesis de colágeno. Concentraciones de los aminoácidos añadidos en los medios de cultivo, y resultados de estas adiciones sobre la síntesis de colágeno por los fibroblastos y los condrocitos. En la tabla se muestra también el rango de concentración de los aminoácidos en sangre, que pueden considerarse las concentraciones fisiológicas (entre 1 y 6 mg/100 mL aproximadamente), y el porcentaje de cada aminoácido en la estructura del colágeno. La isoleucina y el ácido aspártico se usaron como controles para evaluar el efecto de los tres aminoácidos seleccionados. Ninguno de los dos produjo efectos significativos sobre la síntesis de colágeno en el mismo rango de concentraciones.

	Fibroblastos (Colágeno Tipo I)			Condrocitos (Colágeno Tipo II)			Sangre ⁺	Colágeno [¶]
	Máximo*	Aumento [†]	Medio [‡]	Máximo*	Aumento [†]	Medio [‡]		
Glicina	5'5-8'0	27-43%	3	5'5-11	48-65%	0'75	0'8-5'4	33'3
Prolina	5-10	12-96%	0	5'5-8'5	61-98%	3'65	1'5-5'7	12'8
Lisina	16-22	16-68%	11'6	6'0-8'5	47-107%	3'45	1'4-5'8	2'7
Isoleucina	–	0	10'5			0'39	0'7-4'2	1'0
Aspártico	–	0	0			1'33	0'01-0'30	2'5

*Intervalo de concentraciones del aminoácido (mg/100 mL) que produce el máximo efecto (suma de la cantidad que había en el medio más la añadida).

† Máximo aumento en la síntesis de colágeno que se produce con la concentración del aminoácido señalada en la columna anterior.

‡ Concentración del aminoácido en el medio de cultivo estándar sin enriquecer (mg/100 mL).

+ Rango normal de concentración del aminoácido en sangre (mg/100 mL), que puede considerarse el valor normal de su concentración fisiológica [216].

¶ Porcentaje del aminoácido en la composición del colágeno tipo I [216].

Debemos concluir, por tanto, que estos experimentos demuestran la necesidad de glicina, y la necesidad de que la concentración de glicina se encuentre en los valores más altos del rango fisiológico. La respuesta del sistema al aumento de la concentración de glicina demuestra la necesidad que tiene el sistema de este aminoácido, y los valores en los que este aminoácido ejerce su acción máxima demuestran que ese rango fisiológico debería mantenerse en sus niveles más altos, o que la síntesis de colágeno funcionará mejor si conseguimos llevar la concentración de glicina a esos niveles.

Optimización de la síntesis de colágeno

El efecto individual de cada uno de los tres aminoácidos seleccionados para nuestro estudio (glicina, prolina y lisina) sobre la actividad de los fibroblastos y los condrocitos en la fabricación de colágeno está mostrado en las tres series de figuras en el capítulo 9: figuras 9.11, 9.13 y 9.15 para el colágeno tipo I de los fibroblastos; figuras 9.34, 9.45 y 9.55 para el colágeno tipo II de la matriz de los condrocitos. En todos estos casos, la función de la producción de colágeno frente a la concentración del aminoácido presenta un máximo, dando la

concentración del aminoácido con la que se consigue la máxima producción de colágeno. Las concentraciones tanto inferiores como superiores a esa concentración rinden resultados más bajos. Este efecto no se observa en los aminoácidos usados como control: isoleucina (figura 9.17) y ácido aspártico (figura 9.19) en el intervalo de concentraciones ensayadas, mostrando que el enriquecimiento del medio con esos dos aminoácidos no produce variaciones significativas en la síntesis de colágeno.

Las curvas de glicina, prolina y lisina, que muestran que una concentración determinada de un aminoácido produce un efecto máximo, reflejan las correspondientes funciones de optimización, y demuestran por tanto que la síntesis de colágeno es una función optimizable con respecto a las concentraciones de estos tres aminoácidos en ambos tipos de células, y para todos los tipos de colágeno estudiados.

Estos efectos muestran que las concentraciones de estos tres aminoácidos desempeñan un papel especialmente relevante en el proceso de síntesis de colágeno. Estas curvas, que son equivalentes a las de velocidad de reacción frente a concentración de sustrato, no tienen el típico aspecto de las de saturación, que son siempre asintóticas, sino funciones típicas de optimización con un máximo. Lo que hace que estas curvas sean especialmente interesantes es que en la mayor parte de los casos hay un máximo claro (no una meseta), y la zona de decaimiento, tras el máximo, está dentro del intervalo de concentraciones fisiológicas. Se trata, por tanto, de curvas de optimización reales, muy diferentes de una cinética de inhibición por el sustrato, cuyo efecto sólo se advierte a concentraciones muy por encima de las normales que ocurren en el metabolismo, y después de una meseta más o menos extensa.

Los datos de las funciones de optimización están recogidos en la tabla 10.1. Las concentraciones de aminoácidos que dan los valores máximos están en el límite, o algo más allá, del rango de concentraciones consideradas fisiológicas. El rango fisiológico suele estar entre 1'0 y 5'5 mg/100 mL y los máximos se encuentran en el límite. La síntesis de colágeno necesita, pues, que las concentraciones de estos aminoácidos se mantengan dentro de los márgenes altos de ese rango. Si, por el contrario, estamos en la zona baja, con concentraciones del orden de 0'5-2'0 mg/100 mL, la síntesis de colágeno ocurrirá en condiciones precarias y esto podría afectar no sólo a la velocidad de síntesis, que podría ser extremadamente lenta, sino incluso a su calidad.

En efecto, como anotábamos al principio de este capítulo, pensamos que hay indicios que sugieren que la velocidad de síntesis del colágeno puede tener una influencia decisiva en la fabricación de la molécula con su correcta estructura covalente. El motivo fundamental de esta hipótesis es que los puntos de hidroxilación no ocupan posiciones fijas en la molécula, sino que son un determinado porcentaje distribuido al parecer con cierta aleatoriedad; esto sugiere que las reacciones de hidroxilación –su frecuencia y sus posiciones– son el resultado estadístico de la actividad de las enzimas que lo hacen. En tal caso, la velocidad de síntesis debe desempeñar un papel crítico en el proceso puesto que tiene que haber una coordina-

ción entre las actividades de las enzimas que llevan a cabo la biosíntesis de la cadena polipeptídica, y las hidroxilasas responsables de las posteriores modificaciones covalentes. Y debemos insistir, en este punto, en el carácter real de nuestros resultados (las funciones de optimización) ya que se han obtenido con células vivas en un medio que simula el líquido intersticial, obteniéndose los máximos con unas concentraciones de aminoácidos que están dentro del rango fisiológico. El hecho de que los tres aminoácidos, cuya disponibilidad consideramos más crítica para el proceso de síntesis de colágeno, produzcan funciones de optimización pensamos que es un dato que contribuye a reafirmar esa hipótesis.

Efectos y concentraciones de los aminoácidos

Los tres aminoácidos seleccionados (glicina, prolina y lisina) producen un aumento claramente significativo de síntesis de colágeno en los dos tipos de células, pero el efecto de la glicina es el mayor de los tres dentro de los límites en la concentración fisiológica (5 mg/100 mL).

En el rango de concentraciones fisiológicas (1-5 mg/100 mL) el efecto de la glicina es claramente el más importante, como puede verse en la figura 10.1, pues el efecto principal de los otros dos (lisina y prolina) queda fuera de ese rango (10 mg/mL). Si nos mantenemos dentro de los límites del rango fisiológico (hasta 5'5 mg/100 mL) el efecto de la glicina es realmente el único importante. Es importante insistir en que el efecto positivo que producen estos tres aminoácidos (glicina, lisina y prolina) sobre la síntesis de colágeno no es general. No cualquier aminoácido es capaz de provocar una respuesta igual, como lo demuestran los resultados de la isoleucina y el ácido aspártico.

Estos resultados nos dan la confirmación empírica de los resultados demostrados en el estudio teórico: la glicina es un aminoácido esencial y, puesto que es preciso enriquecer el medio de cultivo para que los fibroblastos puedan sintetizar colágeno en condiciones óptimas, hemos de concluir también, que debería ser igualmente conveniente enriquecer la dieta con este aminoácido, como medida preventiva, e incluso terapéutica, en todas aquellas dolencias y problemas de salud que puedan estar relacionadas con una deficiencia en la función fisiológica del colágeno.

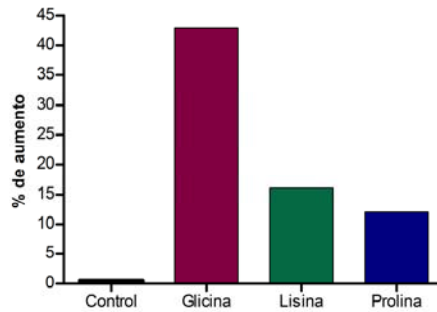


Figura 10.1. Efecto de los tres aminoácidos más necesarios para la estructura del colágeno en la concentración fisiológica (5 mg/100 mL), activando la síntesis de colágeno por los fibroblastos. La activación que ejerce la glicina es mucho mayor que la de los restantes, poniendo de manifiesto su necesidad para el buen funcionamiento del sistema y, de ahí, la necesidad de enriquecer el medio y la dieta con este aminoácido.

Tratamiento de la artrosis con glucosamina

El tratamiento clásico farmacológico de la artrosis se hace con antiinflamatorios inhibidores de la enzima COX2, incluyendo los más comunes (aspirina, paracetamol) y otros que se anuncian como más específicos, tales como diclofenaco (voltarén) o el ibuprofeno, aunque es sabido que estos productos no combaten realmente la artrosis, sino sus síntomas. Por otra parte, como hemos mencionado en el capítulo 3, se han intentado tratamientos alternativos entre los que destaca la glucosamina que se presenta en diversos preparados, como *Xicil*, *Cartisorb* o *Hespercorbin*. La glucosamina se suele administrar en forma de sales, como cloruro o sulfato, de las cuales la segunda es la más común, y también se han probado otros compuestos como el condroitín sulfato. La glucosamina se administra oralmente, con una dosis media de 1'5 g/día, o en inyectables de 250-400 mg/día. El condroitín sulfato se administra siempre por vía oral, en dosis similares a la glucosamina. Es importante señalar que todos estos productos no son medicamentos, sino nutrientes, también llamados nutracéuticos.

La información publicada reportando resultados del tratamiento de la artrosis con glucosamina se remonta a 40 años atrás [264]. Desde entonces hasta la actualidad se han hecho muchos ensayos clínicos investigando el posible efecto de la glucosamina. La cantidad de trabajos que se han publicado sobre el tema es enorme¹, siendo sin duda éste uno de los

¹ Por ejemplo, en la base de datos bibliográficos de Internet *PubMed*, la llamada de “glucosamine” genera 1.580 referencias, muchas de las cuales –quizá la mayoría– reportan resultados positivos, aunque también hay un número importante de artículos que desmienten esos resultados.

productos más ensayados en este campo, y quizá el que más resultados contradictorios ha producido.

Un gran número de esos trabajos, muchos de ellos publicados en buenas revistas, concluyen claramente que la glucosamina produce buenos resultados, mejorando los síntomas de la artrosis (en especial la de rodilla) y de ciertos tipos de artritis. Por ejemplo, el trabajo de Qiu *et al.* [265] describe un estudio en una muestra aleatoria de doble ciego con placebo con 142 pacientes con artrosis de rodilla, comparando los tratamientos de sulfato y cloruro de glucosamina, y concluye que en ambos casos se produce un descenso significativo de los síntomas. Otro estudio en la misma línea y con similares resultados es el de Svetlova e Ignat'ev [266], en el que se administraron 1'2 g/día de cloruro de glucosamina a 30 pacientes con artrosis durante dos meses, con un grupo control de 24 pacientes, observándose un descenso en el índice de Lequesne² y menos dolor, sin efectos adversos, y la mejoría persistió durante tres meses después de dejar el tratamiento. Otro ensayo clínico con una muestra aleatoria de doble ciego con placebo también describe resultados positivos, aunque hay que admitir que no es concluyente, porque aplica un tratamiento combinado de glucosamina, condroitín sulfato y vitamina C [267].

Hay, sin embargo, algunos estudios que parecen muy concluyentes, por el alcance exhaustivo que presentan. Por ejemplo, el realizado por Tapadinhas *et al.* [268], se hizo con 1.208 pacientes interviniendo 252 médicos. En esta misma línea se han hecho multitud de estudios como el de Reginster *et al.* [269], que describe un ensayo clínico con 212 pacientes con artrosis administrándoles 1'5 g de glucosamina diariamente durante tres años, y también describe resultados positivos, según los cuales las articulaciones de los pacientes del grupo con placebo degeneraron, mientras que las del grupo que tomaba glucosamina no. Pueden verse más resultados en la misma línea y con resultados similares en las referencias [270,271].

También se ha descrito el mismo resultado con la glucosamina administrada en inyectables, tanto por vía intravenosa como intraarticular [272,273]. La lista de estudios que describen resultados positivos del tratamiento con glucosamina es interminable [193,274-277].

La acción beneficiosa de la glucosamina parece, pues, contar con gran soporte empírico, y si fuese así estaríamos, sin duda, ante un avance importante en el tratamiento de la artrosis. Sin embargo, nosotros pensamos que tenemos motivos para no aceptar estos resultados. Podemos citar, por ejemplo, los estudios de Hughes y Carr [278] o el de Clegg *et al.* [279]. Ambos estudios se hicieron siguiendo todas las directrices clásicas de los ensayos clínicos (muestras aleatorias controladas con placebo), y los resultados no demuestran ningún efecto

² Índice basado en un test de preguntas generales sobre el dolor, hábitos de vida y estado general de la salud, y preguntas más específicas, cuyas respuestas permiten obtener una estimación del grado de artrosis.

del tratamiento con respecto al placebo, ya sea con glucosamina, con condroitín sulfato, o con la combinación de ambos.

La polémica es grande. De igual forma que varios autores han revisado el tema concluyendo el efecto beneficioso de la glucosamina, otros también lo han revisado, pero llegando a conclusiones opuestas. Por ejemplo, la revisión crítica de Hochberg (2006), publicada en *New England Journal of Medicine* [280], concluye que los resultados publicados no demuestran un efecto claro de la glucosamina, lo cual es sorprendente –comenta él mismo– dado el enorme número de artículos declarando lo contrario.

Los defensores de la glucosamina suelen insistir en que es un tratamiento que no tiene peligro, que no produce efectos adversos. Y esto posiblemente hace a muchos admitir que aunque no se haya demostrado su efecto, que se tome por si acaso, ya que no tiene peligro (una actitud que uno no esperaría encontrar en una revisión crítica científica). Hay revisiones que a pesar de concluir que la glucosamina no produce efecto se resisten a cerrar la cuestión. Por ejemplo, Manson y Rahman [281], analizando los datos a favor y en contra, concluyen que no se ha demostrado la efectividad de la glucosamina en el tratamiento de la artrosis de rodilla; incluso comentan que podría haberse dado manipulación de resultados o de conclusiones, porque muchos estudios que presentan resultados favorables han sido subvencionados por los fabricantes de glucosamina; sin embargo, puesto que los médicos están de acuerdo en que este tratamiento no ofrece peligro, y dado que no hay muchas alternativas aparte de los antiinflamatorios, no se debe aconsejar que se suprima el tratamiento con glucosamina; no parece razonable –dicen– privar a los pacientes de este tratamiento sólo porque la evidencia a favor no sea aún perfecta. Clegg *et al.*, en el trabajo comentado arriba [279], admiten la misma conclusión: su estudio con cerca de 1.600 pacientes demuestra que la glucosamina no produce efecto, pero dejan pendiente la cuestión diciendo que quizá podría ser efectivo en algunos casos.

Por eso es importante destacar el trabajo de Chard y Dieppe (2001), publicado en *British Medical Journal* [282], quienes concluyen que el tratamiento con glucosamina es probablemente seguro (no provoca efectos adversos), pero no hay buena evidencia que demuestre que funcione. A la misma conclusión llegan McAlindon y Biggee en la revisión crítica reciente (2005) [283], después de considerar una extensa serie de datos: la glucosamina no produce ningún efecto.

Hoffer *et al.* (2001) en un artículo publicado en *Metabolism* [284], considerando los datos publicados sobre la biodisponibilidad y la farmacocinética de la glucosamina (véase más abajo), reconocen que es imposible que la glucosamina pueda hacer algún efecto, porque la que se ingiere por vía oral no puede llegar en absoluto a los condrocitos; y en un intento por explicar la cantidad de resultados positivos descritos en la literatura proponen que el supuesto efecto podría ser debido al sulfato, más que a la glucosamina. Sin embargo, esta conclu-

sión tampoco es consistente puesto que los mismos resultados supuestamente positivos se han obtenido tanto con el sulfato como con el cloruro de glucosamina [265].

Por tanto, a pesar de la ingente cantidad de efectos positivos, aparentemente avalados por ensayos clínicos serios, no hay acuerdo en absoluto, pues igualmente hay una buena colección de ensayos clínicos, llevados a cabo con el mismo rigor (muestras aleatorias de doble ciego con placebo, o comparando el tratamiento de glucosamina con otros productos), que concluyen lo contrario: que no hay ninguna diferencia entre la glucosamina y el placebo. Asistimos a una polémica singular por ambigua: parte de quienes defienden la utilidad de la glucosamina lo hacen sin mucha convicción, y la mayoría de quienes demuestran que no funciona dejan un punto de duda admitiendo que quizá funcione en algún caso. ¿Cuál podemos pensar, pues, que sea la validez de estos ensayos? ¿Por qué esa insistencia en repetir los mismos experimentos una y otra vez, cuando la mayoría de ellos no llegan a ninguna conclusión definitiva? En cualquier caso, todo esto demuestra que por muchos ensayos clínicos que se presenten sobre un fármaco (o sobre un nutriente presentado con fines terapéuticos), tratando de demostrar sus efectos positivos, el método canónico de los ensayos no es garantía de que los resultados sean fiables.

Nuestra crítica al tratamiento con glucosamina

La glucosamina es un precursor metabólico en la biosíntesis de los glucosaminoglicanos, los cuales se asocian a proteínas específicas formando la serie de proteoglicanos que constituyen parte de la matriz extracelular del cartílago, juntamente con el colágeno (véase el capítulo 2).

El tratamiento con glucosamina para la artrosis y otros problemas del sistema mecánico está basado en la hipótesis de que su causa es un fallo en la síntesis de proteoglicanos debido a un déficit de suministro de glucosamina como precursor de su biosíntesis [285,286].

Por nuestra parte, hemos de decir en este punto que no hay indicios teóricos que puedan soportar esta hipótesis. No vemos, ni en la especie humana, ni en ninguna rama del reino animal que exista algún problema para la producción y uso de la glucosamina, como el que hemos descrito aquí para la glicina (a no ser que el paciente tuviese un defecto genético que impidiese su síntesis —una enfermedad congénita del tipo de las glucogenosis); esto podría ser posible, y en ese caso, el tratamiento con glucosamina podría dar resultado, siempre que se asegurase su biodisponibilidad, lo cual es otro punto conflictivo, como veremos. No se ha descrito un caso así, pero, de haberlo, no sería tan abundante que justificase el éxito del tratamiento en la población aleatoria que es objeto de los ensayos clínicos.

La glucosamina contiene un enlace amino susceptible de hidrolizarse en el tracto digestivo para rendir glucosa y amonio [287], y ninguno de estos productos está directamente relacionado con la biosíntesis de glucosaminoglicanos. Esto hace que su biodisponibilidad sea nula o

muy baja en cualquier caso, lo poco que pueda absorberse sin ser digerido se degrade en el hígado en la primera vuelta, de manera que no llega a la circulación sistémica. Estas consideraciones están confirmadas por los estudios de biodisponibilidad y farmacocinética. La biodisponibilidad de la glucosamina es muy baja, prácticamente nula, ya que incluso grandes dosis de glucosamina (1'5 g/día) tomadas oralmente no tienen ninguna repercusión en los niveles de glucosamina en sangre. La glucosamina, en cualquier caso, no es detectable en plasma, ni en individuos normales, tras la ingestión oral [288]. Hay, sin embargo, un autor que manifiesta lo contrario [289], pero ese resultado no es verosímil pues tiene contra él todos los demás trabajos de biodisponibilidad, que aparte de ser consistentes entre sí, también lo son con los estudios de farmacocinética [287,290,291].

Los estudios de la farmacocinética de la glucosamina administrada por vía oral y por vía intravenosa, con el producto marcado radiactivamente, en ratas y humanos voluntarios, muestran que la radiactividad se incorpora en muchos tejidos indiscriminadamente —no especialmente en el cartílago, igual que lo hace la glucosa libre—, y que sus productos metabólicos se eliminan rápidamente, la mayor parte (50%) como CO₂, y el 35% en la orina [290,291]. Estos datos desmienten cualquier posibilidad de actuación de la glucosamina.

Varios autores han investigado el efecto que podría tener la glucosamina sobre condrocitos cultivados *in vitro*, enriqueciendo el medio de cultivo con glucosamina en un rango de concentraciones de hasta 100 µg/mL [292,293]. Aunque se han obtenido ciertos resultados en esos sistemas, han sido criticados argumentando que las concentraciones de glucosamina necesarias para que se diese el efecto de estimulación eran imposibles de alcanzar por las células *in vivo*.

Hay un estudio muy reciente que nos parece decisivo, y que pensamos que debería cerrar definitivamente la discusión sobre el posible papel de la glucosamina. Se trata del trabajo publicado por el grupo de Lammi, de la Universidad de Kuopio (Finlandia) en *Biochimica et Biophysica Acta* [294]. Estos autores describen el efecto de la glucosamina, sulfato de glucosamina y de otros productos relacionados añadidos al medio de cultivo sobre diversas variables relacionadas con el desarrollo y la regeneración del cartílago: la producción de agreganos, la actividad de la enzima hialuronano sintasa, y sobre la síntesis de glucosaminoglicanos.

Utilizaron concentraciones de glucosamina, sulfato de glucosamina, glucosamina 6-sulfato y glucosamina 3-sulfato, y los mismos derivados de galactosa o manosamina, en concentraciones de 0, 0'1 y 1'0 mM en períodos de 0, 4, 8, 24 y 72 horas. Los resultados mostraron que ninguno de los productos a esas concentraciones produce ningún efecto en los condrocitos sobre la síntesis de agreganos, la síntesis de glucosaminoglicanos, la expresión del gen de la hialuronano sintasa, la actividad de esta enzima, ni la síntesis de glucosaminoglicanos. Por tanto, a nuestro entender, estos experimentos cierran la cuestión. La glucosamina libre, ni sus derivados, aún en el caso de que alcance el cartílago, no puede producir ningún efecto.

El trabajo de este grupo nos resulta especialmente interesante, no sólo porque despeja definitivamente la cuestión de la glucosamina, sino también porque tiene muchos puntos en común con parte del trabajo que presentamos en esta Tesis: el cultivo de condrocitos bovinos, el seguimiento del crecimiento de las células en el medio estándar y suplementado con el ingrediente cuya influencia se desea ver en la síntesis de las macromoléculas de la matriz, etc. La diferencia es que el trabajo de Lammi consiste en el estudio de la influencia de la glucosamina y otros derivados de azúcares sobre la síntesis de glucosaminoglicanos y sus derivados, y el nuestro es el estudio de la influencia de la glicina y de otros aminoácidos sobre la síntesis de colágeno en las mismas células. Así, el trabajo de Lammi puede considerarse un punto de referencia o control para el nuestro. Comparando pues ambos trabajos, podemos concluir que los condrocitos no parecen tener problemas de nutrición para fabricar los glucosaminoglicanos, mientras que sí se puede intervenir de esa forma, en condiciones razonables para favorecer la síntesis de colágeno.

Estudio nutricional llevado a cabo por el Instituto del Metabolismo Celular (IMC)

Los resultados del estudio nutricional que está llevando a cabo el Instituto del Metabolismo Celular en estrecha colaboración con el trabajo de esta Tesis, un avance de los cuales se expone en el capítulo 8, demuestran que los resultados teóricos y experimentales de esta Tesis tienen una clara aplicación práctica y nos llevan a concluir que muchas de las enfermedades degenerativas relacionadas con una debilidad del sistema mecánico (huesos, cartílagos y tendones) pueden tener una causa carencial, debida principalmente a una deficiencia de glicina, y también, aunque probablemente en menor extensión, por un defecto de lisina, ya que el enriquecimiento de la dieta con estos dos aminoácidos como aditivos alimentarios produce una sensible mejoría de los síntomas produciendo una desaparición del dolor de las articulaciones sin el uso de analgésicos, mientras que la prolina no parece ejercer ningún efecto. Estos resultados están totalmente de acuerdo con nuestros resultados teóricos, y con nuestros resultados experimentales obtenidos con los cultivos de fibroblastos y condrocitos.

La primera conclusión que se deriva de la combinación de todos estos resultados es que la causa inmediata de estos problemas es una deficiencia en la síntesis de colágeno –no de proteoglicanos– siendo su causa primaria la escasez de glicina como principal y más escasa materia prima para la síntesis de colágeno por estas células, y también, en algunos casos, debido a la carencia de lisina, mientras que no parece que haya problema en el suministro de prolina. Estos resultados están totalmente de acuerdo con los que se muestran en la figura 10.1, donde se ve que el diferente efecto de estos tres aminoácidos en los cultivos de fibroblastos coincide con el observado en el estudio nutricional. Por otra parte, los resultados con los cultivos de condrocitos (tabla 10.1) muestran que la adición de los tres aminoácidos al

medio podría producir un efecto similar. Sin embargo, los resultados del estudio nutricional parecen indicar que la jerarquía de importancia de cada uno (glicina/lisina/prolina) es la misma sobre el cartílago que sobre el tejido conjuntivo. Esto probablemente se debe a que, en efecto, la presencia de una concentración alta de prolina puede mejorar el rendimiento de los condrocitos, pero probablemente no sea necesario añadir este aminoácido a la dieta como suplemento nutricional, ya que tratándose de un aminoácido no esencial, el organismo tendría suficiente capacidad para sintetizarlo, alcanzando la concentración alta en plasma sin problemas, mientras que siendo la glicina y la lisina esenciales –según hemos demostrado– debe ser conveniente añadirlos a la dieta, especialmente la glicina, cuyo efecto es más importante y más general.

Capítulo 11

Conclusiones

1. Revisión del concepto de aminoácidos esenciales. Hemos hecho una revisión crítica del concepto de aminoácidos esenciales y concluimos que la lista debe ampliarse teniendo en cuenta la capacidad cuantitativa del metabolismo para sintetizar la cantidad de cada uno, de acuerdo con las necesidades del metabolismo. Así, proponemos que la lista de aminoácidos esenciales no debería reducirse al máximo posible, tratando de forzar el metabolismo como para comprobar hasta dónde es capaz de resistir, sino, al contrario, ampliarse todo lo necesario para que trabaje en condiciones óptimas. Este criterio nos lleva a proponer que se amplíe la lista añadiendo a los ocho aminoácidos esenciales clásicos por insuficiencia bioquímica (valina, leucina, isoleucina, treonina, metionina, lisina, fenilalanina y triptófano) los siguientes: histidina, por insuficiencia bioquímica; tirosina y cisteína, por dependencia bioquímica de otro aminoácido esencial; arginina, por imposibilidad biofísica; y finalmente glicina, por imposibilidad matemática. De estos aminoácidos que proponemos añadir a la lista, ya otros autores habían sugerido que los cuatro primeros (histidina, tirosina, cisteína y arginina) debían considerarse esenciales, aunque no se había dado una explicación teórica completa sobre la arginina. Nuestra principal aportación en este sentido es proponer que se añada la glicina a esta lista, para lo que damos una explicación teórica y mostramos resultados experimentales que lo avalan.

2. La glicina debe considerarse aminoácido esencial por razones de imposibilidad matemática. Nuestro estudio teórico sobre la capacidad metabólica para sintetizar glicina nos lleva a concluir que la capacidad que tiene el metabolismo para sintetizar glicina es muy limitada y depende estrictamente de los procesos que consumen unidades C_1 transportadas por el tetrahidrofolato, de forma que estos procesos pueden dar cuenta de las necesidades de glicina para la síntesis de porfirinas, bases púricas y creatina, pero son insuficientes

para la demanda general del metabolismo, por lo que concluimos que la glicina es un aminoácido esencial, considerando sus necesidades cuantitativas. Dado que esta incapacidad depende de relaciones estequiométricas fijas, que condicionan una relación matemática que no puede alterarse mediante procesos de regulación enzimática, introducimos el concepto de aminoácido esencial *por motivos de imposibilidad matemática*, que queda representado con el caso de la glicina.

3. La glicina es especialmente necesaria para la síntesis del colágeno. La síntesis de colágeno significa un gasto extraordinario de glicina, de más de 15 gramos diarios, los cuales deben ser suministrados por la dieta, ya que la capacidad metabólica de síntesis de glicina sólo puede cubrir los requerimientos para la síntesis de otros compuestos (principalmente bases púricas, porfirinas y creatina). La glicina es, pues, especialmente esencial para los fibroblastos, condrocitos y osteoblastos. La cantidad de glicina que se puede ingerir diariamente con una alimentación normal se calcula que es de 2 gramos, y podría llegar a 5 gramos con una dieta especialmente rica en proteínas –y principalmente en colágeno–, pero no más. Por tanto, una alimentación normal hace que una persona esté padeciendo un déficit de glicina de aproximadamente 10 gramos diarios. Esta deficiencia de glicina tiene que producir necesariamente un retraso en la síntesis y renovación del colágeno, aparte de que puede provocar una síntesis incorrecta de la proteína formándose inadecuadas modificaciones covalentes postranscripcionales en los residuos de prolina y lisina.

4. El enriquecimiento del medio de cultivo de fibroblastos y condrocitos con glicina, prolina y lisina activa la síntesis de colágeno. Los tres aminoácidos más característicos de la estructura del colágeno (glicina, prolina y lisina), añadidos individualmente al medio de cultivo de fibroblastos y condrocitos, producen una activación en la producción de colágeno, con respecto a las células cultivadas en el medio estándar sin enriquecer. En la zona alta del rango de concentraciones fisiológicas (~ 5 mg/100 mL) la glicina produce el mayor efecto activador de los tres (43%), seguida de la lisina (16%) y de la prolina (12%), siendo el efecto de la prolina y de la lisina mayor a concentraciones superiores, fuera del rango fisiológico. Esto hace que el efecto de la glicina sea el que tiene más interés fisiológico. En los condrocitos los tres aminoácidos producen un importante efecto activador, de entre el 40 y el 50% sobre el control, todos ellos dentro del rango de concentraciones fisiológicas. La adición de isoleucina y ácido aspártico, utilizados como controles, al medio de cultivo de fibroblastos no produce este efecto. Estos resultados sugieren que las concentraciones de esos tres aminoácidos deberían estar en la zona alta del rango fisiológico (5 mg/100 mL) para evitar problemas en la síntesis de colágeno.

5. Funciones optimizables. La estimulación de la síntesis de colágeno por estos tres aminoácidos muestra funciones optimizables. Las curvas de activación de la síntesis y secreción de colágeno en fibroblastos y condrocitos cultivados *in vitro* producidas por la

adición de glicina, prolina y lisina, muestran que se trata de funciones optimizables, puesto que en todos los casos la síntesis de colágeno, dependiente de la concentración de estos aminoácidos en el medio de cultivo tiene un máximo. Esto significa que hay una concentración óptima de cada uno que maximiza la producción de colágeno. La explicación que damos de este efecto, es que la estructura correcta del colágeno depende de una determinada velocidad de síntesis de la proteína, a fin de que se produzcan las modificaciones covalentes pertinentes, de forma que si la velocidad es más lenta se podrían producir más modificaciones, y menos si es más rápida, dando lugar en ambos casos a estructuras incorrectas del colágeno que podrían acarrear procesos patológicos. En los fibroblastos, solamente el máximo de la glicina está en el rango de concentraciones fisiológicas –en el límite del intervalo (5 mg/100 mL)–, dando una activación del 43%, según hemos comentado en el punto anterior, mientras que los máximos de la prolina y la lisina quedan fuera de ese rango; el efecto de la glicina es, pues, el que tiene más interés fisiológico. En los condrocitos, los tres máximos quedan algo por encima del rango fisiológico (>6 mg/100 mL) aunque también el de la glicina es el más próximo. Estos resultados sugieren que el trabajo óptimo de estas células ha de producirse estando sus concentraciones en el plasma sanguíneo en la zona más alta del intervalo de concentraciones fisiológicas (~ 5 mg/100 mL en los tres casos), y que una concentración menor puede acarrear problemas para la síntesis de colágeno. También estos resultados sugieren que para conseguir un trabajo óptimo de la síntesis de colágeno en estas células el límite del rango de concentraciones plasmáticas podría ser más alto que el observado, lo cual podría conseguirse aumentando la presencia de estos aminoácidos en la dieta.

6. Datos del estudio nutricional llevado a cabo por el Instituto del Metabolismo Celular (IMC). En estrecha colaboración con el trabajo de esta Tesis, en el Instituto del Metabolismo Celular hemos llevado a cabo un proyecto de investigación nutricional sobre el efecto de la glicina usado como suplemento nutricional para combatir la artrosis, la osteoporosis, lesiones físicas, y otros problemas relacionados con el deterioro de la estructura mecánica del cuerpo, incluyendo varios casos de implantes dentarios y degeneración de encías, y un caso de osteogénesis imperfecta. La conclusión de este estudio es que la glicina, administrada en dosis de 10 gramos diarios repartidos en dos tomas de 5 g cada una, por la mañana con el desayuno y por la noche con la cena, produce una mejoría general de estas dolencias en un plazo de tiempo que, en la mayoría de los casos, está entre dos semanas y cuatro meses. El enriquecimiento adicional de la dieta con lisina en cantidades entre 2'5 y 5'0 gramos diarios ocasiona una notable mejoría en los casos más resistentes al tratamiento con glicina exclusivamente. La administración de prolina no ha producido resultados dignos de mención.

7. La causa de la artrosis se debe principalmente a una deficiencia de glicina. A la vista de los resultados teóricos y experimentales de laboratorio con fibroblastos y condrocitos cultivados, y de las aplicaciones de estos resultados en los ensayos nutricionales, concluimos que la causa principal, o más extendida, de la artrosis debe ser una deficiencia de estos tres

aminoácidos, y especialmente debida a la carencia de glicina. Estos resultados nos llevan a concluir que la artrosis y otras enfermedades relacionadas con una debilidad de la estructura mecánica del organismo, incluida la dificultad de reparación de lesiones físicas, deben considerarse como enfermedades carenciales, por defecto, principalmente de glicina y, en muchos casos, se podrán combatir mediante la ingestión directa de glicina como aditivo alimentario.

Bibliografía y apéndices



Bibliografía

Bibliografía general

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WATSON, J.D. (1994). *Biología Molecular de la Célula*, 2ª edición, Ediciones Omega, Barcelona.

BARGMANN, W. (1964). *Histología y Anatomía Microscópica Humanas*, Editorial Labor, Barcelona.

BORRACHERO DEL CAMPO, J. (1972). *Reumatología Clínica*, Editorial Oteo, Madrid.

BUCKWALTER, J.A., ROSENBERG, L.C. & HUNZIKER, E.B. (1990). Articular Cartilage: Composition, Structure, Response to Injury, and Methods of Facilitating Repair. En: *Articular Cartilage and Knee Function. Basic Science and Arthroscopy* (J.W. Ewing, ed.), Bristol-Myers/Zimmer Orthopaedic Symposium Series, New York, pp. 19-56.

BUCKWALTER, J.A. & MANKIN, H.J. (1998). Articular Cartilage: Tissue Design and Chondrocyte-Matrix Interactions. *Instructional Course Lectures*, **47**, 477-486.

BULLOUGH, P.G. (1992). The pathology of osteoarthritis. En: *Osteoarthritis. Diagnosis and Medical/Surgical Management* (Moskowitz, R.W., Howell, D.S., Goldberg, V.M. & Mankin, H.J., eds.), 2nd edition, Saunders Company, Philadelphia, pp. 39-70.

CASTOR, C.W. (1987). Regulación del metabolismo del tejido conectivo. En: *Artritis y otras patologías relacionadas. Texto de reumatología* (McCarty, D.J., ed.), 10ª edición, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, pp. 258-285.

CURTIS, H. & BARNES, N.S. (1993). *Biología*, 5ª edición, Editorial Médica Panamericana, Madrid.

DARNELL, J., LODISH, H. & BALTIMORE, D. (1988). *Biología celular y molecular*. Editorial Labor, Barcelona.

REAL ACADEMIA ESPAÑOLA. (2001). *Diccionario de La Lengua Española*, 22ª edición. Editorial, Espasa Calpe, Madrid.

GRANT, M.E. & JACKSON, D.S. (1976). The Biosynthesis of Procollagen. En: *Essays in Biochemistry, volume 12* (Campbell, P.N. & Aldridge, W.N., eds.), Academic Press Inc., London, pp 77-113.

HAM, A.W. (1975). *Tratado de Histología*, 7ª edición, Editora Importécnica, Madrid.

HARALSON, M.A. & HASSELL, J.R. (1995). The extracellular matrix—an overview. En: *Extracellular matrix. A practical approach* (Haralson, M.A. & Hassell, J.R., eds.), Oxford University Press, New York, pp. 1-30.

HASCALL, V.C. & HEINEGÅRD, D. (1974). Aggregation of cartilage proteoglycans. I. The role of hyaluronic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, **249**, 4232-4241.

- HAY, E.D. (1981). Extracellular Matrix. *The Journal of Cell Biology*, **91**(3 Pt 2), 205s-223s.
- HULMES, D.J.S. (1992). The collagen superfamily –diverse structures and assemblies. En: *Essays in Biochemistry*, volume 27 (Tipton, K.F., ed.), Portland Press Ltd., London, pp. 49-67.
- JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. (1996). *Histología básica. Texto y Atlas*, 4ª edición, Masson, Barcelona.
- KJELLÉN, L. & LINDAHL, U. (1991). Proteoglycans: structures and interactions. *Annual Review of Biochemistry*, **60**, 443-475.
- KIVIRIKKO, K.I. & MYLLYLÄ, R. (1985). Post-translational processing of procollagens. En: *Biology, Chemistry and Pathology of Collagen* (Fleischmajer, R., Olsen, B.R. & Kühn, K., eds.), Annals of the New York Academy of Sciences, New York, pp. 187-201.
- KIVIRIKKO, K.I. & RISTELI, L. (1976). Biosynthesis of collagen and its alterations in pathological states. *Medical Biology*, **54**, 159-186.
- KÜHN, K. (1969). Collagen. En: *Essays in Biochemistry*, volume 5 (Campbell, P.N. & Greville, G.D., eds.), Academic Press Inc., London, pp. 59-88.
- KÜHN, K., GLANVILLE, R.W., BABEL, W., QIAN, R-Q., DIERINGER, H., VOSS, T., SIEBOLD, B., OBERBÄUMER, I., SCHWARZ, U. & YAMADA, Y. (1985). The structure of type IV collagen. En: *Biology, Chemistry and pathology of collagen* (Fleischmajer, R., Olsen, B.R. & Kühn, K., eds.), Annals of the New York Academy of Sciences, New York, pp. 14-24.
- KÜHN, K. (1986). Cartilage Matrix Components. Introduction. En: *Articular Cartilage Biochemistry* (Kuettner, K.E., Scheleyerbach, R. & Hascall, V.C., eds.), Raven Press, New York, pp. 1-2.
- LACKIE, J.M. & DOW, J.A.T. (1999). *The Dictionary of Cell & Molecular Biology*, 3rd edition, Academic Press, California.
- MANKIN, H.J. & RADIN, E. (1987). Estructura y función de las articulaciones. En: *Artritis y otras patologías relacionadas. Texto de reumatología*. (McCarty, D.J., ed.), 10ª edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, pp. 197-212.
- MATHEWS, C.K., VAN HOLDE, K.E. & AHERN, K.G. (2002). *Bioquímica*, 3ª edición. Pearson Education, Madrid.
- MAYNE, R., VAN DER REST, M., NINOMIYA, Y. & OLSEN, B.R. (1985). The structure of type IX collagen. En: *Biology, Chemistry and pathology of collagen* (Fleischmajer, R., Olsen, B.R. & Kühn, K., eds.), Annals of the New York Academy of Sciences, New York, pp. 38-46.
- MAYNE, R. & IRWIN, M.H. (1986). Collagen types in cartilage. En: *Articular Cartilage Biochemistry* (Kuettner, K.E., Scheleyerbach, R. & Hascall, V.C., eds.), Raven Press, New York, pp. 23-38.
- PANIAGUA, R., NISTAL, M., SESMA, P., ÁLVAREZ-URÍA, M. & FRAILE, B. (1993). *Citología e Histología Vegetal y Animal. Biología de las células y tejidos animales y vegetales*, Interamericana-McGraw-Hill, Madrid.
- PAULLING, L. & COREY, R.B. (1951). The structure of fibrous proteins of the collagen-gelatin group. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **37**, 261-271.
- RAWN, J.D. (1999). *Bioquímica*, Interamericana-McGraw Hill, Madrid.
- Real Decreto 1317/1989, de 27 de octubre, por el que se establecen las Unidades Legales de Medida.
- RICARD-BLUM, S., DUBLET, B. & VAN DER REST, M. (2000). *Unconventional collagens. Types VI, VII, VIII, IX, X, XII, XIV, XVI and XIX*, Oxford University Press, New York.

- ROSENBERG, L. (1987). Estructura y función de los proteoglicanos. En: *Artritis y otras patologías relacionadas. Texto de reumatología* (McCarty, D.J., ed.), 10ª edición, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, pp. 243-257.
- SCHENK, R.K., EGGLI, P.S. & HUNZIKER, E.B. (1986). Articular Cartilage Morphology. En: *Articular Cartilage Biochemistry. Workshop Conference Hoechst-Werk Albert* (Kuettner, K.E., Scheleyerbach, R. & Hascall, V.C., eds.), Raven Press, New York, pp. 3-22.
- SILLENCE, D.O., SENN, A. & DANKS, D.M. (1979). Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. *Journal of Medical Genetics*, **16**, 101-116.
- STRYER, L. (1995). *Bioquímica*, 4ª edición, Editorial Reverté, Barcelona.
- REAL ACADEMIA DE LAS CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES (1990). *Vocabulario científico y técnico*, Editorial Espasa Calpe, Madrid.
- VON DER MARK, K., MOLLENHAUER, J., PFÄFFLE, M., VAN MENXEL, M. & MÜLLER, P.K. (1986) Role of Anchorin CII in the Interaction of Chondrocytes with Extracellular Collagen. En: *Articular Cartilage Biochemistry. Workshop Conference Hoechst-Werk Albert* (Kuettner, K.E., Scheleyerbach, R. & Hascall, V.C., eds.), Raven Press, New York, pp. 125-142.

Bibliografía citada

1. DEVLIN, T.M. (2004). *Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas*, 4ª edición, Editorial Reverté, Barcelona.
2. GELSE, K., PÖSCHL, E. & AIGNER, T. (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **55**, 1531-1546.
3. BORNSTEIN, P. & PIEZ, K.A. (1964). A biochemical study of human skin collagen and the relation between intra- and intermolecular cross-linking. *The Journal of Clinical Investigation*, **43**, 1813-1823.
4. LAYMAN, D.L., MCGOODWIN, E.B. & MARTIN, G.R. (1971). The nature of collagen synthesized by cultured human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **68**, 454-458.
5. BELLAMY, G. & BORNSTEIN, P. (1971). Evidence for procollagen, a biosynthetic precursor of collagen. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **68**, 1138-1142.
6. CHURCH, R.L., PFEIFFER, S.E. & TANZER, M.L. (1971). Collagen biosynthesis: synthesis and secretion of a high molecular weight collagen precursor (procollagen). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **68**, 1638-2642.
7. PONTZ, B.F., MÜLLER, P.K. & MEIGEL, W.N. (1973). A study on the conversion of procollagen. Release and recovery of procollagen peptides in the culture medium. *The Journal of Biological Chemistry*, **248**, 7558-7564.
8. MYLLYHARJU, J. (2003). Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis. *Matrix Biology*, **22**, 15-24.
9. SPIRO, R.G. (1969). Characterization and quantitative determination of the hydroxylysine-linked carbohydrate units of several collagens. *The Journal of Biological Chemistry*, **244**, 602-612.
10. SIEGEL, R.C. (1974). Biosynthesis of collagen crosslinks: increased activity of purified lysyl oxidase with reconstituted collagen fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **71**, 4826-4830.

11. SIEGEL, R.C. & FU, J.C.C. (1976). Collagen cross-linking. Purification and substrate specificity of lysyl oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, **251**, 5779-5785.
12. SIEGEL, R.C. (1976). Collagen cross-linking. Synthesis of collagen cross-links *in vitro* with highly purified lysyl oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, **251**, 5786-5792.
13. FUJIMOTO, D. (1980). Evidence for natural existence of pyridinoline cross-link in collagen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **93**, 948-953.
14. KUROYANAGI, M., SHIMAMURA, E., KIM, S., ARAKAWA, N., FUJIWARA, Y. & OTSUKA, M. (2002). Effects of L-ascorbic acid on lysyl oxidase in the formation of collagen cross-links. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **66**, 2077-2082.
15. STOPAK, D. & HARRIS, A.K. (1982). Connective tissue morphogenesis by fibroblast traction. I. Tissue culture observations. *Developmental Biology*, **90**, 383-398.
16. MUIR, H. (1986). Current and future trends in articular cartilage research and osteoarthritis. En: *Articular Cartilage Biochemistry* (Kuettner, K.E., Scheleyerbach, R. & Hascall, V.C., eds.), Raven Press, New York, pp. 423-440.
17. VAN DER REST, M. MAYNE, R., NINOMIYA, Y., SEIDAH, N.G., CHRETIEN, M. & OLSEN, B.R. (1985). The Structure of Type IX Collagen. *The Journal of Biological Chemistry*, **260**, 220-225.
18. DIAB, M., WU, J-J. & EYRE, D.R. (1996). Collagen type IX from human cartilage: a structural profile of intermolecular cross-linking sites. *The Biochemical Journal*, **314**, 327-332.
19. HUBER, S., VAN DER REST, M., BRUCKNER, P., RODRIGUEZ, E., WINTERHALTER, K.H. & VAUGHAN, L. (1986). Identification of the Type IX Collagen Polypeptide Chains. The $\alpha 2$ (IX) polypeptide carries the chondroitin sulphate chain(s). *The Journal of Biological Chemistry*, **261**, 5965-5968.
20. IRWIN, M.H. & MAYNE, R. (1986). Use of Monoclonal Antibodies to Locate the Chondroitin Sulphate Chain(s) in Type IX Collagen. *The Journal of Biological Chemistry*, **261**, 16281-16283.
21. KONOMI, H., SEYER, J.M., NINOMIYA, Y. & OLSEN, B.R. (1986). Peptide-specific Antibodies Identify the $\alpha 2$ chain as the Proteoglycan Subunit of Type IX Collagen. *The Journal of Biological Chemistry*, **261**, 6742-6746.
22. PROCKOP, D.J. & KIVIRIKKO, K.I. (1995). Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annual Review of Biochemistry*, **64**, 403-404.
23. SILLENCE, D.O. (1981). Osteogenesis imperfecta: An expanding panorama of variants. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **159**, 11-25.
24. BASABE TUERO, B. (2000). Funciones de la vitamina C en el metabolismo del colágeno. *Revista Cubana Alimentación Nutritiva*, **14**, 46-54.
25. MURAD, S., GROVE, D., LINDBERG, K.A., REYNOLDS, G., SIVARAJAH, A. & PINNELL, S.R. (1981). Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **78**, 2879-2882.
26. PROCKOP, D.J. & PIHLAJANIEMI, T. (1987). El colágeno en tejidos conectivos normales y enfermos. En: *Artritis y otras patologías relacionadas. Texto de reumatología* (Mc Carty, D.J., ed), 10ª edición, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, pp. 227-242.
27. SPRANGER, J., WINTERPACHT, A. & ZABEL, B. (1994). The type II collagenopathies: a spectrum of chondrodysplasias. *European Journal of Pediatrics*, **153**, 56-65.
28. FERNÁNDEZ, M. & BALSAS, A. (1997). Factores hereditarios en la artrosis. En: *Artrosis. Visión actual* (J. Paulino Tevar, ed.), Grupo Aula Médica, Madrid, pp. 23-54.

29. MENDLER, M., EICH-BENDER, S.G., VAUGHAN, L., WINTERHALTER, H. & BRUCKNER, P. (1989). Cartilage Contains Mixed Fibrils of Collagen Types II, IX, and XI. *The Journal of Cell Biology*, **108**, 191-197.
30. KUETTNER, K.E. & KIMURA, J.H. (1985). Proteoglycans: an overview. *Journal of Cellular Biochemistry*, **27**, 327-336.
31. ROSENBERG, L.C. & BUCKWALTER, J.A. (1986). Cartilage Proteoglycans. En: *Articular Cartilage Biochemistry. Workshop Conference Hoechst-Werk Albert* (Kuettner, K.E., Scheleyerbach, R. & Hascall, V.C., eds.), Raven Press, New York, pp. 39-58.
32. MAROUDAS, A. & VENN, M. (1977). Chemical composition and swelling of normal and osteoarthrotic femoral head cartilage. II. Swelling. *Annals of Rheumatologic Diseases*, **36**, 399-406.
33. ÁLVARO-GRACIA, J.M. & LAFFON, A. (1997). Las citoquinas en la patogenia de la artrosis. En: *Artrosis. Visión actual* (J. Paulino Tevar, ed.), Grupo Aula Médica, Madrid, pp. 55-75.
34. BIDANSET, D.J., GUIDRY, C., ROSENBERG, L.C., CHOI, H.U., TIMPL, R. & HOOK, M. (1992). Binding of the Proteoglycan Decorin to Collagen Type VI. *The Journal of Biological Chemistry*, **267**, 5250-5256.
35. WIBERG, C., KLATT, A.R., WAGENER, R., PAULSSON, M., BATEMAN, J.F., HEINEGÅRD, D. & MÖRGE LIN, M. (2003). Complexes of Matrilin-1 and Biglycan or Decorin Connect Collagen VI Microfibrils to Both Collagen II and Aggrecan. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 37698-37704.
36. MOLLENHAUER, J., BEE, J.A., LIZARBE, M.A. & VON DER MARK, K. (1984). Role of anchorin II, a 31,000-mol-wt membrane protein, in the interaction of chondrocytes with type II collagen. *The Journal of Cell Biology*, **98**, 1572-1579.
37. HEDBOM, E., ANTONSSON, P., HJERPE, A., AESCHLIMANN, D., PAULSSON, M., ROSA-PIMENTEL, E., SOMMARIN, Y., WENDEL, M., OLDBERG, A. & HEINEGARD, D. (1992). Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. *The Journal of Biological Chemistry*, **267**, 6132-6136.
38. FIFE, R.S. & BRANDT, K.D. (1989). Cartilage Matrix Glicoprotein is Present in Serum in Experimental Canine Osteoarthritis. *The Journal of Clinical Investigation*, **84**, 1432-1439.
39. POOLE, A.R., PIDOUX, I., REINER, A. & ROSENBERG, L. (1982). An Immunoelectron Microscope Study of the Organization of Proteoglycan Monomer, Link Protein, and Collagen in the Matrix of Articular Cartilage. *The Journal of Cell Biology*, **93**, 921-937.
40. EHRLICH, M.G., MANKIN, H.J., JONES, H., WRIGHT, R., CRISPEN, C. & VIGLIANI, G. (1977). Collagenase and Collagenase Inhibitors in Osteoarthritic and Normal Human Cartilage. *The Journal of Clinical Investigation*, **59**, 226-233.
41. POOLE, A.R., KOBAYASHI, M., YASUDA, T., LAVERTY, S., MWALE, F., KOJIMA, T., SAKAI, T., WAHL, C., EL-MAADAWY, S., WEBB, G., TCHETINA, E. & WU, W. (2002). Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **61** (Supl. II), ii78-ii81.
42. BUCKWALTER, J.A. & MANKIN, H.J. (1998). Articular Cartilage: Degeneration and Osteoarthrosis, Repair, Regeneration, and Transplantation. *Instructional Course Lectures*, **47**, 487-504.
43. JONES, J.A. & DOHERTY, M. (1995). ABC of Rheumatology: Osteoarthritis. *BMJ*, **310**, 457-460.
44. HOWELL, D.S., TREADWELL, B.V. & TRIPPEL, S.B. (1992). Etiopathogenesis of osteoarthritis. En: *Osteoarthritis. Diagnosis and Medical/Surgical Management* (Moskowitz, R.W., Howell, D.S., Goldberg, V.M. & Mankin, H.J., eds.), 2nd Edition, Saunders Company, Philadelphia, pp. 233-252.

45. FIFE, R.S. (1992). A Short History of Osteoarthritis. En: *Osteoarthritis. Diagnosis and Medical/Surgical Management* (Moskowitz, R.W., Howell, D.S., Goldberg, V.M. & Mankin, H.J., eds.), 2nd Edition, Saunders Company, Philadelphia, pp. 11-14.
46. HOLLANDER, J.L. (1987). Introducción. En: *Artritis y otras patologías relacionadas. Texto de reumatología* (Mc Carty, D.J., ed.), 10^a Edición, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, pp. 23-8.
47. VALLOIS, H.V. (1948). Paleopathology of paleontologie humaine. *Homenaje a Don Luis Hoyos Sainz*, **1**, 333-341.
48. STRAUSS, W.L. & CAVE, A.J. (1957). Pathology and the posture of Neanderthal man. *The Quarterly Review of Biology*, **32**, 348-363.
49. ACKERNCHT, E.H. (1953). Paleopathology. En: *Anthropology Today* (Kroeber, A.L., ed.), University of Chicago, Chicago.
50. PEREZ, P.J. & MARTINEZ, I. (1989). Evidence of temporomandibular arthrosis in the Middle Pleistocene human fossils from Atapuerca/Ibeas (Spain). *Journal of Paleopathology*, **3**, 15-18
51. HOOTON, E.A. (1930). *The Indians of Pecos Pueblo*, Yale University Press, New Heaven.
52. RUFFER, M.A. (1918). Arthritis deformans and spondylitis in ancient Egypto. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, **22**, 152-196.
53. SMITH, E.G. & DAWSON, W.R. (1924). *Egyptian mummies*, Allen and Unwin, London.
54. WELLS, C. (1962). Joint pathology in ancient Anglo-Saxons. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, **44B**, 948-949.
55. PAULINO, J. (1997). Artrosis/Epidemiología. En: *Artrosis. Visión actual* (Paulino Tevar, ed.), Grupo Aula Médica, Madrid, pp. 1-22.
56. MEDSGER, T.A. & MASI, A.T. (1987). Epidemiología de las enfermedades reumáticas. En: *Artritis y otras patologías relacionadas. Texto de reumatología* (Mc Carty, D.J., ed.), 10^a Edición, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, pp. 29-59.
57. JORDAN, J.M., KINGSTON, R.S., LANE, N.E., NEVITT, M.C., ZHANG, Y., SOWERS, M.F. *et al.* (2000). Systemic risk factors for osteoarthritis. En: Felson, D.T., conference chair. Osteoarthritis: new insights. Part I: The disease and its risk factors. *Annals of Internal Medicine*, **133**, 637-639.
58. SRIKANTH, V.K., FRYER, J.L., ZHAI, G., WINZENBERG, T.M., HOSMER, D. & JONES, G. (2005). A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, **13**, 769-781.
59. HELMINEN, H.J. SÄÄMÄNEN. A.-M., SALMINEN, H. & HYTTINEN, M.M. (2002). Transgenic mouse models for studying the role of cartilage macromolecules in osteoarthritis. *Rheumatology*, **41**, 848-856.
60. ALA-KOKKO, L., BALDWIN, C.T., MOSKOWITZ, R.W. & PROCKOP, D.J. (1990). Single base mutation in the type II procollagen gene (*COL2A1*) as a cause of primary osteoarthritis associated with a mild chondrodysplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **87**, 6565-6568.
61. FELSON, D.T. (1995). Weight and osteoarthritis. *The Journal of Rheumatology*, **22**, 7-9.
62. JONES, G., NGUYEN, T., SAMBROOK, P.N., LORD, S.R., KELLY, P.J. & EISMAN, J.A. (1995). Osteoarthritis, bone density, postural stability, and osteoporotic fractures: a population based study. *The Journal of Rheumatology*, **22**, 921-925.
63. DEQUEKER, J., MOKASSA, L. & AERSSSENS, J. (1995). Bone density and osteoarthritis. *The Journal of Rheumatology Supplement*, **43**, 98-100.

64. MOBASHERI, A., VANUCCI, S.J., BONDY, C.A., CARTER, S.D., INNES, J.F., ARTEAGA, M.F., TRUJILLO, E., FERRAZ, I., SHAKIBAEI, M. & MARTÍN-VASALLO, P. (2002). Glucose transport and metabolism in chondrocytes: a key to understanding chondrogenesis, skeletal development and cartilage degradation in osteoarthritis. *Histology and Histopathology*, **17**, 1239-1267.
65. DEGROOT, J., VERZIJL, N., WENTING-VAN WIJK, M.J.G., JACOBS, K.M.G., VAN EL, B., VAN ROERMUND, P.M., BANK, R.A., BIJLSMA, J.W.J., TEKOPPELE, J.M. & LAFEVER, F.P.J.G. (2004). Accumulation of Advanced Glycation End Products as a molecular mechanism for aging as a risk factor in osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, **50**, 1207-1215.
66. WILLHELMI, G. (1993). Potential influence of nutrition with supplements on healthy and arthritic joints. II. Nutritional quantity, supplements, contamination. *Zeitschrift für Rheumatologie*, **52**, 191-200.
67. STUDER, R., JAFFURST, D., STEFANOVIC-RACIC, M., ROBBINS, P.D. & EVANS, C.H. (1999). Nitric oxide in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, **7**, 977-979.
68. OH, M., FUKUDA, K., ASADA, S., YASUDA, Y. & TANAKA, S. (1998). Concurrent generation of nitric oxide and superoxide inhibits proteoglycan synthesis in bovine articular chondrocytes: involvement of peroxynitrite. *The Journal of Rheumatology*, **25**, 2169-2174.
69. HENROTIN, Y., DEBY-DUPONT, G., DEBY, C., DE BRUYN, M., LAMY, M. & FRANCHIMONT, P. (1993). Production of active oxygen species by isolated human chondrocytes. *British Journal of Rheumatology*, **32**, 562-567.
70. SCHWARTZ, E.R., LEVEILLE, C. & OH, W.H. (1981). Experimentally induced osteoarthritis in guinea pigs: effects of surgical procedure and dietary intake of vitamin C. *Laboratory Animal Science*, **31**, 683-687.
71. MCALINDON, T. & FELSON, D.T. (1997). Nutrition: risk factors in osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **56**, 397-400.
72. SCHWARTZ, E.R. & ADAMY, L. (1977). Effect of ascorbic acid on arylsulfatase activities and sulfated proteoglycan metabolism in chondrocyte cultures. *The Journal of Clinical Investigation*, **60**, 96-106.
73. SANDELL, L.J. & DANIEL, L.C. (1988). Effects of ascorbic acid on collagen mRNA levels in short-term chondrocytes cultures. *Connective Tissue Research*, **17**, 11-22.
74. BHALLA, A.K., WOJNO, W.C. & GOLDRING, M.B. (1987). Human articular chondrocytes acquire 1,25-(OH)₂ vitamin D-3 receptors in culture. *Biochimica et Biophysica Acta*, **931**, 26-32.
75. JIMENEZ, S.A. (2005). Overview on Glucosamine and Chondroitin in Osteoarthritis, 10th World Congress on Osteoarthritis, December 8-11, Boston, Massachusetts.
76. LIPPIELLO, L., HALL, D. & MANKIN, H.J. (1977). Collagen synthesis in normal and osteoarthritic human cartilage. *The Journal of Clinical Investigation*, **59**, 593-600.
77. MANKIN H.J. & THRASHER A.Z. (1975). Water content and binding in normal and osteoarthritic human cartilage. *The Journal of Bone and Joint Surgery American Volume*, **57**, 76-80.
78. SANDELL, L.J. & AIGNER, T. (2001). Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Research*, **3**, 107-113.
79. NELSON, F., DAHLBERG, L., LAVERTY, S., REINER, A., PIDOUX, I., IONESCU, M., FRASER, G.L., BROOKS, E., TANZER, M., ROSENBERG, L.C., DIEPPE, P. & POOLE, A.R. (1998). Evidence for Altered Synthesis of Type II Collagen in Patients with Osteoarthritis. *The Journal of Clinical Investigation*, **102**, 2115-2125.

80. MEACHIM, G. & COLLINS, D.H. (1962). Cells counts of normal and osteoarthritic articular cartilage in relation to the uptake of sulphate ($^{35}\text{SO}_4$) in vitro. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **21**, 45-50.
81. POOLE, A.R., KOBAYASHI, M., YASUDA, T., LAVERTY, S., MWALE, F., KOJIMA, T., SAKAI, T., WAHL, C., EI-MAADAWY, S., WEBB, G., TCHETINA, E. & WU, W. (2002). Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **61**, 78-81.
82. LOHMANDER, L.S., ATLEY, L.M., PIETKA, T.A. & EYRE, D.R. (2003). The release of crosslinked peptides from type II collagen into human synovial fluid is increased soon after joint injury and in osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, **48**, 3130-3139.
83. SQUIRES, G.R., OKOUNEFF, S., IONESCU, M. & POOLE, A.R. (2003). The pathobiology of focal lesion development in aging human articular cartilage and molecular matrix changes characteristic of osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, **48**, 1261-1270.
84. AIGNER, T. & STÖVE, J. (2003). Collagens—major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **55**, 1569-1593.
85. BUCKWALTER, J.A. & MOW, V.C. (1992). Cartilage repair in osteoarthritis. En: *Osteoarthritis, Diagnosis and Medical/Surgical Management* (Moskowitz, R.W., Howell, D.S., Goldberg, V.M. & Mankin, H.J., eds.), 2nd edition, Saunders Company, Philadelphia, pp. 71-107.
86. MATYAS, J.R., SANDELL, L.J. & ADAMS, M.E. (1997). Gene expression of type II collagens in chondro-osteophytes in experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, **5**, 99-105.
87. POTTINGER, L.A., PHILIPS, F.M. & DRAGANICH, L.F. (1990). The effect of marginal osteophytes on reduction of varus-valgus instability in osteoarthritic knees. *Arthritis and Rheumatism*, **33**, 853-858.
88. VENN M. & MAROUDAS A. (1977). Chemical composition and swelling of normal and osteoarthrotic femoral head cartilage. I. Chemical composition. *Annal of the Rheumatic Diseases*, **36**, 121-129.
89. MANKIN, H.J. & BRANDT, K.D. (1992). Biochemistry and metabolism of articular cartilage in osteoarthritis. En: *Osteoarthritis, Diagnosis and Medical/Surgical Management* (Moskowitz, R.W., Howell, D.S., Goldberg, V.M. & Mankin, H.J., eds.), 2nd edition, Saunders Company, Philadelphia, pp. 109-154.
90. BOLLET, A.J., HANDY, J.R. & STURGILL, B.C. (1963). Chondroitin sulfate concentration and protein-polysaccharide composition of articular cartilage in osteoarthritis. *The Journal of Clinical Investigation*, **42**, 853-859.
91. BYERS, P.D., MAROUDAS, A., OZTOP, F., STOCKWELL, R.A. & VENN, M.F. (1977). Histological and biochemical studies on cartilage from osteoarthrotic femoral heads with special reference to surface characteristics. *Connective Tissue Research*, **5**, 41-49.
92. ERONEN, I., VIDEMAN, T., FRIMAN, C. & MICHELSSON, J.E. (1978). Glycosaminoglycan metabolism in experimental osteoarthrosis caused by immobilization. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, **49**, 329-334.
93. FLOMAN, Y., EYRE, D.R. & GLIMCHER, M.J. (1980). Induction of osteoarthrosis in the rabbit knee joint: biochemical studies on the articular surface. *Clinical Orthopaedics*, **147**, 278-286.
94. BRANDT, K.D., PALMOSKI, M.J. & PERRICONE, E. (1976). Aggregation of cartilage proteoglycans. II Evidence for the presence of a hyaluronate-binding region on proteoglycans from osteoarthritic cartilage. *Arthritis and Rheumatism*, **19**, 1308-1314.

95. MOSKOWITZ, R.W., HOWELL, D.S., GOLDBERG, V.M., MUNIZ, O. & PITA, J.C. (1979). Cartilage proteoglycans alterations in an experimentally induced model of rabbit osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, **22**, 155-163.
96. FLOMAN, Y., EYRE, D.R. & GLIMCHER, M.J. (1980). Induction of osteoarthrosis in the rabbit knee joint: biochemical studies on the articular surface. *Clinical Orthopaedics*, **147**, 278-286.
97. BILLINGHURST, R.C., DAHLBERG, L., IONESCU, M., REINER, A., BOURNE, R., RORABECK, C., MITCHELL, P., HAMBOR, J., DIEKMANN, O., TSCHESCHE, H., CHEN, J., VAN WART, H. & POOLE A.R. (1997). Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *The Journal of Clinical Investigation*, **99**, 1534-1545.
98. HOLLANDER, A.P., PIDOUX, I., REINER, A., RORABECK, C., BOURNE, R. & POOLE, A.R. (1995). Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originally around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration. *The Journal of Clinical Investigation*, **96**, 2859-2869.
99. DODGE, G.R. & POOLE, A.R. (1989). Immunohistochemical detection and immunochemical analysis of type II collagen degradation in human, normal, rheumatoid, and osteoarthritic articular cartilages and in explants of bovine articular cartilage cultured with interleukin 1. *The Journal of Clinical Investigation*, **83**, 647-661.
100. HOLLANDER, A.P., HEATHFIELD, T.F., WEBBER, C., IWATA, Y., BOURNE, R., RORABECK, C. & POOLE, A.R. (1994). Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay. *The Journal of Clinical Investigation*, **93**, 1722-1732.
101. DAHLBERG, L., BILLINGHURST, C., MANNER, P., IONESCU, M., REINER, A., TANZER, M. *et al.* (2000). Collagenase-mediated cleavage of type II collagen is selectively enhanced in osteoarthritic cartilage and can be arrested with a synthetic inhibitor which spares collagenase-1 (MMP-1). *Arthritis and Rheumatism*, **43**, 673-682.
102. POOLE, A.R., NELSON, F., DAHLBERG, L., TCHETINA, E., KOBAYASHI, M., YASUDA, T., LAVERTY, S., SQUIRES, G., KOJIMA, T., WU, W. & BILLINGHURST, R.C. (2003). Proteolysis of the collagen fibril in osteoarthritis. *Biochemical Society Symposium*, **70**, 115-123.
103. PELLETIER, J.P., MARTEL-PELLETIER, J., ALTMAN, R.D., GHANDUR-MNAYMNEH, L., HOWELL, D.S. & WOESSNER, J.F. JR. (1983). Collagenolytic activity and collagen matrix breakdown of the articular cartilage in the Pond-Nuki dog model of osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, **26**, 866-874.
104. PANULA, H.E., HYTTINEN, M.M., AROKOSKI, J.P.A., LÅNGSJÖ, T.K., PELTTARI, A., KIVIRANTA, I. & HELMINEN, H.J. (1998). Articular cartilage superficial zone collagen birefringence reduced and cartilage thickness increased before surface fibrillation in experimental osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **57**, 237-245.
105. GARNERO, P., PIPERNO, M., GINEYTS, E., CHRISTGAU, S., DELMAS, P.D. & VIGNON, E. (2001). Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **60**, 619-626.
106. GARNERO, P., AYRAL, X., ROUSSEAU, J-C., CHRISTGAU, S., SANDELL, L.J., DOUGADOS, M. & DELMAS, P.D. (2002). Uncoupling of type II collagen synthesis and degradation predicts progression of joint damage in patients with knee osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, **46**, 2613-2624.
107. GARNERO, P., CONROZIER, T., CHRISTGAU, S., MATHIEU, P., DELMAS, P.D. & VIGNON, E. (2003). Urinary type II collagen C-telopeptide levels are increased in patients with rapidly destructive hip osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **62**, 939-943.

108. MAROUDAS, A., MIZRAHI, J., KATZ, E.P., WACHTEL, E.J. & SOUDRY, M. (1986). Physicochemical Properties and Functional Behavior of Normal and Osteoarthritic Human Cartilage. En: *Articular Cartilage Biochemistry* (Kuettner, K., Scheleyerbach, R. & Hascall, V.C., eds.), Raven Press, New York, pp. 311-329.
109. HOLLANDER, A.P., HEATHFIELD, T.F., LIU, J.J., PIDOUX, I., ROUGHLEY, P.J., MORT, J.S. & POOLE, A.R. (1996). Enhanced denaturation of the alpha (II) chains of type-II collagen in normal adult human intervertebral discs compared with femoral articular cartilage. *Journal of Orthopaedic Research*, **14**, 61-66.
110. WU, W., BILLINGHURST, R.C., PIDOUX, I., ANTONIOU, J., ZUKOR, D., TANZER, M. *et al.* (2002). Sites of collagenase cleavage and denaturation of type II collagen in aging and osteoarthritic articular cartilage and their relationship to the distribution of matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 13. *Arthritis and Rheumatism*, **46**, 2087-2094.
111. PRATTA, M.A., YAO, W., DECICCO, C., TORTORELLA, M.D., LIU, R.Q., COPELAND, R.A., MAGOLDA, R., NEWTONS, R.C., TRZASKOS, J.M. & ARNER, E.C. (2003). Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 45539-45545.
112. STOOP, R., BUMA, P., VAN DER KRAAN, P.M., HOLLANDER, A.P., BILLINGHURST, R.C., MEIJERS, T.H.M. *et al.* (2001). Type II collagen degradation in articular cartilage fibrillation after anterior cruciate ligament transaction in rats. *Osteoarthritis and Cartilage*, **9**, 209-215.
113. EHRlich, M.G., HOULE, P.A., VIGLIANI, G. & MANKIN, H.J. (1978). Correlation between articular cartilage collagenase activity and osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, **21**, 761-766.
114. EYRE, D.R., McDEVITT, C.A., BILLINGHAM, M.E.J. & MUIR, H. (1980). Biosynthesis of collagen and other matrix proteins by articular cartilage in experimental osteoarthrosis. *The Biochemical Journal*, **188**, 823-837.
115. SANDY, J.D., ADAMS, M.E., BILLINGHAM, M.E., PLAAS, A. & MUIR, H. (1984). In vivo and in vitro stimulation of chondrocyte biosynthetic activity in early experimental osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, **27**, 388-397.
116. HERMANSSON, M., SAWAJI, Y., BOLTON, M., ALEXANDER, S., WALLACE, A., BEGUM, S., WAIT, R. & SAKLATVALA, J. (2004). Proteomic analysis of articular cartilage shows increased type II collagen synthesis in osteoarthritis and expression of inhibin α A (activin A), a regulatory molecule for chondrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 43514-43521.
117. JENNINGS, L., WU, L., KING, K.B., HAMMERLE, H., Cs-SZABO, G. & MOLLENHAUER, J. (2001). The effects of collagen fragments on the extracellular matrix metabolism of bovine and human chondrocytes. *Connective Tissue Research*, **42**, 71-86.
118. MOSKOWITZ, R.W., HOOPER M.M. & HOLDERBAUM, D. (2005). Total quantitative osteoarthritis load(TQOL) assessment tool: a proposed methodology for biomarker correlations. *Osteoarthritis and Cartilage*, **13(supl. A)**, S14-S15.
119. GAY, S., MULLER, P.K., LEMMEN, C., REMBERGER, K., MATZEN, K. & KÜHN, K. (1976). Immunohistological study on collagen in cartilage-bone metamorphosis and degenerative osteoarthritis. *Klinische Wochenschrift*, **54**, 969-976.
120. GOLDRING, M.B., BIRKHEAD, J., SANDELL, L.J., KIMURA, T. & KRANE, S.M. (1988). Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, **82**, 2026-2037.

121. ALVARO-GRACIA, J.M., ZVAIFLER, N.J. & FIRESTEIN, G.S. (1990). Cytokines in chronic inflammatory arthritis. V. Mutual antagonism between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on HLA-DR expression, proliferation, collagenase production, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, **86**, 1790-1798.
122. AIGNER, T., BERTLING, W., STÖB, H., WESELOH, G. & VON DER MARK, K. (1993). Independent expression of fibril-forming collagens I, II, and III in chondrocytes in human osteoarthritic cartilage. *The Journal of Clinical Investigation*, **91**, 829-837.
123. AIGNER, T., ZHU, Y., CHANKSI, H., MATSEN, F.A., MALONEY, W.J. & SANDELL, L.J. (1999). Reexpression of procollagen type IIA by adult articular chondrocytes in osteoarthritis cartilage. *Arthritis and Rheumatism*, **42**, 1443-1450.
124. SANDELL, L.J., MORRIS, N., ROBBINS, J.R. & GOLDRING, M.B. (1991). Alternatively spliced type II mRNAs define distinct populations of cells during vertebral development: differential expression of the amino-propeptide. *The Journal of Cell Biology*, **266**, 13446-23452.
125. AIMES, R.T. & QUIGLEY, J.P. (1995). Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4- length fragments. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**, 5872-5876.
126. MANSELL, J.P. & BAILEY, A.J. (1998). Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis. *The Journal of Clinical Investigation*, **101**, 1596-1603.
127. RIZKALLA, G., REINER, A., BOGOCH, E. & POOLE, A.R. (1992). Studies of the articular cartilage proteoglycan aggrecan in health and osteoarthritis. *The Journal of Clinical Investigation*, **90**, 2268-2277.
128. BRANDT, K.D. (2003). Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on chondrocyte metabolism *in vitro* and *in vivo*. *The American Journal of Medicine*, **83**, 29-34.
129. CAMERLAIN, M., MCCARTY, D.J., SILCOX, D.C. & JUNG, A. (1975). Inorganic pyrophosphate pool size and turnover rate in arthritic joints. *The Journal of Clinical Investigation*, **55**, 1373-1381.
130. HOWELL, D.S., MUNIZ, O., PITA, J.C. & ENIS, J.E. (1975). Extrusion of pyrophosphate into extracellular media by osteoarthritic cartilage incubates. *The Journal of Clinical Investigation*, **56**, 1473-1480.
131. BURTON-WURSTER, N. & LUST, G. (1985). Deposition of fibronectin in articular cartilage of canine osteoarthritic joints. *American Journal of Veterinary Research*, **46**, 2542-2545.
132. BURTON-WURSTER, N., BUTLER, M., HARTE, S., COLOMBO, C., QUINTAVALLA, J., SWARTZENDURBER, D., ARSENI, C. & LUST, G. (1986). Presence of fibronectin in articular cartilage in two animal models of osteoarthritis. *The Journal of Rheumatology*, **13**, 175-182.
133. BROWN, R.A. & JONES, K.L. (1990). The synthesis and accumulation of fibronectin by human articular cartilage. *The Journal of Rheumatology*, **17**, 65-75.
134. MILLER, D.R., MANKIN, H.J., SHOJI, H. & D'AMBROSIA, R.D. (1984). Identification of fibronectin in preparations of osteoarthritic human cartilage. *Connective Tissue Research*, **12**, 267-275.
135. REES, J.A., ALI, S.Y. & BROWN, R.A. (1987). Ultrastructural localisation of fibronectin in human osteoarthritic articular cartilage. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **46**, 816-822.

136. EHRlich, M.G., MANKIN, H.J., JONES, H., GROSSMAN, A., CRISPEN, C. & ANCONA, D. (1975). Biochemical confirmation of an experimental osteoarthritis model. *The Journal of Bone and Joint Surgery American Volume*, **57**, 392-396.
137. MITROVIC, D., GRUSON, M., DEMIGNON, J., MERCIER, P., APRILE, F. & DE SEZE, S. (1981). Metabolism of human femoral head cartilage in osteoarthrosis and subcapital fracture. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **40**, 18-26.
138. MITCHELL, P.G., MAGNA, H.A., REEVES, L.M., LOPRESTI-MORROW, L.L. YOCUM, S.A., ROSNER, P.J., GEOGHEGAN, K.F. & HAMBOR, J.E. (1996). Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *The Journal of Clinical Investigation*, **97**, 761-768.
139. MURPHY, G., KNAUPER, V., ATKINSON, S., BUTLER, G., ENGLISH, W., HUTTON, M., STRACKE, J. & CLARK, I. (2002). Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Research*, **4(Suppl 3)**, S39-S49.
140. DEAN, D.D., MARTEL-PELLETIER, J., PELLETIER, J.P., HOWELL, D.S. & WOESSNER, J.F. (1989). Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *The Journal of Clinical Investigation*, **84**, 678-685.
141. NGUYEN, Q., MORT, J.S. & ROUGHLEY, P.J. (1992). Preferential mRNA expression of prostromelysin relative to procollagenase and in situ localization in human articular cartilage. *The Journal of Clinical Investigation*, **89**, 1189-1197.
142. LOHMANDER, L.S., HOERRNER, L.A. & LARK, M.W. (1993). Metalloproteinases, tissue inhibitor, and proteoglycan fragments in knee synovial fluid in human osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, **36**, 181-189.
143. MILLER, E.J., HARRIS, E.D. JR., CHUNG, E., FINCH, J.E. JR., MCCROSKERY, P.A. & BUTLER, W.T. (1976). Cleavage of type II and III collagens with mammalian collagenase: site of cleavage and primary structure at the NH₂-terminal portion of the smaller fragment released from both collagens. *Biochemistry*, **15**, 787-792.
144. SHLOPOV, B.V., LIE, W.R., MAINARDI, C.L., COLE, A.A., CHUBINSKAYA, S. & HASTY, K.A. (1997). Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. *Arthritis and Rheumatism*, **40**, 2065-2074.
145. BORDEN, P., SOLYMAR, D., SWCHARCZUK, A., LINDMAN, B., CANNON, P. & HELLER, R.A. (1996). Cytokine control of interstitial collagenase and collagenase-3 gene expression in human chondrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, 23577-23581.
146. WALAKOVITS, L.A., MOORE, V.L., BHARDWAJ, N., GALLICK, G.S. & LARK, M.W. (1992). Detection of stromelysin and collagenase in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and posttraumatic knee injury. *Arthritis and Rheumatism*, **35**, 35-42.
147. CLARK, I.M., POWELL, L.K., RAMSEY, S., HAZLEMAN, B.I. & CAWSTON, T.E. (1993). The measurement of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP), and collagenase-TIMP complex in synovial fluids from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, **36**, 372-379.
148. MAEDA, S., SAWAI, T., UZUKI, M., TAKAHASHI, Y., OMOTO, H., SEKI, M. & SAKURAI, M. (1995). Determination of interstitial collagenase (MMP-1) in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **54**, 970-975.

149. REBOUL, P., PELLETIER, J.P., TARDIF, G., CLOUTIER, J.M. & MARTEL-PELLETIER, J. (1996). The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synovio-cytes: a role in osteoarthritis. *The Journal of Clinical Investigation*, **97**, 2011-2019.
150. MOHTAI, M., SMITH, R.L., SCHURMAN, D.J., TSUJI, Y., TORTI, F.M., HUTCHINSON, N.I., STETLER-STEVENSON, W.G. & GOLDBERG, G.I. (1993). Expression of 92-kD type IV collagenase/gelatinase (gelatinase B) in osteoarthritic cartilage and its induction in normal human articular cartilage by interleukin 1. *The Journal of Clinical Investigation*, **92**, 179-185.
151. GUNJA-SMITH, Z., NAGASE, H. & WOESSNER, J.F. JR. (1989). Purification of the neutral proteoglycan-degrading metalloproteinase from human articular cartilage tissue and its identification as stromelysin matrix metalloproteinase-3. *The Biochemical Journal*, **258**, 115-119.
152. NGUYEN, Q., MURPHY, G., ROUGHLEY, P.J. & MORT, J.S. (1989). Degradation of proteoglycans aggregate by a cartilage metalloproteinase. Evidence for the involvement of stromelysin in the generation of link protein heterogeneity in situ. *The Biochemical Journal*, **259**, 61-67.
153. FLANNERY, C.R., LARK, M.W. & SANDY, J.D. (1992). Identification of a stromelysin cleavage site within interglobular domain of human aggrecan. *The Journal of Biological Chemistry*, **267**, 1008-1014.
154. WU, J.J., LARK, M.W., CHUN, L.E. & EYRE, D.R. (1991). Sites of stromelysin cleavage in collagen types II, IX, X, and XI of cartilage. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**, 5625-5628.
155. MURPHY, G., COCKETT, M.I., STEPHENS, P.E., SMITH, B.J. & DOCHERTY, A.J. (1987). Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. *The Biochemical Journal*, **248**, 265-268.
156. HE, C.S., WILHELM, S.M., PENTLAND, A.P., MARMER, B.L., GRANT, G.A., EISEN, A.Z. & GOLDBERG, G.I. (1989). Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **86**, 2632-2636.
157. JONES, G.C. & RILEY, G.P. (2005). ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, **7**, 160-169.
158. LARK, M.W., BYNER, E.U., FLANAGAN, J., HARPER, C.F., HOERRNER, L.A., HUTCHINSON, N.I. *et al.* (1997). Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic and rheumatoid joints. *The Journal of Clinical Investigation*, **100**, 93-106.
159. LARK, M.W., GORDY, J.T., WEIDNER, J.R., AYALA, J., KIMURA, J.H., WILLIAMS, H.R., MUMFORD, R.A., FLANNERY, C.R., CARLSON, S.S., IWATA, M. & SANDY, J.D. (1995). Cell-mediated catabolism of aggrecan: evidence that cleavage at the "aggrecanase" site (Glu³⁷³-Ala³⁷⁴) is a primary event in proteolysis of the interglobular domain. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**, 2550-2556.
160. TORTORELLA, M., PRATTA, M., LIU R.Q., ABBASZADE, I., ROSS, H., BURN, T. & ARNER, E. (2000). The thrombospondin motif of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 25791-25797.
161. DEAN, D.D. & WOESSNER, J.F. JR. (1984). Extracts of human articular cartilage contain an inhibitor of tissue metalloproteinases. *The Biochemical Journal*, **218**, 277-280.
162. DEAN, D.D., AZZO, W., MARTEL-PELLETIER, J., PELLETIER, J.P. & WOESSNER, J.F. JR. (1987). Levels of metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in human osteoarthritic cartilage. *The Journal of Rheumatology*, **14**, 43-44.

163. GOMEZ, D.E., ALONSO, D.F., YOSHII, H. & THORGEIRSSON, U.P. (1997). Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *European Journal of Cell Biology*, **74**, 111-122.
164. YAMADA, H., STEPHENS, R.W., NAKAGAWA, T. & MCNICOL, D. (1988). Human articular cartilage contains an inhibitor of plasminogen activator. *The Journal of Rheumatology*, **15**, 1138-1143.
165. ATTUR, M.G., DAVE, M., CIPOLLETTA, C., KANG, P., GOLDRING, M.B., PATEL, I.R., ABRAMSON, S.B. & AMIN A.R. (2000). Reversal of autocrine and paracrine effects of interleukin 1 (IL-1) in human arthritis by type II IL-1 decoy receptor. Potential for pharmacological intervention. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 40307-40315.
166. ARNER, E.C., DECICCO, C.P., CHERNEY, R. & TORTORELLA, M.D. (1997). Cleavage of native cartilage aggrecan by neutrophil collagenase (MMP-8) is distinct from endogenous cleavage by aggrecanase. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 9294-9299.
167. FOSANG, A.J., LAST, K. & MACIEWICZ, R.A. (1996). Aggrecan is degraded by matrix metalloproteinases in human arthritis. Evidence that matrix metalloproteinases and aggrecanase activities can be independent. *The Journal of Clinical Investigation*, **98**, 2292-2299.
168. EHRLICH, M.G., ARMSTRONG, A.L., TREADWELL, B.V. & MANKIN, H.J. (1987). The role of proteases in the pathogenesis of osteoarthritis. *The Journal of Rheumatology*, **14**, 30-32.
169. AZZO, W. & WOESSNER, J.F. JR. (1986). Purification and characterization of an acid metalloproteinase from human articular cartilage. *The Journal of Biological Chemistry*, **261**, 5434-5441.
170. PETTIPHER, E.R., HIGGS, G.A. & HENDERSON, B. (1986). Interleukin 1 induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycans degradation in the synovial joint. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **83**, 8749-8753.
171. MIN, B.H., KIM, H.J., LIM, H., PARK, C.-S. & PARK, S.R. (2001). Effects of ageing and arthritic disease on nitric oxide production by human articular chondrocytes. *Experimental & Molecular Medicine*, **33**, 299-302.
172. YUDOH, K., VAN TRIEU, N., NAKAMURA, H., HONGO-MASUKO, K., KATO, T. & NISHIOKA, K. (2005). Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Research & Therapy*, **7**, R380-R391.
173. CAO, M., WESTERHAUSEN-LARSON, A., NIYIBIZI, C., KAYALKOVICH, K., GEORGESCU, H.I., RIZZO, C.F., HEBDA, P.A., STEFANOVI-RACIC, M. & EVANS, C.H. (1997). Nitric oxide inhibits the synthesis of type-II collagen without altering CollIA1 mRNA abundances: prolyl hydroxylase as a possible target. *The Biochemical Journal*, **324**, 305-310.
174. OH, M., FUKUDA, K., ASADA, S., YASUDA, Y. & TANAKA, S. (1998). Concurrent generation of nitric oxide and superoxide inhibits proteoglycan synthesis in bovine articular chondrocytes: involvement of peroxynitrite. *The Journal of Rheumatology*, **25**, 2169-2174.
175. TAKAHASHI, M., NAITO, K., ABE, M., SAWADA, T. & NAGANO, A. (2004). Relationship between radiographic grading of osteoarthritis and the biochemical markers for arthritis in knee osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, **6**, R208-R212.
176. SUGIYAMA, S., ITOKAZU, M., SUZUKI, Y. & SHIMIZU, K. (2003). Procollagen II C propeptide levels in the synovial fluid as a predictor of radiographic progression in early knee osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **62**, 27-32.

177. LOHMANDER, L.S., YOSHIHARA, Y., ROOS, H., KOBAYASHI, T., YAMANDA, H. & SHINMEI, M. (1996). Procollagen II C-propeptide in joint fluid: changes in concentration with age, time after knee injury, and osteoarthritis. *The Journal of Rheumatology*, **23**, 1754-1769.
178. ROBINS, S.P., STEWART, P., ASTBURY, C. & BIRD, H.A. (1986). Measurement of the cross linking compound, pyridinoline, in urine as an index of collagen degeneration in joint disease. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **45**, 696-973.
179. VIGNON, E., GARNERO, P., DELMAS, P., AVOUAC, B., BETTICA, P., BOERS, M., EHRLICH, E., MACKILLOP, N., ROVATI, L., SERNI, U., SPECTOR, T. & REGINSTER, J.Y. (2001). Recommendations for the registration of drugs used in the treatment of osteoarthritis: an update on biochemical markers. *Osteoarthritis and Cartilage*, **9**, 289-293.
180. POOLE, A.R., IONESCU, M., SWAN, A. & DIEPPE, P.A. (1994). Changes in cartilage metabolism in arthritis are reflected by altered serum and synovial fluid levels of the cartilage proteoglycan aggrecan. Implications for pathogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, **94**, 25-33.
181. LOHMANDER, L.S., DAHLBERG, L., RYD, L. & HEINEGARD, D. (1989). Increased levels of proteoglycan fragments in knee joint injury. *Arthritis and Rheumatism*, **32**, 1434-1442.
182. LOHMANDER, L.S., IONESCU, M., JUGESSUR, H. & POOLE, A.R. (1999). Changes in joint cartilage aggrecan alter knee injury and in osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, **42**, 534-544.
183. THONAR, E.J., LENZ, M.E., KINTWORTH, G.K., CATERSON, B., PATCHMAN, L.M. & GLICKMAN, P. (1985). Quantification of keratan sulfate in blood as a marker of cartilage metabolism. *Arthritis and Rheumatism*, **28**, 1367-1376.
184. SWEET, M.B.E., COELHO, A., SCHNITZLER, C.M., SCHNITZER, T.J., LENZ, M.E., JAKIM, I., KUETTNER, K.E. & THONAR, E.J. (1988). Serum keratan sulfate levels in osteoarthritic patients. *Arthritis and Rheumatism*, **31**, 648-652.
185. BELCHER, C., YAQUB, R., FAWTHROP, F., BAYLISS, M. & DOHERTY, M. (1997). Synovial fluid chondroitin and keratan sulphate epitopes, glycosaminoglycans, and hyaluronan in arthritic and normal knees. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **56**, 299-307.
186. SPECTOR, T.D., HART, D.J., NANDRA, D., DOYLE, D.V., MACKILLOP, N., GALLIMORE, J.R. & PEPYS, M.B. (1997). Low-level increases in serum C-reactive protein are present in early osteoarthritis of the knee and predict progressive disease. *Arthritis and Rheumatism*, **40**, 723-727.
187. SHARIF, M., GEORGE, E., SHEPSTONE, L., KNUDSON, W., THONAR, E.J., CUSHNAGHAN, J. & DIEPPE, P. (1995). Serum hyaluronic acid level as a predictor of disease progression in osteoarthritic of the knee. *Arthritis and Rheumatism*, **38**, 760-767.
188. LAURENT, T.C., LAURENT, U.B. & FRASER, J.R. (1996). Serum hyaluronan as a disease marker. *Annals of Medicine*, **28**, 241-253.
189. LOHMANDER, L.S. (2000). What can we do about osteoarthritis? *Arthritis and Rheumatism*, **2**, 95-100.
190. BRANDT, K.D. (1987). Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on chondrocyte metabolism in vitro and in vivo. *The American Journal of Medicine*, **83**, 29-34.
191. PALMOSKI, M.J. & BRANDT, K.D. (1980). Effects of some nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proteoglycans metabolism and organization in canine articular cartilage. *Arthritis and Rheumatism*, **23**, 1010-1020.
192. PELLETIER, J.-M. (2003). Rationale for the use of structure-modifying drugs and agents in the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, **00**, 1-6.

193. DE LOS REYES, G.C., KODA, R.T. & LIEN, E.J. (2000). Glucosamine and chondroitin sulfates in the treatment of osteoarthritis: a survey. *Progress in Drug Research*, **55**, 81-103.
194. MELÉNDEZ-HEVIA, E. (1999). Los problemas de la Ciencia. *Revista de la Academia Canaria de Ciencias*, **10**, 127-191.
195. DOBZHANSKI, T. (1973). Nothing in Biology Makes Sense Except in the Light of Evolution. *American Biology Teacher*, **35**, 125-129.
196. DARWIN, C. (1859). *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*, John Murray, London. Traducción: El origen de las especies. Alianza Editorial, Madrid, 2003.
197. DAWKINS, R. (1986). *The Blind Watchmaker: Why the Evidence of Evolution Reveals a Universe Without Design*. Traducción: El relojero ciego. Labor, Barcelona, 1989.
198. RIDLEY, M. (1985). *The problems of evolution*, Oxford University Press, Oxford. Traducción: La evolución y sus problemas. Pirámide, Madrid, 1987.
199. MELÉNDEZ-HEVIA, E. (1993). *La evolución del metabolismo: hacia la simplicidad*, Eudema, Madrid.
200. JACOB, F. (1977). Evolution and tinkering. *Science*, **196**, 1161-1166.
201. MELÉNDEZ-HEVIA, E., WADDELL, T.G. & CASCANTE, M. (1996). The puzzle of the Krebs citric acid cycle: assembling the pieces of chemically feasible reactions, and opportunism in the design of metabolic pathways during evolution. *Journal of Molecular Evolution*, **43**, 296-303.
202. MELÉNDEZ-HEVIA, E. (2001). *La selección natural y la termodinámica en la evolución biológica: del origen de la vida al cáncer*, Servicio de Publicaciones de la Universidad de La Laguna, Tenerife.
203. BONDY, P.K. (ed.). (1969). *Duncan's Diseases of Metabolism. Genetics and Metabolism*, 6th edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia.
204. FERNANDES, J., SAUDUBRAY, J.-M. & VAN DER BERGHE, G. (2000). *Inborn Metabolic Diseases. Diagnosis and Treatment*, 3rd edition, Springer-Verlag, Berlin.
205. MICHAL, G. (ed.). (1999). *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*, 3rd edition, John Wiley & Sons, Inc/Spectrum Akademischer Verlag, New York.
206. METZLER, D.E. (2001). *Biochemistry. The chemical reactions of living cells*, 2nd edition. Hartcourt-Academic Press, San Diego, California.
207. Expaty database: <http://www.expaty.ch/cgi-bin/search-biochem-index>
208. KEGG PATHWAY Database: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>
209. <http://ihome.cuhk.edu.hk/~b400559/bioinformatics.html>
210. ELLIOT, R. Y ONG, T.J. (2002). Nutritional genomics. *BMJ*, **324**, 1438-1442.
211. BOITEUX, A. & HESS, B. (1981). Design of glycolysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, **293**, 5-22.
212. FELL, D. (1997). *Understanding the control of metabolism*. Portland Press, London.
213. CILLI, F., KHAN, M., FU, F. & WANG, J.H-C. (2004). Prostaglandin E₂ Affects Proliferation and Collagen Synthesis by Human Patellar Tendon Fibroblasts. *Clinical Journal of Sport Medicine*, **14**, 232-236.

214. ZAUCKE, F., DINSER, R. MAURER, P. & PAULSSON, M. (2001). Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and collagen IX are sensitive markers for the differentiation state or articular primary chondrocytes. *The Biochemical Journal*, **358**, 14-24.
215. HARDINGHAM, T., TEW, S. & MURDOCH, A. (2002). Tissue engineering: chondrocytes and cartilage. *Arthritis Research*, **4(suppl 3)**, S63-S68.
216. WHITE, A., HANDLER, P., SMITH, E.L., HILL, R.L. & LEHMAN, I.R. (1983). *Principios de Bioquímica*, 6ª edición, McGraw-Hill, Madrid.
217. OESSER, S. & SEIFERT, J. (2003). Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen. *Cell and Tissue Research*, **311**, 393-399.
218. ROSE, W.C. (1957). The amino acid requirements of adult man. *Nutrition Abstracts and Reviews Series A Human and Experimental*, **27**, 631-647.
219. VISEK, W.J. (1984). An update of concepts of essential amino acids. *Annual Review of Nutrition*, **4**, 137-155.
220. URICH, K. (1990). *Comparative Animal Biochemistry*, Springer-Verlag, Berlin.
221. YOUNG, V.R. & THARAKAN, J.F. (2004). Nutricional essentiality of amino acids and amino acids requirements in healthy adults. En: *Metabolic and therapeutic aspects of amino acids in clinical nutrition* (Cyanober, L.A., ed.), CRC Press, Boca Raton, Flor, USA, pp. 439-470.
222. CHEUNG, C.W., COHEN, N.S. & RAIJMAN, L. (1989). Channelling of urea cycle intermediates in situ in permeabilized hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, **264**, 4038-4044.
223. OVÁDI, J. (1995). *Cell architecture and metabolic channelling*, Springer-Verlag, New York.
224. OVÁDI, J. (1998). Old pathway—new concept: control of glycolysis by metabolite-modulated dynamic enzyme associations. *Trends in Biochemical Sciences*, **13**, 486-490.
225. AGIUS, L. & SHERRATT, H.S.A. (1997). *Channelling in intermediary metabolism*, Portland Press, London.
226. REYNOLDS, J.V., DALY, J.M., SHOU, J., SIGAL, R., ZIEGEL, M.M. & NAJI, A. (1990). Immunologic effects of arginine supplementation in tumor-bearing and non-tumor-bearing hosts. *Annals of Surgery*, **211**, 202-210.
227. LEHNINGER, A.L. (1982). *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular*, 2ª edición, Omega, Barcelona.
228. BERG, J.M., TYMOCZKO, J.L. & STRYER, L. (2003). *Bioquímica*, 5ª edición, Ed. Reverté, Barcelona.
229. VOET, D. & VOET, J.G. (1992). *Bioquímica*, 2ª edición, Omega, Barcelona.
230. STRAJLER, A.N. (1999). *Science and Earth History: The Evolution/Creation Controversy*, Protheus Books, Amherst, New York.
231. ZHAO, D., HUTTON, H.M., MEYER, T.E., WALKER, F.A., MACKENZIE, N.E. & CUSANOVICH, M.A. (2000). Structure and stability effects of the mutation of glycine 34 to serine in *Rhodobacter capsulatus* cytochrome c(2). *Biochemistry*, **39**, 4053-4061.
232. WILSON, T.M. & CAMERON, V. (1994). Replacement of a conserved glycine residue in subunit II of cytochrome c oxidase interferes with protein function. *Current Genetics*, **25**, 233-238.
233. PAGE, R.D.M. & HOLMES, E.C. (1998). *Molecular Evolution. A Phylogenetic Approach*, Blackwell Science, Ltd., Oxford, U.K.

234. AVISE, J.C. (2004). *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*, Sinauer Assoc. Sunderland, Mass., U.S.A.
235. LUCATELLI, M., CAVARRA, E., DE SANTI, M.M., TETLEY, T.D., MARTORANA, P.A. & LUNGARELLA, G. (2003). Collagen phagocytosis by lung alveolar macrophages in animal models of emphysema. *European Respiratory Journal*, **2**, 120-145.
236. VAAGE, J. & LINDBLAD, W.J. (1990). Production of collagen type I by mouse peritoneal macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, **48**, 274-280.
237. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. (1973). *Energy and protein requirements*. FAO and WHO, Roma.
238. CAIRNS-SMITH, A.G. (1992). *Genetic Takeover – and the mineral origins of life*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
239. OHNO, S. (1996). The notion of the Cambrian pananimalia genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **93**, 8475-8478.
240. CONWAY-MORRIS, S. (2003). The Cambrian 'explosion' of metazoans and molecular biology: would Darwin be satisfied? *International Journal of Developmental Biology*, **47**, 505-515.
241. EXPOSITO, J.Y., LE GUELLEC, D. LU, Q. & GARRONE, R. (1991). Short chain collagens in sponges are encoded by a family of closely related genes. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**, 21923-21928.
242. ADAMS, E. (1978). Invertebrate collagens. *Science*, **202**, 591-598.
243. RYCHEL, A.L., SMITH, S.E., SHIMAMOTO, H.T. & SWALLA, B.J. (2006). Evolution and development of the chordates: collagen and pharyngeal cartilage. *Molecular Biology and Evolution*, **23**, 541-549.
244. ROTHSCHILD, B.M. (1987). Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis as reflected in the paleontologic record: dinosaurs and early mammals. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, **17**, 119-125.
245. ROTHSCHILD, N.M. & MARTIN, L.D. (1993). *Paleopathology – Disease in the fossil record*. CRC Press, Boca Raton, Flor.
246. DULBECCO, R. & FREEMAN, G. (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology*, **8**, 396-397.
247. HAM, R.G. (1965). Clonal Growth of Mammalian Cells in a Chemically Defined, Synthetic Medium. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **53**, 288-293.
248. IOANNIDIS, N., KURZ, B., HANSEN, U. & SCHÜNKE, M. (1999). Influence of fulvic acid on the collagen secretion of bovine chondrocytes *in vitro*. *Cell and Tissue Research*, **297**, 141-147.
249. KUETTNER, K.E., PAULI, B.U., GALL, G., MEMOLI, V.A. & SCHENK, R.K. (1982). Synthesis of Cartilage Matrix by Mammalian Chondrocytes *In Vitro*. I. Isolation, Culture Characteristics, and Morphology. *The Journal of Cell Biology*, **93**, 743-750.
250. KUETTNER, K.E., MEMOLI, V.A., PAULI, B.U., WROBEL, N.C. THONAR, E.J.-M.A. & DANIEL, J.C. (1982). Synthesis of Cartilage Matrix by Mammalian Chondrocytes *In Vitro*. II. Maintenance of Collagen and Proteoglycan Phenotype. *The Journal of Cell Biology*, **93**, 751-757.
251. DANIEL, J.C., PAULI, B.U. & KUETTNER, K.E. (1984). Synthesis of Cartilage Matrix by Mammalian Chondrocytes *In Vitro*. III. Effects of Ascorbate. *The Journal of Cell Biology*, **99**, 1960-1969.
252. FRESHNEY, R.I. (2000). *Culture of Animal Cells: a manual of basic technique*, 4th edition, Wiley-Liss Inc., New York.

253. KOLETTAS, E., BULUWELA, L., BAYLISS, M. & MUIR, H.I. (1995). Expression of cartilage-specific molecules is retained on long-term culture of human articular chondrocytes. *Journal of Cell Science*, **108**, 1991-1999.
254. GOLDRING, M.B., BIRKHEAD, J., SANDELL, L.J., KIMURA, T. & KRANE, S.M. (1986). Immune interferon suppresses levels of procollagen mRNA and type II collagen synthesis in cultured human articular and costal chondrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, **261**, 9049-9055.
255. VON DER MARK, K., GAUSS, V., VON DER MARK, H. & MÜLLER, P. (1977). Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature*, **267**, 531-532.
256. MÜLLER, P.K., LEMMEN, C., GAY, S., GAUSS, C. & KÜHN, K. (1977). Immunochemical and Biochemical study of collagen synthesis by chondrocytes in culture. *Experimental Cell Research*, **108**, 47-55.
257. BENYA, P.D., PADILLA, S.R. & NIMNI, M.E. (1987). Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell*, **15**, 1313-1321.
258. ELIMA, K. & VUORIO, E. (1989). Expression of mRNAs for collagen and other matrix components in dedifferentiating and redifferentiating human chondrocytes in culture. *FEBS Letters*, **258**, 195-198.
259. YUAN, C.M., ALA-KOKKO, L., LE GUELLEC, D., FRANC, S., FERTALA, A., KHILLAN, J.S., SOKOLOV, B.P. & PROCKOP, D.J. (2000). Lack of a phenotype in transgenic mice aberrantly expressing COL2A1 mRNA because of highly selective post-transcriptional down-regulation. *The Biochemical Journal*, **345**, 377-384.
260. HUANG, M., SHARMA, S., ZHU, L.X., KEANE, M.P., LUO, J., ZHANG, L., BURDICK, M.D., LIN, Y.Q., DOHADWALA, M., GARDNER, B., BATRA, R.K., STRIETER, R.M. & DUBINETT, S.M. (2002). IL-7 inhibits fibroblast TGF- β production and signalling in pulmonary fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, **109**, 931-937.
261. VERGNES, L., PHAN, J., STRAUSS, M., TAFURI, S. & REUE, K. (2003). Cholesterol and Cholate Components of an Atherogenic Diet Induce Distinct Stages of Hepatic Inflammatory Gene Expression. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 42774-42784.
262. MELÉNDEZ-HEVIA, E. (2006). *Glycine as a diet supplement for the treatment of a wide range of health problems that result from underlying metabolic disorders*. United States Patent and Trademark Office. Serial No. 199327, Series Code: 11, Filed: August 8, 2005. Application No. 20060052454; Kina Code A1. Published in USPTO on March 9, 2006.
263. MELÉNDEZ-HEVIA, E., DE PAZ-LUGO, P. & MELÉNDEZ-MORALES, D. (2006). *L-Lysine, and mixtures of L-Lysine and glycine as diet supplement for the treatment of special health problems that result from underlying metabolic disorders*. Manuscrito en preparación.
264. VETTER, G. (1965). Glucosamine in the therapy of degenerative rheumatism. *Deutsch Medical Journal*, **16**, 446-449.
265. QUI, G.X., WENG, X.S., ZHANG, K., ZHOU, Y.X., LOU, S.Q., WANG, Y.P., LI, W., ZHANG, H. & LIU, Y. (2005). A multi-central, randomized, controlled trial of glucosamine hydrochloride/sulfate in the treatment of knee osteoarthritis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, **85**, 3067-3070.
266. SVETLOVA, M.S. & IGNAT'EV, V.K. (2005). Experience with glucosamine hydrochloride in the treatment of patients with osteoarthrosis. *Terapevticheskii Arkhiv*, **77**, 64-67.

267. LEFFLER, C.T., PHILIPPI, A.F., LEFFLER, S.G., MOSURE, J.C. & KIM, P.D. (1999). Glucosamine, chondroitin, and manganese ascorbate for degenerative joint disease of the knee or low back: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Military Medicine*, **164**, 85-91.
268. TAPADINHAS, M.J., RIVERA, I.C. & BIGNARNINI, A.A. (1982). Oral glucosamine sulfate in the management of arthrosis: report on a multi-centre open investigation in Portugal. *Parmatherapeutica*, **3**, 157-1168.
269. REGINSTER, J.Y., DEROISY, R., ROVATI, L.C., LEE, R.L., LEJEUNE, E., BRUYERE, O., GIACOVELLI, G., HENROTIN, Y., DACRE, J.E. & GOSSETT, C. (2001). Long-term effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression: a randomised, placebo-controlled clinical trial. *Lancet*, **357**, 251-256.
270. PUJALTE, J.M, LLAVORE, E. P. & YLESCUPIDEZ, F.R. (1980). Double-blind clinical evaluation of oral glucosamine sulphate in the basic treatment of osteoarthritis. *Current Medical Research and Opinion*, **7**, 110-114.
271. LOPES VAZ, A. (1982). Double-blind clinical evaluation of the relative efficacy of ibuprofen and glucosamine sulphate in the management of osteoarthritis of the knee in out-patients. *Current Medical Research and Opinion*, **8**, 145-149.
272. D'AMBROSIO, E. CASA, B., BOMPANI, R., SCALI, G & SCALI, M. (1981). Glucosamine sulphate: a controlled clinical investigation in arthrosis. *Pharmatherapeutica*, **2**, 504-508.
273. VAJARADUL, Y. (1981). Double-blind clinical evaluation of intra-articular glucosamine in outpatients with gonarthrosis. *Clinical Therapy*, **3**, 336-343.
274. MCALINDON, T.E., LAVALLEY, M.P., GULIN, J.P. & FELSON, D.T. (2000). Glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis: a systemic quality assessment and meta-analysis. *Journal of the American Association*, **283**, 1469-1475.
275. JAMES, C.B. & UHL, T.L. (2001). A Review of Articular Cartilage Pathology and the Use of Glucosamine Sulfate. *Journal of Athletic Training*, **36**, 413-419.
276. REGINSTER, J.Y., BRUYERE, O., FRAIKIN, G. & HENROTIN, Y. (2005). Current concepts in the therapeutic management of osteoarthritis with glucosamine. *Bulletin (Hospital for Joint Diseases (New York))*, **63**, 31-36.
277. KELLY, G.S. (1998). The role of glucosamine sulfate and chondroitin sulfates in the treatment of degenerative joint disease. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*, **3**, 27-39.
278. HUGHES, R. & CARR, A. (2002). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of glucosamine sulphate as an analgesic in osteoarthritis of the knee. *Rheumatology (Oxford)*, **41**, 279-284.
279. CLEGG, D.O. *et al.* (2006). Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *New England Journal of Medicine*, **354**, 858-860.
280. HOCHBERG, M.C. (2006). Nutritional supplements for knee osteoarthritis—still no resolution. *New England Journal of Medicine*, **354**, 858-860.
281. MANSON, J.J. & RAHMAN, A. (2004). This house believes that we should advise our patients with osteoarthritis of the knee to take glucosamine. *Rheumatology (Oxford)*, **43**, 100-101.
282. CHARD, J. & DIEPPE, P. (2001). Glucosamine for osteoarthritis: magic, hype, or confusion? It's probable safe-but there's no good evidence that it works. *British Medical Journal*, **322**, 1439-1440.
283. MCALINDON, T.E. & BIGGEE, B.A. (2005). Nutritional factors and osteoarthritis: recent developments. *Current Opinion in Rheumatology*, **17**, 647-652.

284. HOFFER, L.J., KAPLAN, L.N., HAMADEH, M.J., GRIGORIU, A.C. & BARON, M. (2001). Sulfate could mediate the therapeutic effect of glucosamine sulfate. *Metabolism*, **50**, 767-770.
285. McCARTY, M.F. (1994). The neglect of glucosamine as a treatment for osteoarthritis—a personal perspective. *Medical Hypotheses*, **42**: 323-327.
286. McCARTY, M.F. (1996). Glucosamine for wound healing. *Medical Hypotheses*, **47**: 273-275.
287. ABEDOWALE, A., DU, J., LIANG, Z., LESLIE, J.L. & EDDINGTON, N.D. (2002). The bioavailability and pharmacokinetics of glucosamine hydrochloride and low molecular weight chondroitin sulfate alter single and multiple doses to beagle dogs. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, **23**, 217-225.
288. BIGGEE, B.A., BLINN, C.M., MCALINDON, T.E., NUIITE, M. & SILBERT, J.E. (2003). Low levels of human serum glucosamine alter ingestion of glucosamine sulphate relative to capability for peripheral effectiveness. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **65**, 222-226.
289. PERSIANI, S., RODA, E., ROVATI, L.C., LOCATELLI, M., GIACOVELLI, G. & RODA, A. (2005). Glucosamine oral bioavailability and plasma pharmacokinetics alter increasing doses of crystalline glucosamine sulfate in man. *Osteoarthritis and Cartilage*, **13**, 1041-1049.
290. SETNIKAR, I., GIACHETTI, C. & ZANOLO, G. (1984). Absorption, distribution and excretion of radioactivity alter a single intravenous or oral administration of [¹⁴C]-glucosamine to the rat. *Pharmatherapeutica*, **3**, 538-550.
291. SETNIKAR, I., PALUMBO, R., CANALI, S. & ZANOLO, G. (1993). Pharmacokinetics of glucosamine in man. *Arzneimittel-forschung*, **43**, 1109-1113.
292. KIM, J.J. & CONRAD, H.E. (1974). Effect of D-glucosamine concentration on the kinetics of mucopolysaccharide biosynthesis in cultured chick embryo vertebral cartilage. *The Journal of Biological Chemistry*, **249**, 3091-3097.
293. BASSLEER, C. ROVATI, L. & FRANCHIMONT, P. (1998). Stimulation of proteoglycan production by glucosamine sulfate in chondrocytes isolated from human osteoarthritic articular cartilage *in vitro*. *Osteoarthritis and Cartilage*, **6**, 427-434.
294. QU, C.J., KARJALAINEN, H.M., HELMINEN, H.J. & LAMMI, M.J. (2006). The lack of effect of glucosamine sulphate on aggrecan mRNA expression and (35)S-sulphate incorporation in bovine primary chondrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1762**, 453-459.

Apéndice I

Acrónimos y abreviaturas

3-PGA	3-fosfoglicerato
ADAMTS	Enzimas con actividad desintegrina y metaloproteasa con motivos de trombospondina
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
AMP	Adenosina monofosfato
Asp	Ácido aspártico
BCIP/NBT	Bromocloroindolil fosfato / nitro blue tetrazolium
BME	Medio basal de Eagle
BSA	Albúmina de suero bovino
BSP	Sialoproteína ósea
CAM	Moléculas de adhesión celular
CM	Cabeza metacarpiana
CMC	Carboximetilcelulosa
CHO	Células de ovario de hámster chino
COMP	Proteína Oligomérica del Cartílago
CRP	Proteína C reactiva
DAB	3,3'-diaminobencidina
de DHLNL	6'-deshidro-5,5'-di-hidroxi-lisino-norleucina

DMEM	Medio MEM modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilén diamino tetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGTA	Ácido etilén glicol-bis-(β-aminoetiléter)N, N, N', N' tetraacético
ELISA	Ensayo con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas
EMEM	MEM con sales de Earle
FACIT	Colágenos asociados a fibrillas
FBS	Suero bovino fetal
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FP	Falanges proximales
GAG	Glucosaminoglicano
Gly	Glicina
HA	Ácido hialurónico
HBSS	Solución de Hank
HEPA	Filtro absoluto
HEPES	(N-[2-hidroxietil]-piperazina-N'-[láctico 2-etano-sulfónico
HMEM	MEM con sales de Hank
Hyl	5-Hidroxilisina
Hyp	4-Hidroxiprolina
IGF	Factor de crecimiento similar a insulina
IL	Interleuquina
Ile	Isoleucina
IRGA	Dispositivo que analiza el CO ₂ del incubador de CO ₂
Lys	Lisina
MEM	Medio de Eagle
MMP	Metaloproteasa
mRNA	RNA mensajero

MT-MMP	Metaloproteasas de membrana
NO	Óxido nítrico
OA	Osteoartritis
OPD	o-fenilendiamina
PAI I	Inhibidor del activador del plasminógeno
PAO	Poliaminooxidasa
PBS	Solución de Dulbecco
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PM	Peso molecular
pNPP	p-nitrofenil fosfato
PPI	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa
Pro	Prolina
PVP	Polivinilpirrolidona
RER	Retículo endoplásmico rugoso
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SED	Síndrome de Ehlers-Danlos
STMOAD	Fármacos modificadores de la estructura
TAC	Tomografía axial computerizada
TBS	Buffer Tris salino
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
THF	Tetrahidrofolato
TIM	Triosa fosfato isomerasa
TIMP	6-tiosina monofosfato
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNF	Factor de necrosis tumoral
TPA	Activador tisular del plasminógeno

Apéndice II

Aparatos de laboratorio

Aparato	Marca	Modelo
Agitador de tubos orbital	IKA	Yellowline TTS 2
Agitador de tubos orbital	IKA	MS I Minishaker
Agitador de tubos vortex	SBS	Top Mixer AT-1
Agitador de vaivén	Sky Line	Shaker S-4
Agitador magnético	Selecta	Agimatic 243
Agitador magnético	Hanna Instruments	HI 301N
Agitador magnético	Techmatic	MST 11
Agitador magnético	IKA	RCT Basic
Agitador magnético	Ovan	Basic Mag Mix
Agitador magnético	Heidolph	MR 1000
Arcón congelador industrial	Lynx	
Armario refrigerador industrial	Portinox	Are X500-1P
Aspirador y desechador de muestras autoclavable	Integra Biosciences	Vacunsafe Comfort
Autoclave	Raypa	AE-75
Balanza electrónica de precisión	Precisa	XB120A

Balanza electrónica de precisión	Sartorius	CP-64
Balanza granatorio electrónica	Sartorius	Acculab
Baño termostático	Julabo	SW 20C
Baño termostático	Lauda	M12
Bomba de vacío por efecto Venturi	Heto	Sue 30
Cabina de flujo laminar	Telstar	PV-100
Cámara digital	Leica	DC180
Campana de extracción de gases	Astec Environmental Systems	Astecair 500
Centrífuga de mesa	Jouan	B 3.11
Centrífuga refrigerada	Sorvall	RC2-B
Conductímetro portátil	WTW	LF96
Congelador	Liebherr	GX811
Contador de células	Beckman Coulter	Vi-Cell
Contenedor de nitrógeno líquido	Air Liquide	GT 35
Contenedor de nitrógeno líquido	Fisher Bioblock	RS Series 60L
Estufa para secado de material	JP Selecta	Dryglass
Incubador de CO ₂	New Brunswick Scientific	CO281R
Lector de microplacas	Anthos Zenyth	3100
Máquina fabricadora de hielo en escamas		
Microcentrífuga refrigerada de alta velocidad	Heraeus	Biofuge fresco
Microscopio invertido con sistema de fluorescencia incorporado	Leica	DMIL
Nevera congelador	Crolls	
pH-metro digital	WTW	pH537
pH-metro digital	Sartorius	PB-11
Pipeteador eléctrico	Powerpette Plus	Fisherbrand
Pipeteador eléctrico	Powerpette Plus	Jencons
Selladora de bolsas para autoclave	Citynet Medical	

Apéndice III

Productos químicos

Producto	Casa comercial	Referencia
Ácido acético glacial (químicamente puro)	Panreac	211008
Ácido L-Aspártico	Quimipur	ID-1245
Ácido clorhídrico 35%	Panreac	141019
Ácido fórmico 85%	Panreac	121029.1611
Ácido 4-hidroximetil benzoico	Sigma	H-5892
Albúmina de suero bovino	Sigma	A-6003
Anticuerpo anti-colágeno tipo I/III de piel de fetos de ratón (conejo)	Calbiochem	234169
Anticuerpo anti-IgG de conejo (cabra) conjugado a fluoresceína	Calbiochem	401319
Anticuerpo anti-IgG de ratón (oveja) conjugado a FITC	Stressgen	SAB-102
Anticuerpo monoclonal anti-colágeno tipo II (Clon 2B1.5) (ratón)	LabVision	MS-235-P200
Azida sódica	Panreac	162712
Azul Tripán, cell culture tested	Sigma	T-6146
Bicarbonato sódico (NaHCO ₃)	Panreac	141638

Borohidruro sódico	Merck	1.06371.0100
Cloruro cálcico anhidro (CaCl ₂)	Panreac	141219
Cloruro magnésico hexahidrato (MgCl ₂ · 6H ₂ O)	Merck	1.05833.0250
Cloruro potásico (KCl)	Merck	1.04936.0500
Cloruro sódico (NaCl)	Merck	1.06404.1000
Colagenasa de <i>Clostridium histolyticum</i> , Tipo IV (Clostridiopeptidasa A, EC 3.4.24.3)	Sigma	C-5138
D-Glucosa	Sigma	G-8270
Elastasa	Sigma	E-7885
Estándar de colágeno	Bicolor	S1010
Estreptomina sulfato	Fluka	85880
Fosfato bisódico dihidrato (Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O)	Merck	1.06580.1000
Fosfato potásico monobásico (KH ₂ PO ₄)	Merck	4873.0250
Fosfato sódico di-hidrógeno I-hidrato (NaH ₂ PO ₄ · 1H ₂ O)	Panreac	131965
Gelatina granulada	Acofarma	14631
Gentamicina sulfato	Fluka	48760
Glicina	Quimipur	ID-726
HEPES, sal de Na	Sigma	H-3784
Hialuronidasa, tipo V (EC 3.2.1.35)	Sigma	H-6254
Hidróxido sódico (NaOH), en pastillas	Normapur	28252.29
L-Isoleucina	Quimipur	ID-1249
Kit de detección del colágeno tipo II nativo	Chondrex	6009
Kit reactivos contador de células	Izasa	82383198
L-Lisina	Quimipur	ID-1252
Medio de montaje Fluoromount-G	Southern Biotech	0100-01
Medio DMEM	Gibco	31600-091
Medio Ham F12	Sigma	N-6760
Paraformaldehído	Fluka	76240

PBS 10x	Sigma	D-1408
Penicilina-G, sal de sodio (EC 200-710-2)	Sigma	P-3032
Pepsina	Fluka	77160
Permanganato potásico (KMnO ₄)	Panreac	141527
L-Prolina	Quimipur	ID-764
Pronasa de <i>Streptomyces griseus</i>	Fluka	81748
Rojo fenol	Sigma	P-3532
Rojo Sirio	Biocolor	S1005
Sulfato de magnesio heptahidrato (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	Panreac	141404
Tripsina	Gibco	27250-018
Triton X-100	Sigma	T-8532
Trizma base	Sigma	T-1503
Suero bovino fetal (FBS)	Sigma	F-7524

Glosario de términos

Absorbancia: cifra sin dimensiones que indica hasta qué punto absorbe una disolución de una sustancia la luz de una determinada longitud de onda. Se define como el logaritmo negativo de la fracción de luz de longitud de onda λ que pasa a través de una muestra de la disolución. Su valor depende de la longitud del paso de la luz, la concentración de la disolución, y el coeficiente de la sustancia a esa longitud de onda.

Ácido acético glacial: ácido acético anhidro o, al menos, de riqueza superior al 99'5%. Recibe esta denominación por su semejanza de cristalización con el hielo.

Ácidos grasos esenciales: ácido linoleico y linolénico que deben suministrarse en la alimentación ya que no pueden ser sintetizados por el organismo.

Ácido hialurónico: polímero compuesto por unidades diméricas repetidas de ácido glucurónico y N-acetil-glucosamina. Suele tener un peso molecular extremadamente grande (hasta varios millones de daltons) y formar el centro de los agregados de proteoglicanos presentes en la matriz extracelular.

Aminoácidos esenciales: aminoácidos que deben obtenerse de la alimentación, ya que no pueden sintetizarse en el organismo (al menos en cantidades suficientes).

Aminoácido no esencial: aminoácido que puede sintetizar el organismo.

Anemia perniciosa: enfermedad producida por la deficiencia de vitamina B₁₂. Los síntomas son una disminución de los eritrocitos, debilidad y trastornos neurológicos.

Aneuploide: que no tiene un múltiplo exacto del número cromosómico haploide.

Anfiartrosis: articulación semimóvil.

Anticuerpo: proteína globular, sintetizada por los linfocitos B, que es complementaria de una sustancia extraña (antígeno) con la que se combina específicamente.

Anticuerpo monoclonal: un anticuerpo homogéneo, producido por un clon de células que lo sintetizan, y que se une a solo tipo de antígeno.

Antígeno: sustancia extraña, habitualmente una proteína o polisacárido, capaz de causar la producción de anticuerpos y de reaccionar luego con ellos específicamente.

Antioxidante: compuesto fuertemente reductor, como el ácido ascórbico, que contrarresta la tendencia de un metabolito a oxidarse a una especie potencialmente tóxica o perjudicial.

Artrosis: enfermedad de las articulaciones debida a un desequilibrio en la homeostasis de la matriz extracelular que implica la degradación del cartílago y la pérdida de la función articular normal.

Autoclave: aparato que sirve para esterilizar objetos y sustancias situados en su interior, por medio de vapor y altas temperaturas.

Azida: cualquier compuesto que contenga el grupo N_3^- , normalmente se utiliza la sal de sodio NaN_3 , un inhibidor del transporte de electrones que bloquea el flujo de electrones desde la citocromo oxidasa hasta el oxígeno. Se utiliza con frecuencia para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Azul Tripán: colorante biológico utilizado para determinar la viabilidad celular. El azul Tripán es incapaz de atravesar las membranas plasmáticas intactas, y por lo tanto sólo tiñe células muertas.

Biglicano: un pequeño proteoglicano, de 150-240 kDa, de la matriz extracelular. La proteína central tiene una masa de aproximadamente 42 kDa y es muy similar a la proteína central de la decorina y la fibromodulina. Las tres tienen secuencias altamente conservadas que contienen 10 repeticiones internas homólogas de alrededor de 25 aminoácidos con motivos ricos en leucina. El biglicano tiene dos cadenas de glucosaminoglicanos, de condroitín sulfato o dermatán sulfato.

Cabina de flujo laminar: dispositivo de trabajo por el que circula aire filtrado de una forma no turbulenta paralela o perpendicularmente a la superficie de trabajo, para mantener condiciones de asepsia.

Cartílago: tejido conectivo en el que domina una matriz extracelular rica en colágeno tipo II y proteoglicanos, especialmente condroitín sulfato. El cartílago es más flexible y compresible que el hueso y a menudo sirve como un esqueleto en etapas tempranas del desarrollo, siendo mineralizado a medida que el animal crece. El cartílago es producido por los condrocitos que quedan rodeados por la matriz que ellos mismos secretan.

Channelling: asociación física ordenada de enzimas que participan secuencialmente en una ruta de transformación, de forma que el producto de una, y sustrato de la siguiente, se tras-pasa directamente de la primera a la segunda, sin tener que difundir al medio.

Confluencia: momento del cultivo en el que toda el área de crecimiento disponible es utilizada y las células se encuentran en estrecho contacto unas con otras.

Código genético: código mediante el cual una secuencia de nucleótidos de una molécula de DNA o RNA especifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido. Está formado por codones de tres nucleótidos que especifican un determinado aminoácido o indican al ribosoma que detenga la traducción y libere el polipéptido. Con unas pocas excepciones, de importancia menor, todos los seres vivos utilizan el mismo código.

Codón: secuencia de tres nucleótidos del mRNA que dirige la incorporación de un aminoácido durante la síntesis de proteínas o actúa como señal de comienzo o de parada.

Colagenasa: enzima proteolítica capaz de degradar el colágeno nativo. Una vez que la colagenasa ha actuado pueden intervenir otras proteasas menos específicas para completar la degradación. Las colagenasas de células de mamíferos son metaloenzimas y específicas para cada tipo de colágeno. Son liberadas en forma latente (proenzima) en los tejidos y requieren la activación de otras proteasas para poder degradar la matriz fibrilar.

Colágeno: principal proteína estructural de la matriz extracelular. Posee una composición en aminoácidos inusual: muy rica en glicina, prolina, hidroxiprolina, lisina e hidroxilisina. Su estructura también es inusual: una triple hélice de polipéptidos de unos 95 kDa que origina una molécula de tropocolágeno de 300 x 0,5 nm, resistente al ataque de las proteasas.

Complejo de Golgi: orgánulo presente en muchas células eucariotas; consiste en túbulos, sacos y vesículas aplanados limitados por membrana. Funciona como un centro de procesamiento, empaque y distribución para las sustancias que elabora la célula.

Concentración de células: número de células por mL de medio.

Condrocito: célula diferenciada responsable de la secreción de la matriz extracelular del cartílago.

Condronectina: proteína de 180 kDa aislada de suero de pollo que favorece el anclaje de los condrocitos al colágeno tipo II.

Confluyente: cultivo celular en el que todas las células están en contacto y por lo tanto toda la superficie del frasco de cultivo está cubierta.

Cultivo de células: crecimiento de células disociadas de un tejido mediante migración espontánea o disgregación enzimática o mecánica.

Cultivo primario: un cultivo originado a partir de células, tejidos u órganos tomados directamente de un organismo, y antes del primer subcultivo.

Curva de crecimiento: representación del número de células frente al tiempo, para un cultivo celular proliferativo; usualmente se divide en la fase lag (la fase antes de que el crecimiento se

inicie), la fase log (el periodo de crecimiento exponencial), y la fase estacionaria (número estable de células que se alcanza cuando el cultivo deja de crecer a una alta densidad celular).

Decorina: un pequeño proteoglicano (90-140 kDa) de la matriz extracelular, denominado así porque 'decora' las fibras de colágeno. La proteína central tiene una masa aproximada de 42 kDa y es muy similar a la proteína central del biglicano y la fibromodulina. Las tres tienen secuencias altamente conservadas que tienen 10 repeticiones homólogas internas de aproximadamente 25 aminoácidos con motivos ricos en leucina. La decorina sólo tiene una cadena de glicosaminoglicano.

Dependiente de anclaje: que requiere anclarse a una superficie sólida para sobrevivir o crecer.

Dermatosparaxis: enfermedad recesiva del ganado en el que una procolágeno peptidasa está ausente. En consecuencia los péptidos amino y carboxilo-terminales del procolágeno no son eliminados, y la dermis se vuelve frágil. Es similar al síndrome de Ehlers Danlos en humanos.

Desdiferenciación: pérdida irreversible de las características especializadas que una célula puede expresar *in vivo*. Se utiliza para referirse a la pérdida progresiva de la morfología diferenciada en observaciones histológicas de, por ejemplo, el tejido tumoral.

Desnaturalización: pérdida de la configuración nativa de una macromolécula que resulta, por ejemplo, del tratamiento con calor, cambios extremos de pH, tratamiento químico u otros agentes desnaturalizantes. Habitualmente está acompañada por pérdida de la actividad biológica.

Diartrrosis: articulación móvil sinovial.

Diploide: condición en la que cada autosoma está representado dos veces (2n); por oposición a haploide (n).

Disolución tampón, disolución amortiguadora, buffer: sistema químico que estabiliza la concentración de una sustancia; los sistemas ácido-base sirven como tampones de pH, previniendo cambios drásticos en la concentración de hidrogeniones.

EDTA (Ácido etilendiaminetetraacético): agente quelante de calcio y magnesio.

EGTA (ácido etilenglicol-bis(β -aminoetiléter)-N,N'-tetraacético): agente quelante de calcio.

ELISA (análisis inmunosorbente con la enzima ligada): técnica muy sensible para detectar pequeñas cantidades de una proteína o cualquier otra sustancia antigénica.

Enlace peptídico: enlace que liga sucesivos aminoácidos para formar un péptido. Consiste en un enlace amida entre el grupo α -carboxilo de un aminoácido y el grupo α -amino del siguiente.

Epítoto (o determinante antigénico): la parte específica de una partícula antigénica que reconoce un determinado anticuerpo o un receptor de célula T.

Errores congénitos del metabolismo: mutaciones humanas que dan lugar a alteraciones específicas del metabolismo intermediario. Generalmente, el problema radica en una enzima que es inactiva, hiperactiva, demasiado escasa o demasiado abundante. Los síntomas pueden deberse a una producción insuficiente de un metabolito necesario y/o a la acumulación de otro metabolito hasta alcanzar concentraciones tóxicas.

Escorbuto: enfermedad carencial ocasionada por la deficiencia de vitamina C. Los efectos son debidos a un fallo en la hidroxilación de los residuos de prolina durante la síntesis de colágeno. Se caracteriza por debilidad, anemia, hemorragias subcutáneas, encías porosas, etc.

Especie reactiva de oxígeno (ROS): derivado reactivo del oxígeno molecular, entre los que se encuentran el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el oxígeno singlete.

Estro: periodo de apareamiento en las hembras de los mamíferos, caracterizado por la ovulación y la actividad sexual intensificada.

Estructura cuaternaria de una proteína: nivel de estructura que se obtiene cuando varias cadenas polipeptídicas plegadas distintas (subunidades) se asocian de una forma específica para producir una proteína completa.

Estructura primaria de una proteína: secuencia de aminoácidos del polipéptido.

Estructura secundaria de una proteína: estructura simple (a menudo una hélice, una hoja o un cable) que resulta del plegamiento espontáneo cuando se forma una cadena polipeptídica; mantenida por los puentes de hidrógeno y otras fuerzas débiles.

Estructura terciaria de una proteína: estructura compleja habitualmente globular, que resulta de un plegamiento ulterior de la estructura secundaria de una proteína; se forma espontáneamente debido a las atracciones y repulsiones entre los aminoácidos con cargas distintas entre sus grupos R.

Euploide: múltiplo exacto del set cromosómico haploide.

Explante: pequeños fragmentos de tejidos extraídos de un animal donante, mantenidos con vida y en crecimiento bañados por un medio de cultivo apropiado.

Factor de crecimiento: un factor, liberado por las células, que induce la proliferación en otras células; principalmente con efecto paracrino, pero también puede ser liberado en la sangre por las plaquetas o el endotelio.

Factor de crecimiento similar a la insulina: proteína del ser humano que interviene en las acciones promotoras de crecimiento de la hormona de crecimiento. Posee propiedades semejantes a la insulina (p. ej., promueve el transporte de glucosa y la síntesis de grasas).

Factor de necrosis tumoral: proteína que suprime la división celular y las células tóxicas o tumorales.

Factor de proliferación: polipéptido extracelular que estimula la proliferación y/o la división celular.

Factor de proliferación derivado de las plaquetas: proteína segregada por las plaquetas sanguíneas durante la coagulación. Estimula la mitosis durante la cicatrización de las heridas.

Factor de proliferación epidérmico: proteína que estimula la división celular de las células epiteliales.

Fenotipo: características observables de un organismo que resultan de la interacción entre el genotipo y el ambiente.

Fibroblástico: que se parece a los fibroblastos –morfología fusiforme (bipolar) o estrellada (multipolar)–; normalmente dispuestos en paralelo en la confluencia si el contacto está inhibido. A menudo, el término es utilizado indiscriminadamente para células mesodérmicas no diferenciadas, sin tener en cuenta su relación con los fibrocitos. Es más correcto utilizar el término fibroblastoide.

Fibroblasto: célula del tejido conectivo, de origen mesodérmico, que secreta procolágeno fibrilar, fibronectina y colagenasa.

Fibromodulina: un pequeño proteoglicano, de alrededor de 60 kDa, de la matriz extracelular. La proteína central tiene una masa aproximada de 42 kDa y es muy similar a la proteína central del biglicano y la fibromodulina. Las tres tienen una secuencia muy conservada que contiene 10 repeticiones homólogas internas de alrededor de 25 aminoácidos con motivos ricos en leucina. La fibromodulina tiene cuatro cadenas de queratán sulfato unidas.

Fibronectina: glicoproteína de alto peso molecular (dos cadenas de 250 kDa cada una unidas mediante puentes disulfuro) presente de forma insoluble en la matriz extracelular de los tejidos animales, y en forma soluble en el plasma.

FITC (isotiocianato de fluoresceína): el FITC es utilizado como reactivo para conjugar fluoresceína a una proteína. Los anticuerpos marcados con FITC son muy utilizados en la microscopía de fluorescencia: el fluoróforo iluminado con luz UV emite luz verde.

Fluorescencia: propiedad de emitir luz bajo excitación molecular causada por un haz de luz incidente; la luz emitida es siempre menos energética (tiene mayor longitud de onda) que la luz productora de la excitación.

Fluorocromos: aquellas moléculas que emiten fluorescencia cuando son correctamente excitadas; los fluorocromos tales como la fluoresceína y la tetrametil rodamina suelen utilizarse en sus formas isotiocianato (FITC, TRITC).

Glicina: el amino ácido más simple (75 Da). Es el residuo más abundante en las proteínas, especialmente en el colágeno y la elastina, y no es ópticamente activo.

Glucosaminoglicanos (también denominados mucopolisacáridos): polisacáridos formados por unidades repetidas de disacáridos en los que un azúcar es la N-acetilgalactosamina o la N-acetilglucosamina. Habitualmente la unidad de disacárido contiene un grupo carboxilo, y a menudo uno o varios sulfatos, por lo que la mayor parte de los glucosaminoglicanos tienen una densidad elevada de cargas negativas. Los glucosaminoglicanos frecuentemente se combinan con una proteína para formar proteoglicanos y son un componente importante de la matriz extracelular de vertebrados.

Haploide: que tiene sólo un conjunto de cromosomas (n), por oposición al diploide (2n); característico de los gametos eucarióticos.

Hemoglobina: proteína transportadora de oxígeno que se sintetiza durante el desarrollo de los eritrocitos en la médula ósea. Es una proteína compleja compuesta por cuatro grupos hemo y cuatro cadenas peptídicas de globina. Se designa a éstas como cadenas α (alfa), β (beta), γ (gamma) y δ (delta) en el adulto y cada una está constituida por varios centenares de aminoácidos.

Heteroploide: un cultivo en el que las células tienen números cromosómicos diferentes al diploide y diferentes de cada uno.

Hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$: material cristalino que proporciona dureza y rigidez a los huesos de los vertebrados y a las conchas de los moluscos.

Hidroxilisina: lisina hidroxilada postraslacionalmente presente en el colágeno y frecuentemente unida a hidratos de carbono.

Hidroxiprolina: residuo específico de prolina junto a un residuo de glicina en el colágeno que es hidroxilado en el C4, antes de que los polipéptidos se hagan helicoidales, mediante la actividad de la prolil hidroxilasa. La presencia de hidroxiprolina es fundamental para producir una triple hélice de tropocolágeno estable.

Homeostasis: la tendencia hacia un estado relativamente constante.

Homeotermo: capaz de mantener una temperatura corporal constante a pesar de las fluctuaciones ambientales.

Inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMP): familia de proteínas de alrededor de 200 residuos que pueden inhibir metaloproteasas, como la colagenasa, uniéndose a ellas.

Inmunofluorescencia: test o técnica en la que uno u otro componente de una reacción inmunológica se vuelve fluorescente al ligarle un fluorocromo como la fluoresceína, ficoeritrina o rodamina, de manera que la reacción puede ser detectada como un complejo antígeno-anticuerpo fluorescente.

Inmunofluorescencia indirecta: un método de tinción inmunofluorescente en la que el primer anticuerpo, que es dirigido directamente contra el antígeno que ha de ser localizado, se usa sin marcar, y la localización del primer anticuerpo es entonces detectada mediante el uso de una anti-IgG marcada fluorescentemente

In vitro: literalmente 'en vidrio', pero se utiliza convencionalmente para referirse a cultivado fuera del hospedador como los cultivos celulares, los cultivos de órganos; también se utiliza para indicar reacciones bioquímicas o moleculares llevadas a cabo en tubos de ensayo.

In vivo: en el organismo entero vivo.

Interacciones no covalentes: todos los tipos de interacciones entre los átomos y las moléculas que no implican compartir realmente electrones en un enlace covalente. Incluyen las interacciones electrostáticas, las interacciones de dipolo permanente e inducido y los enlaces de hidrógeno.

Interleuquina: una variedad de sustancias producidas por los leucocitos (no de forma exclusiva) y que actúan durante la respuesta inflamatoria.

Latirismo: alteración que afecta a los entrecruzamientos del colágeno como resultado del secuestro de cobre por los nitrilos (la lisil oxidasa es una metaloenzima que contiene cobre). En los animales se produce por la ingesta de plantas tóxicas del género *Lathyrus*.

Línea celular: un cultivo propagado tras el primer subcultivo.

Matriz extracelular: cualquier material producido por las células y secretado al medio circundante, pero normalmente se aplica este término a la porción no celular de los tejidos animales. La matriz extracelular del tejido conectivo es particularmente importante y las propiedades de esta matriz determinan las propiedades del tejido. En términos generales existen tres componentes principales: elementos fibrosos (particularmente colágeno, elastina o reticulina), proteínas de unión (como fibronectina, laminina), y moléculas de relleno (generalmente glu-

cosaminoglicanos). La matriz puede ser mineralizada para resistir la compresión (como en el hueso) o rica en fibras resistentes a la tensión (como en el tendón).

Medio: una mezcla de sales inorgánicas y otros nutrientes capaz de sostener el crecimiento celular *in vitro* durante 24 horas.

Medio de crecimiento: el medio utilizado para propagar una línea celular particular; normalmente un medio basal con aditivos como suero o factores de crecimiento.

Medio de cultivo definido: medio de cultivo en el que se conocen todos los componentes. En la práctica esto significa que el suero (que normalmente se añade al medio de cultivo de células animales) es reemplazado por insulina, transferrina y factores de crecimiento.

Membrana basal: matriz extracelular que se encuentra bajo las células epiteliales. Existen dos capas distintas: la lámina basal, inmediatamente adyacente a las células, es producida por las células epiteliales y contiene colágeno tipo VI; la lámina reticular es producida por los fibroblastos del tejido conectivo y contiene colágeno fibrilar.

Metabolismo intermediario: todas las interacciones de un organismo que tienen relación con el almacenamiento y la generación de energía metabólica, y con la biosíntesis de compuestos de peso molecular bajo y compuestos de almacenamiento de energía. No incluye la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas.

Metaloproteasas de la matriz (MMP): enzimas proteolíticas que degradan la matriz extracelular. Incluye colagenasas y elastasas.

Modificación postraslacional: cambios que ocurren en las proteínas tras la formación del enlace peptídico, como la glicosilación, la fosforilación, la hidroxilación, etc.

Nódulos de Bouchard: engrosamientos óseos en las articulaciones interfalángicas proximales característicos de la artrosis.

Nódulos de Heberden: engrosamientos óseos en las articulaciones interfalángicas distales característicos de la artrosis.

Osteogénesis imperfecta: anomalía patológica hereditaria, caracterizada por alteraciones generalizadas del tejido conectivo (huesos, tendones, ligamentos, dentina, etc.), debido a lo cual la fácil fractura de los huesos largos y del cráneo es uno de los datos clínicos más significativos. Las articulaciones son hipermóviles y la piel, fina y atrófica. Sinónimos: enfermedad de Lobstein, enfermedad de Vrolik.

Osteofitos: excrecencia ósea en forma de reborde o pico que aparece en las articulaciones afectadas por artrosis.

Osteoporosis: condición que se caracteriza por la pérdida progresiva de la densidad y adelgazamiento del tejido óseo.

pH óptimo: pH al que una enzima cataliza una reacción con una eficiencia máxima.

Pirógeno: sustancia o agente que produce fiebre.

Poiquilotermo: organismo cuya temperatura corporal varía con la del ambiente.

Poliploide: célula u organismo con más de dos conjuntos completos de cromosomas por núcleo.

Polirribosoma: dos o más ribosomas unidos con una molécula de mRNA que están traduciendo simultáneamente.

Procolágeno: moléculas de colágeno triméricas en las que las extensiones peptídicas terminales están unidas por puentes disulfuro; los péptidos terminales son luego eliminados por proteasas específicas para producir una molécula de tropocolágeno.

Procolágeno peptidasas: proteasas que eliminan las extensiones peptídicas terminales del procolágeno; la deficiencia de estas enzimas ocasiona dermatosparaxis o síndrome de Ehlers-Danlos.

Proliferación celular: aumento en el número de células mediante división.

Pronasa: mezcla de enzimas proteolíticas de *Streptomyces griseus*.

Proteoglicano: molécula grande que contiene un número grande de cadenas de glicosaminoglicanos ligados a una molécula proteica central.

Recambio: velocidad a la que todas las moléculas de una estructura se degradan y sustituyen por moléculas sintetizadas de nuevo.

Resonancia magnética nuclear (RMN): un tipo de espectroscopia que se basa en el hecho de que los núcleos de los isótopos que tienen la propiedad de 'espín' resonarán con frecuencias específicas de radiación de microondas cuando se les coloca en un campo magnético de una determinada fuerza. La energía de resonancia es sensible al entorno molecular local, por lo que la espectroscopia de RMN puede utilizarse para explorar la estructura molecular. Además, diferentes tejidos vivos tienen unos espectros globales de RMN característicos, que son sensibles a los cambios del entorno tisular. La RMN puede utilizarse, pues, en el estudio del metabolismo de los tejidos y en el diagnóstico de las enfermedades.

Retículo endoplásmico: sistema extenso de membranas presente en la mayor parte de las células eucarióticas, que divide el citoplasma en compartimentos y canales; frecuentemente cubierto por ribosomas.

Rizartrosis: alteración degenerativa (OA) de la articulación trapeciometacarpiana.

Rojo fenol: colorante utilizado como indicador de pH, cambia de amarillo a rojo en el rango de pH de 6'8-8'4. Muy utilizado en los medios de cultivo de tejidos

Sales biliares: moléculas anfipáticas con propiedades detergentes que son componentes importantes de la bilis, un líquido amarillo verdoso que favorece la digestión de las grasas. Derivados conjugados de los ácidos biliares ácido cólico y ácido desoxicólico.

Sinartrosis: articulación inmóvil.

Sincondrosis: articulación inmóvil con tejido fibroso interpuesto.

Sindesmosis: sinartrosis en la que los huesos de una articulación se fijan por tejido conectivo fibroso.

Síndrome de Ehlers-Danlos: grupo heterogéneo de anomalías patológicas hereditarias, caracterizadas por fragilidad e hiperelasticidad de la piel e hiperextensibilidad de las articulaciones. Se han descrito varios tipos con diferentes modos de herencia y con arreglo a distintos mecanismos bioquímicos primario; todos los defectos bioquímicos conocidos afectan al metabolismo de las fibras de colágeno.

Solución salina equilibrada: solución isotónica de sales inorgánicas presentes en aproximadamente las concentraciones fisiológicas; también puede contener glucosa, pero normalmente está libre de otros nutrientes orgánicos.

Subconfluente: menos que confluyente; no toda la superficie del frasco de cultivo está cubierta.

Subcultivo: transferir las células de un recipiente de cultivo a otro.

Termodinámica: estudio de las transformaciones de energía. La primera ley de la termodinámica establece que en todos los procesos la energía total del sistema más sus alrededores permanece constante. La segunda ley establece que todos los procesos naturales tienden a producirse en una dirección tal que aumenta el desorden o la aleatoriedad del sistema.

Tripsina: enzima que ataca específicamente los enlaces peptídicos en los que el grupo carboxilo pertenece a un resto de arginina o de lisina.

Tritón X-100: detergente no iónico utilizado en biología celular para solubilizar lípidos y ciertas proteínas celulares.

Vitamina: cualquiera de las muchas sustancias orgánicas relacionadas que no pueden ser sintetizadas por un organismo particular y son esenciales en cantidades pequeñas para el crecimiento y la función normal.

