

# Viejos conocidos, nuevos usos: bloqueando la respuesta inflamatoria en el cartílago artrósico.

Eloi Franco-Trepát<sup>1#</sup>, Ana Alonso-Pérez<sup>1#</sup>, María Guillán-Fresco<sup>1</sup>, Alberto Jorge-Mora<sup>1</sup>, Oreste Gualillo<sup>2</sup> and Rodolfo Gómez<sup>1\*</sup>



<sup>1</sup> Musculoskeletal Pathology Group Institute IDIS, Santiago University Clinical Hospital, Santiago de Compostela, 15706, Spain  
<sup>2</sup> Research laboratory 9 (NEIRID LAB), Institute of Medical Research, SERGAS, Santiago University Clinical Hospital, Santiago de Compostela, 15706, Spain.  
 #These authors contributed equally to this work \*Corresponding author: Rodolfo.Gomez.Bahamonde@sergas.es



## INTRODUCCIÓN

El paulatino envejecimiento de la población se relaciona con el aumento en la prevalencia de enfermedades degenerativas como la artrosis. Esta se define por una disminución del espacio articular debido a la degradación progresiva del cartílago. Esta degradación articular es debida en gran parte a las alteraciones biomecánicas asociadas al envejecimiento o a la obesidad y provoca la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) que activan receptores inmunes innatos como el "Toll-like receptor-4" (TLR4). La activación del TLR4 induce la síntesis de factores proinflamatorios y pro-catabólicos que actúan de forma sinérgica promoviendo una mayor degradación tisular. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera la artrosis una de las principales causas de dolor crónico y de invalidez. Los traumatólogos no disponen actualmente de un tratamiento eficaz, sin embargo, en otras áreas clínicas están usando medicamentos (amitriptilina, naloxona y talidomida) que podrían presentar actividad bloqueadora específica del TLR4.

## OBJETIVO

Determinar la actividad de amitriptilina (AT), naloxona (NLX) y talidomida (TALI) en condrocitos artrósicos para bloquear las respuestas inmunes innatas mediadas por TLR4.

## MÉTODOS

El efecto de amitriptilina, naloxona y talidomida en la respuesta inmune innata mediada por LPS [100ng/ml], agonista del TLR4, y por IL1B [0,1ng/ml], agonista del receptor IL1R, fue determinada en condrocitos humanos artrósicos aislados de cartílago de rodilla. El análisis proteómico masivo se realizó por MALDI/TOFF y se filtro por FDR 5% y p-valor <0,05. Los niveles de la citoquina interleuquina 6 (IL6) se determinaron por ELISA. El análisis de expresión génica (mRNA) de IL6, lipocalina 2 (LCN2) y metaloproteinas 3 (MMP3) se realizó por RT-PCR. La viabilidad se testó usando el ensayo MTT.

## CONCLUSIONES

El estudio de reposicionamiento de fármacos en condrocitos artrósicos humanos ha demostrado que:

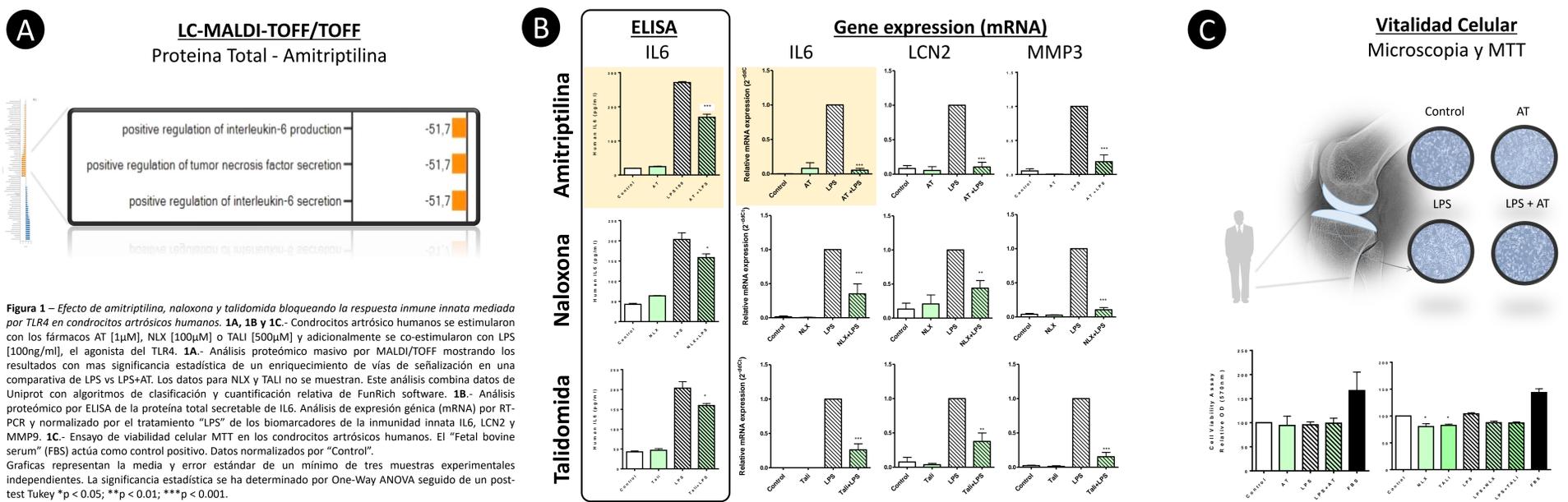
1. Amitriptilina inhibe la expresión de múltiples proteínas implicadas en la respuesta inmune innata mediadas por TLR4 y IL1R.
2. Amitriptilina, naloxona y talidomida bloquean la secreción proteica de IL6 y la expresión génica de múltiples biomarcadores de la inmunidad innata dependientes de TLR4 y IL1R

Por tanto, el reposicionamiento farmacológico de estos fármacos es viable, otorgando a los traumatólogos una nueva herramienta terapéutica.

## RESULTADOS

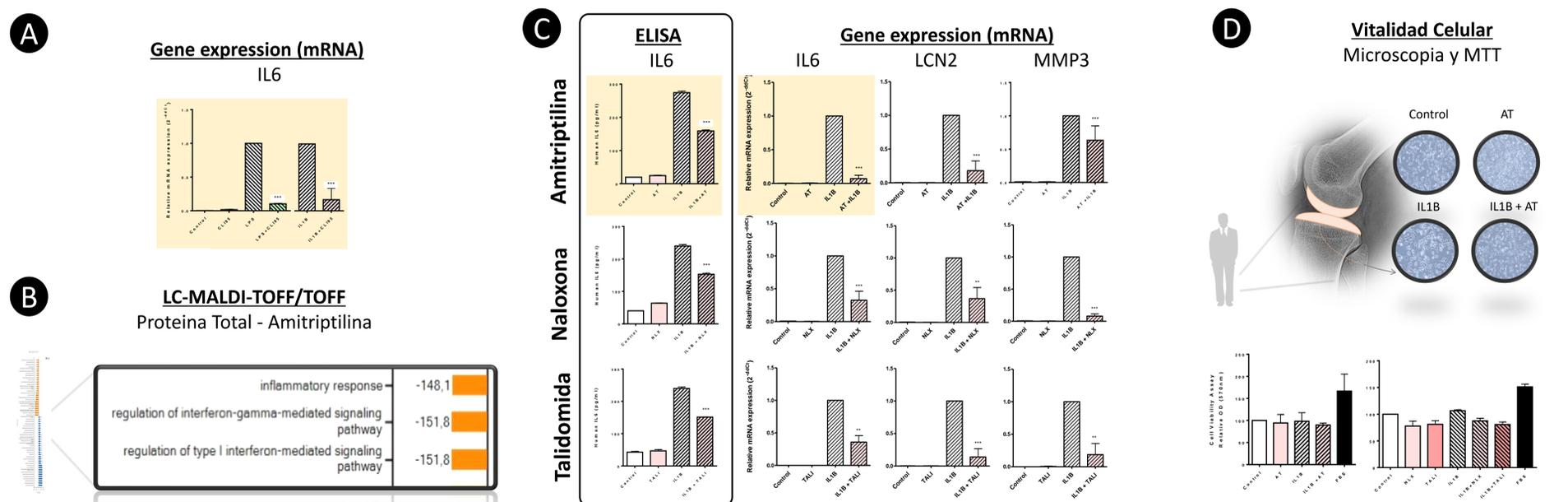
### AMITRIPTILINA, NALOXONA Y TALIDOMIDA BLOQUEAN LAS RESPUESTAS IMMUNE INNATAS MEDIADAS POR TLR4

El análisis proteómico de condrocitos humanos artrósicos tratados con LPS [100ng/ml] desveló un enriquecimiento de las vías de señalización relacionados con la inmunidad innata. La co-estimulación con AT [1µM] redujo la promoción de estas vías, incluyendo la citoquina IL6, la cual ha sido relacionada con la artrosis. La reducción de los niveles y expresión (mRNA) de IL6 fue validada por ELISA y RT-PCR. Además, otros biomarcadores de la artrosis previamente identificados, LCN2 y MMP3, también mostraron una reducción de expresión génica. NLX y TALI mostraron resultados muy similares a AT. La viabilidad celular de los condrocitos humanos artrósicos estimulados no se vio significativamente alterada por los fármacos.



### AMITRIPTILINA, NALOXONA Y TALIDOMIDA BLOQUEAN LAS RESPUESTAS IMMUNE INNATAS MEDIADAS POR IL1R

Se ha sugerido que el receptor TLR4 participa en los procesos inflamatorios mediados por la IL1 a nivel articular. Interesantemente, el bloqueo de TLR4 por parte de un inhibidor específico (CL195) en condrocitos artrósicos, redujo la expresión génica (mRNA) de IL6 inducida tanto por la estimulación con LPS como IL1B. En este contexto, nos planteamos estudiar si la respuesta inmune innata mediada por IL1R en condrocitos artrósicos también se ve modulada por parte de los fármacos reposicionados. La acción de AT, NLX y TALI fue muy similar a la observada previamente mediada por TLR4, tanto para los análisis proteómicos como los genéticos y de vitalidad (MALDI/TOFF, ELISA, RT-PCR y MTT).



**Figure 2 – Efecto de amitriptilina, naloxona y talidomida bloqueando la respuesta inmune innata mediada por IL1R en condrocitos artrósicos humanos.** Condrocitos artrósicos humanos se estimularon con: **2A.** CL195 [1µM] (inhibidor específico de TLR4). **2B, 2C y 2D.** AT [1µM], NLX [100µM] o TALI [500µM]. Adicionalmente se co-estimularon con: **2A, 2B, 2C y 2D.** LPS [100ng/ml], agonista del TLR4, o IL1B [0,1ng/ml], agonista del IL1R. **2A.** Análisis de expresión génica (mRNA) de IL6 por RT-PCR y normalizado por el tratamiento "LPS" o "IL1B". **2B.** Análisis proteómico masivo por MALDI/TOFF mostrando los resultados con mas significancia estadística de un enriquecimiento de vías de señalización en una comparativa de IL1B vs IL1B+AT. Los datos para NLX y TALI no se muestran. Este análisis combina datos de Uniprot con algoritmos de clasificación y cuantificación relativa de FunRich software. **2C.** Análisis proteómico por ELISA de la proteína total secretada de IL6. Análisis de expresión génica (mRNA) por RT-PCR y normalizado por el tratamiento "IL1B" de los biomarcadores de la inmunidad innata IL6, LCN2 y MMP3. **2D.** Ensayo de viabilidad celular MTT en los condrocitos artrósicos humanos. El "Fetal bovine serum" (FBS) actúa como control positivo. Datos normalizados por "Control". Gráficas representan la media y error estándar de un mínimo de tres muestras experimentales independientes. La significancia estadística se ha determinado por One-Way ANOVA seguido de un post-test Tukey \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001.