



Louis Lippiello
Nutramax Laboratories Edgewood MD 21040, USA

Link al artículo original (en inglés):
<http://ecam.oxfordjournals.org/cgi/content/full/4/2/219>

Publicado originalmente en:
eCAM 2007 4(2):219-224;
doi:10.1093/ecam/nel081

© 2006 The Author(s).
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/uk/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Síntesis de colágeno en tenocitos, células del ligamento y condrocitos expuestos a una combinación de glucosamina HCl y condroitín sulfato

RESUMEN

Los ensayos clínicos de los nutracéuticos glucosamina (glcN) y condroitín sulfato (CS) han demostrado la eficacia de éstos para aliviar los síntomas de la artrosis. Estudios *in vitro* e *in vivo* apoyan la existencia de una relación sinérgica en la que se produce una regulación al alza de la actividad sintética de los condrocitos. La combinación de glucosamina y condroitín sulfato también podría ser útil como terapia coadyuvante en lesiones deportivas si se lograra generar una regulación al alza de la síntesis de colágeno similar en tejido articular accesorio al ligamento y al tendón. Se ha analizado la síntesis de colágeno y proteínas no colágenas (PNC) en cultivos de tenocitos de bóvidos, células del ligamento y condrocitos expuestos a glucosamina + condroitín sulfato por medio de la absorción del marcador radiactivo prolina por material sensible al colágeno. La determinación de marcador radioisotópico con hidroxiprolina (un marcador específico para la síntesis de colágeno) llevada a cabo tras el aislamiento con HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento) confirmó la especificidad de los efectos metabólicos. La síntesis total de material sensible a colagenasa presentó una regulación al alza máxima a dosis fisiológicas de glucosamina + condroitín sulfato. La respuesta de los tejidos presenta la secuencia: células del ligamento (+69%) > condrocitos (+56%) > tenocitos (+22%). La Hidroxiprolina marcada aumentó un 132% en las células del ligamento, un 27% en tenocitos y un 49% en las células del epitendón después de 48 h de exposición a $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ glucosamina + $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ condroitín sulfato. La combinación de dosis bajas de glucosamina y condroitín sulfato estimula la síntesis de colágeno y PNC *in vitro* por parte de las células del ligamento, tenocitos y condrocitos. Por lo tanto, su uso terapéutico para los traumas del tejido articular accesorio podría ayudar a potenciar los procesos de reparación.

Introducción

La combinación de glucosamina (glcN) y condroitín sulfato (CS) ha sido ampliamente probada para el alivio sintomático en pacientes con articulaciones artrósicas (1-4). También se ha evaluado su efecto sobre la degeneración del cartílago articular y los efectos antiinflamatorios en diversos modelos animales de

artrosis (5-8). Además, estudios *in vitro* e *in vivo* apoyan la existencia de una relación sinérgica de estos dos agentes relacionados con la regulación al alza de la matriz de síntesis de proteoglicanos y la regulación a la baja de la actividad de la metaloproteasa (1, 9-11), dándose un efecto "condroprotector". En su mayor parte, estos estudios sólo han examinado las res-

puestas de los condrocitos articulares, pero conceptualmente la artrosis es considerada un trastorno de la articulación en conjunto incluyendo el ligamento y las estructuras articulares accesorias al tendón (12).

Los ligamentos y tendones son tejido conectivo fibroso denso que proporciona estabilidad mecánica a las articulaciones durante el movimiento. Las células similares a los fibroblastos están rodeadas por un sistema organizado de matriz extracelular fibrosa, compuesta principalmente de colágeno tipo I, elastina, proteínas no colágenas y pequeñas cantidades de queratina y condroitín sulfato. Las alteraciones relacionadas con el envejecimiento o el traumatismo de tendones y ligamentos juegan un papel importante en la alteración de la dinámica de las articulaciones y predisponen a éstas a un inicio precoz de artrosis (13, 14). El fallo del tendón o ligamento debido a una rotura traumática, así como el uso excesivo y/o los procesos inflamatorios ocupan el puesto 15 de las afecciones musculoesqueléticas más comunes y representan el 30-50% de todas las lesiones deportivas (15). Por otra parte, la incidencia anual de rotura aguda del ligamento cruzado anterior se ha estimado en uno cada 3.000 en la población norteamericana, con aproximadamente 95.000 nuevos casos por año (16).

Las terapias actuales para el tratamiento de lesiones de ligamento y tendón se centran en el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) para reducir al mínimo la inflamación y el posterior daño a la integridad del tejido. Sin embargo, algunos autores han advertido de que el uso excesivo de algunos AINEs podría ser perjudicial, ya que estos agentes tienen un efecto inhibitorio sobre la síntesis de proteoglicanos y sobre la proliferación celular (17) y no se ha demostrado que proporcionen ningún beneficio bioquímico en modelos animales (18). Varios factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, el factor de crecimiento y transformación beta y el factor de crecimiento básico de fibroblastos han demostrado una

estimulación significativa de la síntesis de matriz *in vitro*, pero no se ha probado su eficacia *in vivo* (19). Actualmente no existe una terapia eficaz para mejorar la velocidad de recuperación o la capacidad de estos tejidos para sanar (17). Algunos suplementos nutracéuticos como la creatina, efedra, etc. pueden producir efectos secundarios, y no existen datos rigurosos que justifiquen su uso (20).

Todavía no se han llevado a cabo ensayos clínicos que empleen preparados nutracéuticos para la curación y la reducción de los procesos inflamatorios en el tejido conectivo denso. La ventaja de este tipo de terapia para las lesiones deportivas es la posibilidad de mejorar los procesos de reparación natural, así como de reducir la dosis AINEs.

La justificación para explorar si la combinación de glucosamina + condroitín sulfato tiene un efecto beneficioso sobre la síntesis de colágeno en los ligamentos y tendones se basa en estudios previos que sugerían que glucosamina y condroitín sulfato actúan como modificadores de respuesta biológica que regulan al alza la actividad metabólica de los condrocitos (10). Dado que las células del tejido ligamentoso o tendinoso tienen un origen similar a los condrocitos articulares, muestran propiedades mecánicas y cambios en el metabolismo similares a los relacionados con el envejecimiento (21), son menos sensibles a estímulos de reparación (22) y son capaces de mantener los procesos de remodelación normal (23), se consideró conveniente comprobar si respondían de manera similar a los condrocitos articulares. Además, la mayoría de los estudios publicados con estos agentes se han centrado en el cartílago articular y el estudio de la síntesis de proteoglicanos, su degradación y la actividad antiinflamatoria. Poco se sabe de sus efectos sobre la síntesis de colágeno, un componente importante del cartílago, así como del tejido conjuntivo denso. Con este fin, se ha llevado a cabo un estudio con un preparado comercial, el *Cosamin DS*[®] (*CDS; Nutramax Laboratories Inc, Edgewood, MD*), una mezcla de glucosamina HCl (*FCHG49*[®], 99% de pureza), condroitín sulfato (*TRH122*[®], 98% de

pureza) y ascorbato de manganeso en la proporción 5:4:1, para el que existen numerosos datos in vitro y clínicos. Este producto se ha utilizado en su conjunto, en lugar de realizar pruebas de sus componentes individuales, ya que a pesar de que los datos previos indican que ambos agentes ejercen una regulación al alza de la actividad sintética de los condrocitos, la combinación de estas sustancias cuenta con una mayor eficacia clínica (1) y actúa de manera sinérgica en el cartílago articular in vitro (8).

Materiales y Métodos

El cartílago articular se obtuvo a partir de las superficies articulares de las articulaciones del metacarpiario de vacas Holstein de 3 a 5 años de edad. El tejido del ligamento fue resecado entre el tercer y cuarto metacarpiario y se extirpó una gran parte de la tendón extensor de una zona adyacente a la articulación metacarpiana. Los tres tejidos fueron digeridos con colagenasa bacteriana (Sigma / Aldrich Chemical Co, St Louis, MO) de Tipo I (tendón y ligamento) o tipo II (cartílago) en unidades de 220 ml⁻¹. La población celular fue ampliada con cultivos de 75 cm² que contenían DMEM/F-12 + 10% de suero fetal de ternero, 50 µg⁻¹ ml de ácido ascórbico 2-sulfato y antibióticos. En algunos estudios, el epitelio fue disecado del tendón y cultivado por separado. Después de un solo estadio del proceso, se obtuvieron suficientes células para su cultivo en pocillos multiplaca. Todas los cultivos se llevaron a un estado metabólico estacionario con un cultivo adicional de 5 días en DMEM/F-12 + 10% FCS. Veinticuatro horas antes de la prueba, las células de los cultivos fueron aclimatadas a DMEM/F-12 con 1% de suero de ternera fetal, 50 µg⁻¹ ml de ácido ascórbico y 5 mM de glucosa. Todos los estudios posteriores se realizaron en un medio que contenía niveles fisiológicos de glucosa (5 mM) y diferentes dosis de Cosamin DS®. Además, se emplearon dos métodos para controlar la neosíntesis de colágeno y proteínas no colágenas.

MÉTODO 1 Incorporación de Prolina (pro) titulada en material sensitivo a Colagenasa

Se expusieron células cultivadas en 24 pocillos multiplaca con una densidad de 200.000 células por pocillo, a una temperatura de 37° C, durante 24 horas, a dosis de prolina de 1, 10, 50 y 100 µg ml⁻¹ y 5 µ Ci ml⁻¹-3H (actividad específica 97 Ci mM⁻¹). Hubo un total de 8 réplicas/tratamientos en un volumen total medio de 0.5 ml. Se utilizó IGF-1 a 50 ng ml⁻¹ como control positivo. Los cultivos se finalizaron con un proceso de congelación-descongelación y fueron desagregados después mediante sonicación para romper las células. Se analizó el colágeno soluble y la síntesis de proteínas no colágenas a partir de la adición de 50% de ácido tricloroacético (TCA) para precipitar todas las proteínas contenidas en la capa de células combinada y en el medio (concentración final de TCA 5%). Las placas fueron centrifugadas a 3000 r.p.m. (revoluciones por minuto) en microplacas durante 15 min y se eliminó el sobrenadante. La precipitación de TCA (5% con 1 mM prolina) fue repetida hasta que el sobrenadante estuviese libre de radiofármaco no incorporado. La TCA residual fue eliminada mediante un enjuague/aclarado/lavado final de etanol: éter etílico (1:1) y las placas de cultivos secadas con aire.

El análisis del material sensitivo a colagenasa fue realizado de acuerdo al método de Diegelmann y cols. (24). En pocas palabras, el colágeno en las placas de precipitado de TCA secadas fue digerido añadiendo una mezcla de incubación de 25 µg de colagenasa purificada (*Worthington Biochemical Corp, Lakewood, NJ*) en 200 µ l de Tris 0,05 M (pH 7.6) que contenía 0,005 M CaCl₂. Las placas fueron incubadas durante 3 horas a 37 ° C. El sobrenadante fue retirado después de la centrifugación y se repitió por segunda vez la digestión colagenasa. La radioactividad en los sobrenadantes agrupados (fracción total de colágeno) se contabilizó en pocillos multiplaca tras la adición de 300 µl de centelleante (*Hewlett Packard*) a 100 µl de la muestra. El residuo

(proteínas no colágenas) se disolvió calentando a 50° C en 1 N NaOH durante 15 minutos y se contaron alícuotas similares tal y como se ha descrito anteriormente. Los datos se expresan como cuentas por minuto ± SEM junto con material sensible a colagenasa y proteínas no colágenas. Salvo que se indique lo contrario, todos los cultivos de tendón consistían en una mezcla de tres tipos de células: la vaina de fibroblastos, tenocitos del epitelio y endotelio.

MÉTODO 2 Actividad específica de hidroxiprolina (HYP)

Al repetir los experimentos, las células cultivadas en una densidad de 500.000 por pocillo en 12-pocillos multiplaca fueron tratadas durante 48 h con 10 µ g ml⁻¹ Cosamin DS®. El sobrenadante de la digestión de la colagenasa (fracción de colágeno total) se preparó hasta 6 N HCl con ácido concentrado e hidrolizado a 120° C bajo vacío durante 24 h. Después de la evaporación de HCl, los residuos de aminoácidos fueron dansilados mediante la adición de 100 µ l de 500 mM NaHCO₃ y 100 µ l de 20 mM DNS-Cl en acetona a 100 µ l de muestra hidrolizada. Las muestras reaccionaron bajo condiciones de oscuridad durante 40 min a 65 ° C. La separación de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de los ácidos imino dansilados se realizó en una columna *Ultrasphere SAO C-18* (250 mm x 4,6 mm) utilizando un gradiente gradual de 25 mM NaH₂PO₄ + 25 mM de ácido acético/acetonitrilo (86:14) (disolvente A) y el 100% acetonitrilo (disolvente B) (25). Los picos correspondientes a la verdadera prolina e hidroxiprolina fueron recogidos y analizados para la radiactividad y cuantificados comparándolos con estándares conocidos. Los datos se muestran como actividad específica (cuentas por minuto de hidroxiprolina o prolina µ g⁻¹ hidroxiprolina o prolina).

Análisis estadístico

Los datos del cultivo celular se expresan como el promedio cuentas por minuto ± SEM. Los experimen-

tos fueron realizados con células de diferentes animales para asegurar la validez de los resultados. También se calculó el porcentaje de cambio de los cultivos de control y las medias se compararon por medio de ANOVA y una prueba t-Student para comparaciones de múltiples grupos. Se determinó la significancia estadística por la prueba t-Student de dos colas para datos no apareados (P < 0,05).

Resultados

Caracterización de los cultivos celulares

La microscopía de fase de los cultivos de células de tendón reveló una mezcla de tipos de células derivadas de tejido del tendón. Morfológicamente, las células del epitendón (vainas) aparecen como grandes fibroblastos ovalados, mientras que los tenocitos son pequeños y en forma de huso. Los cultivos de ligamento y condrocito presentaron homogeneidad en el tipo de células.

Regulación al alza de la síntesis de colágeno

Se observó una respuesta inversa en función de la dosis en la absorción de prolina titulada en el material sensible a colagenasa en los tres tipos de células expuestas a diferentes dosis de Cosamin DS® (Tabla 1). En cada tipo de células,

la máxima captación de colágeno se produjo a 1-10 µg ml⁻¹, la dosis más baja empleada. No se observó ningún efecto o solo una ligera inhibición de la síntesis de colágeno a dosis superiores a 50 µg ml⁻¹ (Tabla 1), sin efecto o ligera inhibición de la síntesis de colágeno se observó (Tabla 1). La sensibilidad de respuesta de cada tipo de células con respecto a la síntesis de colágeno seguía el orden descendiente: células del ligamento (+ 69%) ³3d condrocitos (+ 56%) > tenocitos (+ 22%).

Se confirmó una estimulación inducida por Cosamin DS® de la síntesis de colágeno evaluando la actividad específica de prolina e hidroxiprolina. La actividad específica de hidroxiprolina en las células del ligamento fue significativamente mayor que las células de tenocitos o del epitendón (132% frente a 27% y 49%, expresadas como porcentaje en el cambio con respecto a los cultivos control). Los condrocitos no fueron analizados (Tabla 2).

Cálculo de la proporción de Colágeno respecto a la de proteínas no colágenas

El cálculo de la síntesis de proteínas no colágenas en el método 2 se realizó suponiendo que la proporción de prolina a hidroxiprolina en el colágeno de tipo I es similar a la del tipo II, con valor igual a 1.42. También se supone que la actividad específica de los dos ácidos imino es idéntica, ya que hidroxiprolina deriva de prolina en las reacciones post-transcripcionales. De este modo, el cálculo de la síntesis de proteínas no colágenas es:

$$\begin{aligned} &\text{Hidroxiprolina marcada} \\ &\times 1.42 \\ &= \text{prolina marcada en colágeno} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} &\text{Total prolina marcada} \\ &- \text{prolina marcada en colágeno} \\ &= \text{prolina marcada en proteínas no colágenas} \end{aligned}$$

Teniendo en cuenta lo anterior, se calculó la proporción de colágeno en la síntesis de proteínas no colágenas en los tres tipos de células midiendo la cantidad de prolina marcada en el colágeno y en las proteínas no colágenas. Los datos presentados en la Tabla 3 indican que el IGF-1 presenta mayor efecto estimulador en la síntesis del colágeno frente a la síntesis de proteínas no colágenas tanto en condrocitos como tenocitos, no siendo así en las células de ligamento. Por el contrario, la exposición al Cosamin DS® no altera significativamente la proporción de colágeno a proteínas no colágenas con respecto a los valores control en ningún tipo de células.

Discusión

La combinación de glucosamina y condroitín sulfato estimula de manera efectiva la neosíntesis de colágeno en los cultivos celulares de tejidos de ligamento, tendón y cartílago. Basándonos en la razón

Tabla 1. Síntesis de colágeno de los condrocitos, células del ligamento y tenocitos expuestas a diferentes dosis de Cosamin DS®

| | Control | IGF (50 ng ml ⁻¹) | Cosamin DS® (1 µg ml ⁻¹) | Cosamin DS® (10 µg ml ⁻¹) | Cosamin DS® (50 µg ml ⁻¹) | Cosamin DS® (100 µg ml ⁻¹) |
|------------------------------|----------|-------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--|
| Condrocitos | 380 (60) | 600 (96) | 592 (112) [†] | 560 (60) [†] | 580 (112) [†] | 352 (58) |
| Células del ligamento | 520 (32) | 944 (132) | 880 (120) [†] | 920 (148) [†] | 656 (120) [†] | 576 (56) |
| Tenocitos | 316 (43) | 460 (35) | 385 (35) [†] | 419 (30) [†] | 364 (45) [†] | 345 (43) |

Datos presentados como captación media (±DS, desviación estándar) (n = 8) de prolina titulada cuentas por minuto por material sensible a colagenasa (colágeno).

[†]Significación estadística P < 0.05 a 0.001.

5:4:1 del producto comercial *Cosamin®DS*, una dosis de 10 µg ml⁻¹ expuso a las células a 5 µg ml⁻¹ de glucosamina (~23 µM), 4 µg ml⁻¹ de condroitín sulfato (~0.25 µM) y 1 µg ml⁻¹ de ascorbato de Mn. En comparación con los niveles in vivo, el condroitín sulfato a 0.25 µM se encuentra probablemente en el rango inferior del que se podría obtener con dosis repetidas (26). Las dosis de glucosamina se encuentran en el rango de los niveles de suero, o que coincide con los últimos datos publicados [23 µM frente a 10–60 µM (27, 28)]. Los efectos mostrados in vitro pueden estar asociados a la glucosamina y al condroitín sulfato, ya que el medio contenía únicamente 50 µg ml⁻¹ de ascorbato, pudiéndose descartar los efectos derivados de la pequeña cantidad de ascorbato presente.

Estos resultados fueron detectados bajo condiciones in vitro en un medio que contenía glucosa a niveles comparables en suero y con densidades celulares que mantienen el fenotipo celular (29). El medio del cultivo DMEM/F-12, optimizado para el crecimiento celular, contiene 17 mM de glucosa. Estos niveles tan elevados de azúcar pueden encontrarse en suero para diabéticos, mientras que los niveles normales de glucosa rondan los 5 mM. Estudios previos realizados con células similares a las fibroblásticas muestran que los niveles elevados de glucosa (> 5 mM) reducen la síntesis de colágenos de tipo

1 (30, 31). En un estudio preliminar en el que se usaron condrocitos se observó hasta un 28% de reducción en la captación de prolina radiomarcada por el material sensible a colagenasa a 17 mM de glucosa en comparación con 5mM de glucosa (datos no presentados). Para conseguir el mantenimiento y adherencia de las células en el cultivo fue necesaria la utilización de al menos un 1% de suero de feto de ternero.

Las células del epitendón producen colágeno y se considera que están implicadas en la regeneración de los tendones (21), aunque el ligamento in vivo es, funcional y metabólicamente, el tejido más activo en comparación con los tendones o los condrocitos (32). Los datos de este artículo confirman estos hallazgos dado que las células del ligamento captaron casi el doble de la radioactividad en material sensible a colagenasa respecto a los tenocitos o los condritos (Tabla 1). Esta evidencia también se mostró en el cálculo de la actividad específica de hidroxiprolina (+132% en ligamento frente a +27% en los tenocitos). Al comparar la proporción de prolina radiomarcada en colágeno frente a la prolina radiomarcada en proteínas no colágenas, se observa un aumento en un factor 3 con IGF-1 en condrocitos y tenocitos, pero no en las células de ligamento. Además, la proporción de células expuestas a *Cosamin DS®* no difería significativamente de la de control. Este hecho sugiere que la respuesta de

los condrocitos y tenocitos al *Cosamin DS®* puede ser distinta mecánicamente a la del IGF-1.

En la literatura, existen pocas publicaciones dedicadas al efecto de glucosamina o condroitín sulfato en la síntesis del colágeno. Bassleer y cols. (33) encontraron que el condroitín sulfato no tenía ningún efecto en la síntesis de colágeno en cartílago humano, mientras que Anderson y cols. (34) no detectaron ningún efecto de la glucosamina en la síntesis de colágeno de condrocitos caninos. Si embargo, los resultados de Jimenez *et al.* (35) O'Grady y cols. (36) apuntan a un incremento de la expresión génica para la síntesis de colágeno con cualquiera de las dos sustancias, solas o en combinación. La disparidad de los resultados podría ser debida a las dosis usadas, al sistema de cultivos, como por ejemplo, grupos de células versus explantes, o también podría significar que el incremento de los niveles de mRNA no se vea reflejado en el producto final analizado.

También se ha observado (9, 37) un efecto inhibitor en niveles altos de condroitín sulfato en la síntesis de glucosaminoglicanos por parte de los condrocitos. A pesar de que el preparado de este trabajo consistió en una mezcla de glucosamina y condroitín sulfato, la inhibición de la síntesis de colágeno mostrada con dosis superiores a 50 µg ml⁻¹ (20 µg ml⁻¹ condroitín sulfato) sugiere que el efecto se debe al componente de condroitín sulfato. Ni en este trabajo ni en

Tabla 2. Análisis comparativo de la actividad específica de hidroxiprolina y prolina en el colágeno de las células de tejido conectivo expuestas a *Cosamin DS®* e IGF-1

| ENSAYO | LIGAMENTO | | | TENDÓN | | | EPITENDÓN | | |
|--|-----------|--------------------|-----------|----------|--------------------|------------|-----------|--------------------|------------|
| | Control | <i>Cosamin DS®</i> | IGF | Control | <i>Cosamin DS®</i> | IGF | Control | <i>Cosamin DS®</i> | IGF |
| Actividad específica Hidroxiprolina | 68 (13) | 158 (35)† | 195 (38)† | 250 (23) | 318 (25)† | 626 (120)† | 378 (45) | 563 (120)† | 740 (160)† |
| Actividad específica Prolina | 120 (26) | 196 (25)† | 348 (69)† | 230 (35) | 326 (45)† | 555 (110)† | 180 (24) | 167 (28) | 300 (55)† |

Datos presentados como media (±DS) de la actividad específica (cuentas por minuto hidroxiprolina µg⁻¹ hidroxiprolina y cuentas por minuto prolina µg⁻¹ prolina) en cultivos expuestos a los agentes durante 48 horas.

†Significación estadística respecto al control con p < 0.05.

estudios de otros autores (9, 37) se ha analizado el comportamiento inverso dosis-respuesta de las células del tejido conectivo al condroitín sulfato. Es razonable conjeturar que la respuesta se asemeja a una típica no monotónica dosis-respuesta (es decir, una curva no-lineal donde la pendiente de la relación dosis-respuesta se invierte de signo en algún punto de la curva).

Existen varias terapias alternativas y complementarias relacionadas con el metabolismo del tejido conectivo y su reparación. Por ejemplo, en una revisión reciente de Ahmed y cols. (38) se describe el uso de productos botánicos en artrosis. También se han propuesto bromelaina (39) y acupuntura con veneno de abeja (40) para una indicación similar. La adición de glucosamina y condroitín sulfato a la lista de terapias alternativas proporciona una herramienta adicional para el tratamiento alternativo no invasivo.

La importancia clínica de estos resultados es relevante para pacientes con lesiones de menisco y del ligamento de la rodilla, ya que los datos apuntan que este tipo de pacientes son propensos a desarrollar cambios degenerativos radiológicos en un período de 10-20 años (14). Dado que el colágeno es el principal componente de estos tejidos, la hipótesis propuesta es que regulación al alza de su síntesis mediante la combinación glucosamina y condroitín sulfato puede acelerar la reparación tisular y disminuir la probabilidad de desarrollo de artrosis. Sin embargo, es demasiado prematuro extrapolar estos resultados in vitro a casos in vivo. A pesar de esto, la combinación de glucosamina y condroitín sulfato podría evitar y/o acelerar los procesos de reparación (Fig. 1) cuando se produce degradación del colágeno en condiciones de trauma/estrés. Asimismo, cabe recordar que estos resultados se refieren a efectos directos in vitro de dichos agentes en el metabolismo celular del tejido conectivo. La eficacia clínica in vivo está relacionada con el alivio sintomático en virtud de su acción antiinflamatoria, por lo que esto podría no ser necesariamente equivalente a las respuestas metabólicas observadas. 🌐



Figura 1
Condroitín sulfato + Glucosamina representa una mayor síntesis de colágeno y el trauma/estrés representa la síntesis de colágeno.

Tabla 3. Proporción de prolina marcada en colágeno respecto a prolina marcada en proteínas no colágenas

| | Condrocitos | Tenocitos | Células del ligamento |
|--------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Control | 1.09 (0.12) | 0.72 (0.11) | 0.90 (0.08) |
| Cosamin DS® | 0.80 (0.04) | 1.06 (0.10) | 0.97 (0.25) |
| IGF-1 | 3.15 (0.66) [†] | 2.15 (0.55) [†] | 0.83 (0.20) |

Datos presentados como proporción de cuentas por minuto (\pm SEM) de prolina marcada en colágeno a prolina en proteínas no colágenas.
[†]Significación estadística a P < 0.05.

Bibliografía

1. Clegg DO, Reda DJ, Harris CL, Klein MA, O'Dell JR, Hooper MA, et al. Glucosamine, chondroitin sulfate and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *N Engl J Med* 2006;354:795–808.
2. Das A, Hammad TA. Efficacy of a combination of FCHG49 glucosamine hydrochloride, TRH122 low molecular weight sodium chondroitin sulfate and manganese ascorbate in the management of knee osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil* 2000;8:343–30.
3. Leffler CT, Philippi AF, Leffler SG, Mosure JC, Kim PD. Glucosamine, chondroitin sulfate and manganese ascorbate for degenerative joint disease of the knee or low back: A randomized, double blind, placebocontrolled pilot study. *Mil Med* 1999;164:85–91.
4. McAlindon TE, LaValley MP, Gulin JP, Felson DT. Glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis: a systematic quality assessment and meta-analysis. *JAMA* 2000;283:1469–75.
5. Beren J, Hill SL, Diener-West M, Rose NR. Effect of pre-loading oral glucosamine HCl/chondroitin sulfate/manganese ascorbate combination on experimental arthritis in rats. *Proc Exp Biol Med* 2001;226: 144–51.
6. Canapp SO, McLaughlin RM, Hoskinson JJ, Roush JK, Butine MD. Scintigraphic Evaluation of dogs with acute synovitis after treatment with glucosamine HCl and chondroitin sulfate. *Am J Vet Res* 1999;60: 1552–7.
7. Hanson RR, Smalley LR, Huff GK, White S, Hammad TA. Oral treatment with a glucosamine-chondroitin sulfate compound for degenerative joint disease in horses: 25 cases. *Equine Pract* 1997;19:16–20.
8. Lippiello L, Woodward J, Karpman R, Hammad TA. In vivo chondroprotection and metabolic synergy of chondroitin sulfate with glucosamine. *Clin Orthop* 2000;381:229–40.
9. Collier S, Ghosh P. Evaluation of the effect of antiarthritic drugs on the secretion of proteoglycans by lapine chondrocytes using a novel assay procedure. *Ann Rheum Dis* 1989;48:372–81.
10. Lippiello L. Glucosamine and chondroitin sulfate: biological response modifiers of chondrocytes under simulated conditions of joint stress. *Osteoarthr Cartil* 2003;11:335–42.
11. Orth MW, Peters TL, Hawkins JN. Inhibition of articular cartilage degradation by glucosamine HCl and chondroitin sulfate. *Equine Vet J* 2002;34:224–9.
12. Poole RA. An Introduction to the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosci* 1999;4:662–70.
13. Beynon BD, Johnson RJ, Abate JA, Fleming BC, Nichols CE. Treatment of anterior cruciate ligament injuries. Part I. *Am J Sports Med* 2005;33: 1579–602.
14. Messner K. Current advances in sports-related cartilage research. Meniscus and ligament injuries are associated with increased risk of knee joint arthrosis. *Lakartidningen* 1998;95:4611–2.
15. Laurencin CT, Gelberman RH. Overview of disease and treatment related to aging of tendons and ligaments. In: Buckwalter JA, Goldberg VM, Woo SLY (eds). *Musculoskeletal Soft-Tissue Aging: Impact on Mobility*. Rosemont, IL: American Academy Orthopaedic Surgeons Publishers, 1992.
16. Frank CB, Jackson DW. Current concepts review—the science of reconstruction of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg* 1997;79:1556–76.
17. Riley GP, Cox M, Harrall RL, Clements S, Hazleman BL. Inhibition of tendon cell proliferation and matrix glycosaminoglycan synthesis by non-steroidal antiinflammatory drugs in vitro. *J Hand Surg* 2001;26: 224–8.
18. Marsolais D, Cote CH, Frenette J. Nonsteroidal anti-inflammatory drug reduces neutrophil and macrophage accumulation but does not improve tendon regeneration. *Lab Invest* 2003;83:991–9.
19. Letson AL, Dahners LE. The effects of combinations of growth factors on ligament healing. *Clin Orthop* 1994;308:207–12.
20. Tokish JM, Kocher MS, Hawkins RJ. Erogenic aids: a review of basic science, performance, side effects, and status in sports. *Am J Sports Med* 2004;32:1543–53.
21. Garner WL, McDonald JA, Koo M, Kuhn C, Weeks PM. Identification of the collagen-producing cells in healing flexor tendon. *Plast Reconstr Surg* 1989;83:875–9.
22. Woo SL, Vogrin TM, Abramowitch SD. Healing and repair of ligament injuries in the knee. *J Am Acad Orthop Surg* 2000;8:364–72.
23. Manske PR, Lesker PA. Biochemical study of flexor tendon participation in the repair process—an in vitro study. *J Hand Surg* 1984;9: 117–20.
24. Diegelmann RF, Bryson GR, Flood LC, Graham MF. A microassay to quantitate collagen synthesis by cells in culture. *Anal Biochem* 1990;186: 296–300.
25. Negro A, Garbisa S, Gotte L, Spina M. The use of reverse-phase high performance liquid chromatography and precolumn derivatization with dansyl chloride for quantitation of specific amino acids in collagen and elastin. *Anal Biochem* 1987;160:39–46.
26. Adebowale A, Du J, Liang Z, Leslie JL, Eddington ND. The bioavailability and pharmacokinetics of glucosamine hydrochloride and low molecular weight chondroitin sulfate after single and multiple doses to beagle dogs. *Biopharm Drug Dispos* 2002;23:217–25.
27. Anderson JW, Nicolosi RJ, Borzelleca JF. Glucosamine effects in humans: a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy. *Food Chem Toxicol* 2005;43:187–201.
28. Persiani S, Rotini R, Trisolino G, Delliponti L, Rovati LC, Locatelli M, et al. Glucosamine plasma and synovial fluid concentrations before and after oral administration of crystalline glucosamine sulfate in knee osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum* 2005;52:S508.
29. Benya PD. Modulation and reexpression of the chondrocyte phenotype; mediation by cell shape and microfilament modification. *Pathol Immunopathol Res* 1988;7:51–4.
30. Benazzoug Y, Borchiellini C, Labat-Robert J, Robert L, Kern P. Effect of high-glucose concentrations on the expression of collagens and fibronectin by fibroblasts in culture. *Exp Gerontol* 1998;33: 445–55.
31. Willershausen-Zonnchen B, Lemmen C, Hamm G. Influence of high glucose concentrations on glycosaminoglycan and collagen synthesis in cultured human gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol* 1991;18:190–5.
32. Riechert K, Labs K, Lindenhayn K, Sinha P. Semiquantitative analysis of types I and III collagen from tendons and ligaments in a rabbit model. *J Orthop Sci* 2001;6:68–74.
33. Bassleer CT, Combal A, Bougaret S, Malaise M. Effects of chondroitin sulfate and interleukin-1 on human articular chondrocytes cultivated in clusters. *Osteoarthr Cartil* 1998;6:196–204.
34. Anderson CC, Cook JL, Kreeger JM, Tomlinson JL. In vitro effects of glucosamine and acetylsalicylate on canine chondrocytes in threedimensional culture. *Am J Vet Res* 1999;60:1546–51.
35. Jimenez SA, Dodge GR, Thomas J. The Effects of Glucosamine Sulfate on Chondrocyte Gene Expression. 9th EULAR Symposium, Madrid, 1996, 8–10.
36. O'Grady C, Grande D, Marwin SE. Chondroprotection and gene expression effects of nutritional supplements on articular cartilage. *Osteoarthr Cartil* 2000; 8(Suppl B): S34–5.
37. Verbruggen G, Cornelissen M, Elewaut D, Broddelez C, DeRiddeer L, Veys EM. Influence of polysulfated polysaccharides on aggrecans synthesized by differentiated human articular chondrocytes. *J Rheumatol* 1999;26:1663–71.
38. Ahmed S, Anuntiyo J, Malemud CJ, Haqqi TM. Biological basis for the use of botanicals in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a review. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005;2:301–8.
39. Brien S, Lewith G, Walker A, Hicks SM, Middleton D. Bromelain as a treatment for osteoarthritis: a review of clinical studies. *Evid Based Complement Alternat Med* 2004;1:251–7.
40. Lee JD, Park HJ, Chae Y, Lim S. An overview of bee venom acupuncture in the treatment of arthritis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005;2: 79–84.

Journals Subscription Department

Oxford University Press
Great Clarendon Street
Oxford, OX2 6DP, UK
Tel: +44 (0)1865 353907
Fax: +44 (0)1865 353485

Consejo Editorial de eCAM

www.oxfordjournals.org/ecam/edboards.html