

EFFECTOS DE DICLOFENAC, CELECOXIB Y SULFATO DE GLUCOSAMINA SOBRE MARCADORES INFLAMATORIOS EN CULTIVO DE CONDROCITOS DE PACIENTES CON OSTEOARTRITIS

ARTICULAR CARTILAGE IN OSTEOARTHRITIC PATIENTS: EFFECTS OF DICLOFENAC, CELECOXIB AND GLUCOSAMINE SULFATE ON INFLAMMATORY MARKERS

Nilda Y. Brizuela, Hilda L. Montrull, Silvia L. Demurtas, Carlos I. Meirovich

RESUMEN

La osteoartritis (OA) es una enfermedad articular crónica, progresiva que se instala como consecuencia de un proceso complejo que involucra alteraciones mecánicas y biológicas del sistema músculo-esquelético, siendo resultante de múltiples interacciones entre factores genéticos e injurias extrínsecas.

La patogenia de esta enfermedad se relaciona con alta y desviada producción de citokinas proinflamatorias y de enzimas proteolíticas, que degradan y destruyen la matriz extracelular en tejidos articulares y peri-articulares.

Se estudiaron 20 casos con OA, de los cuales se obtuvo cartilago durante intervenciones quirúrgicas programadas.

El cartilago se cultivó en medio Dulbecco-Eagle, con o sin agregado de AINEs o condromoduladores.

En los sobrenadantes se determinaron óxido nítrico por reacción de Griess y medición espectrofotométrica; y colagenasa por ELISA doble sándwich en presencia de anticuerpos monoclonales.

En ausencia de AINEs, los cultivos de condrocitos produjeron 1950 ± 665 ng/ml de MMP-1. La adición de Diclofenac redujo esa cifra a 1140 ± 155 ng/ml, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa, ($p < 0,06$).

Por el contrario, Celecoxib redujo el nivel de la enzima a 760 ± 75 ng/ml ($p < 0,01$) y la

Glucosamina también provocó un descenso (950 ± 89 ng/ml) significativo ($p < 0,05$).

Los niveles de ON en ausencia de AINEs llegaron a $47,3 \pm 4,9$ μ M. Su producción no varió significativamente con la adición de Diclofenac, Celecoxib o Glucosamina ($p = ns$).

Los resultados indicarían la incapacidad de Diclofenac para modificar la generación de enzimas proteolíticas, mientras que Celecoxib y Glucosamina disminuyen su producción significativamente. Ninguno de los fármacos utilizados en nuestro trabajo ha logrado alterar la concentración de ON.

Muchos interrogantes quedan aún sin resolver y todavía se carece de fármacos de eficacia comprobada para alterar el curso natural de la enfermedad.

Palabras claves: osteoartritis-metaloproteasas-óxido nítrico-anti-inflamatorios-glucosamina

ABSTRACT

Osteoarthritis is a chronic and progressive joint disease. It is established by a complex process involving mechanical and biological alterations of the musculoskeletal system, which are generated by a great variety of interactions between genetic factors and extrinsic injuries. The pathogenesis of this disease is related to an

Fecha de envío: 28 de septiembre de 2007 • Fecha de aceptación: 3 de noviembre de 2007
Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
Santa Rosa 1085. CP 5000 - Correo electrónico: hmontrull@fibertel.com.ar

El presente trabajo se realizó con un subsidio de Secretaría de Ciencia y Técnica. Universidad Nacional de Córdoba

increased and divergent production of inflammatory markers and proteolytic enzymes that promote the degradation and destruction of the extracellular matrix of articular and periarticular tissues.

Cartilage samples were taken from 20 osteoarthritic patients during programmed surgical interventions. The cartilage samples were cultured in Dulbecco-Eagle medium, with or without the addition of NSAIDs or modulators of chondrocyte metabolism. The content of nitric oxide in the supernatant was quantified using the Griess reaction; the concentration of MMP-1 was quantified via double-sandwich ELISA.

Untreated chondrocyte cultures produced 1950 ± 665 ng/ml MMP-1. With the addition of Diclofenac this value decreased to 1140 ± 155 ng/ml, although this difference was not statistically significant ($p < 0,06$). However, in the presence of Celecoxib the level significantly dropped to 760 ± 75 ng/ml ($p < 0,01$). Although the addition of glucosamine did not produce such a noticeable reduction in the level of MMP-1 (950 ± 89 ng/ml), it was statistically significant ($p < 0,05$). On the contrary, none of the drugs (Diclofenac, Celecoxib, Glucosamine) modified the level of nitric oxide which had a mean value of $47,3 \pm 4,9$ μ M in the control samples.

This investigation evidenced the inability of Diclofenac to significantly modify the production of proteolytic enzymes in osteoarthritic chondrocyte cultures. However, both Celecoxib and Glucosamine significantly reduced the production of MMP-1. On the contrary, none of the drugs used in this study managed to modify the concentration of nitric oxide. To the present day, no drugs have been found to be efficient in altering the natural course of the disease, requiring further investigation.

Keywords: Osteoarthritis, chondrocytes, collagenasa, óxido nítrico, antiinflamatorios

INTRODUCCIÓN

La osteoartritis (OA) es una enfermedad crónica y degenerativa del cartilago articular de elevada prevalencia en pacientes mayores de 60 años (1-4). Su etiología involucra la confluencia de un conjunto de procesos mecánicos y biológicos del sistema músculo-esquelético que desequilibran el balance normal entre síntesis y degradación condral (5).

En condiciones fisiológicas la homeostasis osteocondral responde a un complejo equilibrio entre las acciones estimulantes, inhibitoras y reguladoras de diversas citocinas e interleucinas (6).

Estas son sustancias de naturaleza peptídica generadas por las membranas celulares las que, tras ser liberadas dentro del líquido sinovial, difunden hacia el cartilago, tejido que es blanco de sus efectos (7).

Un avance fundamental en el conocimiento de la fisiopatología de la inflamación fue el descubrimiento del rol del óxido nítrico (ON) vasodilatador soluble y gaseoso generado por las enzimas ON-Sintasas (ONS), mediante degradación metabólica de la arginina (8, 9).

Consecuente a la estimulación del ON aumenta la producción de colagenasas (MMP-1), cuya actividad enzimática intensifica la resorción de proteoglicanos (10-13).

A partir del ácido araquidónico se forman derivados activos merced a la intervención de dos tipos de enzimas: Las ciclo-oxigenasas (COX-1, COX-2 y COX-3) y las lipo-oxigenasas (5-LOX, 12-LOX y 15-LOX).

La COX-1, de expresión constitutiva, es responsable de la síntesis de eicosanoides, lípidos implicados en el control homeostático de numerosas funciones fisiológicas.

La enzima COX-2 es producto de un gen que posee elevado nivel de regulación. COX-2 cataliza la producción local de prostaglandinas (PG) en condiciones fisiológicas, pero su participación es mayor en estados patológicos como OA. Inducida por citocinas y otros mediadores, la COX-2 se expresa por la aparición de inflamación, dolor, fiebre y proliferación celular (8, 14, 15).

La terapéutica farmacológica de OA ha logrado resultados paliativos en cuanto a dolor se refiere, utilizando los *analgésicos antiinflamatorios no esteroideos* (AINEs) (13, 16, 17). Desarrollando una perspectiva mas amplia, investigaciones recientes se han orientado a la búsqueda de fármacos que puedan modificar el curso de la enfermedad.

Estos potenciales medicamentos modificadores de la progresión de la osteoartritis fueron y están siendo diseñados para prevenir, retrasar o incluso revertir los cambios que OA provoca en las articulaciones. Tales drogas han sido denominadas tentativamente *condromoduladores* (1, 6, 18-23).

En función de esos antecedentes se diseño cultivar condrocitos articulares de pacientes con

osteoartritis con el fin de cuantificar *in vitro* los efectos del antiinflamatorio no selectivo Diclofenac, el anti-COX-2 selectivo Celecoxib y el condromodulador Glucosamina sobre la producción de MMPs y la relación NO₂/NO₃. Para comparar con condrocitos normales, se eligió emplear como controles cultivos de condrocitos provenientes de traumatismos sin patología artrítica.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Se extrajeron muestras de cartílago humano de 20 pacientes, cuyo rango etario fue 65 a 74 años que cumplían con los criterios de inclusión definidos para OA por American College of Rheumatology (24), los cuales habían sido sometidos a cirugía rotuliana de reemplazo.

Se excluyeron pacientes con otras patologías inflamatorias, depósitos de cristales, osteonecrosis, displasia maligna, o anquilosis senil (24).

Los pacientes firmaron consentimiento informado para realizar el estudio. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Nacional de Clínicas.

Todas las muestras fueron inicialmente lavadas con buffer salino fosfato libre de calcio y magnesio (DPBS).

Todos los cultivos fueron sometidos al procedimiento que se describe a continuación:

Para obtener los condrocitos del cartílago articular, el tejido de cada paciente se sometió a digestión primaria durante 1 hora con pronase al 0.2% (Sigma, St. Louis, MO, USA), seguido por digestión secundaria durante 3 Horas a 37°C con 0.2% de colagenasa de clostridium (Sigma) en medio Dulbecco's modificado por Eagle, con alta concentración de glucosa (DMEM; Life Technologies, Rockville, MD, USA), y conteniendo 26 mM HEPES (Gibco), Bicarbonato de sodio (0,5g/l), glutamina (2mM), streptavidina (100 mg/l), y una solución protectora antibiótico-antimicótica (100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomina y 0,25 mg/ml de anfotericina B; (Life Technologies)).

Los condrocitos fueron separados por centrifugación, lavados dos veces y luego resuspendidos en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino (FBS; Life Technologies). Finalmente, el material se transfirió a tubos para cultivo de tejido de 10 ml de capacidad con una cantidad final de 10⁴ células/cm².

Cada muestra se incubó por cuadruplicado a 37°C (2) durante 48 horas en una incubadora Schell-Labâ (Oregon USA), en atmósfera de carbógeno (oxígeno con 5% de CO₂).

Uno de los tubos contenía sólo los condrocitos osteoarthríticos suspendidos en el medio de cultivo.

Los otros tres tubos se utilizaron para conocer los efectos «*in vitro*» de Diclofenac sódico, Celecoxib o Glucosamina, sobre la actividad metabólica del tejido articular osteoarthrítico. Con esa finalidad en uno de ellos se agregó Diclofenac en un rango de concentración 1-10 µg/ml. En otro se adicionó Celecoxib en el mismo rango y en el último se introdujo Sulfato de Glucosamina en dosis de 100 µg/ml. Dichas dosis se eligieron en función de las concentraciones plasmáticas que se alcanzan en los pacientes durante los respectivos tratamientos farmacológicos.

El medio de cultivo de cada una de las muestras se removió a los 2 días y de inmediato fue sometido a las correspondientes determinaciones químicas de MMP-1 (colagenasa) y de óxido nítrico (ON).

DETERMINACION DE N^x

La liberación de ON se midió en función de la cantidad de nitrito (NO₂) y nitrato (NO₃) presentes en el medio de cultivo.

NO₂ se determinó por ensayo colorimétrico, basado en la reacción de Griess (25) (Metrolab 1600, Argentina). NO₃ se calculó por su reducción a NO₂ en presencia de Cadmio (Cd) (26).

Se adicionaron a cada muestra 0.45 ml de sulfanilamida 0.1% y 0.05 ml de á-naftil etilendiamina 0.2% (volumen final=1 ml). Al cabo de 15 minutos se leyó el color rosado desarrollado por espectrofotometría, a 540 nm. El espectrofotómetro fue calibrado a cero con el blanco de reactivos. Para calcular el contenido de nitritos presentes, se confeccionaron diariamente curvas de calibración con soluciones standard de nitrito de sodio en concentraciones crecientes.

DETERMINACION DE METALOPROTEASA-1 (COLAGENASA)

La concentración de MMP-1 en el sobrenadante de las células cultivadas fue determinada mediante el método ELISA doble Sándwich (Amersham Biosciences), agregando anticuerpos monoclonales anti-colagenasa en buffer fosfato salino (PBS) a una concentración de 10mg/ml (10).

En cada mini-cubeta de una placa múltiple se vertieron 50 ml del preparado, dejando reposar toda la noche a 4°C. Tras lavar 3 veces con PBS se añadieron 200 ml de albúmina bovina (BSA), diluida en PBS al 0,2 % para bloquear la formación de complejos antígeno-anticuerpo con otras proteínas no específicas (25).

Luego se incorporó colagenasa standard diluida al 1% en PBS-BSA. Se lavó con buffer y a continuación se agregó anticuerpo monoclonal (2 mg/ml) dejando reposar 30 minutos a 37 ° C (10).

Luego de nuevo triple lavado con buffer, se añadieron 50 ml de una dilución 1/4000 de streptavidin peroxidasa, dejando reaccionar 30 minutos a 37° C. Las mini cubetas se lavaron 3 veces con PBS y una con el buffer para desarrollar color. La lectura se efectuó a 410 nm en un espectrofotómetro automático METROLAB. Referida a un valor standard, la reacción de color se detuvo mediante el agregado de ácido sulfúrico 2M.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron expresados como Media \pm error standard y analizados con test-T. Todo valor $p > 0.05$ fue considerado no significativo.

Para los estudios tipo cohorte con múltiples variables se recurrió al método ANOVA.

RESULTADOS

En cartilago articular humano con OA luego del agregado de fármacos:

Concentración de MMP-1

La figura 1 muestra los resultados de las concentraciones de MMP-1 en el sobrenadante del cultivo de cartilago osteoartrítico sin y con el agregado de los fármacos. En ausencia de fármacos la concentración de MMP-1 fue 1967 ± 665 ng/ml.

La adición de Diclofenac redujo ese promedio a 1140 ± 155 ng/ml que no alcanza significancia estadística ($p < 0,06$).

Con la incorporación de Celecoxib, se detectó un descenso de la producción de MMP-1 hasta 760 ± 75 ng/ml, cuya significatividad es ($p < 0,01$).

Por su parte la adición de glucosamina redujo las cifras a 950 ± 89 ng/ml, de significancia estadística ($p < 0.05$).

Niveles de óxido nítrico

La figura 2 muestra los niveles de ON medidos como metabolitos estables. Los niveles de ON en ausencia de AINEs llegaron a $47,3 \pm 4,9$ μ M, término medio. Cuando al cultivo se adicionaron Diclofenac, Celecoxib o Glucosamina su producción no varió significativamente ($p = ns$).

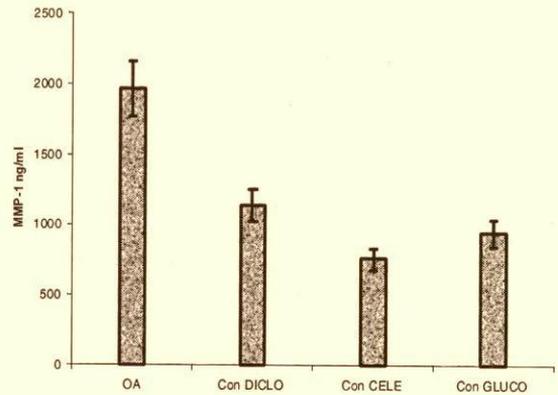


Figura 1. Cambios en la concentración de colagenasa (MMP-1) en cultivo de condrocitos osteoartríticos con el agregado de Antiinflamatorios. Las barras representan valores medios ESM para $n=20$ OA: muestras con OA: osteoartritis; DICLO: con el agregado diclofenac; CELE: con celecoxib; GLUCO: con glucosamina. * indica diferencia significativa ($p < 0,05$)

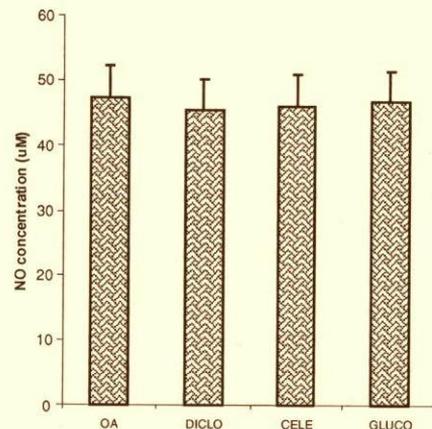


Figura 2. Liberación de NO, en cultivo de condrocitos osteoartríticos sin o con adición de Antiinflamatorios. Las barras representan valores medios \pm ESM para $n=20$ OA: muestra osteoartrítica; DICLO: con agregado de diclofenac; CELE: con celecoxib; GLUCO: con glucosamina. Sin diferencia estadísticamente significativa.

DISCUSION

El presente estudio fue diseñado para detectar y medir en pacientes con osteoartritis la existencia de marcadores biológicos relacionados con esta patología y la posible alteración de sus niveles cuando se emplean algunos de los fármacos propuestos en la terapéutica, incluyendo los de acción sintomática y los que denominamos condromoduladores.

Los experimentos descriptos precedentemente demostraron que en los condrocitos osteoarthríticos aumenta la producción de ON y de las enzimas catabólicas (MMP-1) (7, 27).

La producción de metaloproteasas juega un importante rol en el desbalance metabólico propio de OA (28) incrementando las células apoptóticas y la desorganización de la estructura normal del cartilago articular (29).

Varios grupos de investigadores, inclusive nosotros mismos, han demostrado esta relación en trabajos anteriores (27).

La introducción de fármacos antiinflamatorios en el medio de cultivo, disminuyó en grado variable la concentración de MMP-1 (10, 27-29).

Cuando adicionamos Diclofenac al cultivo la concentración de MMP-1 se redujo en un 40%, en lo que diferimos de Blot y col quienes no encontraron respuesta a esa droga (17) pero la significancia estadística de tales valores perdió fuerza por la dispersión y el elevado ES ($p < 0,06$).

En cambio, la influencia de Celecoxib sobre la producción de MMP-1 fue muy significativa pues sus niveles cayeron a un valor que ronda el 30% de las cifras iniciales. ($p < 0,01$).

Cuando se agregó glucosamina la caída de la producción de colagenasa fue menor que con Celecoxib aunque significativa marcando una concentración que se ubica entre los valores logrados con las otras dos drogas y con una significatividad de $p < 0,05$.

Las investigaciones precedentes son suficientemente demostrativas en cuanto a la incapacidad de Diclofenac para modificar la generación de enzimas proteolíticas, comparada con Celecoxib, inhibidor selectivo de COX-2, que reduce la producción de MMP-1 y protege a los condrocitos de su desviación catabólica (17, 29).

Estos resultados pueden relacionarse con la inhibición del metabolismo de los proteoglicanos

por los anti-COX-2 selectivos, lo que marca cierta diferencia con los AINES no selectivos (13, 30).

La producción de ON que en ausencia de AINES se ubicó en $47,3 \pm 4,9 \mu\text{M}$, no varió significativamente con la adición de Diclofenac, Celecoxib o Glucosamina ($p = \text{ns}$).

La incapacidad de las drogas utilizadas en nuestro trabajo para modificar la concentración de ON, coincide con el aumento de los marcadores biológicos que determinan daño articular y menores niveles de reparación, características ambas que se enlazan y tipifican el proceso inflamatorio crónico de esta enfermedad. Se considera que ON media los efectos destructivos de la interleucina-1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en el cartilago, mientras que la inhibición de ON retarda los cambios histológicos, signos y síntomas en OA inducida experimentalmente (31).

Recientemente se ha abierto un debate sobre glucosamina, agente biológico que ha sido propuesto tanto para aliviar síntomas como para frenar el progreso de la enfermedad (19).

Integrante de los fármacos clasificados como condromoduladores, en nuestros experimentos glucosamina no se mostró capaz de disminuir la concentración de ON en cultivos de condrocitos. Su efecto sobre la concentración de MMP-1 fue poco significativo, por lo que su supuesta actividad cóndro-moduladora y/o anti-inflamatoria permanece aun en el terreno de lo hipotético (18, 19, 22).

Los resultados comunicados por los diferentes autores son contradictorios, lo que es en parte atribuible a que difieren los modelos de investigación utilizados. Dodge informó que en cultivo de cartilago articular humano, glucosamina incrementa la producción de agregan y al mismo tiempo inhibe la generación de enzimas catalíticas (19) Sin embargo, estimamos que este aspecto aún requiere demostración y ratificación.

Nuestros resultados sostienen la propuesta de tratar OA interfiriendo la cascada catabólica a través del bloqueo de la actividad del ON (28, 31)

La experiencia clínica con los inhibidores COX-2 selectivos demostró eficacia terapéutica, pero su incidencia como generador de eventos adversos cardiovasculares limita su utilización en pacientes con riesgos potenciales (16).

La no significancia de algunos valores por su dispersión, no debe considerarse definitiva y requiere nuevos estudios clínicos.

En modelo utilizado en esta investigación permite evaluar simultáneamente varios agentes terapéuticos lo que puede ayudar a dilucidar los interrogantes referidos

BIBLIOGRAFIA

1. Loeser RF, Todd MD, Seely BL. Prolonged treatment of human osteoarthritic chondrocytes with insulin-like growth factor-I stimulates proteoglycan synthesis but not proteoglycan matrix accumulation in alginate cultures. *J Rheumatol* 2003 Jul;30(7):1565-70.
2. Oliveria SA, Felson DT, Cirillo PA, Reed JI, Walker AM. Body weight, body mass index, and incident symptomatic osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Epidemiology* 1999 Mar;10(2):161-6.
3. Lawrence JS, Bremner JM, Bier F. Osteoarthritis. Prevalence in the population and relationship between symptoms and x-ray changes. *Ann Rheum Dis* 1966 Jan;25(1):1-24.
4. Cardiel MH, Rojas-Serrano J. Community based study to estimate prevalence, burden of illness and help seeking behavior in rheumatic diseases in Mexico City. A COPCORD study. *Clin Exp Rheumatol* 2002 Sep;20(5):617-24.
5. Anderson JJ, Felson DT. Factors associated with osteoarthritis of the knee in the first national Health and Nutrition Examination Survey (HANES I). Evidence for an association with overweight, race, and physical demands of work. *Am J Epidemiol* 1988 Jul;128(1):179-89.
6. Malemud CJ. Cytokines as therapeutic targets for osteoarthritis. *BioDrugs* 2004;18(1):23-35.
7. Moo V, Sieper J, Herzog V, Muller BM. Regulation of expression of cytokines and growth factors in osteoarthritic cartilage explants. *Clin Rheumatol* 2001;20(5):353-8.
8. Abramson SB, Attur M, Amin AR, Clancy R. Nitric oxide and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2001 Dec;3(6):535-41.
9. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991 Aug;21(4):361-74.
10. Clark IM, Powell LK, Ramsey S, Hazleman BL, Cawston TE. The measurement of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP), and collagenase-TIMP complex in synovial fluids from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1993 Mar;36(3):372-9.
11. Barnes PJ. Molecular biology. Inflammatory activities. *Nature* 1991 Jan 24;349(6307):284-5.
12. Brandt KD. Insights into the natural history of osteoarthritis provided by the cruciate-deficient dog. An animal model of osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1994 Sep 6;732:199-205.
13. Berenbaum F, Grifka J, Brown JP, Zacher J, Moore A, Krammer G, et al. Efficacy of lumiracoxib in osteoarthritis: a review of nine studies. *J Int Med Res* 2005 Jan;33(1):21-41.
14. Higgs GA, Moncada S, Vane JR. Eicosanoids in inflammation. *Ann Clin Res* 1984;16(5-6):287-99.
15. Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Apr 1;88(7):2692-6.
16. Psaty BM, Furberg CD. COX-2 inhibitors—lessons in drug safety. *N Engl J Med* 2005 Mar 17;352(11):1133-5.
17. Blot L, Marcelis A, Devogelaer JP, Manicourt DH. Effects of diclofenac, aceclofenac and meloxicam on the metabolism of proteoglycans and hyaluronan in osteoarthritic human cartilage. *Br J Pharmacol* 2000 Dec;131(7):1413-21.
18. Chan PS, Caron JP, Rosa GJ, Orth MW. Glucosamine and chondroitin sulfate regulate gene expression and synthesis of nitric oxide and prostaglandin E(2) in articular cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage* 2005 May;13(5):387-94.
19. Dodge GR, Jimenez SA. Glucosamine sulfate modulates the levels of aggrecan and matrix metalloproteinase-3 synthesized by cultured human osteoarthritis articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2003 Jun;11(6):424-32.
20. Nakamura H, Shibakawa A, Tanaka M, Kato T, Nishioka K. Effects of glucosamine hydrochloride on the production of prostaglandin E2, nitric oxide and metalloproteinases by chondrocytes and synoviocytes in osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2004 May;22(3):293-9.
21. Polisson R. Innovative therapies in osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2001 Dec;3(6):489-95.
22. Poolsup N, Suthisisang C, Channark P, Kittikuluth W. Glucosamine long-term treatment and the progression of knee

osteoarthritis: systematic review of randomized controlled trials. *Ann Pharmacother* 2005 Jun;39(6):1080-7.

23. Schurman DJ, Smith RL. Osteoarthritis: current treatment and future prospects for surgical, medical, and biologic intervention. *Clin Orthop Relat Res* 2004 Oct;(427 Suppl):S183-S189.

24. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* 1986 Aug;29(8):1039-49.

25. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982 Oct;126(1):131-8.

26. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990 Aug;36(8 Pt 1):1440-3.

27. Montrull HL, Brizuela NY, Demurtas SL, Spitale L, Meirovich CI. Structure and secretory activity of cultured chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Biocell* 2005 Aug;29(2):163-7.

28. Martel-Pelletier J, McCollum R, Fujimoto N, Obata K, Cloutier JM, Pelletier JP. Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Lab Invest* 1994 Jun;70(6):807-15.

29. Monfort J, Garcia-Giralt N, Lopez-Armada MJ, Monliau JC, Bonilla A, Benito P, et al. Decreased metalloproteinase production as a response to mechanical pressure in human cartilage: a mechanism for homeostatic regulation. *Arthritis Res Ther* 2006;8(5):R149.

30. Emery P. Clinical implications of selective cyclooxygenase-2 inhibition. *Scand J Rheumatol Suppl* 1996;102:23-8.

31. Vuolteenaho K, Moilanen T, Hamalainen M, Moilanen E. Regulation of nitric oxide production in osteoarthritic and rheumatoid cartilage. Role of endogenous IL-1 inhibitors. *Scand J Rheumatol* 2003;32(1):19-24.