

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

**“EFECTO DEL FACTOR DE TRANSFERENCIA SOBRE EL
PERFIL PROINFLAMATORIO Y ANTIINFLAMATORIO
DEL CARTILAGO ARTICULAR EN OSTEOARTRITIS
INDUCIDA EN RATA”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

PRESENTA:

MARÍA DEL PILAR ACOSTA RÍOS

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. NURY PEREZ HERNANDEZ

DR. GUILLEMO PEREZ ISHIWARA



MÉXICO D.F, 2011

COMITÉ TUTORIAL

M. en C. Beatriz Elisa Gallo Olvera

Dra. Elizabeth Pérez Hernández

Dra. María del Consuelo Gómez García

Dr. Juan Salas Benito



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de MEXICO DF siendo las 12 :00 horas del día 13 del mes de JUNIO del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ENMH para examinar la tesis titulada:

EFFECTO DEL FACTOR DE TRANSFERENCIA SOBRE EL PERFIL PROINFLAMATORIO Y ANTIINFLAMATORIO DEL CARTILAGO ARTICULAR EN OSTEOARTRITIS INDUCIDA EN RATA

Presentada por el alumno:

ACOSTA RIOS MARIA DEL PILAR
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)

Con registro:

A	0	9	0	0	1	0
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRIA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

DR DAVID GUILLERMO PEREZ ISHIWARA

DRA NURY PEREZ HERNANDEZ

DRA MARIA DEL CONSUELO GOMEZ GARCIA

DRA ELIZABETH PEREZ HERNANDEZ

DR JUAN SALAS BENITO

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

SECRETARIA DE EDUCACION PUBLICA
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE INVESTIGACION

DR CESAR AUGUSTO SANDINO REYES LOPEZ



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México DF el día 13 del mes de Junio del año 2011, el (la) que suscribe María del Pilar Acosta Rios alumno (a) del Programa de Maestría en Biomedicina Molecular con número de registro A090010, adscrito a Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Nury Perez Hernández y del Dr. David Guillermo Perez Ishiwara y cede los derechos del trabajo intitulado EFECTO DEL FACTOR DE TRANSFERENCIA SOBRE EL PERFIL PROINFLAMATORIO Y ANTIINFLAMATORIO DEL CARTÍLAGO ARTICULAR EN OSTEOARTRITIS INDUCIDA EN RATA, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección asirelativamente@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Nombre y firma

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Biomedicina Molecular I, de la sección de estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional. Bajo la dirección de la Dra. Nury Pérez Hernández y del Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara.

Durante el desarrollo de este trabajo se conto con la beca de maestría del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con la beca del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) del IPN, como parte del proyecto SIP-20100654. Además se conto con la beca Institucional de tesis del IPN.

AGRADECIMIENTOS

- A mis directores de tesis: A la Dra. Nury Pérez Hernández y al Dr. Guillermo Pérez Ishiwara, doy mi más profundo agradecimiento ya que siempre conté con su apoyo tanto en el ámbito académico como en el personal.
- A mis asesores de tesis: Dra. Elizabeth Pérez Hernández, Dra. María del Consuelo Gómez García y al Dr. Juan Salas Benito; por todo el empeño y tiempo dedicado a este trabajo.
- A mi asesora de tesis: M en C. Beatriz Elisa Gallo Olvera, por el apoyo siempre incondicional y por compartir conmigo esa pasión por el Factor de Transferencia. Muchas Gracias.
- Al laboratorio BIOEXPORT y a todo su equipo por la donación de unidades de factor de transferencia para este trabajo. En especial agradezco el apoyo al QBP. Bulmaro Esteban Correa Meza y al QBP. Carlos Pérez de la Mora, ya que sin ustedes la historia de los últimos 15 años de mi vida no se escribiría igual. Infinitas gracias.
- A todos los integrantes del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital de Ortopedia “Dr. Victorio de la Fuente Narvaes” Distrito Federal, en especial al Dr. Ayala, por permitirme hacer parte de mi trabajo en este lugar.
- A todas las personas que forman parte del laboratorio de Biomedicina Molecular I y del laboratorio de Productos Naturales I, por compartir conmigo esta experiencia; Gracias a Denisse, Rita, Elvia, Oli, Elvira y Elvia. Así mismo agradezco a mis compañeros de generación por el tiempo juntos; gracias a Laura, Leonel, Elibeth y Roberto.
- A la Dra Monica de Nova por apoyarme en este trabajo y por tener siempre un minuto para escucharme.
- Finalmente agradezco a todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

- Este trabajo está dedicado a mi familia. Gracias a mi mamá María de la Luz Ríos y a mi papá Luis Acosta, por creer en mí, y por apoyarme siempre en las buenas y malas, sin ustedes yo no sería lo que soy ahora.
- A mis hermanas Ana y Mimi; y a mis sobrinos que siempre están a mi lado alegrándome la vida.
- A la familia Gaspar, muchas gracias por su apoyo.
- En especial dedico este trabajo a los dos hombres de mi vida que me convirtieron en la mujer más feliz del mundo: Erik y Eric Gael.
- Gracias Erik por todo el amor que siempre me has dado, por confiar en mi y ser mi fuerza para seguir adelante, por apoyarme infinitamente en todo momento. Te amo.
- Gracias a mi niño Eric Gael por enseñarme que por ti vale la pena cualquier esfuerzo y cualquier desvelo, te amo y quiero que sepas que estaré a tu lado para apoyarte y quererte siempre.

ÍNDICE

	PAGINA
INDICE DE FIGURAS	i
INDICE DE TABLAS	ii
ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
1.INTRODUCCION	
1.1 EL CARTILAGO ARTICULAR	1
1.2 ESTRUCTURA DEL CARTILAGO ARTICULAR	1
1.3 LOS CONDROCITOS	3
1.4 LA MATRIZ EXTRACELULAR	4
1.4.1 EI LÍQUIDO TISULAR	5
1.4.2 MACROMOLECULAS DE LA MEC	5
1.4.3 PROTEINAS NO COLÁGENAS	6
1.4.4 RECAMBIO Y MANTENIMIENTO DE LA MEC	6
1.5 OSTEOARTRITIS	
1.5.1 DEFINICION	10
1.5.2 EPIDEMIOLOGIA	
1.5.2.1 PREVALENCIA	11
1.5.2.1 MORBILIDAD	11
1.5.3 ETIOLOGIA	12
1.5.4 FISIOPATOLOGIA DE LA OSTEOARTRITIS	13
1.5.5 TRATAMIENTO DE LA OSTEOARTRITIS	20
1.5.5.1 TRATAMIENTOS QUIRÚRGICOS	21
1.5.5.2 TRATAMIENTOS CONSERVADORES	22

1.6 FACTOR DE TRANSFERENCIA	
1.6.1 HISTORIA DEL FACTOR DE TRANSFERENCIA	26
1.6.2 EL FACTOR DE TRANSFERENCIA COMO AGENTE TERAPEUTICO	28
2. ANTECEDENTES	33
3. JUSTIFICACION	35
4. OBJETIVOS	36
4.1 OBJETIVO GENERAL	36
4.2 OBJETIVOS PATICULARES	36
5. MATERIAL Y MÉTODOS	
5.1 INDUCCIÓN DE OSTEOARTRITIS EN RATA	37
5.2 EVALUACION CLINICA	38
5.3 ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO	39
5.3.1 TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA PARA EVALUAR LA MORFOLOGIA CELULAR	40
5.3.2 TINCION CON SAFRANINA O PARA EVALUAR LOS PROTEOGLICANOS	41
5.3.3 TINCION CON TRICROMICO DE MASSON PARA EVALUAR LA COLAGENA	42
5.4 ANALISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESION DE CITOCINAS PRO- INFLAMATORIAS Y ANTI-INFLAMATORIAS	43
5.4.1 OBTENCION, ANALISIS Y CUANTIFICACION DEL RNA	43
5.4.2 SINTESIS Y CUANTIFICACIÓN DE cDNA	45
5.4.3 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA MULTIPLE (M-PCR)	46
5.4.4 RT-PCR MULPLE PARA CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS	46
5.4.5 RT-PCR MULPLE PARA CITOCINAS ANTI-INFLAMATORIAS	48
5.4.6 ELECTROFORESIS DE LA RT-PCR	50
5.4.7 TINCION DE GELES	50

5.5 INMUNOHISTOFLUORESCENCIA Y ANÁLISIS CON MICROSCOPIA CONFOCAL	50
6. RESULTADOS	52
6.1 INDUCCION DE OSTEOARTRITIS EN RATA	52
6.2 EVALUACIÓN CLÍNICA	54
6.3 ANALISIS MACROSCÓPICO	55
6.4 ANALISIS HISTOPATOLOGICO	58
6.4.1 EVALUACIÓN DE LA MORFOLOGIA CELULAR	58
6.4.2 EVALUACIÓN DE LA MEC (PROTEOGLICANOS)	60
6.4.3 EVALUACIÓN DE LA MEC (COLAGENA)	62
6.5 ANALISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESION DE CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS Y ANTI-INFLAMATORIAS	64
6.6 INMUNOHISTOFLUORESCENCIA Y ANÁLISIS CON MICROSCOPIA CONFOCAL	73
7. DISCUSION	78
8. CONCLUSIONES	89
9. PERSPECTIVAS	91
10. BIBLIOGRAFIA	92
ANEXO 1	102

INDICE DE FIGURAS

		PAGINA
Fig. 1	Representación gráfica de las zonas del cartílago articular adulto (Modificada de Kapoor <i>et al.</i> , 2011).	2
Fig. 2	Alteración de los factores anabólicos y catabólicos en OA (Modificada de Kapoor <i>et al.</i> , 2011).	20
Fig. 3	Modelo animal de OA. Incisión lateral en rodilla derecha	53
Fig. 4	Modelo animal de OA. Disección de menisco medial	53
Fig. 5	Análisis macroscópico de las articulaciones	57
Fig. 6	Valoración de la morfología celular mediante la tinción con hematoxilina y eosina.	60
Fig. 7	Valoración de Proteoglicanos mediante la tinción con safranina O	62
Fig. 8	Valoración de Colágena mediante la tinción con tricrómico de Masson	64
Fig. 9	Amplificación de un fragmento del gen de <i>actina</i>	67
Fig. 10	Calidad del cDNA sintetizado	69
Fig. 11	Expresión de citocinas anti-inflamatorias	70
Fig. 12	Expresión de citocinas pro-inflamatorias	71
Fig. 13	Inmunolocalización de FGF-2	74
Fig.14	Inmunolocalización de PDGF	75
Fig. 15	Inmunolocalización de IκB no fosforilada	76
Fig. 16	Inmunolocalización de NFκB.	77

INDICE DE TABLAS

	PAGINA
TABLA 1 Clasificación arbitraria de signos clínicos	38
TABLA 2 Tamaños moleculares de las citocinas pro-inflamatorias detectadas	48
TABLA 3 Tamaños moleculares de las citocinas anti-inflamatorias detectadas	49
TABLA 4 Puntaje obtenido de la clasificación arbitraria de signos clínicos	54
TABLA 5 Cuantificación de RNA por espectrofotometría	65
TABLA 6 Cuantificación de RNA tratado con DNAsas	66
TABLA 7 Cuantificación de cDNA	68

ABREVIATURAS

ADAMTS	Adamalinas
BMPs	Proteínas morfogénicas óseas
°C	Grados centígrados
CF	Con factor de transferencia
DNA	Acido desoxirribonucleico
FGF-2	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
FT	Factor de transferencia
GAGs	Glucosaminoglicanos
g	Gramos
h	Horas
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IL-21	Interleucina 21
IFN-γ	Interferón gamma
kDa	Kilodaltones
MEC	Matriz extracelular
min	Minutos
mL	Mililitros
μg	Microgramos
MMPs	Metaloproteasas

OA	Osteoartritis
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
RNA	Acido ribonucleico
SF	Sin factor de transferencia
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa

RESUMEN

La osteoartritis (OA) es una enfermedad articular degenerativa y progresiva caracterizada por la pérdida irreversible de cartílago con remodelación del área subcondral e inflamación de la membrana sinovial. Se considera como la artropatía más común en personas mayores de 65 años de edad y clínicamente se caracteriza por rigidez y dolor articular, limitación de la movilidad e inflamación local. Los tratamientos actuales solo le permiten al paciente modular el dolor y disminuir la inflamación. Sin embargo, no existe ningún tratamiento que regenere el cartílago articular dañado o detenga el proceso degenerativo. En la fisiopatogénesis de la enfermedad participan diversas citocinas pro- y anti-inflamatorias, que se han propuesto como blancos terapéuticos a través del uso inmunoterapias que podrían regular la acción de los factores anabólicos y catabólicos. El factor de transferencia (FT) se considera como un inmunomodulador, el cual se ha empleado en pacientes con OA. Las evidencias clínicas muestran la disminución de síntomas y la modulación del dolor. Sin embargo, no se cuenta con estudios moleculares que describan su mecanismo de acción. Por lo tanto en la presente tesis evaluamos histopatológicamente el efecto del FT en el desarrollo y progresión de la OA murina y su relación con el perfil pro-inflamatorio y anti-inflamatorio del cartílago articular. Se trabajó con ratas wistar, a los cuales se les indujo OA mediante menisectomía medial unilateral y ejercicios de alto impacto por 20 días. Posteriormente se sacrificaron y se extrajeron los cóndilo femorales y los platillos tibiales de la articulación afectada, se realizaron los análisis histopatológicos correspondientes, la detección de los niveles de expresión de citocinas pro- y anti-inflamatorias y la inmunolocalización de las citocinas pro- y anti-inflamatorias en el cartílago articular. Los resultados demostraron que los explantes de cartílago obtenidos de animales con OA tratados con FT no presentaron alteraciones en distribución y la arquitectura celular, no hubo presencia de displasia celular, ni agrupación de los condrocitos en clones. Así mismo también se evidenció una menor degradación de los componentes de la matriz extracelular (colágena y proteoglicanos), observándose características histológicas de mayor similitud a las del cartílago articular normal. En cuanto a la expresión de citocinas anti-inflamatorias mediante RT-PCR, el cartílago de animales con OA inducida sin tratamiento no mostró la expresión de FGF-2 y de IFN γ y se observó solamente una baja expresión de PDGF. Sin embargo, en los animales tratados con FT la expresión de las interleucinas anti-inflamatorias PDGF, IFN γ , FGF-2 incremento significativamente en comparación a lo observado en el cartílago sano. En la expresión de citocinas pro-inflamatorias el FT no modificó

la expresión de IL-1, sin embargo, observamos que la expresión de I κ B fue menor en comparación con las muestras de los animales sin tratamiento. El análisis de inmunohistofluorescencia mostro que las proteínas FGF-2 y PDGF, se localizaron en el cartílago normal y en el cartílago obtenido de animales con OA tratados con FT, correlacionando con lo encontrado en la RT-PCR, mientras que I κ B no fosforilada, la cual se mostró débilmente localizada en condrocitos de cartílago sano y en las muestras obtenidas de animales tratados con FT. Los resultados de este trabajo nos permite sugerir que el FT indúcela expresión de citocinas anti-inflamatorias y la disminución de algunas citocinas pro-inflamatorias, equilibrando de esta manera, la homeostasis perdida en los condrocitos para la regulación de los procesos catabólicos y anabólicos de la MEC.

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a progressive, degenerative joint disease characterized by irreversible loss of cartilage with subchondral area remodeling and inflammation of the synovial membrane. OA is the arthropathy considered the most common in people over 65 years old and is clinically characterized by stiffness and joint pain, limited mobility and local inflammation. Current treatments only modulate pain and reduce inflammation. However, there is no treatment to regenerate articular damaged. The pathophysiology of the disease involves the participation of various pro- and anti-inflammatory cytokines, which have been proposed as therapeutic targets through the use of immunotherapies to regulate the anabolic and catabolic pathways. The use of transfer factor (TF) in patients with OA, have showed regression of symptoms and modulation pain. However, there is no molecular studies that describe its mechanism of action. Therefore in this study we evaluate histologically the effect of FT in the development and progression of murine OA and its relationship to pro-inflammatory and anti-inflammatory articular cartilage profile. We used wistar rats, to induced OA by unilateral medial meniscectomy and high impact exercise for 20 days. The animals were killed, femoral condyle and tibial plateau of the affected joint was obtained to performed histopathological studies, expression analysis of pro-and anti-inflammatory and immunolocalization of both in the articular cartilage. The results showed that cartilage explants obtained from animals with OA treated with TF did not show changes in the distribution and the cellular architecture; there was no cellular dysplasia, or clustering of chondrocytes in clones. On the other hand a reduced degradation of extracellular matrix components (collagen and proteoglycans) was evidenced showing histological features more similar to normal articular cartilage. The expression of anti-inflammatory cytokines by RT-PCR, showed that the cartilage of animals with OA without treatment, no expression of FGF-2 and IFN γ was detected showing only low expression of PDGF. However, in animals treated with TF the expression of anti-inflammatory cytokines PDGF, IFN γ , FGF-2 significantly increased compared to that observed in healthy cartilage. That analysis of pro-inflammatory cytokines expression in FT treated animals did not displayed the expression of IL-1, however, we note that the expression of I κ B was lower than compared with samples from animals without treatment. The localitation and expression of immunohistofluorescence FGF-2 and PDGF in tissue, were found in normal cartilage and cartilage from OA animals treated with TF OA, correlating with the findings of the RT-PCR. Also similar weakly expression of unphosphorylated I κ B was also observed in healthy and OA TF treated their animals.

The results present here allows us to suggest that FT promotes a mechanism of action by increasing the expression of anti-inflammatory cytokines and reduction of some pro-inflammatory cytokines, thereby balancing the loss OA chondrocyte homeostasis for regulation of anabolic and catabolic processes of the ECM.

1. INTRODUCCION

1.1 EL CARTILAGO ARTICULAR

El cartílago articular es un tejido conjuntivo especializado avascular, alinfático y aneural, que cubre los componentes óseos de las articulaciones diartrodiales. Este tejido permite amortiguar y minimizar las fuerzas de tracción y compresión generadas por el movimiento de la articulación. El cartílago y el líquido sinovial facilitan el deslizamiento de las superficies articulares y distribuyen las cargas sobre el hueso adyacente. Los nutrientes y el oxígeno se difunden desde el líquido sinovial y el hueso subcondral. El cartílago consta de una matriz extracelular (MEC) compuesta en su mayor parte de agua, colágena y proteoglicanos; y una sola línea celular, los condrocitos, los cuales constituyen el 1.65% del volumen total del tejido (Martel-Pelletier *et al.*, 2008).

1.2 ESTRUCTURA DEL CARTILAGO ARTICULAR

El cartílago articular consta de cuatro zonas horizontales donde la estructura, la composición, el volumen y la forma celular son variables; así como el diámetro y la orientación de las fibras de colágena; y la concentración de proteoglicanos es diferente de acuerdo a la zona en la que se encuentran. Estas zonas son, desde la superficie hacia el hueso subcondral: superficial, media o transicional, profunda o radial y calcificada (Martel-Pelletier *et al.*, 2008). (Fig.1)

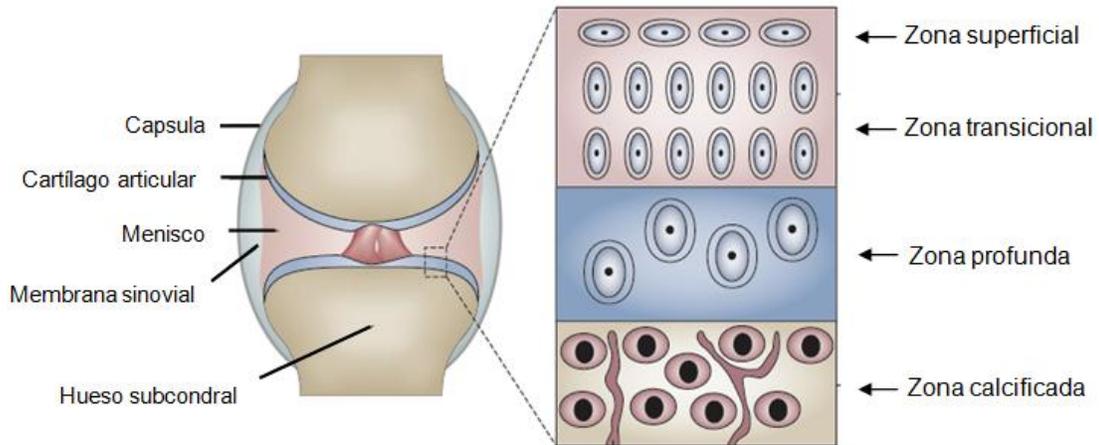


Fig. 1. Representación gráfica de las zonas del cartílago articular adulto (Modificada de Kapoor *et al.*, 2011).

La zona superficial, constituye el área de deslizamiento articular, es la más delgada y consta de condrocitos elongados y dispuestos paralelamente a la superficie. Las fibras de colágeno son delgadas y se disponen de manera tangencial; el contenido de proteoglicanos es el más bajo de todo el cartílago y es la zona con mayor contenido de agua (Vega *et al.*, 2002).

La zona transicional o media constituye del 40 al 60% del peso total del cartílago; esta es la zona con mayor concentración de proteoglicanos y menor cantidad de agua. Las fibras de colágeno tienen mayor diámetro y están dispuestas radialmente. En esta zona los condrocitos son esféricos rodeados por MEC y dispuestos en columnas (Vega *et al.*, 2002).

La zona profunda, constituye el 30% del volumen de la MEC; los condrocitos se disponen en columnas perpendiculares a la superficie del cartílago y el volumen

celular es muy bajo. Esta zona contiene la mayor cantidad de fibras de colágena con disposición radial y el mayor porcentaje de agreganos. Es el area con menor cantidad de agua (Vega et al ., 2002).

La zona calcificada separa el hueso subcondral del cartílago articular, está constituida por condrocitos pequeños y redondeados, localizados en lagunas no calcificadas. Las fibras de colágena se disponen perpendicularmente a la superficie articular, ancladas a la matriz calcificada y carece de proteoglicanos (Vega et al ., 2002).

1.3 LOS CONDROCITOS

Los condrocitos son células altamente diferenciadas y especializadas que derivan de células mesenquimales con capacidad limitada de proliferación y una vida media muy larga. Su tamaño, forma y actividad metabólica varían según la zona del cartílago donde se encuentren. Ocupan aproximadamente el 1 % del volumen tisular total y producen los componentes de la MEC como colágena, proteoglicanos y proteínas no colágenas dentro de una estructura altamente ordenada. Estas células no tienen contacto entre sí, ni están vinculadas con el exterior por lo que se nutren con el líquido sinovial. Los condrocitos son sensibles a los cambios estructurales de la matriz y a las demandas de carga de la superficie articular, estos eventos condicionan alteraciones sobre su metabolismo, favoreciendo o limitando la síntesis de las macromoléculas estructurales, contribuyendo así en el mantenimiento de este tejido (Huber et al ., 2000).

1.4 LA MATRIZ EXTRACELULAR

La MEC representa entre el 20 y el 40% del peso húmedo del cartílago articular. Presenta grandes diferencias según las zonas en las que se divide el cartílago articular. Consta de dos componentes principales, el líquido tisular y una red de macromoléculas estructurales, como la colágena, los proteoglicanos y, en menor medida, proteínas no colágenas como laminina, integrina y fibronectina, que dan forma y estabilidad al tejido (Huber *et al.*, 2000).

Alrededor de cada condrocito, la matriz extracelular está dividida en diferentes regiones que se denominan desde la célula hacia la periferia: región pericelular, región territorial y región interterritorial. Estas regiones presentan diferencias estructurales y distribución específica de proteoglicanos; la matriz pericelular contiene gran concentración de proteoglicanos sulfatados hialuronato y biglicanos. El condrocito y su ambiente pericelular representan un condrón. La matriz territorial, se encuentra bien definida en las zonas transicional y profunda del cartílago. Las fibras de colágena en estas zonas son de diámetro ancho y radiales mientras que la concentración de condroitin-sulfato es la más alta en esta región. Finalmente la matriz interterritorial posee la cantidad más alta de keratan-sulfato y las fibras de colágena de diámetro ancho se encuentran formando arcos (Huber *et al.*, 2000).

1.4.1 LÍQUIDO TISULAR

El líquido tisular contiene agua, electrolitos, glucosa y proteínas pequeñas. La concentración más alta de agua se encuentra cerca de la capa superficial y disminuye gradualmente hacia la capa profunda (Huber *et al.*, 2000).

1.4.2 MACROMOLECULAS DE LA MEC

La colágena forma una red que corresponde del 50-60% del peso seco de la MEC y simula el endoesqueleto del cartílago. El diámetro de las fibras de colágena varía desde 20 nm en la zona superficial de 70-120 nm en la zona profunda. Las fibras de colágena más abundantes son de tipo II, sin embargo también se encuentran aunque en menor proporción, colágenas tipo III, VI, X, XI, XII y XIII. Las colagenas de tipo II IX y XI forman una heterofibrilla que confiere la estructura del cartílago articular. La colágena de tipo II forma el volumen principal de la fibrilla, la del tipo XI condiciona el diámetro de las mismas y la de tipo X interviene en el soporte estructural además de facilitar la interacción con los proteoglicanos. (Eyre *et al.*, 2006).

Los proteoglicanos, son glicoproteínas que proporcionan al cartílago la capacidad de resistencia a la compresión y contribuyen a su durabilidad. Los proteoglicanos constituyen la segunda macromolécula proporcional en la MEC después de la colágena. Los constituyentes básicos de los proteoglicanos son los glicosaminoglicanos (GAGs). Los GAGs son cadenas largas y flexibles de unidades repetidas de disacáridos con la fórmula general (azúcar- ácido-aminoazúcar)_n. Los GAGs que se encuentran en cartílago se denominan: keratán

sulfato, condroitín-4-sulfato y condroitín-6-sulfato. Un extremo de cada GAG sulfatado se enlaza al núcleo de una proteína de 250 nm de largo. En cada núcleo se pueden acomodar hasta 30 GAGs. Estos monómeros de proteoglicanos posteriormente se enlazan a intervalos de entre 25 y 2500 nm a lo largo de la molécula de ácido hialurónico para dar lugar a una estructura tipo cepillo que se une a la colágena. Dentro de los proteoglicanos, el agregano es el más abundante en el cartílago articular (Huber *et al.*, 2000).

1.4.3 PROTEÍNAS NO COLÁGENAS.

En la MEC existen proteínas como fibronectina, laminina e integrina, que tienen como función unir los condrocitos a la matriz extracelular; estas proteínas también interaccionan con receptores celulares permitiendo la migración, proliferación y diferenciación de los condrocitos. Otras proteínas contenidas en la matriz del cartílago son: la proteína de la matriz oligomérica de la colágena, la glicoproteína gp39 y la tenascina, así mismo se encuentra la ancorina CII, la cual es una proteína no colágena que ayuda al anclaje de los condrocitos a las fibras de colágena. (Martel-Pelletier *et al.*, 2008).

1.4.4 RECAMBIO Y MANTENIMIENTO DE LA MEC.

El recambio y mantenimiento de la MEC del cartílago está regulado por los condrocitos, a través de procesos anabólicos, catabólicos, y por la acción de citocinas reguladoras que estimulan la síntesis y degradación de esta.

Los factores anabólicos son capaces de mantener la homeostasis del cartílago y estimular su reparación. Estos factores son polipéptidos que promueven la síntesis de colágena y proteoglicanos y contrarrestan los efectos destructivos generados por los factores catabólicos sobre el cartílago. En esta categoría se encuentran el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs); el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) y el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) (Blom *et al.*, 2007).

El TGF- β es un factor de crecimiento multifuncional que regula la proliferación celular y la síntesis de MEC. Su principal función es la inhibición de la síntesis de las metaloproteasas de matriz (MMPs) MMP-9 y MMP-1 (Martel-Pelletier *et al.*, 2008).

Las BMPs son potentes inductores de la formación del hueso y del cartílago, también promueven la síntesis de MEC y el crecimiento de los condrocitos. BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, BMP-9 y BMP-13 estimulan la síntesis de colágena de tipo II y del agregano (Martel-Pelletier *et al.*, 2008).

El IGF-1 es un factor homeostático, que interviene en la síntesis de MEC y en la actividad mitótica de los condrocitos. Además promueve la síntesis de proteoglicanos y colágena de tipo II (Martel-Pelletier *et al.*, 2008).

El FGF incluyen al FGF-2, FGF-4, FGF-8, FGF-9, FGF-10 y FGF-18, así como los receptores FGFR1, FGFR2 y FGFR3. El más importante es el FGF-2 o FGF-b, ya que promueve la síntesis de proteoglicanos y la síntesis de colágena, además de ser un mitógeno potente para condrocitos (Martel-Pelletier *et al.*, 2008).

Los factores catabólicos incluyen a la interleucina 1 (IL-1), al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), a la interleucina 6 (IL-6), a la interleucina 17 (IL-17), a la interleucina 18 (IL-18) y a la interleucina 21 (IL-21); estos factores son los responsables de la degradación de la MEC, ya que tienen un marcado efecto supresor sobre la síntesis de proteoglicanos, seguido por la destrucción de la red de colágena. Esto se observa cuando los factores catabólicos, estimulan a los condrocitos para liberar MMPs (Blom *et al.*, 2007).

Las MMPs o matrixinas constituyen una familia de Zinc-endopeptidasas estructuralmente relacionadas que median la degradación de los diversos componentes de la MEC. Estas proteasas en el cartílago articular se dividen en grupos basados en su especificidad celular: colagenasas, estromelinas, gelatinasas, MMPs de tipo membranal (MT-MMP) y adamalinas (ADAMTS) (Martel-Pelletier *et al.*, 2008).

Las colagenasas, MMP-1, MMP-8, y MMP-13, son las responsables de la degradación de colágena; MMP-1 y MMP-8 realizan esta función sobre todo en la zona superficial, mientras que la MMP-13 en la zona media y profunda (Martel-Pelletier *et al.*, 2008).

Las estromelinas MMP-3 y MMP-10, tienen una amplia especificidad de sustratos, que incluye los proteoglicanos, fibronectina, elastina y laminina. MMP-3, también actúa degradando colágena de tipo IX y está implicada en la cascada enzimática responsable para la activación de proMMP-1 (Martel-Pelletier *et al.*, 2008).

Dos gelatinasas se han encontrado en los tejidos articulares: la MMP-9 y MMP-2 y están implicadas en la desnaturalización de la colágena tipo II, IV y V; y la gelatina. (Martel-Pelletier *et al.*, 2008).

En el subgrupo MT-MMP se han identificado y designado varias proteasas denominadas MT1, MT6 y MMP. Estas se caracterizan por un dominio transmembranal en el C-terminal, actúan en la superficie celular y están implicadas en la degradación de la matriz extracelular por poseer actividad de colagenasa y de agrecanasa (Martel-Pelletier *et al.*, 2008).

La familia de ADAMTS están relacionadas con la degradación de agrecano, por lo que también se les conoce como agrecanasas, se denominan, ADAMTS-4 y ADAMTS 5 (Martel-Pelletier *et al.*, 2008).

Otras proteasas que actúan como factores catabólicos son las serina- proteasas y thiol-proteasas. Las serina-proteasas convierten el plasminógeno en plasmina, teniendo esta última el potencial para degradar proteoglicanos, así como para activar las MMPs. Las Thiol proteasas están implicadas en la degradación de macromoléculas de la MEC en la región pericelular, donde el pH de la matriz es ácido (Martel-Pelletier *et al.*, 2008).

La IL-1 es la responsable de aumentar la expresión de MMP-1, MMP-3, y MMP-13 teniendo un efecto supresor de la colágena tipo II y del agrecano, además induce la producción de IL-6. Por su parte, el TNF α suprime la síntesis de proteoglicanos y de la colágena tipo II en el condrocito. La IL-6 aumenta la

expresión de MMP-1 y MMP-3; mientras que la IL-17 y la IL-18 aumenta la producción de óxido nítrico y prostaglandina E2 (Kapoor *et al.*, 2011).

Por otra parte, algunas citocinas ejercen acciones reguladoras con el fin de mantener la integridad de la MEC: la IL-4, IL-10 y la IL-13 neutralizan los efectos de la IL-1 provocando la disminución de la síntesis de MMPs, además la IL-4 minimiza la síntesis de óxido nítrico y de prostaglandina E2 (Kapoor *et al.*, 2011).

La mala interacción entre diversos factores ambientales y los factores moleculares, desencadenan la degradación excesiva de la MEC y pérdida del cartílago articular, esto genera en los condrocitos, la imposibilidad de mantener el balance homeostático entre la síntesis y degradación de la MEC; lo que conducirá al desarrollo de patologías articulares como la osteoartritis (OA). (Kapoor *et al.*, 2011).

1.5 OSTEOARTRITIS

1.5.1 DEFINICION

La OA es una enfermedad articular degenerativa y progresiva caracterizada por la pérdida irreversible de cartílago con remodelación del área subcondral e inflamación de la membrana sinovial. Clínicamente, la OA se caracteriza por rigidez y dolor articular, limitación de la movilidad, crepitación, y grado variable de inflamación local. (Martel-Pelletier *et al.*, 2008).

La OA afecta principalmente a las articulaciones que soportan mayor peso y/o que desarrollan un mayor esfuerzo; estas articulaciones se encuentran en manos,

cadera, rodillas, hombros, cuello y columna lumbosacra. La OA afecta a toda la articulación, incluyendo el hueso subcondral, los meniscos, los ligamentos, la cápsula articular, la membrana sinovial y el músculo periarticular (Paz *et al.*, 2002).

1.5.2 EPIDEMIOLOGIA DE OA

1.5.2.1 PREVALENCIA

La OA es la artropatía de mayor prevalencia en todo el mundo y la causa más frecuente de discapacidad para la deambulaci3n. Seg3n la OMS, las enfermedades articulares representan el tercer problema de salud m3s importante en los pa3ses desarrollados y, entre ellas, la OA es la m3s frecuente ya que afecta al 80% de la poblaci3n mayor de 65 a3os. La prevalencia se incrementa dram3ticamente con la edad y se ve aumentada en el sexo femenino. (Arden *et al.*, 2006).

1.5.2.3 MORBILIDAD

La OA afecta no solo el funcionamiento f3sico del paciente, tambi3n afecta su bienestar psicol3gico. La OMS estima que el 80% de las personas con OA est3n restringidas en sus movimientos y el 25% no puede realizar las actividades cotidianas, por lo tanto, esta patolog3a produce un costo social y econ3mico de gran magnitud por la p3rdida de horas laborables y el alto consumo de f3rmacos (Paz *et al.*, 2002).

1.5.3 ETIOLOGIA

La OA tiene una etiología multifactorial, en donde se involucran factores biomecánicos y factores sistémicos. Dentro de los factores biomecánicos se encuentran la obesidad, los ejercicios de alto impacto como el atletismo, y los traumatismos en las articulaciones. Dentro de los factores sistémicos se encuentran la edad y el género, la influencia endocrina, los factores genéticos y la desnutrición. (Martel-Pelletier *et al.*, 2008).

Particularmente el descubrimiento de mutaciones en el gen que codifica para la colágena tipo II, en ciertas familias que padecían un caso múltiple de OA precoz familiar, supuso la relación de factores genéticos en ciertas formas de OA precoz. La OA generalizada muchas veces está condicionada por factores genéticos, se transmite de forma dominante en la mujer y recesiva en el hombre (O'Connor *et al.*, 2007).

Por otro lado, el estudio de los polimorfismos de nucleótidos únicos (SNPs) ha permitido correlacionar ciertas variantes genéticas con la fisiopatogénesis de este padecimiento. Se han identificado SNPs en genes que codifican para el TGF- β y para las BMPs, estos SNPs se relacionan con la presencia de malformaciones esqueléticas como la hiperlaxitud articular, que predispone el desarrollo temprano de la OA. (Lories *et al.*, 2011).

1.6 FISIOPATOLOGIA DE LA OA

La fisiopatología de la OA, inicia en el momento en el que los factores ambientales alteran el metabolismo fisiológico del cartílago. Comprende desde las primeras fases de OA, en donde los condrocitos proliferan formando clones, a medida de que hay degradación de las capas superficiales del cartílago y alteración de la MEC. El examen macroscópico de una articulación con OA muestra una superficie articular granulosa más blanda de lo normal, desprendimiento de porciones de todo el espesor del cartílago hasta dejar al descubierto placas de hueso subcondral que se convierten en una nueva superficie articular. Simultáneamente, el hueso esponjoso subyacente se condensa y esclerosa, y en los bordes de la pared articular aparecen osteofitos y se hace evidente la pérdida de espacio interarticular (Paz *et al.*, 2002).

Los condrocitos desempeñan un papel primordial en estos procesos y constituyen la base celular de la enfermedad. Durante la patogénesis de la OA, los condrocitos responden a estímulos adversos promoviendo la degradación de la MEC y regulando negativamente los procesos para la reparación. Como consecuencia los condrocitos sufren cambios fenotípicos a los que se les ha denominado como “transdiferenciación” (Kouri *et al.*, 2006). Este fenómeno está relacionado con los cambios que sufren las estructuras celulares como son la disrupción del citoesqueleto y el incremento tanto del retículo endoplásmico rugoso como del Complejo de Golgi. Así mismo, también se relaciona con el desequilibrio de las actividades bioquímicas y moleculares de los condrocitos; en este contexto el aumento de citocinas inflamatorias como IL-1 β y TNF- α , favorecen la producción

de MMPs, y el aumento en la síntesis de óxido nítrico (ON) y las prostaglandinas, lo que promueve la degradación de la matriz extracelular y la muerte celular programada (condroptosis) (Kouri *et al.*, 2006).

Diversos estudios muestran una clara relación entre la progresión del daño al cartílago articular y el aumento de citocinas inflamatorias que incluyen a la IL1- β , TNF- α ; IL-6; IL15, IL-17, IL-18 y IL-21 (Kapoor *et al.*, 2011).

La IL-1 β es el principal mediador de la destrucción del cartílago articular. Dentro de los cambios moleculares encontrados en la OA, esta citocina pro-inflamatoria, disminuye la producción de la MEC estimulando la síntesis y activación de las MMPs 1, 3 y 13 y por tanto con la pérdida de la relación matriz-células, lo que conlleva a la muerte celular por condroptosis debido a la pérdida de mecanismos de supervivencia, a la activación de moléculas pro-apoptóticas y al aumento en la síntesis de otras citocinas pro-inflamatorias como la IL-6 (Baugé *et al.*, 2008). Adicionalmente la IL-1 disminuye significativamente la síntesis de proteoglicanos, este efecto lo logra suprimiendo la síntesis de 3-glucuroniltransferasa, la cual es una enzima clave en la biosíntesis de glicosaminoglicanos vinculados al agregano. (Gouze, J. N. *et al.*, 2001).

La IL-1 β se une a dos tipos específicos de receptores membranales: la unión de IL-1 β con el receptor tipo I (IL-1RI) produce un cambio conformacional del receptor generando la transducción de una señal, en tanto que el receptor tipo II (IL-1RII) capta la IL-1 β , pero no transduce la señal. El receptor tipo I (IL-1RI) es responsable de todos los efectos biológicos de la IL-1 β , una glicoproteína

transmembranal monomérica de 80 kDa, que se expresa constitutivamente en los condrocitos. Si bien la unión de IL-1 β a IL-1RI es necesaria pero no es suficiente para producir actividad biológica, ya que se requiere del reclutamiento de la proteína accesoria del receptor de IL-1 denominada IL-1RacP. Esta es una proteína de 570 aminoácidos, homóloga de ambos receptores. El receptor IL-RII es una glicoproteína de 68-kDa con un dominio intracitoplasmático pequeño, en comparación con IL-1RI, y se expresa constitutivamente en condrocitos. Como se mencionó anteriormente IL-1RII capta la IL-1 β , pero no produce señalización intracelular, compitiendo con IL-1RI por IL-1 β y modulando de esta manera su actividad (Martel-Pelletier, *et al.*, 1992).

La dimerización del dominio citosólico de IL-1RI y de IL-1RacP es necesaria para el reclutamiento de las protein-quinzas asociadas a IL-1R (IRAK-1, IRAK-2, IRAK-M) y el reclutamiento de la proteína adaptadora MyD88. Luego, IRAK se disocia de este complejo y se asocia con el factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF-6). Posteriormente, se activa una cascada de múltiples fosforilaciones y desfosforilaciones secuenciales de diferentes quinasas (como las protein-quinzas activadas por estrés, denominadas SAP-quinzas, las cuales resultan en la activación de proteínas que participan en la traducción y traslocación de factores de transcripción particularmente NF-kB y AP-1 al núcleo (Saklatvala., 2007). Alternativamente, a través de la proteína asociada a TRAF-6, ECSIT (intermediario de señalización evolutivamente conservado en las vías Toll), se produce una señal diferente que lleva a la activación de c-jun mediante el sistema de señalización MAP quinasa / JNK (Saklatvala., 2007)

El NF- κ B es un factor de transcripción que regula la expresión de genes que codifican moléculas de adhesión, citocinas y receptores inmunológicos, comprende hetero y homodímeros de la familia NF κ B/Rel: p65(Re1A), Re 1B, C-Re1, p50 (NF κ B1) y p52 (NF κ B2). Las formas abundantes de NF κ B son los heterodímeros p65 y p50. En estado basal estos heterodímeros se unen a la proteína inhibitoria I κ B en sus dos formas principales α y β . Este trímero se encuentra principalmente en citoplasma, sin embargo cuando las I κ B cinasas (IKK) se activan por efecto de la señalización de IL-1, por ejemplo, el complejo IKK, trímero de IKK α junto con NEMO/IKK γ , fosforilan a I κ B α para su rápida ubiquitinación y degradación. Esto ocasiona que el dímero de NF κ B se transloque a núcleo. Una vez en el núcleo NF κ B se une a sitios específicos de las regiones promotoras de los genes pro-inflamatorios, promoviendo así su transcripción. NF- κ B estimula la expresión de genes que codifican citocinas como TNF- α , IL-1, IL-6, e IL-12; así mismo estimula la expresión de genes que codifican para E-selectina, moléculas de adhesión VCAM-1, ICAM-1, eolaxina y enzimas inducibles como COX-2, la fosfolipasa A tipo 2 (PLA2) e iNOS. NF- κ B también incrementa la expresión de moléculas importantes en la regulación de la proliferación celular y apoptosis, tales como: el factor inhibidor de la apoptosis celular (c-IAP1 y c-IAP2), Bcl-2, Fas, c-myc y ciclina D1 (Saklatvala., 2007).

Otra citocina fuertemente relacionada en el desarrollo de OA es el TNF- α . La señalización intracelular mediada por TNF- α se da a través de interacciones con dos de sus receptores: TNFR1 (p55) y TNFR2 (p75). Estos receptores forman dímeros en la superficie celular donde se unen a una molécula de TNF- α trimérica

y así inician la transducción de señales. Existen 2 formas de TNF- α , una monomérica y otra trimérica, ésta última puede ser soluble o bien, un elemento transmembranal. La forma soluble se une a ambos receptores de TNF- α , mientras que el elemento transmembranal, envía señales sólo por medio del receptor TNFRII. Específicamente, en condrocitos con OA, el TNFRI es el receptor dominante en comparación con condrocitos sanos (Kapoor *et al.*, 2011; Barnes *et al.*, 1997).

Tras la fijación a sus receptores, el TNF- α induce al menos tres vías de señalización: una vía induce a la apoptosis por la intermediación de caspasas, otra activa las MAP-quinasas y la producción del factor de transcripción AP-1 involucrado en la proliferación celular, y la tercera vía activa al NF- κ B, regulando la expresión de citocinas pro-inflamatorias. (Barnes *et al.*, 1997).

Particularmente en OA, el TNF- α reduce la expresión de la colágena tipo II y disminuye la expresión de agregano, así mismo, se ha demostrado que TNF- α suprime la síntesis de otros proteoglicanos. Esta citocina estimula a los condrocitos para liberar varias enzimas proteolíticas, entre las que se encuentran las MMP1 (Colagenasa intersticial), MMP3 (Estromelisina 1) y MMP13 (Colagenasa 3). También el TNF- α también induce la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), principalmente ON y el anión superóxido que genera hidrógeno, peróxido, peroxinitrito y los radicales hidroxilo, que contribuyen a la degradación del cartílago. Por otro lado el TNF- α en conjunto con la IL-1, disminuye la expresión de los antioxidantes que son enzimas que limpian las

especies reactivas de oxígeno, incluyendo la superóxido dismutasa, peroxidasa, catalasa y glutatión (Westacott *et al.*, 1994).

La IL-17, IL-18 e IL-21 son mediadores que también juegan un papel importante en el proceso de OA. Estas citocinas aumentan la síntesis del ON y la prostaglandina E2. Particularmente el ON produce una gran cantidad de ROS, y altos niveles de nitritos, ello puede atribuirse a un aumento de expresión de ON sintasa inducible (iNOS). El ON también participa en la promoción del catabolismo en la OA a través de una serie de mecanismos, incluyendo la inducción de la inflamación sinovial, la inhibición de la síntesis de macromoléculas de la matriz, como agreganos, aumento en la actividad de las MMPs, y la reducción de la síntesis del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra), por los condrocitos (Kapoor *et al.*, 2011).

Otros moléculas implicados en la OA son la PGE2, la oncostatina M (OSM) y fibronectina. El aumento de la síntesis de prostaglandina E2 juega un papel importante en la exacerbación de la inflamación articular ya que afecta a los tejidos articulares, al actuar como un regulador autócrino y estar relacionado con la producción de las MMPS. Por otro lado, el aumento en la síntesis de Oncostatina M y fibronectina, ocasiona la expresión de la colagenasa y agreganasa; este papel se debe a que éstas moléculas se relacionan de manera sinérgica con IL-1, TNF α e IL-17 (Barksby *et al.*, 2006).

Una vez activados estos factores catabolicos, existe un aumento en la síntesis de las MMPs, siendo estas las responsables de la degradación de las

macromoléculas de la MEC, desencadenando fibrosis irreversible. En este momento los condrocitos son incapaces de sintetizar correctamente los factores anabólicos, entre ellos, el FGF, TGF- β y IGF-1; dando como resultado un desbalance importante en la síntesis de los componentes de la MEC (Shimoaka *et al.*, 2002).

Finalmente, el desequilibrio en estos procesos permite el incremento de las concentraciones iónicas, aumenta el pH y la presión osmótica; se intensifica la degradación de colágena y el tamaño del agregado es reducido. La degradación de los proteoglicanos es importante y la síntesis de colágena tipo II es deficiente. Ante estos cambios, la red de colágena dañada no puede soportar el aumento de la presión osmótica, provocando el ablandamiento del tejido, dando como resultado la destrucción progresiva del cartílago, con remodelación del área subcondral e inflamación de la membrana sinovial (Fig. 2) (Shimoaka *et al.*, 2002).

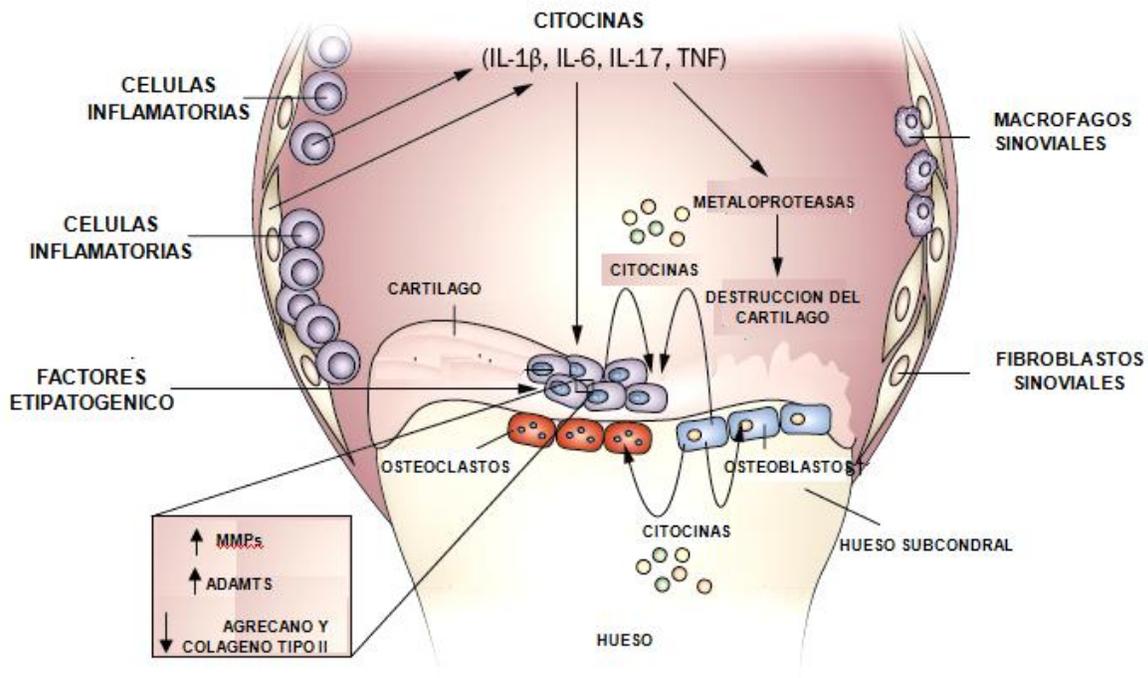


Fig. 2. Alteración de los factores anabólicos y catabólicos en OA (Modificada de Kapoor *et al.*, 2011).

1.7 TRATAMIENTO DE LA OA

A pesar de que se conocen las alteraciones moleculares implicadas en la OA, los tratamientos para esta patología son paliativos ya que no regeneran totalmente el cartilago (Joern *et al.*, 2010).

Los tratamientos actuales están divididos en dos categorías: tratamientos quirúrgicos y tratamientos conservadores.

1.7.1 TRATAMIENTOS QUIRÚRGICOS

Los tratamientos quirúrgicos están indicados sólo cuando todos los tratamientos conservadores se han intentado, sin éxito, en los pacientes con artrosis avanzada y grave aumento de sus síntomas.

La mayoría de las operaciones intra-articulares se realizan a través de un artroscopio. Las principales ventajas de los procedimientos artroscópicos son importantes ya que ofrecen mínimo trauma quirúrgico y una tasa de infección muy baja (menos de 0,1%). El propósito de la artroscopía es la liberación de detritos y mediadores de la inflamación. Sin embargo, cuando la artroplastia no mejora la calidad de vida del paciente, se recurre a la condroplastía, que consiste en extraer cartílago desgastado y fragmentado, sin embargo, esta técnica no da más que un beneficio a largo plazo y no disminuye el dolor (Moseley *et al.*, 2002).

El desbridamiento, descrito en 1941 por Magnuson como "la artroplastia de limpieza" sirve para liberar detritos y mediadores de la inflamación. También es útil para el tratamiento de posibles daños del menisco, sin embargo es poco utilizada debido a que no ofrece grandes ventajas sobre la artroplastia (Magnuson *et al.*, 1941).

Otra terapia quirúrgica conocida como "hueso estimulante" está basada en abrir el cartílago subcondral y con ello se pretende potenciar células pluripotenciales desde hueso hacia la superficie de la articulación. Los estudios no han revelaron diferencias significativas entre los diversos métodos que se utilizan y este método (Matsunga *et al.*, 2007).

El trasplante de condrocitos autólogos es otra terapéutica quirúrgica; se describió en 1984 por Brittberg. En esta técnica, se extrae cartílago de una articulación y los condrocitos son enzimáticamente aislados y cultivados *ex vivo*, para después volver a colocarlos en la articulación afectada particularmente en el sitio del defecto del cartílago. Sin embargo, los resultados a largo plazo aún no están disponibles para documentar la supervivencia de las células del cartílago reimplantadas (Brittberg *et al.*, 1984).

En el trasplante osteocondral autólogo (PTU), también llamado mosaicoplastia, consiste en tomar una parte de cartílago de la articulación que no es la afectada y, a continuación se inserta en la articulación afectada particularmente en el sitio de la lesión; al parecer esta opción quirúrgica brinda mayores beneficios a largo plazo que el trasplante de condrocitos autólogos (Hangody *et al.*, 2004).

La última opción quirúrgica para el tratamiento de OA es artroplastia, en donde se reemplaza el cartílago articular por una prótesis, sin embargo desafortunadamente en la mayoría de los pacientes, la movilidad de la articulación resulta limitada (Joern *et al.*, 2010).

1.7.2 TRATAMIENTOS CONSERVADORES

Los tratamientos conservadores de la OA están basados en un esquema terapéutico por etapas, que se aplican de forma individual dependiendo de la gravedad y la presentación de los síntomas. Este tipo de tratamientos están ampliamente descritos en la guía para el tratamiento de OA, que fue publicada por la Sociedad Alemana de Ortopedia y Cirugía Ortopédica (Deutsche Gesellschaft

für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie) y la Asociación Alemana de Profesionales de Ortopedistas y Cirujanos de Traumatología (der Berufsverband Orthopädie für Ärzte Traumatologie und) (Joern *et al.*, 2010).

Los objetivos del tratamiento conservador están encaminados a modular el dolor, mejorar la movilidad y la deambulaci3n, mejorar la calidad de vida del paciente, y el retraso en la progresi3n de la OA. Es importante por tanto, la educaci3n del paciente, el ajuste del estilo de vida, y cuando est3 indicado, la p3rdida de peso. Se debe evitar cualquier factor que pueda causar estr3s excesivo y perjudicial en la articulaci3n (Chodosh *et al.*, 2005).

La fisioterapia consiste en la aplicaci3n de ultrasonido, electroterapia, estimulaci3n muscular, aplicaci3n de calor y fr3o, acupuntura, ejercicios de estiramiento y tracci3n; todos con la finalidad de modular la inflamaci3n y disminuir el dolor. As3 mismo se puede usar aparatos ortop3dicos sobre todo en OA de cadera, rodilla y tobillo; dentro de estos aparatos destacan el uso de amortiguadores de talones (que proporciona una funci3n de amortiguaci3n) y cu3as para elevar el lado exterior o interior del zapato, corrigiendo as3 el eje vertical de la cadera, hasta mejorar la tensi3n mec3nica de la parte afectada de la articulaci3n (Pollard *et al.*, 2008).

El tratamiento conservador incluye el uso de medicamentos para tratar el dolor en la articulaci3n afectada por OA, entre los cuales est3n los analg3sicos anti-inflamatorios, glucocorticoides, opioides, medicamentos sintom3ticos de acci3n lenta para la OA (SYSADOA) y anti-citocinas.

El uso crónico de analgésicos para tratar OA representa riesgos específicos debido a su mecanismo de acción ya que inhiben la secreción de prostaglandinas a través de la inhibición de la COX en una o ambas de sus dos isoformas, COX-1 y COX-2. Los inhibidores específicos de la COX-2 tienen un efecto selectivo anti-inflamatorio, pero nefrotóxico. Inhibidores no selectivos de la COX también tienen efectos secundarios renales, por lo que no es recomendable su uso indiscriminado y por largo plazo (Watson *et al.*, 2006).

Cuando los signos de la inflamación son severos, se pueden utilizar inyecciones intra-articulares de glucocorticoides para prevenir un derrame articular. El tipo más adecuado de glucocorticoides son los de vida media larga, como acetónido de triamcinolona o hexacetonida, a una dosis de 10 mg o 40 mg. Estas inyecciones de esteroides debe utilizarse con precaución y con la técnica estéril adecuada. (Bellamy *et al.*, 2006).

Otro grupo de fármacos que se pueden administrar por vía oral y por vía intra-articular, son el ácido hialurónico sintético, sulfato de D-glucosamina, el sulfato de condroitina, y la diacereína. Estos medicamentos son denominados fármacos de acción lenta para la OA (SADOA), un término acuñado por la Sociedad Internacional de Investigación de la OA (OARSI). Los mecanismos efectores de estos medicamentos, abarcan la inhibición de la inflamación y el bloqueo de los nociceptores del dolor. Además pueden ejercer cierta alteración sobre las propiedades viscoelásticas del cartílago (Towheed *et al.*, 2005).

Los fármacos anti-citocinas para el tratamiento de OA tienen como objetivo contrarrestar los efectos pro-inflamatorios, que destruyen a la MEC. Este tipo de tratamientos incluyen la administración de anticuerpos contra el TNF- α o bien el uso de enzimas que permiten la activación de IL-4, IL-10, IL-13 (Yang *et al.*, 2008). Por lo tanto, algunos autores sugieren como blanco terapéutico modular la expresión de citocinas anti- y pro-inflamatorias mediante el uso de inmunoterapéuticos (Kapoor *et al.*, 2011).

El factor de transferencia (FT) se ha utilizado como inmunoterapia en el tratamiento de OA, sin embargo esta terapia solo se ha realizado de manera empírica y no hay estudios de investigación que avalen su uso, por lo que en este estudio se evaluaron los efectos moleculares e inmunomoduladores del FT en esta patología.

1.8 FACTOR DE TRANSFERENCIA

El FT, también conocido como extracto dializable de leucocitos, está constituido por moléculas de bajo peso (menor a 10000 daltones) que pueden modular la respuesta inmune de un organismo. Dichas moléculas son termolábiles y estables en frío, y se han descrito como oligorribonucleótidos ligados a péptidos (Kirkpatrick CH. *et al.*, 2000). El factor de transferencia es obtenido a partir del extracto de 100 millones de leucocitos que se someten a diálisis y que corresponden a una unidad internacional de factor de transferencia (Fudenberg *et al.*, 1993).

1.8.1 HISTORIA DEL FT

A principios de 1940 Landstainer y Chase describieron por primera vez la transferencia de hipersensibilidad tardía, en cobayos sensibilizados a tuberculina y cloruro de picrilo (Fudenberg *et al.*, 1993). En 1949, Lawrence, describió la transferencia adaptativa antígeno-específica mediada por la inmunidad celular en humanos, utilizando linfocitos viables intactos de un individuo con intradermorreacción (IDR) positiva a la tuberculina, dichos leucocitos fueron transferidos a un individuo IDR negativo a tuberculina, dando como resultado que este último, al ser retado con tuberculina, diera una IDR positiva. Así mismo Lawrence en 1955, demostró que la hipersensibilidad de tipo tardío (DTH) a ciertos antígenos como PPD, Toxoide tetánico y proteína M del estreptococo podría ser transferida por extractos solubles de leucocitos a personas no reactivas a estos antígenos, los cuales se volvieron positivos a las 24 h. De esta manera

Lawrence concluyó que el responsable de la transferencia de DTH, era un factor al cual denominó “Factor de Transferencia”.

Al continuar con las investigaciones Lawrence en 1955 dio a conocer que el “factor de Transferencia” podía pasar a través de una membrana de diálisis sin que este perdiera su actividad biológica; con este descubrimiento se descartó la idea de que el efecto biológico observado fuera causado por anticuerpos; en ese momento, Lawrence concluyó que el FT solo era de una especie molecular, y con peso menor a 10 kDa; sin embargo hoy en día se sabe que se trata de un conjunto de moléculas llamadas Extracto Dializable de Leucocitos (Fudenberg *et al.*, 1993).

En 1975, Kirkpatrick y colaboradores, describieron que el FT derivado de leucocitos humanos tiene un gran poder quimiotáctico en los granulocitos y un leve poder quimiotáctico en los monocitos, estos resultados fueron demostrados *in vivo* en la piel de mono *Rhesus*. Este mismo grupo de investigadores en 1985, utilizó antígenos sintéticos para inmunizar ratones, obtener FT y con este realizar estudios de transferencia de DTH. En estos experimentos, los ratones que recibieron FT únicamente reaccionaron con el antígeno para el cual el ratón donador fue sensibilizado; con estos resultados Kirkpatrick reforzó el concepto de que la transferencia de DTH con FT es un evento inmunológicamente específico.

1.8.2 EL FT COMO AGENTE TERAPÉUTICO

El FT se ha utilizado desde 1970 como terapéutica en algunos padecimientos infecciosos, en los que la respuesta celular inmune tiene gran relevancia, así como en enfermedades con alteraciones inmunológicas y en algunas neoplasias (Fudenberg *et al.*, 1993).

Existen diferentes estudios clínicos que hacen referencia a los efectos obtenidos al utilizar el FT como terapéutica en diferentes patologías, a continuación se enlistan los principales. En 1975 Rocklin y colaboradores evaluaron el uso de FT en pacientes con inmunocompromiso e infecciones crónicas, encontrando que los pacientes que recibieron tratamiento conjunto con antibioticoterapia y FT, clínicamente respondieron de manera favorable. En 1984 Kaminkova hizo un estudio clínico en pacientes con otitis media, encontrando que los pacientes tratados con FT presentaron un incremento significativo en su cuenta total de linfocitos en comparación a los pacientes que no fueron tratados con FT, además los pacientes tratados con FT fueron valorados durante 1 año posterior al tratamiento encontrándolos asintomáticos. En 1990 Estrada-Parra y colaboradores demostraron el efecto clínico de FT en pacientes con *Herpes zoster*, encontrando mejoría de los síntomas y reducción de neuralgia post-herpética. En 1996 Pizza y colaboradores estudiaron a pacientes con inmunodeficiencia por infección de VIH encontrando que el FT aumentó la cuenta total de linfocitos T CD3, CD4 y CD8. En México, Estrada y colaboradores en 1998 realizaron un estudio clínico en pacientes con *Herpes zoster* a los que se administró FT por 12 semanas, los resultados de pruebas inmunológicas demostraron el aumento en los niveles de

interferón γ (INF- γ) y un incremento en la cuenta de linfocitos T CD4. Así mismo Cordero y colaboradores en 1999, estudiaron pacientes con dermatitis atópica observando que el FT reguló el incremento de eosinófilos y un aumento de linfocitos T CD4.

En 2004 Fabre y colaboradores, estudiaron el papel de FT en un modelo murino con tuberculosis, demostrando la eliminación significativa de la carga bacteriana combinando la quimioterapia con FT. En 2009, Espinosa y colaboradores, llevaron a cabo un estudio clínico de pacientes con asma a los cuales se administró FT, mostrando reducción significativa en el requerimiento de glucocorticoides y mejoría de las pruebas de función pulmonar.

Por otro lado, el FT se ha utilizado como inmunoterapia para tratar diferentes tipos de carcinomas, estos estudios se han realizado tanto de manera clínica como *in vitro*, En 1977, Español y colaboradores realizaron un estudio clínico en pacientes con neuroblastoma tratados con FT; observando la mejoría clínica de los pacientes, incluso sin presentar metástasis después de un año de tratamiento. Fernández y colaboradores en 1993, administraron FT en pacientes con leucemia aguda en remisión, este estudio demostraron el aumento en el número de neutrófilos, leucocitos totales, plaquetas y hemoglobina.

En 1996, Pizza y colaboradores, estudiaron a pacientes con cáncer de próstata que no respondieron normalmente a las terapias convencionales. La terapéutica con FT mostró que la remisión completa del carcinoma se logró en dos pacientes,

remisión parcial en seis, y sin progresión de la enfermedad metastásica en catorce pacientes.

Durante ese mismo año, Pizza y colaboradores, realizaron un estudio con noventa y nueve pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas, se les administró FT y sus tiempos de supervivencia se compararon con 257 pacientes con cáncer de pulmón a los que no se les dió el tratamiento. Los pacientes con FT tuvieron un aumento considerable en la sobrevida ($p < 0.02$) más que aquellos que no recibieron el FT.

En 2005, Pineda y colaboradores estudiaron el impacto del FT sobre el glioma murino. Encontraron que FT reduce significativamente el tamaño del tumor, aumentado la cuenta de linfocitos CD2, CD4, CD8 y de las células NK, además de observar apoptosis de células tumorales.

Referente a estudios *in vitro* para valorar el efecto del FT sobre células cancerígenas, se ha observado que el FT aumenta la capacidad de los linfocitos para limitar el crecimiento tumoral. En el 2006, Franco Molina y colaboradores realizaron un estudio cuyo objetivo fue determinar si el FT presentaba efectos citotóxicos o bien modulaba la expresión de genes involucrados en la apoptosis de células de cáncer de mama. Evaluaron el efecto sobre la proliferación celular en cultivos de diferentes líneas celulares cancerígenas (MCF-7, BT-474, MDA-MB-453, A-427, Calu-1, U937 y L5178Y) las cuales fueron tratados con FT por 72h, a dosis crecientes desde 0-0.66 U/ml. El efecto de FT sobre la proliferación celular fue evaluado mediante ensayos de MTT, así mismo fue valorada la fragmentación

del DNA; y posteriormente obtuvieron el RNA total para buscar la expresión de moléculas como p53, Bax-1, c-myc, y Bcl-2, las cuales están íntimamente relacionadas con el proceso de apoptosis. Este grupo de trabajo concluyó que el FT tiene efectos citotóxicos sobre la línea celular cancerígena dependiente de dosis, por otro lado demostraron que el FT no afectó la viabilidad de las células controles (células la línea PBMC), así mismo observaron que el FT induce la fragmentación del DNA, a dosis crecientes y que el FT inhibió la expresión de p53, Bax-1, c-myc, y Bcl-2.

Por otro lado, con respecto a estudios moleculares que describan el posible mecanismo de acción de FT a nivel de expresión de citocinas pro y anti-inflamatorias, Ojeda y colaboradores, en el 2005, evaluaron la actividad molecular del FT, sobre la expresión de algunas citocinas pro-inflamatorias. Estos investigadores, encontraron que el FT moduló la producción de citocinas pro-inflamatorias en los leucocitos activados por componentes de la pared bacteriana como lipopolisacáridos (LPS), ácido lipoteicoico (LTA), y péptidoglicano (PGN). Los resultados evidenciaron la inhibición de la producción de TNF- α , y el incremento en la síntesis de IL-8 y de IL-6 en las células endoteliales. Además, se indujo la expresión de TLR2 y TLR4, y el aumento de los niveles de cAMP, mientras que la actividad de NFkB fue inhibida.

Continuando con estudios moleculares, Dvorožňáková y colaboradores, en el 2009 evaluaron el efecto de FT sobre la respuesta inmune de los ratones infectados con *Echinococcus multilocularis*. Se observó que la administración FT aumentó la supresión de la respuesta proliferativa de células T y B de los ratones

infectados de las semanas 8 a 14 post infección (pi), respectivamente. La presencia de células T CD4 en el bazo de ratones infectados aumentaron desde la semana 6 hasta la 14 pi, tanto en animales tratados únicamente con FT, como en animales tratados con FT más albendazol. La producción de IFN- γ después de la aplicación de FT fue significativamente mayor entre las semanas 6 y 12 pi, y durante este tiempo, el FT inhibió significativamente la síntesis de IL-5. El FT redujo el crecimiento de los quistes de larvas en magnitud similar a los antihelmínticos como el albendazol. La terapia combinada de FT con albendazol dió mejores resultados.

Como se puede observar el FT es un inmunomodulador que se emplea en una amplia gama de enfermedades. Su seguridad ha sido evaluada en ensayos clínicos, y de vigilancia activa en pacientes, encontrando que no existen efectos adversos asociados a este tratamiento (Cruz Barrios *et al.*, 2006).

Actualmente se puede obtener factor de transferencia de diferentes especies, entre ellos del cocodrilo, en donde se obtiene un extracto linfocitario del bazo del *Crocodylus moreletii* (Correa *et al.*, 2002).

2. ANTECEDENTES

Existen diversos estudios clínicos en donde se evidencia el efecto del FT en diferentes patologías. Sin embargo, dentro de las patologías de tipo articular, tratadas con FT, los estudios son escasos. Georgescu realizó un estudio clínico en 1985, en donde se administró FT a 50 pacientes del sexo femenino con artritis reumatoide por un periodo de seis meses, los pacientes presentaron mejoría de sus síntomas desde los primeros tres meses de tratamiento, este estudio dio a conocer que el FT representa un adyuvante importante en el tratamiento de artritis reumatoide, concluyendo que debido a su acción sobre sistema inmunológico, el FT puede ser usado como inmunoterapia alternativa en algunas patologías en donde se presente inflamación crónica y desgaste articular.

Sin embargo, a nivel molecular existen muy pocos estudios que documenten el efecto causado por la terapéutica con FT; en este contexto Stanciková y colaboradores en 1994 valoraron el efecto del FT en un modelo murino de artritis inducida por adyuvante. En este estudio se valoró el efecto de varias fracciones de FT: FT I con peso molecular por debajo de 10 kDa (preparado comercial), FT II con peso molecular por debajo de 5 kDa (fracción del supresor), FT III con peso molecular de 5 a 10 kDa. Una vez inducida la artritis por adyuvante (AA), las ratas fueron tratadas con FT desde el primer día hasta el día 18, la administración fue vía intraperitoneal cada dos días. Varios marcadores de inflamación se evaluaron: el volumen de la pata trasera, el ácido hialurónico sérico, la albúmina sérica y la biopterina en la orina. Todos estos marcadores se normalizaron después de usar FT fracción II, en comparación con los controles. Con estos

resultados, concluyen que la fracción II de FT ejerció un efecto modulador manteniendo los marcadores de la inflamación sin cambios, en ratas con artritis reumatoide inducida (Stanciková *et al.*, 1994).

3. JUSTIFICACION

La OA es una enfermedad progresiva, crónicodegenerativa, caracterizada por la degradación del cartílago articular. Es la primera causa de dolor articular en pacientes mayores a 55 años de edad con repercusiones importantes tanto en la salud, como en el aspecto laboral y psicosocial. El objetivo de los tratamientos actuales son disminución del dolor y mejorar la función articular, sin embargo, son insuficientes para detener el daño progresivo del cartílago (Kapoor *et al.*, 2011).

Actualmente, se han estudiado los mecanismos moleculares que participan en el desarrollo y la progresión de la OA, esto ha permitido conocer con exactitud las citocinas involucradas en esta patología y proponer diferentes inmunoterapias que puedan regular la acción de los factores anabólicos y catabólicos (Kapoor *et al.*, 2011).

El FT al ser un agente terapéutico con acción inmunomoduladora, se ha empleado clínicamente para tratar a pacientes con OA. Las evidencias clínicas han mostrado la disminución de síntomas como el dolor, inflamación articular y degradación de cartílago. Sin embargo, los efectos fisiológicos y los procesos moleculares *in situ* en el tejido articular, inducidos por el tratamiento con FT no han sido descritos, por lo que es necesario investigar si la mejoría clínica asociada al tratamiento con FT, correlaciona con la alteración de los procesos fisipatogénicos de la OA. El presente estudio permitirá tener fundamentos científicos que validen el uso del FT derivado de cocodrilo en esta enfermedad.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el papel del FT en la expresión de las citocinas anti-inflamatorias y pro-inflamatorias en el proceso de OA inducida en rata.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Precisar los cambios morfológicos del cartílago articular con OA inducida en ratas tratadas con FT.
- Evaluar los niveles de expresión de las citocinas pro- y anti-inflamatorias implicadas en el proceso de OA inducida en ratas tratadas con FT.
- Determinar la inmunolocalización de las citocinas pro- y anti-inflamatorias en el cartílago articular con OA inducida en ratas tratadas con FT.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 INDUCCIÓN DE OA EN RATA

Se emplearon ratas machos Wistar de 130 a 150 g de peso. Se formaron tres grupos: el grupo control, sin tratamiento y sin inducción de OA; un segundo grupo con inducción de OA sin tratamiento con FT (SF) y el tercer grupo con inducción de OA y tratamiento con FT (CF). La inducción de OA, el procedimiento quirúrgico se realizó bajo efecto anestésico (0.7ml de ketamina y 0.3 ml de xilacina, vía intraperitoneal). Se realizó tricotomía del área articular (pata derecha); previa asepsia y antisepsia de la región, se efectuó una incisión antero-medial en la cara interna de la rodilla derecha, paralela al eje longitudinal de la pata, se disecó por planos hasta abordar el compartimiento medial de la articulación, una vez identificado, se seccionó el menisco lateral y se removió en un 30 a 50%. Se suturó con nylon 2,0, se verificó que el efecto anestésico fuera revertido, y después de dos días del posoperatorio se sometieron a un programa de ejercicio de alto impacto (Lozaya KA *et al.*, 2000).

Al grupo CF se le administró FT obtenido de bazo de cocodrilo a dosis de 1 ml cada 48 h (proporcionado por el laboratorio BIOEXPORT) durante 20 días. Como grupos control, al grupo SF solo se administró glicina a dosis de 1 ml cada 48 h (vehículo del FT) y el tercer grupo sin inducción de OA no recibió ningún tratamiento. Los animales de los grupos CF y SF fueron sometidos a una rutina de ejercicios de alto impacto por 15 min, durante 20 días.

5.2 EVALUACIÓN CLINICA

Los animales de experimentación de los tres grupos de trabajo, fueron evaluados clínicamente durante 20 días. Los signos clínicos fueron documentados por una medición cualitativa asignándose el puntaje según la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación arbitraria de signos clínicos

PUNTAJE	SIGNOS CLINICOS
1	Sano, sin signo de enfermedad
2	Piloerección
3	Disminución de la motricidad (letargo) + piloerección
4	Alteraciones en la marcha + Disminución de la motricidad (letargo) + piloerección

Una vez concluidos los 20 días de la realización de ejercicios de alto impacto, las ratas fueron sacrificadas. En condiciones de esterilidad, se disecó la articulación de la rodilla afectada de cada uno de los miembros de cada grupo, previa asepsia y antisepsia de la región, teniendo el cuidado de no lesionar vasos sanguíneos para evitar contaminación. Las piezas quirúrgicas se colocaron en PBS estéril, y fueron analizadas las características macroscópicas de estas; posteriormente se realizó la extracción de los explantes de cartílago articular a partir de las zonas de carga (cóndilos femorales y patillos tibiales), los cuales se introdujeron en PBS estéril para evitar desecación. Todas las muestras obtenidas de cada grupo, fueron colocadas en cajas Petri con PBS estéril, para evitar la desecación.

5.3 ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

Para el análisis histopatológico se emplearon dos fijadores: formaldehído al 10%/PBS buffer y solución de Bouin. Una vez fijados, los explantes se procesaron de la siguiente manera: se deshidrataron con alcohol, a concentraciones crecientes de alcohol: 70%, 90% y 100%. Posteriormente se aclararon con xileno. Y se infiltraron en parafina, para ello se calentó la parafina a 60° C, después se colocó el explante de cartílago y un poco de parafina fundida en un molde de metal de forma rectangular y se dejó solidificar a temperatura ambiente. En este momento el bloque adquirió una dureza adecuada para ser cortado con el microtomo de parafina. Se realizaron secciones de 3µm de grosor (Microtomo rotatorio American Optical 820). Para llevar a cabo el montaje de la muestra, los cortes se depositaron sobre la superficie de un baño de agua caliente (38° C) donde con el calor se estiraron convenientemente. Seguidamente se recogieron sobre portaobjetos tratados con gelatina y se dejaron secar en una estufa a 38° C para que se adhirieran al vidrio. Para la evaluación morfológica se empleó la tinción de hematoxilina y eosina, la proporción de proteoglicanos se evaluó mediante la tinción de safranina O (muestras fijadas en formaldehído al 10%/PBS) y la proporción de colágena mediante la tinción de tricrómico de Massón (muestras fijadas en solución de Bouin).

5.3.1 TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA PARA EVALUAR LA MORFOLOGIA CELULAR

Una vez montados los cortes se desparafinaron con xileno, se hidrataron con etanol a graduación decreciente (100°, 90°, 70°), eliminando el exceso de alcohol con agua destilada y se tiñeron con Hematoxilina de Harris filtrada durante 5 a 10min. Se enjuagaron con agua destilada, se diferenciaron sumergiendo rápidamente en alcohol-ácido al 1%, se lavaron con agua destilada y se contrastaron con solución de eosina-floxina durante 30s. Posteriormente se deshidrataron con etanol a graduación creciente (70°, 90° 100°), se remojaron en xileno por 10min y se cubrieron utilizando resina DPX.

La Hematoxilina (anexo 1) es un colorante básico que reacciona con los grupos aniónicos (cargados negativamente) de los componentes de los tejidos, como los grupos fosfato ionizados (PO_3^-) de la heterocromatina, nucléolos y ácidos nucleicos (DNA y RNA) del núcleo y matriz del cartílago. La Eosina (anexo 1) debido a su carácter ácido reacciona con los grupos catiónicos (cargados positivamente) de los componentes del tejido, por medio de enlaces electroestáticos como con los grupos amino ionizados (NH_4^+) de la mayor parte del citoplasma no especializado, filamentos citoplasmáticos y fibras extracelulares, por lo que son acidófilos.

5.3.2 TINCIÓN CON SAFRANINA O PARA EVALUAR LOS PROTEOGLICANOS

La tinción con safranina O es la técnica más utilizada para la tinción de proteoglicanos del cartílago. Es una tinción de contraste ya que es un marcador de glicosaminoglicanos (GAGs). Se ha demostrado que la unión de safranina O para GAGs en el cartílago es mediante estequiometría, y la intensidad de la tinción dependerá de la cantidad de GAGs en el tejido.

Una vez desparafinadas las secciones con xileno por 15 min, se enjuagaron con dos cambios de etanol al 100% y se hidrataron en dos cambios de etanol al 95% (1 min cada uno), al terminar la hidratación, se enjuagaron con tres cambios de agua destilada durante 5 min. Posteriormente, se colocaron los portaobjetos en safranina O al 5% durante 40 min, después se enjuagaron con 3 cambios de agua destilada (6 inmersiones cada uno), e inmediatamente se realizó la inmersión en verde rápido alcoholado, durante 30 s y después la inmersión en ácido acético 1 % (8 baños). A continuación se enjuagaron las secciones con agua destilada (6 baños) y con etanol al 95% (6 baños). Finalmente, se realizó la deshidratación con 2 cambios de etanol al 100% (8 inmersiones cada uno) y se enjuagaron con xileno durante 1 min. Para el montaje se colocó sobre las secciones una gota de resina y se montaron los portaobjetos. Finalmente, las muestras ya teñidas y montadas fueron observadas mediante microscopía óptica.

5.3.3 TINCION CON TRICROMICO DE MASSON PARA EVALUAR LA COLAGENA

El análisis histopatológico se completó con la tinción especial para colágena (tinción con tricrómico de Masson), para ello se utilizaron la muestras que se fijaron por inmersión en solución de Bouin durante cuatro horas y se lavaron posteriormente con alcohol al 70%.

Una vez que tuvimos los cortes ya hidratados, se tiñeron con hematoxilina férrica durante 10 min. Se lavaron en agua corriente durante 10 min y con agua destilada durante 5 min. Posteriormente se tiñeron con la solución de escarlata-fucsina ácida durante 5 min, se lavaron con agua destilada y a continuación se trataron con la solución de ácido fosfomolibdico durante 10 min; después se tiñeron con solución de azul de anilina 15 min. Posteriormente, se lavaron con agua destilada y se realizó la diferenciación de la tinción utilizando la solución de ácido acético al 1% durante 3 min. Finalmente se realizó la deshidratación con 2 cambios de etanol al 100% y se enjuagaron con xileno durante 1 min. Para montar la muestra se colocó sobre las secciones una gota de resina DXP y se cubrieron con portaobjetos. Las muestras ya teñidas fueron observadas mediante microscopía de luz.

5.4 ANALISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESION DE CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS Y ANTI-INFLAMATORIAS

5.4.1 OBTENCION, ANALISIS Y CUANTIFICACION DEL RNA

Se utilizaron las muestras de los tres grupos de estudio que fueron sumergidas en trizol con la finalidad de obtener el RNA de los condrocitos. Inicialmente, se maceró el cartílago en un homogenizador previamente esterilizado y posteriormente se agregó 1 ml de proteinasa K (200 µg/ml), se colocó en incubación a 60° C durante 3 h, esto con la finalidad de degradar el tejido. Posteriormente, se agregó 1 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente, después se centrifugó a 11900 rpm durante 15 min. Se transfirió la fase acuosa (superior) a un tubo eppendorf estéril y se le agregó isopropanol para precipitar el RNA, nuevamente se centrifugó a 11900 rpm por 15 min, el sobrenadante se desechó y se observó en el fondo del tubo eppendorf la pastilla de RNA. A continuación el RNA se precipitó en una solución que contiene 300 µl de agua DEPC (anexo 1), 900 µl de etanol y 30 µl de acetato de sodio pH 5.2 y se dejó incubar toda la noche a -20° C. Al día siguiente, la muestra se centrifugó y la pastilla se lavó con etanol al 80%, se desechó el sobrenadante y posteriormente se secó cuidadosamente la pastilla obtenida a 37° C. El RNA se resuspendió en agua DEPC.

Se cuantificó la cantidad de RNA obtenido utilizando el nanoespectrofotómetro marca Epoch Biotek a 260/280 nm, para evaluar la concentración y pureza de los

ácidos nucleicos. Una vez cuantificado el RNA, las muestras se trataron con DNAsa utilizando el Kit RQ1 de Promega, de la siguiente manera:

En un tubo eppendorf estéril se agregaron 2 µg de las muestras de RNA, 6 µl de buffer 10X, 2 µl de la enzima RQ1y 1 µl de agua DEPC. Posteriormente, se incubó la mezcla 15 min a 37° C. Después se inactivó la reacción agregando 1 µl de la solución de paro, incubando a 65° C 10 min. Una vez concluido este paso se cuantificó nuevamente la cantidad de RNA de las muestras tratadas.

Para verificar que las muestras no estuvieran contaminadas con DNA, se realizó una PCR en punto final, amplificando el gen de actina; para ello, se colocaron 2.5 µl de buffer 10X, 1µl de dNTPs, 2 µl de oligonucleótido sentido, 2 µl de oligonucleótido antisentido y 0.5 µl de Taq DNA Polimerasa (5 U/µl). En el control positivo se agregó 2 µl del DNA control; en el tubo control negativo se agregó 2µl de agua. En las muestras problema se agregó la cantidad correspondiente a 200 ng de RNA, en este caso el volumen fue variable, por esta razón final se aforó con la cantidad de agua necesaria para tener 25 µl de volumen final.

Una vez realizadas las mezclas de reacción, se colocaron en el termociclador de la marca Applied Biosystem con las siguientes condiciones de ciclado: 94° C 1 min, 35 ciclos de (94° C por 35 s, 68° C 35 s y 72° C 35 s), finalmente los fragmentos de PCR amplificados fueron terminados incubándolos a 72° C por 10 min.

5.4.2 SINTESIS Y CUANTIFICACIÓN DE cDNA

Para la síntesis de cDNA, se utilizó el Kit Súper Scrip III First-Strand Syntesis Supermix, de la siguiente manera:

En un tubo eppendorf estéril se agregó 2 µg de la muestra de RNA, 1µl de oligonucleótido dT y 1 µl de buffer de alineamiento. La mezcla se incubó a 65° por 5 min y después a 4° por 1 min; finalmente se agregó 8 µl de buffer y 2 µl de enzima RT. Una vez realizados estos pasos, se colocó el tubo en el termociclador con las siguientes condiciones: 50° C por 50 min y 85° C por 5 min para sintetizar el cDNA.

Posteriormente se cuantificó el cDNA obtenido de las muestras utilizando el nanoespectrofotómetro marca Epoch Biotek a 260/280 nm, para evaluar la concentración y pureza de los ácidos nucleicos. Para verificar la calidad del cDNA sintetizado se realizó una PCR en punto final para amplificar el gen de actina y verificar la funcionalidad del cDNA, de la siguiente manera:

Se colocaron 2.5 µl de buffer 10X, 1µl de dNTPs, 2 µl de oligonucleótido sentido, 2 µl de oligonucleótido antisentido y 0.5µl de Taq DNA Polimerasa (5 U/µl). En el control positivo se agregó 2 µl del DNA control; en el control negativo se agregó 2 µl de agua. En las muestras problema se agregó la cantidad correspondiente a 200 ng de RNA y cDNA respectivamente, en este caso el volumen fue variable, por esta razón al final se aforó con la cantidad de agua necesaria para tener 25 µl de volumen final.

Las mezclas de reacción se colocaron en el termociclador de la marca Applied Biosystem con las siguientes condiciones de ciclado: 94° C 1 min, 35 ciclos (94° C por 35 s, 68° C 35 s y 72° C 35 s), finalmente los fragmentos de PCR amplificados fueron terminados incubándolos a 72° C por 10 min.

5.4.3 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA MULTIPLE (M-PCR)

Una vez amplificado el cDNA, se procedió a la detección de la expresión de citocinas pro-inflamatorias, mediante la realización de PCR multiplex. La PCR se realizó utilizando el MPCR Kit for rat Inflammatory Cytokine Genes of Maxim Biotech, Inc. Este Kit permite analizar la expresión de citocinas pro-inflamatorias como Ik-B, TNF- α , IL - 1, IL-6 y NFk-B. Así mismo se utilizó el kit MPCR Kit for rat Inflammatory Genes of Maxim Biotech, Inc para la determinación de la expresión de citocinas anti-inflamatorias como IFN- γ , PDGF, FGF-2, IL-4,IL-2 y la IL10.

5.4.4 RT-PCR MULPLEX PARA CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS

La reacción de PCR se realizó de la siguiente manera:

Se colocaron 25 μ l de MPCR Buffer 10X, 5 μ l de oligonucleótidos 10X rINF2G MPCR y 0.5 μ l de Taq DNA Polimerasa (5 U/ μ l). En el control positivo se agregó 5 μ l del cDNA control del Kit; en el control negativo se agregaron 5 μ l de agua. Para las muestras problema se agregó la cantidad correspondiente a 300 ng de cDNA respectivamente. En las muestras problema el volumen fue variable, por esta razón al final se aforó con la cantidad de agua necesaria para tener un volumen final de 50 μ l.

Una vez realizadas las mezclas de reacción se colocaron en el termociclador de la marca Applied Biosystem con las siguientes condiciones de ciclado: 96° C 1 min, 64° C 4 min por 2 ciclos, posteriormente 40 ciclos de 94° C por 1 min y 64° C 4 min, finalmente los fragmentos de PCR amplificados fueron terminados incubándolos a 70° C por 10 min. Los tamaños esperados para los genes de citocinas pro-inflamatorias se mencionan en la tabla 2.

TABLA 2. Tamaños moleculares de las citocinas pro-inflamatorias detectadas

GEN	Tm de oligonucleótido sentido y antisentido	Tamaño del amplificado (pb)
IL-6	68 ° /70 ° C	453
NFk-B	68 ° /69 ° C	396
TNF-alpha	70 ° /70 ° C	351
IL-1	68 ° /68 ° C	294
Ik-B	67 ° /71 ° C	167
GAPDH	67 ° /68 ° C	532

5.4.5 RT-PCR MUXPLEX PARA CITOCINAS ANTI-INFLAMATORIAS

La reacción de PCR se realizó de la siguiente manera:

Se colocaron 25 µl de MPCR buffer 10X, 5µl de oligonucleótidos 10X rINF2G MPCR y 0.5µl de Taq DNA Polymerasa (5 U/µl). En el control positivo se agregó 5 µl del cDNA control del Kit; en el control negativo se agregaron 5 µl de agua. En los tubos de las muestras problema se agregó la cantidad correspondiente a 3000 ng de cDNA. En el caso de las muestras problema el volumen fue variable, por esta razón al final se aforó con la cantidad de agua necesaria tener un volumen final de 50 µl.

Una vez realizadas las mezclas de reacción, se colocaron en el termociclador con las siguientes condiciones de ciclado: 96° C 1 min, 68° C 4 min por 2 ciclos, posteriormente 40 ciclos de 94° C por 1 min y 68° C 4 min, finalmente los fragmentos de PCR amplificados fueron terminados incubándolos a 70° C por 10 min. Los tamaños esperados para los genes de citocinas pro-inflamatorias se mencionan en la tabla 3.

TABLA 3. Tamaños moleculares de las citocinas anti-inflamatorias detectadas.

GEN	Tm de oligonucleótido sentido y antisentido	Tamaño del amplificado (pb)
PDGF	66 ° /68 ° C	238
IFN-gamma	66 ° /70 ° C	283
FGF-2	66 ° /68 ° C	326
IL-4	66 ° /68 ° C	381
IL-2	69 ° /66 ° C	439
IL-10	70 ° /67 ° C	525
GAPDH	68 ° /68 ° C	658

5.4.6 ELECTROFORESIS DE LA RT-PCR

Los productos de ambas RT-PCR multiplex, fueron sometidos a electroforesis en un gel de acrilamida al 12 % (anexo 1), en un sistema de electroforesis vertical a 80 Volts, durante 90 min con buffer de corrida TBE 1x.

5.4.7 TINCION DE GELES

Para la visualización de los geles se utilizó la tinción con bromuro de etidio, los geles se visualizaron en el transiluminador con luz UV con una longitud de onda de 254nm; las imágenes fueron captadas por un fotodocumentador marca UVP.

5.5. INMUNOHISTOFLUORESCENCIA Y ANÁLISIS CON MICROSCOPIA CONFOCAL

Los explantes se fijaron en paraformaldehído al 4% (anexo 1) durante 4h, a 4°C. Previo a la realización de los cortes las muestras se impregnaron con sacarosa al 10% (anexo 1), como crioprotector, durante toda la noche. Se realizaron criocortes de 5 μ m de espesor (criostato Leyca 819) y se montaron en portaobjetos previamente gelatinizados y se conservaron en congelación a -20°C.

Los criocortes se rehidrataron con PBS (anexo 1) frío durante 10 min y previo al inmunomarcaje se realizó un pretratamiento para degradación de RNA, con el objeto de evitar la tinción inespecífica citoplásmica con cloruro de amonio 5mM (anexo 1) por 10 min a temperatura ambiente y posteriormente con ácido clorhídrico (anexo 1) por 2 h a temperatura ambiente. Después, las secciones se permeabilizaron con PBS-tritón (anexo 1), se bloqueo el marcaje inespecífico con

albúmina bovina libre de IgG al 0.2% (anexo 1) durante 20 min y se incubó con 50 µl de los anticuerpos primarios contra las citocinas PDGF (sc-7958), FGF-2 (sc-7911), IκB (abcam-47752) y NFκB (abcam-31409) a una dilución de 1:50 en PBS-tritón x-100 al 0.2% durante toda la noche, en cámara húmeda a 4°C. Una vez realizados los lavados con PBS-Tritón, se incubó con el anticuerpo secundario específico acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC- Jackson Inmuno Research 111-095-003) a una dilución de 1:60, durante 2h a temperatura ambiente, en cámara húmeda y protegidos de la luz. Para la contratinción se utilizó yoduro de propidio (concentración de 2.5 µg/µl) por 5 min. El procedimiento se concluyó con montaje con medio Vectashield y sellado con barniz de uñas, conservando los cortes a 4°C para su posterior análisis microscópico. La longitud de onda de excitación y emisión para FITC es de 494-520nm y de 554nm para el yoduro de propidio. En los controles negativos se omitió el anticuerpo primario.

La adquisición de imágenes se realizó en el Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías del IPN, utilizando el microscopio confocal de barrido láser de la marca lsm 710, Carl Zeiss, Alemania, con las siguientes condiciones: el modo de trabajo fue Best signal (mejor señal); el modo de escaneo fue plane (un solo plano o también conocido en 2D); el objetivo utilizado fue Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27; el Pinhole utilizado fue de 48 µm, con láseres Track 1 488nm al 3% de poder y Track 2 514nm al 2% de poder; los filtros utilizados para la detección de fluorescencia fueron 493-523nm. Una vez obtenidas las imágenes se evaluaron parámetros de inmunolocalización de la proteína e intensidad de la marca comparativamente para las condiciones de estudio.

6. RESULTADOS

6.1 INDUCCION DE OA EN RATA

Los modelos animales de OA son utilizados comúnmente en el estudio de la patogénesis de la enfermedad y pueden ser generados naturalmente o inducidos quirúrgicamente. En el presente estudio se utilizó como modelo la OA inducida mediante menisectomía medial unilateral en rata, en el cual los cambios degenerativos progresivos ocurren en 20 días posteriores a la intervención quirúrgica. Estos se caracterizan por pérdida de condrocitos y proteoglicanos, por fibrosis, por la formación de osteofitos y por la presencia de clones. (Bendele *et al.*, 2001) (Fig. 3 y 4).

Las ratas macho Wistar de 130 a 150 g de peso se incluyeron en tres grupos al azar. Un grupo sirvió como control, al cual no se le administró ningún tratamiento y no se indujo OA. Al grupo denominado CF se le indujo OA y se les administró FT desde que iniciaron los ejercicios de alto impacto (dos días posteriores a la intervención quirúrgica) a dosis de 1 ml cada 48 hrs hasta concluir 20 días. Al grupo SF, se les indujo OA y se les administro glicina desde que iniciaron los ejercicios de alto impacto (dos días posteriores a la intervención quirúrgica) a dosis de 1 ml cada 48 hrs hasta concluir 20 días; la glicina es el vehículo del FT.



Fig. 3 Modelo animal de OA. Incisión lateral en rodilla derecha



Fig. 4 Modelo animal de OA. Disección de menisco medial

6.2 EVALUACION CLINICA

Durante 20 días posteriores a la realización de la menisectomía parcial, se valoró clínicamente a los animales de experimentación, obteniendo un puntaje con base a la escala arbitraria descrita en materiales y métodos (tabla 1); el puntaje obtenido se encuentra descrito en la tabla 4.

Tabla 4. Puntaje obtenido de la clasificación arbitraria de signos clínicos

GRUPO	DIA 5	DIA 10	DIA 15	DIA 20
EXPERIMENTAL				
GRUPO CONTROL	1	1	1	1
GRUPO SF	2	3	4	4
GRUPO CF	2	2	3	4

Los resultados de la valoración clínica mostraron que la actividad motora en el grupo control no fue afectada. En los animales del grupo experimental con OA sin tratamiento se observó disminución considerable de su actividad física, aproximadamente desde el día 5 presentaron piloerección (este signo nos indicó que hay estimulación del sistema nervioso simpático provocando la contracción de los músculos, en respuesta al dolor); para el día 10 se observó letargo y piloerección y desde el día 15 al 20 se observó letargo, piloerección y alteraciones en la marcha (al caminar presentaban rigidez de la articulación

afectada). En los animales tratados con FT si bien se observó la presencia de piloerección desde el día 5, de manera interesante y a diferencia del grupo SF las ratas del grupo CF presentaron un incremento en su actividad motora. Este incremento de la movilidad (brincos), se observó durante la realización de los ejercicios de alto impacto aproximadamente hasta el día 10, para el día 15 presentaron piloerección y letargo, finalmente en el día 20 se observó letargo, piloerección, así como alteraciones en la marcha (al caminar presentaban rigidez de la articulación afectada).

Esta evaluación permitió observar que en los primeros días posteriores a la inducción de OA, los animales tratados con FT presentaron un aumento de su actividad física comparándolos con los animales sin tratamiento, sin embargo para el día 20 los animales de ambos grupos presentaron características clínicas muy similares.

Con la finalidad de identificar posibles diferencias en las articulaciones de las ratas de los diferentes grupos de estudio, se disecaron las articulaciones de la rodilla derecha de cada uno de los miembros de cada grupo, y se realizó la valoración macroscópica de la articulación afectada, una vez cumplidos los 20 días de la realización de ejercicios de alto impacto.

6.3 ANÁLISIS MACROSCÓPICO

En el estudio macroscópico de las articulaciones de los tres grupos de investigación se observó que las superficies de los cartílagos articulares tibiales y

femorales del grupo control, presentaron características propias del cartílago articular normal, superficie de coloración aperlada, lisa y brillante (Fig. 5 A y B).

En las rodillas con OA del grupo SF, los cóndilos femorales mostraron erosiones cartilaginosas con engrosamientos parciales; no se observaron signos de engrosamiento articular sobre los platillos tibiales, pero sí fibrosis importante en ambos platillos. El cartílago de las articulaciones con OA se observó más opaco a diferencia de las articulaciones del grupo control, y además se observó el cartílago más delgado y translúcido (Fig. 5 C y D).

Así mismo el análisis de las rodillas con OA del grupo tratado con FT, mostró que los cóndilos femorales medial estaban igualmente afectados con erosión y engrosamiento; en los platillos tibiales se observó fibrosis importante. En general el cartílago del grupo CF también se observó más opaco y engrosado que el de las articulaciones del grupo control (Fig. 5 E y F).

Por lo que en general no se observaron diferencias contundentes en el análisis macroscópico de las articulaciones de las ratas de los grupos CF y SF

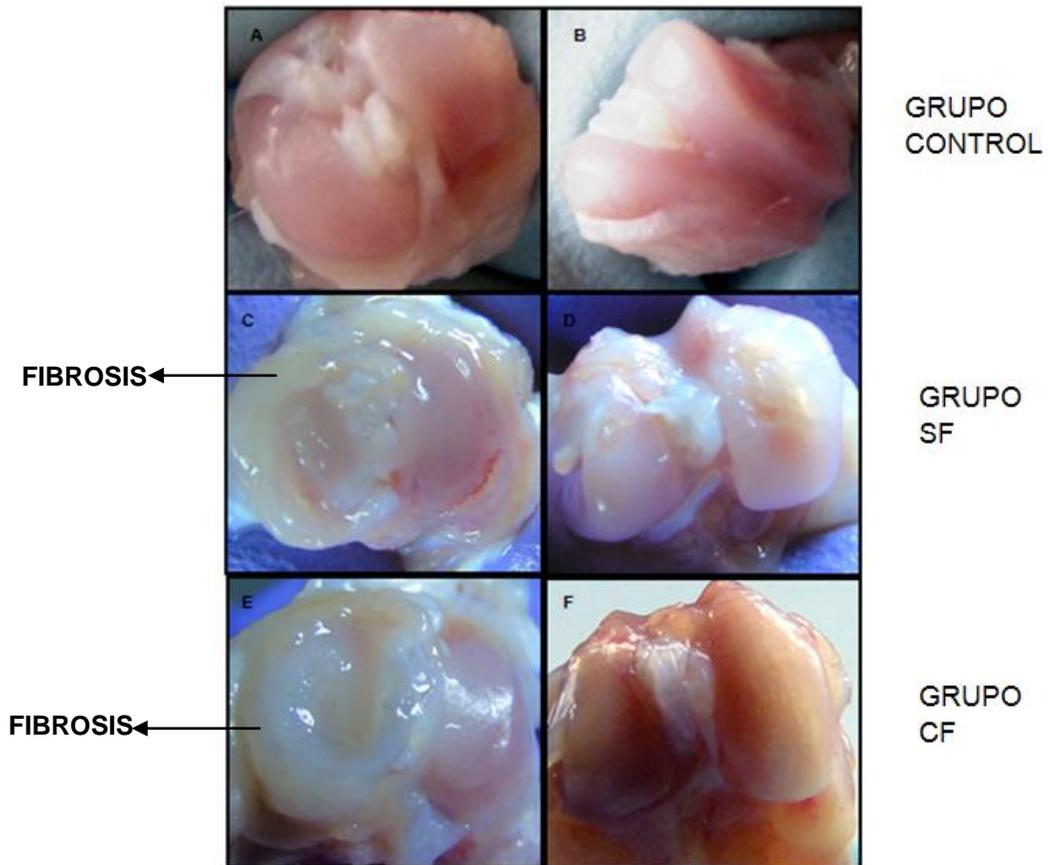


Fig. 5 Análisis macroscópico de la articulación. (A) Platinos tibiales extraídos de animales del grupo control **(B)** Cóndilos femorales extraídos de animales del grupo control. **(C)** Platinos tibiales con OA extraídos de animales sin tratamiento. **(D)** cóndilos femorales con OA extraídos de animales sin tratamiento. **(E)** Platinos tibiales con OA extraídos de animales tratados con FT **(F)** cóndilos femorales con OA extraídos de animales tratados con FT.

Ya realizado este análisis, se procedió a la extracción de los explantes de cartílago articular a partir de las zonas de carga de los cóndilos femorales y los platillos tibiales.

6.4 ANALISIS HISTOPATOLOGICO

Este análisis permite la valoración de la morfología celular, así como la distribución de la colágena y los proteoglicanos de la MEC, mediante la utilización de diferentes técnicas de tinción. Para realizar la valoración de la morfología celular, la tinción se realizó con hematoxilina y eosina; para valorar la cantidad de proteoglicanos la tinción se realizó con Safranina O; y para valorar la cantidad de colágena la tinción fue con la técnica de tricómico de Masson.

6.4.1 EVALUACIÓN DE LA MORFOLOGIA CELULAR

Los cortes histológicos del grupo control mostraron características propias del cartílago articular sano, conservando su disposición arquitectural, así como la morfología de los condrocitos en cada una de sus zonas. La zona superficial, media o transicional, profunda o radial y la zona calcificada. En la zona superficial los condrocitos están aplanados, alineados paralelamente a la superficie, en la zona media los condrocitos se observaron redondeados. En la zona profunda, los condrocitos se encontraron agrupados en columnas perpendiculares a la superficie y en la zona calcificada, los condrocitos se observaron hipertróficos (Fig. 6 A y E).

El cartílago articular del grupo OA sin tratamiento con FT mostró zonas de fibrilación superficial, con modificaciones en la orientación celular, condrocitos hipertróficos y agregados en “clones”, y presencia de fisuras que se extienden hasta la zona media (Fig. 6 B, C, y D).

Comparativamente, los explantes de cartílago del grupo OA tratados con FT, mostraron menor formación de fibrocartílago, conservando parcialmente la morfología aplanada y orientación de los condrocitos superficiales, así como las columnas perpendiculares. No se observó la presencia de clones. (Fig. 6 F, G, y H) El análisis comparativo de la morfología celular y distribución de las distintas zonas del cartílago, sugiere que las muestras obtenidas de animales tratados con FT, aunque presentaron lesión, los daños son menores, observándose características del cartílago articular, con mayor similitud a lo observado en las muestras del grupo control sin OA inducida.

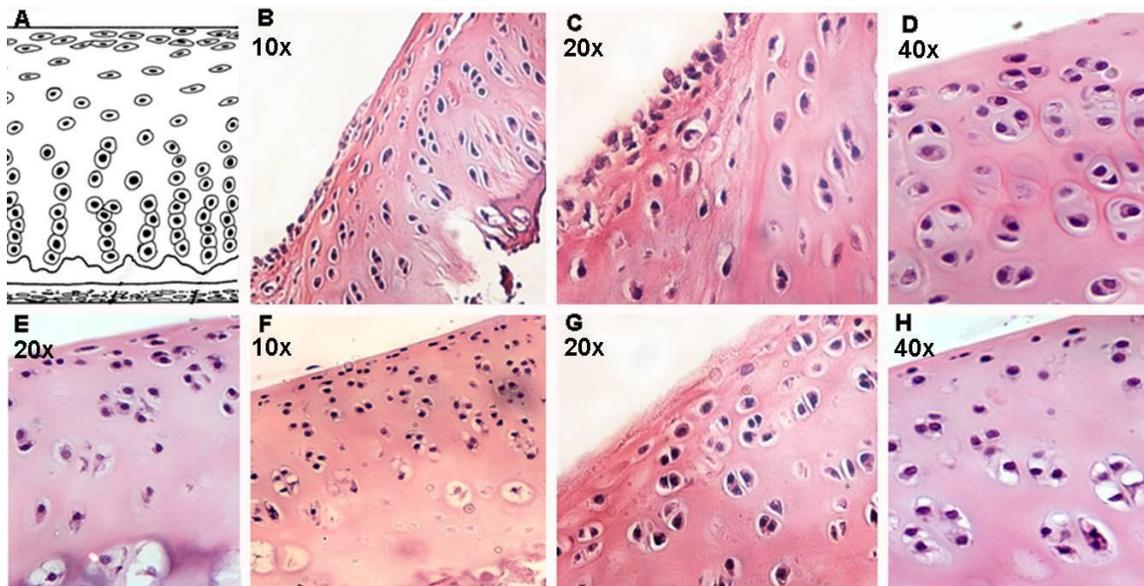


Fig. 6. Análisis morfológico del cartílago articular mediante la tinción de hematoxilina y eosina. (A) Esquema de la estructura del cartílago articular (A). Cortes histológicos de cartílago articular, grupo OA sin tratamiento con FT (B, C y D). Cortes histológicos de cartílago grupo OA con tratamiento con FT (F, G y H). Grupo control (E).

6.4.2 EVALUACIÓN DE LA MEC (PROTEOGLICANOS)

La tinción con safranina O es la técnica más utilizada para la tinción de proteoglicanos del cartílago. Es una tinción de contraste ya que es un marcador de glicosaminoglicanos (GAGs). Se ha demostrado que la unión de safranina O para GAGs en el cartílago es mediante estequiometría, y la intensidad de la tinción dependerá de la cantidad de GAGs en el tejido.

Como se puede observar en la figura 7 G, las muestras obtenidas de los explantes de cartílago del grupo control se observaron homogéneas, de color rojo y de buena intensidad. En ellas se puede observar la cantidad normal de proteoglicanos que se encuentra en este tejido: en la zona superficial la tinción es menor debido a que el contenido de proteoglicanos es el más bajo de todo el cartílago; en la zona media existe la mayor concentración de proteoglicanos por lo que la intensidad de la tinción es mayor con respecto a otras zonas. En la zona profunda la tinción es homogénea pero tenue y la zona calcificada carece de proteoglicanos.

Por su parte en las muestras obtenidas de los explantes de cartílago, de animales con OA sin tratamiento (Figura 7 D, E, F); mostraron mayor heterogeneidad en la tinción con safranina O en todo el espesor del cartílago, con predominio de la zona superficial y media, y zonas de fibrocartílago, sugiriendo mayor degradación de proteoglicanos.

Por otro lado, las muestras obtenidas de los explantes de cartílago de animales con OA tratados con FT, se observaron de color rojo intenso en las zonas media y profunda, y mostró con áreas pálidas en la capa superficial y zonas de fibrocartílago, lo que denota disminución en la proporción de proteoglicanos, comparativamente con la tinción homogénea en todo el espesor del cartílago del grupo control, indicando que hubo degradación parcial de proteoglicanos. (Fig. 7 E, F, G).

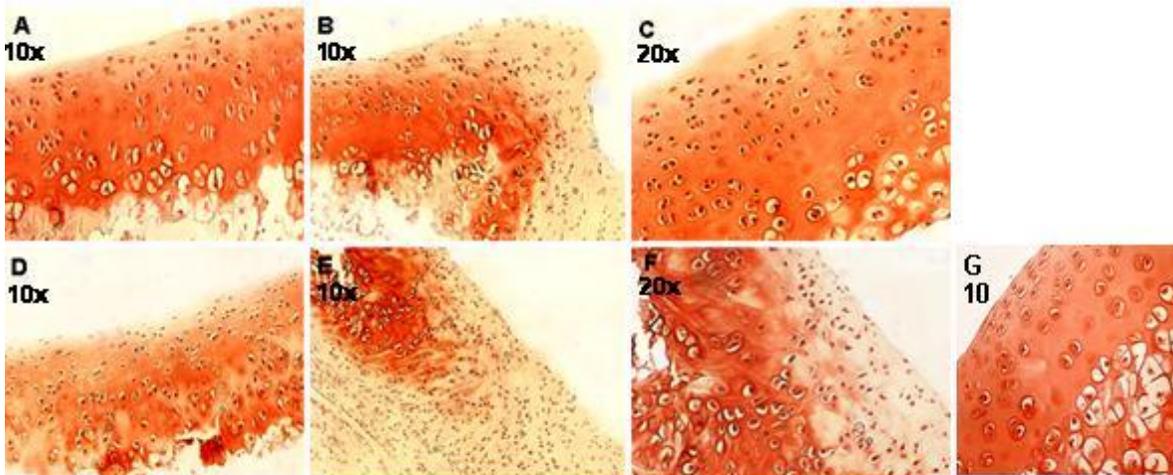


Figura 7. Análisis de la proporción de proteoglicanos, tinción con Safranina O. Grupo OA con tratamiento con FT (A, B y C); grupo OA sin tratamiento con FT (D, E y F); grupo control (G).

6.4.3 EVALUACION DE LA MEC (COLAGENA)

El tricrómico de Masson, al igual que otros colorantes tricrómicos, es una tinción especial que permite visualizar claramente las fibras de colágena que forman fibras gruesas o haces, diseñados para dar resistencia; también evidencia, aunque en menor intensidad, las fibras reticulares. Se emplean tres colorantes para diferenciar el núcleo celular, el citoplasma y las fibras de colágena.

En las muestras obtenidas de los explantes de cartílago de animales sin OA, las fibras de colágena se tiñeron de azul y el núcleo celular de color marrón, la tinción

es homogénea y se puede observar la cantidad normal de colágena que se encuentra en el cartílago (Fig. 8 M).

El análisis del cartílago obtenido de los animales con OA sin tratamiento presentaron mayor proporción de degradación de proteoglicanos, evidenciada con una tinción rojiza más heterogénea que el grupo OA con tratamiento con FT, y afectando todas las capas del espesor del cartílago degradación importante de la colágena (Fig. 8 J,K,L).

En cuanto al análisis de las muestras obtenidas de los animales con OA tratados con FT, mostraron disminución en la proporción de fibras de colágena predominantemente en las zonas superficiales del cartílago, evidenciadas con una tinción rojiza, comparativamente con la tinción azulada homogénea de la muestra control. En otras áreas se observaron zonas de abundante formación de fibrocartílago (Fig. 8 G,H,I).

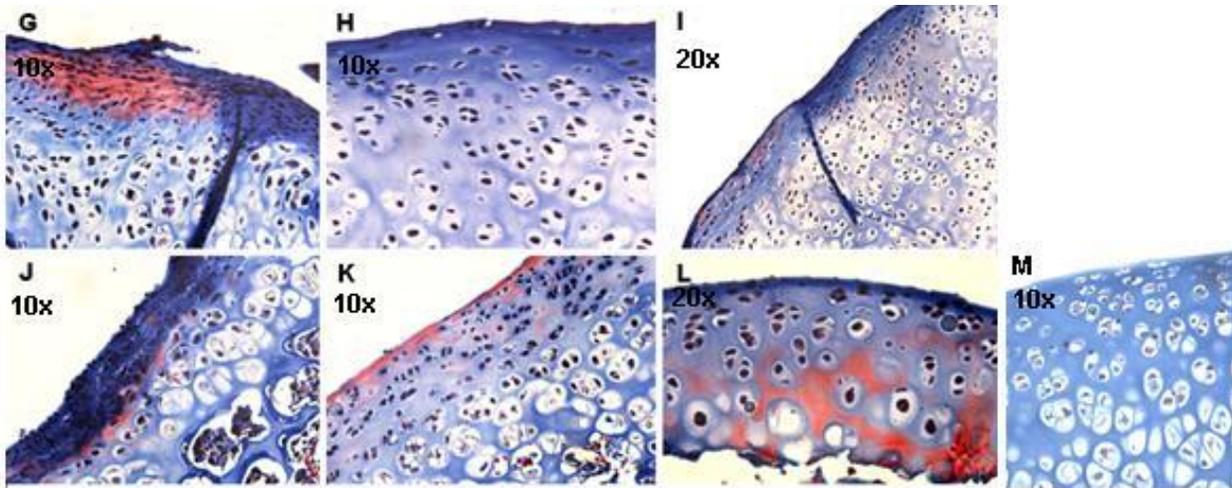


Figura 8. Análisis de la proporción de colágena, tinción con Tricrómico de Massón. Grupo OA con tratamiento con FT (G, H y I); grupo OA sin tratamiento con FT (J, K y L); grupo control (M).

6.5 ANALISIS DE LA EXPRESION DE CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS Y ANTI-INFLAMATORIAS EN OA.

Durante el proceso de fisiopatogénesis de la OA, se presenta un desbalance entre los factores catabólicos y los factores anabólicos, en este proceso se ven implicadas citocinas pro- y anti-inflamatorias; dentro de las citocinas pro-inflamatorias destacan la IL-1, el TNF α y la IL-6, las cuales son responsables de la alteración de los procesos catabólicos; en lo que respecta a las citocinas anti-inflamatorias se ha reportado la participación del IFN- γ PDGF y del FGF-2; los cuales son factores anabólicos de suma importancia, ya que promueven la síntesis de la MEC. (Martel-Pelletier *et al.*, 2008).

Para estudiar los niveles de expresión de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias implicadas en el proceso de OA, y como pudieran modificarse por el

tratamiento con FT, se valoró la expresión de los mensajeros correspondientes, empleando RNA obtenido de las muestras de cartílago de los animales del grupo control y de los grupos con OA inducida, tratados con FT y sin tratamiento.

El RNA de los diferentes grupos se obtuvo mediante la técnica de trizol y posteriormente se realizó la cuantificación de dicha extracción, los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Cuantificación de RNA por espectrofotometría.

Número de Replica	Relación de la absorbancia a 260/280 nm	RNA Control	RNA Grupo con OA tratado con FT	RNA Grupo con OA sin tratamiento
1	1.96 nm	279.28 ng/μl	140.9 ng/μl	49.93 ng/μl
2	1.91 nm	121.8 ng/μl	201.30 ng/μl	178.78 ng/μl
3	1.89 nm	158.3 ng/μl	90.4 ng/μl	48.6 ng/μl

La relación de absorbancia de 260/280nm mostró en las tres repeticiones un valor muy cercano a 2, lo que nos sugiere una pureza adecuada de los ácidos nucleicos y una muy baja contaminación con proteínas.

Una vez cuantificado y verificada la pureza del RNA, las muestras se trataron con DNAsa libre de RNAsa, utilizando el Kit RQ1 de Promega, al termino del tratamiento, el RNA se precipitó y cuantifico nuevamente; en la tabla 6 se muestran las concentraciones finales obtenidas.

Tabla 6. Cuantificación de RNA tratado con DNAsas.

Numero de Replica	RNA Control	RNA Grupo con OA tratado con FT	RNA Grupo con OA sin tratamiento
1	253.67 ng/μl	88.22 ng/μl	56.98 ng/μl
2	114.2 ng/μl	197.24 ng/μl	156.14 ng/μl
3	387.17 ng/μl	326.80 ng/μl	318.88ng/μl

Posteriormente, con la finalidad de verificar que las muestras de RNA estuvieran libres de DNA contaminante, se realizó una PCR en punto final amplificando el gen de *actina*.

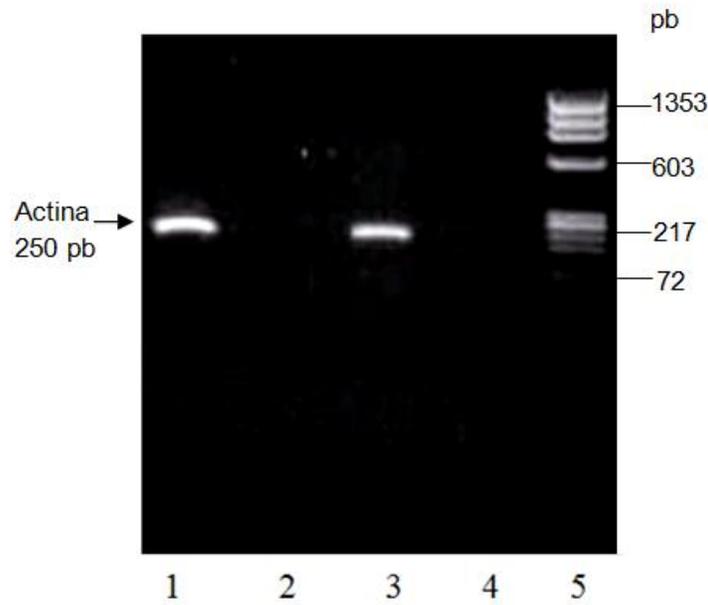


Fig 9. Amplificación de un fragmento del gen de *actina*. Gel de agarosa al 2%. Carril 1, PCR para el gen de actina empleando DNA como templado; Carril 2, PCR sin templado; Carril 3, PCR para gen de actina usando como templado RNA sin tratamiento con DNAsa; Carril 4, PCR para gen de actina usando como templado RNA con tratamiento de DNAsa; Carril 5, Marcador de tamaño molecular.

Los resultados mostraron (Fig. 9, carril 3) que el RNA obtenido previo al tratamiento con DNAsa estaba contaminado con DNA; posterior al tratamiento la PCR en la que se uso como templado dicho RNA resulto negativa (Fig 9, carril 4) mostrando que las muestras experimentales estuvieron libres de trazas de DNA, que pudiera interferir con la interpretación de los resultados.

Una vez verificada la calidad y la integridad del RNA, se procedió a realizar la síntesis del cDNA, a través de la transcriptasa reversa (RT), la cual sintetiza una cadena de DNA a partir de un templado de RNA.

La cuantificación de los cDNAs obtenidos se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Cuantificación de cDNA

Número de Replica	RNA Control	RNA Grupo con OA tratado con FT	RNA Grupo con OA sin tratamiento
1	536.30 ng/μl	361.562 ng/μl	120.65 ng/μl
2	311.90 ng/μl	523.6 ng/μl	415.77 ng/μl
3	760.89 ng/μl	897.259 ng/μl	678.90 ng/μl

Para verificar la calidad del cDNA sintetizado se realizó una PCR para amplificar nuevamente el gen de *actina* y verificar la calidad del cDNA.

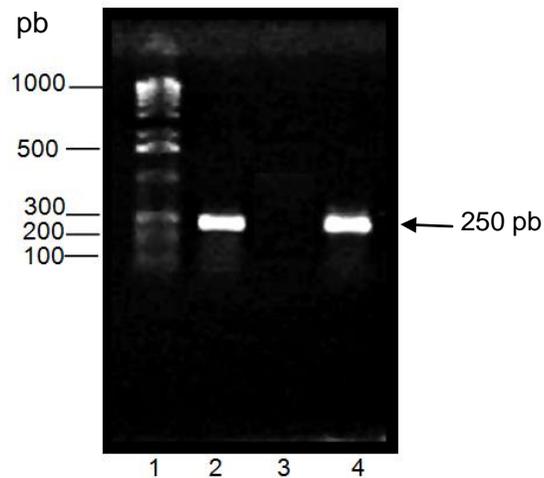


Fig 10. Calidad del cDNA sintetizado. Carril 1, Marcador de tamaño molecular; Carril 2, PCR para el gen de actina empleando DNA como control; Carril 3, PCR para gen de actina usando como templado RNA tratado con DNAsa; Carril 4, PCR para gen de actina usando como templado el cDNA sintetizado.

Los resultados mostraron que existe amplificado del tamaño esperado, para el gen de actina cuando se uso como templado el cDNA sintetizado anteriormente, lo que sugiere que el cDNA es de buena calidad y se encuentra integro para los ensayos de RT-PCR posteriores.

Una vez obtenido el cDNA se procedió a la detección de la expresión de citocinas pro-inflamatorias, mediante la realización de PCR multiplex. Se empleó el kit de MPCR de Maxim Biotech para detectar la expresión de I- κ B, TNF- α , IL-1, IL-6. Así mismo se utilizó el kit de MPCR de Maxim Biotech para detectar la expresión de las citocinas anti-inflamatorias IFN- γ , PDGF, FGF-2, IL-4, IL-2 y la IL10.

En las figuras 11 y 12 se observa el corrimiento electroforético de las PCR multiplex realizados con los cDNA obtenidos de los tres grupos de estudio. Todos los resultados se normalizaron con su respectivo control interno que fue el gen *GADPH*.

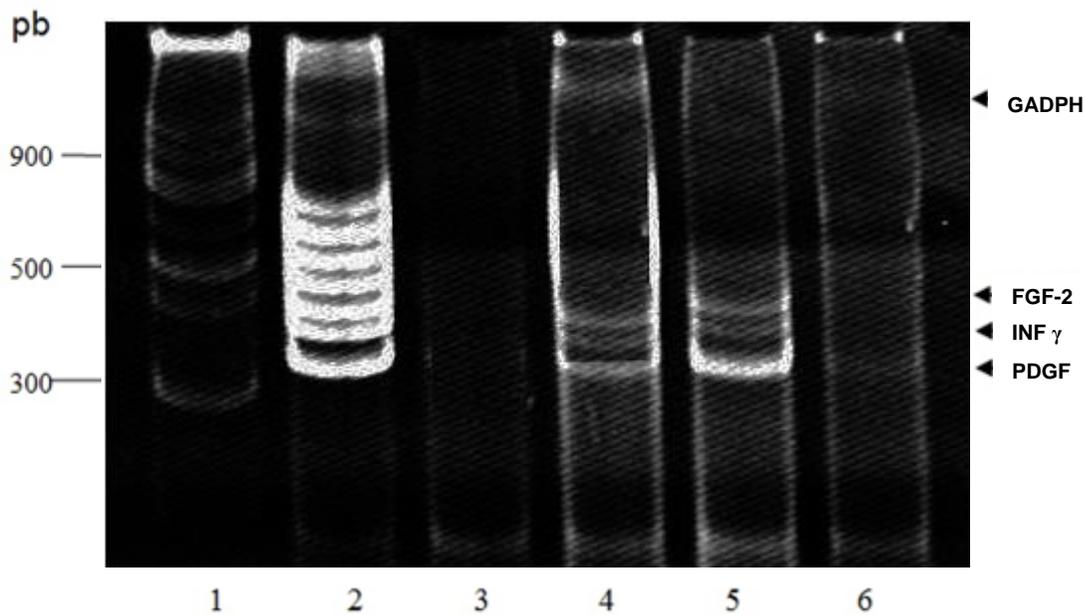


Fig 11. Expresión de citocinas anti-inflamatorias. Corrimiento electroforético en un gel de poliacrilamida al 12% de los productos de la PCR multiplex. Carril 1, marcador de tamaño molecular de 100 pb; Carril 2, amplificado del control positivo del Kit; Carril 3, PCR sin templado; Carril 4, PCR multiplex de las muestras de cartílago de los animales sin intervención quirúrgica y sin tratamiento (control normal); Carril 5, PCR multiplex de las muestras de cartílago de los animales con OA inducida tratados con FT; Carril 6, PCR multiplex de las muestras de cartílago de los animales con OA inducida sin tratamiento.

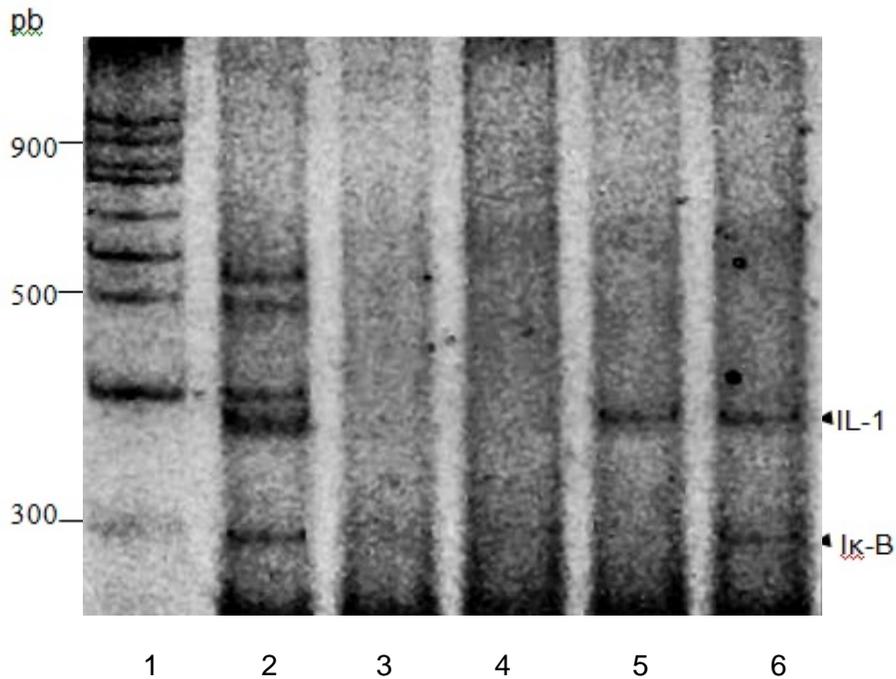


Fig. 12 Expresión de citocinas pro-inflamatorias. Corrimiento electroforético en un gel de poliacrilamida al 12% de los productos de las PCR multiplex. Carril 1, marcador de tamaño molecular de 100 pb; Carril 2, amplificado del control positivo del Kit; Carril 3, control negativo; Carril 4, PCR multiplex de las muestras de cartílago de los animales sin intervención quirúrgica y sin tratamiento (control normal); Carril 5, PCR multiplex de las muestras de cartílago de los animales con OA inducida tratados con FT; Carril 6, PCR multiplex de las muestras de cartílago de los animales con OA inducida sin tratamiento.

Como se puede observar en la figura 11, PDGF, IFN γ , FGF-2 se expresaron de manera basal en el cartílago normal (fig 11, carril 4). En el cartílago de animales con OA inducida sin tratamiento no se observó la expresión de FGF -2 y de IFN γ y se observó una banda muy tenue para PDGF. Estos resultados nos sugieren que la disminución y/o ausencia en la expresión de dichas citocinas se debe probablemente al proceso degenerativo de la OA y al daño producido en el cartílago.

Por otro lado, la expresión de las interleucinas anti-inflamatorias PDGF, IFN- γ , FGF-2 incrementaron significativamente en los cartílagos de los animales tratados con FT a niveles similares o superiores a la expresión de dichas citocinas en el cartílago normal. De manera particular es importante señalar que la citocina PDGF se sobre-expresa notoriamente sugiriendo que FT esta modulando positivamente la expresión de dichas citocinas anti-inflamatorias en los condrocitos de los animales tratados con FT.

Respecto a la expresión de las citocinas pro-inflamatorias, en la figura 12 se observa que no hay expresión basal de ninguna citocina pro-inflamatoria en el cartílago normal. Mientras que la IL-1 e I κ -B se expresaron en el cartílago de los animales con OA sin tratamiento. Estos resultados sugieren que la expresión de dichas citocinas está fuertemente relacionada con el proceso degenerativo y el daño al cartílago por la OA inducida que genera un proceso inflamatorio crónico. En las muestras obtenidas de animales con OA tratados con FT no hubo disminución de la expresión de IL-1, observandose niveles similares de expresión a los animales con OA sin tratamiento. Sin embargo, a diferencia de los animales

con OA sin tratamiento, en los animales con OA tratados con FT disminuyó completamente la expresión de I κ -B sugiriéndose que el FT es capaz de modular parcialmente la expresión de citocinas pro-inflamatorias.

6.6 INMUNOHISTOFLUORESCENCIA Y ANALISIS CON MICROSCOPIA CONFOCAL

Para determinar la inmunolocalización de las citocinas pro- y anti-inflamatorias seleccionadas. Se utilizaron anticuerpos específicos para las citocinas FGF-2, PDGF, NF κ B e I κ B no fosforilada. El marcaje se realizó en secciones de cartílago articular obtenidos de ratas a las cuales se les indujo OA y que no recibieron ningún tratamiento o bien que fueron tratadas con FT.

FGF-2, se localizó en el citoplasma de los condrocitos del cartílago sano (control), presentaron inmunoreactividad de FGF-2 intensa y homogénea en los condrocitos del espesor total del cartílago. Los condrocitos del cartílago de animales con OA sin tratamiento presentaron inmunoreactividad en las células de la capa media y profunda de similar intensidad. Las muestras de cartílago normal.

Mientras que en las muestras obtenidas de animales tratados con FT, se observó intenso inmunomarcaje de la proteína FGF-2 en el citoplasma de los condrocitos predominantemente de la zona media del cartílago (Fig. 13).

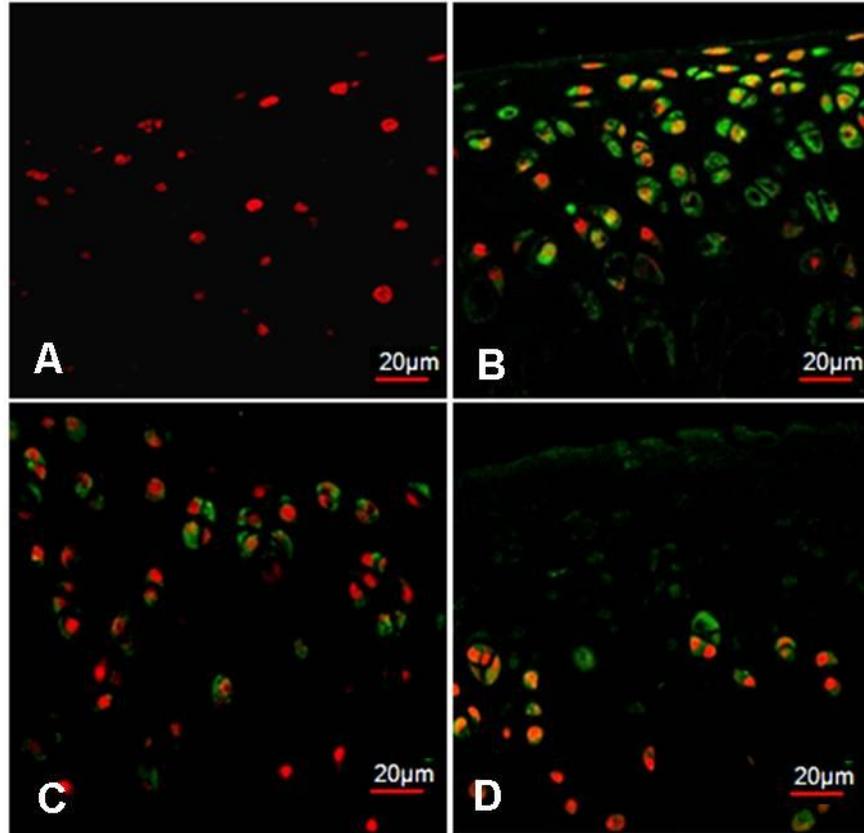


Fig. 13. Inmunolocalización de FGF-2. (A) Control negativo. (B) Cartílago normal. (C) Cartílago de los animales con OA sin tratamiento (D) Cartílago de los animales con OA tratados con FT.

La inmunolocalización de la proteína PDGF mostró un patrón homogéneo en el citoplasma de la mayoría de los condrocitos del cartílago sano, comparativamente, no se observó inmunoreactividad en los condrocitos del cartílago del grupo sin tratamiento con FT y una distribución homogénea en el citoplasma de la gran mayoría de los condrocitos en el cartílago del grupo OA tratado con FT (Fig. 14).

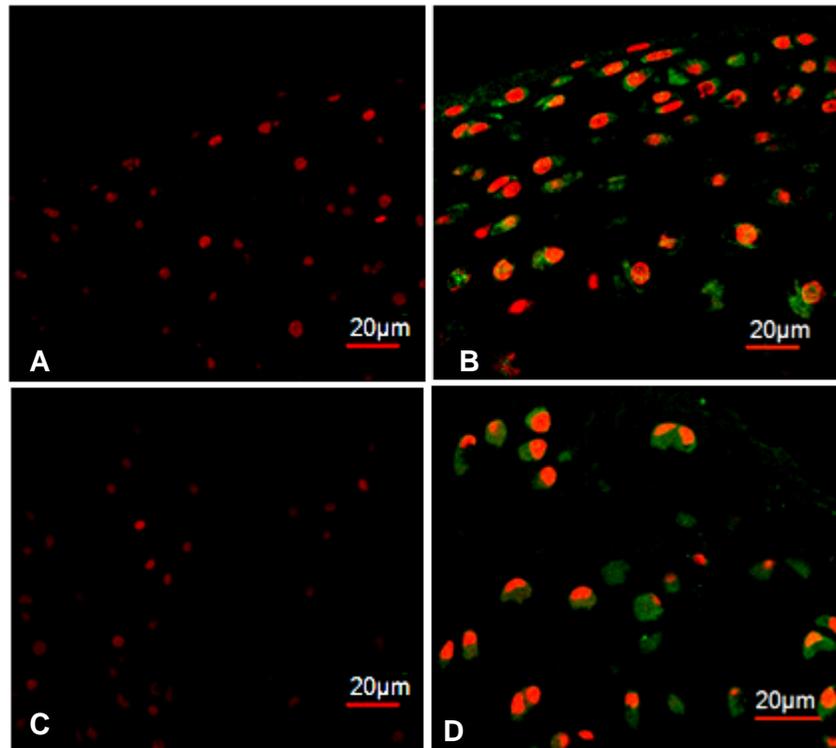


Fig. 14. Inmunolocalización de PDGF. (A) Control negativo. **(B)** Cartílago normal. **(C)** Cartílago de los animales con OA sin tratamiento **(D)** Cartílago de los animales con OA tratados con FT.

En lo que respecta a la localización de la proteína I κ B no fosforilada, no se identificó inmunoreactividad en el grupo control así como en los condrocitos del cartílago de animales sin tratamiento. En las muestras obtenidas de animales tratados con FT, I κ B no fosforilada se observó débilmente en el citoplasma de algunos condrocitos de la zona superficial (Fig. 15).

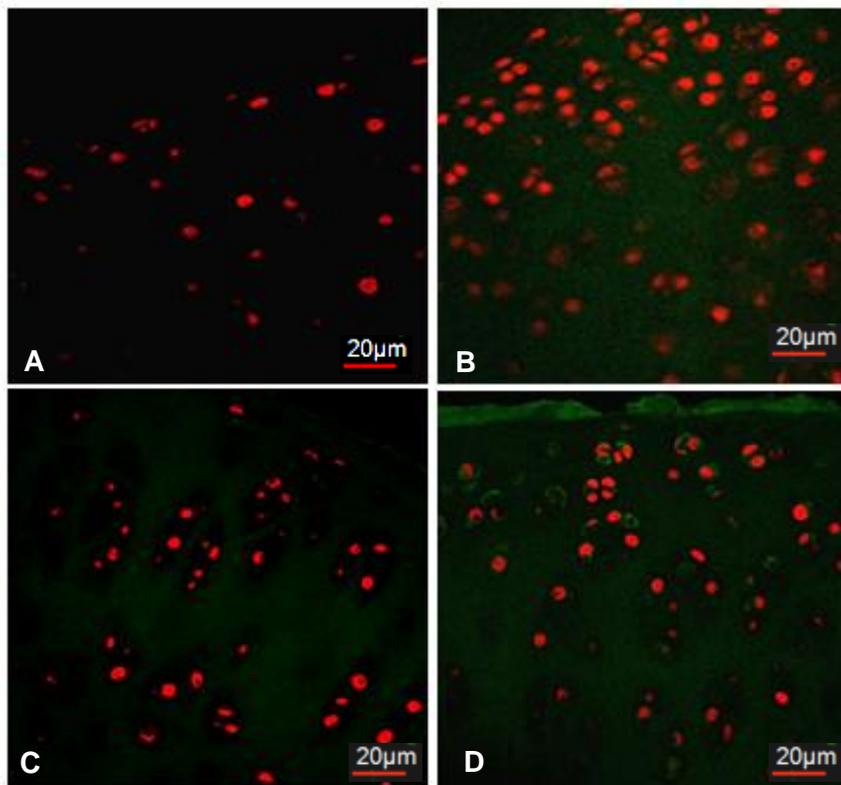


Fig. 15. Inmunolocalización de I κ B no fosforilada. (A) Control negativo. **(B)** Cartílago normal. **(C)** Cartílago de los animales con OA sin tratamiento **(D)** Cartílago de los animales con OA tratados con FT.

Finalmente, no se observó inmunoreactividad de la proteína NFκB en ninguno de los grupos experimentales (Fig. 16).

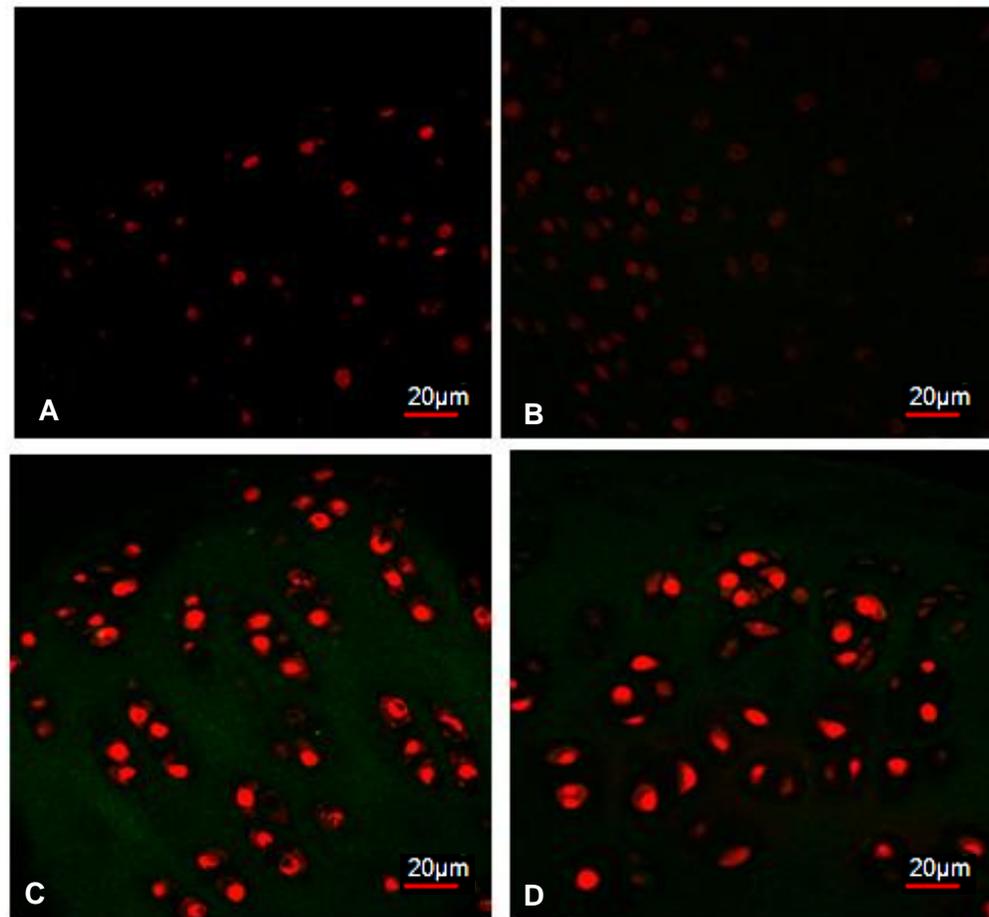


Fig. 16. Inmunolocalización de NFκB. (A) Control negativo. **(B)** Cartílago normal. **(C)** Cartílago de los animales con OA sin tratamiento **(D)** Cartílago de los animales con OA tratados con FT.

7. DISCUSION

La OA es una enfermedad crónico-degenerativa, la cual se considera como la artropatía más común en personas mayores de 65 años de edad. Se caracteriza por dolor, rigidez y disfunción de las articulaciones, en casos más graves se suele observar atrofia muscular y deformidad de las extremidades (Arden *et al.*, 2006).

Las opciones terapéuticas actuales tienen como objetivo modular el dolor, mejorar la función articular, la deambulaci3n y mejorar la calidad de vida del paciente. Sin embargo, los tratamientos convencionales adem1s de que poseen efectos secundarios no deseados, no previenen esta patolog1a y no regeneran el cart1lago articular da1ado. Por ejemplo, los analg1sicos anti-inflamatorios inhiben la secreci3n de prostaglandinas a trav1s de la inhibici3n de la COX, permitiendo un efecto selectivo anti-inflamatorio, pero con efectos secundarios nefrot3xicos (Watson *et al.*, 2006). Por otro, lado los tratamientos quir1rgicos implican riesgos importantes que incluso, pueden originar la rigidez total de la articulaci3n afectada (Joern *et al.*, 2010).

Ante la incidencia epidemiol3gica de esta patolog1a y la b1squeda de otras opciones de tratamiento que pudiesen detener y regenerar la perdida articular, se ha propuesto como blancos terap1uticos, regular la expresi3n y/o la actividad de las citocinas implicadas en la fisiopatog1nesis de esta enfermedad, mediante el uso de inmunomoduladores (Kapoor *et al.*, 2011).

El FT es un agente que cl1nicamente ha demostrado su utilidad terap1utica a trav1s de una probable acci3n inmunomoduladora, regulando entre otras cosas la

expresión de citocinas anti-inflamatorias y pro-inflamatorias (Dvorožňáková *et al.*, 2009; Ojeda *et al.*, 2004). Así por ejemplo Georgescu y colaboradores en 1985 mostró efectos benéficos del FT al modular la inflamación y la disminución del dolor, en diversas patologías articulares. Por otro, lado su empleo constituye una terapéutica segura la cual ha sido evaluada en ensayos clínicos y de vigilancia activa en pacientes, encontrando que no existen efectos adversos asociados a este tratamiento (Cruz Barrios *et al.*, 2006).

El presente estudio tuvo como fin primordial documentar los efectos histopatológicos y moleculares producidos por el FT en la OA. Lo anterior con la finalidad de determinar si el FT es capaz de inducir o revertir los procesos degenerativos durante la fisiopatogénesis de la enfermedad. Así como aportar evidencias experimentales que validen el uso clínico de FT como un agente inmunoterapéutico en el tratamiento de OA.

Por tanto, para evaluar el efecto de FT en OA, utilizamos un modelo animal en rata, lo que nos permitió valorar los cambios degenerativos progresivos de esta enfermedad en 20 días posteriores a la inducción de esta. Estos cambios incluyen fibrosis, alteraciones en la morfología y distribución celular en el cartílago así como la pérdida de los componentes de la MEC.

Los estudios macroscópicos de las articulaciones afectadas de los animales tratados con FT y sin tratamiento, no mostraron cambios importantes que sugirieran modificaciones en la fisiopatología de la enfermedad; observándose en ambos casos, cóndilos femorales con erosiones cartilaginosas y engrosamientos

parciales; los platillos tibiales no presentan signos de engrosamiento articular pero si se observó fibrosis en ambos platillos; por lo tanto a nivel macroscópico no existieron diferencias contundentes entre el grupo tratado con FT y el grupo sin tratamiento.

Sin embargo, al realizar el análisis histopatológico, si se mostraron los siguiente cambios: en cuanto a morfología celular, los explantes de cartílago obtenidos de animales con OA sin tratamiento mostraron alteraciones en la arquitectura celular y se perdió la distribución celular en las diferentes zonas: observándose displasia celular y condrocitos agrupados en “clones”. Estas características correlacionan con diversos estadios del proceso degenerativo del cartílago en la OA humana, el cual se caracteriza por perdida de la forma alargada de las células de la zona superficial y la disminución del tamaño de estas (Montrull, *et al.*, 2005). Las células en la zona media aumentaron en volumen y se organizaron en grupos de 2-8 células denominados clones, los cuales constituyen agregados de condrocitos, que son típicos de la OA y que se encuentran en la zona superficial y media del corte histológico. (Montrull, *et al.*, 2005)

Al valorar histológicamente los explantes de cartílago obtenidos de animales con OA tratados con FT, se evidenciaron diferencias claras con los cartílagos con OA provenientes de animales sin tratamiento. La distribución y la arquitectura celular se conservaron, no hubo presencia de displasia celular, ni agrupación de los condrocitos en clones. El análisis comparativo de la morfología celular y la distribución en las distintas zonas del cartílago, sugiere por tanto que las muestras

obtenidas de animales tratados con FT, presentaron menor daño, observándose características histológicas de mayor similitud a las del cartílago articular normal.

Como hemos mencionado anteriormente, la MEC esta compuesta principalmente por los proteoglicanos y la colágena. En cuanto al contenido de proteoglicanos en la zona superficial, es el más bajo de todo el cartílago, mientras que en la zona media existe la mayor concentración de proteoglicanos. En la zona profunda la concentración de proteoglicanos es alta y la zona calcificada carece de proteoglicanos (Vega *et al* ., 2002). Pritzker y colaboradores en el 2005 demostraron que dentro del proceso degenerativo de la MEC, el cartílago pierde hasta el 75% de proteoglicanos, de las tres zonas.

En concordancia con lo observado por Pritzker, en este trabajo observamos un patrón similar. Estos hallazgos fueron observados en los explantes de cartílago de animales con OA, sin tratamiento, demostrando que efectivamente en la fisiopatología de la OA la degradación de proteoglicanos abarca varias zonas del cartílago. En contraparte, la valoración de proteoglicanos en las muestras de cartílago obtenidas de animales con OA tratados con FT, evidenciaron una tinción más homogénea, específicamente en el área superficial, que sugiere una degradación menor, aunque la tinción también presentó degradación de proteoglicanos en la zona media del corte histológico.

Respecto a la colágena, en la zona superficial del cartílago las fibras de la colágena están dispuestas de manera tangencial, en la zona media las fibras tienen mayor diámetro y están dispuestas de manera perpendicular a la superficie

articular, en la zona profunda se orientan hacia la superficie articular y se disponen radialmente; y en la zona calcificada se disponen perpendicularmente hacia la superficie articular (Vega *et al.*, 2002). En el desarrollo de la OA, en el cartílago se presenta fibrosis en la zona superficial y fragmentación y degradación de las fibras de colágena y degradación importante de esta proteína en las cuatro capas del tejido articular. Particularmente, la degradación de las fibras de colágena, da lugar a la fibrosis irreversible (Martel-Pelletier *et al.*, 2008). Estos datos se observaron en los explantes obtenidos de animales con OA sin tratamiento, en donde se evidenció degradación importante de colágena en todas las zonas del cartílago, fragmentación de la red de colágena y fibrosis de la capa superficial. En contraste a lo observado en las muestras obtenidas de los animales con OA tratados con FT, en donde se evidenció una tinción más homogénea y la degradación de colágena se observó en menor grado, preferencialmente en la zona superficial del cartílago.

Nuestros hallazgos sugieren que la inmunoterapia con FT modifica el proceso fisiopatogénico de la enfermedad. Estos datos también fueron encontrados por Boileau, Martel-Pelletier y colaboradores en 2009, al realizar el análisis histopatológico en un modelo animal de OA en perros, en donde se valoró el efecto de la fracción total de los aceites insaponificables de aguacate y soya (ASU), encontrando que estos compuestos pueden reducir el desarrollo del cartílago osteoartítico y las lesiones del hueso subcondral (Boileau *et al.*, 2009). En ese estudio Boileau observó una menor degradación de los proteoglicanos y disminución en la displasia de condrocitos y en la formación de clones, sugiriendo

que el efecto protector de ASU podría estar mediado por una reducción en el catabolismo del cartílago (Boileau *et al.*, 2009).

Los cambios histopatológicos observados en los animales tratados con FT nos sugirieron además la posibilidad de modificaciones en el balance de citocinas pro- y anti-inflamatorias en virtud de que el FT se ha reportado como un inmunomodulador. Al evaluar la expresión de las citocinas anti-y pro-inflamatorias mediante RT-PCR multiplex; encontramos que PDGF y FGF-2 se expresaron de manera basal en el cartílago normal, esto fue descrito por Blom y colaboradores en el 2007, al sugerir la expresión de dichas citocinas como factores anabólicos que se expresan de manera basal en el condrocito. Otra citocina expresada de manera basal fue IFN γ , la cual no se ha considerado hasta el momento como un factor anabólico, pero se sabe que inhibe la reabsorción de cartílago articular y regula a TNF α , para modular el proceso de degradación del cartílago (Bunning *et al.*, 1989).

En el presente trabajo, el cartílago de animales con OA inducida sin tratamiento no mostró la expresión de FGF-2 y de IFN γ y se observó solamente una baja expresión de PDGF. Sin embargo, en los animales tratados con FT la expresión de las interleucinas anti-inflamatorias PDGF, IFN γ y FGF-2 incremento significativamente. Este efecto también fue observado por Guillen y colaboradores en el 2005 en donde el aumento en la expresión de PDGF en el cartílago, incrementa la síntesis de proteoglicanos, promueve la formación de colágena y favorece la inducción de fenómenos de reparación tisular. Así mismo, Grassi y colaboradores en el 2004 encontraron que el IFN γ inhibe la apoptosis en

condrocitos, mediante la regulación de caspasa 8 y 3 y la activación de la proteína anti-apoptótica FLIP. Estos investigadores sugieren que el IFN γ afecta por tanto, la señalización de CD95 implicada en la apoptosis de condrocitos humanos (Grassi *et al.*, 2004).

Finalmente, Prazuna y colaboradores demostraron que FGF-2 promueve la síntesis de la colágena y los proteoglicanos, al controlar la producción de enzimas catabólicas mediante la activación de factores como EIK1, MAPK y NF κ B. Dichos autores observaron este efecto al encontrar que niveles bajos de FGF-2 reduce la síntesis de BMPs y del IGF-1, al mismo tiempo induce síntesis de la MMP-13.

Teniendo en consideración los diversos efectos encontrados para el PDGF, IFN γ y FGF-2 en el proceso anabólico del cartílago, nuestros resultados de la sobreexpresión de dichos factores en respuesta al tratamiento con FT sugieren que, el FT está promoviendo la síntesis de proteoglicanos y colágena, contrarrestando así el proceso de degradación de la MEC durante la OA, así como la inhibición de la apoptosis en condrocitos. Estos eventos correlacionan con el análisis histopatológico y los signos clínicos que sugieren que se está retardando la evolución de la OA.

En cuanto a la evaluación de citocinas pro-inflamatorias, de manera basal no hubo expresión de estas moléculas en el cartílago sano, sin embargo, en los animales con OA sin tratamiento y tratadas con FT, encontramos los mismos niveles de expresión de IL-1, lo cual concuerda con lo reportado por Blom y colaboradores en el 2008 donde demostraron que en los procesos de OA siempre hay aumento

en la expresión de factores catabólicos como IL-1. Por lo que el tratamiento con FT no modificó la expresión de IL-1.

Por el contrario de manera interesante encontramos que la expresión de I κ B fue menor en los animales tratados con FT en comparación con los que no fueron tratados. Este resultado sugiere que probablemente se desencadena una desregulación en la vía de señalización de NF κ B, dando como resultado la disminución en la transcripción de genes pro-inflamatorios, lo que sugiere que el FT pudiera modular parcialmente el proceso inflamatorio a través de la disminución de I κ B.

Dentro de la transcripción de genes pro-inflamatorios, I κ B tiene un papel fundamental en la activación del factor de transcripción NF κ B, esto se debe a que dicha activación se produce cuando I κ B a y b son degradadas por el proteasoma después de su fosforilación y ubiquitinación; I κ B es fosforilado en las serinas 32 y 36 por IKK a y b. Esto libera NF κ B de I κ B, y le permite translocarse a núcleo. Una vez en el núcleo NF κ B estimulando la expresión de genes que codifican citocinas como TNF- α , IL-1, IL-6, e IL-12; por lo tanto al presentarse cualquier desregulación en esta vía de señalización o mientras I κ B se encuentre unida a NF κ B este no podrá translocarse a núcleo y por lo tanto no habrá la transcripción de genes pro-inflamatorios.

Al respecto, Bar-Yehuda y colaboradores en el 2009 valoraron el efecto la adenosina A3 altamente selectiva de los receptores agonistas (CF101) el cual se definió recientemente como un potente agente anti-inflamatorio para el tratamiento

de la artritis reumatoide. Este grupo de investigadores evaluaron el efecto del tratamiento con CF101 en un modelo animal de OA, analizando los niveles de expresión de las proteínas quinasa B (PKB) entre las que destaca IκB; encontrando que la expresión de esta proteína disminuye en las ratas tratadas con CF101 en comparación con las ratas tratadas con vehículo, concluyendo que CF101 actuó como un agente protector de cartílago, disminuyendo la expresión de efectores inflamatorios.

En lo que respecta al análisis de inmunohistofluorescencia es importante mencionar que FGF-2, se localizó en el citoplasma de los condrocitos del cartílago normal y en el cartílago obtenido de animales con OA tratados con FT, correlacionando con lo observado en la RT-PCR múltiple. Sin embargo, cabe señalar que contrario a lo observado en la RT-PCR múltiple para esta citocina, en la inmunohistofluorescencia si se observó tinción en los condrocitos obtenidos de animales con OA sin tratamiento. Esto pudiera deberse a que durante la fisiopatogénesis de la OA, se inhiba la síntesis *de novo* de RNA mensajero correspondiente a FGF-2, mientras que la proteína ya sintetizada antes de dicha inhibición pudiera originar la fluorescencia observada.

En el caso de la inmunolocalización de la proteína PDGF, tanto en el cartílago sano como en el obtenido de animales con OA tratados con FT, se observó una distribución homogénea e intensa de la fluorescencia en los condrocitos en todas las zonas del cartílago; así mismo se evidenció que hay ausencia o muy baja detección de la proteína PDGF en los condrocitos del cartílago obtenido de animales sin tratamiento; estos resultados correlacionan con lo observado en la

RT-PCR múltiple en donde no se observó la expresión en los condrocitos con OA sin tratamiento, estos resultados sugieren que la síntesis de esta proteína en el cartílago obtenido de animales tratados con FT, se está llevando a cabo de manera muy similar al cartílago normal y que en los cartílagos sin tratamiento se inhibe su expresión.

En el análisis de la inmunolocalización de la proteína I κ B no fosforilada, la fluorescencia no se mostró en condrocitos de cartílago sano, así mismo los condrocitos del cartílago de animales sin tratamiento, no mostraron marcaje positivo para anti- I κ B no fosforilada, mientras que en las muestras obtenidas de animales tratados con FT observamos marcaje para I κ B no fosforilada en los condrocitos. Ahora bien con respecto a la proteína I κ B nuestros resultados sugieren que en los animales sin tratamiento I κ B se esta fosforilando por lo que se separa de NF κ B lo que permite su traslocación al núcleo, mientras que en los animales tratados con FT I κ B en su forma no fosforilada, se encuentra unida a NF κ B, al mantenerse no fosforilada, I κ B no se separa de NF κ B y por lo tanto, esta última pudiera no ser translocada al nucleo para llevar a cabo la transcripción de genes pro-inflamatorios (Saklatvala *et al.*, 2007).

Esto correlaciona entonces con lo observado en la RT-PCR múltiple en donde se observa la expresión de I κ B en los animales sin tratamiento, mientras que cuando se da el tratamiento con FT la expresión de I κ B está inhibida.

Por último en el análisis preliminar de la inmunohistofluorescencia para la proteína NF κ B, no se detectó en los condrocitos del cartílago sano, ni en los condrocitos de

los cartílagos de animales con OA tratados y sin tratar con FT. Esto correlaciona en la RT-PCR múltiple en donde no se expresó esta citocina en ninguno de los tres grupos de estudio.

En resumen nuestros resultados nos permiten sugerir que el efecto de FT induce un aumento en la expresión de citocinas anti-inflamatorias y la disminución de algunas citocinas pro-inflamatorias, equilibrando de esta manera, la homeostasis perdida en el condrocito para la regulación de los procesos catabólicos y anabólicos de la MEC. Estos análisis morfológicos y moleculares validan y sustentan el efecto y el uso del FT en OA.

. 8. CONCLUSIONES

- A nivel macroscópico, las articulaciones afectadas no presentaron diferencias morfológicas entre los animales con OA tratados con FT y los animales sin tratamiento.
- A nivel histológico la valoración de morfología celular y de los principales componentes de la MEC (colágena y proteoglicanos) evidenció que los animales con OA tratados con FT, presentaron menor daño, observándose características histológicas de mayor similitud a las del cartílago articular normal.
- El FT indujo la expresión de citocinas anti-inflamatorias PDGF, IFN γ y FGF-2 en los animales con OA tratados con FT.
- La expresión de la IL-1 no se modificó ante el tratamiento con FT.
- Los niveles de expresión a nivel de RNAm de I κ B, disminuyeron al tratar a las ratas con FT.

- En nuestros ensayos de inmunohistofluorescencia, el marcaje con el anticuerpo anti-PDGF y anti-FGF se observó localizado tanto en los condrocitos de cartílago sano, como en los condrocitos de animales tratados con FT,
- El marcaje con el anticuerpo anti-I κ B se observó de mayor intensidad en los cartílagos obtenidos de los animales tratados con FT y de menor intensidad en los cartílagos de los animales sin tratamiento.

9. PERSPECTIVAS

- Realizar RT-PCR en tiempo real para evaluar cuantitativamente los cambios encontrados en la expresión de las citocinas anti- y pro-inflamatorias de este trabajo.
- Hacer estudios profilácticos en modelos menos severos que permitan evaluar si el FT es capaz de prevenir el proceso degenerativo.
- Analizar mediante RT-PCR la expresión de metaloproteasas 1,3 y 13, y con ello verificar si el tratamiento con FT inhibe su expresión.
- Evaluar por RT- PCR la expresión de óxido nítrico y la expresión de prostagladina E2, ya que estas moléculas también están fuertemente relacionadas en el proceso de OA, y verificar si la terapéutica con FT modifica su expresión.
- Valorar mediante ensayos de TUNEL si la terapéutica con FT inhibe o regula la apoptosis en condrocitos.
- Realizar estudios de proteómica en cartílago de animales tratados con FT y compara si existen diferencias entre estas y las proteínas expresadas típicamente en el proceso de OA.

10. BIBLIOGRAFIA

- Arden N, Nevitt N. **Osteoarthritis, Epidemiology**. Clinical Rheumatology. 2006, 20, 3-25.
- Barksby HE, Hui W, Wappler I. **Interleukin-1 in combination with oncostatin M up-regulates multiple genes in chondrocytes, implications for cartilage destruction and repair**. Arthritis and Rheumatism. 2006, 54, 540–550.
- Barnes PJ, Karin M. **Nuclear factor-kappaB, a pivotal transcription factor in chronic inflammatory disease**. N Engl J Med. 1997, 336, 1066-72.
- Baugé C, Roche R, Saurel AS, Pujol JP, Legendre F **Chondroitin sulfate modulation of matrix and inflammatory gene expression in IL-1beta-stimulated chondrocytes--study in hypoxic alginate bead cultures**. Osteoarthritis Cartilage. 2008, 16(1), 105-14.
- Bellamy N, Cambell J, Robinson V, et al. **Intraarticular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee**. Cochrane Data -base Syst Rev 2006, 2, CD005328
- Bendele AM., **Animal models of osteoarthritis**. J Musculoskel Neuron Interact. 2001, 1, 363-376.
- Blom B. Blom, Peter M. van der Kraan and Wim B. van den Berg. **Cytokine Targeting in Osteoarthritis**. Current Drug Targets. 2007, 8, 283-292

- Boileau Christelle, Martel-Pelletier Martel-Pelletier, Judith Caron, Philippe Msika, Georges B Guillou, Caroline Baudouin, and Jean-Pierre Pelletier. **Protective effects of total fraction of avocado/soybean unsaponifiables on the structural changes in experimental dog osteoarthritis, inhibition of nitric oxide synthase and matrix metalloproteinase-13.** Arthritis Res Ther. 2009, 11(2), R41.
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. **Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation.** N Engl J Med. 1984, 331, 889–95.
- Bunning RA, Russell RG. **The effect of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon on the resorption of human articular cartilage and on the production of prostaglandin E and of caseinase activity by human articular chondrocytes.** Arthritis Rheum. 1989, 32(6), 780-4.
- Chodosh J, Morton SC, Mojica W. **Meta-analysis, chronic disease self-management programs for older adults.** Ann Intern Med 2005, 143, 427–38.
- Cordero Miranda MA, Flores Sandoval G, Orea Solano M, Estrada Parra S, Serrano Miranda E. **Safety and efficacy of treatment for severe atopic dermatitis with cyclosporin A and transfer factor.** Rev Alerg Mex. 1999, 46, 49-57
- Correa-Meza, B.E., Villavicencio, K., Castro M. M. E. DeLeon, F; Perez de la M., C., Aguilar, L., Zepeda, H **Factor de transferencia de Crocodylus moreleti. Estudios preliminares.** Cartel publicado para el congreso nacional de factor de transferencia, Julio 2002.

- Cruz Barrios M, Rodríguez Montiel B, Furones Mourelle J, Alonso Carbonell L, Calvo Barbado D y Rego Hernández J. **Efectos adversos asociados al tratamiento con factor de transferencia.** Rev Cubana Farm 2006, 1, 40
- Dvoroznáková E, Porubcová J, Sevcíková Z. **Immune response of mice with alveolar echinococcosis to therapy with transfer factor, alone and in combination with albendazole.** Parasitol Res. 2009, 105(4), 1067-76.
- Español T, Padulles J, Prats J. **Neuroblastoma and transfer factor.** Dev Biol Stand. 1977, 38, 331-3
- Espinosa Padilla SE, Orozco S, Plaza A, Estrada Parra S, Estrada García I, Rosales González MG, Villaverde Rosa R, Espinosa Rosales FJ. **Efecto del factor de transferencia en el tratamiento con glucocorticoides en un grupo de pacientes pediátricos con asma alérgica moderada persistente.** Revista Alergia México. 2009, 56(3), 67-71.
- Estrada S. Cabezas R. Padierna L. Fernandez C. **Inmunoterapia con factor de transferencia en pacientes con herpes zoster.** Biotecnología Aplicada. 1990,7,1,52-57.
- Estrada-Parra S, Nagaya A, Serrano E, Rodriguez O, Santamaria V, Ondarza R, Chavez R, Correa B, Monges A, Cabezas R, Calva C. **Comparative study of transfer factor and acyclovir in the treatment of herpes zoster.** Int J Immunopharmacol. 1998, 20, 521-35
- Eyre DR, Weis MA & Wu JJ. **Articular cartilage collagen, an irreplaceable framework.** J Clin Invest. 1991, 87, 357–361.

- Fabre, Perez, Aguilar, Rangel, Estrada-García, Hernández, Estrada-Parra. **Transfer factors as immunotherapy and supplement of chemotherapy in experimental pulmonary tuberculosis.** Clin Exp Immunol. 2004, 136, 215–223.
- Fernandez, Diaz, Morales, Toledo, Hernandez E, Rojas, Madriz, Lopez. **Effect of transfer factor on myelosuppression and related morbidity induced by chemotherapy in acute leukaemias** Br J Haematol. 1993, 84, 423-427
- Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Miranda-Hernández D, Zapata-Benavides P, Castillo-León L, Isaza-Brando C, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. **In vitro effects of bovine dialyzable leukocyte extract (bDLE) in cancer cells** Cytotherapy. 2006, 8(4), 408-14
- Fudenberg, H. Pizza, G. **Transfer factor 1993, new frontiers.** Progress in drug research 1994, 42, 309-400
- Georgescu C. **Effect of long-term therapy with transfer factor in rheumatoid arthritis.** Med Interne. 1985, 23(2), 135-40.
- Gouze, J. N. **Interleukin-1 β down-regulates the expression of glucuronosyltransferase I, a key enzyme priming glycosaminoglycan biosynthesis, influence of glucosamine on interleukin-1 β -mediated effects in rat chondrocytes.** Arthritis Rheum. 2001. 44, 351–360.
- Grassi F, Piacentini A, Cristino S, Toneguzzi S, Facchini A, Lisignoli G. **Inhibition of CD95 apoptotic signaling by interferon-gamma in human osteoarthritic chondrocytes is associated with increased expression of FLICE inhibitory protein.** Arthritis Rheum. 2004, 50(2), 498-506.

- Guillen Salazar, Mirabeth Lis. **Rediferenciación de condrocitos en plasma rico en factores de crecimiento plaquetarios para condroplastia articular.** Patología del aparato locomotor, 2005, 3 (1), 13-23
- Hangody L, Ráthonyi G, Duska ZS. **Autologous osteochondral mosaicplasty – surgical technique.** J Bone Joint Surg (Am). 2004, 86 Suppl. I, 65–72.
- Huber M, Trattnig S, Lintner F. **Anatomy, Biochemistry and Physiology of Articular Cartilage.** Investigative Radiology. 2000, 35(10), 573–80
- Joern W.-P. Michael, Klaus U. Schlüter-Brust, Peer Eysel. **The Epidemiology, Etiology, Diagnosis, and Treatment of Osteoarthritis of the Knee.** Dtsch Arztebl Int. 2010, 107(9), 152–62
- Martel-Pelletier Martel-Pelletier; Christelle Boileau; Jean-Pierre Pelletier. **Cartilage in normal and osteoarthritis conditions.** Best Practice & Research Clinical Rheumatology. 2008, 22, 351–384
- Kaminkova J, Lange CF. **Transfer factor and repeated otitis media.** Cell immunol. 1984, 89, 259-264
- Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. **Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis.** Nat. Rev. Rheumatol. 2011, 7, 33–42.

- Kirkpatrick CH y Gallin JI. **Suppression of cellular immune responses following transfer factor, Report of a case.** Cellular Immunology. 1975, 15, 470–474.
- Kirkpatrick CH, Rozzo SJ, Mascali JJ., Murine. **Specific interactions between transfer factor and antigen.** J Immunol. 1985, 135 (6), 27-33
- Kirkpatrick CH. **Transfer factors, identification of conserved sequences in transfer factor molecules.** Mol Med. 2000, 6(4),332-41
- Kouri J.B. and Lavallo C. **Review.Do chondrocytes undergo "activation" and"transdifferentiation" during the pathogenesis of osteoarthritis? A review of the ultrastructural and immunohistochemical evidence.** Histol Histopathol.2006, 21 , 793-802
- Lawrence HS. **The transfer in humans of delayed skin sensitivity to Streptococcal M substances and to tuberculin with disrupted leukocytes.** Journal of Clinical Investigation. 1955, 34, 219 - 230.
- Lories R, Luyten F. **The bone–cartilage unit in osteoarthritis.** Nat. Rev. Rheumatol. 2011, 7, 43–49.
- Lozoya K, Kouri JB. **A novel rat osteoarthrosis model to assess apoptosis and matrix degradation.** Pathol Res Pract. 2000, 196, 729-745
- Magnuson PB. **Joint debridement and surgical treatment of degenerative arthritis.** Gynecol Obstet. 1941, 73, 1–9.

- Martel-Pelletier. **The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function.** Arthritis Rheum. 1992, 35, 530–540.
- Matsunga D, Akizuki S, Takizawa T, Yamazaki I, Kuraishi J. **Repair of articular cartilage and clinical outcome after osteotomy with microfracture or abrasion arthroplasty for medial gonarthrosis.** Knee. 2007, 14, 465–71.
- Moseley JB, O'Malley K, Petersen NJ. **A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee.** N Engl J Med. 2002, 347, 81–8.
- Montrull, Brizuela, Demurtas, Spitale, Meirovich. **Structure and secretory activity of cultured chondrocytes from patients with osteoarthritis.** Biocell. 2005, 29(2), 163-167
- O'Connor MI. **Sex differences in osteoarthritis of the hip and knee.** J Am Acad Orthop Surg. 2007, 15 Suppl 1, S22-5.
- Ojeda, Cornelis, Fernández. **Dialyzable Leukocyte Extract differentially regulates the production of TNF α , IL-6, and IL-8 in bacterial component-activated leukocytes and endothelial cells.** Inflamm. res. 2005, 54, 74–81
- Paz J, González-Busto I, Paz J. **Artrosis, patogenia y desarrollo.** Revista de Ortopedia y Traumatología. 2002, 46, 401-8.

- Pineda B, Estrada-Parra S, Pedraza-Medina B, Rodriguez-Ropon A, Perez R, Arrieta O. **Interstitial transfer factor as adjuvant immunotherapy for experimental glioma.** J Exp Clin Cancer Res. 2005, 24(4), 575-83.
- Pizza G, Chiodo F, Colangeli V, Gritti F, Rauseo E, Fudenberg HH, De Vinci C, Viza D. **Preliminary Observations using HIV-specific Transfer Factor in AIDS.** Biotherapy. 1996, 9, 41-47.
- Pizza G. **A preliminary report on the use of transfer factor for treating stage D3 hormoneunresponsive metastatic prostate cancer.** Biotherapy. 1996. (1-3),123-32
- Pizza G. **In vitro studies during long-term oral administration of specific transfer factor.** Biotherapy. 1996. 9(1-3),175-85
- Pollard H, Ward G, Hoskins W, Hardy K. **The effect of a manual therapy knee protocol on osteoarthritis knee pain: a randomized controlled trial.** J Can Chiropr Assoc 2008, 52, 229–42.
- Prasanna Muddasani, Jim C. Norman, Michael Ellman, Andre J. van Wijnen, and Hee-Jeon. **Basic Fibroblast Growth Factor Activates the MAPK and NFκB Pathways That Converge on Elk-1 to Control Production of Matrix Metalloproteinase-13 by Human Adult Articular Chondrocytes.** The journal of biological chemistry. 2007, 282 (43), 31409–31421.
- Pritzker, Gay, Jimenez, Ostergaard, Pelletier, Revell, Salter, W. B. van den Berg. **Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging.** OsteoArthritis Research Society International. 2005 .07.014

- Rocklin, R. E. **Use of transfer factor in patients with depressed cellular immunity and chronic infection.** Birth Defects, Original Article Series. 1975, 11, 431-435.
- Shimoaka T, Ogasawara T, Yonamine A. **Regulation of osteoblast, chondrocyte, and osteoclast functions by fibroblast growth factor (FGF)-18 in comparison with FGF-2 and FGF-10.** The Journal of Biological Chemistry. 2002, 277, 7493–7500.
- Saklatvala J. **Inflammatory Signaling in Cartilage, MAPK and NF-κB Pathways in Chondrocytes and the Use of Inhibitors for Research into Pathogenesis and Therapy of Osteoarthritis** Current Drug Targets. 2007, 8, 305-313
- Stanciková M, Rovenský J, Pekárek J, Orvický E, Blazícková S, Cech K. **Influence of various forms of dialyzable leukocyte extracts on rat adjuvant arthritis.** Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 1994,42(4), 295-9.
- Towheed TE, Maxwell L, Anastassiades TP. **Glucosamine therapy for treating osteoarthritis.** Cochrane Database Syst Rev. 2005, 2, CD002946
- Vega Álvarez, J A, García-Suárez, O, Fernández Monjil, D, del Valle Soto , M. **Bioquímica y biología del cartílago articular.** Rev Ortp Traumatol. 2002, 46,391-400.

- Watson M, Mrookes ST, Kirwan JR. **Non-aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drugs for treating osteoarthritis of the knee.** Cochrane Database Syst Rev. 2006, 1, CD000142
- Westacott, C. I., Atkins, R. M., Dieppe, P. A. & Elson, C. J. **Tumor necrosis factor α receptor expression on chondrocytes isolated from human articular cartilage.** J. Rheumatol. 1994, 21,1710–1715.
- Yang KG, Raijmakers NJ, van Arkel ER. **Autologous interleukin- 1 receptor antagonist improves function and symptoms in osteoarthritis when compared to placebo in a prospective random - ized controlled trial.** Osteoarthritis Cartilage 2008, 16, 498–505.

ANEXO 1

HEMATOXILINA DE HARRIS

REACTIVO	CANTIDAD
Hematoxilina	5 g
Alcohol 100%	50 mL
Alumbre de Potasio	100 mL
Agua destilada	1000mL
Oxido de rojo de mercurio	2.5 g

EOSINA

REACTIVO	CANTIDAD
Eosina	0.25 g
Floxina	0.25 g
Agua destilada	100 mL

GEL DE ACRILAMIDA AL 12%

REACTIVO	CANTIDAD
Acrilamida al 30%	3.6 ml
TBE 10X	1.5 mL
Agua destilada	6 mL
PSA	60 µl
TEMED	6 µl

AGUA DEPC

REACTIVO	CANTIDAD
Agua Destilada	1 litro
Dietilpirocarbonato	1 mililitro

Agitar toda la noche y posteriormente esterilizar

PBS 10x

REACTIVO	CANTIDAD
NaCl	82 g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	3.8 g
NaH ₂ PO ₄	17.4 g
Agua desinizada	1000 mL

PBS 1X pH 7.4

REACTIVO	CANTIDAD
Agua Desionizada	900 mL
PBS 10X	100 mL

Medir pH y filtrar

PBS -TRITON

REACTIVO	CANTIDAD
Tritón	2 mL
PBS 1X pH 7.4	998 mL

PARAFORMALDEHIDO AL 4%

REACTIVO	CANTIDAD
Paraformaldehido	4 g
PBS 1X pH 7.4	100 mL

Calentar en baño maría a 65°C durante 2 horas.

Dejar enfriar y almacenar la solución a 4° C, donde permanece estable por 2 semanas

GELATINA AL 0.5%

REACTIVO	CANTIDAD
Gelatina	1 g
Sulfato de potasio crómico	0.1 g
Agua desionizada	200 ml

Calentar los 200ml de agua desionizada a 65° C disolver la gelatina y agregar el sulfato de potasio cromico. Dejar enfriar a temperatura ambiente e introducir los portaobjetos de vidrio y dejar secar a 37° C durante toda la noche.

CLORURO DE AMONIO (NH₄Cl)

REACTIVO	CANTIDAD
NH ₄ Cl	0.026 g
PBS 1X pH 7.4	10 mL

ACIDO CLOHIDRICO (HCL)

REACTIVO	CANTIDAD
HCL	1 mL
PBS 1X pH 7.4	9 mL

SACAROSA AL 10%

REACTIVO	CANTIDAD
Sacarosa	2 g
PBS 1X pH 7.4	20 mL

ALBUMINA LIBRE DE IgG AL 2%

(CANTIDAD PARA 13 LAMINILLAS)

REACTIVO	CANTIDAD
Albumina libre de IgG	1.6 milig
PBS- Tritón	800 mL