



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS  
MOLECULAR**

**EL EFECTO DEL EJERCICIO DE ALTO IMPACTO SOBRE LA  
EXPRESIÓN DE CITOCINAS PRO- Y ANTI-INFLAMATORIAS EN EL  
CARTÍLAGO ARTICULAR DE RATA Y SU POSIBLE RELACIÓN  
CON LA OSTEOARTRITIS**

Tesis que presenta

Q.B.P. Moisés Cabrera González

Para Obtener el Grado de  
Maestro en Ciencias

En la Especialidad de  
INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Director de la Tesis:

Dr. Juan B. Kouri Flores

México, Distrito Federal

AGOSTO, 2013

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Patología Osteoarticular del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN bajo la dirección del Dr. Juan Bautista Kouri Flores, con el apoyo del CONACYT con número de registro 168328.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan B. Kouri, por la dirección de este trabajo, su apoyo, orientación y estímulo.

A los Doctores Fidel de la Cruz Hernández Hernández, Marco Antonio Vega López, Carlos Lavallo Montalvo y Elizabeth Pérez Hernández por su asesoría en la realización de este trabajo y colaboración en la interpretación de resultados.

A los auxiliares de laboratorio:

Al Dr. Raymundo Cruz y en especial a la Biol. Magdalena Miranda, por su amistad y transmitirme su experiencia, consejos y comentarios, para poder realizar este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio:

A las M. en C. Maylin, América y Nancy y al M. en C. David Solís García, por su amistad y confianza, por el apoyo brindado en la parte experimental. También al técnico de laboratorio Biol. Oscar por su empeño y don de colaboración.

A las secretarías del Departamento:

Irma Edith Miranda y Clara Castelán Domínguez.

A los Doctores y compañeros del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN.

## DEDICATORIA.

A mi familia:

A mi madre Cecilia, por su inmenso amor, sus grandes enseñanzas y por heredarme su fortaleza, además de guiarme en el apasionante camino de la investigación.

A mi padre Carlos por su apoyo incondicional y constante, sus consejos y experiencias, a pesar de la distancia,

A mi esposa Nancy Ivet por estar conmigo siempre. Por emprender sus proyectos junto con los míos y por ser el gran soporte que me mantiene de pie.

A mi hijo Ethan Sebastián, que es la luz de mis días, mi gran felicidad y mi mayor alegría. Gracias por ser mi hijo, pero sin duda gracias por permitirme ser tu Padre.

## ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Generalidades del efecto del ejercicio sobre los tejidos muculoesqueléticos.....	1
1.2 ¿Qué es la osteoartritis?.....	2
1.3 Biología, estructura y organización del cartílago articular .....	3
1.4 Epidemiología.....	6
1.5 Patogénesis de la OA.....	7
1.6 El papel de las citocinas en la OA .....	9
1.6.1. Interleucina-1beta.....	10
1.6.2 Interleucina 10.....	12
1.6.3 Factor de crecimiento transformante-beta .....	13
1.7 Efecto de la actividad física sobre la articulación.....	14
2. Justificación.....	16
3. Hipótesis .....	17
4. Objetivo General .....	18
4.1. Objetivos particulares .....	18
5. Metodología.....	19
5.2. Grupos experimentales.....	20
5.3. Lesión a la membrana sinovial .....	20
5.4. Ejercicio de alto impacto.....	20
5.5. Obtención de las muestras de cartílago de rata.....	21
5.6. Cortes en el criostato.....	21

5.8. Inmunofluorescencia indirecta .....	22
5.9. Contra-tinción .....	22
5.10. Controles positivos para la inmunofluorescencia .....	22
5.11. Obtención y cultivo de macrófagos peritoneales.....	23
5.12. Microscopía confocal .....	23
5.13. Análisis estadístico .....	24
6. Resultados .....	25
6.1 Estudio macroscópico e histológico del cartílago articular femoral de la rodilla en ratas normales y con cirugía.....	25
6.2 Detección de las interleucinas 1- $\beta$ , 10 y el factor de crecimiento transformante- $\beta$ en condrocitos de cartílago de rata.....	28
6.2.1 Expresión de IL-1 $\beta$ en cartílago articular de rata .....	28
6.2.2 Expresión de IL-10 en cartílago articular de rata .....	31
6.2.3 Expresión de TGF- $\beta$ en cartílago articular de rata .....	34
7. Discusión.....	38
8. Conclusiones.....	43
9. Perspectivas.....	44
10. Referencias.....	45
11. Anexo.....	50

## ABREVIATURAS

BMP	Proteína morfogénica de hueso
COX-2	Ciclooxigenasa 2
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GAG	Glucosaminoglucanos
ICE	Enzima convertidora de IL-1beta
IL-10	Interleucina 10
IL-1 $\beta$	Interleucina-1beta
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinasa
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras de kappa de las células B activadas
NO	Óxido nítrico
OA	Osteoartritis
PBS	Buffer fosfato salino
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SFB	Suero fetal bovino
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante-beta
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteinasas
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Características patogénicas de la Osteoartritis	3
Figura 2.	Dibujo esquemático de la estructura del cartílago articular y el hueso subcondral	5
Figura 3.	Liberación de citocinas dentro del cartílago articular	11
Figura 4	Esquema general de trabajo para el estudio histopatológico y de inmunofluorescencia en el cartílago articular de rata	19
Figura 5.	Apariencia macroscópica del cóndilo femoral de rata de los diferentes grupos de estudio	26
Figura 6.	Histología del cartílago articular de rata teñidos con safranina-O	27
Figura 7.	Expresión de la IL-1 $\beta$ en macrófagos peritoneales	28
Figura 8.	Expresión de IL-1 $\beta$ en los grupos de ratas normales y con cirugía en los diferentes días de estudio	30
Figura 9.	Análisis estadístico de la molécula IL-1 $\beta$ en el cartílago de rata de los diferentes grupos de estudio	31

Figura 10.	Expresión de la IL-10 en macrófagos peritoneales	32
Figura 11.	Expresión de IL-10 en los grupos de ratas normales y con lesión en la membrana sinovial en los diferentes días de estudio	33
Figura 12.	Análisis estadístico de la expresión de la IL-10 de los diferentes grupos de estudio	34
Figura 13.	Control positivo de TGF- $\beta$ en macrófagos	35
Figura 14.	Expresión de TGF- $\beta$ en cartílago articular de ratas normales y con cirugía en los diferentes días de estudio	36
Figura 15.	Intensidad de pixeles de la molécula TGF- $\beta$ de los diferentes grupos de estudio	37

## 1. Introducción

### 1.1. Generalidades del efecto del ejercicio sobre los tejidos muculoesqueléticos

Recientemente hay un gran interés en la relación que existe entre el ejercicio y la salud. Varios estudios han demostrado que el incremento en la actividad física disminuye el riesgo de enfermedades cardiovasculares, mejora la presión sanguínea, ayuda en la reducción de peso, mejora el estado de ánimo, y aumenta el bienestar emocional (Hunter *et al.*, 2009)

El ejercicio ya es una actividad popular en muchos países, sobre todo en la parte occidental del mundo por lo que ha llegado a ser parte de un estilo de vida moderna. En contraste, un porcentaje menor de la población tiene la percepción de que el ejercicio es potencialmente peligroso para las articulaciones, en particular sobre las extremidades inferiores (Hunter *et al.*, 2009). Millones de personas en varios países regularmente practican actividades físicas recreacionales o competitivas, por tal motivo muchos médicos han postulado que estas actividades podrían tener consecuencias adversas a largo plazo sobre las articulaciones (Gahunia *et al.*, 2012)

Las articulaciones son parte del sistema esquelético y están compuestas de tejido conectivo especializado el cual, actúa de forma sinérgica para tratar con eficacia y eficiencia las cargas mecánicas encontradas a lo largo de toda la vida. Cuando realizamos tareas como ponernos de pie, caminar o correr, la rodilla principalmente soporta fuerzas de magnitudes muy altas (Wu *et al.*, 1996).

Varios estudios han mencionado el efecto del ejercicio sobre los huesos, músculos, tendones, y el cartílago donde se ha demostrado que facilita ciclos catabólicos y anabólicos dentro de estos tejidos, manteniendo así una correcta homeostasis. Sin embargo, un drástico incremento o disminución en la intensidad de las actividades físicas resulta en un desequilibrio homeostático. También, lesiones debidas a ejercicios extremos o inapropiados pueden afectar no solo el hueso, músculos, ligamentos o tendones, sino también al cartílago articular, y todo esto causa inflamación, dolor, y rigidez a la articulación. Todo esto conduce a

padecer osteoartritis (OA), que se caracteriza por excesiva degradación y eventual pérdida del cartílago articular (Gahunia *et al.*, 2012)

## 1.2 ¿Qué es la osteoartritis?

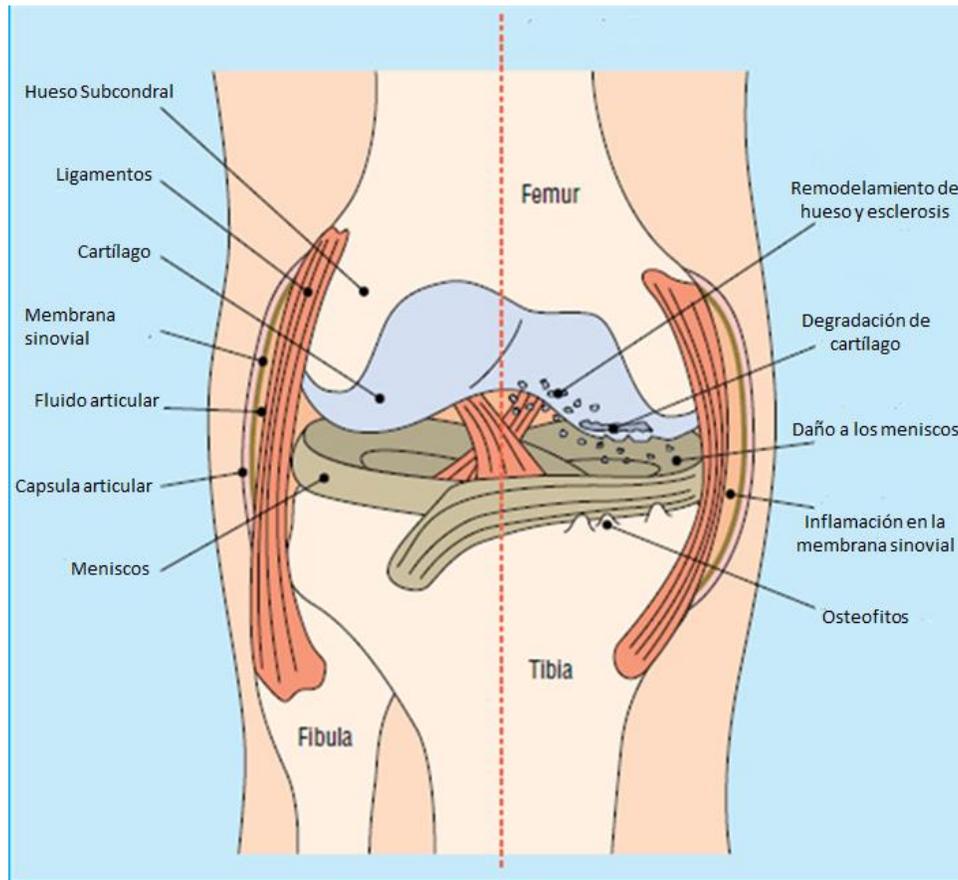
La OA es una enfermedad crónico degenerativa de las articulaciones (Bay-Jensen *et al.*, 2010), que lleva a discapacidad física, perjudicando la calidad de vida de la población adulta, con mayor impacto en países industrializados (Madry *et al.*, 2012) Los sitios frecuentemente afectados son las manos, rodillas, pies, cadera y columna vertebral (Goldring *et al.*, 2007).

La OA se caracteriza principalmente por la degradación y pérdida del cartílago articular, sin embargo, también hay cambios hipertróficos en el hueso con formación de osteofitos, remodelación del hueso subcondral, inflamación de la membrana sinovial e hipertrofia de la cápsula articular (Fig. 1) (Mahajan *et al.*, 2005). Estos cambios son diagnosticados en estados avanzados de la enfermedad. El principal problema en la OA es que la enfermedad en la mayoría de los casos es detectada hasta que las alteraciones en la articulación son demasiado pronunciadas, con dolor y cambios radiográficamente detectables. Las muestras de cartílago articular son difíciles de obtener debido a que usualmente en la enfermedad en etapas tempranas todavía no hay síntomas clínicos. Por esta razón existe un gran número de modelos animales para estudiar estados tempranos de la degradación de cartílago articular en la OA (Lorenz *et al.*, 2006).

Todavía no se conoce completamente la etiología de esta enfermedad pero parece ser el resultado de un complejo sistema de interacciones mecánicas, biológicas, bioquímicas, moleculares y enzimáticas que llevan a la destrucción del cartílago articular. (Martel-Pelletier *et al.*, 2008). Desafortunadamente, el cartílago articular tiene una capacidad limitada de regeneración, esta regeneración se establece como una reacción a la pérdida de las fibras de colágeno así como otros componentes de la matriz extracelular. La capacidad mecánica se reduce considerablemente en comparación a una articulación normal (Lorenz *et al.*, 2006)

### 1.3 Biología, estructura y organización del cartílago articular

El cartílago articular es un tejido conectivo altamente especializado, avascular, aneural y alinfático (Heijink *et al.*, 2012), que proporciona una superficie de apoyo para evitar o tener poca fricción, mientras que también absorbe y transmite la compresión, tensión y fuerza de impacto a través de la articulación diartrodial. Las propiedades biomecánicas del cartílago articular están garantizadas por la particular organización de la matriz extracelular (MEC), encargada de dar resistencia a la tracción y tensión. Estas cargas mecánicas son distribuidas a través de la MEC, donde son disipadas y transmitidas posteriormente a los condrocitos (Madry *et al.*, 2012).



**Fig. 1 Características patogénicas de la osteoartritis.** Esquema de la articulación de la rodilla saludable (lado izquierdo) y cambios producidos por la osteoartritis (lado derecho) (Hunter *et al.*, 2006).

Los principales constituyentes de la MEC del cartílago son el colágeno y proteoglicanos. El colágeno tipo II es el principal componente molecular en el cartílago articular normal pero colágenos III, VI, IX, X, XI, XII, y XIV contribuyen en pequeñas cantidades a mantener la matriz extracelular (Umlauf *et al.*, 2010). Los proteoglicanos están presentes en mayor cantidad y forman complejos macromoleculares con el ácido hialurónico llamado agregano. La “unidad de agregano” comprende una proteína núcleo la cual establece varias interacciones con cadenas laterales de diferentes glucosaminoglucanos (GAG). Varias unidades de agreganos son después ensambladas en forma radial y conectadas a moléculas de ácido hialurónico a través de la unión con proteínas. Se establece que el ácido hialurónico tiene una conexión funcional con el condrocito vía el receptor CD44 (Madry *et al.*, 2012). Otros proteoglicanos presentes en el cartílago incluyen a los sindecanos y glicanos, la decorina, biglicano, fibromodulina, lumicano, epificano, y perlecano (Umlauf *et al.*, 2010). El cartílago está dividido en cuatro zonas con diferentes funciones: la superficial, la media o transicional, la profunda o radial, y las zonas del cartílago calcificadas (Fig. 2). No hay un límite bien definido entre las tres primeras zonas (Martel-Pelletier *et al.*, 2008; Umlauf *et al.*, 2010).

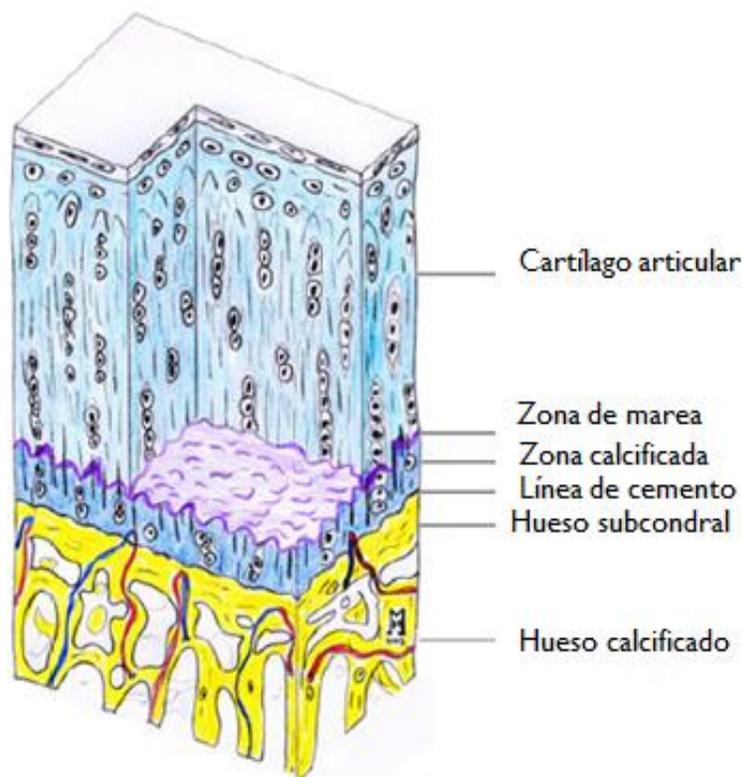
La zona superficial, la más delgada de las cuatro, consiste de finas fibras colágenas con orientación tangencial, bajo contenido de proteoglicanos, y los condrocitos están alargados y alineados paralelamente a la superficie. Esta zona está en contacto con el fluido sinovial, y es responsable de la mayoría de las propiedades de tensión que permiten al cartílago resistir la fuerza de compresión y tensión impuesta por el movimiento de la articulación.

La zona media representa el 40-60% del total del cartílago. Está formado por proteoglicanos y fibras colágenas gruesas organizadas en haces radiales o capas. Los condrocitos en esta zona son de baja densidad y tienen una forma redonda.

En la zona profunda, los condrocitos tienen la misma forma que en la zona media y están alineados perpendicularmente a la superficie articular, pero en baja

densidad. Esta zona contiene fibras colágenas largas en una disposición radial, también contiene una gran cantidad de agreganos.

El cartílago calcificado está dividido en otras zonas por la zona de marea, y se separa física y mecánicamente del cartílago hialino y hueso subcondral. Su principal función parece ser el anclar el cartílago al hueso por medio de las fibras de colágeno de la zona radial que penetran dentro del cartílago calcificado. En esta zona la población celular es muy escasa y los condrocitos son hipertróficos (Martel-Pelletier *et al.*, 2008; Goldring *et al.*, 2009).



**Fig. 2 Esquema de la estructura del cartílago articular normal y el hueso subcondral.** La figura muestra una visión de la estructura interna del cartílago articular y las zonas que sirven de anclaje al hueso subcondral (Madry *et al.*, 2012).

El condrocito es el único tipo celular presente en el cartílago articular, representa menos del 5% del volumen del tejido (Madry *et al.*, 2012), tiene baja actividad metabólica, sobrevive bajo condiciones relativas de hipoxia y en ausencia de suministros vasculares. Esta célula, es responsable de remodelar y mantener la

estructura y función de la matriz del cartílago; y posee poca capacidad regenerativa (Goldring *et al.*, 2007). Los condrocitos reaccionan a cambios estructurales del ambiente de la MEC produciendo citocinas catabólicas y factores anabólicos, que actúan sobre los condrocitos y células de tejidos adyacentes. Los condrocitos tienen receptores para componentes de la MEC, muchos de los cuales responden a estimulación mecánica. Entre estos receptores se incluyen varias integrinas, que sirven como receptores para fibronectina y fragmentos de colágena tipo II. La activación de estos receptores puede estimular la producción de enzimas degradadoras de la MEC, citocinas inflamatorias y quimiocinas, sin embargo, no se ha establecido si estos eventos inician o retroalimentan la degradación de la matriz (Goldring *et al.*, 2011).

#### 1.4 Epidemiología

La OA está reconocida como la enfermedad articular y el segundo problema reumatológico más común en todo el mundo (Mody *et al.*, 2012). La OA se espera que sea la cuarta causa de discapacidad mundial para el año 2020 (Woolf *et al.*, 2003).

Un estudio en el 2005 en Estados Unidos estimó que la OA es una de las cinco causas principales de discapacidad en adultos. En el 2006 se contabilizó que alrededor de 40 millones de europeos sufren de OA y aproximadamente el 25% son adultos con discapacidad. Con estos datos la proyección es que para el año 2030, 20% de las personas adultas desarrollarán OA en el oeste de Europa y norte de América (Mobasher, 2011).

Varios estudios han demostrado que en la población entre 60 a 64 años la OA se desarrolla en un 23% en la rodilla derecha de hombres contra 16.3% en la izquierda, mientras que su distribución parece ser equilibrada en mujeres donde el 24.2% ocurre en la rodilla derecha; y 24.2% en la rodilla izquierda (Michael *et al.*, 2010).

Por otro lado la prevalencia de OA de rodilla se ha estimado en 18 a 25% en varones de Europa del este, en 24 a 40% en mujeres en edades de 60 a 79 años

en Países Bajos y en 28 a 34% en adultos de España. En México, en una encuesta nacional de salud hecha en el 2005, se estimó que el 26% de la población presenta algún síntoma de afección reumática; en general, la rodilla es la articulación inferior más afectada (16%) y su prevalencia aumenta hasta 35% en la octava década de vida (Morales *et al.*, 2007).

### 1.5 Patogénesis de la OA

La OA es resultado de una falla para mantener la homeostasis entre la síntesis y la degradación de los componentes de la MEC (Heijink *et al.*, 2012), la cual puede tener diferentes etiologías, pero con cambios biológicos, morfológicos y características clínicas similares (Madry *et al.*, 2012). Los cambios patológicos vistos en articulaciones con OA incluyen la degradación del cartílago articular, remodelación del hueso subcondral, formación de osteofitos, grados variables de inflamación de la membrana sinovial, degeneración de los ligamentos e hipertrofia en la cápsula articular (Loeser *et al.*, 2012).

El proceso patofisiológico de la OA puede ser dividido en tres estados: Al principio, la MEC se degrada a nivel molecular. El líquido tisular aumenta y la cantidad de moléculas de matriz, particularmente el agregado disminuyen. La estructura de la red de colágeno se daña, esto lleva a reducir la dureza del cartílago. En el segundo estado, los condrocitos intentan compensar el daño con un aumento en la actividad metabólica. Se forman agregados celulares rodeados de moléculas de matriz recién sintetizadas. Esta condición puede permanecer por varios años. En el tercer estado, los condrocitos no son capaces de mantener (Umlauf *et al.*, 2010) la actividad de reparación y como consecuencia hay una pérdida completa de cartílago. El hueso subcondral reacciona con desprendimiento de fibras y formación de quistes. Una característica consistente de la OA es la formación de osteofitos y nódulos osteocondrales con lo que la OA se distingue de otras artritis. La función exacta de los osteofitos es desconocida, pero puede contribuir a la estabilización de las articulaciones afectadas por la OA (Lorenz *et al.*, 2006).

Se demostró que durante la patogénesis de la OA los condrocitos responden a estímulos adversos promoviendo la degradación de la matriz y regulando negativamente los procesos de reparación. Como consecuencia los condrocitos sufren cambios fenotípicos dramáticos, a los que se les ha denominado “transdiferenciación” (Kouri *et al.*, 2006). Este fenómeno está relacionado con los cambios celulares como la ruptura del citoesqueleto, el incremento del retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi, así como el aumento de actividades bioquímicas y moleculares de los condrocitos (Kouri *et al.*, 2002)

El fallo en el mantenimiento de la homeostasis entre la síntesis y degradación de los condrocitos provoca la pérdida de fibras de colágeno y proteoglicanos de la MEC (Lorenz *et al.*, 2006). Como primer mecanismo compensatorio, en la articulación aumenta la síntesis de moléculas de matriz y la proliferan los condrocitos en las capas más profundas del cartílago, este mecanismo es capaz de mantener la integridad del cartílago articular por varios años, ya que los condrocitos de la zona superficial son incapaces de compensar la pérdida de moléculas de MEC. Sin embargo, si continúa el daño mecánico repetido en la articulación se induce la degradación del tejido articular, debido al aumento en la expresión y activación de enzimas degradativas y esta situación termina por superar la reparación (Umlauf *et al.*, 2010; Heijink *et al.*, 2012).

Aunque persiste el debate acerca de si el proceso de la enfermedad se origina en el cartílago articular, la membrana sinovial o el hueso subcondral, muchos investigadores coinciden en que el desarrollo de la OA ocurre en los condrocitos en la mayoría de los pacientes diagnosticados. Debido a que los condrocitos son blancos de mecanismos inflamatorios promovidos por la inflamación de la membrana sinovial, los condrocitos osteoarthriticos presentan un aumento en la expresión de citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  y quimiocinas), que activan varias vías de señalización inflamatorias, así como la activación de genes blanco que promueven el catabolismo (Madry *et al.*, 2012)

## 1.6 El papel de las citocinas en la OA

Muchas citocinas anti-inflamatorias como por ejemplo la IL-4, IL-10 e IL-13 y factores de crecimiento como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento transformante-beta (TGF- $\beta$ ) producidos por los condrocitos, están involucrados en la homeostasis del cartílago articular. Estas moléculas promueven cambios en el metabolismo y fenotipo de los condrocitos, llevando a alteraciones de la estructura de la matriz del cartílago (Umlauf *et al.*, 2010).

En la actualidad se sabe que la inflamación participa en la progresión de la OA aun en estados tempranos de la enfermedad. La liberación de factores inflamatorios como citocinas proinflamatorias están involucradas en el desequilibrio metabólico, aumentando el catabolismo de la articulación en la OA. La interleucina-1beta (IL-1 $\beta$ ), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF $\alpha$ ) e IL-6 parecen ser las principales citocinas que participan en la patofisiología de la OA, aunque también hay otras citocinas que participan en el proceso degenerativo del cartílago (IL-8, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, factor inhibidor de leucemia (LIF) y quimiocinas) (Kapoor *et al.*, 2011).

Las citocinas IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  son importantes en la progresión de la OA, por ser mediadores predominantes de la inflamación. Sin embargo, la IL-1 $\beta$  parece estar asociada con la destrucción del cartílago ya que por sí sola puede inducir metaloproteinasas (MMP's), agregasas, óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), ciclooxigenasa 2 (COX-2), y reduce la síntesis del inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP) (Umlauf *et al.*, 2010; Kapoor *et al.*, 2011). Aunque IL-1 $\beta$  es aceptada como una citocina proinflamatoria, la delección del gen *Il1b* acelera el desarrollo de la OA en el modelo de ratón, sugiriendo una compleja función de esta citocina en mantener la homeostasis del cartílago articular (Kapoor *et al.*, 2011).

Las citocinas IL-4, IL-10 e IL-13 son de interés en la OA por su potente actividad anti-inflamatoria, además por el hecho de que estas citocinas están presentes en altos niveles en el fluido sinovial de pacientes con OA (Malemud, 2004).

Principalmente la IL-10 ha demostrado tener un efecto inhibitor sobre la IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en estudios *in vitro* e *in vivo*, protegiendo a los condrocitos. También inhibe algunos procesos catabólicos e inflamatorios en pacientes con OA (John *et al.*, 2007; Helmark *et al.*, 2010; Lems *et al.*, 2010).

Además de esas citocinas, los factores de crecimiento tienen un papel importante en la regulación de la homeostasis. Se ha demostrado que factores anabólicos aumentan su expresión en la OA incluyendo el TGF- $\beta$ , el FGF, y la proteína morfogénica de hueso (BMP) que inducen la producción de moléculas de matriz, y también tienen impacto sobre las funciones biológicas de las citocinas y otras moléculas presentes en el tejido articular (Malemud, 2004; Martel-Pelletier *et al.*, 2008; Umlauf *et al.*, 2010). Sin embargo TGF- $\beta$  ha mostrado ser un factor de crecimiento multifuncional que puede regular la proliferación celular, promover la síntesis de moléculas de la MEC principalmente proteoglicanos e inhibir la diferenciación hipertrófica de los condrocitos; también TGF- $\beta$  puede contrarrestar los efectos de la IL-1 $\beta$  y algunas enzimas proteolíticas (Fig. 3) (Martel-Pelletier *et al.*, 2008; van der Kraan *et al.*, 2009).

#### 1.6.1. Interleucina-1beta

La interleucina-1beta (IL-1 $\beta$ ) es producida como un precursor inactivo de 31 kDa (pro-IL-1 $\beta$ ) el cual es activado por un corte proteolítico para generar su forma activa de 17 kDa; la enzima responsable de este proceso es la caspasa-1, también llamada enzima convertidora de IL-1 $\beta$  (ICE) (Malemud, 2004; Daheshia *et al.*, 2008).

La IL-1 $\beta$  activa a las células a través de su receptor específico en la superficie celular conocido como receptor de IL-1 tipo 1 (IL-1RI). La expresión de este receptor incrementa en condrocitos humanos durante la OA. En la membrana superficial de los condrocitos está presente otro receptor llamado receptor de IL-1 tipo 2 (IL-1RII), este receptor es un receptor señuelo debido a su incapacidad para transmitir señales (Daheshia *et al.*, 2008; Kapoor *et al.*, 2011).

En la patología de la OA, la IL-1 $\beta$  estimula la sobreexpresión de genes que codifican para enzimas proteolíticas, y estimula la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), principalmente óxido nítrico (NO) y anión superóxido que genera peróxido de hidrogeno, peroxinitrito y radicales hidroxilos, que contribuyen a la destrucción del cartílago. Además la IL-1 $\beta$  inhibe la expresión de enzimas antioxidantes, incluyendo a la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa.

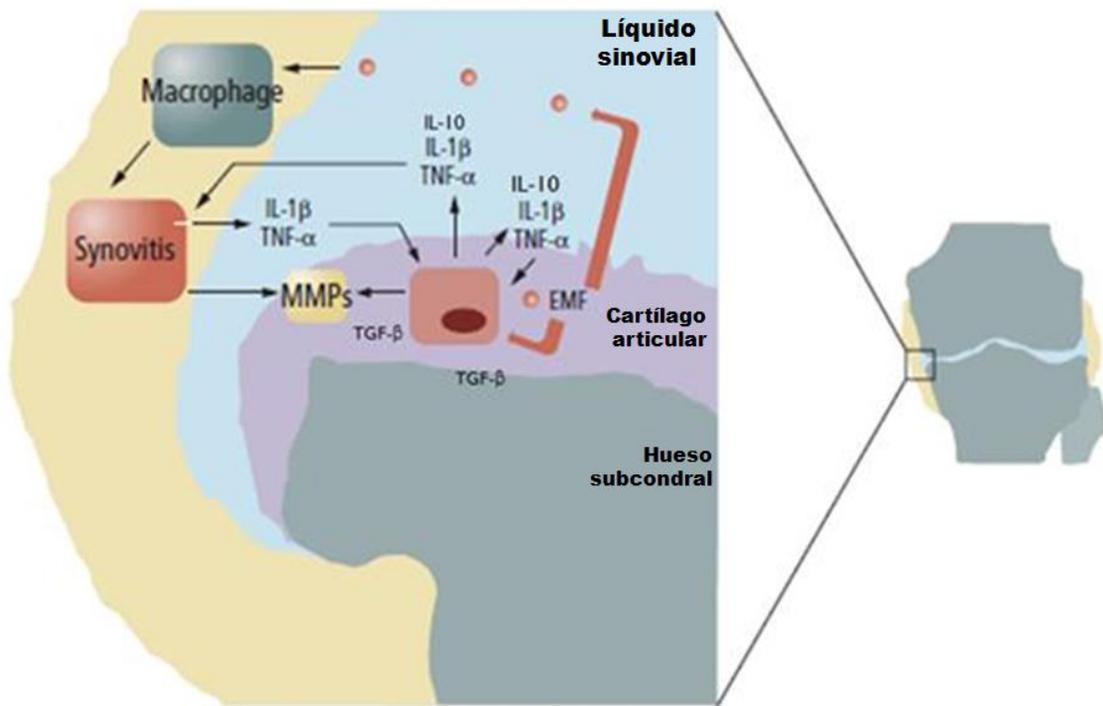


Figura 3 Liberación de citocinas del cartílago articular hacia el fluido sinovial por un estímulo mecánico. La IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  son liberadas por los condrocitos, provocando la síntesis de metaloproteinasas (MMPs). Simultáneamente, son liberados IL-10 y TGF- $\beta$  para poder contrarrestar el daño al cartílago (Souich, 2007).

Los efectos catabólicos y proinflamatorios de IL-1 $\beta$  son a través de la activación de varias vías de señalización incluyendo las de la cinasa N-terminal c-Jun y la proteína cinasa activada por mitógenos p38 y más importante, el factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B). El factor nuclear NF $\kappa$ B media la expresión de varios genes inflamatorios como los que codifican para iNOS, COX-2 y quimiocinas, y también contribuye a la inducción de MMP-1, MMP-9, MMP-13 y ADAMTS-4 (Kapoor *et al.*, 2011).

Concentraciones mínimas de IL-1 $\beta$ , en su forma activa, se han encontrado en el líquido sinovial. La IL-1 $\beta$  no se ha detectado en plasma de pacientes con OA aun con niveles altos de IL-1 $\beta$  en líquido sinovial (Lotz, 2010), sugiriendo que IL-1 $\beta$  probablemente actúa localmente y altera el metabolismo de los condrocitos en la OA (Malemud, 2004).

#### 1.6.2 Interleucina 10

La IL-10 es una citocina anti-inflamatoria con propiedades inmunoregulatoras y liberada principalmente por las células del sistema inmune. Algunas células del tejido conectivo producen la IL-10 incluyendo a los condrocitos (Schulze-Tanzil *et al.*, 2009). Varios estudios revelan un efecto inhibitorio de IL-10 sobre la síntesis de diversas citocinas proinflamatorias en articulaciones inflamadas. Los condrocitos producen IL-10 constitutivamente y también producen el receptor para IL-10 (IL-10R) (Muller *et al.*, 2008), el cual es un tetrámero hecho de dos cadenas de IL-10R1 y dos de IL-10R2 (Iannone *et al.*, 2001).

Al comparar la expresión de IL-10 y el receptor de IL-10 en condrocitos normales, OA y fetales, observando que la expresión del mRNA de IL-10 la más alta fue en condrocitos OA (Muller *et al.*, 2008).

La IL-10 tiene una amplia gama de actividades condroprotectoras. Estimula la síntesis de colágeno tipo II y la expresión de proteoglicanos, inhibe la actividad de MMPs, citocinas proinflamatorias y la producción de óxido nítrico además protege a los condrocitos de la muerte vía apoptosis (Lotz, 2010).

El mecanismo por el cual la IL-10 inhibe la síntesis de citocinas aún no se han definido. Algunos estudios sugieren que IL-10 inhibe la síntesis a través del bloqueo de NF- $\kappa$ B para la transcripción de genes. Otros reportes sugieren que el efecto de IL-10 es principalmente post-transcripcional. Todas estas observaciones pueden ser correctas, ya que los efectos inhibitorios de IL-10 son a múltiples niveles (Brennan, 1999).

### 1.6.3 Factor de crecimiento transformante-beta

El factor de crecimiento transformante-beta (TGF- $\beta$ ) es un factor de crecimiento involucrado en numerosos procesos biológicos como proliferación, diferenciación, desarrollo embrionario, carcinogénesis e inflamación (van der Kraan *et al.*, 2009).

En células animales, hay tres isotipos de TGF- $\beta$ , llamados  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\beta$ 3. Todas las isoformas muestran una homología de 84-92% (Blaney Davidson *et al.*, 2007). El cartílago articular normalmente contiene TGF- $\beta$  almacenado en una forma latente y posee muy poco en su forma activa. En cartílago OA los niveles de TGF- $\beta$  están incrementados comparados con un control normal (Roman-Blas *et al.*, 2007). Para activar a los condrocitos TGF- $\beta$  señala a través de dos receptores, TGF- $\beta$ -RI (ALK5) y TGF- $\beta$ -RII. El TGF- $\beta$  se une al receptor tipo II, recluta y fosforila al tipo I y subsecuentemente activa a Smad2 o Smad3 por fosforilación (Blaney Davidson *et al.*, 2005; Roman-Blas *et al.*, 2007). El TGF- $\beta$  regula la expresión de proteínas de la MEC, incluyendo fibras de colágena y fibronectina. El TGF- $\beta$  reprime la degradación de la MEC, por inhibición de la expresión de MMP's y serina proteasas, así como también por aumento en la expresión de inhibidores de proteasas como el inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMPs) y el inhibidor del activador del plasminógeno (PAIs) (Javelaud *et al.*, 2004). El TGF- $\beta$  es capaz también de contrarresta los efectos de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  y otros genes inhibiendo la expresión de receptores de citocinas y enzimas proteolíticas. (Blaney Davidson *et al.*, 2007; Martel-Pelletier *et al.*, 2008).

Sin embargo, el efecto protector de TGF- $\beta$  sobre el tejido articular parece ser dependiente de la edad (Martel-Pelletier *et al.*, 2008).

## 1.7 Efecto de la actividad física sobre la articulación.

El ejercicio articular no solo incrementa el flujo sanguíneo para varios tejidos conectivos de la articulación, sino que también mantiene las articulaciones lubricadas. Actividades diarias de baja a moderada intensidad facilitan los ciclos de catabolismo y anabolismo dentro de estos tejidos, manteniendo la degradación y reparación en balance (Gahunia *et al.*, 2012)

El ejercicio de alto impacto, como entrenamientos de resistencia y correr largas distancias, puede causar estrés a los huesos de las extremidades. En respuesta a este estrés, los osteoblastos construyen nuevo hueso, específicamente en los sitios de estímulo, resultando en una mayor densidad ósea que es capaz de resistir el impacto repetitivo.

De los tejidos esqueléticos, el músculo responde con mayor rapidez al ejercicio. Los músculos usados en un ejercicio en particular son reconstruidos sintetizando más proteínas de músculo e incrementando su tamaño. El ejercicio constante de los músculos es necesario para mantener el incremento de tamaño. Sin la adecuada estimulación, los músculos experimentarán una acelerada actividad catabólica resultando en una atrofia muscular.

La integridad de los tendones y los ligamentos es crítico para la función del sistema esquelético, porque éstos unen a los músculos con el hueso y a los huesos entre sí, facilitando el movimiento coordinado y transmitiendo la fuerza a través de las articulaciones. Cuando se exponen a ejercicio regular, los ligamentos se hacen fuertes y son más resistentes a las lesiones.

El cartílago articular es un tejido conectivo especializado altamente hidratado con la capacidad de soportar las fuerzas de impacto. El ejercicio regular facilita la difusión de nutrientes a través del cartílago, y el ejercicio moderado probablemente mejore la composición molecular del cartílago. En contraste, poco ejercicio o la inmovilización eventualmente comprometerá la lubricación del cartílago, aunque esto puede ser revertido con actividad física (Gahunia *et al.*, 2012).

Varios estudios han mostrado el efecto del ejercicio sobre los huesos, músculos, tendones, ligamentos, membrana sinovial, y cartílago articular como método terapéutico en pacientes con OA (Hunter *et al.*, 2009), modulando principalmente el evento inflamatorio, disminuyendo síntomas como dolor, hinchazón y rigidez articular (Bosomworth, 2009; Goldring *et al.*, 2011)

Todos los factores relacionados a los beneficios y riesgos del ejercicio deben de ser considerados. La primera consideración con respecto al ejercicio es saber si el uso repetitivo del cartílago articular como evento primario promueve un cambio degenerativo. Si ese fuera el caso, el ejercicio llevaría a la progresión de la OA.

Hablando particularmente de una rodilla normal, el músculo absorbe la mayoría de la fuerza ejercida sobre la articulación, el resto de la fuerza se redistribuye hacia el hueso, en tanto que el cartílago articular no participa. Una mala distribución de fuerza sobre el cartílago puede ser causada por eventos que modifiquen la mecánica de la articulación como en una lesión, un mal alineamiento de los huesos, meniscectomía o debilidad muscular, y cualquiera de ellos eventualmente conduce a daño al cartílago y al proceso que conduce a la OA (Bosomworth, 2009).

## **2. Justificación**

Hay muchos factores que todavía se desconocen en torno al ejercicio en la aparición de lesiones, debido a la dificultad para obtener muestras de cartílago en personas que practican continuamente actividades físicas. Es necesario evaluar el efecto del ejercicio de alto impacto en un modelo experimental, para relacionar los beneficios y riesgos que puede tener sobre el cartílago articular, así como también estudiar el comportamiento de citocinas como la IL-1 $\beta$ , IL-10 y el factor de crecimiento TGF- $\beta$  implicados en procesos de síntesis y degradación de componentes de matriz extracelular, bajo este estímulo.

### **3. Hipótesis**

La IL-1 $\beta$ , IL-10 y TGF- $\beta$  son mediadores importantes en el proceso de homeostasis del cartílago articular, pero el ejercicio de alto impacto cambiará el nivel de expresión de estas citocinas en este tejido.

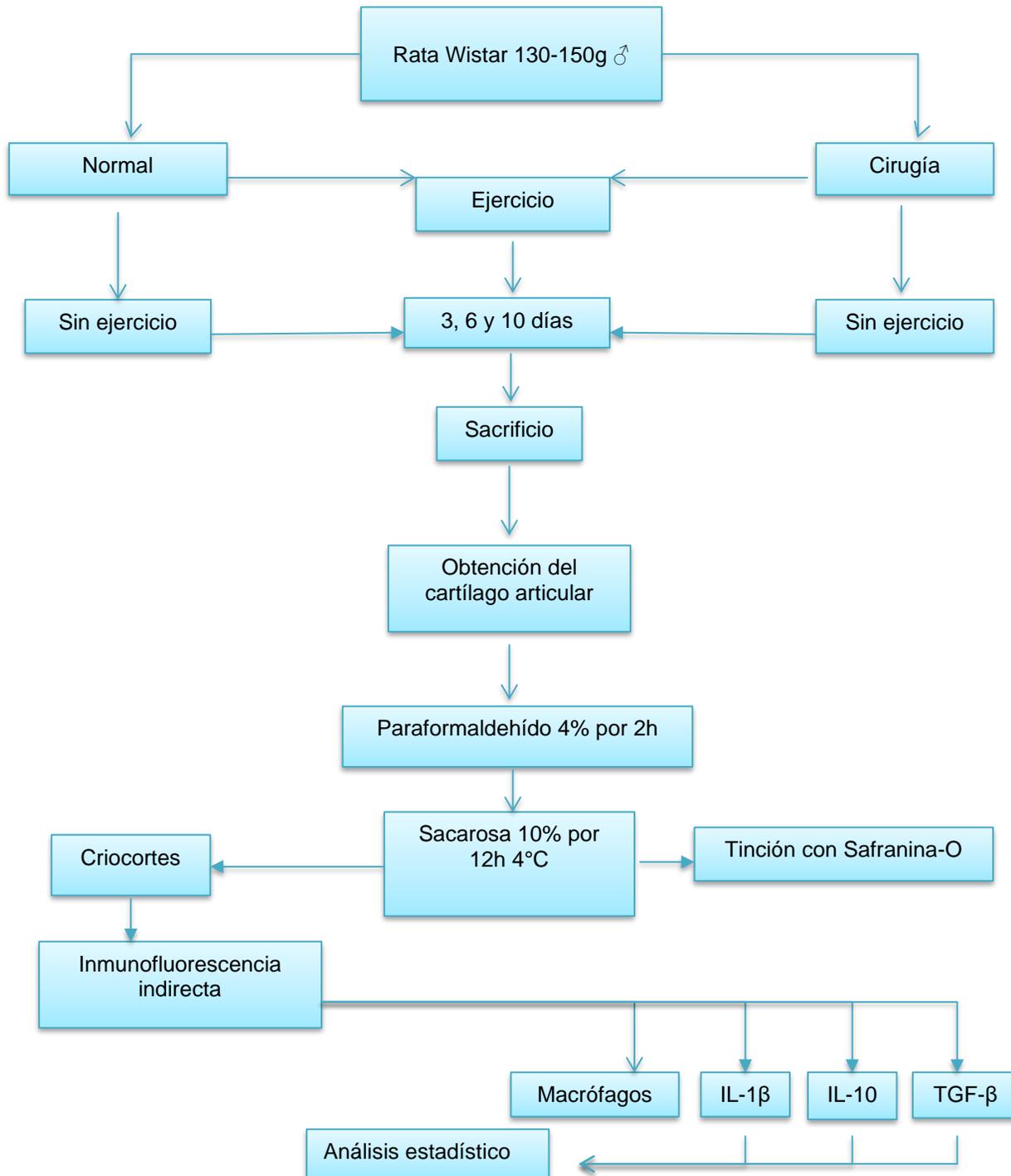
#### **4. Objetivo General**

Analizar si el ejercicio de alto impacto afecta la expresión de citocinas pro- y anti-inflamatorias en cartílago articular de rata normal y/o con lesión en la membrana sinovial.

##### 4.1. Objetivos particulares

- Determinar la integridad del cartílago articular de rata bajo el efecto del ejercicio de alto impacto y en la lesión a la membrana sinovial
- Evaluar los cambios en la expresión de IL-1  $\beta$ , IL-10 y TGF- $\beta$  en cartílago articular normal de rata con y sin ejercicio.
- Evaluar cambios en la expresión de IL-1  $\beta$ , IL-10 y TGF- $\beta$  en cartílago articular de rata con lesión a la membrana sinovial con y sin ejercicio.

## 5. Metodología



**Figura 4** Esquema general de trabajo para el estudio histopatológico y de inmunofluorescencia en el cartílago articular de rata. Los procedimientos particulares se describen a continuación.

### 5.1. Animales

Se utilizaron machos de la especie *Rattus norvegicus* de la cepa Wistar, de 130-150g obtenidos de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV. Los animales fueron albergados en jaulas con libre acceso a comida y agua, se mantuvieron en ciclos de 12h de luz y 12h de oscuridad. Todos los procedimientos de cuidado y uso de los animales siguieron la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 y fueron aprobados por parte del comité institucional CICUAL.

### 5.2. Grupos experimentales

Las ratas fueron distribuidas en 4 grupos experimentales (n=3), para cada día (3, 6 y 10), los cuales se formaron de la siguiente manera: grupo 1: ratas normales sin procedimiento quirúrgico, grupo 2: ratas con cirugía, los grupos 1 y 2 no hicieron ejercicio; grupo 3: ratas con cirugía, grupo 4: ratas normales sin procedimiento quirúrgico, estuvieron sujetos al protocolo de ejercicio de alto impacto durante 3, 6 y 10 días (Lozoya *et al.*, 2000).

### 5.3. Lesión a la membrana sinovial

La técnica consistió en introducirse a la articulación de la rodilla por la parte interna de la pata derecha, realizando un pequeño corte de 2-3 cm. de la piel. Para ello fue indispensable anestésiar a los animales con una combinación de Xilazina 0.02 mL (Anesket® Vet) y Ketamina 0.09 mL (Procin®) por cada 140 g de peso, y se administró por vía intraperitoneal. Después se esterilizó la zona y se cerró con 2 o 3 puntos de sutura. A las ratas que se les practicó este procedimiento se les consideró lesionadas.

### 5.4. Ejercicio de alto impacto

Posterior a la cirugía, a las ratas se les dieron dos días de reposo y a partir del tercer día tanto los animales sometidos a la lesión como las ratas sin cirugía se sometieron a ejercicio de alto impacto. El ejercicio consistió; en desplazamientos de forma lateral con un ángulo de 45° durante 2 min dentro de una caja de cartón

de 60x34x32 cm, hacer saltar a las ratas durante 2 min tomando a las ratas y dejándolas caer a una altura de 30 cm, generar pequeños saltos de las ratas al colocarlas dentro de la caja, bajar y subir la caja de manera continua durante 1 min, el proceso se repite durante 15 min, durante los días de inducción (3, 6 y 10) (Lozoya *et al.*, 2000)

#### 5.5. Obtención de las muestras de cartílago de rata

Transcurrido el tiempo de inducción, las ratas fueron eutanizadas en los días 3, 6 y 10 días en una cámara de CO<sub>2</sub>, posteriormente a los animales se lavaron de la zona pélvica a las patas trasera con cloro al 10% y se desinfectaron con benzal y se extrajo el cóndilo femoral derecho para ser fijado por 2 horas a temperatura ambiente en paraformaldehído al 4% en PBS, pH 7.2. Después la muestra fue lavada con PBS pH 7.2 y se incubó en sacarosa al 10% en PBS pH 7.2 por 12 horas a 4°C. Posteriormente, las muestras fueron colocadas en gel (*tissue freezing medium*-Leica Microsystems) e inmediatamente congeladas a -20°C, hasta el momento de ser cortadas

#### 5.6. Cortes en el criostato

A los cóndilos congelados se les realizaron criocortes (Criostato Leica CM1100, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) de 4 a 6µm, los cuales se montaron en portaobjetos gelatinizados al 0.5% con sulfato de potasio crómico al 0.05%, los cortes se mantuvieron a -20°C hasta antes de realizarse la tinción con safranina-O o la inmunofluorescencia.

#### 5.7. Tinción con Safranina-O

Para la tinción con safranina O, los cortes fueron hidratados por 5 minutos en PBS pH 7.2 y lavados en agua corriente por 2 minutos, en un vaso Coplin. Una vez completada la hidratación, se procedió a teñir con verde rápido (*fast green*) al 0.01% por 10 minutos, se lavó con ácido acético de 10 a 15 segundos y posteriormente se incubó el tejido en el colorante safranina O al 0.1% por 40 minutos. El tejido se deshidrató con alcoholes (50, 70 95 y 100%) por 30 segundos

y por último se aclaró con xileno por 1 minuto. Las muestras se montaron con resina para su observación al microscopio de campo claro.

#### 5.8. Inmunofluorescencia indirecta

Los cortes fueron hidratados durante 10 minutos en PBS pH 7.2, y se permeabilizaron con Tween 20 al 0.2% en PBS (PBS-T) por 10 minutos a temperatura ambiente. Después fueron preincubados con 0.2% de albúmina sérica bovina (BSA) por 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron 2 veces con PBS-T durante 10 minutos. Para detectar las proteínas, las muestras se incubaron toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios: anti-IL-1 $\beta$  policlonal de ratón anti-rata; anti-TGF- $\beta$ 1 policlonal de conejo anti-rata; anti-IL-10 policlonal de cabra anti-rata (Santa Cruz Biotechnology Inc.), en una dilución 1:200; los anticuerpos fueron detectados con un anti-IgG de conejo o con un anticuerpo anti-IgG de cabra o ratón acoplado a FITC (1:750, Jackson Immunoresearch, Inc.) durante 1 hora a temperatura ambiente. Macrófagos activados con LPS se utilizaron como control positivo.

#### 5.9. Contra-tinción

Posterior a la incubación con los anticuerpos se agregó 50  $\mu$ L de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich) a una dilución 1:3000 en PBS-T durante 1min en las muestras. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS durante 5 min cada vez, se retiró el exceso de PBS y los cortes se montaron con un medio de montaje específico para fluorescencia (VectaShield®, Vector Laboratories), se colocaron cubreobjetos (24 X 50 mm) (Corning®, Corning Incorporated) posteriormente se realizó el sellado del cubreobjetos con barniz transparente sobre los bordes del cubreobjetos. Las preparaciones se guardaron a 4 °C protegidas de la luz.

#### 5.10. Controles positivos para la inmunofluorescencia

Macrófagos peritoneales de rata se utilizaron como control positivo para IL-1 $\beta$  e IL-10 y TGF- $\beta$ .

### 5.11. Obtención y cultivo de macrófagos peritoneales

En condiciones de esterilidad se sacrificó una rata por dislocación cervical y rápidamente se colocó el animal en una tabla de disección donde se sujetó, la zona abdominal se enjuagó con alcohol, y la piel se cortó desde la parte baja abdominal hasta la altura del corazón para descubrir el peritoneo. Con una jeringa de 10 ml se inyectó PBS 1X pH 7.2 estéril a 37°C en la cavidad peritoneal, se le dio unos ligeros golpes para facilitar la obtención de las células con la solución, se introdujo la jeringa con el bisel hacía abajo para recuperar la mayor cantidad de solución inyectada, teniendo cuidado de no perforar ningún órgano por lo que con la aguja se debe estirar la piel del peritoneo hacia arriba. A continuación se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min, y las células se resuspendieron en medio de cultivo DMEM pH 7.2, suplementado con SFB al 10%, L-glutamina al 1% y antibiótico/antimicótico al 1%, después se colocaron sobre cubreobjetos estériles (Corning®, Corning Incorporated de 22 X 22 mm), se incubaron a 37°C a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, aproximadamente 4 h para permitir que los macrófagos se adhirieran a la superficie. Después se quitó el medio de cultivo lavando dos veces con PBS estéril se procedió a incubar con el lipopolisacárido (LPS) durante 1 h, se volvió a lavar dos veces con PBS estéril, se eliminó el exceso, las células se fijaron con paraformaldehído 4% pH 7.2 durante 20 min, se eliminó el fijador lavando con PBS estéril, se decantó el exceso de PBS y los cubreobjetos con macrófagos se guardaron a -20 °C hasta su utilización.

Los cubreobjetos con macrófagos se utilizaron como controles positivos para IL-1 $\beta$ , IL-10 y TGF- $\beta$ .

### 5.12. Microscopía confocal

El análisis de las laminillas se realizó con un microscopio láser confocal Carl-Zeiss LMS 700 con el programa ZEN 2011 para PC, utilizando el objetivo Plan NueFLuar 43X de inmersión. Los filtros de excitación utilizados, fueron FITC 490 nm y para ioduro de propidio 493 nm.

### 5.13. Análisis estadístico

El análisis estadístico para la IL-1 $\beta$ , IL-10 y TGF- $\beta$  se tomó como resultado la intensidad de píxeles sobre la imagen grabada obtenidos de los cortes de cartílago para cada proteína, cada experimento se realizó por triplicado para cada grupo de ratas normales y con lesión a la membrana sinovial con y sin ejercicio de 3, 6 y 10 días. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 5.0. Los datos muestran la media  $\pm$  desviación estándar  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) y  $p < 0.001$  (\*\*\*). Para comparar la media entre los grupos experimentales se utilizó la prueba ANOVA dos vías, modificaciones de Bonferroni.

## 6. Resultados

### 6.1 Estudio macroscópico e histológico del cartílago articular femoral de la rodilla en ratas normales y con cirugía

Para observar si el ejercicio tenía algún efecto sobre el cartílago articular de las ratas, se realizó primero un análisis macroscópico en los diferentes grupos de estudio: grupo normal (NS) (como control del ejercicio y la cirugía), grupo normal con ejercicio (NE), el grupo con lesión a la membrana sinovial sin ejercicio (SS) y el grupo con lesión a la membrana sinovial con ejercicio (SE).

El análisis inició observando de manera general el aspecto de la superficie del cartílago articular femoral de la pata derecha de las ratas (Fig. 5), utilizando un microscopio estereoscópico, en los diferentes días de estudio (3, 6 y 10); el grupo normal sin ejercicio sirvió como referencia para comparar con los demás grupos. La superficie de los cóndilos femorales presentó un aspecto normal en todos los grupos de estudio; con una superficie lisa y sin daño aparente al cartílago.

Para tener un mejor idea del estado del cartílago articular, se procedió a realizar criocortes al cóndilo femoral medial en plano sagital con un grosor de 6 a 8 micras, y se tiñeron con safranina O. El objetivo de la tinción fue observar la presencia de proteoglicanos. Las laminillas teñidas con safranina-O se montaron en un microscopio óptico con un objetivo de 40X para analizar la integridad y la presencia de los proteoglicanos, en los diferentes días de estudio (3, 6 y 10) de todos los grupos. Para fines del trabajo el cartílago articular se dividió en tres zonas: zona superficial (ZS) la cual se ubica próxima al espacio articular (Fig. 5a, asterisco) formada por condrocitos alargados, la zona media situada debajo de la zona superficial (ZM) la cual está formada de condrocitos redondos que pueden estar en hileras y por último la zona profunda (ZP) que se encuentra próxima al hueso, en este caso los condrocitos son redondos e hipertróficos.

En los cortes histológicos realizados para los grupos NS, NE, SS y SE (Fig. 6), se observó el aspecto normal del cartílago articular y las tres zonas de estudio. En ninguno de los grupos se observaron cambios en la estructura del cartílago,

tampoco hubo pérdida de proteoglicanos, ni formación de agregados celulares de condrocitos.

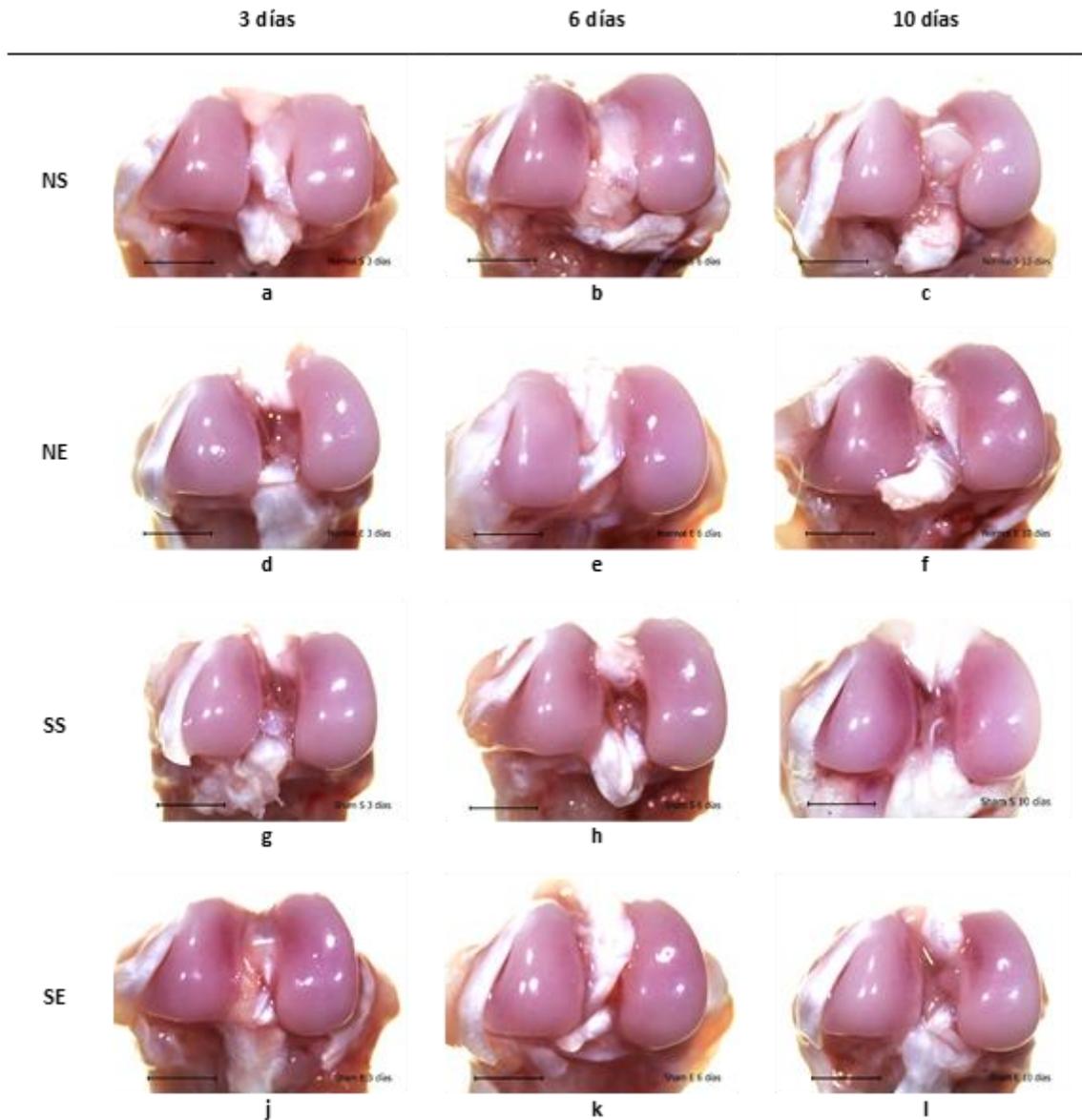
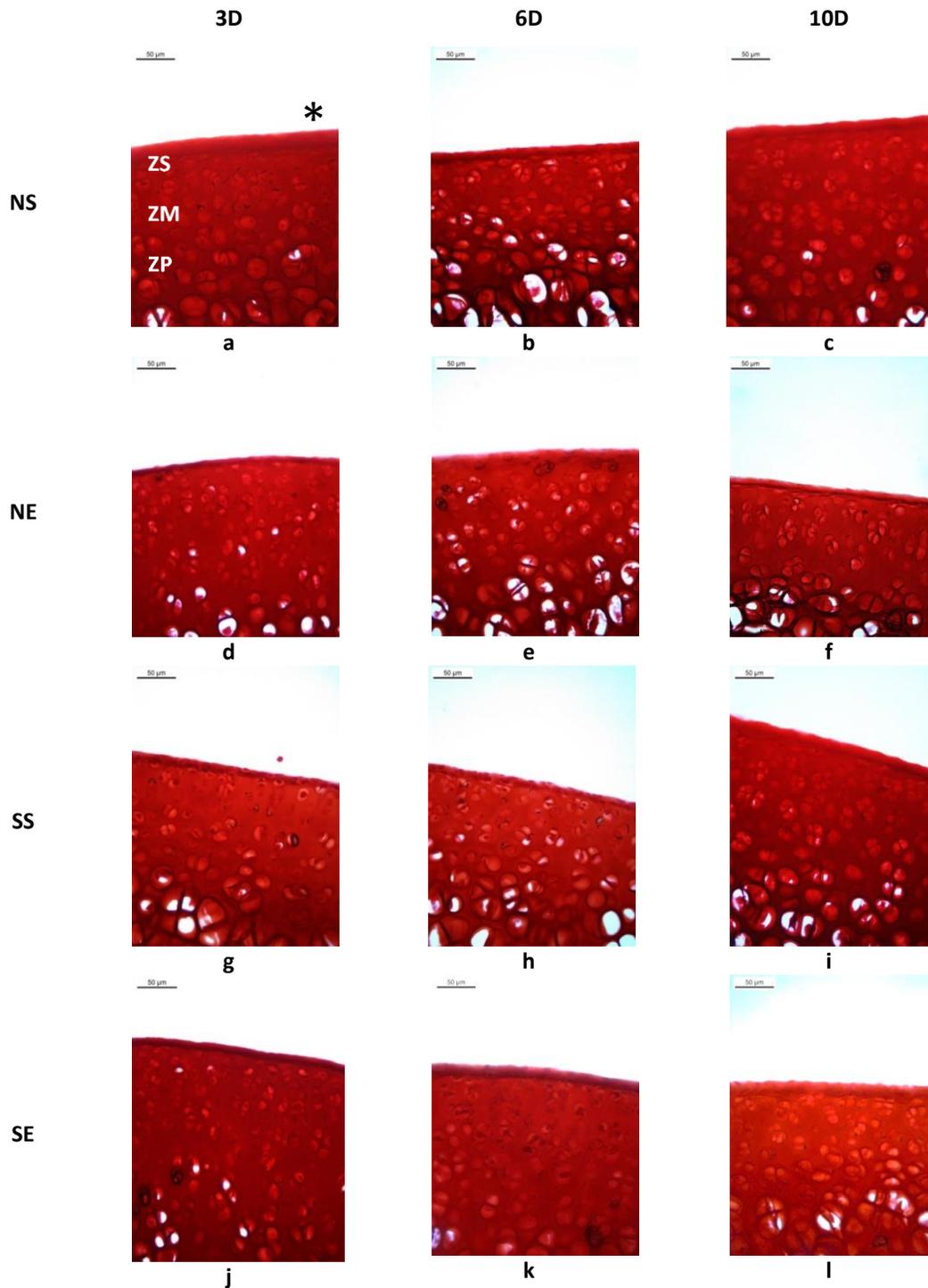


Figura 5 **Apariencia macroscópica del cóndilo femoral de rata de los diferentes grupos de estudio.** Se observó la superficie del cóndilo femoral de rata en los grupos de estudio (NS, NE, SS y SE) con un microscopio estereoscópico a un aumento de 12.5X. La barra en las imágenes representa 2 mm. NS= grupo normal sin ejercicio, NE= grupo normal con ejercicio, SS= grupo con lesión en la membrana sinovial y SE= grupo con lesión en la membrana sinovial más ejercicio.



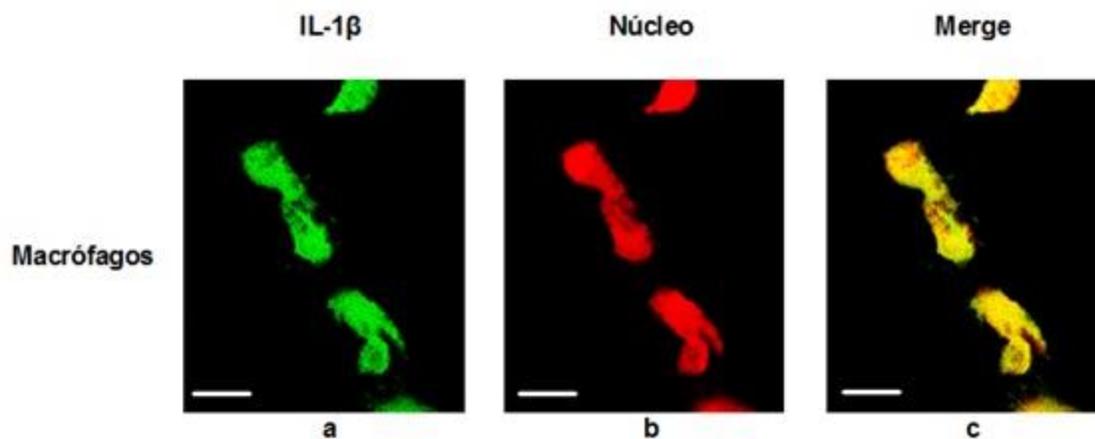
**Figura 6 Histología del cartílago articular de rata teñido con safranina-O.** Se observa la presencia en color rojo de proteoglicanos, también la morfología del cartílago articular de los diferentes grupos (NS, NE, SS y SE), en un aumento de 40X, en cada una de ellas se observa la zona superficial (ZS), zona media (ZM) y zona profunda (ZP). La barra en las imágenes representa 50 µm. NS= grupo normal sin ejercicio, NE= grupo normal con ejercicio, SS= grupo con lesión en la membrana sinovial y SE= grupo con lesión en la membrana sinovial más ejercicio

## 6.2 Detección de las interleucinas 1- $\beta$ , 10 y el factor de crecimiento transformante- $\beta$ en condrocitos de cartílago de rata

Para determinar la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-10 y TGF- $\beta$  en el cartílago de los diferentes grupos de ratas en estudio, se llevó a cabo inmunofluorescencia indirecta donde se utilizó un microscopio láser Carl-Zeiss. El cartílago se analizó mediante fluorescencia para observar la expresión y distribución de las citocinas y el factor de crecimiento durante los días de estudio.

### 6.2.1 Expresión de IL-1 $\beta$ en cartílago articular de rata

Para la detección de IL-1 $\beta$  se utilizaron macrófagos intraperitoneales de rata como control positivo, cultivados en cubreobjetos (Fig. 7).

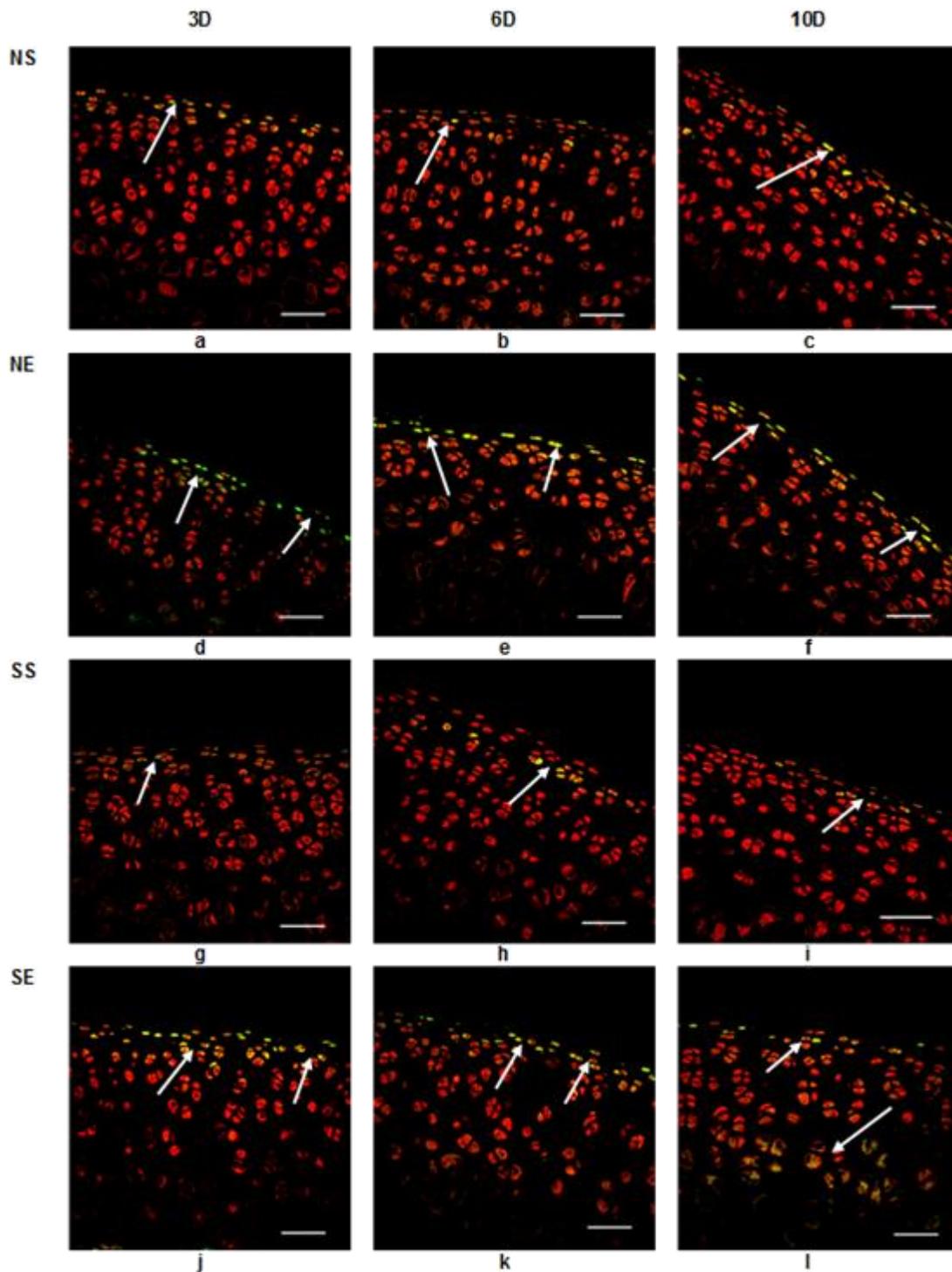


**Figura 7 Expresión de la IL-1 $\beta$  en macrófagos peritoneales.** Se observó la expresión de la IL-1 $\beta$  (FITC-verde) en macrófagos (a) y la contratinción del núcleo (rojo) con ioduro de propidio (b), fusión de las imágenes a y b (c). Microscopia confocal, la barra en las imágenes representa 10  $\mu$ m.

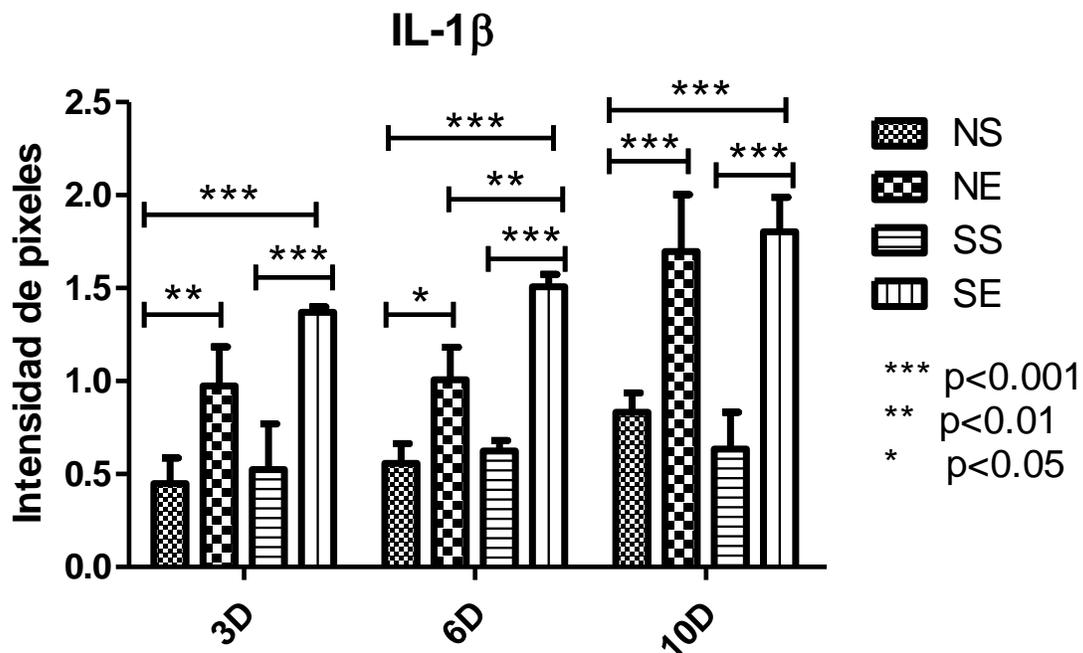
En el grupo NS se observó una ligera expresión de IL-1 $\beta$  (Fig. 8a, b, c) marcada de color verde ubicada principalmente en la ZS (flechas) del cartílago articular de rata, durante los días de estudio (3, 6 y 10), en comparación con el grupo NE (Fig. 8d, e, f), donde hubo un incremento en la expresión de esta molécula desde los primeros días en la zona ZS (flechas).

El resultado del grupo SS (Fig. 8g, h, i) no mostró un incremento en la marca para IL-1 $\beta$  y fue muy parecido al grupo NS. Sin embargo, en el grupo de ratas con SE (Figura 8j, k, l), la presencia de esta citocina fue similar al grupo NE con respecto al incremento en la expresión desde los primeros días, pero la distribución de la marca para esta molécula fue mayor en el décimo día del experimento, localizándose en la zona profunda (flecha hacia abajo) (Fig. 8 l).

La evaluación estadística de la intensidad de coloración en píxeles mostró que el marcaje para la IL-1 $\beta$  en el grupo NE hubo diferencias significativas a los 3, 6 y 10 días en comparación con el grupo NS ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ). Por otro lado, el grupo SS mostró una expresión similar de la IL-1 $\beta$  a la observada en el grupo NS, sin diferencias significativas en ninguno de los días de estudio. Por último el grupo SE mostró una diferencia altamente significativa durante los tres días del experimento para IL-1 $\beta$  respecto al grupo NS ( $p < 0.001$ ); además, en la comparación entre los grupos NE y SE se encontraron diferencias significativas hasta el sexto día del experimento ( $p < 0.01$ ). También se comparó el grupo SS y SE en los diferentes días de estudio, el resultado obtenido reveló diferencias en los tres días de estudio ( $p < 0.001$ ) (Figura 9).



**Figura 8** Expresión de IL-1 $\beta$  en los grupos de ratas normales (NS, NE) y con lesión a la membrana sinovial (SS, SE), en los diferentes días de estudio (3, 6 y 10). La expresión de la IL-1 $\beta$  (color verde) se observa principalmente en la zona superficial (flechas) del cartílago articular de rata en los grupos de estudio (a-l), la contraindicación de los núcleos (color rojo) se realizó con yoduro propidio. La barra en todas las imágenes corresponde a 50  $\mu$ m. NS= grupo normal sin ejercicio, NE= grupo normal con ejercicio, SS= grupo con lesión en la membrana sinovial y SE= grupo con lesión en la membrana sinovial con ejercicio. Días de estudio (3D, 6D y 10D).



**Figura 9. Análisis estadístico de la molécula IL-1 $\beta$  en el cartílago de rata de los diferentes grupos de estudio.** El análisis estadístico indica que existen diferencias significativas de la expresión de IL-1 $\beta$  en los grupos normal NE con respecto al grupo normal NS, el mismo análisis también indica que las diferencias entre el grupo con SE con respecto al grupo NS son altamente significativas. NS= grupo normal sin ejercicio, NE= grupo normal con ejercicio, SS= grupo con lesión en la membrana sinovial y SE= grupo con lesión en la membrana sinovial con ejercicio. Días de estudio (3D, 6D y 10D).

### 6.2.2 Expresión de IL-10 en cartílago articular de rata

Como control positivo de la expresión de IL-10 se utilizaron macrófagos intraperitoneales de rata, cultivados en cubreobjetos (Fig.10)

La expresión de la IL-10 en el cartílago articular de rata del grupo NS se observó de manera muy tenue pero constante en los condrocitos de la zona superficial del cartílago durante todos los días de estudio (flechas) (Fig. 11a, b, c). En el grupo NE (Fig. 11d, e, f) en todos los tiempos analizados se observaron células positivas para esta citocina en mayor cantidad en la zona superficial del cartílago.

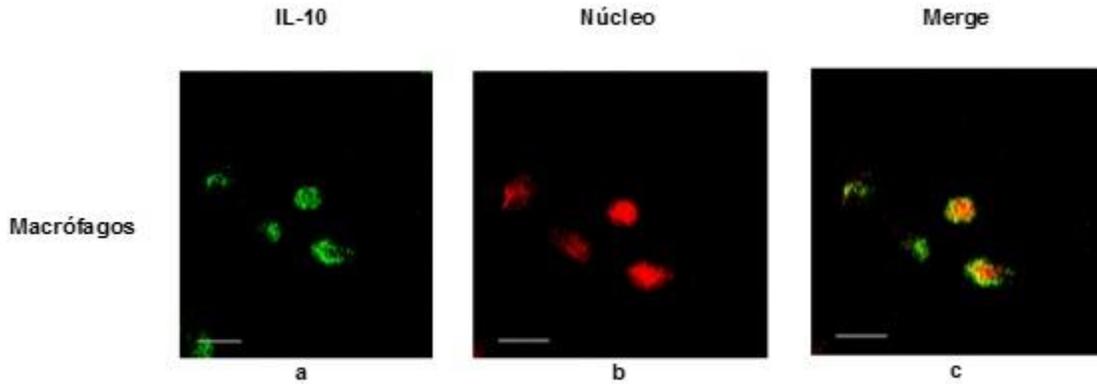


Figura 10 **Expresión de la IL-10 en macrófagos peritoneales.** Se observa la expresión de la IL-10 (FITC-verde) en macrófagos (a) y la contratinción del núcleo (rojo) con ioduro de propidio (b), fusión de las imágenes a y b (c). Microscopia confocal, la barra en las imágenes representa 10  $\mu\text{m}$ .

El marcaje para la IL-10 en el grupo SS, mostró presencia en la zona superficial muy similar al grupo NS (Fig. 11g, h, i), en tanto al grupo SE (Fig. 11j, k, l) el marcaje para la IL-10 mostró gran cantidad de células positivas en la zona superficial.

La evaluación estadística mostró que la expresión para la IL-10 en el grupo NE hubo diferencias significativas a los 6 y 10 días en comparación con el grupo NS ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ). Por otro lado, el grupo SS mostró una expresión similar de la IL-10 en la observada en el grupo NS, pero al décimo día incremento la expresión de esta citocina por lo que en el análisis estadístico mostró diferencias ( $p < 0.05$ ). Por último el grupo SE mostró diferencia significativa durante a los 6 y 10 días del experimento para IL-10 respecto al grupo NS ( $p < 0.05$ ). También comparamos entre sí los grupos SS y SE, no hubo diferencias (Figura 12)

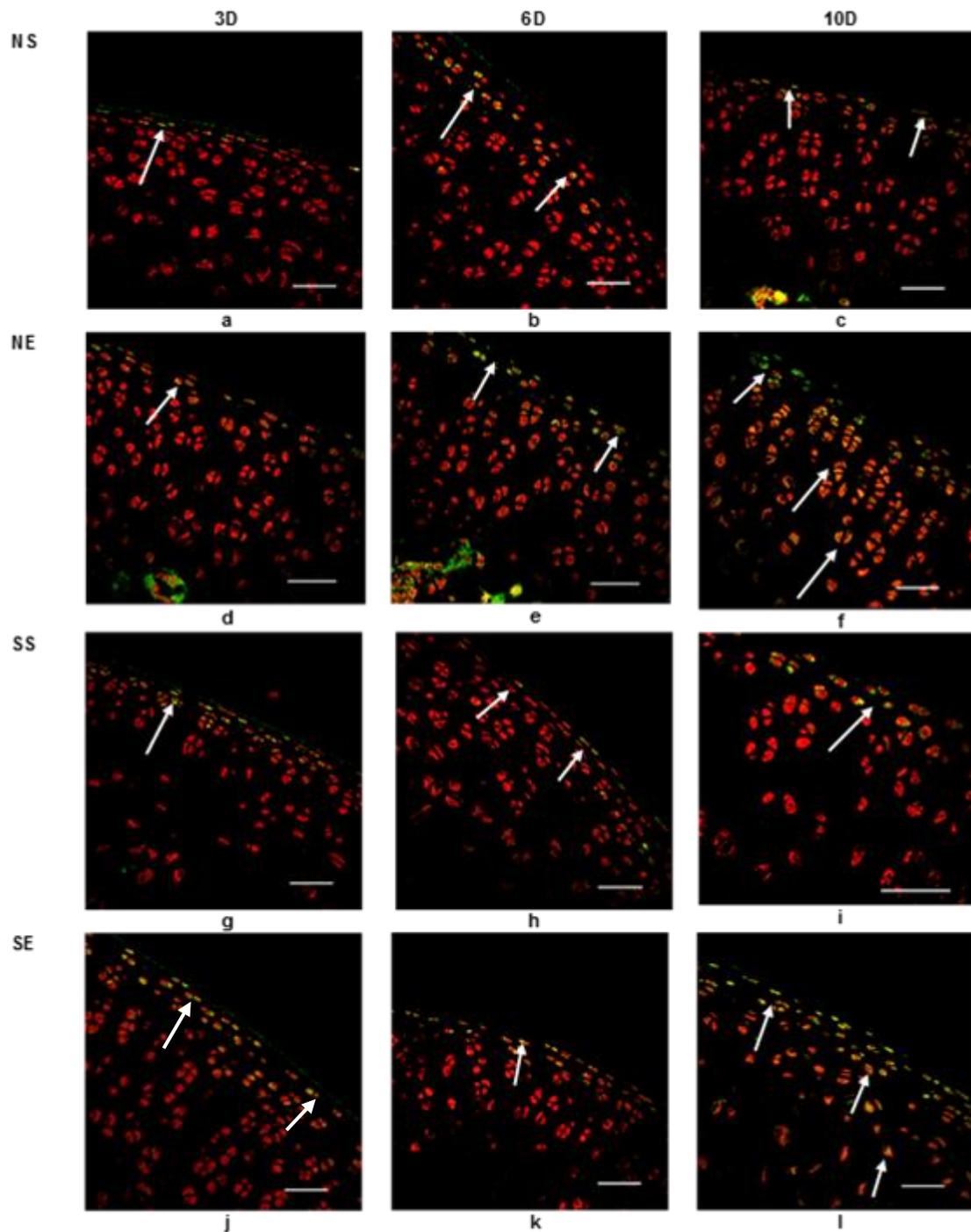
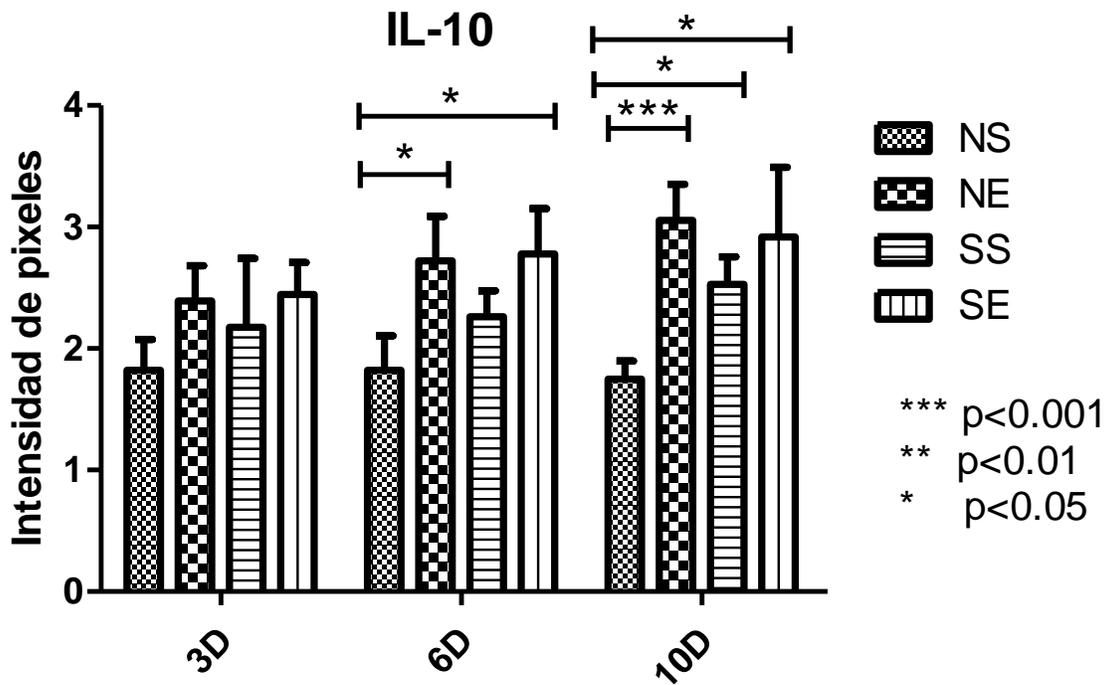


Figura 11 **Expresión de IL-10 en los grupos de ratas normales y con lesión en la membrana sinovial en los diferentes días de estudio.** La expresión de la IL-10 (color verde) se observa principalmente en la zona superficial (flechas), en los grupos NE y SE a los 10 días se observa en las tres zonas (flechas) del cartílago articular de rata, la contratinción de los núcleos (color rojo) se realizó con ioduro propidio. La barra en todas las imágenes corresponde a 50  $\mu$ m. NS= grupo normal sin ejercicio, NE= grupo normal con ejercicio, SS= grupo con lesión en la membrana sinovial y SE= grupo con lesión en la membrana sinovial con ejercicio. Días de estudio (3D, 6D y 10D)



**Figura 12. Análisis estadístico de la expresión de la IL-10 de los diferentes grupos de estudio.** El análisis estadístico indica que existen diferencias significativas de la expresión de IL-10 en el grupo NE con respecto al grupo NS a partir del día 6 (6D), por otro lado el mismo análisis indica diferencias entre el grupo SE y el grupo NS desde el día 6 hasta el último día de estudio. NS= grupo normal sin ejercicio, NE= grupo normal con ejercicio, SS= grupo con lesión en la membrana sinovial y SE= grupo con lesión en la membrana sinovial con ejercicio. Días de estudio (3D, 6D y 10D)

### 6.2.3 Expresión de TGF- $\beta$ en cartílago articular de rata

Como control positivo para la detección de TGF- $\beta$  cultivados en cubreobjetos se utilizaron macrófagos intraperitoneales de rata (Fig. 13).

El factor de crecimiento transformante-beta se observó mediante inmunofluorescencia indirecta en el cartílago articular de la rata. El grupo normal sin ejercicio mostró una expresión ligera sobre la ZS (flechas) (Fig. 14a, b, c) que parece ser constante durante los días de estudio (3, 6 y 10). En cambio el grupo normal con ejercicio (Fig. 14d, e, f) tuvo un gran aumento en la marca para el factor de crecimiento desde el día 3 con respecto al grupo control, la presencia fue en la ZS y en la ZM (flechas), para el día 10 el TGF- $\beta$  estuvo localizado en las tres zonas del cartílago articular (flechas) (Fig.14f).

El grupo con lesión a la membrana sinovial sin ejercicio mostró una expresión similar en lo observado en el grupo control en los días de estudio. La presencia del factor de crecimiento fue en la zona superficial del cartílago (color verde) (Fig. 14g, h, i). Por el contrario en el grupo con lesión en la membrana sinovial con ejercicio, la expresión del TGF- $\beta$  (color verde) fue en las tres zonas del cartílago articular (ZS, ZM y ZP) (Fig.13j, k, l) (flechas) mostrando una mayor expresión a los 10 días con ejercicio (Fig.14 l).

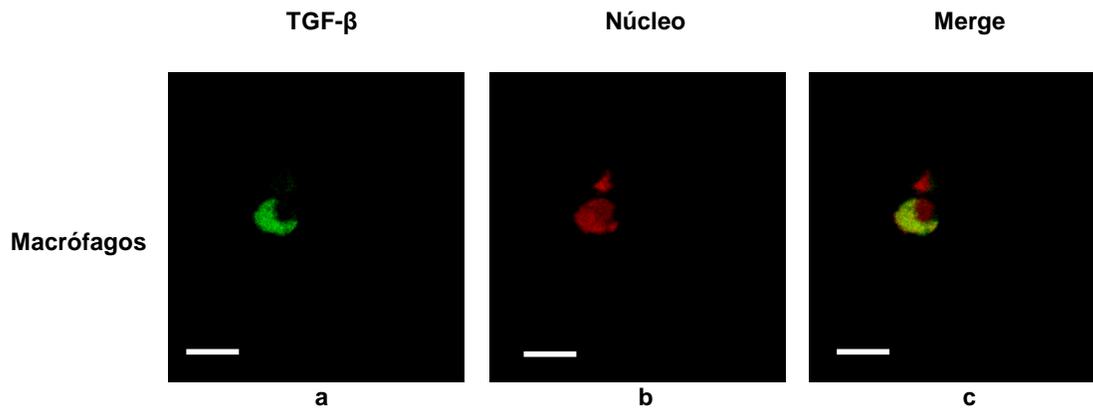
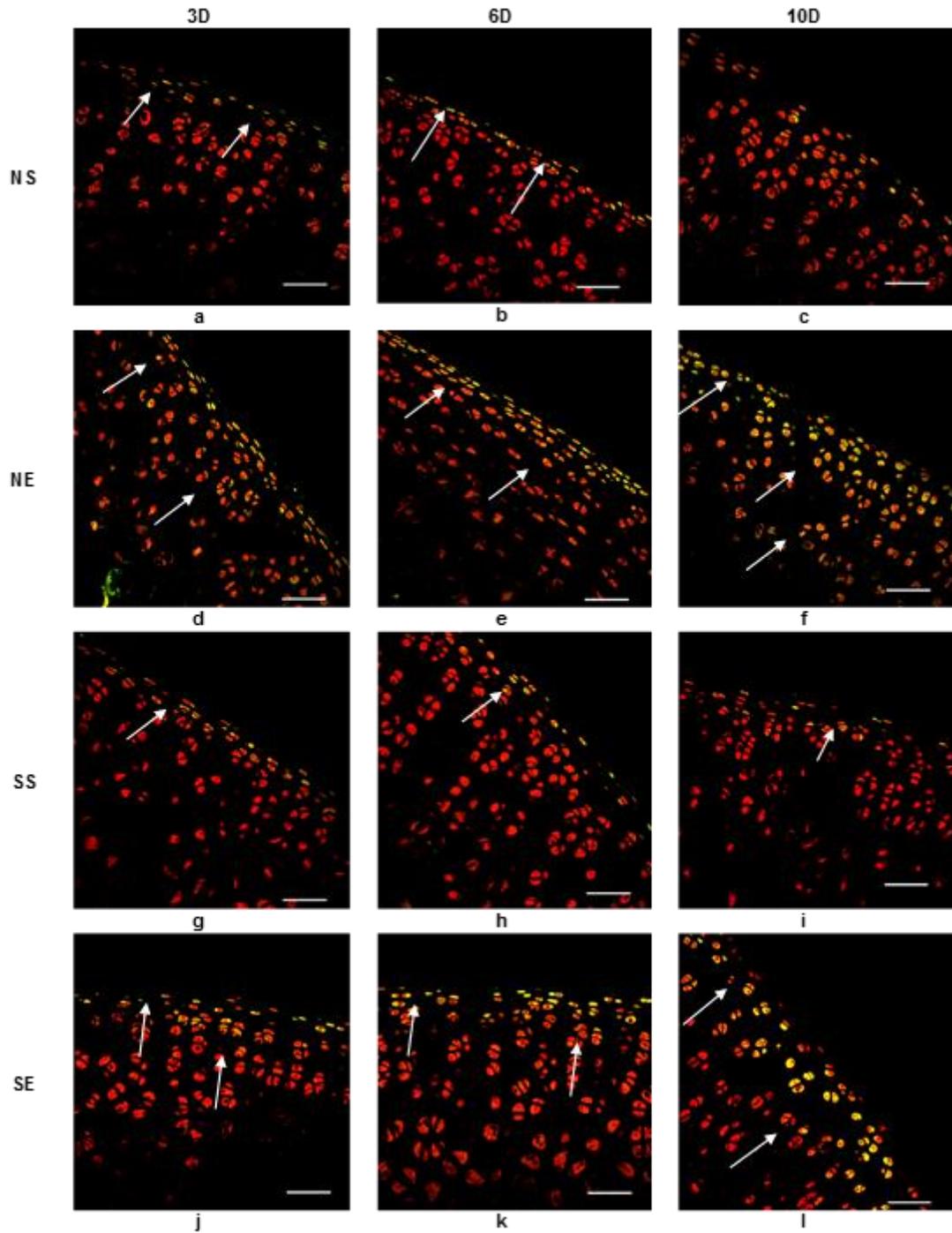


Figura 13. **Presencia de TGF- $\beta$  en macrófagos.** Se observa la expresión de TGF- $\beta$  (color verde) (fig.12a), contratinción del núcleo (color rojo) (fig.12b) se realizó con ioduro de propidio (IP), fusión de las imágenes a y b (c). Microscopia confocal, la barra en las imágenes representa 10  $\mu$ m.

La evaluación estadística de la expresión para el TGF- $\beta$  mostró que en el marcaje en el grupo NE hubo diferencias significativas en los tres días de estudio en comparación con el grupo NS ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ). Por otro lado, el grupo SS mostró una expresión similar de la TGF- $\beta$  a la observada en el grupo NS, no hubo diferencias significativas en ninguno de los días de estudio. También se comparó el grupo SE que mostró una diferencia altamente significativa durante los tres días del experimento para IL-1 $\beta$  respecto al grupo NS ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ). Por último se hizo la comparación para los grupos con lesión (SS y SE), el resultado reveló diferencia en los tres días de estudio ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig.15)



**Figura 14 Expresión de TGF- $\beta$  en cartilago articular de rata.** Se observan células positivas de color verde (flechas) los nucleos de las células (color rojo) contra teñidas con ioduro de propidio (IP). La barra en todos los paneles corresponde a 50  $\mu$ m. NS= grupo normal sin ejercicio, NE= grupo normal con ejercicio, SS= grupo con lesión en la membrana sinovial y SE= grupo con lesión en la membrana sinovial con ejercicio. Días de estudio (3D, 6D y 10D)

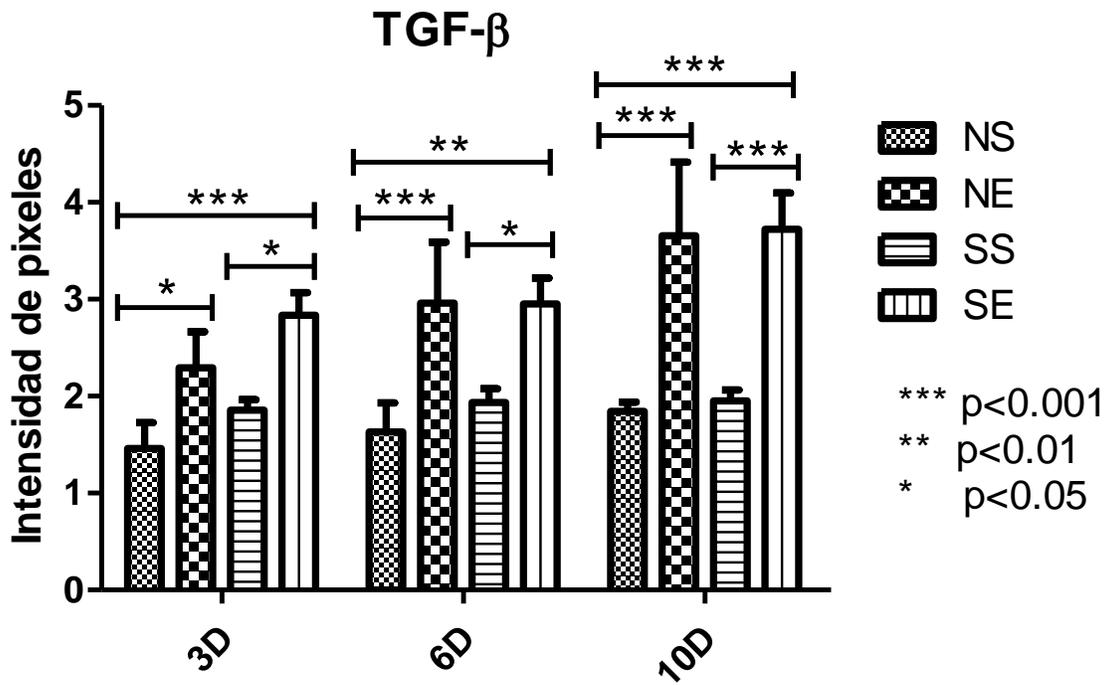


Figura 15. Análisis estadístico de la molécula TGF- $\beta$  de los diferentes grupos de estudio. El análisis estadístico indica que existen diferencias significativas de la expresión de TGF- $\beta$  en los grupos NE con respecto al grupo NS, el mismo análisis también indica que las diferencias entre el grupo con SE con respecto al grupo NS son altamente significativas. NS= grupo normal sin ejercicio, NE= grupo normal con ejercicio, SS= grupo con lesión en la membrana sinovial y SE= grupo con lesión en la membrana sinovial con ejercicio. Días de estudio (3D, 6D y 10D).

## 7. Discusión

El ejercicio ligero a moderado se sabe que protege al cartílago articular, incrementando la cantidad de proteoglicanos también reduce la actividad de citocinas inflamatorias (Helmark *et al.*, 2012). Este efecto es explorado en el tratamiento y prevención de la Osteoartritis. La pregunta que todavía permanece sin responder es respecto al ejercicio de alto impacto y sus consecuencias para el cartílago (Franciozi *et al.*, 2013).

El cartílago articular es un tejido altamente especializado que se mantiene bajo condiciones herméticas reguladas, presenta un bajo volumen de condrocitos, su único componente celular, en una cantidad menor al 5% del volumen total del tejido. El cartílago articular cubre la parte final de los huesos para disminuir la fricción producida por fuerzas mecánicas. Estas cargas mecánicas son absorbidas por la matriz extracelular (MEC) del cartílago, donde subsecuentemente es disipada y transmitida a los condrocitos. Las propiedades bioquímicas del cartílago articular son garantizadas por la particular organización de la MEC, representada principalmente por colágenas y proteoglicanos a cargo de resistir las fuerzas de tensión (Madry *et al.*, 2012).

En el presente trabajo se observó que la actividad física de alto impacto a corto plazo no tuvo efecto sobre la integridad de la superficie del cóndilo femoral normal del modelo animal (Fig. 5d, e, f), tampoco se encontró una disminución de proteoglicanos en el cartílago articular sano de la rata durante los días de estudio (Fig.6d, e, f). Por otro lado, también se trabajó con ratas sometidas a lesión en la membrana sinovial. Con el objetivo de saber si la lesión a este tejido puede influir en la integridad del cartílago articular.

Por mucho tiempo se asumió que la participación de la membrana sinovial en la osteoartritis era consecuencia de un evento secundario de la enfermedad porque el proceso inflamatorio presente en este tejido durante la patología no era considerado un evento inflamatorio clásico, debido a la ausencia de neutrófilos (Goldring *et al.*, 2007). Sin embargo hoy en día se sabe que la inflamación sinovial

es un factor importante que contribuye a la desregulación de las funciones de los condrocitos, favoreciendo un desequilibrio entre las actividades catabólicas y anabólicas en la remodelación de la matriz del cartílago. La sinovitis también involucra infiltrado de linfocitos T y B así como una sobreexpresión de mediadores pro-inflamatorios (Loeser, 2006)

En el presente trabajo no se encontraron cambios macroscópicos en el cóndilo femoral (Fig. 5g, h, i, j, k, l) en los dos grupos de ratas con lesión en la membrana sinovial (con y sin ejercicio), cuando se compararon con el grupo de ratas normales (Fig. 5 a, b, c). En los cortes histológicos teñidos con safranina-O tampoco se observó disminución de proteoglicanos (Fig. 6g, h, i, j, k, l) cuando las imágenes fueron comparadas con el grupo normal sin ejercicio (Fig. 6a, b, c), sugiriendo que el ejercicio y la lesión a la membrana sinovial no promuevan un gran efecto sobre el cartílago articular a corto plazo en el modelo de estudio.

La participación de citocinas y factores de crecimiento en la homeostasis del cartílago articular adulto es importante debido a la capacidad de estimular la producción de componentes de la matriz y salvaguardar el equilibrio metabólico (Madry *et al.*, 2012). Sin embargo durante la progresión de la osteoartritis, el fenotipo catabólico es mantenido principalmente por citocinas pro-inflamatorias, destacando la IL-1 $\beta$ . La IL-1 $\beta$  es la citocina mejor estudiada en el desarrollo de la osteoartritis. Está presente en el líquido sinovial de las articulaciones osteoarthriticas y se expresa en la membrana sinovial y los condrocitos. La IL-1 $\beta$  incrementa los niveles de metaloproteinasas y reduce la síntesis de proteínas de matriz extracelular en condrocitos (Mueller *et al.*, 2011).

En este trabajo se observó la expresión de la IL-1 $\beta$  principalmente en los condrocitos de la zona superficial del cartílago articular de rata. Los resultados obtenidos mostraron un incremento de esta citocina en los grupos de ratas donde fueron sometidos a ejercicio de alto impacto (Fig. 8d, e, f, j, k, l). También se analizó la expresión basal para la IL-1 $\beta$  en un grupo de ratas normales (Fig. 8a, b, c), este grupo fue utilizado como control para los demás grupos. Por último el grupo de ratas que solo fue sometido a la lesión de la membrana sinovial mostro

una expresión similar al grupo control (Fig. 8g, h, i). Los resultados obtenidos indicaron que un daño en la membrana sinovial no influye en la expresión de la IL-1 $\beta$  en el cartílago del modelo y días de estudio. Sin embargo el ejercicio de alto impacto demostró ser un factor para estimular la expresión de esta citocina.

Hasta el momento se desconoce la función de la IL-1 $\beta$  en el cartílago articular normal, pero se sabe que esta citocina puede ser regulada por un inhibidor natural que compite por el receptor de IL-1 tipo I nombrado como antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) con el fin de impedir que la IL-1 $\beta$  se una al receptor y transmita señales al interior de los condrocitos. (Martel-Pelletier *et al.*, 2008). También existe en la membrana superficial de los condrocitos un receptor que actúa como señuelo nombrado como receptor de IL-1 tipo II (IL-1RII), debido a que una vez que la IL-1 $\beta$  se une este receptor no hay activación de señales al interior de la célula.

La IL-10 se ha reconocido como una potente citocina antiinflamatoria importante en la homeostasis del cartílago articular. La IL-10 suprime la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6). Elevadas concentraciones de esta citocina se han encontrado en el cartílago osteoartítico (Muller *et al.*, 2008)

Continuando con nuestro trabajo, también se analizó la expresión de la IL-10 en el cartílago articular de rata, los resultados de la inmunofluorescencia mostraron una distribución de esta citocina en la zona superficial del cartílago articular (Fig. 11) pero en el grupo normal con ejercicio así como en el grupo con lesión en la membrana sinovial con ejercicio a los diez días del experimento, la distribución de la IL-10 fue en las tres zonas del cartílago (Fig.11f, l). Los datos obtenidos en el análisis estadístico indicaron que hasta el sexto día empezó a incrementar esta citocina en los grupos con ejercicio de alto impacto (NE, SE). También hubo un aumento de esta citocina en el grupo con lesión en la membrana sinovial (SS) en el día 10 del experimento revelando diferencias en comparación con el grupo normal (NS) (Fig. 12). El aumento de esta citocina podría deberse al ejercicio de alto impacto, debido al estrés generado en el cartílago del modelo experimental. Se sabe que la IL-10 puede bloquear las funciones de citocinas pro-inflamatorias

al estimular la producción de inhibidores naturales para este tipo de citocinas. También la IL-10 ha demostrado inducir la síntesis de colágeno tipo II en cartílago (Muller *et al.*, 2008). Por estas funciones la IL-10 se ha denominado de tipo protector. Sin embargo esta citocina tiene una vida media relativamente corta, de ahí que no se conozca el mecanismo que la IL-10 utiliza para llevar a cabo su función (Schulze-Tanzil *et al.*, 2009)

El factor de crecimiento transformante-beta ha demostrado tener un papel importante en la homeostasis del cartílago, regulando la proliferación celular, la diferenciación, así como también el control sobre la síntesis y degradación de componentes de matriz extracelular (Finsson *et al.*, 2012)

Por ello se analizó la expresión de TGF- $\beta$  como parte del trabajo planteado. Similar a lo que sucedió en las citocinas anteriores la presencia de TGF- $\beta$  en el grupo normal sin ejercicio (NS) fue solo en la zona superficial del cartílago articular en los días de estudio (3, 6 y 10) (Fig. 14a, b, c), la marca presente en este grupo fue tomada como expresión basal para poder comparar el grupo normal con ejercicio de alto impacto. El resultado obtenido mostró que en el grupo normal con ejercicio hubo un incremento de células positivas para el TGF- $\beta$  desde el tercer día, la presencia de esta proteína fue en la zona superficial y en la zona media del cartílago en el modelo experimental (Fig.14d, e) y en el día 10 del experimento el factor de crecimiento se expresó en las tres zonas del cartílago (zona superficial, media y profunda) (Fig. 14f) .El grupo que se le indujo la lesión en la membrana sinovial (Fig. 14g, h, i) sirvió para comparar al grupo con el mismo procedimiento de la lesión más el estímulo del ejercicio. Similar a lo observado en los grupos normales, el incremento de TGF- $\beta$  fue en el grupo que recibió el estímulo del ejercicio, con presencia en dos zonas del cartílago (zona superficial y zona media) (Fig. 14j, k, l).

Los datos estadísticos obtenidos revelaron una mayor expresión de TGF- $\beta$  en los grupos que fueron sometidos a ejercicio de alto impacto (NE y SE). También al comparar el grupo normal y el grupo con lesión en la membrana (NS vs SS), no hubo diferencias entre estos grupos. Como último dato al comparar los grupos que

recibieron ejercicio (NE vs SE) se demostró que no hubo diferencias para estos grupos (Fig. 15).

Los resultados obtenidos durante el presente trabajo demostraron que el ejercicio de alto impacto estimula la expresión de la IL-1 $\beta$ , IL-10 y TGF- $\beta$  en el modelo experimental a tiempos cortos. Sin embargo la IL-10 fue la citocina que aumento en el grupo que fue sometido a la lesión en la membrana sinovial sin ejercicio, creemos que es debido a su efecto anti-inflamatorio, y la lesión está generando un proceso inflamatorio, el cual creemos está activando de moléculas de tipo inflamatorio.

## 8. Conclusiones

- No se encontraron cambios estructurales en el cóndilo femoral ni pérdida aparente de proteoglicanos en el cartílago articular de la rata, con el efecto del ejercicio de alto impacto y con la lesión en la membrana sinovial.
- El incremento en la expresión de la IL-1 $\beta$ , IL-10 y TGF- $\beta$  se observó en los grupos que fueron sometidos a ejercicio de alto impacto.
- La expresión de la IL-1 $\beta$  y TGF- $\beta$  no se vio afectado en los grupos con lesión a la membrana sinovial, a excepción de la IL-10 que aumento conforme pasaron los días en el grupo con lesión en la membrana sinovial sin ejercicio.
- La lesión en la membrana sinovial parece no influir en la integridad del cartílago articular si no existe un daño físico mayor como una lesión en los meniscos o un una ruptura de ligamentos.

## 9. Perspectivas

- Aumentar los días de entrenamiento para observar el comportamiento de las citocinas así como saber si hay cambios estructurales en el cartílago articular de la rata.
- Analizar la expresión de los inhibidores naturales de la IL-1 $\beta$  en un cartílago articular normal bajo el efecto del ejercicio de alto impacto a corto y largo plazo.
- Evaluar el contenido de fibras de colágena contenidas en la matriz extracelular del cartílago articular con el estímulo del ejercicio de alto impacto.
- Determinar el papel de la IL-1 $\beta$  en la homeostasis del cartílago articular.

## 10. Referencias

Bay-Jensen AC, Hoegh-Madsen S, Dam E, Henriksen K, Sondergaard BC, Pastoureau P, *et al.* (2010). Which elements are involved in reversible and irreversible cartilage degradation in osteoarthritis? *Rheumatology international* **30**(4): 435-442.

Blaney Davidson EN, Scharstuhl A, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB (2005). Reduced transforming growth factor-beta signaling in cartilage of old mice: role in impaired repair capacity. *Arthritis research & therapy* **7**(6): R1338-1347.

Blaney Davidson EN, van der Kraan PM, van den Berg WB (2007). TGF-beta and osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **15**(6): 597-604.

Bosomworth NJ (2009). Exercise and knee osteoarthritis: benefit or hazard? *Canadian family physician Medecin de famille canadien* **55**(9): 871-878.

Brennan FM (1999). Interleukin 10 and arthritis. *Rheumatology* **38**(4): 293-297.

Daheshia M, Yao JQ (2008). The interleukin 1beta pathway in the pathogenesis of osteoarthritis. *The Journal of rheumatology* **35**(12): 2306-2312.

Finnsen KW, Chi Y, Bou-Gharios G, Leask A, Philip A (2012). TGF- $\beta$  signaling in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Frontiers in bioscience* **4**: 251-268.

Franciozi CES, Tarini VAF, Reginato RD, Goncalves PRS, Medeiros VP, Ferretti M, *et al.* (2013). Gradual strenuous running regimen predisposes to osteoarthritis due to cartilage cell death and altered levels of glycosaminoglycans. *Osteoarthritis and Cartilage* **21**: 965-972.

Gahunia HK, Pritzker KP (2012). Effect of exercise on articular cartilage. *The Orthopedic clinics of North America* **43**(2): 187-199, v.

Goldring MB, Goldring SR (2007). Osteoarthritis. *Journal of cellular physiology* **213**(3): 626-634.

Goldring MB, Marcu KB (2009). Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis research & therapy* **11**(3): 224.

Goldring MB, Otero M (2011). Inflammation in osteoarthritis. *Current opinion in rheumatology* **23**(5): 471-478.

Heijink A, Gomoll AH, Madry H, Drobnic M, Filardo G, Espregueira-Mendes J, *et al.* (2012). Biomechanical considerations in the pathogenesis of osteoarthritis of the knee. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA* **20**(3): 423-435.

Helmark IC, Mikkelsen UR, Borglum J, Rothe A, Petersen MCH, Andersen O, *et al.* (2010). Exercise increases interleukin-10 levels both intraarticularly and peri-synovially in patients with knee osteoarthritis: a randomized controlled trial. *Arthritis research & therapy* **12**(4).

Helmark IC, Petersen MC, Christensen HE, Kjaer M, Langberg H (2012). Moderate loading of the human osteoarthritic knee joint leads to lowering of intraarticular cartilage oligomeric matrix protein. *Rheumatology international* **32**(4): 1009-1014.

Hunter DJ, Eckstein F (2009). Exercise and osteoarthritis. *Journal of anatomy* **214**(2): 197-207.

Hunter DJ, Felson DT (2006). Osteoarthritis. *Bmj* **332**(7542): 639-642.

Iannone F, De Bari C, Dell'Accio F, Covelli M, Cantatore FP, Patella V, *et al.* (2001). Interleukin-10 and interleukin-10 receptor in human osteoarthritic and healthy chondrocytes. *Clinical and experimental rheumatology* **19**(2): 139-145.

Javelaud D, Mauviel A (2004). Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles. *The international journal of biochemistry & cell biology* **36**(7): 1161-1165.

John T, Muller RD, Oberholzer A, Zreiqat H, Kohl B, Ertel W, *et al.* (2007). Interleukin-10 modulates pro-apoptotic effects of TNF-alpha in human articular chondrocytes in vitro. *Cytokine* **40**(3): 226-234.

Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H (2011). Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nature reviews. Rheumatology* **7**(1): 33-42.

Kouri JB, Lavalley C (2006). Do chondrocytes undergo "activation" and "transdifferentiation" during the pathogenesis of osteoarthritis? A review of the ultrastructural and immunohistochemical evidence. *Histology and histopathology* **21**(7): 793-802.

Kouri JB, Rojas L, Perez E, Abbud-Lozoya KA (2002). Modifications of Golgi complex in chondrocytes from osteoarthrotic (OA) rat cartilage. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **50**(10): 1333-1340.

Lems WF, den Uyl D (2010). Exercise-induced changes in interleukin-10 in patients with knee osteoarthritis: new perspectives? *Arthritis research & therapy* **12**(4): 131.

Loeser RF (2006). Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide. *Arthritis and rheumatism* **54**(5): 1357-1360.

Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB (2012). Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis and rheumatism* **64**(6): 1697-1707.

Lorenz H, Richter W (2006). Osteoarthritis: cellular and molecular changes in degenerating cartilage. *Progress in histochemistry and cytochemistry* **40**(3): 135-163.

Lotz MK (2010). Posttraumatic osteoarthritis: pathogenesis and pharmacological treatment options. *Arthritis research & therapy* **12**(3).

Lozoya KA, Flores JB (2000). A novel rat osteoarthrosis model to assess apoptosis and matrix degradation. *Pathology, research and practice* **196**(11): 729-745.

Madry H, Luyten FP, Facchini A (2012). Biological aspects of early osteoarthritis. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA* **20**(3): 407-422.

Mahajan A, Verma S, Tandon V (2005). Osteoarthritis. *The Journal of the Association of Physicians of India* **53**: 634-641.

Malemud CJ (2004). Cytokines as therapeutic targets for osteoarthritis. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* **18**(1): 23-35.

Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP, Roughley PJ (2008). Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best practice & research. Clinical rheumatology* **22**(2): 351-384.

Michael JW, Schluter-Brust KU, Eysel P (2010). The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. *Deutsches Arzteblatt international* **107**(9): 152-162.

Mobasheri A (2011). Applications of proteomics to osteoarthritis, a musculoskeletal disease characterized by aging. *Frontiers in physiology* **2**: 108.

Mody GM, Brooks PM (2012). Improving musculoskeletal health: global issues. *Best practice & research. Clinical rheumatology* **26**(2): 237-249.

Morales RE, Bastidas MEP (2007). Existen los fármacos modificadores en la osteoartritis. *Reumatologia clinica* **3**: 39-43.

Mueller MB, Tuan RS (2011). Anabolic/Catabolic balance in pathogenesis of osteoarthritis: identifying molecular targets. *PM & R : the journal of injury, function, and rehabilitation* **3**(6 Suppl 1): S3-11.

Muller RD, John T, Kohl B, Oberholzer A, Gust T, Hostmann A, *et al.* (2008). IL-10 overexpression differentially affects cartilage matrix gene expression in response to TNF-alpha in human articular chondrocytes in vitro. *Cytokine* **44**(3): 377-385.

Roman-Blas JA, Stokes DG, Jimenez SA (2007). Modulation of TGF-beta signaling by proinflammatory cytokines in articular chondrocytes. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **15**(12): 1367-1377.

Schulze-Tanzil G, Zreiqat H, Sabat R, Kohl B, Halder A, Muller RD, *et al.* (2009). Interleukin-10 and articular cartilage: experimental therapeutical approaches in cartilage disorders. *Curr Gene Ther* **9**(4): 306-315.

Souich Pd (2007). The Role of Synovitis in the Physiopathology of Osteoarthritis - Effects of Chondroitin Sulfate. *US MUSCULOSKELETAL REVIEW*: 21-23.

Umlauf D, Frank S, Pap T, Bertrand J (2010). Cartilage biology, pathology, and repair. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **67**(24): 4197-4211.

van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, Blom A, van den Berg WB (2009). TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **17**(12): 1539-1545.

Woolf AD, Pfleger B (2003). Burden of major musculoskeletal conditions. *Bulletin of the World Health Organization* **81**(9): 646-656.

Wu G, Ladin Z (1996). Limitations of quasi-static estimation of human joint loading during locomotion. *Medical & biological engineering & computing* **34**(6): 472-476.



## 11. Anexo

### Solución de buffer fosfato salino (PBS) 1X

Reactivo	Cantidad
NaCl	8.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> monobásico	1.44 g
KCl	0.22 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> dibásico	0.24 g
Agua bidestilada y desionizada	1000 ml

Ajustar el pH entre 7.2-7.4

### Paraformaldehído 4% en PBS

Reactivo	Cantidad
Paraformaldehído	4 g
PBS 1X	100 ml

pH 7.2-7.4, mantener almacenado a 4°C.

### Tween 20 al 0.2% en PBS

Reactivo	Cantidad
Tween 20	200 µl
PBS 1X	100 ml

### Solución de bloqueo

Reactivo	Cantidad
Albumina sérica bovina	0.2 g
PBS-Tween 20 al 0.2%	100 ml