



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

“Estudio *ex vivo* de la regulación de la muerte programada de los condrocitos por la proteína Hsp27”

TESIS

Que presenta

CAROLINA PÉREZ IBÁÑEZ

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Directores de Tesis:

Dr. Juan Bautista Kouri Flores

Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano

Ciudad de México

Agosto, 2018

## Contenido

Resumen.....	3
Abstract.....	4
Introducción.....	5
Generalidades .....	5
Cartílago articular .....	6
Cambios en la unidad osteocondral durante la patogénesis de la osteoartritis.....	8
Apoptosis o muerte celular programada .....	10
Proteínas de choque térmico .....	12
Proteínas pequeñas de choque térmico .....	14
Hsp27 .....	14
Justificación .....	19
Hipótesis .....	20
Objetivos.....	21
Objetivo general .....	21
Objetivos específicos .....	21
Desarrollo.....	22
Estrategia experimental .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Materiales y Métodos .....	23
Resultados.....	29
Discusión.....	44
Conclusiones.....	48
Perspectivas.....	49
Bibliografía.....	50
Apéndice 1.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Detalles de procedimientos .....	57

## Resumen

La Osteoartritis (OA) es la enfermedad reumática más común en la población general a nivel mundial. Se caracteriza principalmente por la degradación progresiva del cartílago hialino de las articulaciones. Los cambios patológicos observados en el cartílago están dirigidos por las citocinas pro-inflamatorias liberadas por los condrocitos, quienes por un fenómeno de “transdiferenciación” desencadenan su programa de muerte celular programada conocido como condroptosis. Recientemente se ha propuesto a la proteína pequeña de choque térmico Hsp27, como un regulador de la homeóstasis de los condrocitos, ya que juega un papel anti-apoptótico en diversas líneas celulares al interactuar con moléculas pro-apoptóticas como Bid y Citocromo C para detener el programa de muerte. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar si la inducción de Hsp27 reduce la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$  al interactuar con proteínas pro-apoptóticas (Citocromo C y Bid). Para cumplir con este objetivo se planteó inducir a la proteína Hsp27 por choque térmico y enseguida añadir un estímulo de muerte con TNF- $\alpha$ . Los explantes osteocondrales estimulados con TNF- $\alpha$  mostraron una reactividad escasa ante este estímulo apoptótico, probablemente debido a que se en estos cultivos se mantiene la integridad de la matriz extracelular. Además, los resultados mostraron una expresión constitutiva de las proteínas pro-apoptóticas, y una expresión diferencial de Hsp27 en las tres zonas del cartílago articular, que varía con relación al estímulo de muerte. Los resultados obtenidos nos permiten sugerir que Hsp27 interactúa con moléculas pro-apoptóticas evaluadas para retrasar la muerte de los condrocitos.

## Abstract

Osteoarthritis is the most common rheumatic condition in the population worldwide. Its main characteristic is the progressive degradation of the joints hyaline cartilage in a cytokine driven mechanism, which is also responsible for the pathological changes that ultimately leads chondrocytes to undergo a “transdifferentiation” that triggers their own death process known as chondroptosis. In the past few years, Hsp27 has been proposed as a key regulator of chondrocytes homeostasis due to its already proven antiapoptotic properties that rely on its interaction with pro-apoptotic molecules such as Bid, Cytochrome c and pro-caspase 3. Therefore, the main goal of this study was to assess whether Hsp27 overexpression can reduce the TNF- $\alpha$ -dependent apoptotic death through its interaction with pro-apoptotic proteins (such as cytochrome c and Bid). To accomplish this goal, we induced Hsp27 expression by heat shock and immediately after we, stimulated chondrocytes with TNF- $\alpha$ . An *ex vivo* model was selected for this study. Osteochondral explants treated with TNF- $\alpha$  showed a very scarce response to the apoptotic stimulus induced by TNF- $\alpha$ , probably due to their maintenance within the extracellular matrix. Our results also showed a constitutive expression of pro-apoptotic proteins, while a stress-dependent differential expression for Hsp27 was detected in the three different cartilage zones. Our results suggest that Hsp27 might be interacting with the evaluated pro-apoptotic proteins.

# Introducción

## Generalidades

La Osteoartritis (OA) es una enfermedad crónico-degenerativa de las articulaciones diartroidales y representa la enfermedad reumática más común en la población general a nivel mundial. Su prevalencia aumenta con la edad y es una de las principales causas de dolor articular y discapacidad de la población adulta (Burgos-Vargas et al., 2014). Se estima que el 9.6% de los hombres y el 18% de las mujeres mayores de 60 años de la población mundial presentan OA sintomática (Musumeci et al., 2015); de acuerdo con el informe mundial de la discapacidad de 2011 de la OMS y el Banco Mundial, se estima una prevalencia de 43.4 millones de personas con discapacidad de moderada a grave asociada con la OA y se espera que para el 2020 sea la cuarta causa de discapacidad (Courties and Sellam, 2016, Officer and Posarac, 2011). De acuerdo con Los Centro de Control de Enfermedades (CDC, del inglés Centres for Disease Control and Prevention), en Estados Unidos de Norteamérica, existen alrededor de 30 millones de personas con esta enfermedad (CDC, 2017), en tanto que en México, un estudio realizado en 2011 por el Grupo de Estudios Epidemiológico de Enfermedades Músculo Articulares (GEEMA), reporta una prevalencia en la población general mexicana de 10.5%, lo que representa alrededor de 12 millones de personas (Pelaez-Ballestas et al., 2011). Se espera que su frecuencia siga elevándose debido al envejecimiento de la población, que de acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas, está a punto de convertirse en una de las transformaciones sociales más significativas del siglo XXI (ONU, 2017); el reto principal del envejecimiento demográfico radica en la necesidad de implementar políticas públicas referentes a los servicios de salud, dado que habrá una demanda creciente de atención por enfermedades crónico degenerativas, como la OA.

## Cartílago articular

A la fecha, el tratamiento de la OA continúa siendo un reto y el entendimiento de sus factores de riesgo y su fisiopatología continúan evolucionando (Martel-Pelletier et al., 2016). La OA se considera la etapa final de la falla articular que puede ser desencadenada y perpetuada por numerosos factores causales (Kapoor et al., 2011), dentro de los cuales la edad es el de mayor importancia, pero también se reconoce al género, inestabilidad articular, traumatismos, antecedentes familiares de OA (que corresponde al componente genético), obesidad y síndrome metabólico (Rillo et al., 2016, Blalock et al., 2015, Courties and Sellam, 2016) entre otros. De acuerdo con este acercamiento, pueden existir subtipos de la enfermedad, cada uno con predominio de características bioquímicas, inflamatorias o genéticas, pero que convergen finalmente en un fenotipo común (Kapoor et al., 2011), en donde, al tratarse de una enfermedad de toda la articulación, podemos encontrar: inflamación de la membrana sinovial, hipertrofia ósea, formación de osteofitos, aumento en el espesor del hueso subcondral y alteraciones en los ligamentos y meniscos, pero cuya característica principal es la degradación progresiva del cartílago articular (Alshami, 2014).

El cartílago articular es un tejido conectivo especializado hialino, sin terminaciones nerviosas, vasos sanguíneos ni vasos linfáticos, constituido por una matriz extracelular (MEC) densa con una distribución escasa de células altamente especializadas llamadas condrocitos (Sophia Fox et al., 2009).

El cartílago se caracteriza por proporcionar escasa fricción; frecuentemente se le describe como un “amortiguador esponjoso” que protege a la articulación de las cargas de impacto. Estas propiedades

mecánicas únicas del cartílago se atribuyen a la interacción de la fase fluida, compuesta por el líquido sinovial y el líquido intersticial con la fase sólida del tejido (Boettcher et al., 2016), es decir, que las propiedades físico mecánicas del cartílago articular están determinadas por su MEC, compuesta por una red de colágena (colágena II, IX y XI) y proteoglicanos (principalmente agregán) (Madry et al., 2012). Al agregán se encuentran unidas covalentemente cadenas laterales de glicosaminoglicanos con carga negativa, y de manera no covalente al ácido hialurónico; Los proteoglicanos son los responsables de la resistencia a la compresión y de la elasticidad debido a su capacidad de absorber agua (Goldring and Goldring, 2016, Madry et al., 2012). Por otro lado, el colágeno tipo II forma una red organizada que atrapa los agregados de proteoglicanos cargados negativamente, por lo que se encarga de la resistencia a la tensión y de mantener el volumen (Madry et al., 2012). Durante el movimiento de las articulaciones se generan fuerzas de carga, por lo que, una gran cantidad de moléculas de agua que se encuentran asociadas con las cadenas hidrofílicas laterales de glicosaminoglicanos y los solutos pequeños, son extruidos fuera de la matriz del cartílago. Cuando se libera la carga, los proteoglicanos tienen la carga fija suficiente como para reabsorber osmóticamente el agua y los solutos pequeños dentro de la matriz, lo que resulta en la restauración de las dimensiones originales del cartílago (Boettcher et al., 2016, Goldring and Goldring, 2016).

Esta compleja organización estructural y funcional del cartílago articular se mantiene en los organismos adultos por la actividad de los condrocitos, únicas células presentes en el cartílago articular (O'Connor et al., 2014). Los condrocitos maduros son células predominantemente redondeadas, con un diámetro promedio de 13  $\mu\text{m}$ ,

que se encuentran en cavidades de la MEC llamadas lagunas. Estas células representan alrededor del 5 al 10% del volumen total del cartílago y son cruciales para el mantenimiento de la MEC (Lin et al., 2006). Por lo tanto, el cartílago depende de la actividad metabólica normal, la homeostasis, así como de la supervivencia de los condrocitos; por lo que puede concluirse, que la supervivencia de los condrocitos es esencial para el funcionamiento normal del cartílago articular (Mobasher, 2002).

### Cambios en la unidad osteocondral durante la patogénesis de la osteoartritis

El biocompuesto formado por el cartílago articular, el hueso subcondral y el cartílago calcificado, se conoce como la unidad osteocondral (Goldring and Goldring, 2016) en donde el hueso subcondral y el cartílago son estructuras dinámicas de soporte de carga (Sharma et al., 2013). Es importante recordar que la OA se caracteriza por una remodelación anormal del cartílago y el hueso, que afecta no solo a la estructura sino también a la composición (Jurynek et al., 2018, Martel-Pelletier et al., 2016). Inicialmente, aparecen fibrilaciones superficiales en el cartílago y a medida que el proceso patológico continúa, se desarrollan fisuras profundas asociadas con la formación de fragmentos de cartílago, lo que conduce finalmente a la delaminación y exposición del cartílago calcificado subyacente y finalmente, del hueso. Estos cambios se acompañan de la expansión de la zona del cartílago calcificado mediante un proceso de osificación endocondral del cartílago articular suprayacente (Burr, 2004). Conforme la enfermedad progresa, la cantidad de proteoglicanos disminuye así como la capacidad del cartílago de absorber agua, por lo que, cualquier fuerza de carga que se genere,

debe ser soportada por la fase sólida del cartílago y no por la fase líquida (líquido sinovial/líquido intersticial) como ocurre en condiciones normales (Boettcher et al., 2016, Martel-Pelletier et al., 2016). La merma de glicosaminoglicanos, es seguida por la erosión de la red de colágeno, éste fenómeno determina la progresión irreversible del proceso degenerativo (Golding, 2012, Little et al., 2009, Martel-Pelletier et al., 2016). La destrucción de la MEC es mediada por la acción enzimática de las metaloproteinasas de la matriz (MMPs-2, -3, -13) y de las agreganasas (ADAMTs-4 y -5) que son inducidas por citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Kapoor et al., 2011, Little et al., 2009, Martel-Pelletier et al., 2016). La hipocelularidad asociada a estos fenómenos, corresponde a un aumento en la muerte de los condrocitos (Grossin et al., 2006, Martel-Pelletier et al., 2016). Esto ha llevado a considerar a la muerte celular programada como una característica central de la degradación de cartílago en OA (Grossin et al., 2006). La muerte celular programada en el cartílago de pacientes con OA fue descrita por primera vez por nuestro grupo (Kouri et al., 1997) y después validada en otros trabajos (Blanco et al., 1998, Hashimoto et al., 1998). Esto ha permitido postular la hipótesis de activación y “transdiferenciación” del condrocito (Kouri and Lavallo, 2006), la cual propone, que al recibir señales nocivas, los condrocitos normales sufren cambios morfo-funcionales para convertirse en condrocitos con capacidad reparativa. Sin embargo, al continuar las señales nocivas, los condrocitos desencadenan su proceso de muerte, que de acuerdo a los estudios realizados por nuestro grupo, involucra una combinación de apoptosis y autofagia por lo que se ha denominado condroptosis (Roach et al., 2004).

## Apoptosis o muerte celular programada

De manera general, el proceso de muerte de los condrocitos puede ser desencadenado a través de las dos vías principales de la apoptosis; la vía extrínseca o mediada por receptor y la vía intrínseca o mitocondrial. La vía extrínseca o mediada por receptor es iniciada por la unión del ligando correspondiente a un miembro de la superfamilia de receptores de TNF, que promueven la formación de complejos de señalización inductores de muerte (como el Death-Inducing Signaling Complex o DISC), y reclutan y activan a las caspasas 8 o 10, que una vez activadas, son capaces de activar de manera directa a las caspasas efectoras como la caspasa 3 (Chowdhury et al., 2008) o bien interactuar con la vía intrínseca a través de Bid (un miembro de la familia de proteínas Bcl-2) que junto con otros integrantes de la familia Bcl-2 promueven la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria (Tait and Green, 2010). En el caso de la vía intrínseca o mitocondrial, ésta se desencadena en respuesta a diversos estímulos como el daño citotóxico, el estrés oxidativo, el estrés del retículo endoplásmico o el daño al DNA (Chowdhury et al., 2008), que también inducen la permeabilización de la membrana externa mitocondrial con la consecuente liberación de moléculas pro-apoptóticas como el citocromo c hacia el citosol. El citocromo c se acopla con Apaf-1 para dar lugar a la formación de un complejo conocido como apoptosoma que es capaz de reclutar y activar a la caspasa 9 (Hengartner, 2000), que al igual que las caspasas 8 y 10, converge en la activación de las caspasas 3, 6 y 7 conocidas como caspasas efectoras (Shi, 2004).

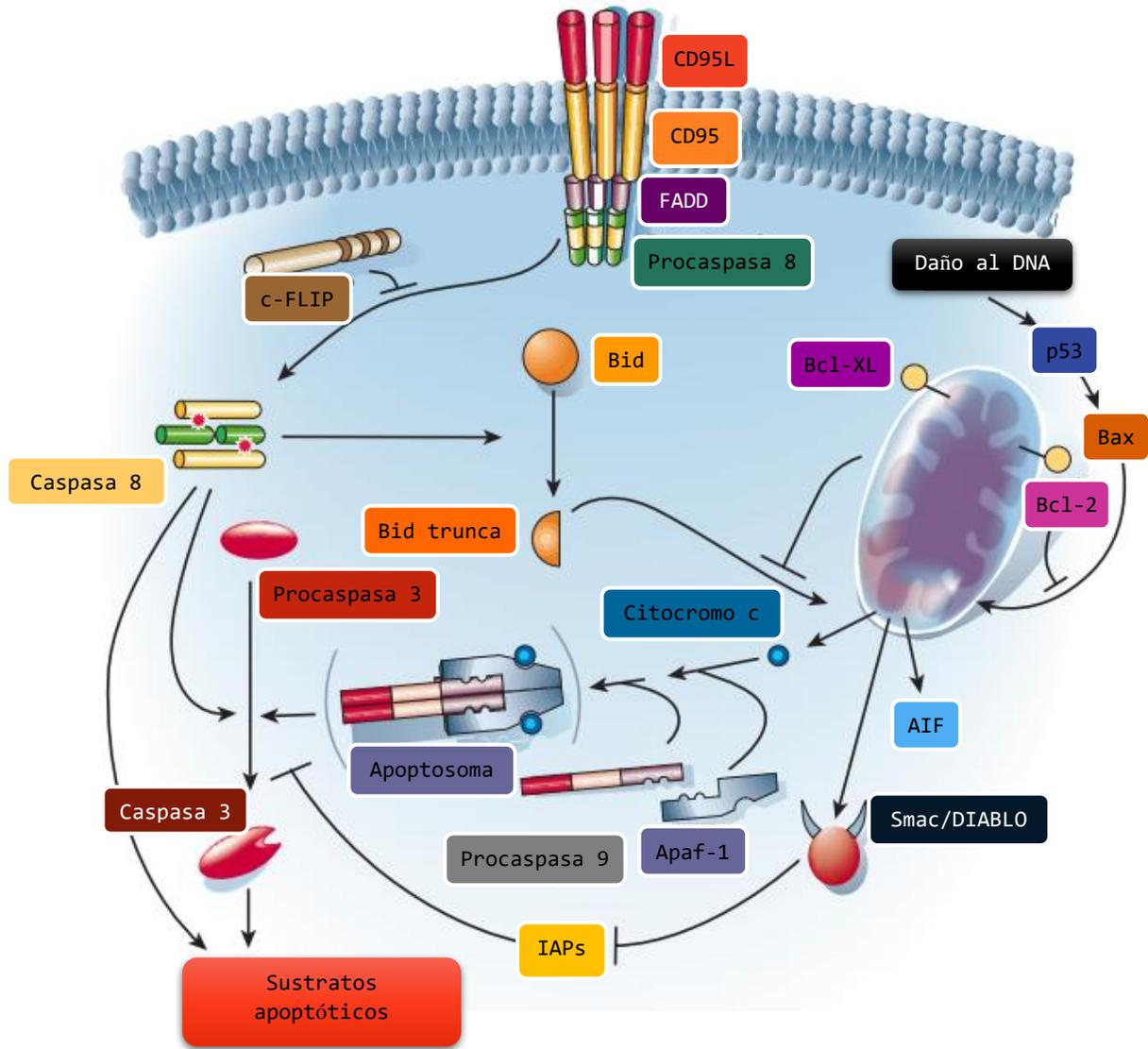


Figura 1 Vía Intrínseca y vía extrínseca. La vía extrínseca depende de la unión de un ligando a su receptor correspondiente, perteneciente a la superfamilia de receptores de TNF $\alpha$ , mientras que la vía mitocondrial puede iniciarse por diversos estímulos. Tomada y modificada de: (Hengartner, 2000)

Existen diversos mecanismos moleculares de los que se dispone para regular el proceso de muerte celular, como la familia de proteínas Bcl-2 que evitan la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. De esta familia, las proteínas anti-apoptóticas más representativas son Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w y Mcl-1 (Kuwana and Newmeyer, 2003). Además de estas moléculas

antiapoptóticas consideradas clásicas, las proteínas de choque térmico o Hsps desempeñan un papel regulatorio en el proceso apoptótico (Mehlen et al., 1996, Takayama et al., 2003).

### Proteínas de choque térmico

La respuesta en expresión génica al choque térmico fue descrita en 1966, a través de cambios en los “puffing patterns” en los cromosomas de las glándulas salivales de *Drosophila buskii* en respuesta a un choque térmico (Ritossa, 1962). Sin embargo, la mayor parte de los miembros de esta familia de proteínas son expresados de manera constitutiva y abundante en ausencia de cualquier tipo de estrés y se ha demostrado que son esenciales para la viabilidad celular bajo condiciones normales de crecimiento (Gething and Sambrook, 1992). Los papeles que desempeñan las Hsps en la función celular son diversos e incluyen la modulación de la actividad de una proteína blanco, promueven el ensamblaje y/o desensamblado de complejos multiprotéicos, regulan la degradación proteosomal de proteínas, facilitan la translocación de proteínas a través de las membranas de diferentes organelos y aseguran el plegado apropiado de las cadenas polipeptídicas nacientes durante la traducción de proteínas (Takayama et al., 2003). De hecho, muchos de los miembros de esta familia, incluyendo aquellos que no responden de manera significativa al choque térmico, son inducidos bajo otras condiciones de estrés cuyo denominador común es la acumulación de proteínas sin plegar o mal plegadas (Gething and Sambrook, 1992).

Con base en su masa molecular las Hsps se han clasificado en seis familias principales: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 y las proteínas pequeñas de choque térmico (sHsps). En el caso de éstas últimas su peso molecular se encuentra entre los 12-43 kDa y se caracterizan por la presencia de un tramo altamente conservado de

80-100 aminoácidos en su extremo C-terminal llamado “ $\alpha$ -crystallin domain” (ACD) que está flanqueado por un dominio menos conservado N-terminal y una extensión C-terminal. Algunos de los miembros de las sHsps, como Hsp27,  $\alpha$ A- y  $\alpha$ B-crystallin son capaces de formar grandes especies oligoméricas (Bakthisaran et al., 2015). El estado de autoagregación u oligomerización y el tamaño de los oligómeros formados, regula las propiedades funcionales de las sHsps, mientras que el tamaño de los oligómeros formados es regulado por fosforilación en residuos específicos de serina (Lelj-Garolla and Mauk, 2006). Además de sus funciones clásicas, se ha demostrado en varias líneas celulares que las Hsp70, Hsp90 y Hsp27 funcionan como reguladoras de la apoptosis.

El papel citoprotector de Hsp70 fue demostrado ante la inducción de apoptosis por óxido nítrico en cultivos primarios de condrocitos, en estos se evidenció una disminución de la forma activa de la caspasa 3 (Galois et al., 2004), ya que al unirse Hsp70 a Apaf-1 impide el reclutamiento y activación de la procaspasa-9 por el apoptosoma (Beere et al., 2000, Saleh et al., 2000). El efecto anti-apoptótico de Hsp90 se evaluó en varias líneas celulares, y se ha demostrado que es capaz de promover la supervivencia celular mediante la interacción directa con Akt inhibiendo su desfosforilación (Sato et al., 2000), e indirectamente al formar complejos Hsp90-Akt que inhiben la muerte celular mediada por JNK y la consiguiente inactivación de la cinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis (Ask1) (Zhang et al., 2005). La Hsp90 también puede modular la vía intrínseca ya que evita la formación del apoptosoma, mediante la inhibición de la oligomerización de Apaf1 (Pandey et al., 2000b). Sin embargo, cuando el estrés al que es sometida la célula es crónico y de alto nivel, la homeostasis que promueve Hsp90 se pierde; lo anterior fue demostrado en 2013 en un modelo de OA en

ratas en el que el estrés crónico y de alto grado fue inducido por carrera extenuante y en el cual, la administración oral de BIIB021, un inhibidor sintético de Hsp90, redujo la respuesta inflamatoria y fue capaz de prevenir el daño al cartílago (Siebelt et al., 2013).

### Proteínas pequeñas de choque térmico

En el genoma humano se han identificado 10 proteínas pequeñas de choque térmico por homología de secuencias y se han separado en 2 grupos a los que se adjudican funciones diferentes; en la clase I se encuentran Hsp27 (HspB1),  $\alpha\beta$ -cristalino (HspB4), Hsp20 (HspB6) y Hsp22 (HspB8), éstas proteínas son inducibles por calor y desempeñan un papel importante en la supervivencia celular bajo condiciones de estrés (Bakthisaran et al., 2015). El grupo de las Hsp de clase II incluye a HspB2, HspB3,  $\alpha$ A-cristalino, HspB7, HspB9 y HspB10, las cuales desempeñan un papel muy relevante en el desarrollo, diferenciación y en otras funciones específicas de cada tejido (Bakthisaran et al., 2015).

### Hsp27

Hsp27 o HspB1 es una verdadera proteína de choque térmico cuyo nivel de expresión es regulado a la alta cuando las células son expuestas a condiciones que alteran el plegado de proteínas, como es el caso del choque térmico (Arrigo, 2017). Hsp27 fue purificada y caracterizada en 1987-1988 (Arrigo et al., 1988, Arrigo and Welch, 1987). Es una chaperona molecular no-dependiente de ATP, cuyo papel principal consiste en atrapar y almacenar polipéptidos con un plegado inadecuado secundario a estrés, para evitar su agregación y facilitar su correcto plegamiento o bien, su degradación proteosomal (Arrigo, 2017). Sin embargo, sus funciones no se limitan a su actividad como chaperona, Hsp27 también está involucrada en la

estabilización del citoesqueleto, además de contar con propiedades antioxidantes y antiapoptóticas (Arrigo, 2017), mismas que se explicarán con mayor detalle a continuación.

Se han propuesto diferentes mecanismos responsables del papel citoprotector de Hsp27. Inicialmente se planteó que el papel citoprotector de Hsp27 ante el choque térmico, era complementario al de otras Hsps, como Hsp70 (Landry et al., 1989). De igual manera, se demostró que la actividad de Hsp27 como chaperona molecular desempeña un papel muy importante como inhibidor de la muerte inducida por especies reactivas de oxígeno, ya que aumenta el contenido celular de glutatión reducido (Preville et al., 1999). Además, se ha evaluado su papel protector ante la apoptosis no relacionada con los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno o de glutatión reducido. Ante el estrés metabólico generado por la merma de ATP, el papel de Hsp27 consiste en la inactivación de Bax, a través de la vía de señalización de fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K)-Akt (Havasi et al., 2008). En este trabajo, los autores propusieron que Hsp27 promueve la supervivencia celular al estabilizar el citoesqueleto, es decir, que actúa como una proteína de andamiaje que permite mantener la proximidad entre E-cadherina y PI3K en la membrana plasmática, lo que mantiene activa a Akt (Havasi et al., 2008). En el caso de la muerte celular mediada por ligando, para el estímulo apoptótico de TNF $\alpha$ , se propuso que el papel protector de Hsp27 depende de su actividad como chaperona molecular y por lo tanto de su capacidad de interactuar con proteínas mal plegadas u oxidadas evitando su agregación (Mehlen et al., 1995). En el proceso apoptótico inducido por Fas, el papel citoprotector de Hsp27 se demostró que consiste en la formación de dímeros fosforilados de ésta proteína que se asocian a Daxx, uno de los mediadores del proceso de muerte desencadenado por Fas, lo cual,

evita la interacción entre Daxx y la cinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis (Ask1) (Charette et al., 2000). No obstante, a pesar de que Daxx es un mediador importante de la vía apoptótica mediada por Fas, la interacción Hsp27-Daxx no puede explicar por completo la inhibición de la vía apoptótica inducida por Fas, por este motivo, se estudió el papel de Hsp27 ante el estímulo apoptótico de Fas/APO-1 en 6 líneas diferentes de cáncer de próstata (Hayashi. et al., 2012). La proteína de 15 kDa fosfoenriquecida en astrocitos (o PEA-15 por sus siglas en inglés) se une a ERK/MAPK o FADD dependiendo de su estado de fosforilación (Renganathan et al., 2005). La unión de PEA-15 con ERK inhibe su traslocación nuclear y por lo tanto, impide que realice su actividad de mitógeno, mientras que su unión a FADD inhibe la apoptosis inducida por Fas; éste cambio en la afinidad de unión de PEA-15 por ERK/MAPK o FADD dependiente del estado de fosforilación está regulado por la actividad de Akt (Hayashi. et al., 2012, Renganathan et al., 2005). En este sentido, se demostró que la asociación de Hsp27 con Akt lleva a la activación y estabilización de Akt, lo que a su vez resulta en la fosforilación de PEA-15 en la serina 116, cambiando la especificidad de PEA-15 de ERK a FADD (Hayashi. et al., 2012). Así mismo, se demostró que Hsp27 bloquea la escisión de Bid, miembro pro-apoptótico de la familia de Bcl2 que se re-localiza del citosol a la membrana externa de la mitocondria durante las fases iniciales del proceso apoptótico (Gahl et al., 2016); este mecanismo depende de los niveles de expresión de Hsp27 y probablemente se relaciona con la capacidad de ésta sHsp de evitar la destrucción de actina-F (Paul et al., 2002). También se demostró que Hsp27 contrarresta la activación de caspasa 9 como consecuencia de su interacción directa con citocromo c y mediante la inhibición de la salida de Smac/DIABLO de la mitocondria; ambos fenómenos regulan negativamente la formación del apoptosoma (Chauhan et al., 2003, Paul et al., 2002). De igual manera, se demostró que

interactúa directamente con procaspasa 3 e inhibe su escisión por caspasa 9 (Pandey et al., 2000a).

Todos estos resultados permiten proponer que Hsp27 establece múltiples estrategias para interferir con el proceso apoptótico a través de cambios específicos en su localización, estado de agregación y fosforilación, es decir que es capaz de adaptarse e interferir así a diferentes niveles de la vía apoptótica, desencadenada por diferentes vías de señalización río arriba de la fase efectora de la apoptosis (Gibert et al., 2012, Paul et al., 2010).

En el caso particular del cartílago articular, en un estudio realizado en cartílago de pacientes a los que se les realizó una artroplastia total de rodilla, se reportó la presencia de Hsp27 en mayor abundancia en condrocitos de zonas morfológicamente intactas comparadas con zonas de cartílago dañadas. Esta condición se detectó mediante análisis de la expresión diferencial tanto de mRNA como de proteína, y se demostró disminución en la expresión de Hsp27 en condrocitos osteoartríticos. Además, se demostró que Hsp27 es regulada negativamente en condrocitos articulares por las citocinas pro-inflamatoria IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  que juegan un papel catabólico fundamental en la patogénesis de la OA por lo que se propone a ésta sHsp como un nuevo regulador de la homeostasis de los condrocitos articulares (Lambrecht et al., 2010).

En la OA se observan alteraciones en la MEC que le hacen perder al cartílago articular sus propiedades biomecánicas necesarias para la función articular. A su vez, la integridad de la MEC es regulada por las únicas células residentes del cartílago, los condrocitos. Ya ha sido demostrado que la pérdida del cartílago articular se relaciona de manera directa con la hipocelularidad observada en OA

y que la disminución de células se debe a muerte celular programada, por lo que el estudio de proteínas como Hsp27 que juegan un papel sustancial en la regulación de los procesos apoptóticos y que recientemente se ha identificado como un nuevo regulador de la homeostasis en cartílago, resulta de gran importancia, ya que entender los mecanismos de la patogénesis de OA nos acerca a desarrollar terapias dirigidas a disminuir la sintomatología, pero principalmente, a modificar y finalmente frenar el progreso de la enfermedad.

## Justificación

La integridad del cartílago articular es mantenida por los condrocitos, únicas células residentes de este tejido. En la OA, disminuye el número de células del cartílago, lo que se relaciona directamente con la degradación progresiva del mismo.

La hipocelularidad observada se debe a eventos de muerte celular programada, por lo que el estudio de proteínas como Hsp27, que participa en la regulación negativa del proceso apoptótico y que se ha identificado como un regulador de la homeostasis del cartílago, permite profundizar en el entendimiento de la patogénesis de la OA y nos acerca al desarrollo de terapias dirigidas a modificar el progreso de la enfermedad.

## Hipótesis

Si Hsp27 es una proteína con capacidad anti-apoptótica, *La inducción de su expresión en cartílago contrarrestará el efecto apoptótico de TNF- $\alpha$* , al interactuar con las proteínas pro-apoptóticas inducidas por esta citocina tales como, citocromo c y Bid.

# Objetivos

## Objetivo general

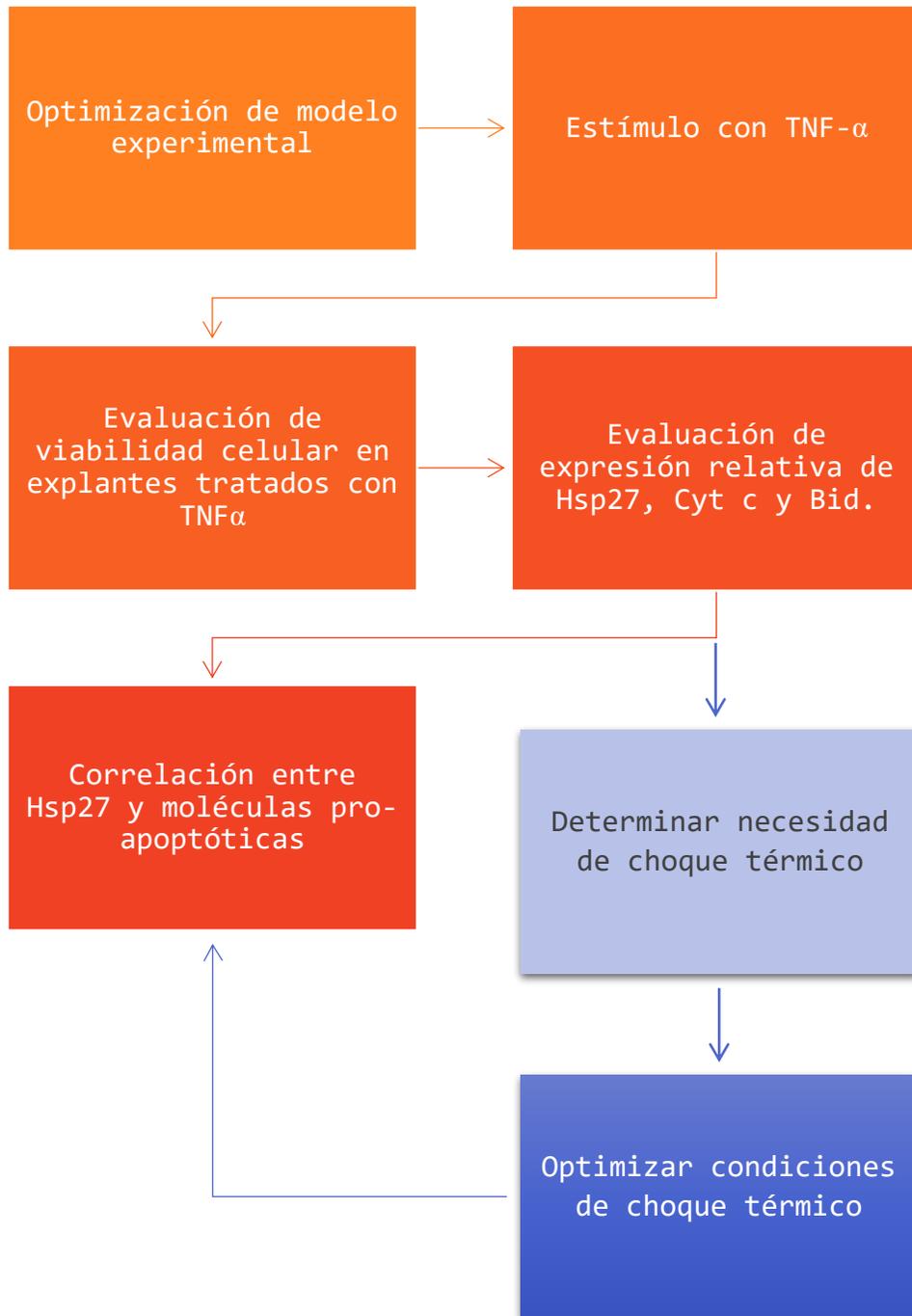
- 1. Determinar si la expresión de la proteína Hsp27 correlaciona con la muerte celular programada de los condrocitos inducida por TNF- $\alpha$  en un explante osteocondral.*
- 2. Determinar el efecto de TNF- $\alpha$  en el establecimiento de la apoptosis en condrocitos de explante osteocondral.*

## Objetivos específicos

1. Optimizar un cultivo de explante osteocondral.
2. Determinar los cambios en la expresión de las proteínas pro-apoptóticas: citocromo c y Bid inducidos por el tratamiento con TNF- $\alpha$ .
3. Determinar si es posible inducir la expresión de Hsp27 por choque térmico en el modelo de explante osteocondral.

# Desarrollo

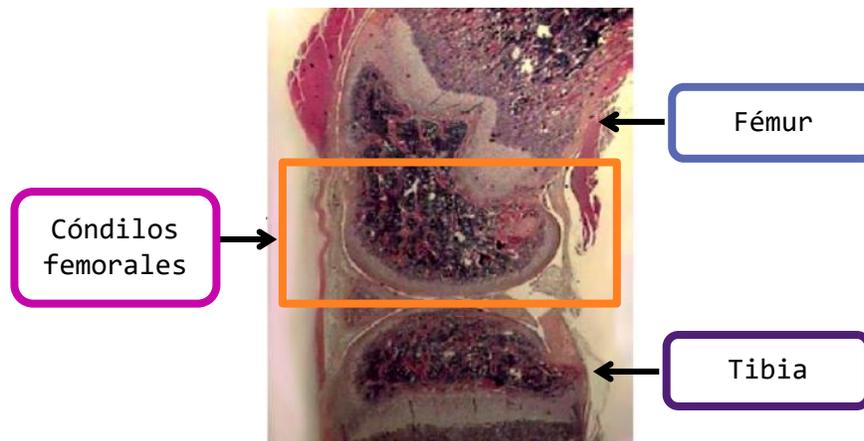
## Estrategia Experimental



## Materiales y Métodos

### Cultivo de explante osteocondral

Se utilizaron ratas Wistar macho de entre 130-150 gr de peso, los animales fueron proporcionados por la UPEAL para el protocolo No. 0002-12. Todos los animales fueron eutanizados dentro de las instalaciones de la UPEAL por dislocación cervical, inmediatamente después, se obtuvo la articulación de ambas rodillas con la capsula articular intacta. Bajo condiciones estériles, se realizó una capsulotomía para exponer las dos superficies óseas que conforman la articulación femorotibial. La superficie articular correspondiente al hueso femoral de la rata está compuesta por dos cóndilos, estos se disecaron y cada uno fue seccionado en 2 partes



*1 Corte Lateral de articulación femorotibial de rata. Se observan ambas superficies articulares; se disecó la parte correspondiente a los cóndilos femorales (color naranja). Modificado de: (Goebel et al., 2010)*

iguales, por lo que se obtuvieron 8 explantes de cada animal.

Los explantes se colocaron en cajas de cultivo de 96 pozos y se separaron en dos grupos principales, 24 y 48 horas, y en 4 subgrupos: sin tratamiento (control), TNF- $\alpha$  10 ng/ml, TNF- $\alpha$  50 ng/ml y TNF- $\alpha$  100 ng/ml. Antes de dar los tratamientos indicados para para grupo, se mantuvieron durante 48 horas en medio DMEM/F12 (Gibco by life

technologies) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco by life technologies), ácido ascórbico (SIGMA Aldrich) a 5 µm/ml y 1% de una solución de Antibiótico Antimicótico (PAA). Los explantes se mantuvieron en una incubadora en condiciones de cultivo estándar (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>). Una vez pasadas las 48 horas de recuperación, se cambiaron a medio DMEM/F12 sin suero fetal bovino con su respectiva concentración de TNF-α (Rat TNF-α, Cat. #400-14, PreproTech). En el grupo de 48 horas, se realizó un cambio de medio a las 24 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de cultivo, se realizaron 3 lavados con buffer de fosfatos (PBS) 1X estéril con pH de 7.2. Inmediatamente después, se fijaron con formaldehído al 4% de paraformaldehído (Kiernan and Kiernan, 2008) durante 3 horas a temperatura ambiente. Una vez concluido el tiempo de fijación, las muestras se lavaron 3 veces en PBS 1X frío, pH de 7.2, y se descalcificaron con EDTA al 0.5 M (Liu et al., 2017, Mori et al., 1965) durante 48 horas a 4°C con agitación. Para retirar los residuos de EDTA, nuevamente se realizaron 3 lavados con PBS 1X frío, pH de 7.2 y se colocaron en sacarosa al 10% durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, las muestras fueron embebidas en medio de congelamiento (Leica BIOSYSTEMS) para obtener criocortes de 8 µm de espesor en un criostato Leica CM1100.

#### Tinción con hematoxilina y Eosina

En los criocortes obtenidos se evaluó la celularidad e integridad de los componentes de la MEC mediante el análisis histológico cualitativo de hematoxilina-eosina, técnica en la que la Hematoxilina tiene un color púrpura intenso y tiñe a los ácidos nucleicos mediante una reacción compleja y poco entendida, mientras que la Eosina tiene un color rosa y tiñe a las proteínas de manera inespecífica, por lo que se obtiene un núcleo teñido de azul y la matriz extracelular con diferentes grados de tinción rosa (Fischer

et al., 2008). La descripción a detalle del protocolo utilizado se encuentra en el *Apéndice 1: Detalle de procedimientos*.

#### Índice de células apoptóticas por ensayo de TUNEL

Se realizó el ensayo de TUNEL para evaluar el efecto del tratamiento con TNF- $\alpha$  sobre la viabilidad de los condrocitos, para esto se utilizó el kit de Promega DeadEnd Fluorometric TUNEL system (Cat. #G3250) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ensayo de TUNEL está diseñado para detectar células apoptóticas que experimentan una degradación extensa de DNA durante las últimas etapas de la apoptosis (Kyrylkova et al., 2012), mediante la adición de una desoxiuridina biotinilada en los extremos romos 3' OH de las cadenas rotas de DNA de las células apoptóticas utilizando la enzima Desoxinucleotidil Transferasa Terminal (Tdt) sin la necesidad de una plantilla guía (Kyrylkova et al., 2012).

#### Inmunohistoquímica

##### 1) Caspasa 3

El efecto del estímulo con TNF- $\alpha$  también fue evaluado mediante la detección de caspasa 3 activa, la caspasa efectora principal de la vía apoptótica (Brentnall et al., 2013). La detección de caspasa 3 activa se realizó por inmunohistoquímica; se utilizó el kit VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit (Peroxidase, Rabbit IgG) (Cat. #PK-6101) y un anticuerpo policlonal de conejo anti-caspasa 3 (Merk Millipore, Cat. #AB3623) a una dilución de 1:80. El protocolo seguido para la técnica de inmunohistoquímica se encuentra descrito a detalle en el *Apéndice 1: Detalle de procedimientos*.

##### 2) Citocromo c y BID

Debido a que el modelo de explante osteocondral no es un modelo que se lleve a cabo dentro de nuestro laboratorio de manera rutinaria, fue necesario su estandarización. Como parte de esta se

evaluó el comportamiento de las moléculas pro-apoptóticas de interés: Citocromo c y Bid. Ambas se estudiaron por inmunohistoquímica. Citocromo c con el anticuerpo de cabra policlonal anti-Citocromo c (Santa Cruz, sc-8385) y Bid con el anticuerpo de cabra policlonal anti-BID (D-19) (Santa Cruz, sc-6291) ambas a una dilución de 1:80; para ambos se utilizó el VECTASTAIN® Elite ABC-Peroxidase Staining Kit (Goat IgG). El protocolo seguido para la técnica de inmunohistoquímica se encuentra descrito a detalle en el Anexo 2 de este documento.

#### Inmunofluorescencia

##### *Hsp27*

Los cambios en la expresión relativa de Hsp27 se evaluaron por inmunofluorescencia. Se utilizó el anticuerpo policlonal de cabra anti-Hsp27 (Santa Cruz, sc-1048) a una dilución de 1:100, como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti cabra acoplado a fluoresceína (FITC) (Jackson Immuno Research, Cat.705-095-147) a una dilución de 1:100; para marcar el núcleo se utilizó 2-(4-Aminofenil)-6-indol-carbamidina dihidrocloruro o DAPI (SIGMA, Cat. D9542-5MG), el reactivo se utilizó a una concentración de 1mg/ml, a una dilución final de 1:1000. DAPI se une a la curvatura menor de DNA, preferentemente en regiones ricas en adenina y timina (Chazotte, 2011). El protocolo utilizado para las inmunofluorescencias se encuentra a detalle en el *Apéndice 1: Detalle de procedimientos*.

#### Sobreexpresión de Hsp27 por choque térmico

Se obtuvieron explantes osteocondrales como se describió con anterioridad y se les permitió un tiempo igual de recuperación (48 horas con suero DMEN/F12 suplementado con suero fetal bovino al 10%, ácido Ascórbico y antibiótico antimicótico al 1% en condiciones de

cultivo estándar). Se probaron 2 temperaturas diferentes, 39°C y 41°C. Al momento de iniciar el choque térmico, los explantes fueron cambiados a medio DMEM/F12 suplementado fresco precalentado a la temperatura requerida (39°C o a 41°C), donde permanecieron durante 15 minutos. Pasado este tiempo, se retiraron de este medio y se cambiaron nuevamente a medio DMEM/F12 suplementado, donde se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar durante 1, 3 y 6 horas, para evaluar si existen cambios en la expresión relativa de Hsp27, fenómeno que ha sido reportado previamente (Bryantsev et al., 2007). Al finalizar los tiempos de recuperación, las muestras fueron procesadas como se describió en el apartado de cultivo osteocondral y se realizaron criocortes de 8 µm de espesor, sobre los cuales se realizó la inmunofluorescencia para detectar Hsp27. Se utilizó el anticuerpo policlonal de cabra anti-Hsp27 (Santa Cruz, sc-1048) a una dilución de 1:100, y la señal se reveló con el mismo anticuerpo secundario anti cabra asociado a FITC (Jackson Immuno Research, Cat. 705-095-147). La fluorescencia media corregida por área se obtuvo con el software ZEN lite y los resultados obtenidos se graficaron utilizando el software GraphPad Prism.

#### Obtención de imágenes

Los experimentos de histoquímica se observaron en un microscopio óptico LEICA DMLS acoplado a una cámara LEICA DFC320. Cada imagen se calibró con *Kodak No. 3 Calibrated Step Tablet*, escaneada con un escáner profesional Epson Expression 1680, esto con la finalidad de obtener las mediciones en densidades ópticas, que representa con mayor precisión los niveles relativos de la proteína en estudio (Rieux et al., 2002); la calibración se llevó a cabo con el software ImageJ y los resultados se graficaron utilizando el software GraphPad Prism.

En el caso de las imágenes de inmunofluorescencia, su análisis se realizó en un microscopio de epifluorescencia Zeiss AXIO Scope. A1 y la intensidad media de fluorescencia corregida por área, se obtuvo con el software ZEN lite. Los datos obtenidos se graficaron utilizando el software GraphPad Prism.

#### Análisis estadístico

Se llevaron a cabo tres experimentos independientes, cada uno de ellos con su respectivo duplicado interno; de los 6 cortes obtenidos en cada laminilla, se analizaron 3, dando al final una  $n$  de 27 para cada experimento.

De los valores obtenidos del procesamiento de imágenes se graficó la media y el error relativo; la significancia entre las medias de los diferentes tratamientos se analizó utilizando una ANOVA de 2 vías con una prueba de comparación múltiple de Bonferroni como post-test o bien con una ANOVA de medidas repetidas con el software GraphPad Prism 7. Los valores se consideraron significativos cuando se obtuvo una  $p < 0.05$ .

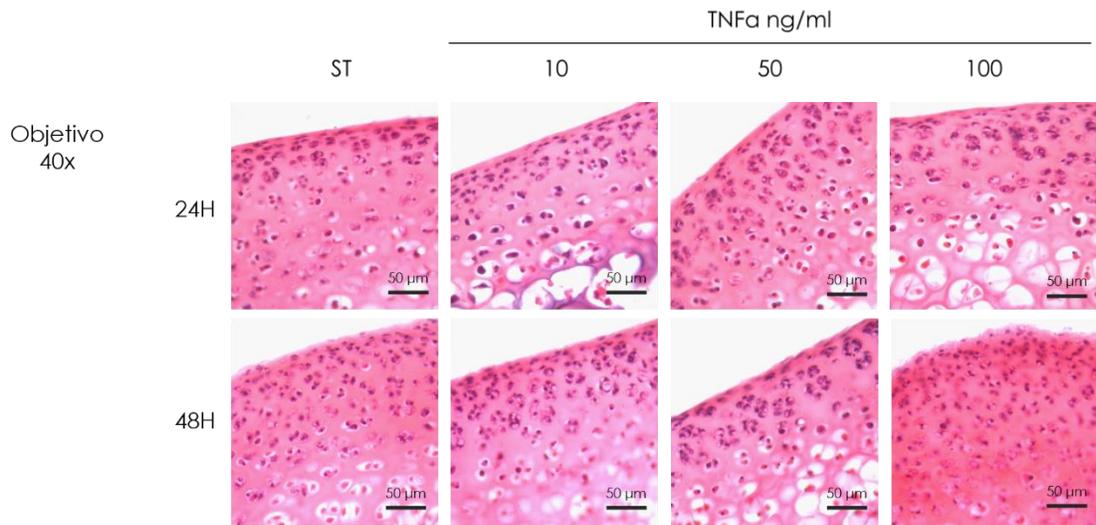
## Resultados

El cultivo de explante osteocondral, es un modelo de experimentación que no había sido utilizado en nuestro grupo de trabajo, por lo cual se estandarizó basándonos en reportes previos de cultivo de explante osteocondral bovino (Bian et al., 2008, Fick et al., 2014), humano (Fischer et al., 2000, Geurts et al., 2018) y rata (Appleton et al., 2010). Sobre este explante osteocondral, se ensayaron distintas dosis de TNF- $\alpha$  según lo reportado en otros trabajos (Carames et al., 2008, Fischer et al., 2000, Lopez-Armada et al., 2006, Webb et al., 1997).

### Tinción con Hematoxilina y Eosina

Una vez estandarizado el cultivo de explante osteocondral, se evaluó la integridad del tejido con las diferentes dosis utilizadas de TNF- $\alpha$  (0, 10, 50 y 100 ng/ml) tanto a las 24 horas como a las 48 horas utilizando la técnica de hematoxilina y eosina (HyE).

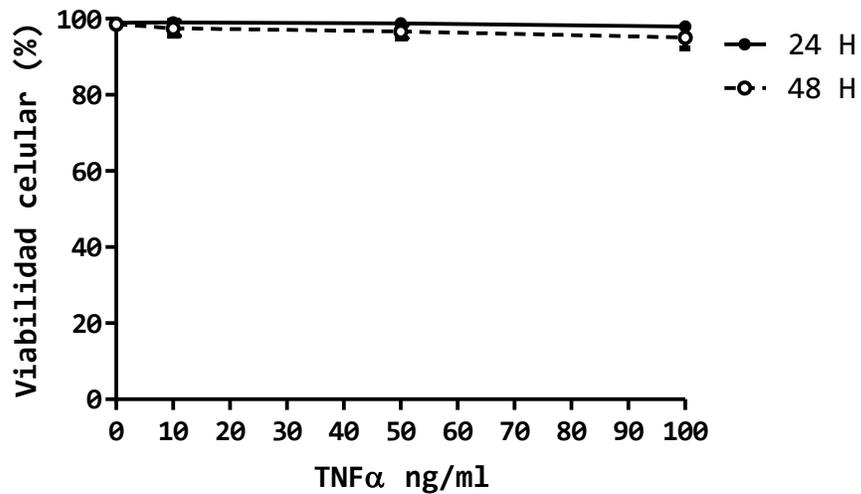
Como puede observarse en la Imagen 2, no se encontraron cambios significativos en la estructura del tejido durante las primeras 24 horas a ninguna de las dosis de TNF- $\alpha$  utilizadas, en comparación con la estructura de los tejidos no tratados (control ST). Tampoco se observaron cambios significativos a las dosis de 10 y 50 ng/ml a las 48 horas; sin embargo, a la dosis de 100 ng/ml de TNF- $\alpha$  se observa una disposición anormal de los condrocitos, desorganización que puede observarse en las 3 zonas del cartílago.



*Figura 2 Tinción con Hematoxilina y Eosina. Explantes osteocondrales cultivados durante 24 o 28 horas, se muestra control sin tratamiento (ST), y tres dosis de TNF- $\alpha$ , 10, 50 y 100 ng/ml. Fueron teñidos con HyE y visuealizados mediante microscopía óptica. Barra de escala= 50  $\mu$ m.*

Evaluación del efecto de TNF- $\alpha$  sobre la viabilidad de los condrocitos

Con la finalidad de encontrar la dosis de TNF- $\alpha$  en la que se indujera un cierto porcentaje de muerte celular de las células presentes, se decidió evaluar la viabilidad celular a las dosis propuestas de TNF- $\alpha$  (0, 10, 50 y 100 ng/ml) durante los dos tiempos evaluados mediante el método de TUNEL.



Gráfica 1 Viabilidad celular por ensayo de TUNEL. Se analizó la viabilidad de los condrocitos del cartílago mediante el ensayo de TUNEL. Se utilizó un análisis ANOVA de medidas repetidas con una prueba de comparación múltiple de Bonferroni como Post-test, se graficó en GraphPad Prism.

Como puede observarse en la gráfica 1, las dosis elegidas de TNF- $\alpha$  no afectan de manera significativa la viabilidad celular, cuando el estímulo se mantiene durante 24 y 48 horas.

A pesar de que no encontramos cambios en la viabilidad celular, para determinar si el estímulo de TNF- $\alpha$  producía muerte celular programada, decidimos analizar la presencia de caspasa 3 activa, lo que indicaría que se ha activado la vía apoptótica (Figura 3).

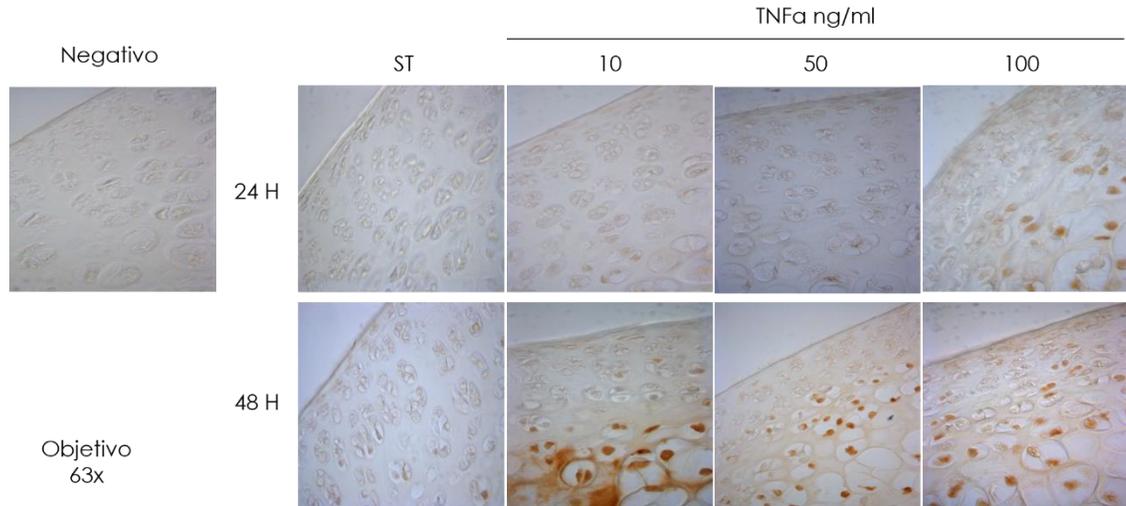


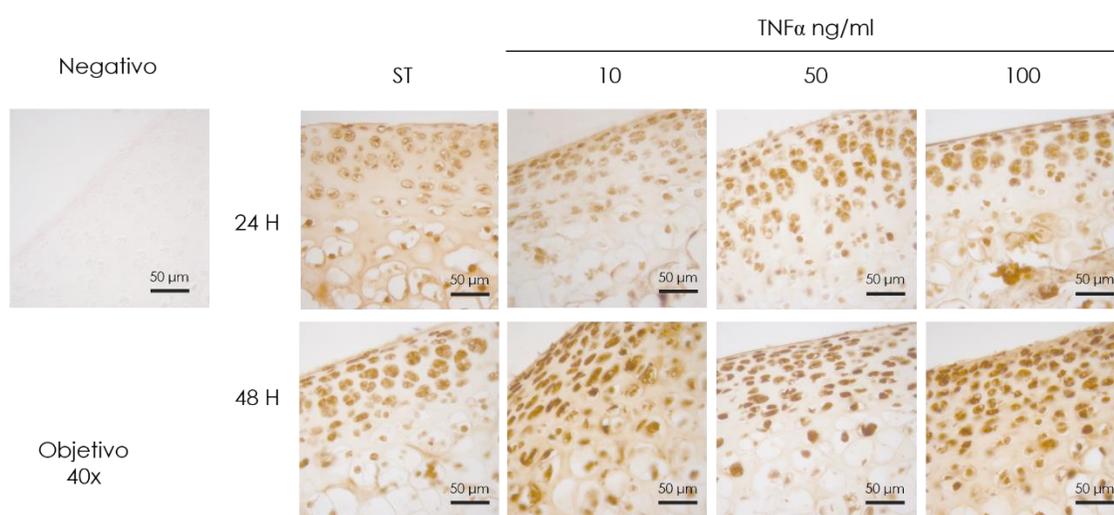
Figura 3 Inmunohistoquímica de caspasa 3 activa en explantes osteocondrales. Explantes osteocondrales mantenidos en cultivo durante 24 o 48 horas. Se muestran los controles (ST), y con tres dosis diferentes de TNF- $\alpha$ : 10, 50 y 100 ng/ml. Se incubaron con un anticuerpo anti-caspasa 3 activa y se revelaron con diaminobencidina, el precipitado de color café corresponde a la localización de la proteína. Las imágenes se obtuvieron por microscopía de Luz.

La presencia de caspasa 3 activa se detectó a las 24 horas en explantes tratados con dosis de 50 y 100 ng/ml de TNF- $\alpha$ , principalmente en la zona profunda del cartílago. En los explantes cultivados durante 48 horas se puede detectar caspasa 3 activa en los explantes tratados con de 10 ng/ml de TNF- $\alpha$ , nuevamente en la zona profunda del cartílago; sin embargo, a la dosis de 50 ng/ml de TNF- $\alpha$ , la marca se extiende a parte de la zona media, y en los explantes tratados con 50 ng/ml de TNF- $\alpha$  y, en los explantes tratados con 100 ng/ml de TNF- $\alpha$ , se detecta la presencia de caspasa 3 activa en la totalidad de la zona profunda, y de la zona media del cartílago e incluso en partes de la zona superficial (Figura 3).

La detección de caspasa 3 activa en algunas de las condiciones en las que los explantes se trataron con TNF- $\alpha$  sugería que los condrocitos estaban presentando apoptosis. Para corroborar esto, se decidió evaluar la existencia de cambios en la expresión relativa de otras proteínas pro-apoptóticas como Citocromo (Cyt c) y Bid mediante ensayos de

inmunohistoquímica. Así mismo, en estas condiciones quisimos determinar los niveles de Hsp27 mediante inmunofluorescencia indirecta.

Immunohistoquímica de Cyt c en explantes tratados con TNF- $\alpha$

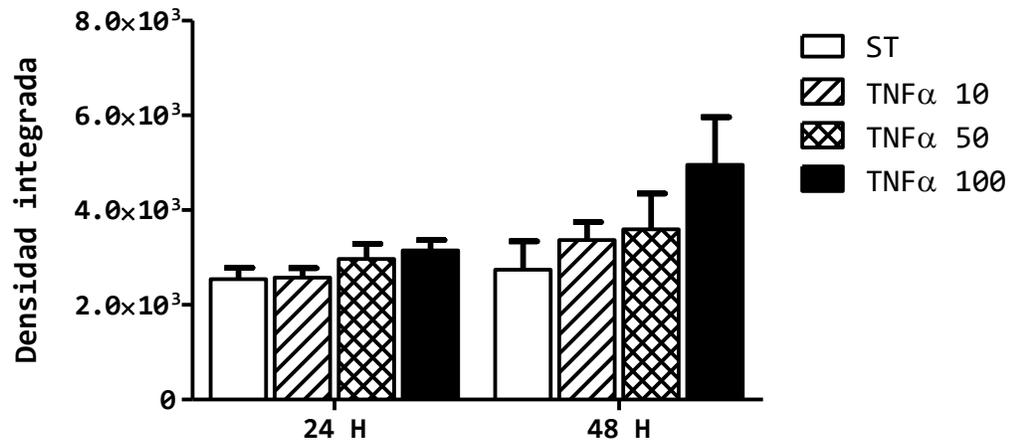


3 Immunohistoquímica de Cyt c de explantes osteocondrales en cultivo.

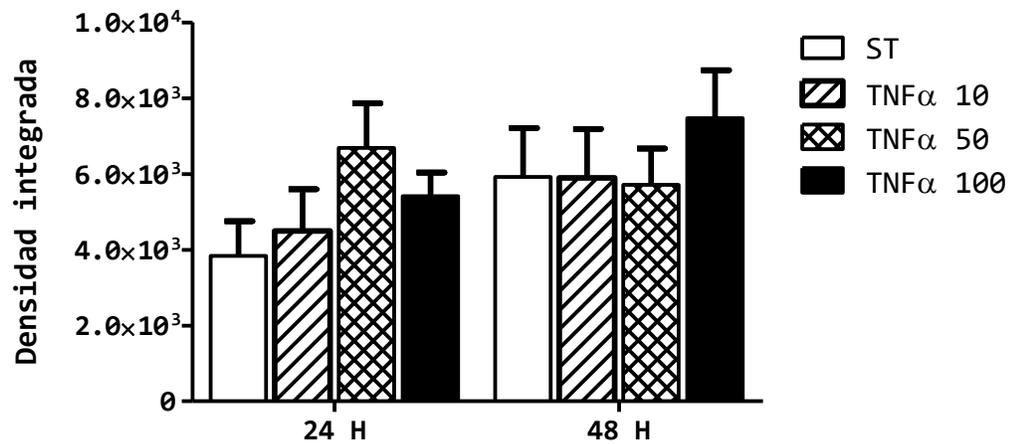
Como puede observarse en la (Figura 4), existe una expresión basal de Cyt c en el cartílago normal, sin embargo, se observa una mayor extensión de la marca en las 3 zonas del cartílago, así como mayor intensidad de la marca a medida que se incrementaron las dosis de TNF- $\alpha$  a las 24 horas. Estos cambios son aún más evidentes en los explantes que se mantuvieron en cultivo durante 48 horas. Por esta razón, se decidió evaluar por zonas la expresión relativa de la proteína mediante la densidad integrada de la imagen utilizando el software ImageJ, los valores obtenidos fueron graficados en el software GraphPad Prism utilizando una ANOVA de medidas repetidas (Figuras).

Análisis por zonas de la expresión relativa de Cyt c en explantes osteocondrales tratados con TNF- $\alpha$

1 Expresión relativa de Cyt c en zona superficial

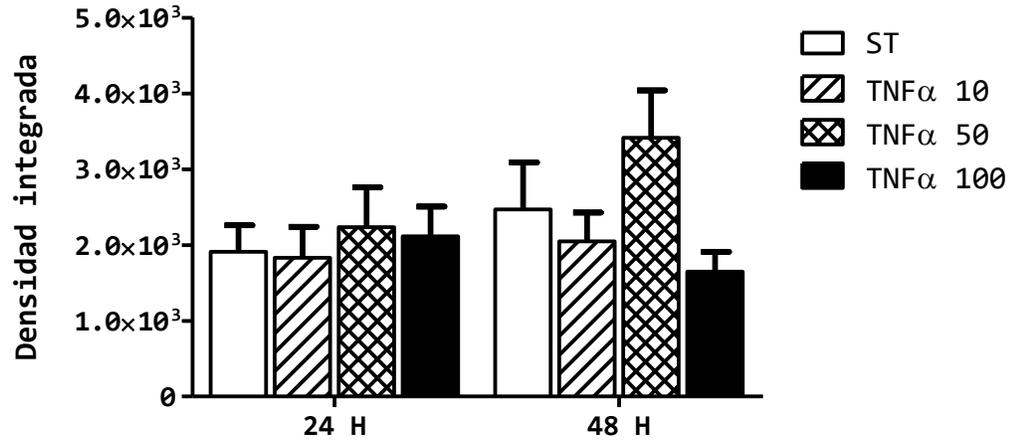


2 Expresión relativa de Cyt c en zona Media



ANOVA de medidas repetidas  
GraphPad Prism

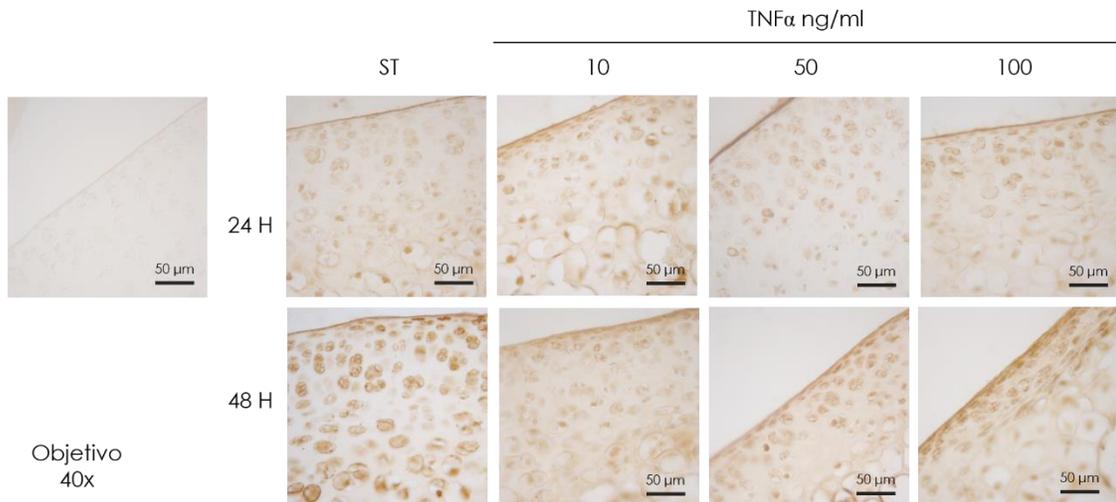
### 3 Expresión relativa de Cyt c en zona profunda



ANOVA de medidas repetidas  
GraphPad Prism

A pesar de la observación inicial, en la que se detecta una tendencia a aumentar la intensidad y las zonas de expresión de Cyt c, la expresión relativa de Cyt c en los explantes mantenidos a 24 o 48 horas no resultaron ser estadísticamente significativos en ninguna de las zonas analizadas con las distintas dosis de TNF- $\alpha$  evaluadas.

Inmunohistoquímica de Bid en explantes tratados con TNF- $\alpha$ s

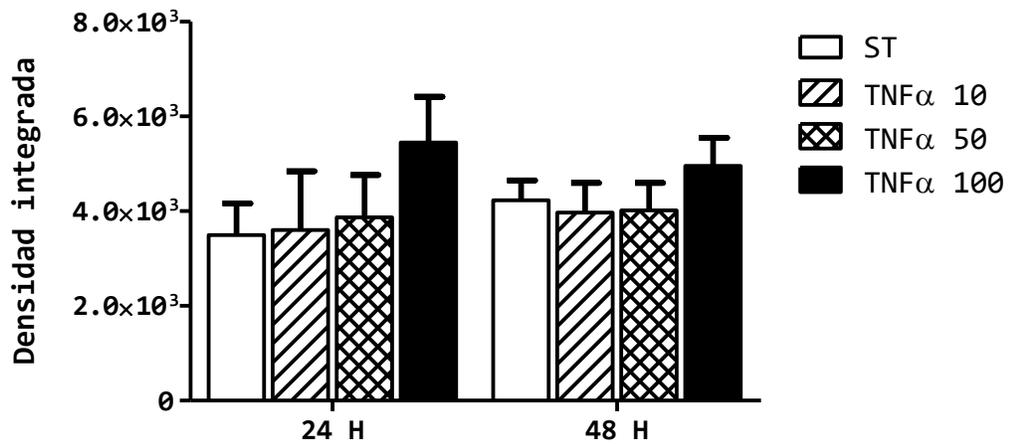


4 Inmunohistoquímica de Bid en explantes osteocondrales en cultivo.

Al igual que en la inmunohistoquímica de Cyt c, se observan cambios aparentes en la intensidad de la marca de Bid en los explantes tratados con las tres diferentes dosis de TNF- $\alpha$ , la cual, al igual que para Cyt c, parece ser dependiente de la dosis y del tiempo (Figura 5), por lo que también se evaluó la expresión relativa de esta proteína en cada zona del cartílago de acuerdo con los valores de densidad integrada obtenidos con el software ImageJ. Los valores obtenidos fueron graficados en el software GraphPad Prism utilizando una ANOVA de medidas repetidas.

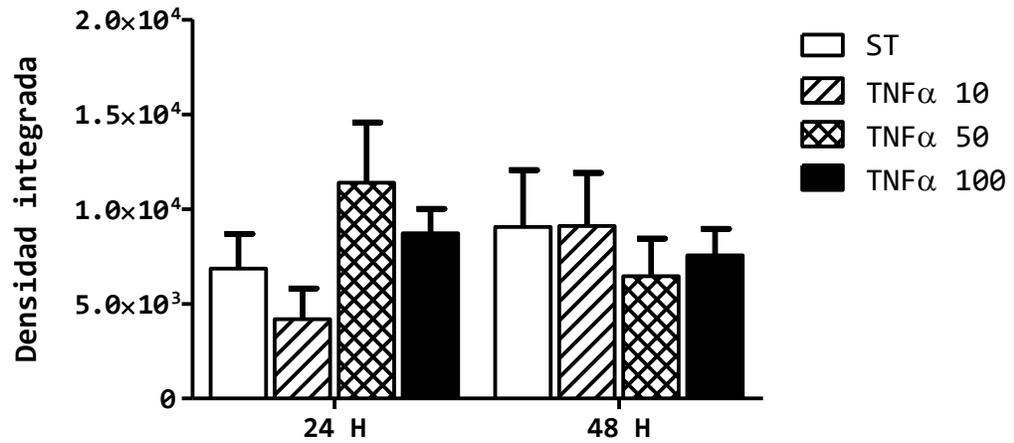
*Análisis por zonas de La expresión relativa de Bid en explantes osteocondrales tratados con TNF- $\alpha$*

4 Expresión relativa de Bid en zona superficial.

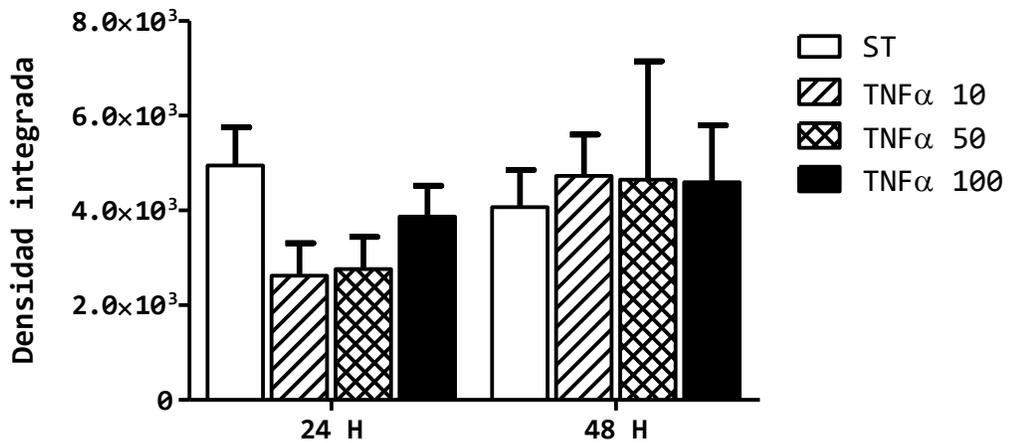


ANOVA de medidas repetidas  
GraphPad Prism

5 Expresión relativa de Bid en zona media.



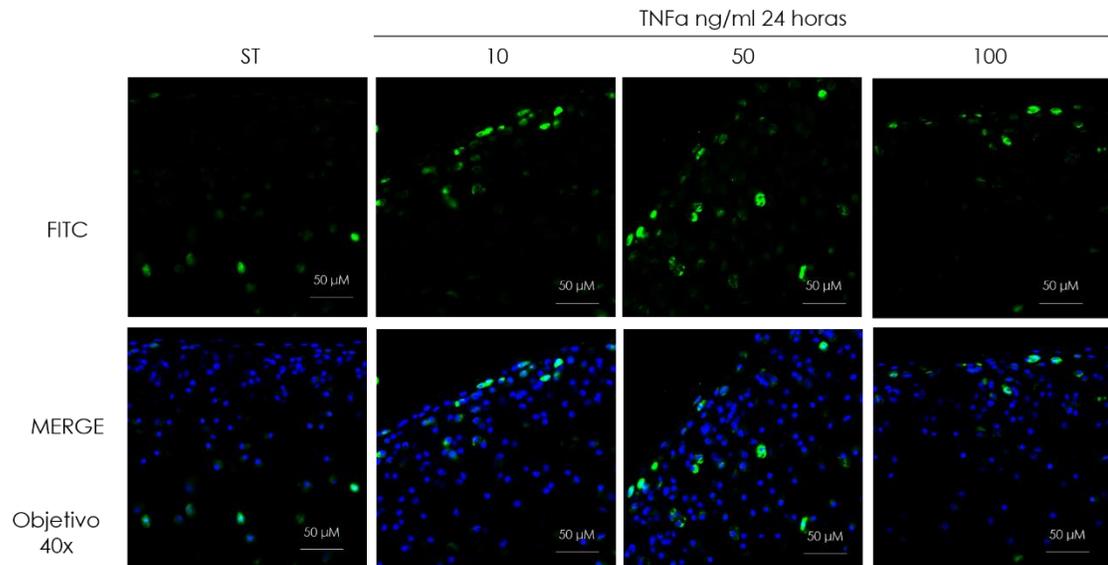
6 Expresión relativa de Bid en zona profunda.



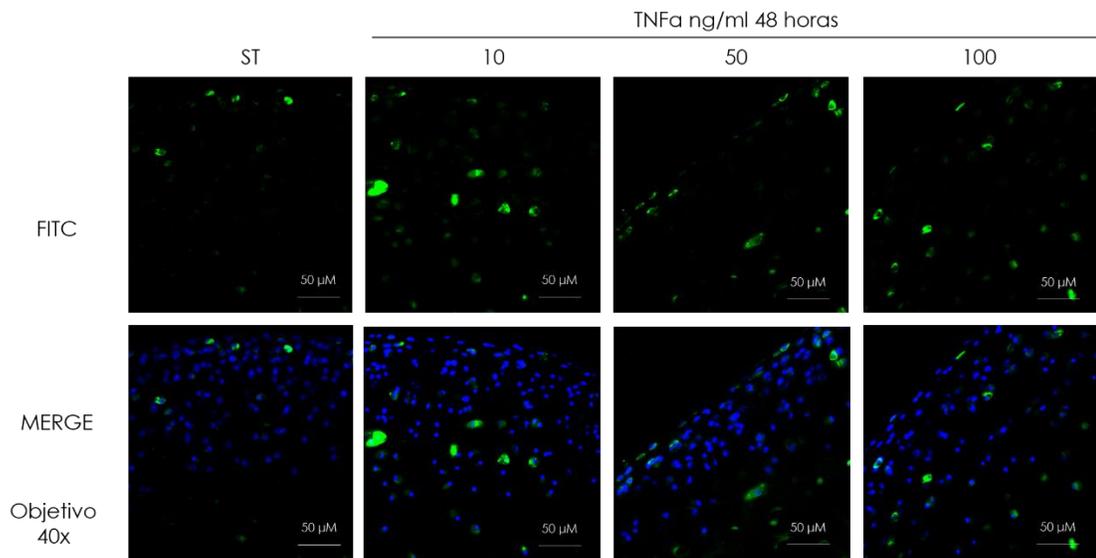
ANOVA de medidas repetidas  
GraphPad Prism

Al igual que en el análisis realizado para la expresión relativa de Cyt c en las tres zonas del cartílago, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas a 24 ni a 48 horas con ninguna de las dosis evaluadas.

Imunofluorescencia indirecta de Hsp27 en explantes tratados con TNF- $\alpha$



5 Inmunofluorescencia indirecta de Hsp27 en explantes osteocondrales en cultivo durante 24 horas.

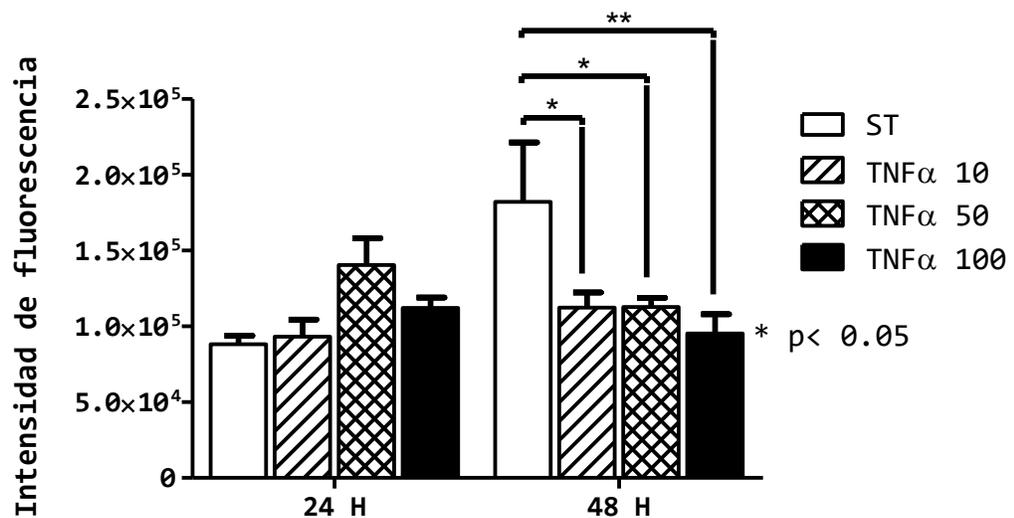


6 Inmunofluorescencia indirecta de Hsp27 en explantes osteocondrales en cultivo durante 48 horas.

Mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta, pudimos observar que existen cambios en la localización de la marca de Hsp27 en las células de los explantes tratados con TNF- $\alpha$  en comparación con las condiciones control (ST) (Figura 6). En el control sin tratamiento mantenido en cultivo durante 24 horas, la proteína se detecta en la zona profunda del cartílago, mientras que a las concentraciones de 10 y 50 ng/ml de TNF- $\alpha$ , Hsp27 se localiza hacia la superficie del cartílago. Cuando se utilizó la dosis de 100 ng/ml, se observó una disminución aparente en toda la región analizada (Figura 7). La cuantificación de la intensidad media de fluorescencia fue detectada con el software ZEN blue y graficada y analizada en GraphPad Prism utilizando una ANOVA de dos vías con una prueba de comparación múltiple de Bonferroni como post-test.

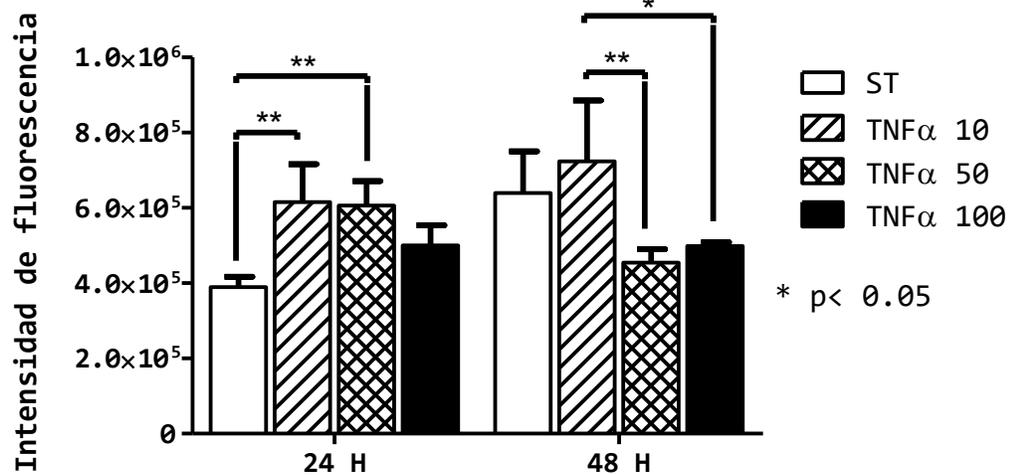
*Análisis por zonas de la expresión relativa de Hsp27 en explantes osteocondrales tratados con TNF- $\alpha$*

7 Intensidad de fluorescencia media en zona superficial Hsp27.



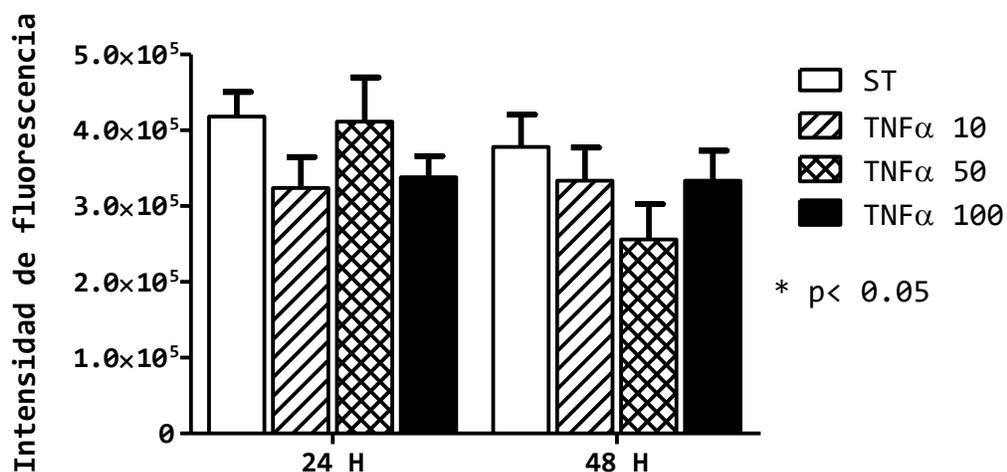
En la zona superficial no se encontraron cambios estadísticamente significativos en los explantes osteocondrales mantenidos en cultivo durante 24 horas; sin embargo, en el grupo que permaneció durante 48 horas, si se detectó una disminución estadísticamente significativa de la proteína Hsp27 con respecto al control sin tratamiento, la cual es particularmente significativa en los explantes tratados con 100 ng/ml de TNF- $\alpha$ .

8 Intensidad de fluorescencia media en zona media Hsp27.



En la zona media del cartílago, también se encontraron cambios estadísticamente significativos; a las 24 horas se encontró un aumento significativo en la detección de la proteína con dosis de 10 y 50 ng/ml de TNF- $\alpha$  con respecto al control sin tratamiento. En los explantes en los que el estímulo se mantuvo durante 48 horas, se encontró una regulación negativa en los explantes tratados con 50 y 100 ng/ml de TNF- $\alpha$ .

9 Intensidad de fluorescencia media en zona profunda Hsp27.

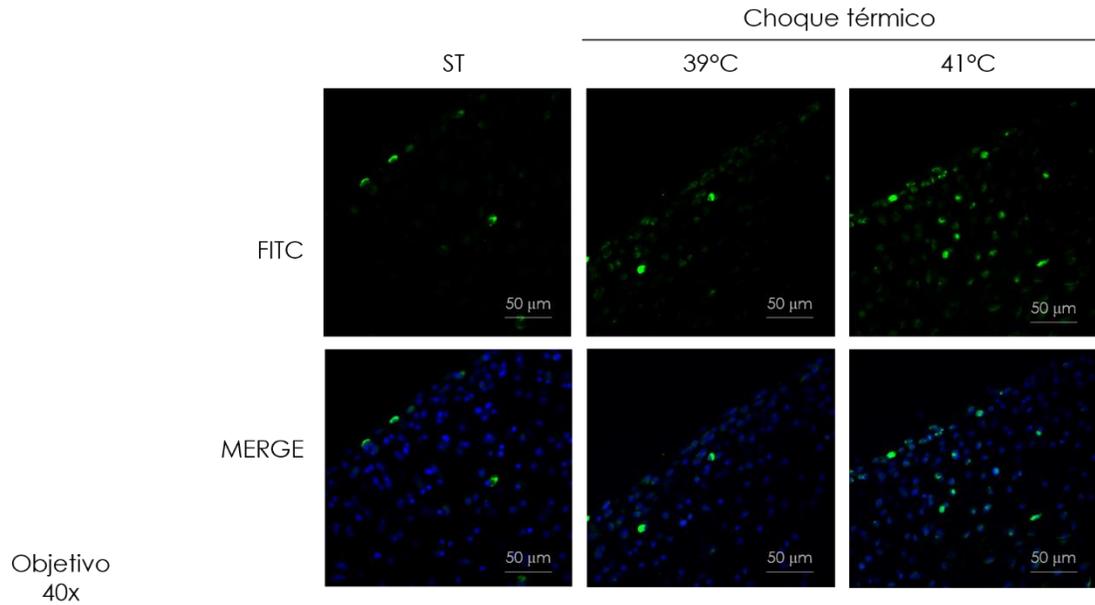


En la zona profunda no se encontraron cambios estadísticamente significativos en la detección de Hsp27 en ninguno de los 2 tiempos evaluados con ninguna de las dosis evaluadas de TNF- $\alpha$ .

Una vez que se conoció el comportamiento de las proteínas de interés en el modelo de explante osteocondral, se decidió realizar experimentos de choque térmico con la finalidad de inducir la expresión de Hsp27.

Para probar las condiciones de choque térmico en los explantes de cartílago, se evaluaron 2 temperaturas diferentes: de 39°C y 41°C durante 15 minutos y posteriormente, se dejaron recuperar en condiciones de 37°C por 1, 3 y 6 horas en condiciones de cultivo estándar antes de su procesamiento para el análisis de la expresión de la proteína Hsp27 mediante inmunofluorescencia indirecta.

## Inmunofluorescencia indirecta de Hsp27 en explantes sometidos a choque térmico

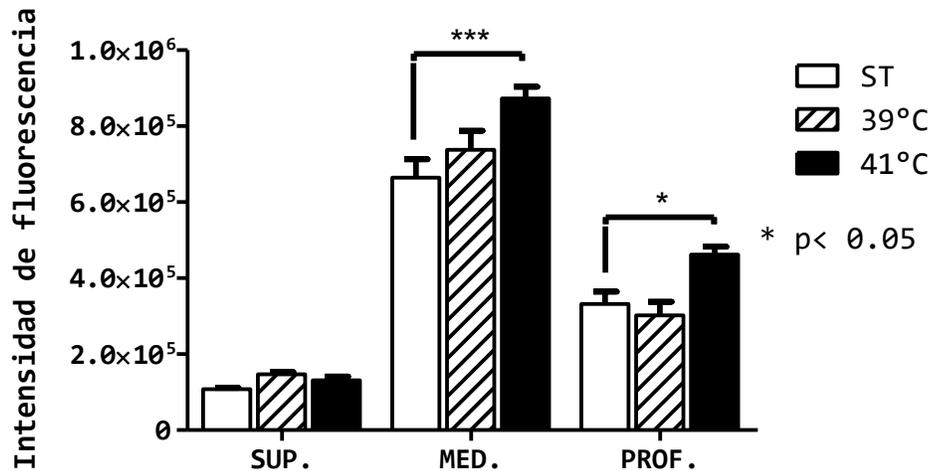


*7 Inmunofluorescencia indirecta para Hsp27 en explantes osteocondrales sometidos a choque térmico con 1 hora de recuperación*

Nuevamente se observó que una expresión relativa de la proteína en forma diferencial en las diferentes zonas del cartílago; los datos obtenidos de fluorescencia media obtenidos con el software ZEN blue se graficaron en GraphPad Prism y se analizaron utilizando una ANOVA de 2 vías con una prueba de comparación múltiple de Bonferroni como Post-test.

Análisis por zonas de la expresión relativa de Hsp27 en explantes osteocondrales sometidos a choque térmico con un periodo de recuperación de 1 hora.

10 Intensidad de fluorescencia media para Hsp27 en explantes osteocondrales con 1 hora de recuperación del choque térmico.



En los explantes que se sometieron al choque térmico a 41°C con una hora de recuperación, se encontró un aumento estadísticamente significativo en la expresión relativa de Hsp27 en la zona media y profunda a los que se les permitió una hora de recuperación después de haber sido sometidos al choque térmico, se encontró un aumento estadísticamente significativo en la expresión relativa de Hsp27 en la zona media y profunda de los explantes que fueron sometidos a choque térmico a una temperatura de 41°C.

## Discusión

La osteoartritis (OA) es una enfermedad musculoesquelética que afecta al 9.6% de los hombres y al 18% de más mujeres con más de 60 años de la población mundial (Musumeci et al., 2015). Actualmente representa la sexta causa de discapacidad y su relevancia epidemiológica aumenta al considerar el envejecimiento de la población al que nos enfrentaremos en los próximos años (ONU, 2017). Es una enfermedad que afecta a toda la articulación, cuya característica principal consiste en la degradación lenta y progresiva del cartílago articular (Alshami, 2014).

El cartílago articular normal está conformado por una matriz extracelular (MEC) densa que proporciona una superficie casi sin fricción encargada de absorber y distribuir las fuerzas que se generan durante el movimiento y la carga de las articulaciones (Martel-Pelletier et al., 2016).

Dentro de la matriz se encuentran distribuidas de forma escasa los condrocitos, que son las únicas células residentes del cartílago y, por lo tanto, los únicos responsables de mantener las propiedades biomecánicas del cartílago articular. Por este motivo, la muerte celular programada de los condrocitos se considera una característica central de la degradación del cartílago en la OA (Grossin et al., 2006), cuyo mecanismo de muerte, conocido como condroptosis, es desencadenado por citocinas proinflamatorias, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Estas citocinas, desempeñan el rol más importante en la severidad de la enfermedad (Kim et al., 2018), por lo que existe un creciente interés en el papel que la respuesta inflamatoria, local o sistémica, pueda tener en el desarrollo de la OA (Jurynek et al., 2018).

Dentro de esta compleja señalización que existe entre los distintos tejidos que componen la articulación y sus mediadores proinflamatorios, se encuentran proteínas como Hsp27, que se ha propuesto como un mediador clave de la homeostasis del cartílago (Lambrecht et al., 2010).

El modelo utilizado en este trabajo (cultivo de explante osteocondral), permite crear un microambiente lo más cercano posible a las condiciones *in vivo*, manteniendo la arquitectura normal del tejido, las interacciones de éste con su MEC, aunque bajo condiciones más controladas (Fischer et al., 2000). De igual manera, se decidió utilizar a TNF- $\alpha$  como inductor de muerte por ser una de las principales citocinas involucradas en el desarrollo de la OA (Fischer et al., 2000, Kapoor et al., 2011, Kim et al., 2018), a las concentraciones utilizadas con mayor frecuencia, y que se ha demostrado, son capaces de afectar la homeostasis de los condrocitos en cultivos primarios en monocapa (Carames et al., 2008, Fischer et al., 2000, Lopez-Armada et al., 2006, Webb et al., 1997).

En nuestro modelo, se encontró una respuesta leve ante el estímulo con TNF- $\alpha$  que se reflejó en la ausencia de alteraciones estructurales importantes, así como en el bajo índice de células apoptóticas detectadas por el ensayo de TUNEL (7.6%). La escasa respuesta, es atribuible a la interacción de los condrocitos con una MEC intacta que proporciona señales de supervivencia a través de algunos de sus componentes, como es el caso de  $\alpha 5\beta 1$ , que tanto en cartílago normal como osteoartrítico, proporciona señales de supervivencia a los condrocitos (Gao et al., 2014). La importancia de estas interacciones para la supervivencia del condrocito en condiciones normales ha sido evidenciada con la creación de ratones *Knockout*; en el caso de la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , la pérdida de función de

cualquiera de sus subunidades ( $\alpha 5$  o  $\beta 1$ ) es letal durante el desarrollo embrionario (Loeser, 2014).

Sin embargo, se demostró la presencia de caspasa 3 activa principalmente en las zonas media y profunda del cartílago. Interesantemente, se pudo demostrar la presencia de Hsp27 en la zona superficial del cartílago, de manera que la falta de activación de caspasa 3 podría ser consecuencia de la interacción de Hsp27 con proteínas pro-apoptóticas.

La interacción de Hsp27 con las 2 proteínas pro-apoptóticas que analizamos en este trabajo ya se ha reportado anteriormente (Paul et al., 2002). En nuestro modelo muestran una expresión estable que no se altera con el estímulo de TNF- $\alpha$ . Sin embargo, los resultados que se tienen hasta el momento no permiten asegurar esta hipótesis; de manera particular, para Cyt c es necesario demostrar no sólo la interacción con Hsp28, si no que el estímulo con TNF- $\alpha$  es suficiente para cambiar su localización de la mitocondria al citosol.

Se podrá afirmar que existe interacción de Hsp27 con cualquiera de las dos proteínas estudiadas, cuando se realicen experimentos como transferencia de energía por resonancia de fluorescencia o FRET, que es el fenómeno físico en donde se transfiere energía desde un fluoróforo excitado, llamado donador, a un cromóforo cercano, llamado aceptor, mediante un acoplamiento dipolo-dipolo no radiante (a través del espacio) (Pietraszewska-Bogiel and Gadella, 2011). Por las características del modelo, es necesario utilizar un doble marcaje indirecto (Sekar and Periasamy, 2003).

Otra opción para detectar interacción proteína-proteína, es la co-inmunoprecipitación, que a pesar de representar un reto para la extracción íntegra de los complejos proteína-proteína por las características del tejido, ya ha sido utilizado previamente en

cartílago (Alvarez-Garcia et al., 2016, Flowers et al., 2017, Schubert et al., 2010).

Con el experimento de choque térmico se logró aumentar la expresión de Hsp27 en cartílago. Se observó un contraste evidente entre los 39°C y 41°C, lo cual nos sugiere la existencia de un umbral para la expresión de Hsp27 que se encuentra por encima de 39°C.

El entendimiento de los procesos moleculares involucrados en el desarrollo de esta patología es de vital importancia para lograr el desarrollo de terapias y fármacos que logren modificar la evolución de la enfermedad y no solamente medicamentos paliativos, que conforme avanza la enfermedad se vuelven ineficientes.

## Conclusiones

La estructura del cartílago articular en los explantes tratados con TNF $\alpha$  se mantuvo al menos durante 24 horas.

Hasta las 48 horas, el tratamiento con TNF $\alpha$  no afectó la sobrevivencia de los condrocitos de las zonas superficial y media del cartílago del explante osteocondral.

El efecto de TNF- $\alpha$  en la activación de caspasa 3, es dependiente del tiempo y la dosis utilizada.

No hubo cambios en la expresión relativa de las proteínas pro-apoptóticas Cyt c y Bid con el tratamiento con TNF- $\alpha$ .

Se encontró la presencia de Hsp27 en condiciones basales, en la zonas media y profunda del cartílago. En la zona media se observó un aumento de la expresión relativa de Hsp27 a 10 y 50 ng/ml de TNF- $\alpha$  durante 24 horas, mientras que a 48 horas se observa una regulación negativa de la expresión de esta proteína mediada por TNF- $\alpha$  en las zonas superficial y media del cartílago.

La expresión relativa de Hsp27 aumenta con choque térmico, principalmente en las zonas media y profunda después de una hora de recuperación del choque térmico.

## Perspectivas

- Observar la localización subcelular de Cyt c durante el tratamiento con TNF- $\alpha$ .
- Determinar si existe interacción entre Hsp-27 y otras proteínas pro-apoptóticas mediante co-inmunoprecipitación o FRET.
- Diseñar un método de sobreexpresión de Hsp27 para evaluar su efecto en la patogénesis de la OA.
- Diseñar un siRNA que bloquee la expresión de Hsp27 y evaluar su efecto en la patogénesis de la OA.

## Bibliografía

- ALSHAMI, A. M. 2014. Knee osteoarthritis related pain: a narrative review of diagnosis and treatment. *Int J Health Sci (Qassim)*, 8, 85-104.
- ALVAREZ-GARCIA, O., OLMER, M., AKAGI, R., AKASAKI, Y., FISCH, K. M., SHEN, T., SU, A. I. & LOTZ, M. K. 2016. Suppression of REDD1 in osteoarthritis cartilage, a novel mechanism for dysregulated mTOR signaling and defective autophagy. *Osteoarthritis and cartilage*, 24, 1639-1647.
- APPLETON, C. T. G., USMANI, S. E., MORT, J. S. & BEIER, F. 2010. Rho/ROCK and MEK/ERK activation by transforming growth factor- $\alpha$  induces articular cartilage degradation. *Laboratory investigation*, 90, 20.
- ARRIGO, A.-P. 2017. Mammalian HspB1 (Hsp27) is a molecular sensor linked to the physiology and environment of the cell. *Cell Stress and Chaperones*, 22, 517-529.
- ARRIGO, A.-P., SUHAN, J. P. & WELCH, W. J. 1988. Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein. *Molecular and Cellular Biology*, 8, 5059-5071.
- ARRIGO, A.-P. & WELCH, W. J. 1987. Characterization and purification of the small 28,000-dalton mammalian heat shock protein. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 15359-15369.
- BAKTHISARAN, R., TANGIRALA, R. & RAO CH, M. 2015. Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. *Biochim Biophys Acta*, 1854, 291-319.
- BEERE, H. M., WOLF, B. B., CAIN, K., MOSSER, D. D., MAHBOUBI, A., KUWANA, T., TAILOR, P., MORIMOTO, R. I., COHEN, G. M. & GREEN, D. R. 2000. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol*, 2, 469-75.
- BIAN, L., LIMA, E., ANGIONE, S., NG, K., WILLIAMS, D., XU, D., STOKER, A., COOK, J., ATESHIAN, G. & HUNG, C. 2008. Mechanical and biochemical characterization of cartilage explants in serum-free culture. *Journal of biomechanics*, 41, 1153-1159.
- BLALOCK, D., MILLER, A., TILLEY, M. & WANG, J. 2015. Joint instability and osteoarthritis. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*, 8, 15-23.
- BLANCO, F. J., GUITIAN, R., VAZQUEZ-MARTUL, E., DE TORO, F. J. & GALDO, F. 1998. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum*, 41, 284-9.
- BOETTCHER, K., KIENLE, S., NACHTSHEIM, J., BURBKART, R., HUGEL, T. & LIELEG, O. 2016. The structure and mechanical properties of articular cartilage are highly resilient towards transient dehydration. *Acta Biomater*, 29, 180-187.
- BRENTNALL, M., RODRIGUEZ-MENOCAL, L., DE GUEVARA, R. L., CEPERO, E. & BOISE, L. H. 2013. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC cell biology*, 14, 32.
- BRYANTSEV, A. L., KURCHASHOVA, S. Y., GOLYSHEV, S. A., POLYAKOV, V. Y., WUNDERINK, H. F., KANON, B., BUDAGOVA, K. R., KABAKOV, A. E. & KAMPINGA, H. H. 2007. Regulation of stress-induced intracellular sorting and chaperone function of Hsp27 (HspB1) in mammalian cells. *Biochemical Journal*, 407, 407-417.
- BURGOS-VARGAS, R., CARDIEL, M. H., LOYOLA-SANCHEZ, A., DE ABREU, M. M., PONS-ESTEL, B. A., ROSSIGNOL, M., AVOUAC, B., FERRAZ, M. B. & HALHOL, H. 2014. Characterization of knee osteoarthritis in Latin America. A comparative analysis of clinical and health care utilization in Argentina, Brazil, and Mexico. *Reumatol Clin*, 10, 152-9.

- BURR, D. B. 2004. Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage*, 12, 20-30.
- CARAMES, B., LOPEZ-ARMADA, M., CILLERO-PASTOR, B., LIRES-DEAN, M., VAAMONDE, C., GALDO, F. & BLANCO, F. 2008. Differential effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  on cell death in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis and cartilage*, 16, 715-722.
- COURTIES, A. & SELLAM, J. 2016. Osteoarthritis and type 2 diabetes mellitus: What are the links? *Diabetes Research and Clinical Practice*, 122, 198-206.
- CHARETTE, S. J., LAVOIE, J. N., LAMBERT, H. & LANDRY, J. 2000. Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Mol Cell Biol*, 20, 7602-12.
- CHAUHAN, D., LI, G., HIDESHIMA, T., PODAR, K., MITSIADES, C., MITSIADES, N., CATLEY, L., TAI, Y. T., HAYASHI, T., SHRINGARPURE, R., BURGER, R., MUNSHI, N., OHTAKE, Y., SAXENA, S. & ANDERSON, K. C. 2003. Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance. *Blood*, 102, 3379-86.
- CHAZOTTE, B. 2011. Labeling nuclear DNA using DAPI. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011, pdb. prot5556.
- CHOWDHURY, I., THARAKAN, B. & BHAT, G. K. 2008. Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 151, 10-27.
- FICK, J., HUTTU, M., LAMMI, M. & KORHONEN, R. 2014. In vitro glycation of articular cartilage alters the biomechanical response of chondrocytes in a depth-dependent manner. *Osteoarthritis and cartilage*, 22, 1410-1418.
- FISCHER, A. H., JACOBSON, K. A., ROSE, J. & ZELLER, R. 2008. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2008, pdb. prot4986.
- FISCHER, B. A., MUNDLE, S. & COLE, A. A. 2000. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induced DNA cleavage in human articular chondrocytes may involve multiple endonucleolytic activities during apoptosis. *Microscopy research and technique*, 50, 236-242.
- FLOWERS, S., KALAMAJSKI, S., ALI, L., BJÖRKMAN, L., RAJ, J., ASPBERG, A., KARLSSON, N. G. & JIN, C. 2017. Cartilage oligomeric matrix protein forms protein complexes with synovial lubricin via non-covalent and covalent interactions. *Osteoarthritis and cartilage*, 25, 1496-1504.
- GAHL, R. F., DWIVEDI, P. & TJANDRA, N. 2016. Bcl-2 proteins bid and bax form a network to permeabilize the mitochondria at the onset of apoptosis. *Cell death & disease*, 7, e2424.
- GALOIS, L., ETIENNE, S., GROSSIN, L., WATRIN-PINZANO, A., COURNIL-HENRIONNET, C., LOEUILLE, D., NETTER, P., MAINARD, D. & GILLET, P. 2004. Dose-response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: a pilot study. *Osteoarthritis Cartilage*, 12, 779-86.
- GAO, Y., LIU, S., HUANG, J., GUO, W., CHEN, J., ZHANG, L., ZHAO, B., PENG, J., WANG, A. & WANG, Y. 2014. The ECM-cell interaction of cartilage extracellular matrix on chondrocytes. *BioMed research international*, 2014.
- GETHING, M. J. & SAMBROOK, J. 1992. Protein folding in the cell. *Nature*, 355, 33-45.
- GEURTS, J., JURIC, D., MÜLLER, M., SCHÄREN, S. & NETZER, C. 2018. Novel Ex Vivo Human Osteochondral Explant Model of Knee and Spine Osteoarthritis Enables Assessment of Inflammatory and Drug Treatment Responses. *International journal of molecular sciences*, 19.
- GIBERT, B., ECKEL, B., FASQUELLE, L., MOULIN, M., BOUHALLIER, F., GONIN, V., MELLIER, G., SIMON, S., KRETZ-REMY, C. & ARRIGO, A.-P. 2012. Knock down of heat shock protein 27 (HspB1) induces degradation of several putative client proteins. *PLoS One*, 7, e29719.
- GOEBEL, J. C., BOLBOS, R., PHAM, M., GALOIS, L., RENGLE, A., LOEUILLE, D., NETTER, P., GILLET, P., BEUF, O. & WATRIN-PINZANO, A. 2010. In vivo high-resolution MRI (7T) of femoro-tibial

- cartilage changes in the rat anterior cruciate ligament transection model of osteoarthritis: a cross-sectional study. *Rheumatology*, 49, 1654-1664.
- GOLDRING, M. B. 2012. Articular cartilage degradation in osteoarthritis. *HSS journal*, 8, 7-9.
- GOLDRING, S. R. & GOLDRING, M. B. 2016. Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage-bone crosstalk. *Nature Reviews Rheumatology*, 12, 632-644.
- GROSSIN, L., COUNIL-HENRIONNET, C., PINZANO, A., GABORIT, N., DUMAS, D., ETIENNE, S., STOLTZ, J. F., TERLAIN, B., NETTER, P., MIR, L. M. & GILLET, P. 2006. Gene transfer with HSP 70 in rat chondrocytes confers cytoprotection in vitro and during experimental osteoarthritis. *FASEB J*, 20, 65-75.
- HASHIMOTO, S., OCHS, R. L., KOMIYA, S. & LOTZ, M. 1998. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 41, 1632-8.
- HAVASI, A., LI, Z., WANG, Z., MARTIN, J. L., BOTLA, V., RUCHALSKI, K., SCHWARTZ, J. H. & BORKAN, S. C. 2008. Hsp27 inhibits Bax activation and apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 283, 12305-13.
- HAYASHI, N., PEACOCK, J. W., BERARDI, E., ZOUBEIDI, A., GLEAVE, M. E. & ONG, C. J. 2012. Hsp27 silencing coordinately inhibits proliferation and promotes Fas-induced apoptosis by regulating the PEA-15 molecular switch. *Cell Death Differ*, 19, 990-1002.
- HENGARTNER, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, 770-6.
- JURYNEC, M. J., SAWITZKE, A. D., BEALS, T. C., REDD, M. J., STEVENS, J., OTTERUD, B., LEPPERT, M. F. & GRUNWALD, D. J. 2018. A hyperactivating proinflammatory RIPK2 allele associated with early-onset osteoarthritis. *Human molecular genetics*, 27, 2383-2391.
- KAPOOR, M., MARTEL-PELLETIER, J., LAJUNESSE, D., PELLETIER, J. P. & FAHMI, H. 2011. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 7, 33-42.
- KIERNAN, J. A. & KIERNAN, J. A. 2008. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*, Scion.
- KIM, J.-R., YOO, J. J. & KIM, H. A. 2018. Therapeutics in osteoarthritis based on an understanding of its molecular pathogenesis. *International journal of molecular sciences*, 19, 674.
- KOURI, J. B. & LAVALLE, 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, 793-802.
- KOURI, J. B., ROSALESENCINA, J. L., CHAUDHURI, P. P., LUNA, J. & MENA, R. 1997. Apoptosis in human osteoarthritic cartilage: A microscopy report. *Medical Science Research*, 25, 245-248.
- KUWANA, T. & NEWMAYER, D. D. 2003. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*, 15, 691-9.
- KYRYLKOVA, K., KYRYACHENKO, S., LEID, M. & KIOUSSI, C. 2012. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Odontogenesis*. Springer.
- LAMBRECHT, S., DHAENENS, M., ALMQVIST, F., VERDONK, P., VERBRUGGEN, G., DEFORCE, D. & ELEWAUT, D. 2010. Proteome characterization of human articular chondrocytes leads to novel insights in the function of small heat-shock proteins in chondrocyte homeostasis. *Osteoarthritis Cartilage*, 18, 440-6.
- LANDRY, J., CHRETIEN, P., LAMBERT, H., HICKEY, E. & WEBER, L. A. 1989. Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. *J Cell Biol*, 109, 7-15.
- LEIJ-GAROLLA, B. & MAUK, A. G. 2006. Self-association and chaperone activity of Hsp27 are thermally activated. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 8169-8174.

- LIN, Z., WILLERS, C., XU, J. & ZHENG, M. H. 2006. The chondrocyte: biology and clinical application. *Tissue Eng*, 12, 1971-84.
- LITTLE, C., BARAI, A., BURKHARDT, D., SMITH, S., FOSANG, A., WERB, Z., SHAH, M. & THOMPSON, E. 2009. Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 60, 3723-3733.
- LIU, H., ZHU, R., LIU, C., MA, R., WANG, L., CHEN, B., LI, L., NIU, J., ZHAO, D. & MO, F. 2017. Evaluation of decalcification techniques for rat femurs using HE and immunohistochemical staining. *BioMed research international*, 2017.
- LOESER, R. F. 2014. Integrins and chondrocyte-matrix interactions in articular cartilage. *Matrix Biology*, 39, 11-16.
- LOPEZ-ARMADA, M., CARAMES, B., LIRES-DEAN, M., CILLERO-PASTOR, B., RUIZ-ROMERO, C., GALDO, F. & BLANCO, F. 2006. Cytokines, tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$ , differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes. *Osteoarthritis and cartilage*, 14, 660-669.
- MADRY, H., LUYTEN, F. P. & FACCHINI, A. 2012. Biological aspects of early osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 20, 407-22.
- MARTEL-PELLETIER, J., BARR, A. J., CICUTTINI, F. M., CONAGHAN, P. G., COOPER, C., GOLDRING, M. B., GOLDRING, S. R., JONES, G., TEICHTAHL, A. J. & PELLETIER, J.-P. 2016. Osteoarthritis. *Nature Reviews Disease Primers*, 2.
- MEHLEN, P., MEHLEN, A., GUILLET, D., PREVILLET, X. & ARRIGO, A. P. 1995. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces changes in the phosphorylation, cellular localization, and oligomerization of human hsp27, a stress protein that confers cellular resistance to this cytokine. *J Cell Biochem*, 58, 248-59.
- MEHLEN, P., SCHULZE-OSTHOFF, K. & ARRIGO, A. P. 1996. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J Biol Chem*, 271, 16510-4.
- MOBASHERI, A. 2002. Role of chondrocyte death and hypocellularity in ageing human articular cartilage and the pathogenesis of osteoarthritis. *Med Hypotheses*, 58, 193-7.
- MORI, M., ITO, M. & FUKUI, S. 1965. Decalcification for histochemical demonstration of hydrolytic and oxidative enzymes. *Histochemie*, 5, 185-195.
- MUSUMECI, G., AIELLO, F. C., SZYCHLINSKA, M. A., DI ROSA, M., CASTROGIOVANNI, P. & MOBASHERI, A. 2015. Osteoarthritis in the XXIst century: risk factors and behaviours that influence disease onset and progression. *International journal of molecular sciences*, 16, 6093-6112.
- O'CONOR, C. J., LEDDY, H. A., BENEFIELD, H. C., LIEDTKE, W. B. & GUILAK, F. 2014. TRPV4-mediated mechanotransduction regulates the metabolic response of chondrocytes to dynamic loading. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 1316-21.
- OFFICER, A. & POSARAC, A. 2011. World report on disability. *World Health Organisation*.
- ONU 2017. World Population Prospects: The 2017 Revision, Key Findings and Advance Tables. United Nations.
- PANDEY, P., FARBER, R., NAKAZAWA, A., KUMAR, S., BHARTI, A., NALIN, C., WEICHSELBAUM, R., KUFE, D. & KHARBANDA, S. 2000a. Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. *Oncogene*, 19, 1975-1981.
- PANDEY, P., SALEH, A., NAKAZAWA, A., KUMAR, S., SRINIVASULA, S. M., KUMAR, V., WEICHSELBAUM, R., NALIN, C., ALNEMRI, E. S., KUFE, D. & KHARBANDA, S. 2000b. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J*, 19, 4310-22.

- PAUL, C., MANERO, F., GONIN, S., KRETZ-REMY, C., VIROT, S. & ARRIGO, A. P. 2002. Hsp27 as a negative regulator of cytochrome c release. *Molecular and Cellular Biology*, 22, 816-834.
- PAUL, C., SIMON, S., GIBERT, B., VIROT, S., MANERO, F. & ARRIGO, A.-P. 2010. Dynamic processes that reflect anti-apoptotic strategies set up by HspB1 (Hsp27). *Experimental cell research*, 316, 1535-1552.
- PELAEZ-BALLESTAS, I., SANIN, L. H., MORENO-MONTOYA, J., ALVAREZ-NEMEGYEI, J., BURGOS-VARGAS, R., GARZA-ELIZONDO, M., RODRIGUEZ-AMADO, J., GOYCOCHEA-ROBLES, M. V., MADARIAGA, M., ZAMUDIO, J., SANTANA, N., CARDIEL, M. H. & GRUPO DE ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO DE ENFERMEDADES MUSCULO, A. 2011. Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology. *J Rheumatol Suppl*, 86, 3-8.
- PIETRASZEWSKA-BOGIEL, A. & GADELLA, T. 2011. FRET microscopy: from principle to routine technology in cell biology. *Journal of microscopy*, 241, 111-118.
- PREVILLE, X., SALVEMINI, F., GIRAUD, S., CHAUFOUR, S., PAUL, C., STEPIEN, G., URSINI, M. V. & ARRIGO, A. P. 1999. Mammalian small stress proteins protect against oxidative stress through their ability to increase glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and by maintaining optimal cellular detoxifying machinery. *Exp Cell Res*, 247, 61-78.
- RENGANATHAN, H., VAIDYANATHAN, H., KNAPINSKA, A. & RAMOS, J. W. 2005. Phosphorylation of PEA-15 switches its binding specificity from ERK/MAPK to FADD. *Biochem J*, 390, 729-35.
- RIEUX, C., CARNEY, R., LUPI, D., DKHISSI-BENYAHYA, O., JANSEN, K., CHOUNLAMOUNTRI, N., FOSTER, R. & COOPER, H. 2002. Analysis of immunohistochemical label of Fos protein in the suprachiasmatic nucleus: comparison of different methods of quantification. *Journal of biological rhythms*, 17, 121-136.
- RILLO, O., RIERA, H., ACOSTA, C., LIENDO, V., BOLANOS, J., MONTEROLA, L., NIETO, E., ARAPE, R., FRANCO, L. M., VERA, M., PAPASIDERO, S., ESPINOSA, R., ESQUIVEL, J. A., SOUTO, R., ROSSI, C., MOLINA, J. F., SALAS, J., BALLESTEROS, F., RADRIGAN, F., GUIBERT, M., REYES, G., CHICO, A., CAMACHO, W., URIOSTE, L., GARCIA, A., IRAHETA, I., GUTIERREZ, C. E., ARAGON, R., DUARTE, M., GONZALEZ, M., CASTANEDA, O., ANGULO, J., COIMBRA, I., MUNOZ-LOUIS, R., SAENZ, R., VALLEJO, C., BRICENO, J., ACUNA, R. P., DE LEON, A., REGINATO, A. M., MOLLER, I., CABALLERO, C. V. & QUINTERO, M. 2016. PANLAR Consensus Recommendations for the Management in Osteoarthritis of Hand, Hip, and Knee. *J Clin Rheumatol*, 22, 345-54.
- RITOSSA, F. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 18, 571-573.
- ROACH, H. I., AIGNER, T. & KOURI, J. B. 2004. Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes? *Apoptosis*, 9, 265-77.
- SALEH, A., SRINIVASULA, S. M., BALKIR, L., ROBBINS, P. D. & ALNEMRI, E. S. 2000. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol*, 2, 476-83.
- SATO, S., FUJITA, N. & TSURUO, T. 2000. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 10832-7.
- SCHUBERT, T., SCHLEGEL, J., SCHMID, R., OPOLKA, A., GRÄSSEL, S., HUMPHRIES, M. & BOSSERHOFF, A.-K. 2010. Modulation of cartilage differentiation by melanoma inhibiting activity/cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein (MIA/CD-RAP). *Experimental & molecular medicine*, 42, 166.
- SEKAR, R. B. & PERIASAMY, A. 2003. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *The Journal of cell biology*, 160, 629-633.
- SHARMA, A. R., JAGGA, S., LEE, S.-S. & NAM, J.-S. 2013. Interplay between cartilage and subchondral bone contributing to pathogenesis of osteoarthritis. *International journal of molecular sciences*, 14, 19805-19830.

- SHI, Y. 2004. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Science*, 13, 1979-1987.
- SIEBELT, M., JAHR, H., GROEN, H. C., SANDKER, M., WAARSING, J. H., KOPS, N., MULLER, C., VAN EDEN, W., DE JONG, M. & WEINANS, H. 2013. Hsp90 inhibition protects against biomechanically induced osteoarthritis in rats. *Arthritis Rheum*, 65, 2102-12.
- SOPHIA FOX, A. J., BEDI, A. & RODEO, S. A. 2009. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*, 1, 461-8.
- TAIT, S. W. & GREEN, D. R. 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 621-32.
- TAKAYAMA, S., REED, J. C. & HOMMA, S. 2003. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene*, 22, 9041-9047.
- WEBB, G. R., WESTACOTT, C. I. & ELSON, C. J. 1997. Chondrocyte tumor necrosis factor receptors and focal loss of cartilage in osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage*, 5, 427-437.
- ZHANG, R., LUO, D., MIAO, R., BAI, L., GE, Q., SESSA, W. C. & MIN, W. 2005. Hsp90-Akt phosphorylates ASK1 and inhibits ASK1-mediated apoptosis. *Oncogene*, 24, 3954-63.



# Apéndice 1

## Detalles de procedimientos

### Tinción con Hematoxilina y Eosina

#### Preparación de reactivos

A. Bicarbonato de Sodio al 0.1%

Bicarbonato de sodio (SIGMA, Cat. S8875) 1 gr

Agua destilada 1000 ml

Mezclar hasta que se disuelva. El pH debe estar alrededor de

8.0. Almacenar a temperatura ambiente.

B. Alcohol-ácido al 1%

Ácido clorhídrico (J.T. BAKER 9508-05) 1 ml

Etanol (J.T. BAKER 9000-02 al 70%) 100 ml

Mezclar bien.

C. Solución *Stock* de Eosina Y

Eosina Y (SIGMA-ALDRICH, E4009-5G) 0.5 gr

Agua destilada 10 ml

Etanol (J.T. BAKER 9000-02 al 70%) al 95% 40 ml

Mezclar hasta disolver y almacenar a temperatura ambiente.

a. Solución de trabajo

Solución *stock* de Eosina Y 12.5 ml

Etanol al 80% 37.5 ml

Ácido acético glacial 0.25 ml

Mezclar bien y almacenar a temperatura ambiente.

D. Hematoxilina de Harris. Solución de Hematoxilina de

Harris (SIGMA-ALDRICH, Cat. HHS16-500ML)

Filtrar antes de usar con una membrana de 0.45  $\mu$ m.

#### Tren de tinción

1. Hidratar en PBS 1X durante 10 minutos.

2. Lavar 10 segundos en agua destilada.

3. Teñir con Hematoxilina de Harris durante 10 minutos.

4. Lavar en agua de grifo durante 2 minutos.

5. Diferenciar en alcohol ácido, sumergir 2 ves.

6. Lavar en agua de grifo durante 2 minutos.

7. Sumergir durante 30 segundos en el bicarbonato de sodio

para el proceso de *Bluing*.

8. Lavar en agua de grifo durante 30 segundos.

9. Alcohol al 95%, sumergir 10 veces.

10. Realizar tinción de contraste con Eosina Y durante 45 segundos.

11. Deshidratar en alcohol al 95% 1 minuto.

12. Alcohol absoluto, 2 cambios de 1 minuto cada uno.

13. Aclarar en xileno, 2 cambios de 1 minuto cada uno.

14. Montar con Poly-Mount®.

## Protocolo de inmunohistoquímica

1. Hidratar 10 minutos a temperatura ambiente con PBS 1X.
2. Permeabilizar con Tritón X-100 al 0.3% en PBS 1X durante 3 minutos a temperatura ambiente.
3. Retirar solución con Tritón X-100 con PBS 1X.
4. Bloquear con suero normal de conejo al 1.5% en PBS 1X durante 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Anticuerpo primario:
  - a. Caspasa 3 activa (Merk Millipore, Cat. #AB3623) 1:60 en PBS 1X con PBS al 0.2% y Tritón X-100 al 0.01%.
  - b. Bid (Santa Cruz, sc-6291) 1:60  
en PBS 1X con PBS al 0.2% y Tritón X-100 al 0.01%.
  - c. Cyt c (Santa Cruz, sc-6291) 1:60  
en PBS 1X con PBS al 0.2% y Tritón X-100 al 0.01%.
  - d. Incubar durante toda la noche a 4°C.
6. Se realizan 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X.
7. Anticuerpo secundario: Diluir 1:200 en PBS 1X con suero normal de conejo al 1.5%. Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
8. Se realizan 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X.
9. Se incuba con solución ABC durante 1 hora a temperatura ambiente.
  - a. Preparar 20 minutos antes de que termine la hora de incubación del anticuerpo secundario.
  - b. Para preparar la solución ABC se necesitan 100 µl de la solución A y B para 5000 µl de PBS 1X (VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit).
10. Se realizan 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X.
11. Revelar con 3,3'-diaminobencidina (DAB) al 0.5% y peróxido de hidrógeno al 0.01% en PBS 1X durante 30 minutos aproximadamente.
12. Detener reacción con agua de grifo.
13. Deshidratar en etanol
  - a. 50% 30 segundos
  - b. 70% 30 segundos
  - c. 95% 30 segundos
  - d. 100% 30 segundos
14. Pasar a Xilol 2 cambios de 1 minuto cada uno.
15. Montar con Poly-Mount y observar al microscopio.

## Protocolo de inmunofluorescencia

1. Hidratar 10 minutos a temperatura ambiente con PBS 1X.
2. Permeabilizar con Tritón X-100 al 0.3% en PBS 1X durante 3 minutos a temperatura ambiente.
3. Retirar solución con Tritón X-100 con PBS 1X.
4. Bloquear con suero normal de caballo al 1.5% en PBS 1X durante 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Anticuerpo primario:
  - a. Hsp27 (Santa Cruz, sc-1048) 1:100 con suero normal de caballo al 1.5% en PBS 1X
  - b. Incubar durante toda la noche a 4°C.
6. Se realizan 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X.
7. Anticuerpo secundario: Diluir 1:100 en PBS 1X con suero normal de conejo al 1.5%. Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
8. Se realizan 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X.
9. Se incuba con DAPI a una dilución 1:1000 durante 5 minutos
10. Se realizan 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X.
11. Montar con VECTASHIELD® y observar al microscopio.