



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

“EFECTO DE LA VITAMINA D SOBRE LOS TLRs, CITOCINAS Y
METALOPROTEASAS EN EL DESARROLLO DE LA OA INDUCIDA EN
RATA”.

TESIS QUE PRESENTA

M en C. ELENA CRISTINA GONZÁLEZ CASTILLO.

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
PATOLOGÍA EXPERIMENTAL

DIRECTORES DE LA TESIS:

Dr. Juan B. Kourí Flores.

Dr. Vianney F. Ortiz Navarrete.

México, Distrito Federal

Noviembre, 2012

AGRADECIMIENTOS

EL PRESENTE TRABAJO, FUE REALIZADO CON EL APOYO DEL CONACyT (192043) EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL (071220000); BAJO LA TUTORÍA DEL DR. JUAN BAUTISTA KOURI FLORES DEL DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR Y DEL DR. VIANNEY F. ORTIZ NAVARRETE DEL DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR, LA ASESORÍA DE LOS DOCTORES ROSA MA. DEL ANGEL NUÑEZ Y MARCO ANTONIO VEGA LÓPEZ DEL DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR, DEL DR. FERNANDO NAVARRO DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y DEL DR. CARLOS LAVALLE MONTALVO SECRETARIO ACADÉMICO DE LA DIVISIÓN DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNAM.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
INTRODUCCIÓN	1
OSTEOARTRITIS	1
<i>Epidemiología</i>	1
<i>Generalidades</i>	4
RECEPTORES TIPO TOLL	7
VITAMINA D	10
JUSTIFICACIÓN	12
HIPÓTESIS	12
OBJETIVOS	13
METODOLOGÍA (Estrategia Experimental)	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
<i>Inducción de OA</i>	15
<i>Administración y dosis de vitamina D</i>	15
<i>Obtención de condrocitos</i>	16
<i>Extracción de RNA</i>	17
<i>Síntesis de cDNA</i>	17
<i>Amplificación de cDNA para RT-PCR</i>	18
<i>Inmunohistofluorescencia</i>	19
<i>Análisis estadístico</i>	20
RESULTADOS	21
EXPRESIÓN DE LOS TLRs EN LA PROGRESIÓN DE LA OA	21
EXPRESIÓN DE CITOCINAS Y MMPs EN LA INDUCCIÓN DE LA OA	25
EFECTO DE LA VITAMINA D EN EL CARTÍLAGO OA (DOSIS-RESPUESTA)	27
EFECTO DE LA VITAMINA D EN LA INDUCCIÓN DE LA OA	28
EFECTO DE LA VITAMINA D DURANTE LA PROGRESIÓN DE LA OA	30
EFECTO DE LA VITAMINA D EN EL ENGROSAMIENTO	32

DISCUSIÓN	-----	35
CONCLUSIÓN	-----	39
PERSPECTIVAS	-----	39
REFERENCIAS	-----	40

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Prevalencia de las manifestaciones musculoesqueléticas más frecuentes en la población mexicana.	-----2
Figura 2. Proyección de la población por edad al 2050 en la República Mexicana.	-----3
Figura 3. Vías de señalización de TLR-2 y TLR-4	-----9
Figura 4. Vías de acción de la vitamina D	-----11
Figura 5. Estrategia Experimental	-----14
Figura 6. Grupos experimentales	-----16
Figura 7. La expresión de TLR-4 se induce durante el desarrollo de la OA	-----22
Figura 8. La expresión de TLR-2 cambia en la zona media del cartílago	-----23
Figura 9. La expresión de TLR-4 cambia en la zona superficial y en la zona media del cartílago	-----24
Figura 10. La expresión de la IL-1 β , TNF- α y de la MMP-3 incrementa en el desarrollo de la OA	-----26
Figura 11. La expresión de TLR-4 mostró una alta correlación con moléculas asociadas a daño en la OA	-----27
Figura 12. La vitamina D reduce la hipertrofia de la superficie articular de los cóndilos con OA	-----28
Figura 13. El efecto protector de la vitamina D es independiente de la modulación transcripcional de TLR-4	-----30
Figura 14. La vitamina D no tiene un efecto sobre la severidad de la OA	-----32
Figura 15. La vitamina D reduce la hipertrofia inducida por la progresión observada en ratas con 10D de OA.	-----34
Figura 16. La expresión de MMP-3 correlaciona con el engrosamiento del cartílago en ratas suplementadas con vitamina D.	-----34
Tabla 1. Efecto de algunas citocinas sobre el cartílago	-----6
Tabla 2. Ligandos que activan la señalización vía TLR2, TLR2-1, TLR2-6 y TLR-4	-----7
Tabla 3. Oligos diseñados para rata, utilizados para detectar la presencia de los genes	-----19
Tabla 4. Especificaciones de los anticuerpos utilizados	-----20

ABREVIATURAS

AR	-----	Artritis reumatoide
COL1A	-----	Gen de colágena
CONAPO	-----	Consejo Nacional de Población
COPCORD	-----	Programa orientado a la comunidad para el control de enfermedades reumáticas. (Community Oriented Program in the Rheumatic Diseases).
CPPD	-----	Pirofosfato de calcio dihidratado
CT	-----	Calcitonina
DAMPs	-----	Patrones moleculares asociados a daño
dNTPs	-----	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EAI	-----	Ejercicio de alto impacto
ENSAUT	-----	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
ERs	-----	Receptores estrogénicos
IL-1 β	-----	Interleucina 1 β
LPS	-----	Lipopolisacárido
MAPK	-----	Proteínas cinasas activadas por mitógeno
MEC (ECM)	-----	Matriz extracelular
MMPs	-----	Metaloproteasas
MSU	-----	Urato monosódico
MyD88	-----	Proteína de diferenciación mieloide 88
NF- κ B	-----	Factor nuclear κ B
NO	-----	Óxido Nítrico
OA	-----	Osteoartritis
PAMPs	-----	Patrones moleculares asociados a patógenos
PG	-----	Proteoglicanos
PGE ₂	-----	Prostaglandina E ₂

SV	-----	Sin Vitamina
SV+PSV	-----	Sin Vitamina + Progresión Sin Vitamina
TA	-----	Temperatura ambiente
TGF- β	-----	Factor de crecimiento transformante β
TLRs	-----	Receptores tipo Toll
TNF α	-----	Factor de necrosis tumoral α
UI	-----	Unidades internacionales
HALO	-----	Horas después de que se enciende la luz (por sus siglas en inglés)
V	-----	Vitamina
V+PSV	-----	Vitamina + Progresión Sin Vitamina
V+PV	-----	Vitamina + Progresión con Vitamina
VDR	-----	Receptor de vitamina D
VEGF	-----	Factor de crecimiento endotelial vascular

RESUMEN

La inflamación observada en la osteoartritis (OA) está mediada por el infiltrado celular en el tejido sinovial y por la subsecuente liberación de citocinas, inicialmente por macrófagos y después por sinoviocitos y condrocitos. Las citocinas interleucina (IL)-1 β y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α están consideradas como las más importantes en la OA debido a que la IL-1 β esta asociada con la destrucción del cartílago y TNF- α con el inicio de la cascada de inflamación. La liberación de dichas citocinas y la degradación de la matriz extracelular induce la generación de fragmentos de proteínas de matriz que actúan como patrones moleculares asociados a daño (DAMP's) y que son reconocidos por los receptores tipo Toll (TLRs). De esta manera, los fragmentos de fibronectina y de ácido hialurónico inducen la producción de óxido nítrico, citocinas pro-inflamatorias y metaloproteasas (MMPs) a través de TLR-2 y TLR-4. Lo que sugiere que la activación de los TLRs es importante en la inducción y progresión de la OA.

Se ha mostrado que la disminución en la síntesis de TNF- α en monocitos tratados con vitamina D se debe a que regula negativamente las vías de señalización de TLR-2 y TLR-4. En este sentido, estudios tanto epidemiológicos como experimentales en modelos animales sugieren que concentraciones bajas de vitamina D en sangre, están asociadas con la severidad de enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide y la OA. En particular, la deficiencia de vitamina D ha sido asociada positivamente con la progresión de OA de rodilla y cadera, pérdida de cartílago y baja en la densidad mineral ósea. Sin embargo, también se ha observado que la deficiencia de vitamina D solo esta asociada a ciertos grupos de edad y a ciertos factores como el dolor más que a cambios radiográficos; mientras que otros estudios no encuentran asociación alguna entre la vitamina D y la OA, aún en pacientes que consumen suplementos de vitamina D.

Debido a que estudios epidemiológicos solo pueden evaluar el efecto de la vitamina D en ciertas etapas de la OA, el objetivo del presente trabajo fue definir si la suplementación con vitamina D tiene un efecto protector durante el inicio o la progresión de la OA utilizando un modelo de rata. Se mostró que TLR-4 es el mecanismo proinflamatorio que resulta en la expresión de MMP-3, IL-1 β y TNF- α y que conlleva a la inflamación y degradación del cartílago; y que la vitamina D tiene un efecto protector en la inducción de la enfermedad que se pierde durante la progresión.

ABSTRACT

Inflammation in osteoarthritis (OA) is mediated by cellular infiltration into the synovia and the subsequent release of cytokines, primarily by macrophages and later by synoviocytes and chondrocytes. Interleukin (IL)-1 β and tumor necrosis factor (TNF)- α are considered to be key pro-inflammatory cytokines in OA because IL-1 β mediates cartilage destruction and TNF- α drives the inflammatory cascade. The release of cytokines and the degradation of the extracellular matrix (ECM) drive the generation of matrix protein fragments that could act as damage-associated molecular patterns (DAMPs), which are recognized by Toll-like receptors (TLRs). Indeed, fibronectin and hyaluronic acid fragments induce the production of nitric oxide, pro-inflammatory cytokines and metalloproteases (MMPs) through both TLR-2 and TLR-4 signaling. Thus, TLR activation plays a major role in the induction and progression of OA.

It has been shown that TNF- α synthesis decreases in monocytes treated with vitamin D due to the down-regulation of TLR-2 and TLR-4 signaling. In this context, epidemiological studies and experimental animal models suggest that the status of vitamin D is associated with the severity of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis and OA. In particular vitamin D deficiency has been positively associated with knee and hip OA progression, cartilage loss, and low bone mineral density. However it has also been shown that vitamin D deficiency is associated with only certain age groups and with certain factors, such as pain, rather than with radiographic changes, while others studies have found no association between vitamin D and OA, even in patients diagnosed with OA who were using vitamin D supplements.

Because epidemiological studies can only evaluate the effect of vitamin D in certain stages of OA, we aimed to define whether vitamin D has a protective effect during the onset or progression of OA using a rat model. The present study shows the involvement of the TLR-4 pathway in the expression of MMP-3, IL-1 β , and TNF- α during the development of OA. It also shows that vitamin D supplementation has a protective effect during the induction of OA but this effect thus not stand during progression.

INTRODUCCIÓN

OSTEOARTRITIS

Epidemiología

La osteoartritis (OA) es la enfermedad articular más común de todos los tipos de artritis, cuya incidencia es 10 veces mayor a la de la artritis reumatoide (AR)¹.

En México, existen pocos estudios sobre su importancia y prevalencia. En el 2002, Cardiel y Rojas-Serrano, determinaron una prevalencia del 23% de dolor del sistema musculoesquelético y el 1.4% de discapacidad por dichos problemas (dolor y rigidez) en las 2,500 personas entrevistadas². Por otro lado, en el 2005, Espinosa, *et al.*, encontraron una elevada prevalencia de dolor a nivel articular en la población mexicana, siendo las personas de sexo femenino las más afectadas, con un incremento en las manifestaciones conforme a la edad³. Estos datos concuerdan con un estudio realizado en Guanajuato, en donde se mostró que el 14.8% de los pacientes que ingresaron a ortopedia, principalmente entre los 50 y 59 años de edad, fueron por OA, con una mayor incidencia en la población femenina (73%)⁴. Recientemente, un estudio basado en la metodología propuesta por el Programa Orientado a la Comunidad para el Control de Enfermedades Reumáticas (COPCORD, por sus siglas en inglés), realizado en Chihuahua, Nuevo León, Sinaloa, Yucatán, y D.F., encontraron que la OA tiene una mayor prevalencia (10.5%) comparada con la AR (1.6%) o la gota (0.3%)⁵ (Fig. 1). Sin embargo, el porcentaje de pacientes con OA podría ser mayor debido a que la enfermedad solo puede ser diagnosticada en estadios avanzados, cuando las evidencias radiológicas lo permiten, y a que se estima que de la población con OA solo el 30% presenta evidencias radiológicas⁶.

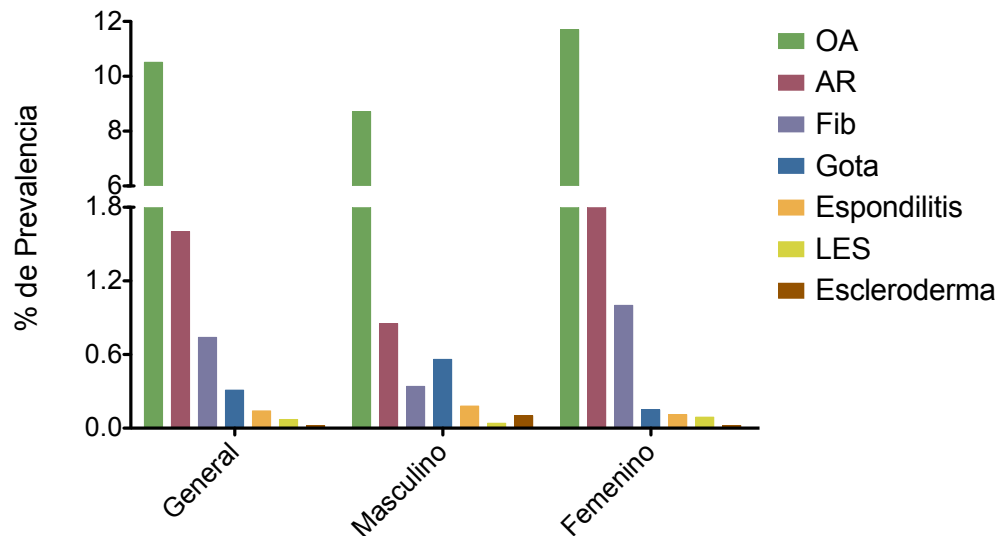


Figura 1. Prevalencia de las manifestaciones musculoesqueléticas más frecuentes en la población mexicana (Chihuahua, Nuevo León, Sinaloa, Yucatán, y D.F.). Estudio basado en la metodología COPCORD realizado en 19,213 personas (95% CI) entre agosto de 2008 y de 2009. Gráfica realizada con los datos obtenidos por Pelaéz-Ballestas⁵.

Existen diversos factores etiológicos que se encuentran asociados a la enfermedad, los cuales, pueden clasificarse en sistémicos (edad, género, menopausia, genéticos⁷⁻⁹, nutrición¹⁰, densidad ósea¹¹) y mecánicos (obesidad¹², cirugías o daños en la articulación, debilidad muscular¹³, atletas profesionales¹⁴, deformidad articular)¹⁴⁻¹⁵, de los cuales, la edad y la obesidad son los de gran importancia para la población mexicana⁵.

Durante muchos años se ha establecido a la OA como una enfermedad crónico-degenerativa, debido a que afecta principalmente a la población mayor de 40 años (que en ocasiones puede traducirse en la pérdida de jornadas de trabajo)^{4, 16-17}, siendo más frecuente en la mayor de 60^{14, 16}; poblaciones que abarcan cada vez mayores proporciones en la población mexicana (figura 2)¹⁸. Esta relación entre la edad y la OA, probablemente está dada por la combinación de factores, tanto mecánicos como sistémicos a los que están sometidas las articulaciones a lo largo de la vida del individuo, principalmente en las mujeres en las que el sobrepeso y las hormonas desempeñan un papel muy importante^{14, 17-18}.

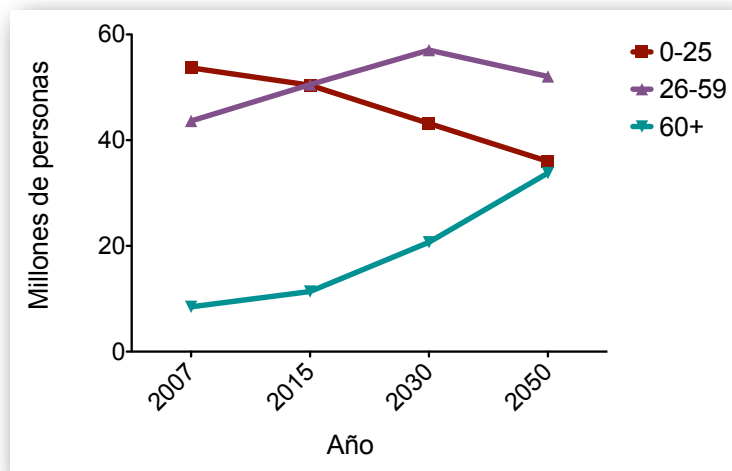


Figura 2. Proyección de la población por edad al 2050 en la República Mexicana. Gráfica realizada a partir de los datos de la CONAPO¹⁸.

Por otra parte, la obesidad es uno de los factores mejor establecidos como de riesgo para la OA de rodilla y cadera^{14, 19-20}, que son los tipos de OA más comunes en México²¹, EE.UU y RU¹⁴. Se ha establecido que la pérdida de peso reduce el riesgo del desarrollo subsecuente de OA de rodilla⁶. Debido a que México ocupa el segundo lugar de obesos en el mundo, con alrededor del 70% de la población mayor de 20 años con sobrepeso, problema igualmente alarmante en niños (5.3% <5años, 26% escolares) y adolescentes (>30%)²², este factor se convierte en uno de los más importantes para el desarrollo de la enfermedad en nuestro país.

Otros factores a considerar son los genéticos, ya que se ha mostrado que su influencia, en ciertas articulaciones, puede alcanzar cerca del 70%²³⁻²⁴. Estudios realizados en la población mexicana, indican que polimorfismos en el gen de CA (repetido en el dinucleótido C-T)²⁵ y de COL2A1²⁶ se encuentran asociados con una mayor o menor predisposición para la enfermedad. En el 2009, Magaña, *et al.*, encontraron que el alelo A y el genotipo AG se encuentran asociados con la OA de rodilla, mientras que el genotipo GG presentó un menor riesgo de progresión de la enfermedad²⁵. Mientras que Gálvez-Rosas, en el mismo año, encontró asociaciones entre los genotipos pp/Pp del gen de la COL2A1 con el grado 4 de OA de rodilla, sugiriendo una asociación entre los polimorfismos de este gen con estadios avanzados de OA de rodilla en la población mexicana²⁶.

Generalidades

La OA se caracteriza principalmente por la degradación del cartílago, formación de osteofitos en los márgenes del hueso y muerte de los condrocitos, mayoritariamente por muerte celular programada o condroptosis²⁷. Se ha sugerido que estos cambios se deben a que cuando el cartílago recibe estímulos catabólicos, como el estrés mecánico, que estimula la síntesis de citocinas inflamatorias y de enzimas degradativas como las MMPs, los condrocitos pueden recuperar la homeostasis del tejido al sintetizar moléculas de la MEC, regulando a su vez negativamente la síntesis de las moléculas inflamatorias y degradativas. Sin embargo, cuando estos estímulos o señales sobrepasan la capacidad reparativa de dichas células, éstas comienzan a sintetizar moléculas de naturaleza o longitud no adecuadas por lo que el daño se incrementa sin ser contrarrestado²⁸⁻³⁰. Al mismo tiempo la síntesis de MMPs aumenta favoreciendo la pérdida de la homeostasis²⁹.

Por otro lado, la formación de osteofitos, inducida por HIF-2 α ³¹, también podría estar relacionada con el intento de recuperar el equilibrio en la articulación, que se pierde con el desgaste heterogéneo del cartílago, reduciendo la inestabilidad de la misma. Estas osificaciones secundarias se ven favorecidas gracias a que el tejido es vascularizado por la acción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) cuya expresión incrementa debido a la inflamación, lo que a su vez permite que se activen las vías de señalización involucradas en la osificación endocondral, como la de la β -catenina, incrementando la expresión de col X³¹⁻³².

Finalmente, los condrocitos al ser continuamente estimulados a sintetizar citocinas (IL-1 β , TNF- α), que a su vez promueven la síntesis de las MMPs y óxido nítrico (NO), favorecen la degradación del tejido y la muerte celular, respectivamente³³⁻³⁴. Algunos autores consideran al NO como el mediador principal de la muerte de los condrocitos, al inducir daño en el ADN mitocondrial³⁵, incrementando la expresión de p53³⁶ y la activación de caspasas^{33, 37-38}. Sin embargo, otros estudios, muestran que no solo el estrés mitocondrial³⁵ y del retículo³⁹⁻⁴⁰ están involucrados con la muerte de los condrocitos, también parece haber una participación importante del aparato de Golgi⁴¹. Todos estos estudios y otros realizados por Kouri, *et al.*, en donde se exponen principalmente los cambios morfológicos que sufren los condrocitos al morir^{27, 41-42}, han mostrado que la muerte celular programada del condrocito esta

mediada tanto por apoptosis como por autofagia^{27, 43}, en donde las células que mueren podrían estar siendo eliminadas mediante fagocitosis⁴⁴ por células vecinas²⁷, a través de la posible comunicación interlagunar entre los condrocitos⁴⁵.

En los últimos años, se ha dado una especial atención al aspecto inmunológico en el desarrollo de la enfermedad. Se ha descrito que, al igual de lo que ocurre en la AR, en la OA se detectan autoanticuerpos que solo se observan en estos pacientes, lo que indica que esta enfermedad presenta una inmunidad patológica específica, que podría contribuir en la secreción de citocinas⁴⁶⁻⁴⁸. Es por ello que la inflamación, a pesar de no ser tan evidente y estudiada como en la AR, parece jugar un papel importante en el catabolismo del cartílago⁴⁹; en donde las citocinas inflamatorias como TNF- α e IL-1 β (tabla1), son producidas por los sinoviocitos, el infiltrado celular de la sinovial y posteriormente por los mismos condrocitos^{34, 50-52}.

Se ha observado que la síntesis de estos factores catabólicos puede ocurrir a través de la señalización de los receptores tipo Toll, los cuales, pueden ser activados por citocinas como la IL-1 β ⁵³.

Tabla1. Efecto de algunas citocinas sobre el cartílago⁴².

CITOCINA	EFEECTO EN EL CARTÍLAGO	EFEECTO EN LA SINOVIAL
Citocinas catabólicas		
IL-1	Disminuye la síntesis de PG, incrementa la expresión y producción de MMP, NO y PGE2.	Induce la activación de la sinovial (expresión de MMP, inflamación).
IL-17	Disminuye la producción de PG, menos potente que la IL-1 β . Induce NO e IL-1 β .	Induce ligera inflamación y sinergiza con la IL-1 β .
TNF- α	Inducción de MMPs, PGE2	Inducción de inflamación y MMP.
Citocinas reguladoras		
IL-4	Importante en el mantenimiento del cartílago normal. Contrarresta el efecto de IL-1 β . Disminuye la síntesis de NO. Induce IL-1Ra y sTNFR.	Modula la inflamación pero puede inducir el infiltrado celular. Inhibe la producción de IL-1 β y TNF- α e induce la de TGF- β .
IL-6	Induce TIMPs.	Induce inflamación.
IL-10	No ejerce un efecto directo sobre la producción de PG. Contrarresta el efecto de IL-1 β .	Inhibe la inflamación. Contrarresta los efectos de IL-1 β e induce TGF- β .
Factores anabólicos		
TGF- β	Estimula la producción de proteínas de la matriz. Contrarresta el efecto de IL-1 β .	Anti-inflamatoria pero puede funcionar como quimioatrayente. Inducir proliferación de la sinovial y la formación de osteofitos. Induce diversos factores de crecimiento.
BMP-2 BMP-4	Estimula la producción de proteínas de la matriz	Inducción de apoptosis de fibroblastos y de formación de osteofitos.
IGF-1	Estimula la producción de proteínas de la matriz. La IL-1 β bloquea su respuesta.	Aumenta la producción de PG y la reparación.
VEGF	Asociado con la progresión de la OA	Induce la angiogénesis

IL: interleucina, MMP: metaloproteasas; NO: óxido nítrico; PGE2: prostaglandina E2; PG: proteoglicanos; TNF α : factor de necrosis tumoral α ; IL-1R: receptor de interleucina 1; sTNFR: receptor de TNF soluble; TGF β : factor de crecimiento transformante β ; TIMPs: inhibidores de metaloproteasas de tejido, BMP: proteína morfogénica de hueso, IGF-1: factor de crecimiento tipo insulina; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

RECEPTORES TIPO TOLL (TLR)

Los receptores Toll de *Drosophila*, desempeñan un papel importante en la respuesta a infecciones y en la polaridad del desarrollo dorso-ventral en los embriones. En los mamíferos, se han encontrado alrededor de 10 receptores homólogos⁵⁴ que son esenciales en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, ver tabla 2) y que se caracterizan por presentar un repetido rico en leucinas (LRR) en su dominio extracelular y un dominio citoplasmático, llamado receptor toll-interleucina (TIR) dado que presenta una alta homología al receptor de IL-1 (IL-1R) formando parte de los receptores transmembranales tipo I. A estos receptores, se les ha denominado receptores tipo Toll (TLRs), los cuales fueron descritos en las células del sistema inmune (macrófagos, células dendríticas) y cuyo reconocimiento permite que se activen vías de señalización que resultan en la síntesis de moléculas inflamatorias, estableciendo una conexión entre la inmunidad innata y el inicio de la adquirida, a través de la activación de los linfocitos⁵⁴⁻⁵⁶.

Tabla2. **Ligandos que activan la señalización vía TLR2, TLR2-1, TLR2-6 y TLR-4**⁵⁸

TLR	Ligando	Origen del ligando
TLR2	Lipoproteína/lipopéptidos	Patógenos
	Diacil lipopéptidos	Ligandos sintéticos (Pam2, MALP2SK4)
	Peptidoglicano	Bacterias Gram +
	Acido lipoteicoico	Bacterias Gram +
	Glicolípidos	<i>Treponema maltophilum</i>
	Porinas	<i>Neisseria meningitidis</i>
	Zymosan	Fungi
	Ac. hialurónico	Hospedero
	Proteína de choque térmico 70 (HSP70)	Hospedero
TLR1/2	Triacil lipopéptidos	Bacteria, micobacteria
	Factores solubles	<i>Neisseria meningitidis</i>
	OspA	<i>Borrelia burgdorferi</i>
TLR2/6	Diacil lipopéptidos	Mycoplasma
TLR4	LPS	Bacterias gram -
	Proteína de choque térmico 60 (HSP60)	<i>Chlamydia pneumoniae</i> , hospedero
	Proteína de choque térmico 70 (HSP70)	Hospedero
	Repetido extra tipo III del dominio A de fibronectina.	Hospedero
	Taxol	Planta

Con la excepción del TLR3, la señalización de los TLRs se da a través de la proteína de diferenciación mielóide 88 (MyD88), que se recluta a través del dominio TIR del C-terminal; mientras que su dominio de muerte (DD), localizado en el N-terminal, se une a la cinasa asociada al IL-1R (IRAK-1) iniciando la señalización a través del factor 6, asociado al receptor de TNF (TRAF-6). TRAF-6, permite que las cinasas de I κ B (IKKs), fosforilen al inhibidor de kappa B (I κ B) liberando así al factor nuclear- κ B (NF- κ B), y que las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), activen al factor nuclear AP-1 (proteína de activación-1) permitiendo la transcripción de genes con relevancia inmunológica^{54, 57-58}. Por otro lado, también se ha descrito que TLR-2, puede reclutar a la GTPasa de la familia Rho, Rac-1, a la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K) y Akt⁵⁹. En el caso de TLR-4, se ha descrito a la proteína adaptadora que contiene al dominio TIR inductor de IFN- β (TRIF), que es esencial para la señalización de TLR3 y que permite la producción del IFN- β ⁶⁰ (Fig. 3). Finalmente, para TLR-1/2, TLR-2/6 y TLR-4 se ha descrito una segunda proteína adaptadora que se une a MyD88, la proteína adaptadora que contiene TIR (TIRAP) ó adaptador tipo MyD88 (Mal), que permite la señalización de estos TLRs a través de NF- κ B y de las MAPK⁶¹⁻⁶².

A pesar de que estas vías de señalización fueron descritas en las células del sistema inmune innato, se ha observado que estos TLRs también están en otras células como los condrocitos y que, en ausencia de infección, pueden reconocer ligandos endógenos o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs)⁶³, como proteínas de choque térmico, ácidos grasos^{57, 64-65}, citocinas y fragmentos de MEC⁶⁶⁻⁶⁷, entre otras⁶⁸.

En el cartílago articular humano, Bobacz y cols.⁶⁹, encontraron que los condrocitos de personas menores de 35 años expresan del TLR-1 al TLR-9 y que la expresión de TLR-7 desaparece en las personas mayores de 35 años, lo que sugiere que con la edad, el cartílago podría perder o disminuir su capacidad de expresar algunos TLRs, independientemente de la enfermedad⁶⁹. Esto podría explicar la controversia que se ha reportado de la expresión de algunos de los TLRs en los pacientes con OA, en donde la mayoría coinciden únicamente en la expresión de TLR2 y TLR4, mismos que parecen incrementarse durante la enfermedad con respecto al tejido sano^{53, 57, 70}. Se ha observado que moléculas que resultan de esta enfermedad, como IL-1 β , f-

Fn⁵³, microcristales de pirofosfato de calcio dihidratado (CPPD) y de urato monosódico (MSU), sirven como ligando de estos TLRs y que su reconocimiento resulta en la síntesis de citocinas, MMPs y NO⁷⁰ (Fig. 3).

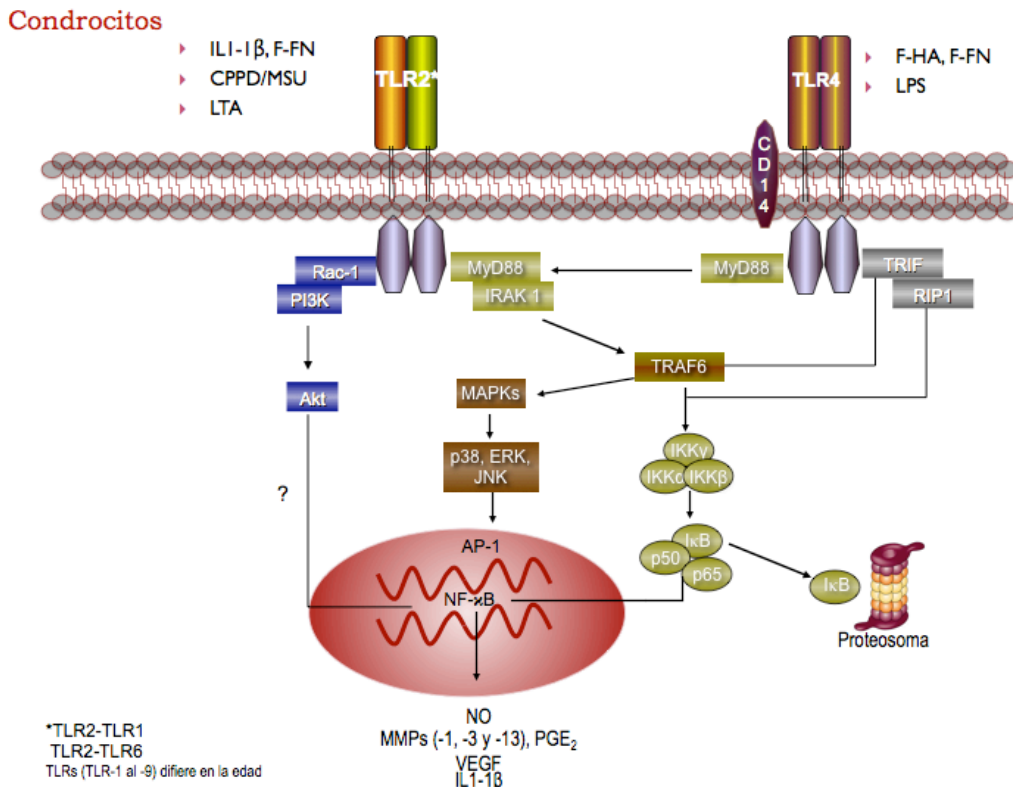


Fig. 3. Vías de señalización de TLR-2 y TLR-4. La activación de estos TLRs permiten la síntesis de MMPs, citocinas, VEGF, NO. f-Fn (fragmentos de fibronectina); F-HA (fragmentos de ácido hialurónico); CPPD (Pirofosfato de calcio dihidratado); MSU(urato monosódico); LTA (ácido lipoteicoico); LPS (lipopolisacárido).

En el año 2006 Sadeghi, *et al.*,⁷¹ observaron en monocitos humanos que el metabolito 1,25OH₂D₃ de la vitamina D, inhibe parcialmente la expresión de TLR-2 y TLR-4 a nivel de mRNA y proteína y que; por lo tanto, los elementos de la vía de señalización se encontraban inactivos, disminuyendo finalmente la expresión de TNF- α ⁷¹. Esto sugiere que en el condrocito, la vitamina D podría tener el mismo efecto y evitar que se dé el catabolismo del cartílago.

VITAMINA D

El metabolito activo de la vitamina D o calcitriol, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, es de gran importancia en el mantenimiento de la homeostasis del calcio y del fósforo en el hueso e intestino. Se sintetiza en el riñón y su función está mediada por el receptor de la vitamina D (VDR), presente en tejidos como el riñón, hueso, intestino, colon y piel, así como en células del sistema inmune⁷².

Para realizar su función, el VDR, forma un complejo con la $1,25\text{OH}_2\text{D}_3$, la cual le induce un cambio conformacional que favorece su heterodimerización con el receptor retinoide X (RXR)⁷³⁻⁷⁵ permitiéndole regular la expresión de genes que codifican para proteínas que determinan el crecimiento y remodelación del hueso, absorción de calcio en intestino, proliferación celular y desintoxicación de lípidos, entre otros^{72, 76}.

Otros efectos de la vitamina D sobre distintas células son el arresto del ciclo celular⁷⁷, por el cual ha adquirido importancia en el tratamiento del cáncer, en la inducción de tolerancia inmunológica⁷⁸ y en la generación de péptidos antimicrobianos⁷⁹ (figura 4), lo cual es importante en el tratamiento de enfermedades inflamatorias e infecciosas, respectivamente. Estos efectos evitan o reducen el efecto negativo que tienen los rayos UV de la luz solar como son el cáncer^{77, 80}, la inflamación e infecciones asociadas a las quemaduras en la piel⁸¹.

Se ha observado que las deficiencias en la vitamina D, están asociadas a diferentes enfermedades como la diabetes tipo I⁸², la OA⁸³, AR⁸⁴, lupus eritematoso sistémico⁸⁵ y algunos tipos de cáncer⁸⁰, entre otras⁸⁶ y que aproximadamente mil millones de personas en el mundo presentan insuficiencias de esta vitamina⁸⁷.

La deficiencia en la vitamina D ha sido ligada a la osteoporosis y en los últimos años con la OA, ya que existe una asociación positiva entre los índices de densidad mineral ósea y la vitamina D con la OA, pues al aumentar estos dos factores, la progresión de la enfermedad disminuye⁸³. Se ha reportado que dosis diarias de vitamina D (≥ 700)^{10, 83, 88}, disminuyen la progresión de la enfermedad en cadera y rodilla, lo que su vez reduce las caídas y fracturas asociadas a la enfermedad en las personas mayores de 65 años⁸⁸⁻⁸⁹. Se ha descrito que la expresión del VDR en los condrocitos de cartílago articular incrementa en pacientes con enfermedades reumáticas como la OA⁹⁰⁻⁹¹ y que este incremento se encuentra asociado a la

expresión de MMP-3⁵⁰. Debido a que los macrófagos de la sinovial sintetizan 1,25OH₂D₃⁹², se ha sugerido que el incremento de ambos podría estar relacionado ya sea con una modulación positiva en el comportamiento de los condrocitos para contrarrestar la enfermedad, dado que polimorfismos en el VDR se han asociado con la progresión de la OA^{8, 93}, ó con una modulación negativa favoreciendo el comportamiento aberrante de los condrocitos⁵⁰ en la producción de factores asociados a la osificación, incrementando la degradación de la MEC y la vascularización del tejido, debido al efecto descrito de la vitamina D en los condrocitos en la placa de crecimiento y a la hipertrofia de los condrocitos asociada a la OA^{31, 50, 94}.

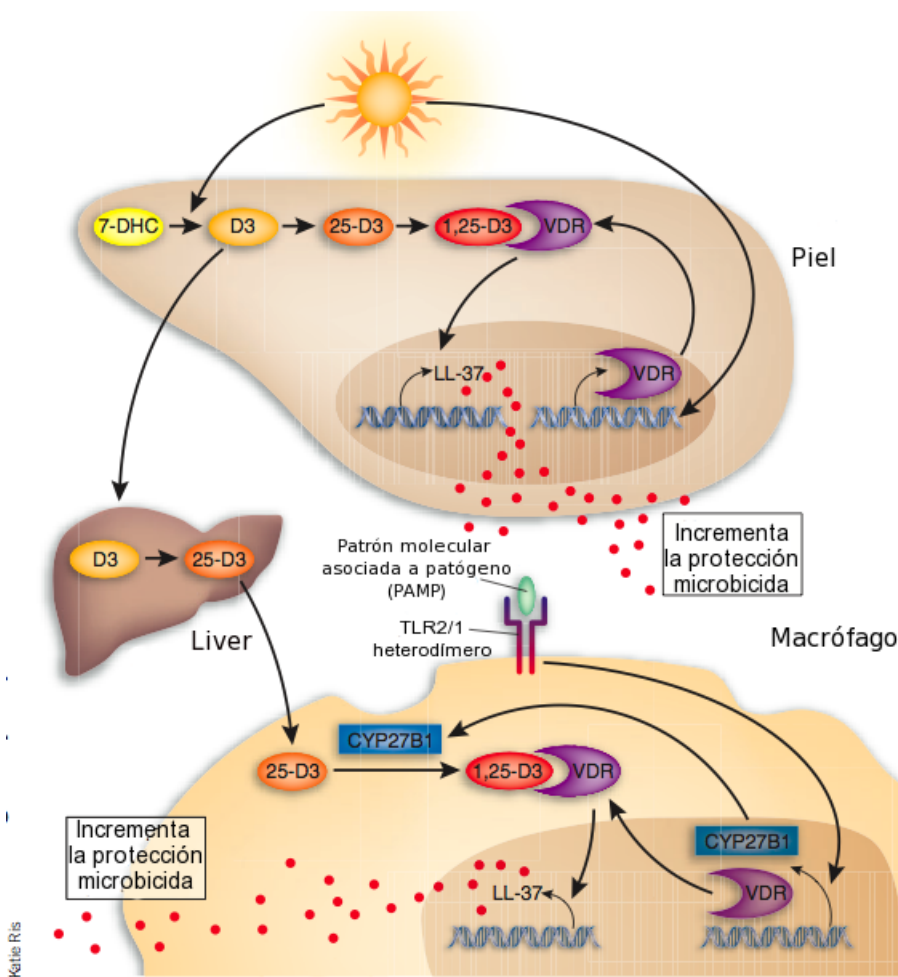


Fig. 4. Vías de acción de la vitamina D. La luz solar, convierte la 7-dihidrocolesterol (7-DHC) en la piel en vitamina D que es convertida sucesivamente en 25-hidroxi-D3 (25-D3) y esta a su vez en 1,25-dihidroxi-D3 (1,25-D3) en los queratinocitos. La luz solar, también induce la expresión del receptor de la vitamina D (VDR). La 1, 25D3 y el VDR, inducen la expresión de genes que codifica al péptido antimicrobiano LL-37. La 1,25-D3, entra a la circulación y es convertida en 25-D3 en el hígado, y es convertida nuevamente en la 1,25-D3 por la enzima CYP27B1 en la circulación. Los monocitos circulantes son activados por los agonistas de TLR2/1 presentes en los microbios. Lo que permite el incremento de la LL-37 y la actividad microbicida en los fagocitos⁸¹.

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

JUSTIFICACIÓN

Se ha descrito que citocinas y metaloproteasas, que son importantes en el desarrollo de la OA, pueden expresarse tras la activación de TLR-2 y TLR-4. En monocitos humanos la vitamina D interfiere con la señalización de estos dos TLRs lo que conlleva a la disminución de la producción de TNF- α . Debido a que niveles adecuados de vitamina D se encuentran asociados con una disminución en la progresión de OA de rodilla y cadera, es importante determinar el efecto que tiene la vitamina D sobre TLRs, citocinas y MMPs expresados en los condrocitos de cartílago de rodilla, así como en el desarrollo de la enfermedad en un modelo de progresión de OA en rata.

HIPÓTESIS

La vitamina D disminuye la progresión de la OA interfiriendo en la expresión de citocinas y metaloproteasas, que participan en la degradación del cartílago, a través de la disminución en la expresión de los TLRs.

OBJETIVOS

GENERAL

- Determinar el efecto de la vitamina D sobre la expresión de moléculas involucradas en el catabolismo del cartílago durante el desarrollo de OA de rodilla.

PARTICULARES

1. Determinar la expresión de los TLR-1, TLR-2, TLR-4 y TLR-6 en condrocitos de cartílago articular de rata con OA de 1, 3, 6, 8, 10 y 20 días.
2. Evaluar la expresión de citocinas inflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF- α) y metaloproteasas (MMP-13, MMP-3 y MMP-9) en condrocitos de cartílago articular de rata con OA de 1, 3, 6, 8, 10 y 20 días.
3. Establecer el efecto de la vitamina D sobre los TLRs expresados en los condrocitos y su relación con la expresión de citocinas y MMPs, en ratas con OA de 1, 3, 6, 8, 10 y 20 días.

METODOLOGÍA (Estrategia experimental)

A ratas Wistar de 150 g de peso promedio, se les extrajeron los condrocitos para determinar la expresión de TLRs, MMPs y citocinas por qRT-PCR (10 ratas de 1, 3, 6, 8, 10 y 20D de OA, por experimento). En explantes de cartílago de cóndilos, se evaluó la expresión del TLR-2 y TLR-4 en las 3 zonas del cartílago (superficial, media y profunda) por inmunohistofluorescencia en microscopia confocal (1 rata de 3, 6, 8, 10 ó 20D de ejercicio por experimento). Por otro lado, para determinar el efecto de la vitamina D sobre la OA; se realizó una curva dosis respuesta de 4, 40, 400 y 4000 UI en ratas con 20 días de OA y se evaluó la hipertrofia de la superficie de la articulación como evidencia de daño. Finalmente, para evaluar el efecto de la dosis que disminuyó la hipertrofia de la superficie articular sobre las moléculas asociadas al daño durante la progresión, se determinaron los niveles de expresión de TLR-4, MMP-3, TNF- α e IL-1 β por qRT-PCR en ratas tratadas con vitamina D + ejercicio de alto impacto (EAI) y en ratas tratadas con vitamina D + EAI (3, 10 y 20 días) + 20 días de progresión (sin ejercicio) con o sin vitamina D (6 ratas por cada grupo). Fig. 5.

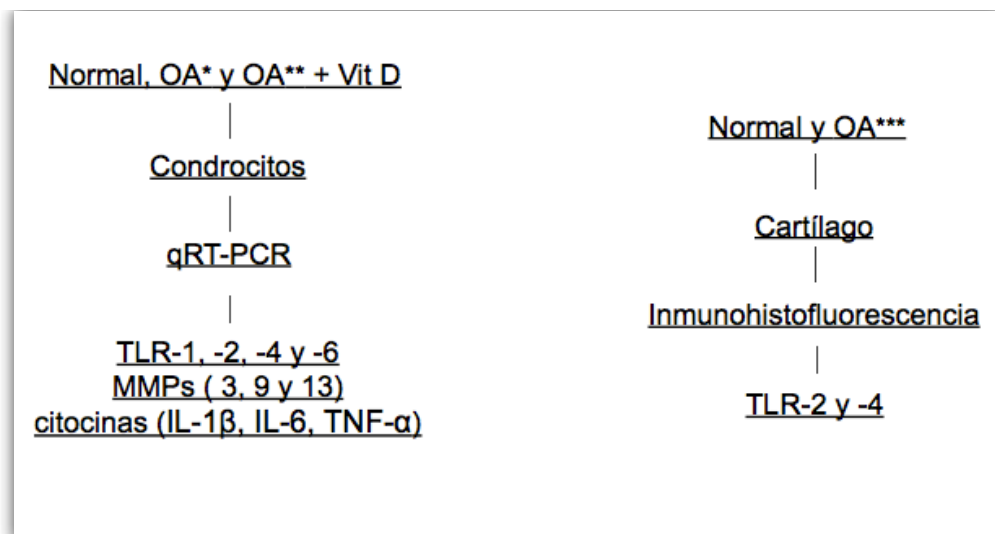


Fig. 5. Estrategia Experimental. Determinación de expresión de TLRs, MMPs y citocinas en condrocitos aislados y explantes de cartílago articular de rata con OA inducida, con y sin vitamina D. * OA de 1, 3, 6, 8, 10 y 20 días; ** OA de 3, 10 y 20; ***OA de 3, 6, 8, 10 y 20

MATERIAL Y MÉTODOS

Inducción de OA

Se realizó en ratas Wistar de 150 g de peso promedio, mediante menisectomía parcial de la parte interna de la pata derecha y ejercicio de alto impacto. Para la operación, las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de xilacina-ketamina (9-0.4 mg) por vía intraperitoneal.

La pata derecha fue rasurada en la parte interna y limpiada con benzal. Una vez que se identificó la zona en que se encontraba el menisco (entre platos tibiales y cóndilos femorales) se realizó una pequeña incisión a través de la cual se cortó el músculo hasta observar tanto el menisco como el ligamento colateral medio (MCL) que fue cortado. Con la ayuda de una aguja de sutura quirúrgica, que se pasa por debajo, el menisco se agarra y corta por los extremos disecándolo por completo de la articulación. Finalmente se suturo la piel. El ejercicio se realizó a partir del 2o día post-quirúrgico, 15 min diarios hasta concluir el tiempo de inducción a estudiar (1, 3, 6, 8, 10 ó 20 días)⁹⁵. Los animales fueron sacrificados en una cámara de CO₂ al día siguiente de que se concluyó con los días de ejercicio o después de los 20 días de progresión

Administración y dosis de vitamina D

La 1,25D₃ de cápsulas (Member's Marck, Bentonville, AR) fue disuelta en aceite de maíz. Las dosis empleadas fueron 100 ng (4 UI), 1µg (40 UI), 10µg (400 UI) y 100µg/kg/d (4000 UI) y administradas vía oral con una cánula esofagogástrica 14 horas después de que la luz fue encendida (14HALO⁹⁶). Las dosis fueron administradas diariamente 3 días antes de la cirugía y hasta el último día de ejercicio y/o progresión (20 días más sin ejercicio).

La progresión de la OA fue evaluada a los 3 días (fase aguda de OA), 10 días (fase intermedia de OA) y 20 días (fase crónica de la OA) en 3 grupos experimentales: Ratas Sin Vitamina durante el EAI + Progresión Sin Vitamina (SV+PSV, ratas tratadas con Vitamina durante el EAI + Progresión sin Vitamina (V+PSV) y ratas tratadas con Vitamina + Progresión con Vitamina (V+PV; ver Fig. 6)

- Grupo 1: Ratas CTL (día -4)
- Grupo 2: Ratas OA Sin Vitamina (SV; día 20)
- Grupo 3: Ratas OA con Vitamina (V; día 20)
- Grupo 4: Ratas OA Sin Vitamina y Progresión Sin Vitamina (SV+PSV; día 40)
- Grupo 5: Ratas OA con Vitamina y Progresión Sin Vitamina (V+PSV; día 40)
- Grupo 6: Ratas OA con Vitamina y Progresión con Vitamina (V+PV; día 40)

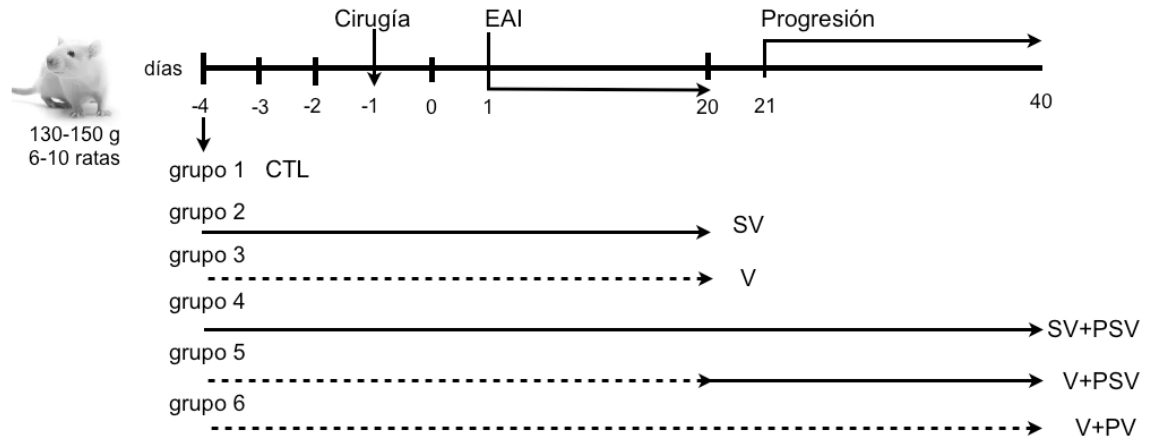


Fig. 6. Grupos experimentales. En cada grupo, el día representa el día de sacrificio correspondiente al grupo de 20 días de OA sin o con progresión. El mismo esquema que se muestra para el grupo 2 y 3, se aplicó para los grupos de 1, 3, 6, 8 y 10 días; mientras que el esquema de los grupos 4, 5, 6 se utilizó para ratas de 3, 10 y 20 días de ejercicio generando grupos de OA con progresión de 23, 30 y 40 días, respectivamente. La vitamina D (4 UI/kg/d) se administró diariamente vía oral con una cánula esofagogástrica 14 HALO. Control (CTL). → sin vitamina; - - -> suplementación con vitamina D.

Obtención de condrocitos

Una vez sacrificados los animales, se lavaron con una solución detergente, cloro y agua. El cartílago articular de los platos tibiales y cóndilos femorales se obtuvo de las patas posteriores derechas disecadas de cada rata con la ayuda de un bisturí con una hoja del número 11. El cartílago obtenido se sumergió en PBS. La digestión del cartílago se realizó con tripsina bovina al 0.4% (≥ 2500 USP U/mg. Research Organics, Clevely EUA) por 5 min y con colagenasa tipo II al 0.4% (300U/mg. Worthington Biochemical Corporation, Nueva Jersey EUA) por 4 h, ambas a 80 x g, protegidas de la luz y a 37°C en Sorvall Legend Micro 17 (Thermo Fisher Scientific, Selangor Darul Ehsan, Malaysia). Posteriormente, se eliminó el tejido restante y las células se centrifugaron a 80 x g 5 min a 4°C (microcentrifuga Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA), se descartó el sobrenadante y se le agregó 1 ml de

TRIZol (GIBCO, BRL). Para determinar la viabilidad y número de células, se tomó una alícuota y se observaron en el microscopio óptico (Leica DMLS, Alemania) en una cámara de Neubauer con tinción vital de azul de tripano al 0.4% en PBS.

Extracción de RNA total.

Los condrocitos (2 a 5×10^5) fueron lisados con 1 ml de TRIZol (GIBCO, BRL). El lisado se homogeneizó por pipeteo y se incubó 5 min a temperatura ambiente (TA) y se le adicionaron 0.2 mL de cloroformo (grado molecular, SIGMA). Se agitó vigorosamente durante 15 seg y se incubó 3 min a TA previo a la centrifugación de 15 min $12,000 \times g$ a 4°C . Se colectó la fase acuosa (~ 0.6 ml) y se le añadió 0.5 ml de isopropanol frío (-20°C) (grado molecular; IBI Scientific), se agitó e incubó 10 min a TA. Posteriormente, se centrifugó a $12,000 \times g$ y la pastilla (gel) se lavó con 1 mL de etanol al 70% frío (-20°C), mezclando y centrifugando a $7,500 \times g$ 5 min a 4°C . El RNA obtenido (pastilla), se dejó secar al aire de 5 a 10 min y se disolvió por pipeteo en 0.05 mL de agua libre de RNasas. Finalmente la muestra obtenida se incubó de 56 a 60°C 10 min y se determinó la concentración del RNA por espectrofotometría ($\lambda = 260$ nm).

La calidad de las muestras se determinó por la diferencia entre las abosorbancias de 260 y 280 nm. El RNA tuvo un valor promedio de A260/A280 de 1.87. La calidad del RNA también fue evaluado por electroforesis del RNA total seguido por la tinción con bromuro de etidio, observándose los rRNAs de 28S y 18S con un tamaño aproximado de 5 kb y 2 kb, respectivamente. El cDNA resultante tuvo un valor promedio de 1.86 de A260/A280.

Síntesis de cDNA

El cDNA total de los condrocitos se obtuvo mediante el método de RT-PCR, mediante el kit "high capacity cDNA reverse transcription" (Applied Biosystems, CA, USA). Para la síntesis de cDNA, se utilizó 1 μg de RNA libre de DNA con la mezcla de reactivos (*buffer*, dNTPs, *primers*, retrotranscriptasa, inhibidor de RNasas y agua libre de RNasas) en un volumen final de 20 μL .

La retrotranscripción se realizó en un termociclador Veriti (Applied Biosystems), bajo las siguientes condiciones: 25 °C por 10 min, 37 °C 120 min, 85 °C 5 min y 4 °C ∞. El cDNA sintetizado se cuantificó y almacenó a -70 °C.

Amplificación del cDNA por qRT-PCR.

Utilizando como templado ~160 ng del producto de la reacción de transcripción reversa, se preparó la mezcla reactiva para la amplificación en un volumen final de 6 µL, conteniendo 0.6 µL de oligos (tabla 3), 1.5 µM (para una concentración final de 150 nM), 2.5 µl de SYBR-Green (Fast SyBR-Green master mix. Applied Biosystems. CA, USA) y agua libre de RNasas y DNasas. En todos los casos se incluyó como control interno el gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y como control negativo la reacción sin cDNA. Para los amplificadores del TLR-2 y MMP-9 la concentración del cDNA utilizado fue de aproximadamente 1600 ng y la de oligos de 600 y 900 nM (concentración final) respectivamente.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se efectuó en un termociclador Step One (Applied Biosystems. CA, USA). La amplificación se completó a 95°C 20' y 35 ciclos a 95°C 3' y 60°C 30' más los tiempos y temperaturas establecidos para la curva de disociación. Los productos de PCR fueron cuantificados mediante el método de cuantificación relativa $\Delta\Delta C_T$ a partir del ciclo umbral (C_T ; ciclo umbral, por sus siglas en inglés). El valor de los genes en los condrocitos de rata fueron normalizados con los datos obtenidos del GAPDH utilizado como calibrador y los resultados expresados como veces de incremento con respecto al CTL (niveles de expresión relativa, $2^{-\Delta\Delta C_T}$).

Tabla 3. **Oligos diseñados para rata, utilizados para detectar la presencia de los genes**

Oligos	Tamaño (pb)	secuencia sentido/ secuencia antisentido	Tm
TLR1	165	5'-TACCCTGAACAACGTGGACA-3'	52
		5'-ATCGACAAAGCCCTCAGAGA-3'	52
TLR2	245	5'-GGAGACTCTGGAAGCAGGTG-3'	56
		5'-CGCCTAAGAGCAGGATCAAC-3'	54
TLR4	239	5'-CCAGAGCCGTTGGTGTATCT-3'	54
		5'-TCAAGGCTTTTCCATCCAAC-3'	50
TLR6	208	5'-GTCTCCCCACTTCATCCAGA-3'	54
		5'-CCCACGTTTACCCTTCTCAA-3'	52
MMP-3	173	5'-AGACAGGCACTTTTGGCG-3'	64
		5'-CTTCATGACCTCGGATAGCC-3'	64
MMP-9	194	5'-TCGAATCACGGAGGAAGC-3'	64
		5'-CCTAGCCCCAACTTATCCAG-3'	62
MMP-13	243	5'-CAAGGACCCTGGAGCCCTGA-3'	71
		5'-TGAGGGTGCAGACGCCAGA-3'	71
IL1 β	79	5'-CACCTCTCAAGCAGAGCACAG-3'	65
		5'-GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC-3'	65
IL6	79	5'-TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC-3'	68
		5'-AAACTCGAGTGACAAGCCCG-3'	68
TNF α	190	5'-GCAGCCTTGTCCCTTGAAGA-3'	66
		5'-TCCTACCCCCAATGTATCCG-3'	66
GAPDH	178	5'-GGTGAAGAATGGGAGTTGC-3'	66
			66

Inmunohistofluorescencia

El cartílago del cóndilo femoral lesionado se fijó en paraformaldehído al 4% en PBS durante 2h a temperatura ambiente y se lavó 3 veces con PBS. Posterior a la fijación, el tejido se dejó en sacarosa al 10% en PBS toda la noche y se cortó en el criostato. Una vez obtenidos los cortes, se colocaron en laminillas gelatinizadas al 0.5% con sulfato de potasio crómico al 0.05% y se guardaron a -20 °C para procesar los cortes del tejido al menos 2 días después. Los cortes se hidrataron con PBS 10 min, se permeabilizaron con PBS-Tween al 0.2% 10 min y se bloquearon con albúmina bovina libre de IgG al 0.2% en PBS-Tween por 20 min a TA; se lavaron 2 veces 5 min con PBS-Tween e incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario en PBS-

Tween. Al término de la incubación con el anticuerpo, los cortes se lavaron 3 veces con PBS-Tween y se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 h a TA en cámara húmeda, en oscuridad. se A continuación, se lavaron para hacer la contratinción con diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en PBS a una dilución 1:600 o con yoduro de propidio (IP) a una concentración de 10mg/mL (Sigma-Aldrich. San Luis. E.U.A). Finalmente, se le agregó 10 µL del medio de montaje para fluorescencia, Vectashield (Vector. Burlingame, CA) y se guardaron a -20°C protegidos de la luz hasta observar en el microscopio confocal (Leica TCS-SP5-DMI6000B con objetivos Plan NeoFluor, Alemania).

Tabla 4. Especificaciones de los anticuerpos utilizados.

	Marca	Dilución	Especificidad
TLR2 (policlonal de cabra IgG)	Santa Cruz (sc-16237: S-16)	1:150	Rata, ratón
TLR4 (policlonal de cabra IgG)	Santa Cruz (sc-16240: L-14)	1:150	Rata, ratón
Burro anti- cabra-FITC	Zymed	1:100	---

Análisis estadístico

Para los experimentos de cinética de OA y expresión de TLRs, MMPs y citocinas se evaluaron 5 experimentos independientes (n=5) y 3 experimentos independientes (n=3) para los análisis de dosis-respuesta de vitamina D y la progresión de la OA. El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa Graph Pad InStat (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de dos factores con la prueba de comparación de Bonferroni, para comparar los niveles de expresión de los días de OA con el CTL; mientras que el ANOVA de un factor con la prueba de comparación de Dunnet se utilizó para determinar la dosis de vitamina D. La prueba de t de *Student* se utilizó para comparar entre los grupos de progresión y para el análisis de correlación se utilizó la prueba de *Pearson*. Los datos se muestran como la media ± el error estándar (error estándar de la media; SEM). La significancia estadística es representada como p<0.05 (*), p<0.01 (**) ó p<0.001(***).

RESULTADOS

EXPRESIÓN DE LOS TLRs EN CONDROCITOS DURANTE LA INDUCCIÓN DE LA OA

Para evaluar la expresión del TLR-1, TLR-2, TLR-4 y TLR-6 durante el desarrollo de la OA, se aislaron condrocitos de cartílago de rata de 1, 3, 6, 8, 10 y 20 días posterior a la inducción y se evaluó los niveles de RNAm por RT-PCR cuantitativa. En la Fig. 7, se muestra que los TLR-1, TLR-2 y TLR-6 se expresaron en los condrocitos durante el tiempo de inducción de la OA sin mostrar diferencias significativas con el grupo CTL (Fig. 7A y 7B). La expresión de TLR-1 y TLR-2, mostraron un patrón similar de expresión (Fig. 7B) consistente con la cooperación entre estos dos receptores mediante su heterodimerización. En contraste se observó un incremento notorio en la expresión de TLR-4 a partir del día 8 (1.6 veces; * $p < 0.05$) que continuó hasta el día 20 (2.1 veces; *** $p < 0.001$), con una expresión máxima al día 10 (2.8 veces; *** $p < 0.001$; Figura 7A y 7C); observándose un incremento lineal significativo (* $p < 0.05$) durante la inducción ($R^2 = 0.8339$; Fig. 7C).

Mediante inmunohistofluorescencia se determinó la expresión del TLR-2 (Fig. 8) y del TLR-4 (Fig. 9) en las zonas superficial, media y profunda del cartílago de los diferentes grupos de estudio, mediante la suma de píxeles y el porcentaje de células positivas al receptor. En cuanto al TLR-2 (Fig. 8A-F), se pudo observar que la expresión en la zona media del cartílago aumentó en el día 10 de inducción de OA ($p < 0.001$; Fig. 8G), día en que la expresión del RNAm fue mayor (Fig. 7A), mientras que la expresión en la zona superficial y profunda se mantuvo sin cambios (Fig. 8G). El porcentaje de células capaces de expresar al receptor (Fig. 8H) se mantuvo sin cambios significativos a lo largo de la progresión de la enfermedad en un patrón de regulación semejante al observado por número de moléculas expresadas (suma de píxeles) en los últimos días de inducción.

Al evaluar la expresión de TLR-4 (Cy5; Fig. 9A-F), se observó una expresión similar entre las capas superficial y media con una marcada, pero no significativa, disminución en la expresión (Fig. 9G). Al evaluar el porcentaje de células positivas, éste se mantuvo constante entre los grupos evaluados (Fig. 9H). El hecho de que el porcentaje de células se haya mantenido alrededor del 80% de expresión con modestos cambios, sugiere que la regulación de los receptores se dió principalmente

por el número de receptores expresados por célula y no por el número de células que los expresaron. Los decrementos a lo largo del desarrollo de la OA, podrían explicarse por la endocitosis que ocurre tras la activación, como consecuencia del reconocimiento de su ligando, seguido de su reciclamiento e inducción de la expresión de más receptores en la superficie celular.

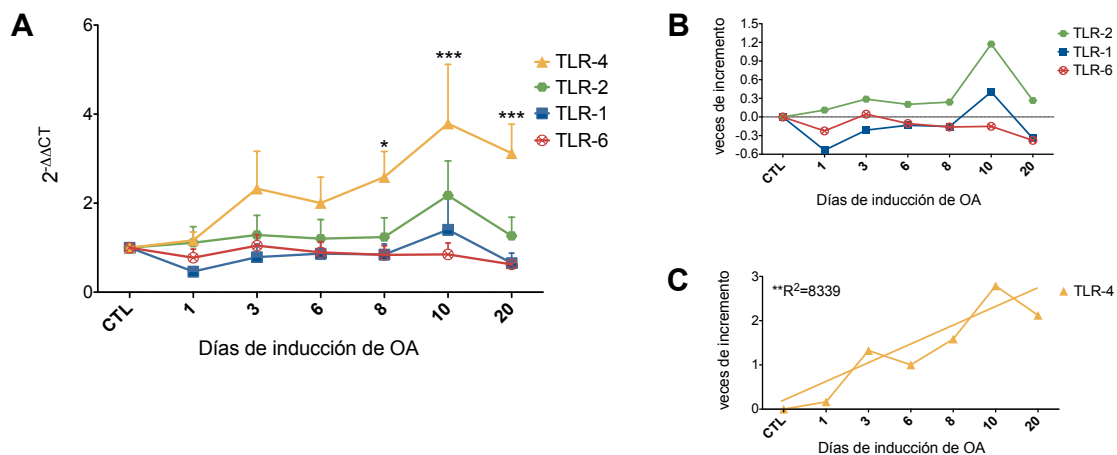


Fig. 7. **La expresión de TLR-4 se induce durante el desarrollo de la OA.** (A) Expresión relativa de TLR-4, TLR-2, TLR-1 y TLR-6 normalizada con respecto a GAPDH y presentada como $2^{-\Delta\Delta C_T}$. (B) TLR-2 y TLR-1 muestran un patrón similar de expresión durante la inducción de la OA mientras que TLR-6 parece regularse negativamente; los datos están presentados como veces de incremento con respecto al grupo control (CTL). (C) La expresión del TLR-4 mostró un incremento en su expresión con respecto al grupo CTL durante la inducción de la OA con una tendencia lineal significativa (** $p < 0.005$). Los resultados representan los datos de cinco experimentos independientes con un total de 50 ratas por grupo (días de OA). * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ determinados con el análisis de 2-factores ANOVA) con el la prueba de Bonferroni para comparar cada grupo con el CTL, barras de error, SEM.

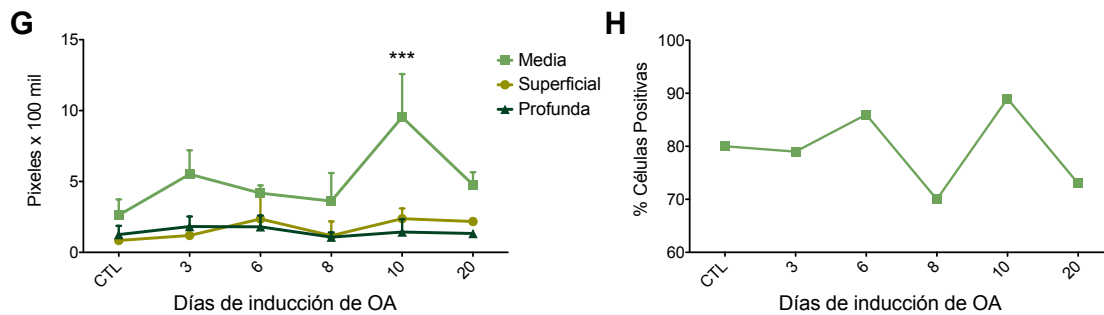
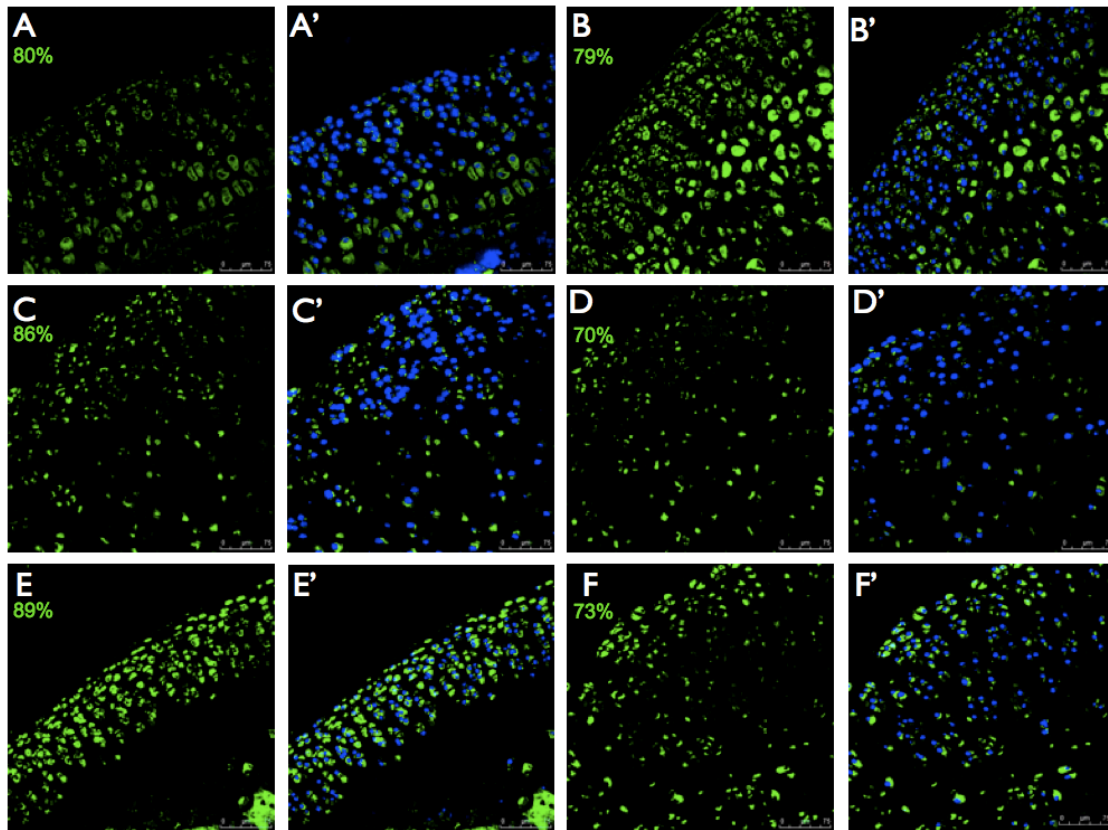


Fig. 8. **La expresión de TLR-2 cambia en la zona media del cartilago.** (A-F) La expresión del TLR-2 (FITC) se evaluó en las diferentes zonas del cartilago en los distintos días de desarrollo de la enfermedad y se compararon con respecto al control. La expresión fue evaluada al día 3 (B), 6 (C), 8 (D), 10 (E) y 20 (F) de OA. (A'-F') Sobreposición de canales en donde se muestra la expresión de TLR-2 en FITC y a los núcleos de los condrocitos en DAPI. (G) La expresión se determinó mediante la suma de pixeles en FITC de las tres zonas. (H) Porcentaje de células totales que expresaron al receptor. Los resultados representan los datos de 3 experimentos independientes con un total de 3 ratas y 6 a 9 campos por cada rata. **Escala de la barra= 75µm.** n=3

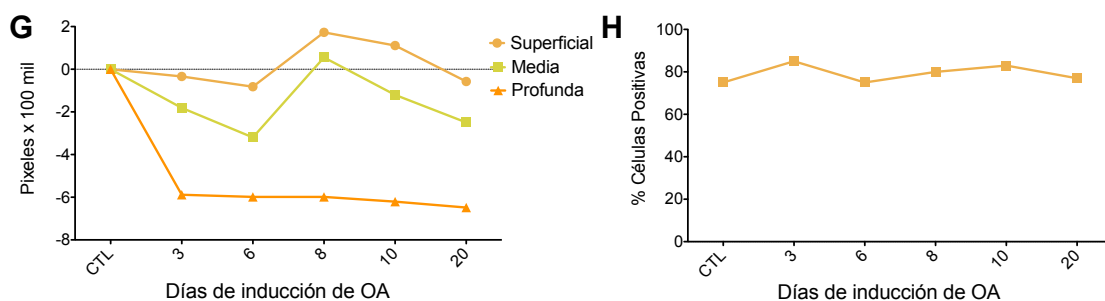
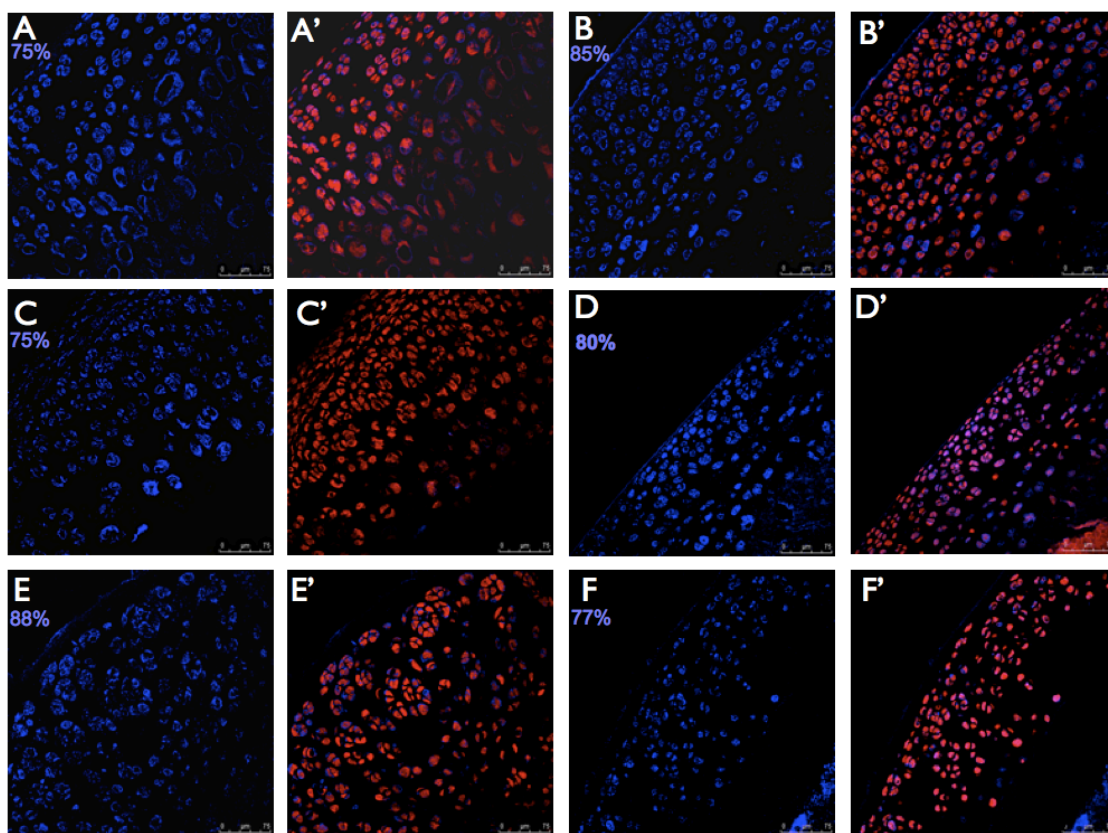


Fig. 9. **Expresión de TLR-4 en las diferentes zonas del cartílago.** La expresión del TLR-4 se evaluó en las diferentes zonas del cartílago en los distintos días de desarrollo de la enfermedad y se compararon con respecto al control (A-F). La expresión fue evaluada al día 3 (B), 6 (C), 8 (D), 10 (E) y 20 (F) de OA, mediante la suma de píxeles en Cy5. (A'-F') Sobreposición de canales en donde se muestra la expresión de TLR-4 en Cy5 y a los condrocitos con ioduro de propidio. (G) La expresión se determinó mediante la suma de píxeles en Cy5 en la zona superficial, media y profunda. (H) Porcentaje de células totales que expresan al receptor. Los resultados representan los datos de 1 rata y 9 campos analizados. **Escala de la barra= 75µm.**

EXPRESIÓN DE CITOCINAS Y MMPs EN LA INDUCCIÓN DE LA OA

La activación de TLR-4 induce la expresión de moléculas asociadas a daño como citocinas inflamatorias y metaloproteasas^{57, 71}. Por ello, se evaluó la expresión de los RNAm de IL-6, IL-1 β , TNF- α , MMP-3, MMP-9 y MMP-13. La expresión de IL-6 se mantuvo sin cambios durante el desarrollo de la OA (Fig. 10A) mientras que la de IL-1 β ($R^2=0.375$; Fig 10B) y de TNF- α ($R^2=0.4173$; Fig. 10C), mostró modificaciones en su expresión entre los diferentes días de inducción de la OA. El incremento de IL-1 β fue mayor el día 8 (19 veces; $p<0.001$; Fig. 10A y 10B), lo que sugiere que esta citocina se encuentra implicada desde el inicio de la enfermedad y durante el desarrollo de la misma. La expresión de las MMP-9 y -13 no presentó cambios significativos con el grupo CTL a lo largo de la inducción de la OA (Fig. 10D). Sin embargo, la expresión de MMP-3 incrementó en los grupos de 8 (1.8 veces; $p<0.01$) y 10 (2.1 veces; $p<0.01$) días de OA como se muestra en las Fig. 10D y 10E. El aumento en la expresión de TLR-4 observada durante la inducción de OA (Fig. 7C), se correlacionó con el incremento en la expresión de MMP-3 ($R^2=0.7692$; Fig. 11A y 11B), TNF- α ($R^2=0.7127$; Fig. 11C y 11D) y en menor medida con la IL-1 β ($R^2=0.3954$; Fig. 11E y 11F). Estos resultados sugieren que la activación de la vía de señalización de TLR-4 juega un papel importante en la patogénesis de la OA y podría activar la expresión de MMP-3, TNF α e IL-1 β . El incremento en la expresión de IL-1 β podría no depender totalmente de la activación de TLR-4, debido a que la expresión de IL-1 β también está regulada por la vía de señalización de los receptores tipo NOD⁹⁷.

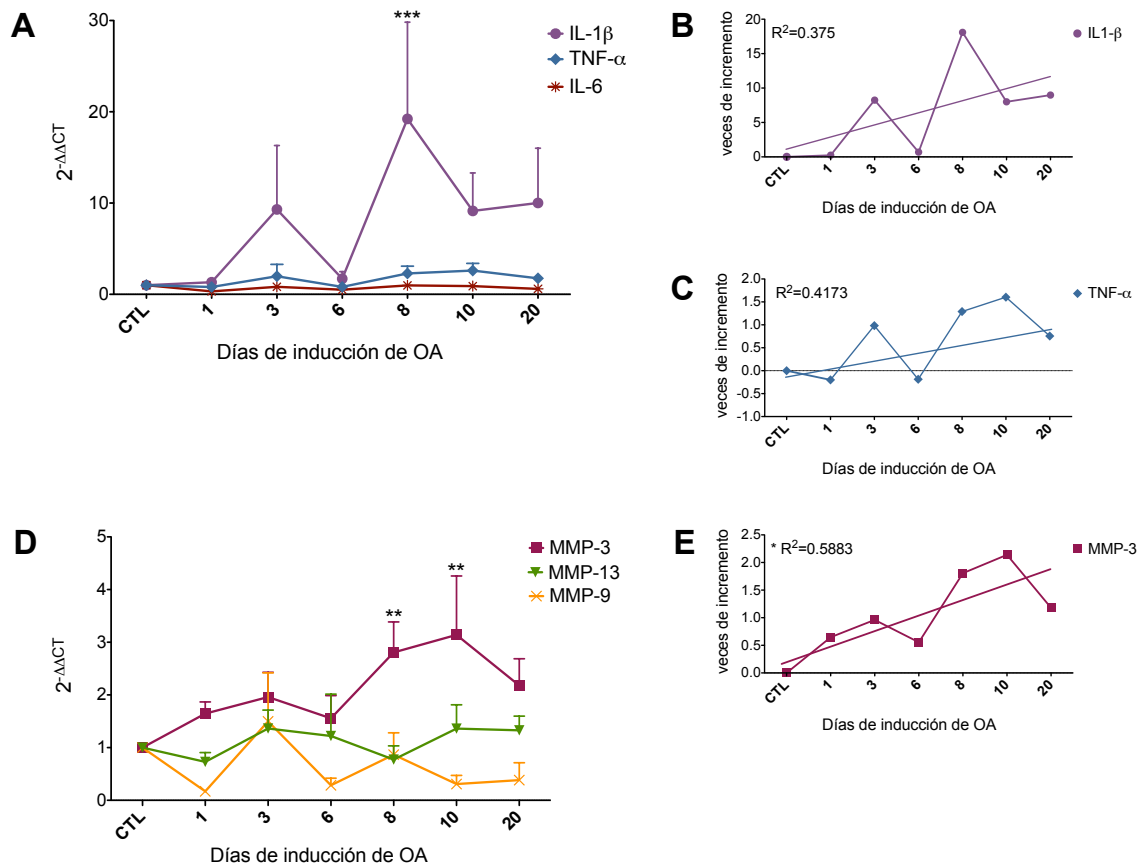


Fig. 10. La expresión de la IL-1β, TNF-α y de la MMP-3 incrementa en el desarrollo de la OA. Los condrocitos fueron obtenidos y procesados para el análisis la expresión de genes por qRT-PCR. **(A)** Expresión relativa de IL-1β, TNF-α e IL-6 normalizada con la expresión de GAPDH y expresada como 2^{-ΔΔCt}. IL-1β mostró una máxima expresión al día 8 de OA (19.22; ***p<0.001). **(B)** Expresión de IL-1β normalizada con la expresión de GAPDH presentada como veces de incremento (R² = 0.375). **(C)** La expresión de TNFα mostró cambios moderados durante la inducción de OA (R² = 0.4173) con respecto al CTL. **(D)** Expresión relativa de MMP-3, MMP-9 y MMP-13 normalizada con la expresión de GAPDH y expresada como 2^{-ΔΔCt}. **(E)** La expresión del MMP-3 mostró un incremento en su expresión con respecto al grupo CTL al día 8 (1.8 veces; **p<0.01) y 10 (2.1 veces; **p<0.01) de OA con una tendencia lineal significativa (R² = 0.5883; p<0.05). Los resultados representan los datos de cinco experimentos independientes con un total de 50 ratas por grupo. *p<0.05; **p< 0.01; ***p<0.001 fueron determinados con el análisis de ANOVA de 2-factores con la prueba de Bonferroni para comparar cada grupo con el CTL, barras de error, SEM.

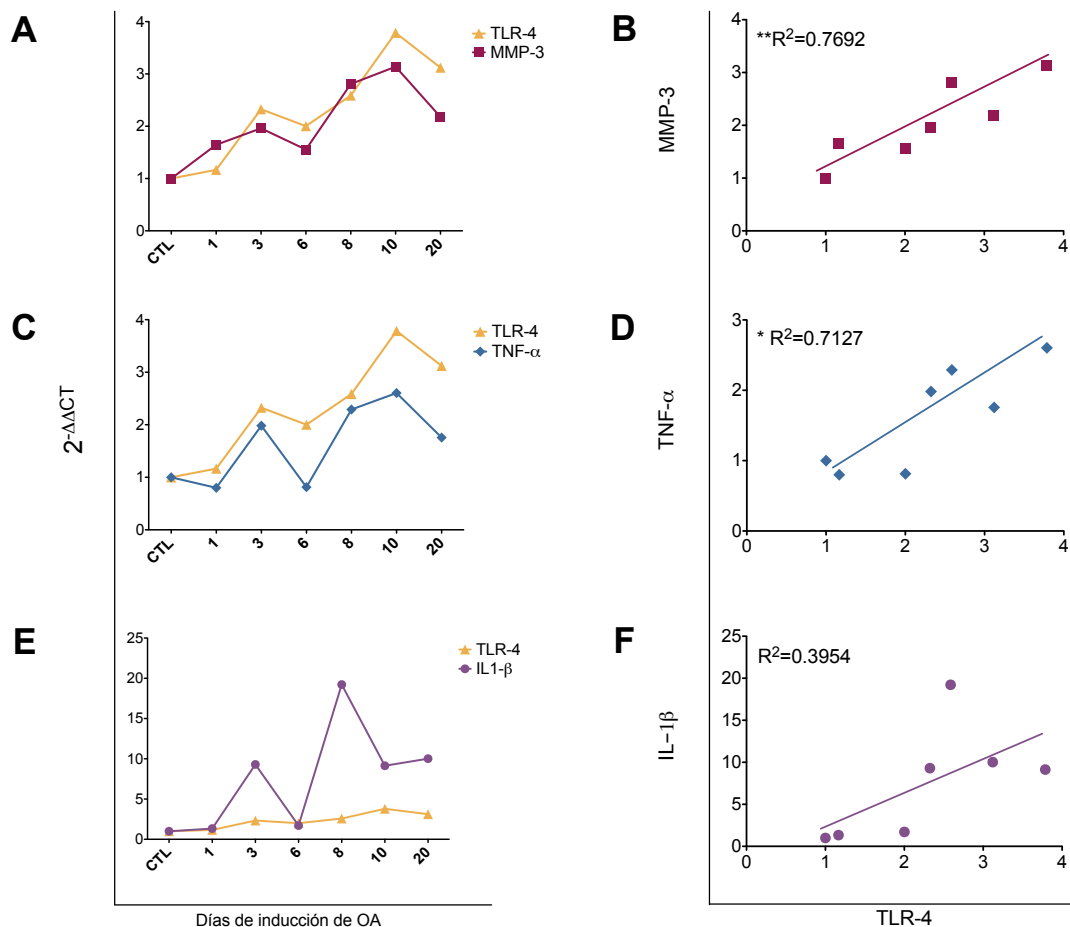


Fig. 11. La expresión de TLR-4 mostró una alta correlación con moléculas asociadas a daño en la OA. Expresión de TLR-4 comparada con la expresión de MMP-3 (A), TNF-α (C) e IL1-β (E), todas normalizadas con la expresión del gen GAPDH y presentados como $2^{-\Delta\Delta CT}$. Correlación entre la expresión relativa de TLR-4 y MMP-3 con una $R^2=0.7692$ (B); TLR-4 y TNF-α con una $R^2=0.7127$ (D) y TLR-4 con IL1-β con una $R^2=0.3954$ (F). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ fueron determinadas utilizando el análisis de correlación de Pearson.

EFFECTO DE LA VITAMINA D EN EL CARTÍLAGO OA (DOSIS-RESPUESTA)

A continuación, se determinó el efecto de diferentes dosis de vitamina D (4, 40, 400 y 4000 UI/kg/d) sobre el engrosamiento del cóndilo a los 20 días de inducción de OA a través de una curva dosis-respuesta. Para ello se midió el grosor de la superficie articular del cóndilo OA y del cóndilo no menisectomizado (derecho e izquierdo, respectivamente; ver Fig. 12) y la diferencia entre ellos fue tomada como indicador de severidad de hipertrofia en la OA. También, se evaluó el engrosamiento en los cóndilos de ratas de 20 días de OA sin vitamina D. La dosis de 4 UI/kg/día, fue la

única dosis que indujo una disminución ($0.34 \pm 0.047 \text{ mm}$; $p < 0.01$) en el engrosamiento de los cóndilos OA con respecto al grupo no tratado (Fig. 12).

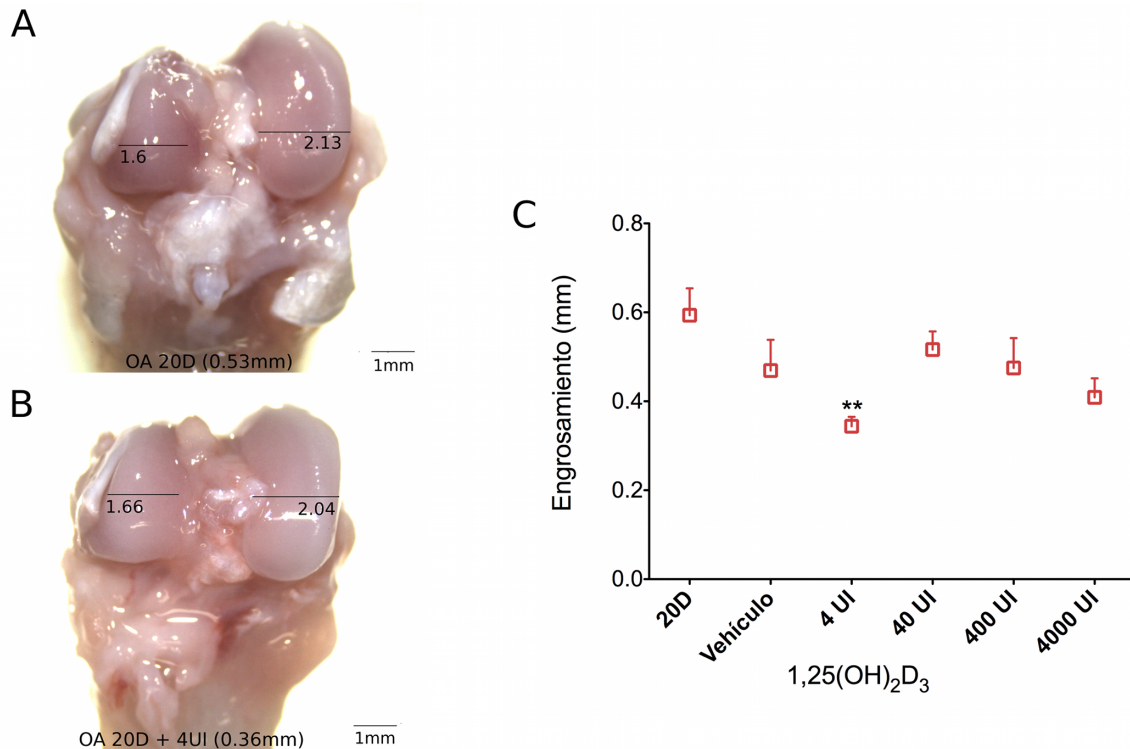


Fig. 12. **La vitamina D redujo la hipertrofia de la superficie articular de los cóndilos con OA.** Imágenes representativas de los cóndilos femorales de una rata no tratada (A) comparada con las el cóndilo femoral de una rata tratada con 4 UI/kg/d de vitamina D (B). La diferencia en el grosor fue tomada como indicador del grado de severidad de la hipertrofia en la OA. (C) La gráfica representa el promedio de engrosamiento a determinada dosis de vitamina D, de 3 experimentos independientes con un total de 15 ratas por grupo. La disminución del engrosamiento $0.34 \pm 0.047 \text{ mm}$ observada con una $**p < 0.01$ fue determinada mediante el análisis de ANOVA de 1-factor con la prueba de Dunnet para comparar cada grupo con el de 20D, barras de error, SEM. **Escala de la barra= 1 mm. 8 X.**

EFEECTO DE LA VITAMINA D EN LA INDUCCIÓN DE LA OA

Para evaluar si el efecto protector observado con 4UI de vitamina D involucra la modulación de TLR-4, se evaluó la expresión de TLR4, IL-1 β , TNF- α y MMP-3 durante las diferentes etapas de inducción de OA. A la inducción durante 3 días se les estableció como etapa aguda, a los 10 días como etapa intermedia y a los 20 días como crónica. Esta clasificación fue establecida con base a los resultados previos⁹⁵. La expresión de TLR-4 incrementó en la etapa crónica (5.89 veces; $p=0.0102$ prueba f) (Figura 13A), mientras que la expresión de MMP-3 incrementó desde la etapa intermedia (4.79-veces; $p=0.0246$ prueba f) hasta la crónica (4.13-

veces; $p=0.0116$ prueba f. Figura 13B). TNF- α también incrementó su expresión en ambas etapas de la enfermedad (10 días: 12.75-veces; $p=0.0004$ y 20 días: 5.31-veces; $p=0.0041$ f test), como se muestra en la Figura 13C. Mientras que la expresión de IL-1 β disminuyó en la etapa aguda (2.21-veces; $p=0.0104$ prueba f), e incrementó a los 10 días de inducción (12.75-veces; $p=0.0473$ prueba f) para finalmente, expresarse en los mismos niveles que el grupo SV en la etapa crónica de inducción (5.31-veces; $p=0.2422$ prueba f) (Figura 13D). Estos datos sugieren que el efecto protector de la vitamina D observado (Figuras 13E, 13F y 15), no se debe a la modulación transcripcional en la activación de TLR-4. En la figura 13F se puede observar, después de 20 días de inducción un daño severo con intensa hipertrofia e hiperplasia del cartílago que disminuyó con el tratamiento de vitamina D.

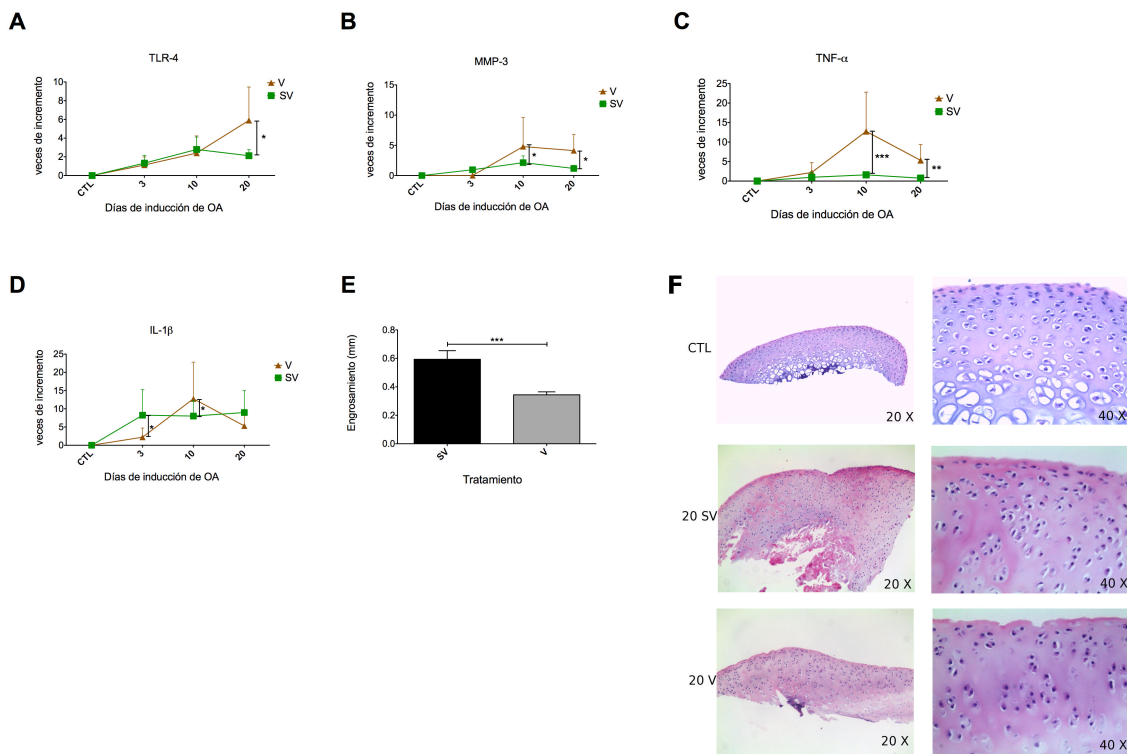


Figura 13. El efecto protector de la vitamina D es independiente de la modulación transcripcional de TLR-4. La evaluación fue realizada durante el periodo de inducción de la enfermedad. Expresión génica de TLR4 (A), MMP-3 (B), TNF-α (C) e IL-1β (D) de ratas en el grupo SV (■) comparado con el grupo V (▲). Los niveles de expresión fueron normalizados con la expresión de GAPDH y presentados como la diferencia de expresión en veces de incremento. E. Comparación de la hipertrofia (engrosamiento) de los cóndilos de ratas con 20 días de OA que fueron tratadas con vitamina D (V) con respecto a aquellas no suplementadas (SV). (F) Comparación morfológica por HE entre ratas control (CTL) y las ratas con 20 días de inducción tratadas con vitamina D (V) o que no fueron tratadas (SV). Los resultados mostrados son el resultado de datos obtenidos de 3 experimentos independientes con un total de 16 a 18 ratas (A-D), de 6 ratas por grupo (E). Imágenes representativas de 2 experimentos independientes (cortes y tinción realizado por la Dra. Hernández Cueto). (F) Las barras de error indican la SEM. La prueba de t con una prueba de F fue realizada; los asteriscos indican: *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001. Los grupos incluidos fueron los siguientes: V (suplementados con vitamina); SV (sin vitamina).

EFFECTO DE LA VITAMINA D DURANTE LA PROGRESIÓN DE LA OA

Con la finalidad de mimetizar la progresión natural de la OA, se evaluó el efecto de suplementar con vitamina D a ratas con inducción de OA y 20 días de progresión, como se describe en la figura 1. La expresión de TLR-4 mostró una regulación negativa al día 30 (28.61 veces; p=0.0125 prueba f) en el grupo V+PV comparado con el grupo SV+PSV (Fig. 14A). La expresión de MMP-3 fue similar entre los grupos evaluados (Fig. 14B). Mientras que la expresión de TNF-α presentó una regulación

negativa en el grupo V+PV en el día 30 comparado con los grupos V+PSV (39.55 veces; $p=0.0042$ prueba f) y SV+PSV (3.66 veces; $p=0.0244$ prueba f; Fig. 14C). Finalmente, la expresión de IL-1 β también mostró una regulación negativa en el día 40 (51.97 veces; $p=0.0168$ prueba f) entre el grupo V+PV y el V+PSV (Fig. 14D) y una regulación positiva en el día 23 (1.09 veces; $p=0.0491$ prueba f) con respecto al grupo no tratado: SV+PSV (Fig. 14D).

A diferencia del efecto protector de la vitamina D mostrado durante la inducción, no se observó evidencia de éste efecto durante la progresión. En la figura 13E y en la figura 14 se muestra que el engrosamiento de cada uno de los grupos no se ve modificado en el día 40. En este caso, el daño fue correlacionado con los cambios observados en la expresión génica de TLR-4, MMP-3 y TNF- α .

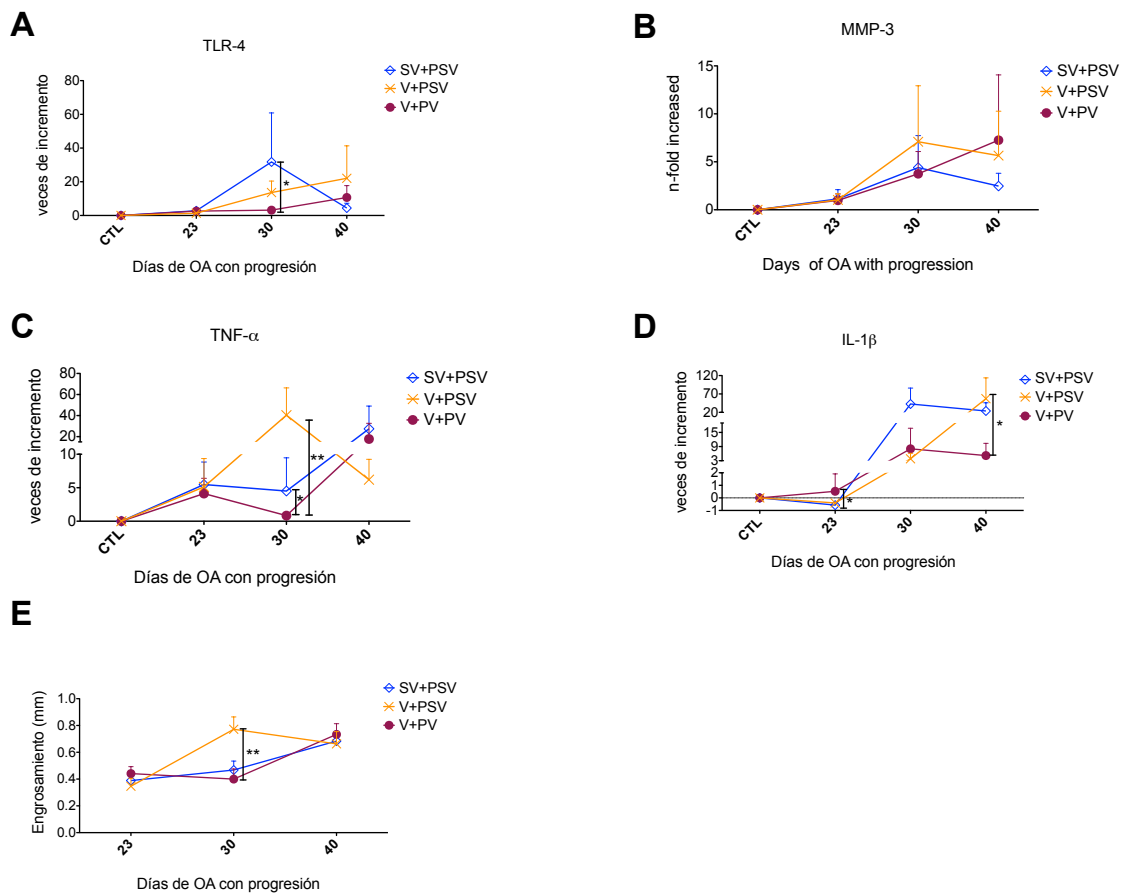


Fig. 14. **La vitamina D no tiene un efecto sobre la severidad de la OA.** Expresión génica de TLR-4 (A), MMP-3 (B), TNF- α (C) e IL-1 β (D) de ratas en el grupo V+PV (●) comparada con los grupos V+PSV (x) y SV+PSV (◇). Los niveles de expresión fueron normalizados con la del gen GAPDH y son presentados como la diferencia de expresión en veces de incremento. E. Comparación de la hipertrofia (engrosamiento) de los condilos de ratas de los grupos V+PV (●), V+PSV (x) y SV+PSV (◇). Los datos mostrados son el resultado de datos obtenidos de 3 experimentos independientes con un total de 16 a 18 ratas (A-D) o de 12 a 16 ratas (E). Las barras de error indican el SEM. La prueba de t con una prueba de F se realizó; los asteriscos indican: * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$. Los grupos incluidos fueron los siguientes: V+PV (suplementados con vitamina durante la inducción y progresión); V+PSV (suplementadas con vitamina durante la etapa de inducción); y SV+PSV (grupo no suplementado con vitamina en ninguna de las etapas). Las ratas fueron diariamente suplementadas con 4 UI de vitamina D.

EFEECTO DE LA VITAMINA D EN EL ENGROSAMIENTO

La participación de las moléculas asociadas al daño (citocinas y MMPs) en la OA, inferida por los cambios en los niveles de expresión de RNA, coincide con la hipertrofia del cartílago, la erosión del hueso y cartílago y el incremento en el tejido fibrótico en los bordes de la articulación. La fibrosis que inicia en la zona de carga y

se extiende conforme progresa la enfermedad, promueve una superficie rugosa y el incremento en el tamaño del cóndilo (Fig. 15). En figura 14E se observa el incremento que tuvieron los cóndilos en los animales del grupo que recibió vitamina D durante el EAI y que fueron sacrificados sin progresión. Tal como se mostró en la Fig. 12, cada cóndilo (derecho e izquierdo) fue medido para evaluar el efecto de la progresión de la OA sobre el engrosamiento del cóndilo y determinar si la vitamina D tenía un efecto sobre la progresión.

Al igual que para las moléculas asociadas al daño, se realizó una comparación entre el engrosamiento en los grupos suplementados con vitamina D (V+PV) y los grupos que solo recibieron vitamina D durante el EAI (V+PSV; Fig. 14E y 15) y el grupo que nunca fue suplementado con la vitamina D (SV+PSV; Fig. 14E y 15). La única diferencia significativa observada fue a los 10 días de OA entre los grupos V+PV y V+PSV, el mismo grupo que mostró menos expresión de MMP-3, TLR-4, y TNF- α . El análisis de correlación entre la expresión de MMP-3 y el engrosamiento en el grupo OA suplementado con vitamina D (V+PV) mostró una correlación de $R^2=0.7013$ (Fig. 16), lo que sugiere que la expresión de esta MMP está asociada con el grado de hipertrofia.

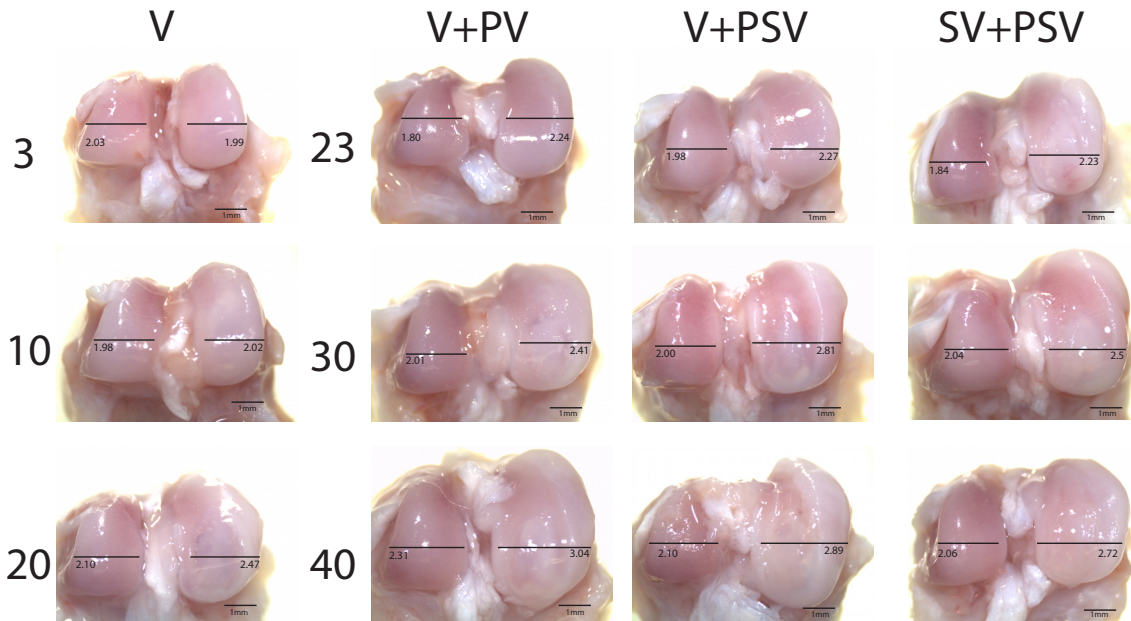


Fig 15. La vitamina D reduce la hipertrofia inducida por la progresión observada en ratas con 10D de OA. Imágenes representativas de rodillas de ratas tratadas con vitamina D durante el ejercicio de alto impacto (EAI). Ratas tratadas con vitamina D durante el EAI (V) y durante la progresión de 20días (V+PV), ratas tratadas con vitamina D solamente en el periodo de ejercicio (V+PSV) y ratas sin tratamiento con vitamina D y progresión (SV+PSV). Imágenes representativas de 3 experimentos independientes con un total de 12 a 16 ratas por grupo. **Escala de la barra= 1 mm. 12.5 X.**

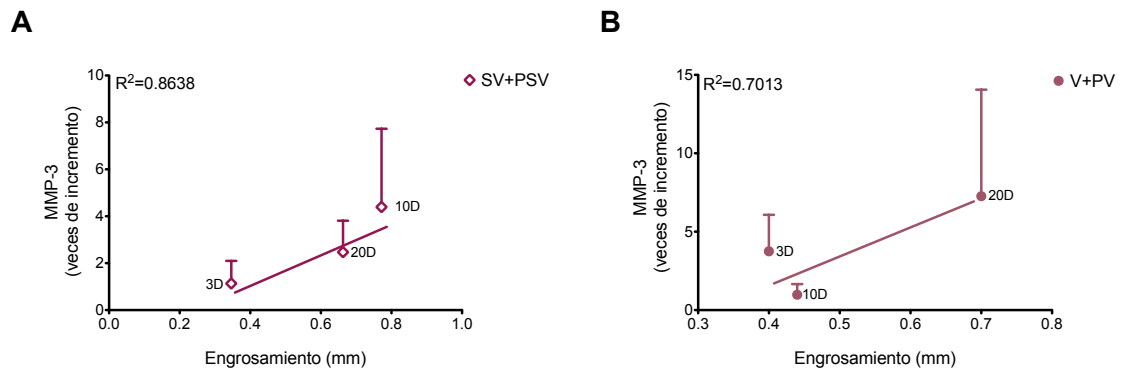


Fig. 16. La expresión de MMP-3 se correlaciona con el engrosamiento del cartilago en ratas suplementadas con vitamina D. Correlación entre la expresión de MMP-3 y el engrosamiento observado en el cartilago obtenido de ratas con 3, 10 y 20 días de OA con la progresión (A) y con progresión suplementadas con vitamina D (B). La correlación tuvo una $R^2=0.8638$ y de 0.7013 respectivamente, y se determinó utilizando el análisis de Pearson.

DISCUSIÓN

El presente estudio demostró que la vía de señalización de TLR-4 participa en la expresión de MMP-3, IL-1 β y TNF- α durante el desarrollo de la OA. También mostró que la vitamina D tiene un efecto protector, observado tanto a nivel histológico como al evaluar en la anchura del cóndilo durante la inducción de la OA, que se observó aún cuando la expresión de los genes previamente mencionados incrementaron. Al evaluar este efecto en la progresión de la OA se observó que a pesar de que la expresión de TLR-4 e IL-1 β disminuyó esto no fue suficiente para mejorar de manera importante la hipertrofia de los cóndilos.

Aunque los condrocitos del cartílago humano expresan todos los TLRs (1-9)⁶⁹, solo la expresión de TLR-2 y TLR-4 incrementa en los condrocitos OA^{57, 98}. Algunos estudios muestran que cuando los condrocitos OA son estimulados *in vitro*, incrementan la expresión de TLR-2, induciendo la síntesis de PGE₂, MMPs (-1, -3 y -13) y NO^{53, 57, 70}. De manera similar, la estimulación de TLR-4 de condrocitos de tejido normal induce la síntesis de TNF- α , IL-1 β , MMP-13 y de la óxido nítrico sintasa inducible^{69, 99}. En este trabajo se observó que la expresión de TLR-4 incrementó durante la inducción de la OA *in vivo*, y que correlacionó con la de TNF- α , IL-1 β y MMP-3, mientras que TLR-1, TLR-2, TLR-6, IL-6, MMP-9 y MMP-13 permanecieron sin cambios durante el desarrollo de la enfermedad. Debido a que la vía de señalización de TLR-4 induce la síntesis de TNF- α , IL-1 β y MMP-3, estos datos sugieren que la señalización de TLR-4 es importante para inducir la respuesta patofisiológica, favoreciendo la inflamación y degradación del cartílago en la OA,

De acuerdo a las etapas de la OA sugeridas para el establecimiento crónico de la enfermedad (inicio del estímulo, reparativa y degradativa)^{29, 100}. El incremento observado en el día 8 de inducción de la OA, de la mayoría de las moléculas evaluadas (TLRs, citocinas y MMPs), sugiere que es en ese día en el que se comienza a perder la capacidad para recuperar la homeostasis y probablemente dando inicio a la etapa degradativa.

La activación de la vía de los TLRs induce la expresión del receptor de la vitamina D (VDR) y CYP27B1 (1 α -hidroxilasa), enzima que convierte a la 25-hidroxicolecalciferol en 1,25(OH)₂D₃, promoviendo la inmunidad innata a través de la activación del

VDR¹⁰¹. Se ha reportado que p65, subunidad de NF- κ B, interacciona directamente con el VDR modulando las respuestas vía VDR y TLR ¹⁰²⁻¹⁰⁴. El resultado de esta relación transcripcional es la regulación de genes blanco de ambos receptores. Por esta razón, se evaluó si el efecto protector de la vitamina D propuesto¹⁰⁵ se debe a la modulación de los TLRs, citocinas y MMPs a nivel transcripcional⁷¹ o si la vitamina D en realidad esta asociada con la severidad de la enfermedad⁵⁰. En este sentido, se ha sugerido que la expresión del VDR esta asociado con la expresión de MMP-3 en el cartílago OA⁵⁰ y con el incremento de citocinas inflamatorias¹⁰⁶. En este estudio, se observó que el suplementar a los animales con vitamina D, modula diferencialmente la expresión génica de TLR-4, TNF- α , IL-1 β y MMP-3 en un modelo de inducción y progresión de OA en rata.

La vitamina D promovió un incremento en la expresión de TLR-4 durante la inducción (20 días de EAI), pero una disminución durante la progresión (grupo de progresión de 30 días). Estos efectos antagonistas podrían deberse a la sobrecarga mecánica constante a la que es sometida la articulación por el EAI diario, lo que promueve la activación de la inflamación durante la inducción de la OA, sobrepasando los efectos benéficos de la vitamina D. Estos podría ser explicado por un reporte reciente que indica que el efecto de la vitamina D precede a la activación de los TLRs, dado que no se observa ningún efecto cuando la vitamina es administrada al mismo tiempo que se estimula la activación de los TLRs¹⁰⁷. Estos datos y los nuestros sugieren que la vitamina D, debe ser administrada antes de que el daño del cartílago ocurra.

Sin embargo, además de los efectos diferenciales de la vitamina D en ambas etapas del desarrollo de la enfermedad (inducción y progresión), también se han descrito efectos duales en la modulación de la expresión de citocinas y metaloproteasas que dependen del tipo celular (fibroblastos de la sinovial, monocitos/macrófagos y condrocitos)^{50, 108}. Se ha reportado que individuos sanos con niveles de vitamina D altos expresan menos TLRs en la superficie de células mononucleares de sangre periférica y que esta disminución está asociada con una menor producción de las citocinas IL-1 β y TNF- α ¹⁰⁹. Sin embargo, en macrófagos derivados de monocitos humanos, activados con LPS, la vitamina D estimula la producción de IL-1 β ¹⁰⁶ y disminuye la de TNF- α ^{71, 109}. En este trabajo, se observó que la vitamina D indujo ambos efectos en esas citocinas, favoreciendo el incremento de IL-1 β a los 10 días

de OA y la disminución en el grupo de progresión de 40 días de OA (V+PV) con efectos similares para TNF- α .

Este efecto supresor e inductor de la vitamina D también ha sido descrito en la expresión de las metaloproteasas. En cartílago OA humano la vitamina D se ha asociado con la expresión de la MMP-3¹¹⁰. Estudios *in vitro*, en condrocitos humanos, muestran que la vitamina D induce la producción de la MMP-1, MMP-3 y PGE₂ al ser estimulados con IL-1 β , mientras que reduce su expresión en fibroblastos de la sinovial de pacientes con AR^{50, 110}, lo que denota la posibilidad de que ambos escenarios están presentes en la articulación OA contribuyendo al microambiente anti- o pro-inflamatorio final del cartílago. El efecto *in vitro*, descrito para la MMP-3 en los condrocitos concuerda con los resultados obtenidos *in vivo* en este trabajo, con los grupos de inducción y con el grupo de progresión de 40 días, en donde su expresión se vio favorecida. Estos datos sugieren que el efecto de la vitamina D no solo depende del tipo celular sino del estado de activación de la célula, determinado por el ambiente inflamatorio en el que se encuentre.

El resultado de esta regulación en las citocinas y MMPs, son los cambios físicos en el cartílago OA que incluyen fibrosis, rugosidad y desgaste de la superficie articular y la formación de osteofitos que se vuelven más prominentes conforme progresa la enfermedad⁵⁰ y que resultan en la hipertrofia del cartílago articular. Para evaluar la hipertrofia en este modelo, se midieron y compararon los cóndilos derecho e izquierdo, observando que el engrosamiento (en mm) permanece sin cambios significativos, excepto cuando se comparó al grupo de progresión de 30 días, tratado con vitamina D durante la progresión (V+PV), contra el grupo que solo fue tratado durante los días de inducción y no durante la progresión (V+PSV), en donde se observó una disminución en el engrosamiento en el primer grupo, que correlaciona con la menor expresión génica de TLR-4, MMP-3 y TNF- α . Estos resultados, que corresponden al inicio de la etapa crónica de OA, podrían estar en concordancia con datos epidemiológicos que encuentran que la asociación entre la deficiencia de vitamina D y la OA solamente se da en determinados grupos de pacientes^{105, 110-111}.

El hecho de que el efecto protector sobre la hipertrofia del cóndilo OA ocurra con dosis bajas de vitamina D (4 IU) y no en dosis más elevadas (40-4000 IU), podría deberse al efecto dual previamente descrito sobre las diferentes poblaciones

celulares presentes en la articulación.^{50, 108}. Se ha reportado que la administración de dosis elevadas de vitamina D inducen efectos secundarios como hipercalcemia e hiperfosfatemia⁹⁶. Sin embargo, no existe un estudio farmacocinético adecuado que establezca los efectos de la vitamina D sobre el cartílago. Además, otros factores deben ser tomados en consideración como son la expresión VEGF, factores de crecimiento¹¹² y MMPs^{108, 112-113}, ya que además de la regulación en la inflamación y el daño, la vitamina D podría también contribuir al incremento de otros factores altamente asociados con la progresión de la OA^{50, 114}.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo indican que la vitamina D podría jugar un papel importante en la fisiopatología de la OA y que sus efectos sobre la OA podrían reflejar el estado de activación celular. Se requieren de más estudios para evaluar el papel de la vitamina D en la regulación de otras moléculas asociadas con el proceso reparador o degenerativo en el cartílago osteoartrotrítico. Además, debido a que se ha reportado que mujeres sanas con altos niveles de vitamina D en suero tienen menos concentraciones de TNF- α ¹¹⁵, es importante establecer si en humanos sanos con niveles serológicos adecuados de vitamina D la suplementación con dicha vitamina conlleva a una mejor respuesta que en aquellos sujetos cuyos niveles de vitamina son bajos.

CONCLUSIÓN

La señalización a través de TLR-4 es el mecanismo proinflamatorio en la osteoartritis que resulta en el incremento en la expresión génica de MMP-3, IL-1 β y TNF- α promoviendo la inflamación y degradación del cartílago. La vitamina D juega un papel importante en la patofisiología de la enfermedad y tiene un efecto protector durante la inducción de la OA que se pierde conforme la enfermedad progresa.

PERSPECTIVAS

Evaluar el efecto de la suplementación de la vitamina D por tiempos mas prolongados previos a la inducción de la OA. Así como la farmacocinética de la vitamina D en los distintos tejidos de la articulación asociados a la OA (hueso, cartílago, sinovial).

REFERENCIAS

- 1 Wieland H, Michaelis M, Kirschbaum B, Rudolphi K. (2005). Osteoarthritis- an untreatable disease? *Nature* **4**: 331-345.
- 2 Cardiel M, Rojas-Serrano J. (2002). Community based study to estimate prevalence, burden of illness and help seeking behavior in rheumatic diseases in Mexico City. A COPCORD study. *Clin Exp Rheumatol* **20**: 617-624.
- 3 Espinosa R, Hernández L, Arroyo C. (2005). Prevalence (PV) of musculoskeletal complaints (MSC) in Mexico. *Arthritis Rheum* **52**: S406.
- 4 DePavia-Mota, Gonzáles M, Cortés B. (2005). Manejo de la osteoartrosis en medicina familiar y ortopedia. *Arch Med Fam* **7**: 93-98.
- 5 Peláez-Ballestas I, Sanin LH, Moreno-Montoya J, Alvarez-Nemegyei J, Burgos-Vargas R, *et al.* (2011). Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology. *J Rheumatol Suppl* **86**: 3-8.
- 6 Gaspar-Carrillo S, Guevara-López U, Covarrubias-Gómez A, Leal-Gudiño L, Trejo-Angeles B. (2007). Evaluación de la funcionalidad en el paciente con osteoartrosis degenerativa. *Revista Mexicana de Anestesiología* **30**: 20-25.
- 7 Valdes AM, Hart DJ, Jones KA, Surdulescu G, Swarbrick P, *et al.* (2004). Association study of candidate genes for the prevalence and progression of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **50**: 2497-2507.
- 8 Valdes AM, Van Oene M, Hart DJ, Surdulescu GL, Loughlin J, *et al.* (2006). Reproducible genetic associations between candidate genes and clinical knee osteoarthritis in men and women. *Arthritis Rheum* **54**: 533-539.
- 9 Valdes AM, Spector TD. (2011). Genetic epidemiology of hip and knee osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **7**: 23-32.
- 10 Henrotin Y, Lambert C, Couchourel D, Ripoll C, Chiotelli E. (2011). Nutraceuticals: do they represent a new era in the management of osteoarthritis? - a narrative review from the lessons taken with five products. *Osteoarthritis Cartilage* **19**: 1-21.
- 11 Arden NK, Crozier S, Smith H, Anderson F, Edwards C, *et al.* (2006). Knee pain, knee osteoarthritis, and the risk of fracture. *Arthritis Rheum* **55**: 610-615.
- 12 Aspden RM. (2011). Obesity punches above its weight in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **7**: 65-68.
- 13 Roos EM, Herzog W, Block JA, Bennell KL, Medscape. (2011). Muscle weakness, afferent sensory dysfunction and exercise in knee osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **7**: 57-63.
- 14 Arden N, Nevitt MC. (2006). Osteoarthritis: epidemiology. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **20**: 3-25.
- 15 Das SK, Farooqi A. (2008). Osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **22**: 657-675.

- 16 Lozano-Ascencio R, Frenk-Mora, González-Block M. (1994). El peso de la enfermedad en adultos mayores. *Salud Pública Mex* **38**: 541-546.
- 17 Contreras-Hernández I, Mould-Quevedo J, Torres-González R, Goycochea-Robles M, Pacheco-Domínguez R, *et al.* (2008). Cost-effectiveness analysis for joint pain treatment in patients with osteoarthritis treated at the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS): Comparison of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS) vs. Cyclooxygenase-2 selective inhibitors. *Cost Eff Resour Alloc* **6**: 1-13.
- 18 CONAPO. (2007). <http://www.conapo.gob.mx>. Feb 01, 2012.
- 19 Grotle M, Hagen K, Natvig B, Dahl F, Kvien T. (2008). Obesity and osteoarthritis in knee, hip and/or hand: an epidemiological study in the general population with 10 years follow-up. *BMC Musculoskelet Disord* **9**: 132.
- 20 van der Kraan PM. (2010). Osteoarthritis and a high-fat diet: the full 'OA syndrome' in a small animal model. *Arthritis Res Ther* **12**: 130.
- 21 García-Olivera I. (2002). Acceso a la atención especializada y su impacto en el enfermo reumático. *Med Int Mex* **18**: 135-136.
- 22 García-García E, De la Llata-Romero M, Kaufer-Horwitz M, Tusié-Luna M, Calzada-León R, *et al.* (2008). Grupo académico para el estudio, la prevención y el tratamiento de la obesidad y el síndrome metabólico de la Comisión Coordinadora de los Institutos Nacionales de Salud, Hospitales Federales de Referencia y Hospitales de Alta Especialidad. *Salud Publica Mex* **50**: 530-547.
- 23 Meulenbelt I, Kraus V, Sandell L, Loughlin J. (2011). Summary of the OA biomarkers workshop 2010 - genetics and genomics: new targets in OA. *Osteoarthritis Cartilage* **19**: 1091-1094.
- 24 Loughlin J. (2005). The genetic epidemiology of human primary osteoarthritis: Current status. *Expert Rev Mol Med* **7**: 1-12.
- 25 Magana J, Galvez-Rosas A, Gonzalez-Huerta C, Duarte-Salazar C, Lara-Alvarado L, *et al.* (2009). Association of the calcitonin gene (ca) polymorphism with osteoarthritis of the knee in a mexican mestizo population. *Knee* **17**: 157-160.
- 26 Gálvez-Rosas A, González-Huerta C, Borgonio-Cuadra V, Duarte-Salazar C, Lara-Alvarado L, *et al.* (2010). A COL2A1 gene polymorphism is related with advanced stages of osteoarthritis of the knee in Mexican Mestizo population. *Rheumatol Int.* **30**: 1035-1039.
- 27 Roach H, Aigner T, Kouri J. (2004). Chondroptosis: A variant of apoptotic cell death in chondrocytes? *Apoptosis* **9**: 265-277.
- 28 Tesche F, Miosge N. (2004). Perlecan in late stages of osteoarthritis of the human knee joint. *Osteoarthritis Cartilage* **12**: 852-862.
- 29 Kouri J, Lavalle C. (2006). Do chondrocytes undergo "Activation" And "Transdifferentiation" During the pathogenesis of osteoarthritis? A review of the ultrastructural and immunohistochemical evidence. *Histol Histopathol* **21**: 793-802.

- 30 Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier J, Roughley P. (2008). Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **22**: 351-384.
- 31 Saito T, Fukai A, Mabuchi A, Ikeda T, Yano F, *et al.* (2010). Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2alpha during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nat Med* **16**: 678-686.
- 32 Velasquillo C, Garciadiego-Cázares D, Almonte M, Bustamante M, Ibarra C, *et al.* (2007). Expression of MIG-6, WNT-9A, and WNT-7B during osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci* **1117**: 175-180.
- 33 Studer R, Jaffurs D, Stefanovic-Racic M, Robbins P, Evans C. (1999). Nitric oxide in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **7**: 377-379.
- 34 Lopez-Armada M, Carames B, Lires-Dean M, Cillero-Pastor B, Ruiz-Romero C, *et al.* (2006). Cytokines, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta, differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* **14**: 660-669.
- 35 Kim J, Xu M, Xo R, Mates A, Wilson G, *et al.* (2010). Mitochondrial DNA damage is involved in apoptosis caused by pro-inflammatory cytokines in human OA chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* **18**: 424-432.
- 36 Hashimoto S, Nishiyama T, Hayashi S, Fujishiro T, Takebe K, *et al.* (2009). Role of p53 in human chondrocyte apoptosis in response to shear strain. *Arthritis Rheum* **60**: 2340-2349.
- 37 Blanco F, Ochs R, Schwarz H, Lotz M. (1995). Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Phatol* 75-85.
- 38 Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D, Coutts R, Lotz M. (1998). Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **41**: 1266-1274.
- 39 Kim H, Blanco F. (2007). Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage. *Current Drug Targets* **8**: 333-345.
- 40 Mak B, Wang Q, Laschinger C, Lee W, Ron D, *et al.* (2008). Novel function of perk as a mediator of force-induced apoptosis. *J Biol Chem* **283**: 23462-23472.
- 41 Pérez H E, Luna M J, Rojas M L, Kouri JB. (2005). Chondroptosis: An immunohistochemical study of apoptosis and Golgi complex in chondrocytes from human osteoarthritic cartilage. *Apoptosis* **10**: 1105-1110.
- 42 Blom A, Van der Kraan P, Van den Berg W. (2007). Cytokine targeting in osteoarthritis. *Current Drug Targets* **8**: 283-292.
- 43 Almonte-Becerril M, Navarro-Garcia F, Gonzalez-Robles A, Vega-Lopez MA, Lavalle C, *et al.* (2010). Cell death of chondrocytes is a combination between apoptosis and autophagy during the pathogenesis of Osteoarthritis within an experimental model. *Apoptosis* **15**: 631-638.
- 44 Castillo EC, Kourí JB. (2004). A new role for chondrocytes as non-professional phagocytes. An in vitro study. *Microsc Res Tech* **64**: 269-268.

- 45 González S, Fragoso-Soriano RJ, Kouri JB. (2007). Chondrocytes interconnecting tracks and cytoplasmic projections observed within the superficial zone of normal human articular cartilage--a transmission electron microscopy, atomic force microscopy, and two-photon excitation microscopy studies. *Microsc Res Tech* **70**: 1072-1078.
- 46 Kato T, Xiang Y, Nakamura H, Nishioka K. (2004). Neoantigens in osteoarthritis cartilage. *Curr Opin Rheumatol* **16**: 604-608.
- 47 Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Imajoh-Ohmi S, Fukuda H, *et al.* (2006). Fibulin-4 is a target of autoimmunity predominantly in patients with osteoarthritis. *J Immunol* **176**: 3196-3204.
- 48 Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Imajoh-Ohmi S, Fukuda H, *et al.* (2004). Proteomic surveillance of autoimmunity in osteoarthritis: Identification of triosephosphate isomerase as autoantigen in patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **50**: 1511-1521.
- 49 Saito I, Koshino T, Nakashima T, Uesugi M, Saito T. (2002). Increased cellular infiltrate in inflammatory synovia of osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* **10**: 156-162.
- 50 Tetlow LC, Woolley DE. (2001). Expression of vitamin D receptors and matrix metalloproteinases in osteoarthritic cartilage and human articular chondrocytes in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* **9**: 423-431.
- 51 Nakamura H, Yoshino S, Kato T, Tsuruha J, Nishioka K. (1999). T-cell mediated inflammatory pathway in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **7**: 401-402.
- 52 Ishii H, Tanaka H, Kato K, Nakamura H, Nagashima M, *et al.* (2002). Characterization of infiltrating T cells and TH1/TH2-type cytokines in the synovium of patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **10**: 277-281.
- 53 Su S-L, Tsai C-D, Lee C-H, Salter DM, Lee H-S. (2005). Expression and regulation of Toll-like receptor 2 by IL-1beta and fibronectin fragments in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* **13**: 879-886.
- 54 Akira S, Takeda K, Kaisho T. (2001). Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2**: 675-680.
- 55 Schjetne K, Thompson K, Nilsen N, Flo T, Fleckenstein B, *et al.* (2003). Cutting edge: Link between innate and adaptive immunity: Toll-like receptor 2 internalizes antigen for presentation to CD4 T cells and could be an efficient vaccine target. *J Immunol* **171**: 32-36.
- 56 Husebye H, Halaas Ø, Stenmark H, Tunheim G, Sandanger Ø, *et al.* (2006). Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J* **25**: 683-692.
- 57 Kim HA, Cho M-L, Choi HY, Yoon CS, Jhun JY, *et al.* (2006). The catabolic pathway mediated by Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Rheum* **54**: 2152-2163.
- 58 Takeda K, Tsuneyasu K, Shizuo A. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21**: 335-376.

- 59 Arbibe L, Mira JP, Teusch N, Kline L, Guha M, *et al.* (2000). Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nature Publishing Group* **1**: 533-540.
- 60 Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, *et al.* (2002). Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* **169**: 6668–6672.
- 61 Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, *et al.* (2002). Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 y TLR4. *Nature* **420**: 324-329.
- 62 Horng T, Barton G, Flavell R, Medzhitov R. (2002). The adaptor molecule TIRAP provides signaling specificity for Toll-like receptors. *Nature* **420**: 329-333.
- 63 Scanzello C, Plaas A, Crow M. (2008). Innate immune system activation in osteoarthritis: Is osteoarthritis a chronic wound? *Curr Opin Rheumatol* **20**: 565–572.
- 64 Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H. (2000). Cutting edge: Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* **164**: 558-561.
- 65 Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch J, Bare´ O, *et al.* (2002). Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: Role of Toll-like receptor TLR2 and TLR4. *J Biol Chem* **277**: 15028–15034.
- 66 Gondokaryono SP, Ushio H, Niyonsaba F, Hara M, Takenaka H, *et al.* (2007). The extra domain A of fibronectin stimulates murine mast cells via Toll-like receptor 4. *J Leukoc Biol* **82**: 657-665.
- 67 Liu-Bryan R, Terkeltaub R. (2010). Chondrocyte innate immune myeloid differentiation factor 88-dependent signaling drives procatabolic effects of the endogenous Toll-like receptor 2/Toll-like receptor 4 ligands low molecular weight hyaluronan and high mobility group box chromosomal protein 1 in mice. *Arthritis Rheum* **62**: 2004-2012.
- 68 Tsan M, Gao B. (2004). Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol* **76**: 514-519.
- 69 Bobacz K, Sunk IG, Hofstaetter JG, Amoyo L, Toma CD, *et al.* (2007). Toll-like receptors and chondrocytes: the lipopolysaccharide-induced decrease in cartilage matrix synthesis is dependent on the presence of toll-like receptor 4 and antagonized by bone morphogenetic protein 7. *Arthritis Rheum* **56**: 1880-1893.
- 70 Liu-Bryan R, Pritzker K, Firestein GS, Terkeltaub R. (2005). TLR2 signaling in chondrocytes drives calcium pyrophosphate dihydrate and monosodium urate crystal-induced nitric oxide generation. *J Immunol* **174**: 5016-5023.
- 71 Sadeghi K, Wessner B, Laggner U, Ploder M, Tamandl D, *et al.* (2006). Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. *Eur J Immunol* **36**: 361-370.

- 72 Haussler M, Haussler C, Bartik L, Whitfield G, Hsieh J, *et al.* (2008). Vitamin D receptor: Molecular signaling and actions of nutritional ligands in disease prevention. *Nutr Rev* **66**: S98-112.
- 73 Carlberg C, Dunlop TW. (2006). The impact of chromatin organization of vitamin D target genes. *Anticancer Res* **26**: 2637-2645.
- 74 Thompson P, Hsieh J, Whitfield G, Haussler C, Jurutka P, *et al.* (1999). Vitamin D receptor displays DNA binding and transactivation as a heterodimer with the Retinoid X Receptor, but not with the thyroid hormone receptor. *J Cell Biochem* **75**: 462-480.
- 75 Thompson P, Remus L, Hsieh J, Jurutka P, Whitfield G, *et al.* (2001). Distinct Retinoid X Receptor activation function-2 residues mediate transactivation in homodimeric and vitamin D receptor heterodimeric contexts. *J Mol Endocrinol* **27**: 211-227.
- 76 Haussler M, Haussler C, Jurutka P, Thompson P, Hsieh J, *et al.* (1997). The vitamin D hormone and its nuclear receptor: Molecular actions and disease states. *J Endocrinol* **154** S57-73.
- 77 Shiohara M, Uskokovic M, Hisatake J, Hisatake Y, Koike K, *et al.* (2001). 24-oxo metabolites of vitamin D3 analogues: Disassociation of their prominent antileukemic effects from their lack of calcium modulation. *Cancer Res* **61**: 3361-3368.
- 78 Zold E, Szodoray P, Gaal J, Kappelmayer J, Csathy L, *et al.* (2008). Vitamin D deficiency in undifferentiated connective tissue disease. *Arthritis Res Ther* **10**: R123.
- 79 Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, *et al.* (2006). Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* **311**: 1770-1773.
- 80 Holick M. (2008). Vitamin D and sunlight: Strategies for cancer prevention and other health benefits. *Clin J Am Soc Nephrol* **3**: 1548–1554.
- 81 Zasloff M. (2006). Fighting infections with vitamin D. *Nat Med* **12**: 388-390.
- 82 Driver J, Foreman O, Mathieu C, Van Etten E, Serreze D. (2007). Comparative therapeutic effects of orally administered 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and 1alpha-hydroxyvitamin D(3) on type-1 diabetes in non-obese diabetic mice fed a normal-calcaemic diet. *Clin Exp Immunol* **151**: 76–85.
- 83 Bischoff-Ferrari HA, Zhang Y, Kiel DP, Felson DT. (2005). Positive association between serum 25-hydroxyvitamin D level and bone density in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **53**: 821-826.
- 84 Patel S, Farragher T, Berry J, Bunn D, Silman A, *et al.* (2007). Association between serum vitamin D metabolite levels and disease activity in patients with early inflammatory polyarthritis. *Arthritis Rheum* **56**: 2143–2149.
- 85 Guillot X, Semerano L, Saidenberg-Kermanac'h N, Falgarone G, Boissier M-C. (2010). Vitamin D and inflammation. *Joint Bone Spine* **77**: 552-557.

- 86 Haroon M, Bond U, Quillinan N, Phelan MJ, Regan MJ. (2010). The prevalence of vitamin D deficiency in consecutive new patients seen over a 6-month period in general rheumatology clinics. *Clin Rheumatol* **30**: 789-794.
- 87 Ding C, Cicuttini F, Parameswaran V, Burgess J, Quinn S, *et al.* (2009). Serum levels of vitamin D, sunlight exposure, and knee cartilage loss in older adults: the Tasmanian older adult cohort study. *Arthritis Rheum* **60**: 1381-1389.
- 88 Bischoff-Ferrari H, Dawson-Hughes B, Staehelin H, Orav J, Stuck A, *et al.* (2009). Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* **1**: 339:b3692.
- 89 Annweiler C, Montero-Odasso M, Schott AM, Berrut G, Fantino B, *et al.* (2010). Fall prevention and vitamin D in the elderly: an overview of the key role of the non-bone effects. *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation* **7**: 50.
- 90 Tetlow LC, Smith SJ, Mawer EB, Woolley DE. (1999). Vitamin D receptors in the rheumatoid lesion: expression by chondrocytes, macrophages, and synoviocytes. *Ann Rheum Dis* **58**: 118-121.
- 91 Zwerina K, Baum W, Axmann R, Ruiz Heiland G, Distler JH, *et al.* (2011). Vitamin D receptor regulates TNF-mediated arthritis. *Ann Rheum Dis* **70**: 1122-1129.
- 92 Hayes ME, Denton J, Freemont AJ, Mawer EB. (1989). Synthesis of the active metabolite of vitamin D, 1,25(OH)₂D₃, by synovial fluid macrophages in arthritic diseases. *Ann Rheum Dis* **48**: 723-729.
- 93 Solovieva S, Hirvonen A, Siivola P, Vehmas T, Luoma K, *et al.* (2006). Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility of hand osteoarthritis in Finnish women. *Arthritis Res Ther* **8**: R20.
- 94 Naja RP, Dardenne O, Arabian A, St Arnaud R. (2009). Chondrocyte-specific modulation of Cyp27b1 expression supports a role for local synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in growth plate development. *Endocrinology* **150**: 4024-4032.
- 95 Abbud K, Kouri J. (2000). A novel rat osteoarthrosis model to assess apoptosis and matrix degradation. *Pathol Res Pract* **196**: 22.
- 96 Tsuruoka S, Nishiki K, Sugimoto K, Fujimura A. (2002). Time of day improves efficacy and reduces adverse reactions of vitamin D₃ in 5/6 nephrectomized rat. *Life Sci* **71**: 1809-1820.
- 97 Mills KHG, Dunne A. (2009). Immune modulation: IL-1, master mediator or initiator of inflammation. *Nat Med* **15**: 1363-1364.
- 98 Zhang Q, Hui W, Litherland GJ, Barter MJ, Davidson R, *et al.* (2008). Differential Toll-like receptor-dependent collagenase expression in chondrocytes. *Ann Rheum Dis* **67**: 1633-1641.
- 99 Campo G, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Nastasi G, *et al.* (2010). Small hyaluronan oligosaccharides induce inflammation by engaging both toll-like-4 and CD44 receptors in human chondrocytes. *Biochem Pharmacol* **80**: 480-490.

- 100 Goldring MB, Goldring SR. (2007). Osteoarthritis. *J. Cell. Physiol.* **213**: 626-634.
- 101 Adams JS, Ren S, Liu PT, Chun RF, Lagishetty V, *et al.* (2009). Vitamin d-directed rheostatic regulation of monocyte antibacterial responses. *J Immunol* **182**: 4289-4295.
- 102 Lu X, Farmer P, Rubin J, Nanes MS. (2004). Integration of the NfkappaB p65 subunit into the vitamin D receptor transcriptional complex: identification of p65 domains that inhibit 1,25-dihydroxyvitamin D3-stimulated transcription. *J. Cell. Biochem.* **92**: 833-848.
- 103 Farmer PK, He X, Schmitz ML, Rubin J, Nanes MS. (2000). Inhibitory effect of NF-kappaB on 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and retinoid X receptor function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**: E213-220.
- 104 Wu S, Liao AP, Xia Y, Li YC, Li J-D, *et al.* (2010). Vitamin D receptor negatively regulates bacterial-stimulated NF-kappaB activity in intestine. *The American Journal of Pathology* **177**: 686-697.
- 105 McAlindon TE, Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Aliabadi P, *et al.* (1996). Relation of dietary intake and serum levels of vitamin D to progression of osteoarthritis of the knee among participants in the Framingham Study. *Ann Intern Med* **125**: 353-359.
- 106 Lee B, Kim T, Jun J, Yoo D, Woo J, *et al.* (2011). Upregulation of interleukin-1 β production by 1,25-dihydroxyvitamin D(3) in activated human macrophages. *Mol Biol Rep* **38**: 2193-2201.
- 107 Gambhir V, Kim J, Siddiqui S, Taylor M, Byford V, *et al.* (2011). Influence of 1,25-dihydroxy vitamin D3 on TLR4-induced activation of antigen presenting cells is dependent on the order of receptor engagement. *Immunobiology* **216**: 988-996.
- 108 Tetlow LC, Woolley DE. (1999). The effects of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) on matrix metalloproteinase and prostaglandin E(2) production by cells of the rheumatoid lesion. *Arthritis Res* **1**: 63-70.
- 109 Khoo A, Chai L, Koenen H, Sweep F, Joosten I, *et al.* (2011). Regulation of cytokine responses by seasonality of vitamin D status in healthy individuals. *Clin Exp Immunol* **164**: 72-79.
- 110 Heidari B, Heidari P, Hajian-Tilaki K. (2011). Association between serum vitamin D deficiency and knee osteoarthritis. *Int Orthop* **35**: 1627-1631.
- 111 Felson DT, Niu J, Clancy M, Aliabadi P, Sack B, *et al.* (2007). Low levels of vitamin D and worsening of knee osteoarthritis: results of two longitudinal studies. *Arthritis Rheum* **56**: 129-136.
- 112 Lin R, Amizuka N, Sasaki T, Aarts MM, Ozawa H, *et al.* (2002). 1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 promotes vascularization of the chondro-osseous junction by stimulating expression of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase 9. *J Bone Miner Res* **17**: 1604-1612.

- 113 Tetlow LC, Woolley DE. (1999). Effects of 1 alpha,25dihydroxyvitaminD3 on matrix metalloproteinase expression by rheumatoid synovial cells and articular chondrocytes in vitro. *Ann N Y Acad Sci* **878**: 615-618.
- 114 Haywood L, McWilliams DF, Pearson CI, Gill SE, Ganesan A, *et al.* (2003). Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **48**: 2173-2177.
- 115 Peterson CA, Heffernan ME. (2008). Serum tumor necrosis factor-alpha concentrations are negatively correlated with serum 25(OH)D concentrations in healthy women. *J Inflamm (Lond)* **5**: 10.

Research Article

Effects of Vitamin D Supplementation during the Induction and Progression of Osteoarthritis in a Rat Model

E. C. Castillo,^{1,2} M. A. Hernandez-Cueto,³ M. A. Vega-Lopez,¹ C. Lavalle,⁴
J. B. Kouri,¹ and V. Ortiz-Navarrete²

¹Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), IPN, Avenida IPN No. 2508, 07360 México, DF, Mexico

²Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), IPN, Avenida IPN No. 2508, 07360 México, DF, Mexico

³Unidad de Investigación en Infectología e Inmunología, Hospital de Infectología Dr. Daniel Méndez Hernández, Centro Médico Nacional La Raza, IMSS, Avenida Jacarandas s/n, 02990 México, DF, Mexico

⁴Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Circuito Escolar s/n, 04510 México, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to V. Ortiz-Navarrete, vortiz@cinvestav.mx

Received 18 April 2012; Revised 4 September 2012; Accepted 5 September 2012

Academic Editor: Angelo Antonio Izzo

Copyright © 2012 E. C. Castillo et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Epidemiological studies correlate low levels of vitamin D with the osteoarthritis (OA) progression. Cytokines and metalloproteases play a major role in OA promoting the inflammation and degradation of the cartilage and can be induced through the Toll-like receptor (TLR) pathway. The aim of this study was to evaluate the protective effect of vitamin D supplementation on the development of osteoarthritis (OA) through examining the genetic regulation of TLRs, cytokines, and metalloproteases in chondrocytes as well as the wideness of cartilage in rats with OA. Our results demonstrate that the signaling through TLR-4 is a proinflammatory mechanism in osteoarthritis that drives the upregulation of MMP-3, IL-1 β , and TNF- α gene expression, leading to cartilage degradation and inflammation. Vitamin D supplementation had a protective effect during the onset but not during the chronic stage of OA in the rat model.

1. Introduction

It has been shown that TNF- α synthesis decreases in monocytes treated with vitamin D (1,25(OH)₂D₃) due to the downregulation of TLR-2 and TLR-4 signaling [1]. In this context, epidemiological studies and experimentally induced animal models suggest that the status of vitamin D is associated with the severity of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis [2] and OA [3]. In particular, vitamin D deficiency has been positively associated with knee [4] and hip [5], OA progression [2, 6], cartilage loss [7], and low bone mineral density [3]. However, it has also been shown that vitamin D deficiency is associated with only certain age groups [4, 6, 8] and with certain factors, such as pain, rather than with radiographic changes [9, 10], while other studies have found no association between vitamin D and OA [8, 11, 12], even in patients diagnosed with OA who were using vitamin D supplements [13].

Because epidemiological studies can only evaluate the effect of vitamin D in certain stages of OA, we aimed to define whether vitamin D has a protective effect during the onset or progression of OA using a rat model. The effect of vitamin D was evaluated by measuring condyle wideness and the gene expression of key cytokines, MMPs, and TLRs that are involved in the development of OA.

2. Methods

2.1. Rats and Cartilage Samples. Male Wistar rats weighing 130–150 g were kept in acrylic cages with a stainless steel cover. The rats were housed in a controlled environment with a 12 h light/dark cycle, constant temperature (22°C) and humidity (70%), and free access to food and water. Their diet was standard chow (Formulab Diet 5008) containing 1% calcium, 0.65% phosphorous, and 3.3 IU/g of vitamin D₃.

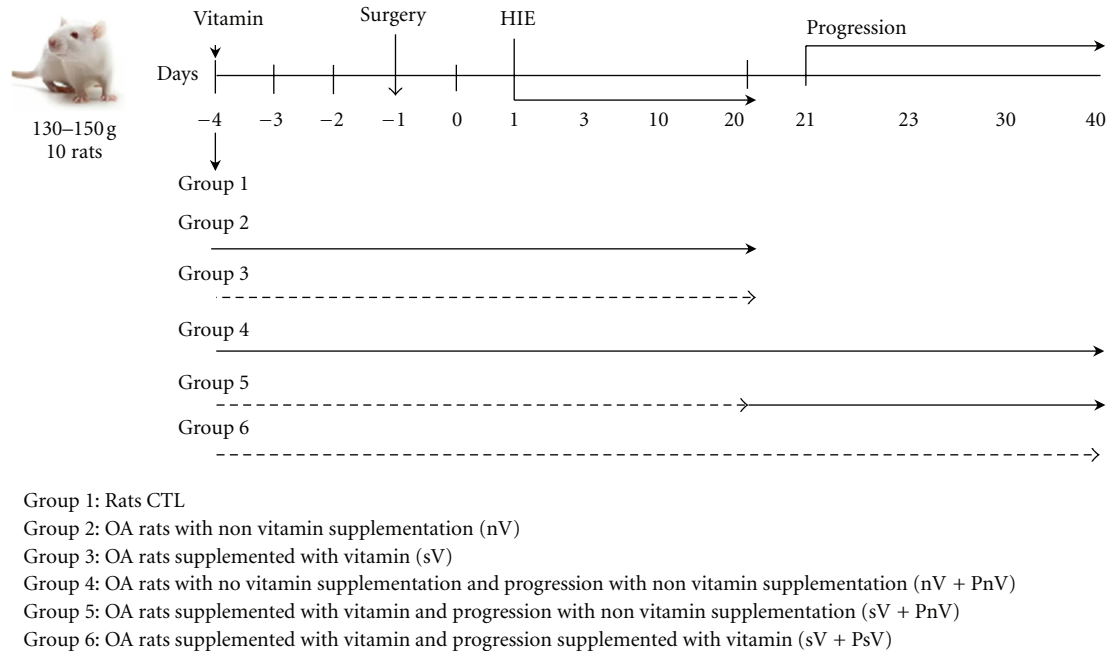


FIGURE 1: Experimental groups. A schematic example of the 20-day induction group and the 40-day progression group of rats with OA with or without supplementation is shown. The same scheme was applied for the other induction (3 and 10 days) and progression (20 and 40 days) groups. Vitamin D (4 IU/kg/d) was administered orally with an esophagogastric cannula 14 HALO. The arrow indicates the group without vitamin supplementation (nV); the pointed arrow indicates the supplementation with vitamin D (sV). Each group was conformed by 10 rats, and every experiment was performed at least by triplicate.

Cartilage samples were obtained from 10 knees of healthy (control (CTL)) or OA rats per experimental group. The local ethics committee of the UPEAL, CINVESTAV-IPN (NOM-062-ZOO-1999), approved this study. The rats were anesthetized with a ketamine 60 mg/kg and xylazine 4 mg/kg solution, and OA was induced in the knee of the right hind leg by a partial meniscectomy, which is the transecting of the medial collateral ligament (MCL) [14], and high-impact exercise (HIE) for 1, 3, 6, 8, 10, or 20 days. For the progression groups, the rats exercised for 3, 10, or 20 days and then were maintained for 20 additional days without exercise (Figure 1), resulting, study periods of 23, 30, and 40 days, respectively. Explants were obtained from the femoral condyles and tibial plateau cartilage from joints where the partial meniscectomy was performed.

The high-impact exercises began two days after surgery. The rats were forced to slide from side to side for 2 minutes in a box, and then the rats were dropped continuously for another 2 minutes. Finally, the rats were forced to jump as the box was continually shaken vertically for 1 minute. This exercise cycle was repeated 3 times each day.

2.2. Vitamin D Administration. Capsules of vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D₃) from Member's Marck (Bentonville, AR) were dissolved in corn oil (vehicle). The doses were 100 ng (4 IU), 1 µg (40 IU), 10 µg (400 IU), and 100 µg/kg/day (4000 IU) and were administered orally with an esophagogastric cannula 14 h after lights on (14HALO [15]). Each dose was administered 3 days before surgery, and daily

administration continued until the last day of OA induction. For the evaluation of 4 IU of vitamin D supplementation during OA progression, three experimental subgroups were included: (1) rats without vitamin supplementation during HIE + progression without vitamin supplementation (nV + PnV), (2) rats supplemented with the vitamin during HIE + progression without vitamin supplementation of vitamin (sV + PnV), and (3) rats supplemented with the vitamin during HIE + progression with vitamin supplementation (sV + PsV) (Figure 1).

2.3. RNA Isolation, cDNA Synthesis, and Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR) Amplification. The cartilage samples were enzymatically digested, and the total RNA was isolated from chondrocytes for real-time reverse transcriptase PCR analysis (qPCR) of TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-6, IL-1β, TNF-α, IL-6, MMP-3, MMP-9, and MMP-13 (Real-Time PCR System, model 7500, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) using the TRIzol LS Reagent (Invitrogen, USA). The first strand of cDNA was synthesized from 1.0 µg total RNA using a high capacity cDNA reverse transcription kit with RNase inhibitor (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA was used as an endogenous control to allow for the relative quantification of the genes of interest. The qRT-PCR was performed with the fast SyBR-Green master mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) on both the targets and the endogenous control (the probes used are shown in Table 1). The amplified PCR products were

TABLE 1: Probes used for genes expression.

Gene	Sense	Antisense
TLR1	5'-TACCCTGAACAACGTGGACA-3'	5'-ATCGACAAAAGCCCTCAGAGA-3'
TLR2	5'-GGAGACTCTGGAAAGCAGGTG-3'	5'-CGCCTAAGAGCAGGATCAAC-3'
TLR4	5'-CCAGAGCCGTTGGTGTATCT-3'	5'-TCAAGGCTTTTCCATCCAAC-3'
TLR6	5'-GTCTCCCCACTTCATCCAGA-3'	5'-CCCACGTTTACCCTTCTCAA-3'
TNF α	5'-AAACTCGAGTGACAAGCCCG-3'	5'-GCAGCCTTGTCCCTTGAAGA-3'
IL1 β	5'-CACCTCTCAAGCAGAGCACAG-3'	5'-GGGTTCATGGTGAAGTCAAC-3'
IL6	5'-TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC-3'	5'-TTGGATGGTCTTGGTCCCTTAGCC-3'
MMP-3	5'-AGACAGGCACTTTTGGCG-3'	5'-CTTCATGACCTCGGATAGCC-3'
MMP-9	5'-TCGAATCACGGAGGAAGC-3'	5'-CCTAGCCCCAACTTATCCAG-3'
MMP-13	5'-CAAGGACCCTGGAGCCCTGA-3'	5'-TGAGGGTGCAGACGCCAGA-3'
GAPDH	5'-TCCTACCCCAATGTATCCG-3'	5'-GGTGAAGAATGGGAGTTGC-3'

quantified by measuring the calculated cycle thresholds (C_T). The amounts of specific mRNA in the samples were calculated by the $\Delta\Delta C_T$ method. The mean value of the CTL chondrocytes target levels was used as the calibrator (one per sample), and the results were expressed as the n -fold difference relative to normal controls for the relative expression level data ($2^{-\Delta\Delta C_T}$).

The quality of the samples was determined by the difference in the absorbance at 260 and 280 nm. The RNA had an average A260/A280 ratio of 1.87. The RNA quality was also assessed by the electrophoresis of the total RNA followed by staining with ethidium bromide. In all samples, bands of 5 kb and 2 kb, corresponding to the 28S and 18S rRNAs, were observed. The cDNA obtained had an A260/A280 average value of 1.86.

2.4. Histological Analysis. Cartilage samples were obtained from 2 knees of healthy (control; CTL) or 20 days OA rats with or without vitamin D supplementation. Samples from each group were fixed with 4% formol, embedded in paraffin, cut at a thickness of 4 μ m and stained with hematoxylin and eosin (HE).

2.5. Statistical Analysis. The data are shown as the mean \pm the standard error (standard error of the mean; SEM). The statistical significance is indicated on the graphs as follows: $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), or $P < 0.001$ (***), with a 95% CI. The expression levels of TLRs, MMPs, and cytokines were measured in five independent experiments ($n = 5$) for the OA kinetic analysis and in three independent experiments ($n = 3$) for the vitamin D dose-response and the OA progression analysis. The statistical analyses were performed by the Graph Pad InStat program (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). A two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test was performed to compare means between the experimental groups without vitamin supplementation and the CTL group or a test for linear trend when applicable. A one-way ANOVA analysis using Dunnett's post hoc test was performed to compare the different doses of vitamin D. Student's t -test was used to compare between the progression groups without vitamin supplementation and the progression group supplemented with vitamin D since

the induction. Finally, the correlation analysis was performed using Pearson's correlation.

3. Results

3.1. Expression of TLRs, Proinflammatory Cytokines, and MMP Genes in Chondrocytes during OA Induction. To evaluate TLR-1, TLR-2, TLR-4, and TLR-6 gene expression during OA development in this rat model, we isolated cartilage chondrocytes from rats subjected to 1, 3, 6, 8, 10, and 20 days of OA induction and assessed TLR mRNA levels using quantitative RT-PCR. Figure 2(a) shows that TLR-1, TLR-2, and TLR-6 were expressed in the chondrocytes throughout the OA induction with no differences in expression levels compared to the control group. Meanwhile, an increase in the level of TLR-4 mRNA expression was observed (linear trend, $P = 0.0041$; $R^2 = 0.8339$) from day 8 (1.6-fold; $P < 0.05$) to 20 (2.1-fold; $P < 0.001$) with maximal expression on day 10 (2.8-fold; $P < 0.001$).

TLR-4 activation results in the expression of molecules associated with damage, such as MMPs and inflammatory cytokines. Therefore, we evaluated the mRNA expression of MMP-3, MMP-9, MMP-13, IL-6, TNF- α , and IL-1 β . The expression of MMP-9 and MMP-13 was detected during the progression of OA, but there were no major changes in their expression between the OA and the CTL groups (Figure 2(b)). In contrast, MMP-3 expression was higher in the OA groups on days 8 (1.8-fold; $P < 0.01$) and 10 (2.1-fold; $P < 0.01$), with a linear trend suggesting an increase in expression ($R^2 = 0.5883$; $P = 0.0219$), as shown in Figure 2(b). Similar to MMP-9 and MMP-13 expression, the IL-6 expression level remained similar to that of CTL, while the expression level of TNF- α ($R^2 = 0.4173$) and IL-1 β ($R^2 = 0.375$) was elevated throughout OA induction (Figure 2(c)). There was a peak in the IL-1 β expression on day 8 (18-fold; $P < 0.001$), suggesting that this cytokine plays an important role during the onset of OA pathogenesis.

TLR-4 expression correlated with the expression of MMP-3 ($R^2 = 0.7692$; $P = 0.0095$), TNF- α ($R^2 = 0.7127$; $P = 0.0169$), and IL-1 β ($R^2 = 0.3954$; $P = 0.1304$), as shown in Supplementary Figure 1, (see Supplementary Material available online at doi:10.1155/2012/156563). These results

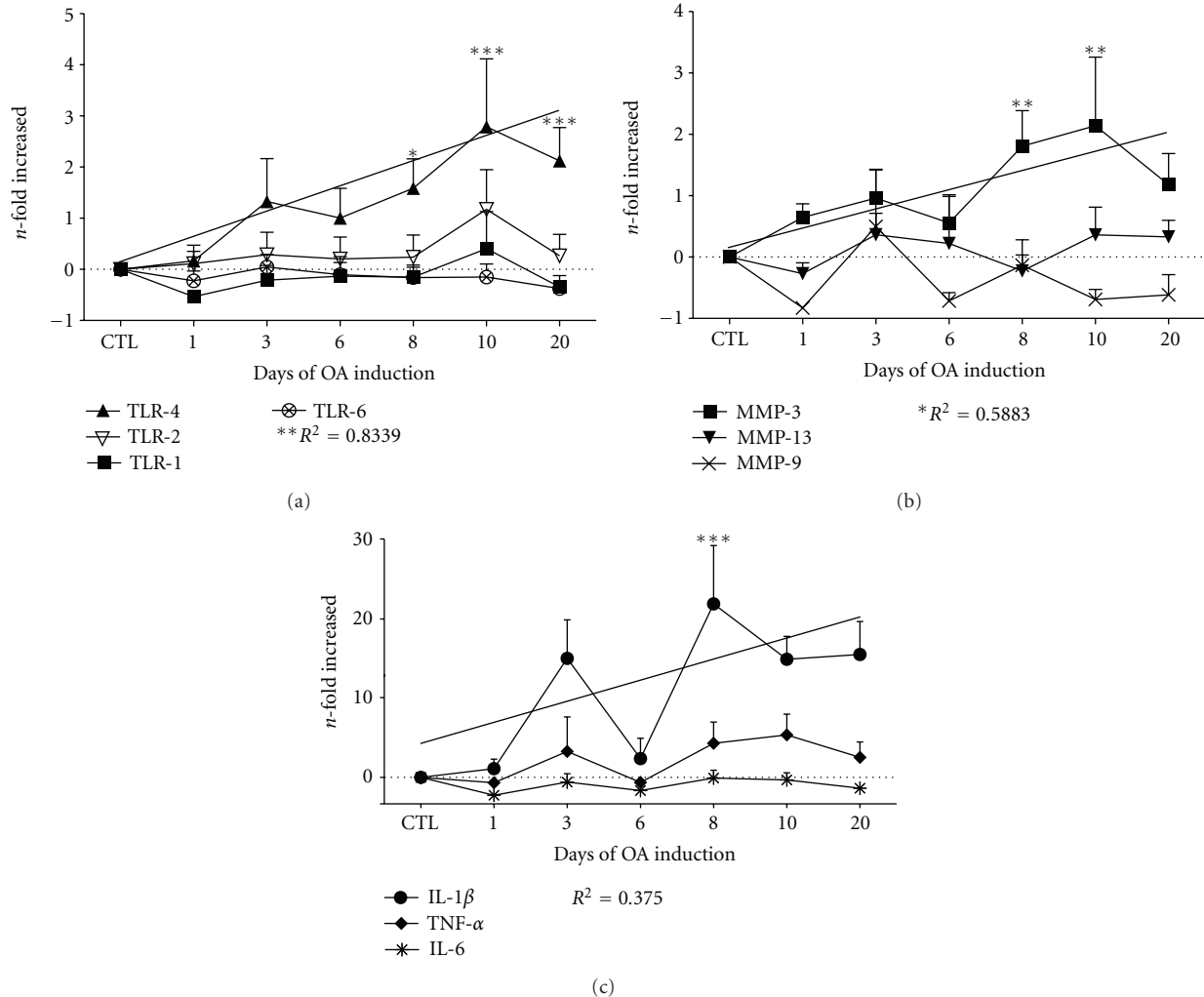


FIGURE 2: TLR-4, MMP-3, IL-1 β , and TNF- α expression was induced during osteoarthritis induction. Chondrocytes were collected and assayed for gene expression by real-time RT-PCR. The relative expression levels were normalized to the expression of the housekeeping GAPDH gene expression and presented as the n -fold difference. (a) TLR-2 and TLR-1 showed a similar pattern of expression during OA induction, whereas TLR-6 was only expressed during the acute stage of OA. TLR-4 showed a remarkable increase in expression with respect to the CTL group throughout OA induction, with a significant linear trend ($R^2 = 0.8339$; $P = 0.0041$). (b) The relative expression levels of MMP-3, MMP-9, and MMP-13, normalized to GAPDH gene expression, are shown. MMP-3 expression increased during OA induction ($R^2 = 0.5883$, $P = 0.0219$) and was highest on days 8 (1.8-fold; 95% CI 0.005241 to 3.609) and 10 (2.1-fold; 95% CI 0.3375 to 3.941). (c) The relative expression of IL-1 β , IL-6, and TNF- α , normalized to GAPDH gene expression, is shown. IL-1 β gene expression increased during OA induction ($R^2 = 0.375$), while TNF- α gene expression changed modestly ($R^2 = 0.4173$), with the highest increase on day 10 (1.6-fold). The results are pooled data from five independent experiments with 50 total rats. The asterisks indicate * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$, which were determined using a 2-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test to compare the experimental groups with the CTL group. The error bars indicate the SEM.

suggest that the activation of the TLR-4 pathway plays an important role in OA pathogenesis by inducing MMP-3, TNF- α , and IL-1 β expression. However, IL-1 β expression may not be entirely dependent on TLR-4 because it also depends on the NOD-like receptors pathway [16].

3.2. Effect of Vitamin D on OA Cartilage (Dose Response). If the activation of TLRs and the synthesis of cytokines and MMPs are associated with OA and if vitamin D modulates TLR-4 activation, then there should be detectable changes in

the joint in response to such modulation. Some of the main characteristics of OA are joint hypertrophy and cartilage and bone erosion, which are associated with increased fibrotic tissue at the borders of the joint. For that reason, we next evaluated the effect of supplementation with different vitamin D doses (4, 40, 400, and 4000 IU/kg/d) during the induction of OA for 20 days (OA20). We measured the OA condyles and nonmeniscectomed condyles (right and left, resp.), and the difference between them was considered an indicative value of OA hypertrophy severity (Figures 3(a) and 3(b)). The wideness of the condyles in OA20 rats without vitamin D

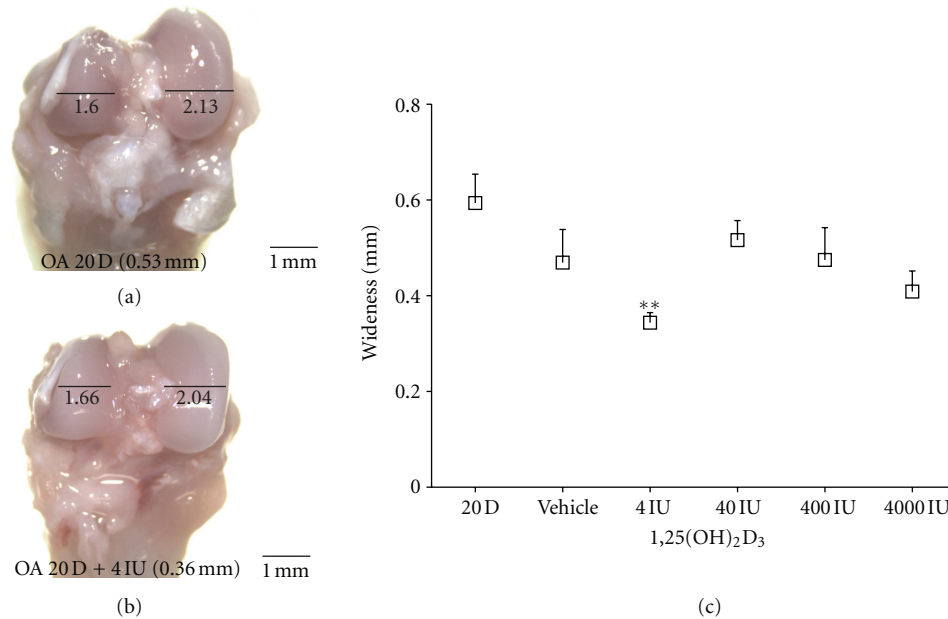


FIGURE 3: Vitamin D reduces the wideness of OA condyles. (a) A representative image of the femoral condyles from a rat with 20 days of OA without treatment. (b) A representative image of the femoral condyles from a rat treated with 4 IU/kg/day of vitamin D. The difference in wideness was taken as an indicator of the degree of severity of OA hypertrophy. (c) The graph presents the average wideness at a given dose from 3 different experiments with 15 total rats. A decrease in the severity of 0.34 ± 0.047 mm (95% CI 0.05367 to 0.4459, $**P < 0.01$) was determined using a one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test to compare all of the conditions with the control group (OA of 20 days without vitamin D). The error bars indicate the SEM. The scale bar = 1 mm 8x.

was used as the control (Figure 3(a)). We observed that the 4 IU/kg/day dose was the only dose that caused a reduction in the wideness of the OA condyles ($P < 0.01$; 0.34 ± 0.047 mm) (Figure 3(c)).

3.3. Effect of Vitamin D Supplementation on OA Induction.

To assess whether the protective effect of supplementation with 4 IU of vitamin D involves TLR-4 modulation, we first evaluated the expression of TLR4, IL-1 β , TNF- α , and MMP-3 during different stages of OA induction. We established day 3 of induction as the acute stage, day 10 as the intermediate stage, and day 20 as the chronic stage. This classification was established taking in consideration the previous results [14]. TLR-4 expression was upregulated (5.89-fold; $P = 0.0102$ F test) until the chronic stage (Figure 4(a)), while MMP-3 expression was upregulated from the intermediate stage (4.79-fold; $P = 0.0246$ F test) to the chronic stage (4.13-fold; $P = 0.0116$ F test, Figure 4(b)). TNF- α was also upregulated during the intermediate and chronic stages (10 days: 12.75-fold; $P = 0.0004$ and 20 days: 5.31-fold; $P = 0.0041$ F test), as shown in Figure 4(c). Meanwhile, IL-1 β expression was downregulated in the acute stage (2.21-fold; $P = 0.0104$ F test), which was followed by an upregulation on day 10 (12.75-fold; $P = 0.0473$ F test). Finally, IL-1 β showed the same levels of expression in the chronic stage (5.31-fold; $P = 0.2422$ F test) as the nV group (Figure 4(d)). These data suggested that the protective effect ($P = 0.0010$ t test) of vitamin D supplementation observed during OA induction (Figures 4(e) and 4(f) and Supplementary Figure 2) is not

due to the modulation of TLR-4 activation at the transcriptional level. In Figure 4(f), we can observe after 20 days of OA induction a severe damage with intense hypertrophy and hyperplasia of the cartilage, which diminished with vitamin D supplementation.

3.4. Effect of Vitamin D Supplementation on Gene Expression during OA Progression.

To mimic the natural progression of OA, we evaluated the effect of vitamin D supplementation in rats with OA progression, as described in Figure 1. The expression of TLR-4 was downregulated at day 30 (28.61-fold; $P = 0.0125$ F test) in the sV + PsV group compared to the nV + PnV group (Figure 5(a)). MMP-3 expression was similar between the evaluated groups (Figure 5(b)); while, TNF- α expression was downregulated in the sV + PsV group on day 30 compared to the groups: sV + PnV (39.55-fold; $P = 0.0042$ F test) and nV + PnV (3.66-fold; $P = 0.0244$ F test) (Figure 5(c)). In addition, IL-1 β was downregulated on day 40 (51.97-fold; $P = 0.0168$ F test) in the sV + PsV group compared to the sV + PnV group (Figure 5(d)) and upregulated on day 23 (1.09-fold; $P = 0.0491$ F test) compared to the nV + PnV group (Figure 5(d)).

In contrast to the protective effect of vitamin D observed during the OA induction, we did not find any evidence for a protective effect of vitamin D supplementation during OA progression. As is shown in Figure 5(e) and Supplementary Figure 2, the rats of all groups had the same degree of damage from OA at the end of the experiment. In this case, the damage was correlated with the changes observed in the gene expression of TLR-4, MMP-3, and TNF- α (Figure 5).

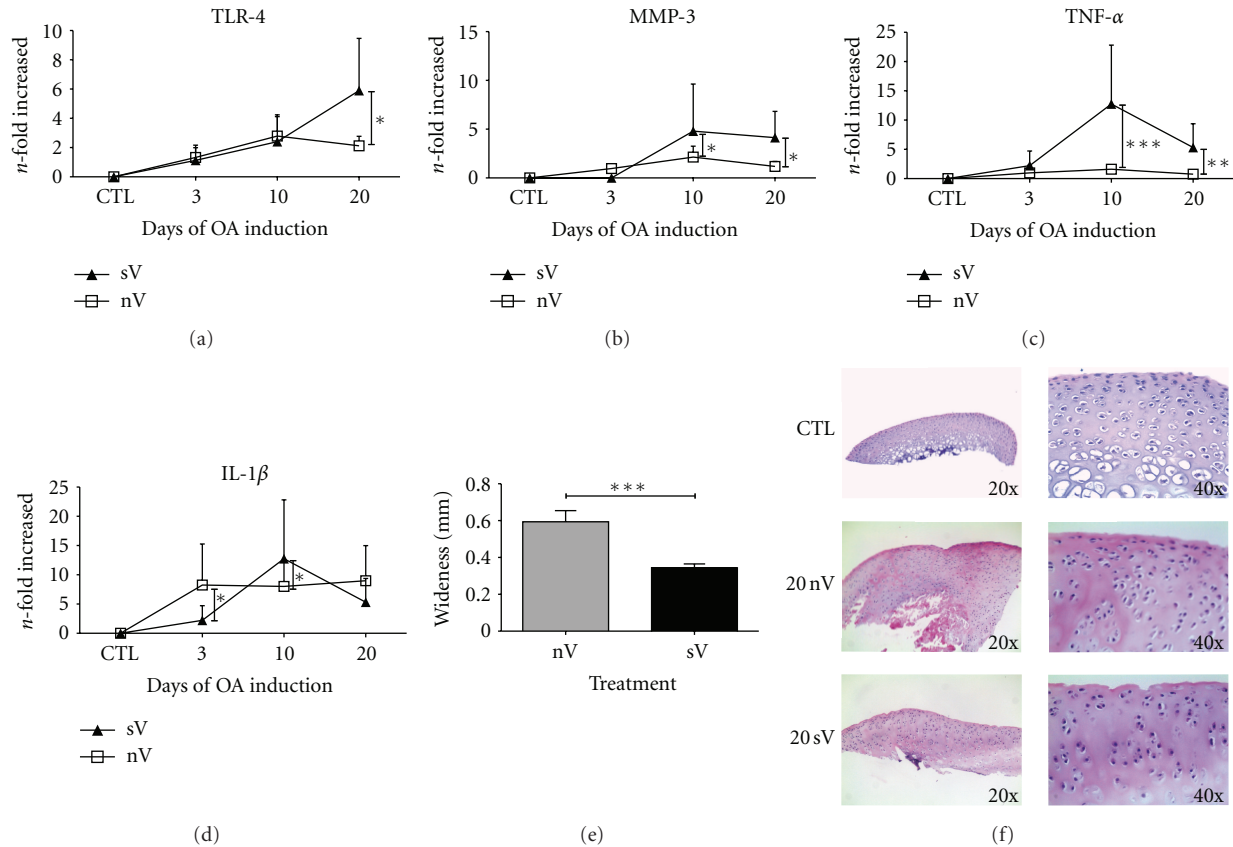


FIGURE 4: The protective effect of vitamin D is independent of the transcriptional modulation of TLR-4. The evaluation was performed during the OA induction period for (a)–(d). The gene expression of TLR4 (a), MMP-3 (b), TNF- α (c), and IL-1 β (d) from rats in the nV group (\square) compared with the sV group (\blacktriangle) is shown. The gene expression levels were normalized to GAPDH gene expression and presented as the *n*-fold difference in expression. (e) A comparison of the hypertrophy (wideness) of the condyles from rats with 20 days of OA that were supplemented with vitamin D (sV) to that of rats with no supplementation (nV). (f) A morphological comparison between condyles of control rats and rats with 20 days of OA induction treated with vitamin D (sV) and nontreated (nV) by HE stain. The supplementation was performed daily with 4 IU of vitamin D. The results are expressed as pooled data from three independent experiments with 16 to 18 total rats (a–d) or with 6 rats per group (e). The error bars indicate the SEM. A *t*-test with an *F* test was performed to obtain the indicated statistical significance values: **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001. Abbreviations indicate the following treatments: nV (without vitamin supplementation); sV (with vitamin supplementation).

4. Discussion

The present study shows the involvement of the TLR-4 pathway in the expression of MMP-3, IL-1 β , and TNF- α during the development of OA. It also shows that vitamin D supplementation has a protective effect on condyle wideness during the induction of OA despite an increase in the expression of the above genes. In contrast, during OA progression, vitamin D supplementation induced the downregulation of TLR-4, IL-1 β , and TNF- α on day 30, but this had no beneficial effect on the disease outcome.

Although human articular chondrocytes express mRNAs for all TLRs (TLRs 1-9) [17] only TLR-2 and TLR-4 expression increased in OA chondrocytes. OA chondrocytes stimulated *in vitro* with ligands for TLR-2 or IL-1 β induced the release of PGE₂, MMPs (-1, -3, and -13), and nitric oxide as a consequence of this stimulation [18–20]. Similarly, the stimulation of TLR-4 expression in normal chondrocytes [17, 21], induces the secretion of TNF- α , IL-1 β , MMP-13,

and inducible nitric oxide synthase [22]. In this study, we found that TLR-4 was upregulated during OA induction *in vivo* and that its expression correlates with TNF- α , IL-1 β , and MMP-3 gene expression. These data suggest that TLR-4 signaling is important in the pathophysiological response that causes the inflammation and degradation of the cartilage in OA.

The TLR activation pathway induces the expression of the vitamin D receptor (VDR) and CYP27B1 (1 α -hydroxylase), the enzyme that converts 25-hydroxycholecalciferol into 1,25(OH)₂D₃, thereby promoting innate immunity through VDR activation [23, 24]. It has been reported that p65, a subunit of NF- κ B, interacts directly with the VDR and that this interaction modulates the VDR and TLR responses [25–27]. The outcome of this TLR-VDR transcriptional partnership is the regulation of the target genes of both receptors. For this reason, we decided to evaluate if the suggested protective effect of vitamin D supplementation on OA was due to a modulation of TLRs, cytokines, and MMPs at

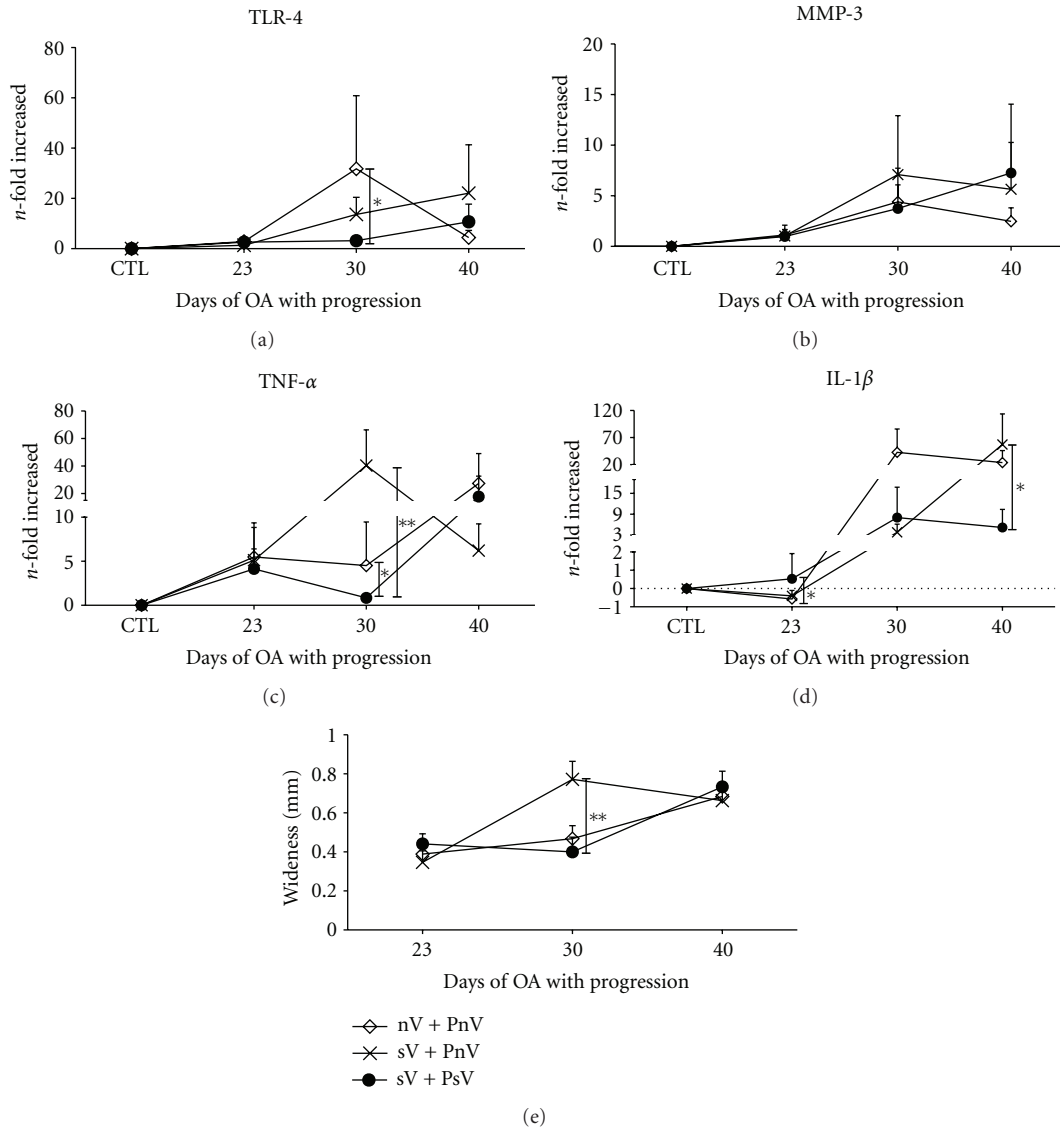


FIGURE 5: Vitamin D has no effect on OA severity. The evaluation of OA was performed during the OA progression phase.(a)–(d). The gene expression of TLR-4 (a), MMP-3 (b), TNF- α (c), and IL-1 β (d) from rats in the sV + Psv group (●) compared with the sV + PnV (×) and the nV + PnV (◇) groups. The gene expression levels were normalized to GAPDH gene expression and are presented as the *n*-fold difference in expression. (e) A comparison of the hypertrophy (wideness) of condyles from the rats of the sV + PsV (●), sV + PnV (×) and nV + PnV (◇) groups is shown. The results shown are pooled data from three independent experiments with 16 to 18 total rats (a–d) or with 12 to 16 total rats (e). The error bars indicate the SEM. A *t*-test with an *F* test was performed; the notations indicate **P* < 0.05 and ***P* < 0.01. The following groups were included: sV + PsV (vitamin supplementation during induction and progression with supplementation of vitamin); sV + PnV (vitamin supplementation during induction and progression without vitamin supplementation); nV + PnV (without vitamin supplementation during induction and progression without vitamin supplementation). For the supplement, 4 IU of vitamin D was administrated daily.

the transcriptional level [1] or if vitamin D was in fact associated with more severe OA because VDR expression has also been associated with MMP-3 expression in OA cartilage [28] and the upregulation of inflammatory cytokines [29]. In this study, we observed that vitamin D supplementation differentially modulated the gene expression of TLR-4, TNF- α , IL-1 β , and MMP-3 during OA induction and progression. Vitamin D supplementation induced TLR-4 expression during OA induction but downregulated it during

OA progression. These antagonistic responses might be due to the continued mechanical overload that promotes the activation of the inflammatory pathway during OA induction.

This differential response has been observed after inflammatory cytokines modulation. Vitamin D downregulates IL-1 β and TNF- α expression in peripheral blood mononuclear cells via TLR-4 downregulation [22]. In contrast, in human monocyte-derived macrophages activated with

lipopolysaccharide, vitamin D stimulates the production of IL-1 β [28] and downregulates TNF- α expression [1, 22, 30]. In our results, we observed both positive and negative effects on cytokines. IL-1 β increased on day 10 of OA induction (sV) and was downregulated on day 40 of OA progression (sV+PsV). Similar effects on TNF- α expression were observed.

Enhancing and suppressive roles for vitamin D have also been described for MMPs expression. Vitamin D has been associated with MMP-3 expression in human OA cartilage. *In vitro* studies show that vitamin D induces the production of MMP-1, MMP-3, and PGE₂ in chondrocytes stimulated with IL-1 β , whereas it reduces MMP-1, MMP-3, and PGE₂ induction by IL-1 β in rheumatoid synovial fibroblasts [28, 31], which are two scenarios that could be present and contribute to the final state of the cartilage during OA development. Our *in vivo* results agree with the effect described for MMP-3 in chondrocytes *in vitro* with regard to the groups of OA induction and at day 40 of OA progression. However, despite that at day 40, MMP-3 expression was upregulated in OA rats, there were no major changes in the other groups. These data suggest that the effect of vitamin D depends not only on the cell type but also on the activation state of the cells and the inflammatory environment.

The regulatory modulation leads to the hypertrophy of the articular cartilage, which is characterized by physical changes, such as fraying, fibrillations with a rough surface, and the formation of osteophytes that become more prominent as the disease progresses [28]. We evaluated hypertrophy in our model by comparing the width of the right and left condyles and observed that the condyle wideness (in millimeters) was not different except when comparing the 30-day group treated with vitamin D during OA progression (sV + PsV) to the 30-day group supplemented only during the induction (sV + PnV). The comparison of these groups also revealed that vitamin D leads to the downregulation of TLR-4, MMP-3, and TNF- α . These findings are in accordance with a study indicating that vitamin D deficiency is greatly associated with the early stages of OA but absent in the advanced stages [4]. This could be explained by a recent report indicating that vitamin D precedes the TLR activation, with no effect observed when vitamin D is administered at the same time or after TLR stimulation [32]. These data and our data suggest that vitamin D supplementation must be administered before cartilage damage occurs.

Remarkably, we observed hypertrophy protection with low doses of vitamin D (4 IU) that was not observed in the same extends with higher doses (40–4000 IU). This lack of dose response might be due to the dual effect that vitamin D has on the different cells of the joint [28, 31]. In fact, it has been reported that administration of high doses of vitamin D induces side effects like hypercalcemia and hyperphosphatemia [15]. However, there is not an appropriate pharmacokinetic study that establishes the effects of vitamin D on the cartilage. Additionally, there are other factors that have to be taken into consideration, including the vitamin D-dependent induction of the expression of VEGF, growth factors [33], and MMPs [31, 33, 34]. These findings suggest that, in addition to its regulation of inflammation and damage, vitamin

D could also contribute to factors highly associated with OA progression [28, 35].

In summary, our findings suggest that vitamin D may play a key role in the pathophysiology of OA. Additionally, the effects of vitamin D on OA may reflect the state of cell activation. Further studies are needed to examine the effects of vitamin D on the various molecules associated with the key degenerative or reparative processes within osteoarthritic cartilage. In addition, it is important to establish whether vitamin D supplementation in healthy subjects with serologically adequate levels of vitamin D yields a better response than supplementation in subjects with lower serum levels. However, it has been reported that healthy women with higher levels of vitamin D in serum had lower concentrations of TNF- α [36]. Moreover, a pharmacokinetic would help to understand the kinetics and effects of different doses of vitamin D.

Abbreviations

OA:	Osteoarthritis
HIE:	High-impact exercise
TLRs:	Toll-like receptors
CTL:	Control
IL-1 β :	Interleukin-1 β
IL-6:	Interleukin-6
TNF α :	Tumor necrosis factor alpha
MMP:	Matrix metalloproteinase
DAMPs:	Damage-associated molecular patterns
IU:	International units
1, 25(OH) ₂ D ₃ :	Vitamin D
14 HALO:	14 hours after light on
qPCR:	Quantitative real-time polymerase chain reaction
HE:	Hematoxylin and eosin
sV:	Rats supplemented with the vitamin
nV:	Rats without vitamin supplementation
nV + PnV:	Rats without vitamin supplementation during HIE + progression without vitamin supplementation
sV + PnV:	Rats supplemented with the vitamin during HIE + progression without vitamin supplementation
sV + PsV:	Rats supplemented with the vitamin during HIE + progression with vitamin supplementation
ANOVA:	Analysis of variance
GAPDH:	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
C _T :	Cycle threshold
SEM:	Standard error of the mean
NOD:	Nucleotide oligomerization domain-like receptors.

Authors' Contribution

E. C. Castillo conducted all the experiments, analyzed the data, conceived and designed the study, confirmed the data analysis, and wrote the initial draft of the manuscript. J. B. Kouri and V. Ortiz-Navarrete conceived of and designed

study, confirmed the data analysis and reviewed the paper critically for important intellectual content. M. A. Hernandez-Cueto conducted the histopathological analysis. M. A. Vega-Lopez and C. Lavallo reviewed the paper critically for important intellectual content. All the authors read and approved the final paper.

Conflict of Interests

All authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

The authors thank the support of the CONACyT and CINVESTAV-IPN, Zacatenco. They thank Daniel Hernandez Cueto for his technical assistance. This work was supported by CONACyT Grant 59787 (to J. B. Kouri). E. C. Castillo was supported by a CONACyT scholarship 192043 and a CINVESTAV scholarship.

References

- [1] K. Sadeghi, B. Wessner, U. Laggner et al., "Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hypo-responsiveness to pathogen-associated molecular patterns," *European Journal of Immunology*, vol. 36, no. 2, pp. 361–370, 2006.
- [2] M. Haroon, U. Bond, N. Quillinan, M. J. Phelan, and M. J. Regan, "The prevalence of vitamin D deficiency in consecutive new patients seen over a 6-month period in general rheumatology clinics," *Clinical Rheumatology*, vol. 30, no. 6, pp. 789–794, 2011.
- [3] H. A. Bischoff-Ferrari, Y. Zhang, D. P. Kiel, and D. T. Felson, "Positive association between serum 25-hydroxyvitamin D level and bone density in osteoarthritis," *Arthritis & Rheumatism*, vol. 53, no. 6, pp. 821–826, 2005.
- [4] B. Heidari, P. Heidari, and K. Hajian-Tilaki, "Association between serum vitamin D deficiency and knee osteoarthritis," *International Orthopaedics*, vol. 35, no. 11, pp. 1627–1631, 2011.
- [5] R. K. Chaganti, N. Parimi, P. Cawthon, T. L. Dam, M. C. Nevitt, and N. E. Lane, "Association of 25-hydroxyvitamin D with prevalent osteoarthritis of the hip in elderly men: the osteoporotic fractures in men study," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 62, no. 2, pp. 511–514, 2010.
- [6] T. E. McAlindon, D. T. Felson, Y. Zhang et al., "Relation of dietary intake and serum levels of vitamin D to progression of osteoarthritis of the knee among participants in the framingham study," *Annals of Internal Medicine*, vol. 125, no. 5, pp. 353–359, 1996.
- [7] C. Ding, F. Cicuttini, V. Parameswaran, J. Burgess, S. Quinn, and G. Jones, "Serum levels of vitamin D, sunlight exposure, and knee cartilage loss in older adults: the Tasmanian older adult cohort study," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 60, no. 5, pp. 1381–1389, 2009.
- [8] D. T. Felson, J. Niu, M. Clancy et al., "Low levels of vitamin D and worsening of knee osteoarthritis: results of two longitudinal studies," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 56, no. 1, pp. 129–136, 2007.
- [9] R. T. Chlebowski, K. C. Johnson, D. Lane et al., "25-Hydroxyvitamin D concentration, vitamin D intake and joint symptoms in postmenopausal women," *Maturitas*, vol. 68, no. 1, pp. 73–78, 2011.
- [10] S. Muraki, E. Dennison, K. Jameson et al., "Association of vitamin D status with knee pain and radiographic knee osteoarthritis," *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 19, no. 11, pp. 1301–1306, 2011.
- [11] D. Jefferies, C. Farquharson, J. Thomson et al., "Differences in metabolic parameters and gene expression related to osteochondrosis/osteoarthritis in pigs fed 25-hydroxyvitamin D3," *Veterinary Research*, vol. 33, no. 4, pp. 383–396, 2002.
- [12] N. E. Lane, L. R. Gore, S. R. Cummings et al., "Serum vitamin D levels and incident changes of radiographic hip osteoarthritis: a longitudinal study. Study of osteoporotic fractures research group," *Arthritis Rheum*, vol. 42, no. 5, pp. 854–860, 1999.
- [13] P. J. DeMarco, F. Constantinescu, L. D. Carbone, K. D. Barrow, and M. C. Nevitt, "Does vitamin D supplementation contribute to the modulation of osteoarthritis by bisphosphonates? Comment on the article by Carbone et al," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 52, no. 5, pp. 1622–1623, 2005.
- [14] K. Abbud and J. Kouri, "A novel rat osteoarthritis model to assess apoptosis and matrix degradation," *Pathology Research and Practice*, vol. 196, no. 11, pp. 729–745, 2000.
- [15] S. Tsuruoka, K. Nishiki, K. Sugimoto, and A. Fujimura, "Time of day improves efficacy and reduces adverse reactions of vitamin D3 in 5/6 nephrectomized rat," *Life Sciences*, vol. 71, no. 15, pp. 1809–1820, 2002.
- [16] K. H. G. Mills and A. Dunne, "Immune modulation: IL-1, master mediator or initiator of inflammation," *Nature Medicine*, vol. 15, no. 12, pp. 1363–1364, 2009.
- [17] K. Bobacz, I. G. Sunk, J. G. Hofstaetter et al., "Toll-like receptors and chondrocytes: the lipopolysaccharide-induced decrease in cartilage matrix synthesis is dependent on the presence of toll-like receptor 4 and antagonized by bone morphogenetic protein 7," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 56, no. 6, pp. 1880–1893, 2007.
- [18] S. L. Su, C. D. Tsai, C. H. Lee, D. M. Salter, and H. S. Lee, "Expression and regulation of Toll-like receptor 2 by IL-1 β and fibronectin fragments in human articular chondrocytes," *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 13, no. 10, pp. 879–886, 2005.
- [19] H. A. Kim, M. L. Cho, H. Y. Choi et al., "The catabolic pathway mediated by Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 54, no. 7, pp. 2152–2163, 2006.
- [20] R. Liu-Bryan, K. Pritzker, G. S. Firestein, and R. Terkeltaub, "TLR2 signaling in chondrocytes drives calcium pyrophosphate dihydrate and monosodium urate crystal-induced nitric oxide generation," *Journal of Immunology*, vol. 174, no. 8, pp. 5016–5023, 2005.
- [21] G. M. Campo, A. Avenoso, S. Campo, A. D'Ascola, G. Nastasi, and A. Calatroni, "Small hyaluronan oligosaccharides induce inflammation by engaging both toll-like-4 and CD44 receptors in human chondrocytes," *Biochemical Pharmacology*, vol. 80, no. 4, pp. 480–490, 2010.
- [22] A. L. Khoo, L. Y. A. Chai, H. J. P. M. Koenen et al., "Regulation of cytokine responses by seasonality of vitamin D status in healthy individuals," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 164, no. 1, pp. 72–79, 2011.
- [23] J. S. Adams, S. Ren, P. T. Liu et al., "Vitamin D-directed rheostatic regulation of monocyte antibacterial responses," *Journal of Immunology*, vol. 182, no. 7, pp. 4289–4295, 2009.
- [24] P. T. Liu, S. Stenger, H. Li et al., "Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response," *Science*, vol. 311, no. 5768, pp. 1770–1773, 2006.
- [25] X. Lu, P. Farmer, J. Rubin, and M. S. Nanes, "Integration of the Nf κ B p65 subunit into the vitamin D receptor transcriptional

- complex: identification of p65 domains that inhibit 1,25-dihydroxyvitamin D₃-stimulated transcription," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 92, no. 4, pp. 833–848, 2004.
- [26] P. K. Farmer, X. He, M. L. Schmitz et al., "Inhibitory effect of NF- κ B on 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and retinoid X receptor function," *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, vol. 279, no. 1, pp. E213–E220, 2000.
- [27] S. Wu, A. P. Liao, Y. Xia et al., "Vitamin D receptor negatively regulates bacterial-stimulated NF- κ B activity in intestine," *American Journal of Pathology*, vol. 177, no. 2, pp. 686–697, 2010.
- [28] L. C. Tetlow and D. E. Woolley, "Expression of vitamin D receptors and matrix metalloproteinases in osteoarthritic cartilage and human articular chondrocytes in vitro," *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 9, no. 5, pp. 423–431, 2001.
- [29] B. N. R. Lee, T. H. Kim, J. B. Jun et al., "Upregulation of interleukin-1 β production by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in activated human macrophages," *Molecular Biology Reports*, vol. 38, no. 3, pp. 2193–2201, 2011.
- [30] J. E. Do, S. Y. Kwon, S. Park, and E. S. Lee, "Effects of vitamin D on expression of Toll-like receptors of monocytes from patients with Behçet's disease," *Rheumatology*, vol. 47, no. 6, pp. 840–848, 2008.
- [31] L. C. Tetlow and D. E. Woolley, "The effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ on matrix metalloproteinase and prostaglandin E₂ production by cells of the rheumatoid lesion," *Arthritis Research*, vol. 1, no. 1, pp. 63–70, 1999.
- [32] V. Gambhir, J. Kim, S. Siddiqui et al., "Influence of 1,25-dihydroxy vitamin D₃ on TLR4-induced activation of antigen presenting cells is dependent on the order of receptor engagement," *Immunobiology*, vol. 216, no. 9, pp. 988–996, 2011.
- [33] R. Lin, N. Amizuka, T. Sasaki et al., "1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ promotes vascularization of the chondro-osseous junction by stimulating expression of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase 9," *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 17, no. 9, pp. 1604–1612, 2002.
- [34] L. C. Tetlow and D. E. Woolley, "Effects of 1 α ,25-dihydroxyvitaminD₃ on matrix metalloproteinase expression by rheumatoid synovial cells and articular chondrocytes in vitro," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 878, pp. 615–618, 1999.
- [35] L. Haywood, D. F. McWilliams, C. I. Pearson et al., "Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 48, no. 8, pp. 2173–2177, 2003.
- [36] C. A. Peterson and M. E. Heffernan, "Serum tumor necrosis factor-alpha concentrations are negatively correlated with serum 25(OH)D concentrations in healthy women," *Journal of Inflammation*, vol. 5, p. 10, 2008.