



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

El Efecto del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF- $\beta\beta$) sobre la progresión de la Osteoartritis experimental en el cartílago articular en rata macho Wistar.

Tesis que para obtener el título de
Licenciado en Biología

PRESENTA:
Cecilia Yazmín Espinosa Blanco

ASESOR DE TESIS:
Dr. Juan Bautista Kouri Flores



Mayo 2015

INDICE	pág.
Abreviaturas	3
Resumen	4
Introducción	6
Hipótesis	21
Objetivos	21
Estrategia experimental	22
Material y métodos	23
Resultados	27
Discusión	35
Conclusión	38
Bibliografía	39
Anexo	44

ABREVIATURAS

OA Osteoartritis

COL II Colágena tipo II

IL-1 β Interleucina 1 beta

MEC Matriz extracelular

MMPs Metaloproteasas

PDGF- $\beta\beta$ Factor de crecimiento derivado de plaquetas $\beta\beta$

PGs Proteoglicanos

μm Micrómetros

ng Nanogramos

RESUMEN

La osteoartritis (OA) es una enfermedad crónico-degenerativa, causada por la destrucción del cartílago que recubre el hueso en todas las articulaciones. También hay inflamación de la membrana sinovial, hipertrofia ósea, formación de osteofitos y aumento en el espesor del hueso subcondral. Actualmente no existe ningún tratamiento que module, detenga o repare el proceso degenerativo del cartílago en la OA; solo se aplican medidas encaminadas a disminuir los síntomas, o en casos extremos al reemplazo quirúrgico de las articulaciones afectadas. El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF- $\beta\beta$) tiene efectos anabólicos a nivel celular *in vitro* por lo que se ha considerado para evitar la muerte de los condrocitos y células madre mesenquimales, inducir su proliferación e incrementar los mecanismos de reparación en la OA. Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue determinar si el tratamiento del PDGF- $\beta\beta$ en la articulación de ratas con OA experimental induce proliferación celular en el cartílago articular y si se modifica la expresión de biomarcadores relacionados a la patogénesis de la OA.

La OA se indujo por menisectomía parcial unilateral y ejercicio de alto impacto por diez días. Un grupo de ratas se trato a los diez y 15 días por vía intra-articular con PDGF- $\beta\beta$. Estos ratas se compararon con ratas OA pero inyectadas con solución salina. Como controles se emplearon ratas normales y ratas con cirugía simulada sham. A los 20 días las ratas se sacrificaron para obtener el cartílago articular, el cual se procesó para su análisis histológico por la técnica de safranina O verde rápido, para el análisis de proteoglicanos y por inmunohistoquímica para detectar a IL-1 β , colágena tipo II y el marcador de proliferación Cdc25c. Los resultados mostraron que el tratamiento con El PDGF- $\beta\beta$, reduce la severidad de la OA cuando se compara al grupo no tratado, por lo que el grado de OA de 4.5 se redujo a 2.5. Aunque el contenido de proteoglicanos no se mejora, el tratamiento con el factor de crecimiento si reduce la fibrilación y las fisuras en la superficie del cartílago articular. Comparado al grupo con OA sin tratamiento, el cartílago de ratas OA tratadas con PDGF- $\beta\beta$ mostraron un porcentaje menor de condrocitos que expresaron a la citocina catabólica IL-1 β . Por el contrario el factor de crecimiento incremento el porcentaje de condrocitos que expresan colágena II,

cuando se compara a los grupos OA sin tratamiento en lo que se disminuye la expresión de colágena II. De manera muy importante encontramos que el tratamiento con el PDGF incrementa el número de células positivas para cdc25c cuando se compara a los grupos sin tratamiento por lo que nuestros resultados sugieren que el factor de crecimiento induce proliferación de células en el cartílago articular. Falta por determinar si estas células son condrocitos o son células madre presentes en cartílago articular.

Este trabajo abre nuevas expectativas en el estudio de esta patogenia ya que se podría generar otras estrategias a partir de inyecciones intra-articulares como terapia. Los resultados también nos indican la importancia de generar estrategias para identificar la enfermedad en etapas tempranas.

INTRODUCCIÓN

Sistema Musculo esquelético

En los organismos vertebrados, su sistema musculo esquelético lo constituyen; los huesos, las articulaciones y los músculos. En general funciona como un elemento de sostén y de protección para los órganos vitales dentro de sus cavidades; por ejemplo, la cavidad torácica protege el corazón y los pulmones mientras la cavidad craneana protege al cerebro. Además, este sistema permite el movimiento del cuerpo cuando los músculos se contraen. (*Stoller y col, 2004*).

Los músculos son tejidos que están unidos a los huesos y a las articulaciones de formas muy específicas. Cada músculo ejerce una tensión a través de la articulación, por lo tanto la línea de acción del músculo en relación con la articulación determina el movimiento que se producirá (*Gowitzke y col, 1999*).

El sistema musculo esquelético es también un armazón sólido y resistente que amortigua las fuerzas que actúan sobre el cuerpo, tales como la gravedad y los golpes. (*Stoller y col, 2004*).

Articulaciones

La conjugación entre dos huesos forman las articulaciones, que son las estructuras que permiten la movilidad de las extremidades como rodillas, caderas, manos, pies, etc. (*García- Germán y col, 2010*). Según el tipo de unión de los huesos y la amplitud de los movimientos que permiten, se distinguen 3 tipos de articulaciones:

Sinartrosis: son articulaciones sin movilidad donde los huesos se unen entre sí por tejido fibroso o una placa cartilaginosa, como por ejemplo los huesos del cráneo (*García- Germán y col, 2010*).

Anfiartrosis: son articulaciones de movilidad limitada en las que las dos superficies articulares se unen por un tejido fibrocartilaginosa, como ocurre en la columna vertebral (*García- Germán y col, 2010*).

Diartrrosis: son las articulaciones con mucha movilidad en la que los huesos que se articulan no se unen directamente entre si ya que están separados por la cavidad

articular (*García- Germán y col, 2010*), los ejemplos más representativos son; las rodillas, la cadera, las manos, los dedos, los hombros y los codos. En la cavidad de las articulaciones diartroideas se encuentran también otras estructuras muy importantes para su correcto funcionamiento: la cápsula, los meniscos, los ligamentos, la membrana sinovial y el líquido sinovial. En estas articulaciones los extremos de los huesos están recubiertos por cartílago hialino conocido como cartílago articular.

Cartílago Articular

El cartílago articular es un tejido conectivo especializado que recubre la superficie de los huesos en las articulaciones para amortiguar la carga y disminuir la fricción (*Sánchez y López, 2011*). En la Figura 1 se muestra la composición del cartílago articular, que básicamente lo constituyen los condrocitos como único tipo celular y una compleja matriz extracelular (MEC) formada por fibras colágenas entre las que predomina la colágena tipo II, los proteoglicanos como el agregano, el líquido tisular y otras proteínas no colágenas como la fibronectina (*Ross y Pawlina, 2007*).

El diámetro de las fibras de colágena varía en tamaño desde 20 nm en la zona superficial hasta 20-70 nm en la zona profunda. La colágena tipo II consta de tres cadenas idénticas α -1 en forma helicoidal y proporciona la arquitectura básica del cartílago. La colágena tipo X se encuentra copolimerizada con la colágena tipo II en la zona calcificada (*Ross y Pawlina, 2007*). Las colágenas tipo II, IX y XI son específicas del cartílago y le dan su forma, rigidez y tensión. Los proteoglicanos son macromoléculas formadas por glucosaminoglicanos (GAG), unidos a una proteína central. El agregano es el proteoglicano más abundante en el cartílago articular y se forma por varios GAG como keratan sulfato (KS) y condroitin sulfato (CS). Los GAG en conjunto proveen de cargas negativas al cartílago y generan una presión osmótica que permite la retención de agua en el tejido (*Ross y Pawlina, 2007*). Además, al ser una molécula elástica, el agregano le proporciona al tejido su durabilidad y su capacidad de resistencia a la compresión. (*Ross y Pawlina, 2007*). Por otra parte, el líquido tisular y su interacción con la red de macromoléculas de

la MEC favorecen la resistencia a las fuerzas mecánicas; y ayuda a la nutrición de los condrocitos ya que hay difusión de los nutrientes desde el líquido sinovial (Quintero y col, 2010).

	VOLUMEN	COMPOSICIÓN
MATRIZ EXTRACELULAR	97- 98%	AGUA 70-80% PESO SECO 20-30% <ul style="list-style-type: none"> → COLÁGENO II 50% → PROTEOGLICANOS 30% → PROTEINAS DE MATRIZ 20%
CONDROCITOS	2-3%	

Figura1. Composición del líquido tisular (Gutfraind, 2010)

Los condrocitos del cartílago articular no son homogéneos, ya que se diferencian por su morfología y su función dependiendo de la zona donde se ubiquen. Estas células son responsables de la síntesis del cartílago articular durante el desarrollo de los vertebrados y, en la etapa adulta, se encargan del mantenimiento de los constituyentes de la MEC, cuyas características físicas-químicas y organización estructural aseguran las propiedades que permiten al cartílago soportar las grandes presiones generadas durante la carga (Quintero y col, 2010).

Los condrocitos de la zona superficial tienen una morfología aplanada mientras los condrocitos de la zona media son redondos se alojan de manera aislada o en grupos de dos o tres, en lagunas espaciosas y redondeadas. Los condrocitos de la zona profunda son más pequeños y ligeramente aplanados con respecto a los de las zonas superficial y media y se agrupan formando columnas verticales. En la zona calcificada, los condrocitos se disponen radialmente y su matriz contiene una

alta concentración de minerales de calcio y pocos proteoglicanos. Entre la zona profunda y la calcificada se encuentra el tidemark o línea de marea (Quintero y col, 2010) (Figura 2).



Figura 2. Esquema del cartílago articular en donde se muestran las zonas que lo componen.

El cartílago articular sano está en equilibrio entre los procesos anabólicos (síntesis de MEC) y catabólicos (degradación de MEC); lo que significa que las moléculas hidrolizadas durante la remodelación del tejido son inmediatamente reemplazadas por moléculas nuevas; sin embargo, en las patologías degenerativas la degradación de los componentes de la MEC es mayor que la síntesis y por lo que los condrocitos mueren y el cartílago se degrada. (Quintero y col, 2010).

Osteoartritis

La osteoartritis (OA) es una enfermedad reumática crónico-degenerativa que se manifiesta por dolor, deformidad e incapacidad funcional de las articulaciones con

mucha movilidad o que soportan peso (Rosales y col, 2014). La OA, también conocida como artrosis u osteoartrosis es una enfermedad muy común que se caracteriza principalmente por la destrucción gradual y progresiva del cartílago que recubre la superficie de las rodillas, las caderas, las manos, los hombros, los tobillos y la columna vertebral (Figura 3) (Kouri y Lavalle, 2006).

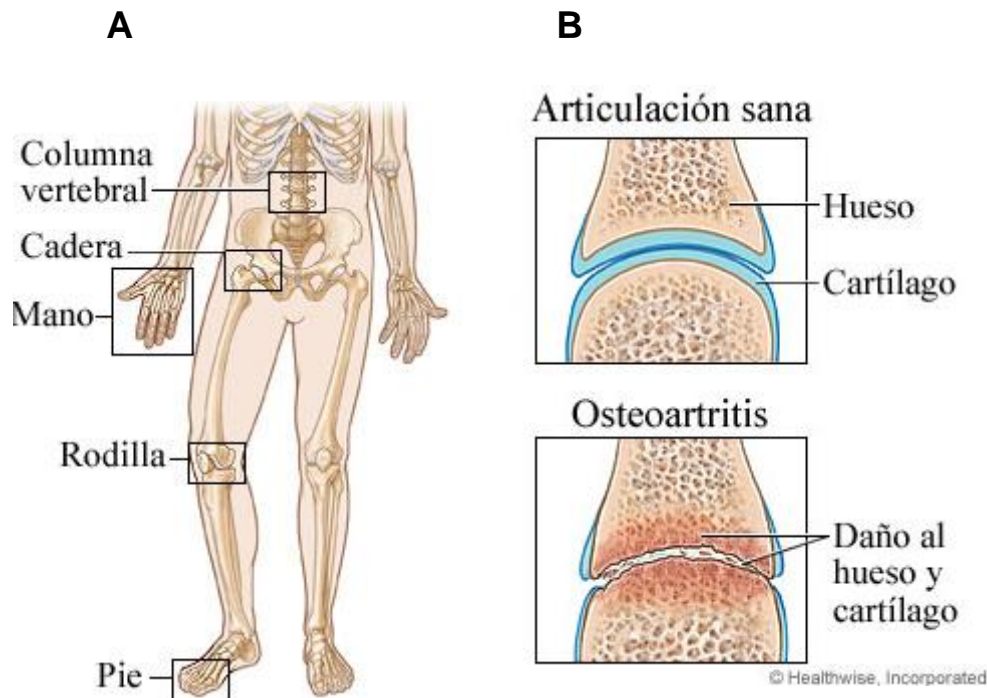


Figura 3. Osteoartritis (OA). A) Principales articulaciones afectadas (www.cdc.gov/spanish/Datos/Articulaciones ,2014) por la OA; B) pérdida del cartílago articular y daños al hueso subcondral en articulaciones con OA.

Incidencia y prevalencia

La OA es un problema de salud pública debido a su alta incidencia y prevalencia en la población mundial ya que la padecen al menos 15% de las personas mayores de 60 años (www.cdc.gov/arthritis/basics/osteoarthritis, 2014). Incluso, se ha determinado que dentro de las enfermedades reumáticas la OA es de 10 a 12 veces más frecuente que la artritis reumatoide (Wieland y col, 2005).

En el 2005 en los Estados Unidos de América, se determinó que la OA afectaba al 13.9% de adultos de 25 años o más y al 33.6% (12.4 millones de personas) de los mayores de 65 años (www.cdc.gov/arthritis/basics/osteoarthritis, 2014). La prevalencia

anual de la OA en el periodo de 2001-2005, se estimó en 3.5%, lo que equivale a 7.7 millones de personas con OA en Estados Unidos de América (*Sackss y col, 2010*). Diversos estudios han demostrado que hay también variación geográfica en la prevalencia de la OA. Por ejemplo, la OA de cadera es poco prevalente en Jamaica, Sudáfrica, Nigeria, Liberia y algunas regiones de China ya que solo afecta a un 1-4% en comparación con los países europeos en donde afecta al 25% de la población adulta (≥ 51 años) (*Nevitt y col, 2002*). Sin embargo, la OA en rodillas, tiene una mayor prevalencia entre las mujeres de Beijing (36.3%) en comparación con una población de caucásica americana (26.2%) (*Nevitt y col, 2002*).

Según la OMS, cerca del 28% de la población mayor de 60 años presenta artrosis sintomática, y el 80% de esta tiene limitaciones en el movimiento. El aumento en la esperanza de vida hará que esta patología se convierta en la cuarta causa de discapacidad para el 2020 (*www.who.org, 2014, Mendoza y García, 2005*).

En México, la Encuesta Nacional de Salud II (ENSA II) de 1998 encontró que la OA es una de las primeras causas de morbilidad con el 14% en personas mayores de 60 años (*De Pavía- Mota y col, 2005*). La prevalencia de la enfermedad entre este grupo es de 7.4 millones y de acuerdo a datos del Consejo Nacional de Población (*CONAPO, 2012*) estiman que este número aumentará para 2050 a 20 millones. Lo que traerá como consecuencia un aumento en el envejecimiento demográfico y por lo tanto, un crecimiento sustancial de la OA en los años siguientes (*Gómez y col, 2011*). En 1996, se calculó que la población mexicana de más de 60 años de edad era del 6.4% y se estimó que para el año 2010 llegaría al 8.8% (*Lozano-Ascencio y col, 1996*).

Factores de riesgo

La enfermedad se produce cuando el cartílago de alguna articulación se deteriora, como una consecuencia de la tensión mecánica, alteraciones biomecánicas y por la actividad creciente de la actividad de metaloproteinasas (MMPs) que degradan la matriz del cartílago (*Aigner y col, 2007*). Los factores de riesgo se dividen en sistémicos y locales (Figura 4).

Entre los sistémicos tenemos a:

- 1) La densidad mineral ósea (DMO); diversos estudios muestran que a mayor DMO aumenta el riesgo de padecer OA, ya que el aumento de la dureza y densidad del hueso incrementan la tensión mecánica lo que ocasiona el daño al cartílago (*Jódar y col, 2005*)
- 2) El género; la mayoría de los tipos de artritis son más comunes en las mujeres ya que el 60% de las personas que padecen OA son mujeres (www.cdc.gov/arthritis/espanol/risk-management.htm, 2014).
- 3) La edad está asociado al envejecimiento del sistema locomotor, ya que presentan cambios anatómicos de las articulaciones y alteraciones biomecánicas o bioquímicas en el cartílago articular, que comprometen las propiedades mecánicas del cartílago (*Rodríguez- Hernández, 2004*).
- 4) La genética se ha encontrado una relación con un gen autonómico en relación al sexo y predominio en mujeres (*Rodríguez- Hernández, 2004*).

Y entre los factores locales tenemos a:

- 1) La obesidad ya que se incrementa la presión sobre las articulaciones de carga. Pero bioquímicamente al los niveles altos de la hormona leptina genera una respuesta entre la respuesta pro-inflamatoria de los condrocitos (IL-6, TNF- α) que podrían acelerar el desarrollo de la enfermedad (*Muñoz y col, 2004*).
- 2) El daño articular que se ocasiona por lesiones en las articulaciones pueden acelerar el desarrollo de la OA (*Rodríguez- Hernández, 2004*).
- 3) La práctica del deporte de alto impacto es un factor de riesgo ya que pueden ocurrir lesiones en la articulación como la ruptura de ligamentos y meniscos; De esta manera las articulaciones con lesiones mal atendidas serán más propensas a desarrollar OA (*Deyle y col, 2005*).
- 4) Debilidad muscular, al tener de cuádriceps femorales débiles (músculos superiores del muslo) las personas serán más propensos a desarrollar OA de rodilla que aquellos que no padecen de debilidad muscular (*Rodríguez- Hernández, 2004*).

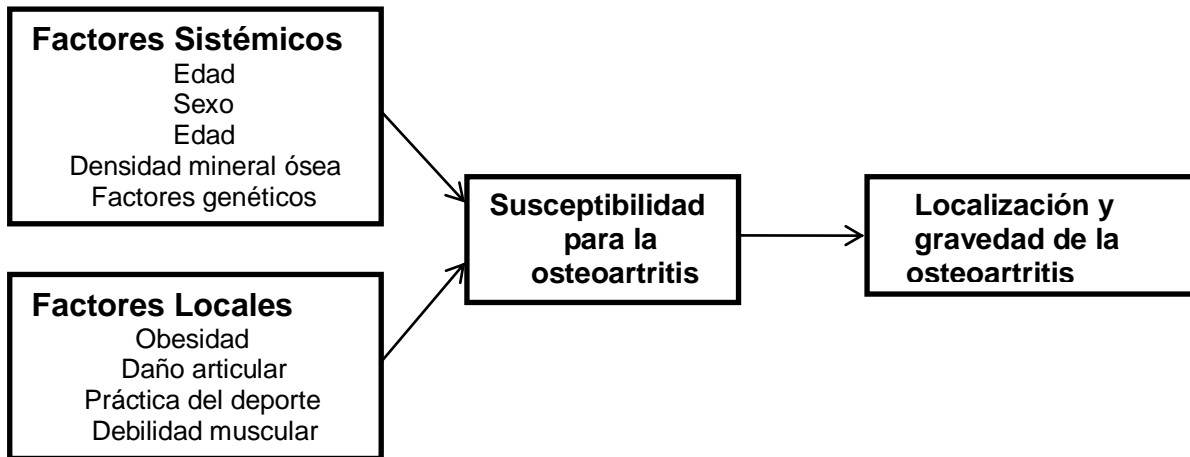


Figura 4. Factores sistémicos y locales relacionados con la OA (*Peña Ayala col, 2007*)

Patogénesis de la OA

En la patogénesis de la OA los condrocitos responden a los estímulos adversos promoviendo la degradación de la MEC y regulando negativamente los procesos para su reparación, por lo que su integridad es fundamental en la patogénesis de la OA (Figura 5). Ambos procesos están íntimamente relacionados, debido a que la degradación de la MEC resulta en la muerte celular como consecuencia de la pérdida de los mecanismos de supervivencia (*Kouri y Lavalle, 2006*).

En la OA se altera el cartílago y gradualmente la superficie se erosiona y con el tiempo el cartílago se desgasta hasta desaparecer. A medida que se pierde el cartílago, el hueso subcondral reacciona y prolifera hacia los lados generando los nódulos llamados osteofitos. La membrana sinovial comienza a engrosarse y produce un líquido sinovial de menor calidad, el cual produce una lubricación menor y también puede contener fragmentos de cartílago. Estos fragmentos originan una inflamación de la membrana y la producción de sustancias que al pasar a la cavidad articular aceleran la destrucción del cartílago (*Ballesteros y col, 2006*).

La degeneración del cartílago articular y los cambios en el hueso subyacente y tejidos de soporte ocasionan dolor, rigidez, problemas de movilidad y limitación de la actividad (*Goldring y Goldring, 2013*).

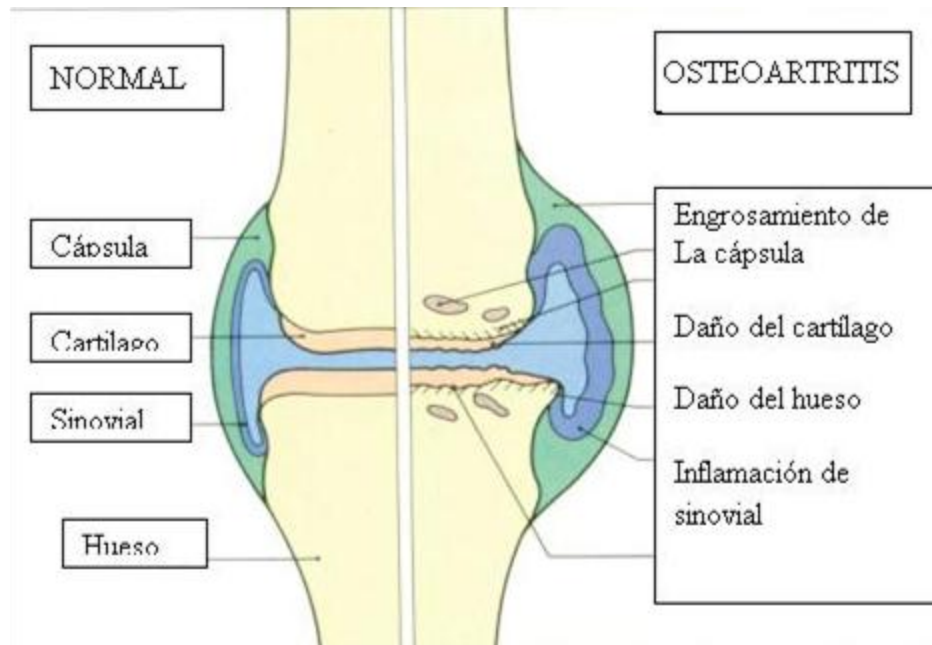


Figura 5. Articulación de rodilla comparando una normal y una con OA.

La pérdida de proteoglicanos y colágeno del cartilago lo hace menos elástico y es más susceptible al daño molecular lo que lleva al deterioro progresivo del cartilago (Aigner y col, 2006). La destrucción molecular de la MEC es conducida principalmente por una actividad creciente de las metaloproteinasas de la matriz (MMPs- 1, -3, -13) y de las agrecanasas (ADAMTs-4 y-5). Estas enzimas son inducidas por citocinas como IL-1 β y TNF- α , así como también por los productos de degradación de la MEC. Las MMPs y ADAMTs parecen tener un papel primordial en el proceso de degradación del cartilago por lo que, su inhibición se ha propuesto como un blanco terapéutico para detener la progresión de la OA (Quintero y col, 2010). Las MMPs participan no solo en procesos degenerativos sino en numerosos procesos relacionados con el desarrollo y la regeneración de los tejidos y órganos (Newby, 2012).

Los cambios bioquímicos en la MEC son también debidos a los cambios morfológicos del condrocito (Kouri y col, 1996). Así, durante la progresión de la OA se han descrito poblaciones celulares variables. La subpoblación tipo 1 son condrocitos normales situados en la zona superficial y la zona media superior. La subpoblación tipo 2 está formada por condrocitos secretorios caracterizados por

un aumento en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. La subpoblación tipo 3 son células que están bajo un proceso de muerte celular programada (*Kouri y col, 1997*).

El tipo de muerte celular que llevan a cabo los condrocitos aun no ha sido definido en su totalidad, debido a que hay evidencias que apoyan que la muerte es por apoptosis, pero también hay evidencias que apoyan la presencia de una muerte diferente a la apoptosis, con base que a estas evidencias; en el 2004 Roach y colaboradores sugirieron el término “condroptosis” para referirse al tipo de muerte de los condrocitos. Dado que la integridad de la MEC depende también de la sobrevivencia del condrocito, la muerte celular del condrocito tiene un papel fundamental en la patogénesis de la OA (*Kouri y col, 1997; Blanco y col, 1998*), ya que no hay capacidad para la reparación del tejido, lo que ha llevado a sugerir el trasplante de condrocitos como una estrategia terapéutica para restaurar al cartílago dañado.

Como ya mencionamos, en el cartílago normal existe un equilibrio entre los procesos anabólicos y catabólicos que mantienen la integridad del cartílago articular. Sin embargo, en la OA existe una alteración del equilibrio entre la síntesis y degradación de la MEC, que permite la destrucción del cartílago articular (Figura 6) (*Sánchez y López, 2011*).

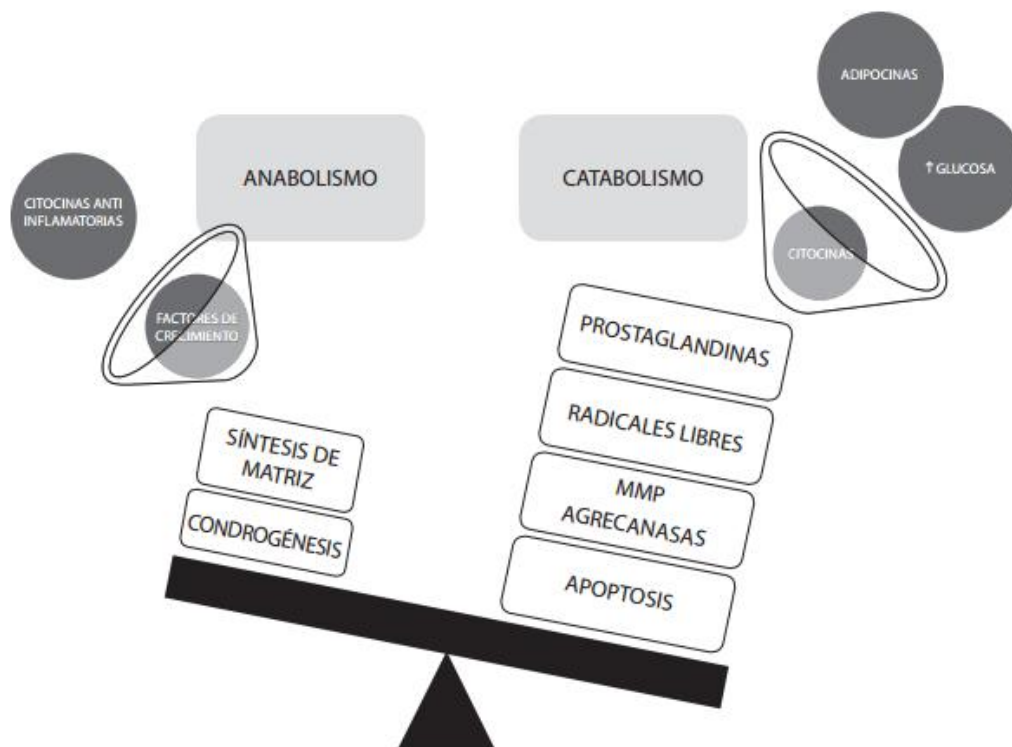


Figura 6. Esquema general del desequilibrio en el metabolismo de la MEC durante el proceso fisiopatológico de la OA y los mecanismos que ocasionan el predominio del catabolismo (Sánchez y López, 2011).

Aunque la OA no es una enfermedad inflamatoria típica ya que no existe la infiltración de neutrófilos y no hay manifestaciones sistémicas de la enfermedad se conoce que los mediadores inflamatorios como IL-1 β y TNF- α favorecen la destrucción de la MEC del ya que inducen la sobreexpresión de la enzimas degradativas (MMPs y ADAMTs) (Lozoya y Kouri, 2000), regulan negativamente la síntesis de los componentes de MEC como las colágenas y PG (Sánchez y López, 2011) y favorece la síntesis de óxido nítrico (NO).

ANTECEDENTES

En la actualidad no hay medicamento que modifique el daño estructural del cartílago articular en la OA, por lo que los tratamientos van dirigidos a aliviar el dolor y a mantener o mejorar el funcionamiento de las articulaciones afectadas (Ballesteros y col, 2006). Por lo tanto, se emplean medidas no farmacológicas como el

ejercicio, uso de rodilleras, control de peso así como tratamientos farmacológicos como la inyección intra articular de ácido hialurónico y fármacos anti-inflamatorios no esteroideos como la aspirina, ibuprofeno, napróxeno etc. (Messier y col, 2000). En la actualidad hay diferentes tratamientos con poca evidencia científica de efecto potencial como modificadores de la OA (Espinosa- Morales y col, 2007). El de mayor constancia hasta el momento es la glucosamina que sirve de sustrato para la biosíntesis de cadenas de glucosaminoglicanos (Setnikar y col, 1991). Esta molécula reduce la producción de prostaglandina E₂ (Largo y col, 2003) e inhibe hasta un 73% la expresión de citocinas pro-inflamatorias a dosis supra fisiológicas (Gouze y col, 2006); sin embargo, su efecto como fármaco modificador de la OA no se ha demostrado. En otro estudio se observó que el condroitin sulfato (CS) tiene efectos anabólicos al aumentar la síntesis de PG y anti-catabólicos al inhibir la IL-1, (Buckwalter y col, 2005) pero de igual manera su capacidad para restaurar el cartílago no se ha demostrado.

Hasta la fecha no se cuenta con un tratamiento que pueda detener la pérdida o permita la regeneración del cartílago articular, por lo tanto se han explorado estrategias experimentales alternas como la aplicación de células madre. Así, se han realizado trasplantes autólogos de células troncales mesenquimales en las rodillas de cabras menisectomizadas. Los resultados mostraron que había regeneración de tejido del menisco y una disminución en la destrucción de cartílago articular (Murphy y col, 2000). En otro estudio inyectaron células madre en ratas con menisectomía y también observaron una regeneración del menisco, así como persistencia de largo plazo de las células troncales mesenquimales en las rodillas lesionadas (Horwitz y col, 2005). Consecuentemente el empleo de células madre se ha vuelto una estrategia terapéutica atractiva para el tratamiento de la OA.

Adicionalmente, se ha descrito la presencia de una población de células madre mesenquimales en el cartílago articular adulto sano y con OA (Solís- García, 2013) que experimentalmente pudieran diferenciarse a condrocitos para la regeneración del cartílago dañado por OA.

Células madre

Desde el punto de vista de su capacidad reproductiva y funcional, las células madre son capaces de dividirse simultáneamente para auto-renovarse, con producción de más células madre semejantes a ella, y por otro lado, generar células hijas comprometidas con diferentes linajes celulares que se diferencian en diversos tipos de células especializadas. Las células madre se clasifican en embrionarias y somáticas o adultas.

Las células madre embrionarias derivan del embrión de los mamíferos en su etapa de blastocito y poseen la capacidad de generar cualquier célula diferenciada en el organismo. Las células somáticas o adultas son células especializadas dentro de la organización de un tejido específico pero su capacidad de diferenciación está restringida ya que es capaz únicamente de generar células del tejido que representa, Figura 7 (López, 2003).

El uso de células madre, supone una novedad de gran impacto a nivel científico ya que se considera como alternativa terapéutica para diferentes patologías debido a su efectividad para reparar tejidos sin generar tejido de granulación asociado con la cicatrización (Horwitz y col, 2005; González, 2014). El caso más destacado es el de las células madre hematopoyéticas capaces de diferenciarse en diversos tejidos como; endotelio, músculo cardíaco, músculo estriado, hepatocitos y neuronas, (López, 2003). (Wakitani y col, 1994).

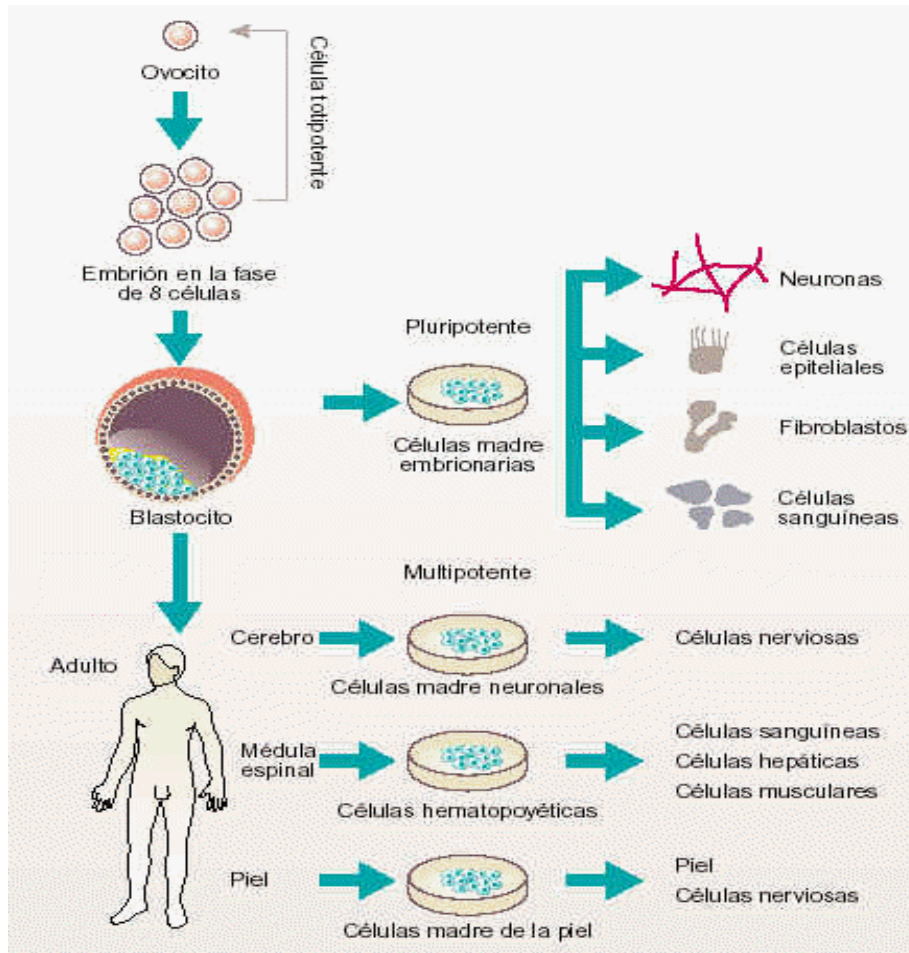


Figura 7. Clasificación de las células madre.

Las células madre mesenquimales (MSCs) se han investigado por el potencial en la reparación y regeneración de tejidos del sistema musculoesquelético (*Wakitani y col, 1994*). Las células MSCs tienen la asombrosa capacidad de diferenciarse en células de cartílago, hueso y tejido adiposo. Utilizando esta capacidad, los investigadores han logrado diferenciar a estas células en condrocitos que pudieran tener una aplicación en la regeneración del cartílago articular.

Estudios realizados en cultivos de condrocitos expuestos al plasma rico en plaquetas, han demostrado un incremento en la proliferación celular y en la síntesis de GAG y colágena tipo II en comparación con los no expuestos; además de una disminución en la expresión de factores catabólicos como IL-1 β y efectos inhibitorios de la activación del factor nuclear κ B (NF κ B) en condrocitos humanos

(Carrillo- Mora y col, 2013). Dentro de los componentes más abundantes dentro del plasma rico en plaquetas destaca el PDGF.

Factor de crecimiento derivado de plaquetas (**PDGF- $\beta\beta$**)

El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)- $\beta\beta$ es un dímero formado por dos cadenas polipeptídicas, unidas por puentes disulfuro, y dentro de sus actividades destacan las siguientes: activador de macrófagos, facilita la formación de colágeno tipo I (Morales-Álvarez y Ariza, 2003); estimula la mitosis de las células mesenquimales y osteoblastos; es un factor mitogénico y quimiotáctico de células de estirpe fibroblástica, glial y muscular lisa; además, regula la secreción colagenasas (De la Mata, 2013).

Los factores de crecimiento pueden mejorar las técnicas de reparación del cartílago a través de múltiples mecanismos, incluyendo el reclutamiento de células condrogénicas (quimiotaxis), la estimulación de la proliferación celular condrogénica (mitogénesis) y la mejora de la matriz del cartílago al regular negativamente los procesos catabólicos e incrementando los procesos anabólicos como la síntesis de colágena y PG (Smith y col, 1991). Esta capacidad de estimular la proliferación celular puede ser aprovechada para inducir la proliferación de las células madre presentes en el cartílago articular con OA ya que su posterior diferenciación en condrocitos pueden ayudar en la regeneración del cartílago, o alternativamente la aplicación de este factor puede mantener la integridad del cartílago articular al regular los procesos bioquímicos que lo destruyen.

HIPÓTESIS

El tratamiento intra-articular con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF- $\beta\beta$) inducirá la proliferación celular y modificará la expresión de los biomarcadores asociados a la OA en un modelo en rata.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF- $\beta\beta$) sobre la progresión de la osteoartritis experimental en el cartílago articular en rata macho Wistar.

OBJETIVOS PARTICULARES

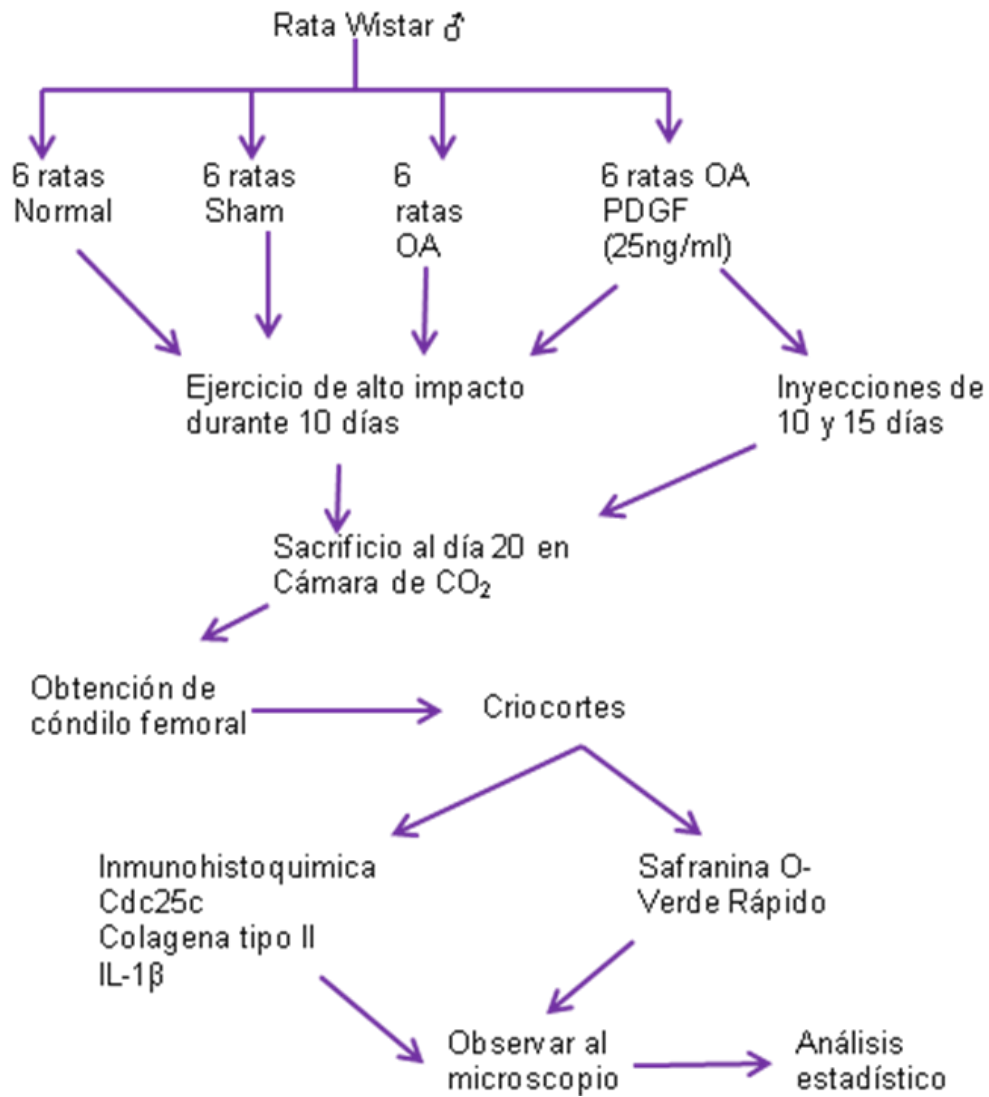
Evaluar el efecto del PDGF- $\beta\beta$ sobre el contenido de proteoglicanos en el cartílago articular de ratas con OA experimental

Determinar el efecto del PDGF- $\beta\beta$ sobre la expresión de colágena tipo II, IL-1 β y en el cartílago articular de ratas con OA experimental.

Evaluar el efecto del PDGF- $\beta\beta$ sobre la proliferación celular al analizar la expresión de Cdc25c.

Determinar si el tratamiento con PDGF- $\beta\beta$ modifica la progresión de la OA y si esto correlaciona con los cambios en las proteínas seleccionadas.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 130 a 150 gramos, mantenidas en condiciones de bioterio con un ciclo de 12 horas luz y 12 horas sombra. Los animales se sacrificaron por sobredosis de CO₂ en apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 que se ajusta a los criterios del comité ético institucional.

Modelo

El empleo de un modelo de OA inducido en ratas Wistar por menisectomía parcial en la articulación de la rodilla (*Lozoya y Kouri, 2000*) y ejercicio de alto impacto ha permitido hacer un estudio de la cinética de los cambios morfo-funcionales y de la participación de moléculas que intervienen en el proceso degenerativo del cartílago articular.

Menisectomía

Los animales se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de una solución de 60 mg/kg de ketamina y 4 mg/kg de xilacina.

Para la menisectomía primero se realizó una pequeña incisión en la piel (2-3 mm) en el lado interno de la pata posterior derecha. Después de cortar la capsula articular y con la ayuda de un bisturí, el menisco medial se separó del plato tibial y del cóndilo femoral. Posteriormente, el menisco se haló ligeramente de su lugar, para después fijarlo con pinzas, cortarlo y extraerlo con una hoja de bisturí del N° 12. Por último, en condiciones de asepsia quirúrgica se procedió a cerrar con 2 o 3 puntos de sutura. A las ratas con la menisectomía se les consideró lesionadas (OA). Como control se utilizaron ratas con cirugía Sham a las que se les realizó la incisión y el corte de la capsula articular pero no se les extrajo el menisco. También se incluyó como control un grupo de ratas normales a las que no se les realizó ninguna cirugía.

Ejercicio

Después de la cirugía, se dejó recuperar a las ratas por dos días y a partir del tercer día se sometieron a ejercicio de alto impacto; que consistió en colocar a 10

ratas en una caja y someterlas durante 15 minutos a saltos de 30 cm de altura, saltos cortos repetidos y desplazamientos laterales por un periodo de 10 días. Después, de los diez días de ejercicio las ratas se dejaron sin ejercicio por diez días adicionales para luego sacrificarse. También los grupos control normal y Sham se sometieron al ejercicio por el mismo tiempo que las ratas con OA.

Inyecciones intra-articulares

Consistió en inyectar una solución a través de los tejidos para llegar al espacio intra-articular de la rodilla derecha, donde se realizó la menisectomía. Las inyecciones que se aplicaron fueron con 25 µl de PDGF-ββ (25 ng/ml) en solución salina estéril. Se aplicaron dos inyecciones, la primera al día diez de ejercicio y la segunda a los 15 días ya con las ratas sin ejercicio. Al cumplir los 20 días, las ratas se sacrificaron y las muestras de cartílago articular se extrajeron y procesaron para su análisis.

Obtención y procesamiento del cartílago articular

Las ratas se sacrificaron en una cámara de CO₂, posteriormente se lavaron con cloro al 10% y se extrajeron las articulaciones tratadas. En condiciones de esterilidad se abrió la capsula articular de la rodilla derecha, siguiendo la metodología reportada por Lozoya y Kouri en el 2000. Posteriormente se extrajeron los cóndilos femorales laterales de la pata derecha. Los cóndilos se fijaron en paraformaldehído 4% en PBS a un pH de 7.2 durante 24 horas a 4°C. Enseguida, los tejidos se incubaron en una solución de sacarosa al 10% en PBS pH 7.2 durante 24 horas a 4°C.

Procesamiento de muestras de cartílago

Los cóndilos ya fijados de cada experimento se congelaron en un medio especial de congelamiento y se cortaron en un criostato (Leica CM 1100). Los criocortes de 8 µm se colocaron en portaobjetos previamente gelatinizados con gelatina de piel de porcino al 0.5% y sulfato de cromo y potasio al 0.05% en agua. Las laminillas con los criocortes se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento.

Tinción con Safranina O

Para evaluar el contenido de proteoglicanos en el cartílago articular, los cortes de 8 µm de los explantes de cada tratamiento se hidrataron en PBS 1X durante 10

minutos a temperatura ambiente y se tiñeron con la técnica de Safranina O-verde rápido (ver anexo). Las imágenes digitales se obtuvieron con una cámara digital acoplada a un microscopio de luz con el objetivo 40x con una cámara digital (Leica DFC280) colocada en un microscopio óptico (Leica DFC320), utilizando el programa LAS (Leica).

Inmunohistoquímica

Para determinar los cambios en la expresión de proteínas se realizaron experimentos de inmunohistoquímica:

Los criocortes se colocaron en una cámara húmeda y se hidrataron con 100µl de PBS pH 7.2 durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se permeabilizaron con PBS 1X Tritón 0.3% (PBT) por 3 minutos, se bloquearon con suero normal de caballo al 1.5% en PBS durante 20 minutos. Después, los anticuerpos primarios: conejo anti-Cdc25C (1:250), conejo anti-IL-1β (1:80), y conejo anti colágena IIA (1:80), (Santa Cruz Biotechnology, INC) diluidos en PBS 1X, BSA 0.2%, Tritón x-100 0.01%, se incubaron a 4°C durante toda la noche en una cámara húmeda. Al término, las laminillas se lavaron con PBS 1X por 3 veces durante 5 minutos. Se prosiguió a eliminar el exceso de PBS 1X y se agregaron 100 µl del anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado a una dilución de 1:250; anti conejo biotinilado 1:100 (para detectar IL-1beta); y de anti-conejo biotinilado 1:100 (COLIIA), se cubrieron con Parafilm y se lavaron con PBS 3 veces durante 5 minutos. Se eliminó el exceso de la solución de lavado y se incubaron con 150 µl del complejo ABC del sistema Avidina-Biotina (Vector laboratories) durante 20 minutos cubiertos con Parafilm a temperatura ambiente. Al término de la incubación Se retiró el Parafilm y se lavó con PBS. La actividad de la peróxidasa se reveló con H₂O₂ al 0.01%, usando 3',3'-diaminobenzidina (DAB) al 0.05%. La reacción se monitoreo en la obscuridad hasta notar la precipitación del DAB y cuando aparecieron los precipitados la reacción se detuvo con PBS.

Como control positivo para el anticuerpo policlonal especie anti-CdC25c, se utilizo la línea celular HaCAT. Para los anticuerpos anti IL-1β se utilizaron muestras de cartílago con OA ya que es importante en el desarrollo de la enfermedad y para colagena II se utilizaron muestras de cartílago normal ya que presenta niveles

altos de colágena tipo II. Como control negativo, se omitió el uso del anticuerpo primario.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico y los gráficos se elaboraron utilizando el programa GraphPad Prism 5.01. Los datos utilizados para realizar el análisis estadístico indican el número de células positivas para cada proteína de interés, IL-1 β , colágena II y CdC25c. Se analizaron 9 laminillas por cada grupo de estudio y de cada laminilla se analizaron al menos 3 campos ópticos. Se utilizó la prueba de ANOVA (análisis de varianza) de una sola vía de Tukey, se consideró una * $p \leq 0.05$ y ** $p < 0.01$ como diferencia significativa cuando los grupos OA y OA con tratamiento se compararon contra el grupo y Sham. Y * $p \leq 0.05$ y ** $p < 0.01$ cuando el grupo OA con tratamiento se comparó con el grupo de OA sin tratamiento. Ya que no se encontraron diferencias entre los grupos control normal y Sham la comparación estadística de los grupos OA con y sin tratamiento se realizó solo contra los grupos Sham.

RESULTADOS

Para determinar si el tratamiento con el PDGF- $\beta\beta$ afecta la progresión de la OA realizamos un análisis histopatológico de los cortes teñidos con safranina-O. El grado histopatológico del cartílago articular se determinó de acuerdo al método de clasificación recomendado por la OARSI (*Pritzker y col, 2006*) para evaluar el grado de OA. Esta escala numérica va de 0 (donde se muestra estructura normal) a 6 (deformación de la estructura y formación de osteofitos).

Como se esperaba los grupos control normal y Sham no presentaron daño ya que la superficie del cartílago fue lisa con los condrocitos de la zona superficial aplanados y no se observó pérdida de proteoglicanos. (Figura 8B y D). Por el contrario el grupo con OA fue clasificado con grado de 4.5 ya que existió fibrilación, fisuras, pérdida de proteoglicanos y formación de agregados celulares (figura 8F). El tratamiento con el PDGF si afecto la progresión de la OA ya que se clasifico con grado 2.5, debido a que no se detectaron fisuras y la fibrilación fue menor; aunque si hubo perdida de proteoglicanos y formación de agregados celulares (figura 8H).

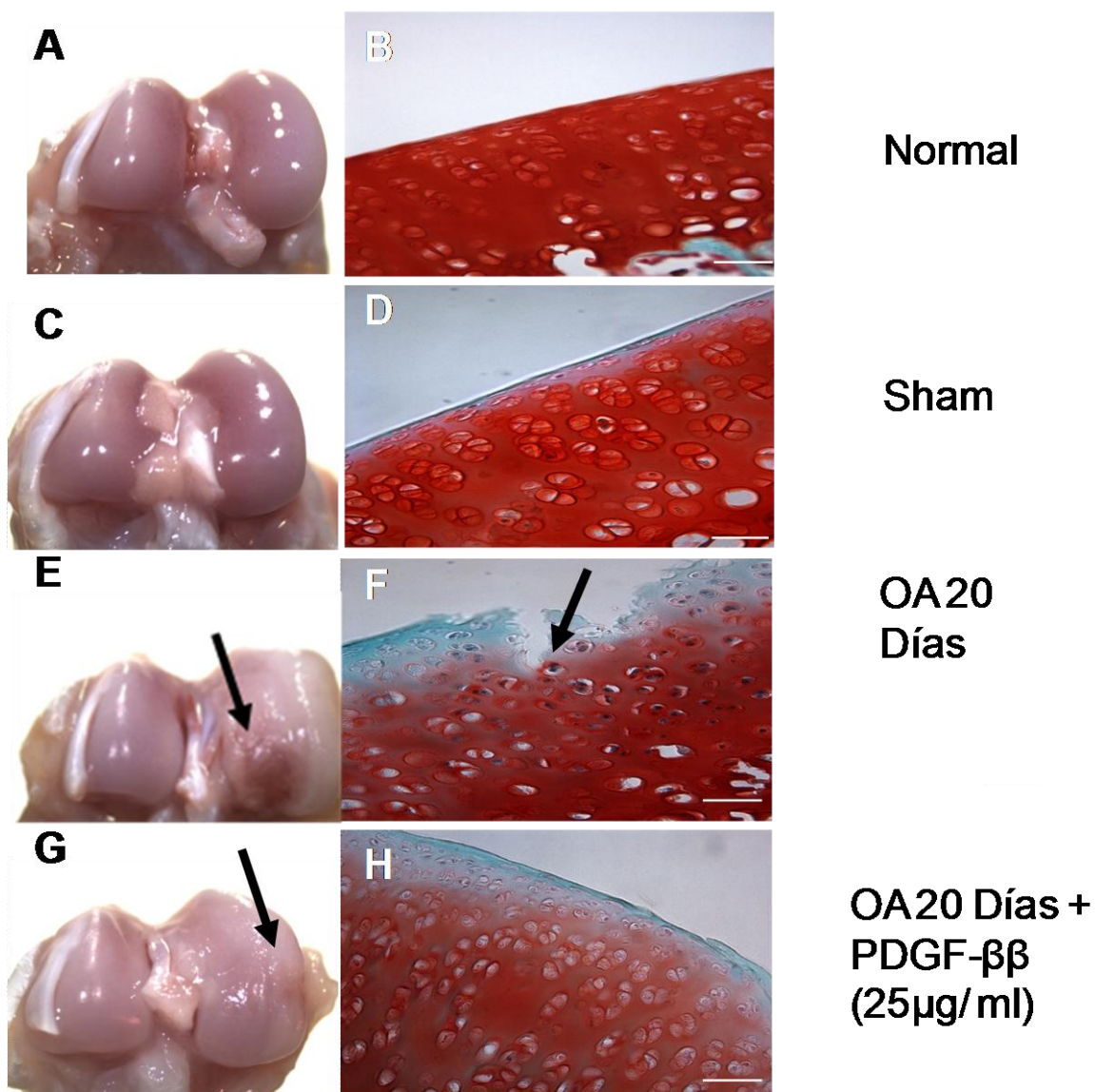


Figura 8. Efecto del PDGF- $\beta\beta$ sobre la estructura y contenido de proteoglicanos del cartílago de rata. En el panel izquierdo se muestran los cóndilos y en el panel derecho se muestran los cortes histológicos teñidos con safranina O-verde rápido. En las imágenes E y G se observan cambios macroscópicos señalados con una flecha, en la imagen F con una flecha muestra la zona superficial presenta fibrilación y pérdida de proteoglicanos. Barra de escala 50 μ m.

Comparado los grupos control; normal (Figura 8A) y Sham (Figura 8C), que presentaron una superficie lisa y brillante, la menisectomía y ejercicio de alto impacto durante 10 días por 15 minutos diarios indujo cambios en la estructura macroscópica del cartílago articular, que se caracterizó por un desgaste del

cartílago articular (Figura 8E, flecha negra). Estos resultados coinciden con una osteoartritis avanzada ya reportada por nuestro grupo de investigación (Abbud y Kouri, 2000). Los cambios macroscópicos correlacionaron con cambios bien definidos a nivel microscópico ya que, comparado a los grupos control normal (Figura 8B) y Sham (Figura 8D), en el cartílago de ratas con OA se observa claramente la fibrilación y pérdida de proteoglicanos (Figura 8F). Los cambios se debieron a la menisectomía, ya que las ratas con cirugía Sham sometidas a ejercicio de alto impacto por 10 días no desarrollaron la lesión a nivel macroscópico ni a nivel microscópico (Figura 8C y 8D).

El tratamiento con el PDGF- $\beta\beta$ si tuvo un efecto sobre la progresión de la OA, ya que a nivel macroscópico el desgaste del cartílago fue menor (Figura 8G) cuando se compara con las ratas OA sin tratamiento (Figura 8E). Además, el tratamiento con PDGF- $\beta\beta$ si tuvo un claro efecto benéfico ya que el cartílago articular de las ratas tratadas presentó una menor fibrilación en la superficie articular, aunque cualitativamente el contenido de proteoglicanos no se modificó, (comparar figura 8F con 8H).

La IL-1 β es una citosina pro-inflamatoria que juega un papel crucial en la patogénesis de la OA ya que; suprime la síntesis de proteoglicanos, colágena tipo II y estimula la síntesis de las metaloproteinasas y agreganasas que degradan a la MEC (Londoño y col, 1993) También suprime los efectos de varios factores de crecimiento sobre los condrocitos, al inhibir la respuesta mitogénica y la síntesis de la glicosaminoglicanos (Spindler y col, 1995). Por lo tanto, investigamos cual es el efecto del PDGF sobre la expresión de esta citosina en la progresión de la OA.

En la Figura 9, se observa que en el cartílago de ratas con OA la expresión a IL-1 β se incrementa en las tres zonas del cartílago (Figura 9C), cuando se compara con los grupos normal (Figura 9A) y Sham (Figura 9B) en los cuales la expresión de IL-1 β es muy baja. El conteo de células positivas para IL-1 β mostro un incremento de aproximadamente 11% en el cartílago de ratas con OA (Figura 9C y F, * $p\leq 0.05$, comparado al cartílago de ratas con cirugía Sham. El grupo de ratas con OA tratadas con PDGF- $\beta\beta$ también presentaron un aumento en el número de células positivas para IL-1 β de hasta un 2.5% en comparación al grupo Sham (Figura 9D y

F, ** $p \leq 0.01$) pero cuando se compara con el grupo OA hubo un menor porcentaje de células que expresaron IL-1 β (aproximadamente 7.5% Figura 9F, $p <$).

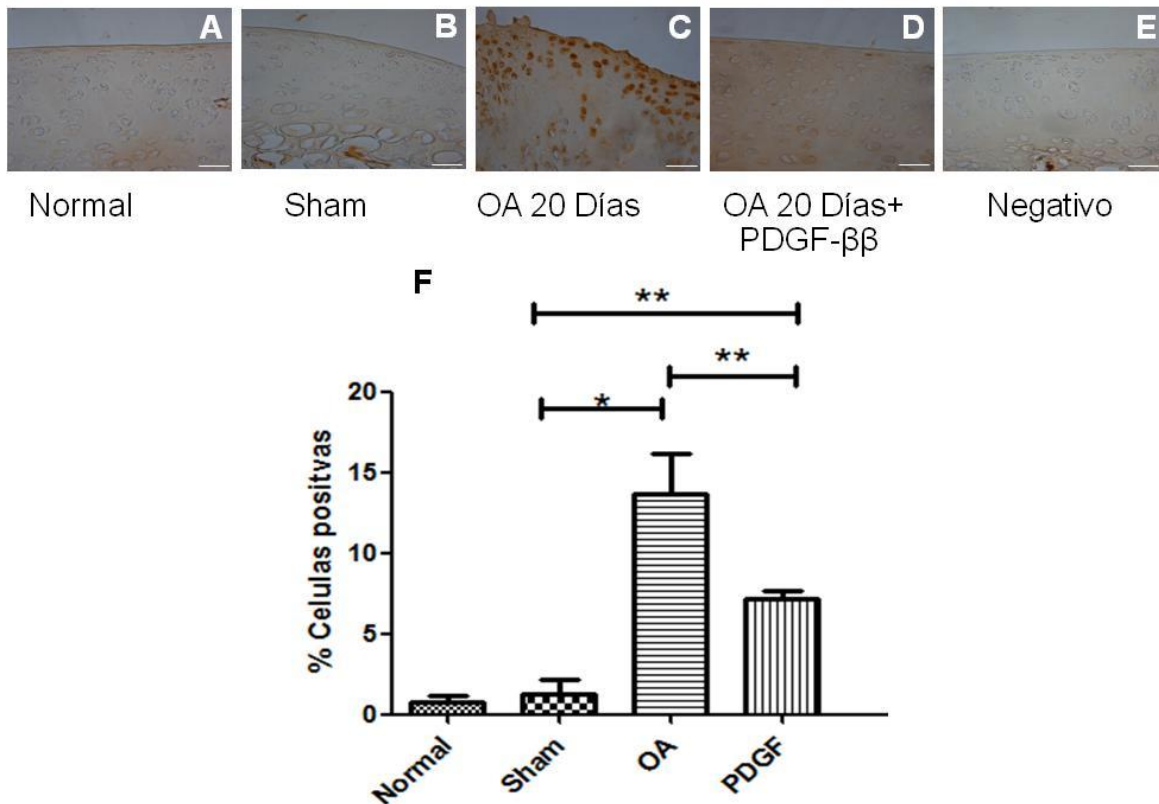


Figura 9. Expresión de IL-1 β en el cartílago articular. En la figura se observan los cortes histológicos de cartílago articular de ratas normal (A), Sham (B), OA (D) y OA tratadas con PDGF- $\beta\beta$ (D), teñidas por inmunohistoquímica para detectar a la IL-1 β . Como control negativo se omitió al anticuerpo primario (E) Barra blanca 50 μ m con el objetivo 40x. El porcentaje de células positivas para IL-1 β se representó en la gráfica de barras (F) que indica los valores de la media \pm DE. El análisis estadístico mostró un aumento significativo en los grupos OA y OA con tratamiento con respecto al grupo Sham y del grupo OA con tratamiento con respecto al grupo OA sin tratamiento (* $p \leq 0.05$ y ** $p \leq 0.01$).

La colágena II mantiene la estructura y la elasticidad del cartílago pero durante la patogénesis de la OA su expresión disminuye (Olmo y col, 1998). Los experimentos de inmunohistoquímica mostraron que los grupos control normal (Figura 10A) y Sham (Figura 10B), la expresión para colágena II fue positiva en todas las zonas del cartílago ya que no hay desgaste del tejido. Al realizar el conteo de las células positivas se encontró que aproximadamente un 11% de las células expresaron la

colágena tipo II (Figura 10F). Como se esperaba la OA indujo una disminución de células positivas a colágena hasta aproximadamente un 4% del total (Figura 10C y F * $p \leq 0.05$). El tratamiento de ratas OA con PDGF mostró un restablecimiento en el número de células positivas para colágena II en los mismos porcentajes (aproximadamente 11%; Figura 10B y F * $p \leq 0.05$) que los grupos normal y Sham (Figura 10F).

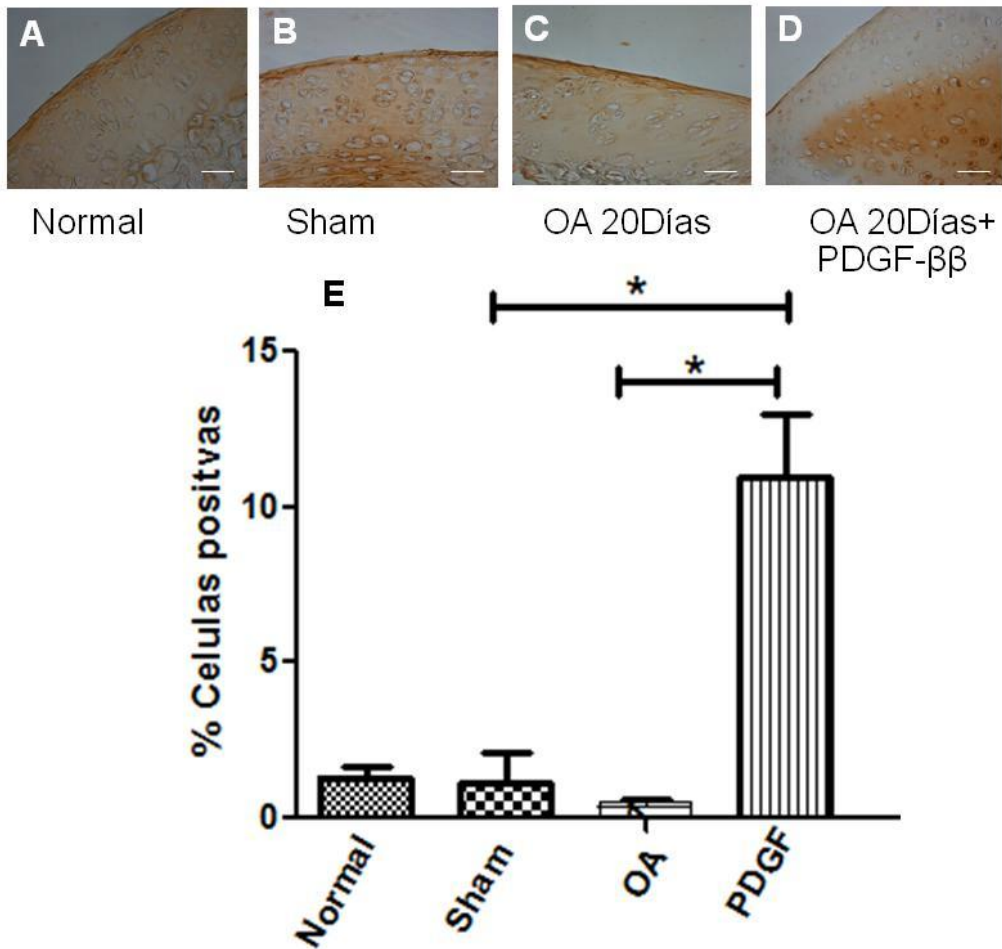


Figura 10. Expresión de colágena II en el cartílago articular. En la figura se observan los cortes histológicos de cartílago articular de ratas normal (A), Sham (B), OA (C) y OA tratadas con PDGF-ββ (D), teñidas por inmunohistoquímica para detectar a la colágena II. Como control negativo se omitió al anticuerpo primario (E) Barra blanca 50 μm con el objetivo 40x. El porcentaje de células positivas para colágena II se representó en la gráfica de barras (F) que indica los valores de la

media \pm DE. El análisis estadístico mostró una disminución significativa en los grupos OA con respecto al grupo Sham. El grupo tratado con PDGF mostró una recuperación en el número de células positivas para colágena II con respecto al grupo OA sin tratamiento (* $p\leq 0.05$).

Varios estudios han demostrado la presencia de células madre mesenquimales en el cartílago articular de humanos (*Solis-García, 2013*). Por lo tanto para determinar si estas células son capaces de proliferar en respuesta al PDGF utilizamos al marcador de proliferación Cdc25c que es una fosfatasa involucrada en la transición de las fases S a M del ciclo celular.

Primero optimizamos la inmunohistoquímica para detectar a la proteína cdc25c en la línea celular HaCAT que se encuentra en un proceso de división celular continua. Nuestros resultados mostraron un claro inmunomarcaje en las células HaCAT (flechas en la figura 11B-D)

En la Figura 12 se observa que el cartílago de ratas control normal y Sham expresan muy bajos niveles de Cdc25c (figura 12A y B) lo que representó aproximadamente un 2% en el cartílago de ratas de las condrocitos (Figura 12E). En el grupo OA sin tratamiento se observó una disminución de aproximadamente 1% en el porcentaje de células positivas para Cdc25c con respecto al grupo Sham (Figura 12C y 12F. Sorprendentemente en el grupo OA con tratamiento con PDGF (Figura 12D y 12F, * $p\leq 0.05$) se observó un incremento de aproximadamente un 11% cuando se comparó con el grupo Sham.

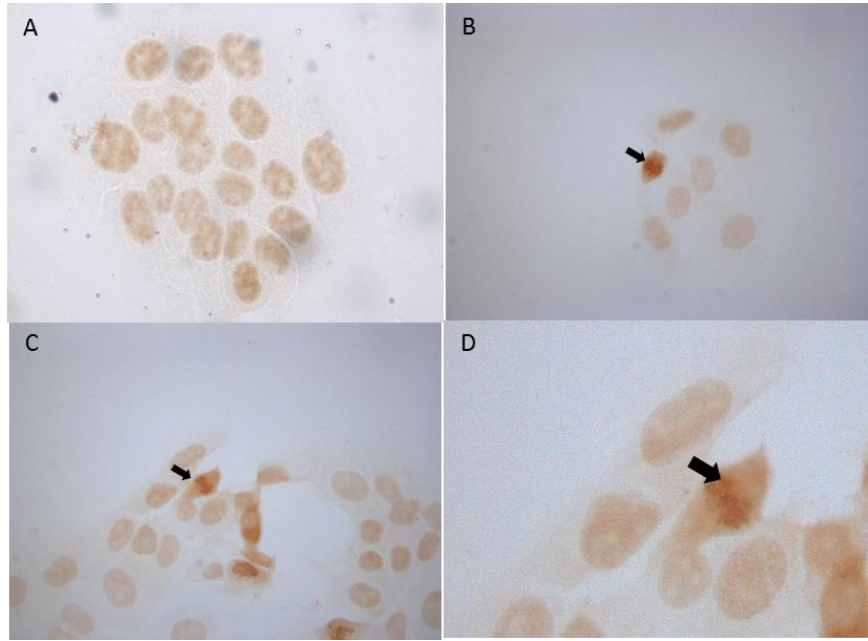


Figura 11. Expresión de Cdc25C en células HaCAT. En la Figura A se muestra el control negativo y en B-D se indica con flechas la señal positiva para Cdc25C donde se muestran a las células en proceso de división celular.

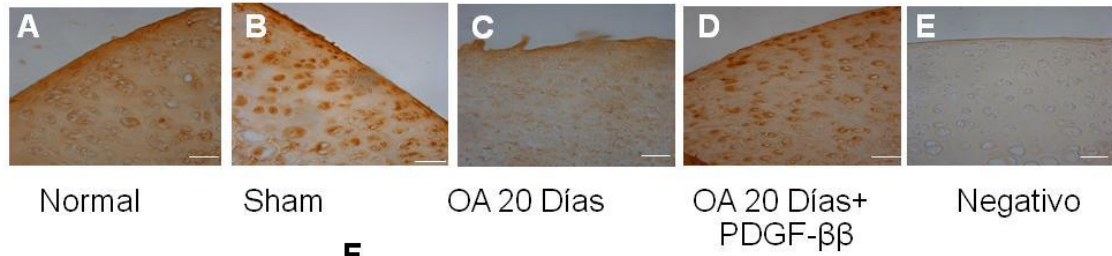


Figura 12. Expresión de Cdc25c en el cartílago articular. En la figura se observan los cortes histológicos de cartílago articular de ratas normal (A), Sham (B), OA (D) y OA tratadas con PDGF- $\beta\beta$ (D), teñidas por inmunohistoquímica para detectar a Cdc25c. Barra blanca 50 μ m con el objetivo 40x. El porcentaje de células positivas para Cdc25c se representó en la gráfica de barras (E) que indica los valores de la media \pm DE. El análisis estadístico mostró una disminución significativo en los grupos OA con respecto al grupo Sham y un aumento significativo del grupo OA con tratamiento con respecto al grupo Sham y OA sin tratamiento (* $p \leq 0.05$)

DISCUSIÓN

La pérdida de un tejido o de su función, debido a defectos congénitos, enfermedades o traumas es uno de los problemas más difíciles, frecuentes y costosos que enfrenta la medicina humana. La regeneración del cartílago articular constituye un problema clínico muy importante ya que existen limitaciones en técnicas para su reparación, por lo tanto los beneficios que se consiguen con un tratamiento correcto, pueden ser muy importantes, ya que se puede evitar la incapacidad física. El impacto socioeconómico de la enfermedad se ha ido incrementando en los últimos años, como resultado del envejecimiento progresivo de la población, por lo que el desarrollar tratamientos eficaces se hace cada vez más necesario (*Scholtissen y col, 2010*).

En el cartílago articular el mantenimiento de la homeostasis es crucial para mantener su estructura y función. El balance de la MEC está regulado por la actividad catabólica y anabólica de los condrocitos. En la OA, el equilibrio se altera, incrementando el catabolismo, lo que se relaciona con las diversas fases descritas de la OA, ya que en el inicio existe un proceso de reparación que resulta fallido y continua con una etapa de degradación que finalmente desencadena la muerte de los condrocitos por condroptosis (*Kouri JB y Lavalle C. 2006*). Se ha sugerido que entre las moléculas que se pueden provocar este cambio en la regulación, se encuentran las citosinas y los factores de crecimiento.

La reparación del cartílago está determinada por la capacidad de los condrocitos de sintetizar los constituyentes de la matriz extracelular (MEC). Sin embargo, los condrocitos pueden también producir elementos catabólicos que degradan o inducen la degradación de estos constituyentes, tales como las MMPs y ADAMTs, que durante la OA son inducidas por las citosinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF- α . Aunque los condrocitos también sintetizan citosinas anti-inflamatorias como interleucina-10 (IL-10), durante la OA la actividad de esta citosina no es capaz de antagonizar la actividad de IL-1 β , por lo que la OA sigue avanzando. En nuestros resultados encontramos que la IL-1 β se induce en la OA pero el tratamiento con el PDGF disminuye el porcentaje de células que expresan a esta citosina pro-

inflamatoria. Este resultado es de gran importancia ya que permite sugerir que el tratamiento con factores de crecimiento puede modificar la evolución de la OA. El como el PDGF provoca una disminución de IL-1 β en los condrocitos no se conoce y tendrá que ser investigado, pero es posible que al unirse a su receptor se activen las vías de MAPK (ERK1/2) para regular negativamente la expresión del ARNm IL-1 β . En la situación inversa se encuentra la colágena tipo II ya que durante la OA sus niveles disminuyen como resultado no solo de la actividad de IL-1 β sino de los altos niveles de colagenasas presentes durante la OA. El tratamiento con el PDGF restauró el porcentaje de células positivas para colágena II a los mismos números que los grupos control por lo que nuestros resultados sugieren que el PDGF puede regular la producción de colágena ya sea de manera directa al desencadenar la vía de señalización para inducir la expresión del gen de colágena II o bien de manera indirecta al regular negativamente los niveles de IL-1 β se evita la señal que bloquea su expresión. Los mecanismos detallados de cómo se da esta interacción tendrán que ser investigados.

Los factores de crecimiento estimulan a muchos tipos celulares que realizan una gran variedad de procesos tales como, la formación de nuevo tejido, la cicatrización, y la reparación de tejidos. Por lo tanto existe la posibilidad de utilizarlos como herramienta terapéutica en el campo de la medicina regenerativa. El estudio de los factores de crecimiento se inició a principios de los años 90's, aunque ya existían estudios clínicos del potencial de factores de crecimiento en curación de heridas y lesiones desde 1982. Estos factores tienen la ventaja de poderse aislar como mezcla a partir de la sangre del propio paciente o bien sintetizarse por técnicas de ingeniería genética. El ejemplo claro de proteínas creadas por ingeniería genética es la insulina humana (Humalog y Liprolog de Eli Lilly), que es de gran utilidad terapéutica para la diabetes, (*Perera y col, 2002*).

Se ha demostrado que al aplicarse el PDGF en condrocitos provenientes de pacientes sometidos a reemplazo de cadera, se puede estimular la expresión de las proteínas CD73, CD90, CD105, CD166 que son marcadores de células madre mesenquimales capaces de diferenciarse en osteoblastos, adipoblastos y

condroblastos (Arévalo y col, 2007), por lo que es posible que aun en cartílago con OA avanzada se mantiene un población de células madre.

El PDGF- $\beta\beta$ tiene una gran influencia sobre los fibroblastos en donde estimula la proliferación celular, la quimiotaxis y la producción de fibras de colágeno. Por esta razón también se ha empleado en condrocitos como una estrategia para la reparación del cartílago articular. Por ejemplo en un estudio se observó que el PDGF induce la proliferación in vitro de los condrocitos (Schmidt y col, 2006) lo que sugiere que es posible que el cartílago articular con pacientes con OA pueda ser tratado con este factor para inducir la proliferación de los condrocitos presentes en el tejido. En nuestros resultados observamos que el grupo de ratas con OA tratadas con PDGF, no solo se evitó la pérdida de componentes de la MEC como los proteoglicanos y colágena tipo II sino que encontramos un aumento en el número de células positivas para Cdc25C en el cartílago articular. Ya que Cdc25C es una fosfatasa activa que ayuda a regular la actividad del factor promotor de la mitosis, nuestros resultados sugieren que el tratamiento con PDGF puede inducir la proliferación de los condrocitos o bien de las células madre mesenquimales presentes en el mismo cartílago. Sin embargo, es necesario todavía corroborar la proliferación de las células del cartílago empleando otras técnicas como la detección de figuras mitóticas con una tinción con naranja de acridina.

Nuestros resultados sugieren que el PDGF- $\beta\beta$, puede ayudar en para aliviar el daño que se genera en el cartílago articular, por lo cual es posible que los factores de crecimiento puedan ser usados como una estrategia terapéutica para estimular la proliferación de las células presentes en el cartílago articular en patologías degenerativas como la OA. Sin embargo, sus efectos y consecuencias en la evolución de la patología todavía deben ser estudiados. También se debe investigar los posibles efectos secundarios de este tipo de factores ya que pudieran inducir enfermedades aún peores como el cáncer.

CONCLUSIÓN

En el estudio morfológico del cartílago articular en el grupo OA con PDGF-ββ se observó una mejoría del desgaste del cartílago articular con respecto al grupo OA sin tratamiento.

También se observó que el grupo OA sin tratamiento en la zona superficial y parte de la zona media presentan fibrilación y pérdida de proteoglicanos, mientras que el grupo OA con PDGF- ββ la pérdida de proteoglicanos fue menor.

También se observó una disminución en la expresión de IL-1β en el grupo OA con PDGF-ββ con respecto al grupo OA sin tratamiento.

Además se observó una disminución en la expresión de colágena II en el grupo OA sin tratamiento con respecto a los grupos normal y Sham. En el grupo OA con PDGF- ββ tuvo un incremento con respecto a los grupos control.

Finalmente se observó un incremento en la expresión de Cdc25C en el grupo OA con PDGF- ββ con respecto a los grupos normal y Sham.

Perspectivas

Incluir los controles adecuados como: ratas normales inyectadas con solución salina, ratas normales inyectadas con el PDGF-ββ y ratas con OA inyectadas con solución salina.

REFERENCIAS

- Abbud- Lozoya KA, Kouri JB. *A novel rat osteoarthritis model to assess apoptosis and matrix degradation*. Pathol Res Pract. 2000; 196: 729-745.
- Aigner T, Soeder S y Haag J. *IL-1 β and BMPs- Interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration*. European Cells and Materials. 2006 vol.12.
- Aigner T, Haag J, Martin J, Buckwalter. *Osteoarthritis: aging of matrix and cells-going for a remedy*. Curr Drug Targets. 2007;8:325-331.
- Arden N and Nevitt CM. *Osteoarthritis: Epidemiology*. Research Clinical Rheumatology. 2006. Vol.20:1(3-25).
- Arévalo J, Páez D, Rodríguez V. *Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas*. Publicación científica nesciencias biomédicas. 2007; 5: 101-212.
- Ballesteros F, Palma S, Radrián F, Riedemann P, Verdejo U. *Guía de práctica clínica en Osteoartritis*. Sociedad Chilena de Reumatología. 2006
- Blanco FJ, Guitian R, Vázquez-Martul E, de Toro FJ, Galdo F. *Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. a posible pathway for osteoarthritis pathology*. Arthritis Rheum. 1998, 4: 284-289.
- Buckwalter JA., Mankin HJ and Godzinsky AJ. *Articular Cartilage and Osteoarthritis*. Instructional Course Lectures.2005. Vol.54.
- Carrillo – Mora P, González- Villalva A, Macías – Hernández SI y Pineda-Villaseñor C. *Plasma rico en plaquetas. Herramienta versátil de la medicina regenerativa?* Cir. 2013; 81: 74-82.
- Deyle G, Allison S, Matekel R, Ryden M, Stang J, Gohdes D, Hutton J, Henderson N and Garber M. *Physical therapy treatment effectiveness for osteoarthritis of the knee: A randomized comparison of supervised clinical exercise and manual therapy procedues versus a home exercise program*. PhysTher. 2005(85); 12: 1301-17.
- De la Mata. *Plasma rico en plaquetas: ¿un nuevo tratamiento para el reumatólogo?* Reumatol Clin. 2013; 09: 166-71.
- De Pavía- Mota E., Larios- González MG. Y Briseño- Cortés G. *Manejo de la osteoartritis en Medicina Familiar y Ortopedia* .Archivos en Medicina Familiar. 2005. Vol.7 (3)93-98.
- Espinosa- Morales R y Pérez Bastidas AE. *Existen los fármacos modificadores en la osteoartritis*. Reumatol. Clin. 2007; 3Supl. 3: 539- 543.

García- Germán D, Delgado AD y Calmet J. *Anatomofisiología de las articulaciones. Traumatismos articulares. Complicaciones de los traumatismos, rigideces, anquilosis*. 2º Programa de actualización en Cirugía Ortopédica y Traumatología. 2010.

Goldring B. M and Goldring R. S. *Osteoarthritis*. Journal of Cellular Physiology. 2013

Gómez- Dantés O, Sesma S, Becerril VM, Knaul FM, Arreola H y Frenk J. *Sistema de salud de México*. Salud Pública Mex. 2011; 53 Supl 2:S220 – S232.

González ML. *Aplicación de células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo y medula ósea para su utilización en regeneración de tejido cartilaginoso*. Dto. Medico, Cirugía y anatomía veterinaria. 2014.

Gouze JN, Gouze E, Popp MP, Bush ML, Dacanay EA, Kay JD and colaborates. *Exogenous glucosamine globally protects chondrocytes from the arthritic effects of IL- 1beta*. Arthritis Res Ther. 2006; 8: R173.

Gowitzke BA, Milner M. *El cuerpo y sus movimientos. Bases científicas*. Editorial Paidotribo. Barcelona.1999.

Gutfraind E. *La Artrosis*. Actualizaciones en reumatología. 2010.

Horwitz EM, LE Blanc K, Dominici M and colaborates. *Clarification of the nomenclature for MSC: The international society for celular therapy position statement*. Cytotherapy. 2005; 7(5):393-395.

Jódar GE, Padrino JM, Díaz- Guerra G, Mira SA, Morillas I, Hawkins F. *Densidad mineral ósea local (tibial) y axial en mujeres menopáusicas con artrosis leve a moderada*. ELSEVIER. 2005; 14(1):1-4.

Kellgreen JH and Lawrence JS. *Radiological assessment of Osteo- Arthrosis*. Ann Rheum Dis. 1957; 16(4): 494-502.

Kouri JB, Jimenez S, Quintero M, Chico A. *Ultra structure of the chondrocytes from the fibrillated and non-fibrillated human osteoarthritic cartilage*. Osteoarthritis Cartilage. 1996, 4: 111-125.

Kouri JB, Rosales-Encina JL, Chaudhuri PP, Luna J, Mena R. *Apoptosis in human osteoarthritic cartilage: a microscopy report*. J Med Sci Res. 1997, 25: 245-248.

Kouri JB y Lavallo C. *Do chondrocytes undergo "activation" and "transdifferentiation" during the pathogenesis of osteoarthritis? A review of the*

ultrastructural and immunohistochemical evidence. Histol Histo pathol. 2006, 21:793-802.

Kouri J, Aguilera J, Reyes J, Lozoya S y Gonzalez S. *Apoptosis chondrocytes from osteoarthrotic human articular cartilage and abnormal calcification of subchondral bone,* J Rheumatol. 2000; 27: 1005-1019.

Largo R, Álvarez-Soria MA, Diez-Ortego I, Calvo E, Sánchez- Pernuate O, Egido J y colaborates. *Glucosamine inhibits IL-1 beta- induced NFkappaB activation in human osteoarthritis chondrocytes.* Osteoarthritis Cartilage. 2003; 11:290-298.

Londoño JC, Restrepo JF, Guzmán R, Peña M, Iglesias A. *Patogénesis de la Osteoartritis.* Rev Fac Med UN Col1993; 41(4):200-205.

López Moratalla N. *La racionalidad terapéutica en la medicina regenerativa con células troncales embrionarias o de adulto.* Anal Real Acad Nal Farm 2003; 69:21-45.

Lozano-Ascencio, R., et al. *El peso de la enfermedad en adultos mayores.* Salud Pública de México. México. 19996. 38. 419-429.

Nevitt MC, Xu L, Zhang Y, Lui LY, Yu W, Lane NE, Qin M, Hochberg MC, Cummings SR and Felson DT. *Very low prevalence of hip osteoarthritis among Chinese elderly in Beijing, China, compared with whites in the United States: the Beijing osteoarthritis study.* Arthritis Rheum. 2002 Jul; 46(7):1773-9.

Newby AC. *Matrix metalloprotease inhibition therapy for vascular diseases.* Vascul Pharmacol. 2012; 56:232-44.

Mendoza R H y García – Armenta ME. *Utilidad de la diacereína/ meloxicam en osteoartritis de rodilla y cadera.* Acta Ortopédica Mexicana. 2005; 19(4): Jul. - -Ago: 165 – 171.

Messier SP, Loeser RT, Mitchell MN and colaborates. *Exercise and weight loss in obese older adults with knee osteoarthritis.* J AM Geriatr Soc. 2000; 48(10): 1062-1072.

Morales – Álvarez L. y Ariza M. *Eventos de señalización asociados al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF- $\beta\beta$).* Colombia. Universitas Scientiarum. 2003(10):5-20.

Muñoz M., Mazure RA y Culebras JM. *Obesidad y sistema inmune.* Nutr. Hosp. XIX. 2004 (6): 319-24.

Murphy JM, Kavalkovitch KW, Fink D, Barry FP. *Regeneration of meniscal tissue and protection of articular cartilage by injection of mesenchymal stem cells. Osteoarthritis Cartilage.* 2000; 8 (Suppl B): S25.

Olmo N y Lizarbe MA. *Proteínas estructurales del tejido conectivo.* Tratado de Reumatología, Aran, Madrid. 1998; 25-54.

Page- McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. *Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling.* Nat Rev Mol Cell Biol. 2007; 8:221-33.

Peña Ayala AH. y Fernández- López JC. *Prevalencia y factores de riesgo de la osteoarthritis.* ReumatolClin. 2007; 3 Sulp 3 S6-12.

Perera J, Tormo A, y García JL. *Ingeniería Genética.* Editorial Síntesis S.A. 2002. Madrid.

Pritzker KPH., Gya S., Jimenez SA., Ostergaard K., Pelletier JP., Revell PA., Salter D and van den Berg WB. *Osteoarthritis cartilage histopathology: Grading and staging.* Osteoarthritis and Cartilage. 2006, 14(1): 13-29.

Quintero M, Monfort J, Mitrovic PR. *Osteoarthritis. Biología, Fisiopatología, Clínica y Tratamiento.* Ed. Médica Panamericana. Madrid, España 2010.

Roach HI and Tilley S. *The pathogenesis of osteoarthritis.* Bone and Osteoarthritis. 2007; 4: 1-18.

Rodriguez- Hernandez JL. *Osteomuscular and rheumatic pain.* Rev Soc Esp Dolor. 2004; 11: 94- 102.

Rosales Adel, Brito NL, De Campos GC, Pailo AF y De Rezende MU. *Obesity, osteoarthritis and clinical treatment.* Acta Ortop Bras.2014; 22(3):136-139.

Ross MH y Pawlina W. *Histología. Textos y Atlas color con Biología Celular y Molecular.* 5ª Edición. Editorial Medica Panamericana. 2008. 992 p.

Sacks JJ, Luo Y-H, Helmick CG. *Prevalence of specific types of arthritis and other rheumatic conditions in the ambulatory health care system in the United States, 2001–2005.* Arthritis Care & Research. 2010; 62 (4):460-464.

Sánchez Naranjo JC y López Zapata DF. *Fisiopatología celular de la Osteoarthritis: El condrocito articular como protagonista.* IATREIA. 2011 Jun; Vol. 24 (2).

Scholtissen S, Bruyère O, Neuprez A, Severens J, Herrero- Beaumont G, Rocvati L, Hilgsmann M and Reginster J. *Glucosamine sulphate in the treatment of knee osteoarthritis: Cost- effectiveness comparison with paracetamol.* Int J ClinPract. 2010; 64(6): 756-762.

Setnikar I, Cereda R, Pacine MA and Revel L. *Antireactive properties of glucosamine sulfate*. *ArzneimForsch/ Drug Res*. 1991; 41: 157-161.

Solis – García CD. *Cambios histológicos e inmunohistoquímicos de la membrana sinovial durante el proceso degenerativo de la osteoartritis en un modelo en rata Wistar*. Instituto Politécnico Nacional. 2013.

Smith RJ, Justen JM, Sam LM, Rohloff NA, Ruppel PL, Brunden MN and collaborates. *Platelet- derived growth factor potentiates cellular responses of articular chondrocytes to interleukin- 1*. *Arthritis Rheum*. 1991; 34: 697-706.

Spindler KP, Mayes CE, Miller RR, Imro AK and Davidson JM. *Regional mitogenic response of the meniscus to platelet- derived growth factor (PDGF- AB)*. *J Orthop Res*. 1995; 13: 201-207.

Stoller DW, Tirman FJ, Bredela MA, Aguilera IL. *Serie Radiología Clínica. Los 100 diagnósticos principales en Sistema musculoesquelético*. Editorial ELSEVIER. España. 2004

Wakitani S, Goto T, Pineda SJ and collaborates. *Mesenchymal cell- based repair of large full- thickness defects of articular cartilage*. *J Bone Joint Surg AM*. 1994; 76 (4): 579-592.

Weissman I, Anderson D and Gage F. *Stem and progenitor cells: origins phenotypes lineages commitments and transdifferentiations*. 2001. *Annun Rev. Cell Dev. Biol*. 2001; 17:387-403.

Wieland HA, Michaelis M, Kirschbaum BJ and Rudolphi KA. *Osteoarthritis- an untreatable disease?* *Nat Rev Drug Discov*. 2005; 4:331-344.

www.cdc.gov/arthritis/basics/ostearthritis.htm

www.conapo.gob.mx/es/CONAPO/Mexico_en_cifras

www.who.org

ANEXO

Preparación de reactivos y soluciones empleadas

PBS1X

Pesar: 1.4g de Na_2HPO_4 ; 8g de NaCl; 0.2g de KH_2PO_4 y 0.2 de KCl. Diluir con 800ml de agua bidestilada. Ajustar el pH a 7.2-7.4 y aforar a 1 litro.

Paraformaldehido 4% pH 7.2-7.4

Pesar: 4g de paraformaldehído.

Se calienta PBS 1X a una temperatura entre 55- 60 °C En agitación constante, disolver 4g de paraformaldehído en 80ml de agua bidestilada. Ajustar el pH7.2 y aforar a 100ml.

Gelatina para los porta objetos

Gelatina al 0.5% y sulfato de potasio y cromo al 0.05%.

Disolver 1.5g de gelatina en agua bidestilada a 60°C una vez disuelta agregar 0.05 g sulfato de potasio y cromo. Dejar enfriar y utilizar a temperatura ambiente.

Suero normal de caballo 1.5%

Disolver 0.15 ml de suero normal de caballo (vector laboratorios) en 10 ml de PBS

Safranina O-Verde Rápido

0.1% Safranina O (Sigma Aldrich) para 100ml

0.01% Fast- Green (Verde Rápido, Sigma Aldrich) para 100ml

0.5% Acido Acético

Se filtran la safranina O y el verde rápido, dejándolos un día, para después ser utilizados.

Procedimiento

1. PBS (5min)
2. Agua destilada (2min)
3. Verde Rápido (Fast Green) (10min)
4. Acido Acético (10-15 seg)
5. Safranina O (40min)

6. Etanol (50%; 70%; 95% y 100%) (sumergir 5 veces)
7. Xileno (1min)
8. Montar con resina

PBS 1x Tritónx100 0.3% (PBT)

Tomar 100ml de PBS 1x y adicionar 0.3ml de Tritón x100 agitar suavemente para no formar burbujas

PBS 1X Tritón x100 0.01% BSA 0.2%

En 14.5ml PBS 1x + 0.5 PBT + 0.03g BSA

Inyecciones HCl 4M BSA 0.1%

BSA 0.01% 0.01g

HCl 0.001% 3.3µl

PDGF 0.75µl

REACTIVOS

DakoCytomation liquid DAB+ Chromogen System

Vectastain. Elit. ABC KIT. Vector Laboratories.

Anticuerpos

Cdc25C

NB 11055710

IL-1β

Santa Cruz Biotechnology, INC

COL II

Col IIA policlonal