



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Efecto del tratamiento con oxigenación hiperbárica (OHB)
en la integridad del cartílago articular durante la progresión
de la osteoartritis experimental”

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:
Sinuhé Reyes López

ASESORES DE TESIS:
M. en C. Enrique Flores Gasca
Dr. Juan Bautista Kouri Flores
Dr. José Raymundo Cruz Pérez

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES
de la FES Cuautitlán.

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Efecto del tratamiento con oxigenación hiperbárica (OHB) en la integridad del cartílago articular durante la progresión de la osteoartritis experimental

Que presenta el pasante: SINUHÉ REYES LÓPEZ

Con número de cuenta: 30622491-9 para obtener el Título de la carrera: Medicina Veterinaria y Zootecnia

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de febrero de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M.V.Z. Carlos Lorenzo García Alcaraz	
VOCAL	M. en C. Enrique Flores Gasca	
SECRETARIO	M. en C. Crisóforo Mercado Márquez	
1er. SUPLENTE	M. en C. Ernesto Marín Flamand	
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Manuel Oliver Olivares Rodríguez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

AGRADECIMIENTOS

En consumación y agradecimiento por la enseñanza y formación como médico veterinario a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán me propuse aportar a esta gran institución un recurso valioso “la medicina hiperbárica”, no solo para la difusión de esta área médica sino también para mirar hacia su desarrollo e inclusión por la medicina veterinaria de nuestro país México.

Aunque el tiempo denotó una Odisea para la materialización de este proyecto de tesis, la búsqueda de apoyo en otra institución junto a las palabras de aliento de las personas más cercanas fueron determinantes y dieron camino para su realización. Esta labor fue posible gracias al apoyo incondicional de mi familia en la construcción de la cámara hiperbárica y al equipo de investigación del laboratorio 10 del CINVESTAV-IPN conformado por el Dr. Juan Kouri, Dr. Raymundo Cruz, Biol. Magda Sánchez, Quím. Óscar y a sus alumnos de doctorado Arely, Carolina y Moisés con quien tengo un profundo agradecimiento a cada uno por sus incontables enseñanzas e instrucción (entre ellas, el manejo del equipo y la realización de distintos procesos de laboratorio, el conocimiento de la patología de la osteoartritis que incluye sus interesantes aportes, la reproducción del modelo experimental para el estudio de esta enfermedad y la inclusión dentro de sus actividades como los seminarios donde conocí sus líneas de investigación) fundamentales para el desarrollo de la tesis y que fueron una gran experiencia y oportunidad únicas.

Las personas que se preocupan pierden la oportunidad de ser victoriosas. En cuanto llega la oportunidad de algo, ocúpate, muévete, consigue...haz que las cosas sucedan pues si se te presentó a ti es porque tienes todo lo necesario para enfrentarlo.

“Topiltzin de Brenda Olvera”

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Anatomía de la articulación	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Capsula articular	2
1.3 Circulación articular	4
1.4 Articulaciones y componentes de la rodilla	5
2. Cartílago articular hialino	7
2.1 Estructura y función	7
2.2 Composición del cartílago articular hialino	8
2.3 Componente celular	9
2.4 Componente extracelular	10
2.5 Histofisiología	13
2.6 Oxigenación en el cartílago articular	13
2.7 Adaptación a la baja tensión de oxígeno	15
2.8 Importancia de la tensión de oxígeno en el condrocito articular	16
3. Osteoartritis (OA)	17
3.1 Fisiopatología	17
3.2 Muerte celular	23
3.3 Cambios histológicos en el cartílago OA	24
3.4 OA en Medicina Veterinaria	26
3.5 Signos de la OA	27
3.6 Tratamiento de la OA	28
4. Oxigenación Hiperbárica (OHB)	29
4.1 Antecedentes históricos	29
4.2 Concepto de OHB	30
4.3 Generalidades	31

4.4 Efectos terapéuticos	32
4.5 La OHB en la Ortopedia	33
4.6 La OHB en la investigación de los problemas del cartílago	34
5. MARCO TEÓRICO	35
6. OBJETIVOS	36
7. HIPÓTESIS	37
8. MATERIALES Y MÉTODOS	38
8.1 Animales y grupos de trabajo	39
8.1.1 Inducción de la OA	39
8.1.2 Estrés mecánico postraumático	40
8.1.3 Control cirugía o modelo Sham	40
8.2 Administración de la OHB	41
8.3 Eutanasia	42
8.4 Toma de cartílago articular	42
8.4.1 Análisis macroscópico	43
8.4.2 Análisis de imágenes	43
8.5 Histotecnica o preparación de tejidos para microscopia óptica	44
8.5.1 Fijación	44
8.5.2 Descalcificación	44
8.5.3 Crioprotección	45
8.5.4 Inclusión en medio de congelamiento	45
8.5.5 Criocortes	45
8.6 Estudio histopatológico	46
8.6.1 Métodos de tinción	46
8.6.2 Inmunohistoquímica	47
8.6.3 Prueba de TUNEL	48
8.7 Análisis estadístico	49
9. RESULTADOS	50
10. DISCUSIÓN	62

11. CONCLUSIONES	65
12. BIBLIOGRAFÍA	66
13. ANEXOS	87

RESUMEN

La osteoartritis (OA), es una enfermedad articular crónico-degenerativa, que se caracteriza por la degradación del cartílago articular. Debido a su frecuencia y discapacidad en diversas especies, es una enfermedad con un gran reto para la medicina. Esta patología altamente compleja exhibe tanto, el compromiso de diversos tejidos de la articulación, como la interacción entre estos y diversos factores externos. Por tal motivo, la OA es fuente de una gran cantidad de estudios en la investigación científica mundial. Así la importancia del oxígeno (O₂) en las células del cartílago comienza a dilucidarse no obstante la característica avascular del cartílago articular.

Diversos estudios han mostrado que la deficiencia de O₂ en las articulaciones puede estar involucrado dentro del curso de la enfermedad en la progresión de la OA. Así que el restablecimiento de los niveles de O₂ en el cartílago OA pueda modular los cambios histopatológicos asociados a la progresión de la OA. La oxigenación hiperbárica (OHB) puede ser útil debido al incremento notable en el aporte de O₂ que se consigue en diferentes tejidos incluyendo las articulaciones. Además hay evidencias que la OHB estimula la formación de los componentes del cartílago, así como la protección al daño oxidativo y la prevención de la muerte de los condrocitos. Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de la OHB en el cartílago articular de un modelo de OA experimental de fase avanzada en ratas Wistar, mediante la observación macroscópica y pruebas de histología, inmunohistoquímica y de TUNEL. Los modelos biológicos fueron sometidos a la cirugía de menisectomía parcial del menisco medial y la transección del ligamento colateral medial de la pata posterior derecha. Después de dos días de recuperación quirúrgica, los animales se sometieron a ejercicio de alto impacto diariamente por 20 días. Una vez terminado el periodo de ejercicio diario se procedió al tratamiento de oxigenación dentro de una cámara hiperbárica durante los mismos 20 días de inducción de la OA. Un día después de terminar el protocolo de ejercicio y tratamiento se realizó la eutanasia de cada grupo y se obtuvieron los fémures derechos para ser fijados, procesados y seccionados en cortes histológicos para la observación y la evaluación del cartílago. Los resultados de la observación macroscópica y la histología evidenciaron menor daño, así como una mejoría en la integridad estructural de la matriz y en las características celulares en el cartílago OA de los individuos tratados con OHB, respecto al grupo OA sin tratamiento. Sin embargo, en los resultados por inmunohistoquímica el tratamiento no demostró tener efecto sobre la expresión de los mediadores catabólicos MMP-13, iNOS y de muerte celular (caspasa 3 activa). De forma diferente, el tratamiento con OHB demostró una reducción en el porcentaje de condrocitos muertos analizadas por la prueba de TUNEL. En conclusión, el tratamiento con OHB puede modificar el proceso osteoartítico inducido en los modelos de rata Wistar al conservar los componentes de la matriz y preservar a los condrocitos. Por lo tanto, se sugiere que la respiración de una alta concentración de oxígeno dentro de la cámara hiperbárica es una modalidad terapéutica segura y con potencial para el tratamiento de la OA.

INTRODUCCIÓN

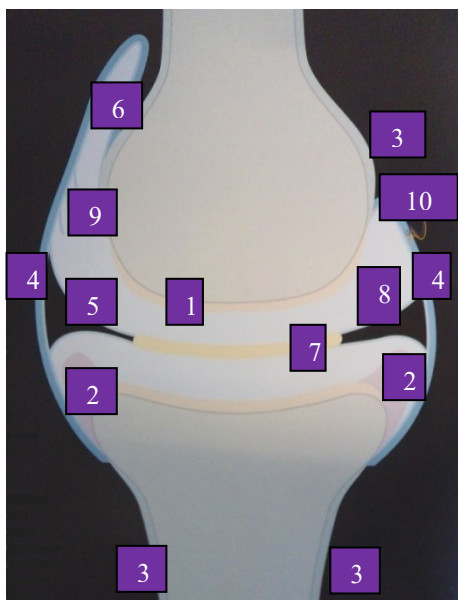
1 Anatomía de la articulación

1.1 Generalidades

Una articulación es la unión entre dos huesos, que conforme a su estructura y función pueden clasificarse en tres tipos: 1) articulaciones fibrosas (*sinartrosis*) como las suturas de la cabeza e internasales del cráneo; 2) articulaciones cartilagosas, (*anfiartrosis*) como la sínfisis pélvica y las articulaciones entre vertebras y 3) articulaciones sinoviales (*diartrosis*) (Duke, 2011; Getty, 1982), que abordaremos con mayor detalle para los propósitos del presente trabajo (Figura 1).

Las articulaciones sinoviales son capaces de moverse libremente y representan la mayor parte de las articulaciones del sistema locomotor, tales como: dedos, codos, tobillos, rodillas y caderas (Duke, 2011; Welsch, 2013). Su función es servir de unión entre dos huesos vinculados en forma discontinua por un espacio articular, lo que brinda amplitud para una mayor movilidad y resistencia a los impactos de gran intensidad, pero al mismo tiempo permite a los huesos “girar” libremente con un mínimo de resistencia (Duke, 2011; Welsch, 2013). El movimiento de una articulación está controlado y limitado por la acción de los músculos y de dos tipos de estructuras pasivas, los ligamentos y los tendones (Duke, 2011).

A continuación, en el siguiente esquema se muestran los componentes generales de la articulación sinovial.



1. Cartílago articular hialino.
2. Rodete fibrocartilaginoso
3. Periostio.
4. Fibrosa de la cápsula sinovial.
5. Membrana sinovial.
6. Receso sinovial.
7. Menisco.
8. Cavidad articular
9. Vellosidades.
10. Vasos y nervios sinoviales

Figura 1. Esquema de una articulación sinovial. Tomado de (Laborda, 2005).

1.2 Capsula articular

La cápsula articular está compuesta por dos estratos o capas: el estrato fibroso y el estrato sinovial. El estrato fibroso, que está compuesto por fibras de colágeno, se encuentra adosado a la cara externa de la cápsula y es continuo con el pericondrio y el periostio lo que le proporciona estabilidad articular. El grosor de esta capa está determinado exclusivamente por las exigencias mecánicas (Köning & Liebich, 2004; Duke, 2011). En la parte interna se encuentra el estrato sinovial o membrana sinovial que es rica en células, vasos sanguíneos y nervios. Su apariencia es de color blanco amarillento, y presenta vellosidades o pliegues sinoviales (Fig. 2) que tapizan la cavidad articular. Estas estructuras varían en número, tamaño, forma y distribución dentro de una misma articulación (Myers & Christine, 1983; Köning & Liebich, 2004).



Figura 2. Observación macroscópica de las vellosidades sinoviales en la cavidad articular con líquido sinovial, imagen izquierda (preparado por Margit Teufel, Viena). Vellosidades sinoviales en la cavidad articular con los vasos inyectados, imagen derecha (preparado por F. Teufel, Viena). Tomado de (Köning & Liebich, 2004).

La membrana sinovial está diseñada para el suministro sanguíneo a la articulación y es un medio que permite el intercambio de líquidos, macromoléculas y solutos. También contribuye con la composición del líquido sinovial con la síntesis del ácido hialurónico, que es producido por los sinoviocitos de tipo fibroblástico (Myers & Christine, 1983; Hardy et al., 1998; Kenneth, 2007; Welsch, 2013).

El líquido sinovial o sinovia es un dializado del plasma que es secretado hacia a la cavidad articular por el estrato sinovial (Fig. 3). Este medio tiene una consistencia viscosa y tiene un pH alcalino (Köning & Liebich, 2004; Welsch, 2013; Getty, 1982). Está compuesto por lubricina, ácido hialurónico, azúcares, electrólitos, enzimas, albúmina y mucina. Debido a su contenido, el líquido sinovial es importante para la lubricación y provisión de nutrientes al cartílago (Köning & Liebich, 2004; Duke, 2011).

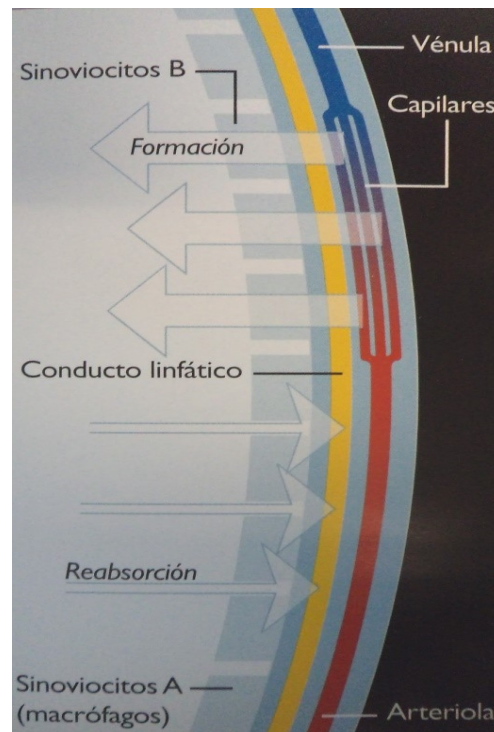


Figura 3. Flujo del líquido sinovial.
Tomado de (Laborda, 2005).

Un factor importante que favorece la nutrición, la oxigenación y la lubricación es el movimiento (Fig. 4) (Fermor, 2007; Joaquín, et al., 2017). Esto es debido, a la difusión durante la carga articular, que permite la distribución de los distintos elementos del líquido sinovial, por medio del transporte intracondral, que es mediado por el flujo de agua y el contenido de proteoglicanos de la matriz extracelular del cartílago (Forriol, 2002; Köning & Liebich, 2004; Sophia et al., 2009).

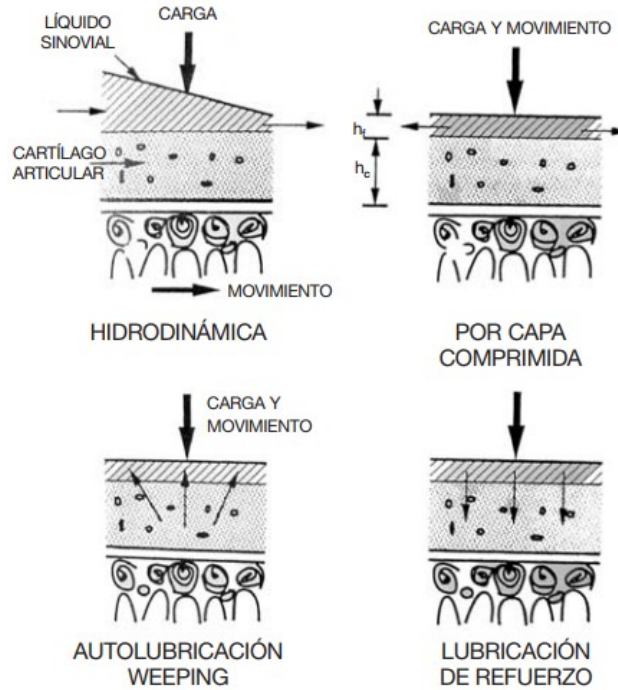


Figura 4. Esquemas de los diferentes tipos de lubricación articular. Tomada de (Brinker, 2000).

1.3 Circulación articular

Varios tejidos articulares disponen de un suministro vascular abundante que responde al ejercicio y a los estados patológicos. Estos comprenden la cápsula articular, la membrana sinovial, los ligamentos y el hueso subcondral, con la excepción del cartílago articular que es avascular. El flujo sanguíneo en las articulaciones sinoviales está formado por pequeñas ramificaciones de las arterias epifisiarias ubicadas en la unión del periostio con la membrana sinovial, lo cual forma un círculo arterial. Las ramificaciones más amplias penetran en el hueso, mientras que las más pequeñas permanecen en la periferia del cartílago articular, dando forma a la circulación pericondral. La irrigación sanguínea ósea subcondral es provista por las arterias epifisiarias, que se desplazan en la epífisis en paralelo al cartílago articular, y envían así las ramificaciones perpendiculares que terminan en asas capilares ubicadas en la zona profunda del cartílago calcificado (Kenneth, 2007).

La irrigación vascular de la membrana sinovial está compuesta por capilares esparcidos en áreas de elevada tensión mecánica. La mayor densidad capilar de la membrana sinovial se ubica a $25\mu\text{m}$ de la superficie articular y es más profusa en el tejido areolar y adiposo. La eficiencia del intercambio de nutrientes, oxígeno y subproductos metabólicos entre los capilares de la membrana y la cavidad articular depende de la densidad y la profundidad capilar y de la irrigación sanguínea (Levick, 1990; Bertone, 1998). Debido a esto, la

integridad de estas formaciones son importantes en el mantenimiento del líquido sinovial y el aporte óptimo de oxígeno en el cartílago (Saari et al., 1989; Brighton et al., 1974; Clark et al., 1991; Lane et al., 1977).

Los factores que pueden afectar gravemente al torrente sanguíneo sinovial comprenden: la presión intraarticular, la temperatura localizada, los reflejos, el tono vasomotor y la liberación local de mediadores vasoactivos (Kenneth, 2007).

1.4 Articulaciones y componentes de la rodilla

Las tres articulaciones que conforman la rodilla permiten realizar amplios movimientos de flexión y extensión (Fig. 5). Las articulaciones femorotibial y femorrotuliana presentan comunicación en sus cavidades articulares y se caracterizan por su función como tróclea sinovial, mientras que la articulación tibioperonea proximal es sinovial plana y no tiene comunicación con las otras cavidades (Laborda, 2005).

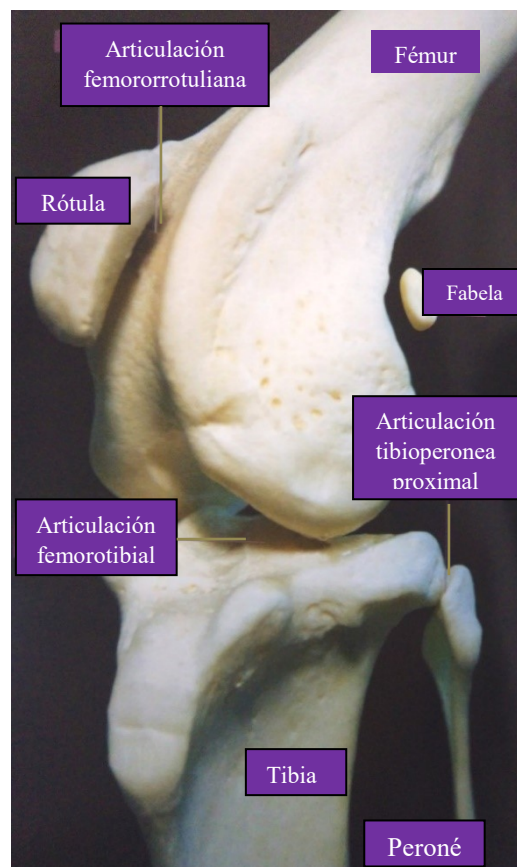


Figura 5. Articulaciones de la rodilla.
Tomado de (Laborda, 2005).

La capsula articular mencionada anteriormente es similar en todas las articulaciones sinoviales, en la rodilla esta estructura se divide en tres compartimentos comunicados entre sí, por lo que cualquier acción sobre uno repercute en los otros; estos compartimentos son: femorrotuliano, femorotibial derecho y femorotibial izquierdo (Laborda, 2005). Otras estructuras que también forman parte de las rodillas se mencionan a continuación.

Ligamentos. Los ligamentos son fuertes bandas o membranas, normalmente compuestas de tejido fibroso blanco que unen los huesos entre sí. Son plegables pero prácticamente inelásticos y sirven también para la conexión de la cápsula con las demás estructuras de la articulación (Getty, 1982; Duke, 2011).

Sobre la rodilla se hallan los siguientes ligamentos (Fig.6):

1. Tendón del musculo cuádriceps femoral.
2. Ligamento rotuliano, que se fija en el surco de la tuberosidad de la tibia.
3. Ligamentos femorrotulianos que vinculan la rótula con las fabelas lateral y medial.
4. Tendón del musculo poplíteo
5. Ligamentos colaterales laterales y colaterales mediales, que unen al fémur y a la tibia.
6. Ligamento tibioperoneo proximal, una la cabeza del peroné lateralmente con la tibia.
7. Ligamento cruzado craneal (anterior), une la superficie interna del cóndilo lateral del fémur con la parte craneal de la eminencia intercondilar de la tibia.
8. Ligamento cruzado caudal (posterior), une la superficie interna del cóndilo medial del fémur con la parte caudal de la eminencia intercondilar de la tibia.

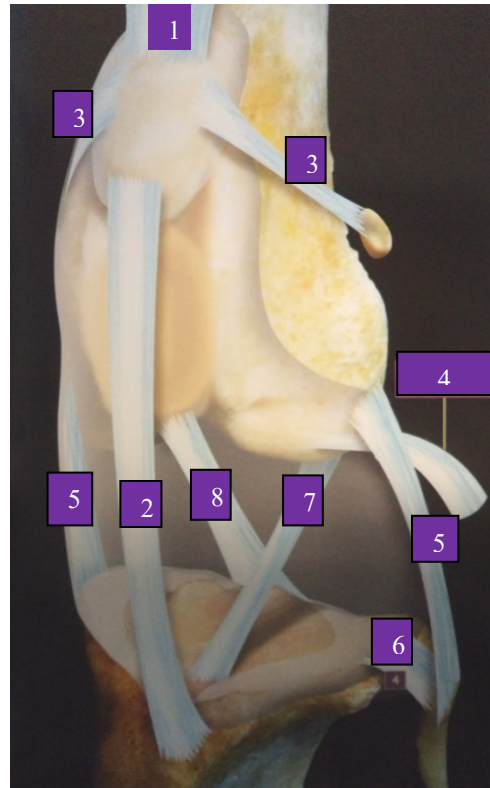


Figura 6. Ligamentos de la articulación de la rodilla. Tomado de (Laborda, 2005).

Músculos. Los músculos que rodean la rodilla y que aportan estabilidad y permiten el movimiento, son los siguientes: bíceps femoral, semitendinoso, semimembranoso, cuádriceps femoral abductor semimembranoso, gastrocnemio y poplíteo (Getty, 1982).

Meniscos. Los meniscos son piezas de fibrocartilago en forma de media luna que se sitúan entre el fémur y la tibia. Cada rodilla tiene dos meniscos, uno medial y otro lateral que contribuyen con la adaptación y la estabilización de las superficies no coincidentes entre los cóndilos femorales y mesetas tibiales, estos también amortiguan las fuerzas de compresión que actúan en los extremos de los huesos (Laborda, 2005; Köning & Liebich, 2004; Duke, 2011; Getty, 1982).

2. Cartilago articular hialino

2.1 Estructura y función

El cartilago (lat. *Cartilago*; gr. *chondros*) es una forma especializada de tejido conjuntivo que deriva de las células madre mesenquimales durante el desarrollo embrionario (Ziskoven et al., 2011). El cartilago articular que recubre los extremos de los huesos, proporciona amortiguación para el contacto entre dos superficies óseas (Laborda, 2005; Duke, 2011). Este tejido, que es avascular, aneural y alinfático, está constituido por los condrocitos y una matriz extracelular (MEC). De acuerdo a su histología la presencia y tipo de fibras de la matriz, el cartilago articular es de tipo hialino (gr. *hyalos*, vidrio), donde la MEC se observa casi homogénea al microscopio óptico sin que se observe la red fibrilar. Este efecto óptico es debido a que el índice de refracción de las fibras de colágeno es similar al de la MEC en las que se encuentran inmersas (Estrada & Uribe, 2002). El cartilago hialino tiene un aspecto vidrioso azulado y es el más abundante en la nariz, tráquea, bronquios, costillas y articulaciones (Geneser, 2014; Estrada & Uribe, 2002).

El grosor del cartilago articular puede ser diferente en función de la tensión (fuerza que actúa sobre una superficie) y de la especie animal; sin embargo, a pesar de estas diferencias, la densidad celular y la MEC del cartilago están constituidos por los mismos elementos, presentan la misma organización y realizan las mismas funciones (Athanasiou et al., 1991; Buckwalter et al., 2005).

Debido a sus propiedades elásticas, el cartilago articular posee la capacidad para distribuir las cargas mecánicas en la articulación, ya que brinda una gran resistencia frente a las fuerzas de compresión y de cizalla generadas durante el movimiento, disminuyendo de esta forma, los picos de estrés mecánico sufridos por el hueso subcondral (Mow & Rosemwasser, 1988; Bassar et al., 1998). Así mismo, su estructura de superficie lisa y deslizante, en conjunto con el líquido sinovial, forman una interface de baja fricción y

elevada resistencia a la compresión (Huber et al., 2000; Grossin et al., 2006; Landínez et al., 2010).

2.2 Composición del cartílago hialino

En el cartílago articular hialino se distinguen 4 estratos o capas (Fig.7) debido a la arquitectura de las fibras de colágeno y a la organización y forma de las células (Welsch, 2013; Köning & Liebich, 2004; Geneser, 2014).

Estrato I, zona superficial o de fibras tangenciales. Las fibras de colágeno se encuentran estrechamente entrelazadas y transcurren paralelas a la superficie, lo que refuerza la estabilidad del cartílago articular. Los condrocitos dentro de esta zona son en general pequeños, fusiformes y están orientados en forma paralela a la superficie.

Estrato II, zona media o de transición. Aquí las fibras de colágeno se cruzan y los condrocitos con frecuencia son grandes, redondeados y aparecen aislados o se encuentran en parejas.

Estrato III, zona radial o profunda. Las fibrillas de colágeno se orientan en sentido casi perpendicular a la superficie, están distribuidas en forma más laxa y son más gruesas que las de la superficie. Los condrocitos de este estrato grueso forman grupos principalmente alargados que se encuentran orientados con las fibrillas de colágeno radiales. Aquí los condrocitos contienen mucho glucógeno, tienen un Retículo Endoplásmico rugoso abundante y un Aparato de Golgi grande y activo.

Estrato IV, zona de cartílago mineralizado. Se ubica sobre el hueso subcondral y posee relativamente pocos condrocitos hipertróficos. La placa ósea subcondral contribuye a las funciones dinámicas en la transmisión de cargas de la articulación, protegiendo al cartílago como amortiguador en los esfuerzos axiales, promueve el aporte metabólico de las capas cartilaginosas más profundas e impide que el cartílago se separe del hueso.

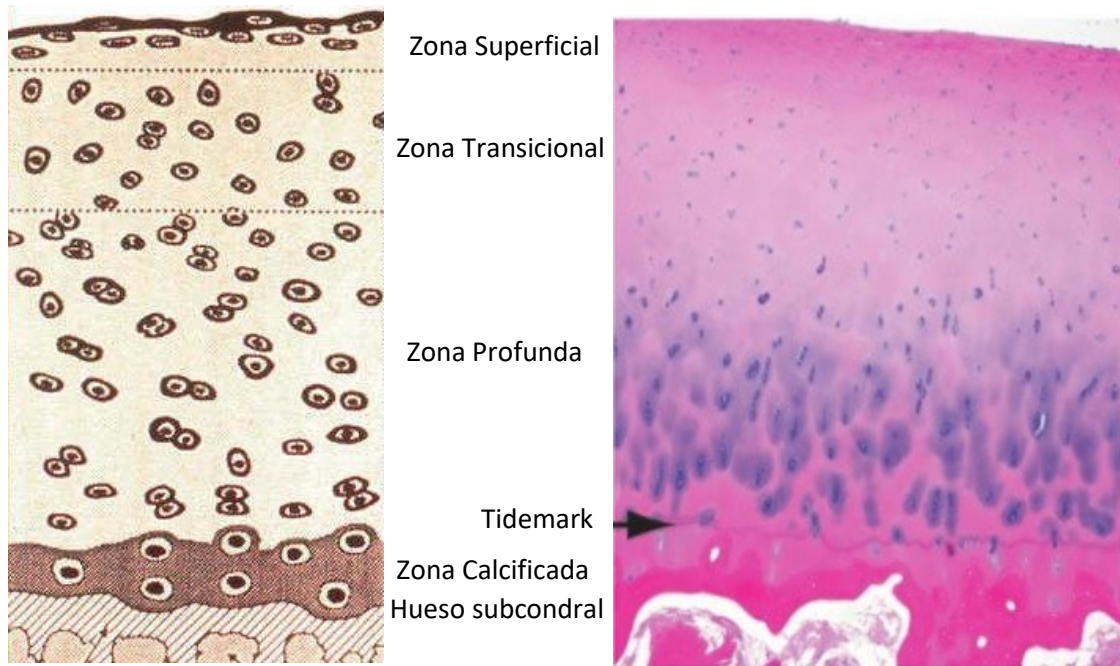


Figura. 7. Microarquitectura del cartílago articular. Esquema representativo de la zonas del cartílago, imagen izquierda modificada de:(López et al., 2004). Imagen histológica teñida con H&E del cartílago, línea de calcificación o tidemark o marca de marea característica del cartílago articular que separa la zona calcificada de la no calcificada (flecha negra), imagen derecha, modificada de: (Link, 2011).

2.3 Componente celular

El único tipo celular presente en el cartílago es el condrocito, quien es el responsable de la síntesis y degradación de los diferentes componentes de la MEC (Fig. 8) (Muir, 1995; Archer & Francis, 2003). Estos se encuentran aislados en pequeños espacios o lagunas (lat. *lacuna*, cavidad) de la MEC (Geneser, 2014). Su tamaño es alrededor de 5 a 15 μm de diámetro (Errington et al., 1997), con un Retículo Endoplásmico y un aparato de Golgi prominentes y un sistema bien desarrollado de gránulos secretorios, lo cual es indicativo de su elevada actividad biosintética (Goldring, 2006).

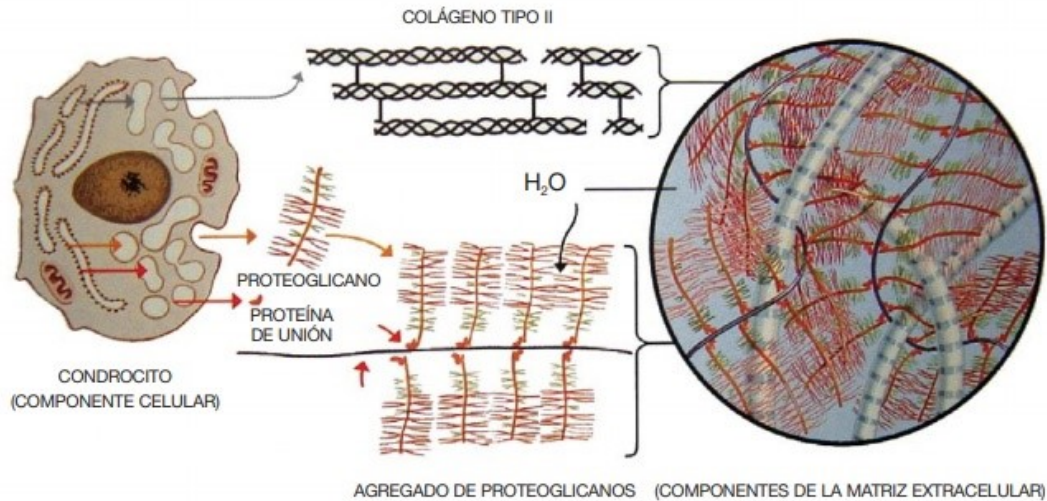


Figura 8. Los condrocitos sintetizan el colágeno y los proteoglicanos. Ambos interactúan conformando la MEC del cartílago, capaz de retener grandes cantidades de agua. Imagen adaptada de: (Buckwalter & Martin, 1995).

2.4 Componente extracelular

La MEC es el componente no celular que proporciona estructura o andamiaje físico para las células y por lo tanto contribuye a las propiedades bioquímicas y biomecánicas requeridas para la homeostasis y la resistencia a las fuerzas de tensión del tejido (Frantz et al., 2010; Gartner, 1997).

En el cartílago hialino la MEC se subdivide en dos regiones: la matriz territorial ubicada alrededor de cada laguna, y la matriz interterritorial (Fig.9). La primera, es una región amplia de 50 μm , que contiene escaso colágeno y abundante condroitín sulfato. Mientras que la matriz interterritorial, es más rica en colágeno tipo II, pero contiene menos proteoglicanos (Gartner, 1997).

Otra región menos descrita es la matriz pericelular o cápsula pericelular, la cual es una región pequeña de la matriz, de 1 a 3 μm de espesor, ubicada inmediatamente alrededor de las lagunas. Se compone de una red fina de fibras de colágeno embebidas en una estructura similar a la membrana basal de los epitelios. Estas fibras pueden representar algunos colágenos menores como el tipo VI y IX que se muestran en el cartílago hialino; algunas investigaciones sugieren que la matriz pericelular puede proteger a los condrocitos contra la tensión mecánica (Gartner, 1997; Liu et al., 2018).

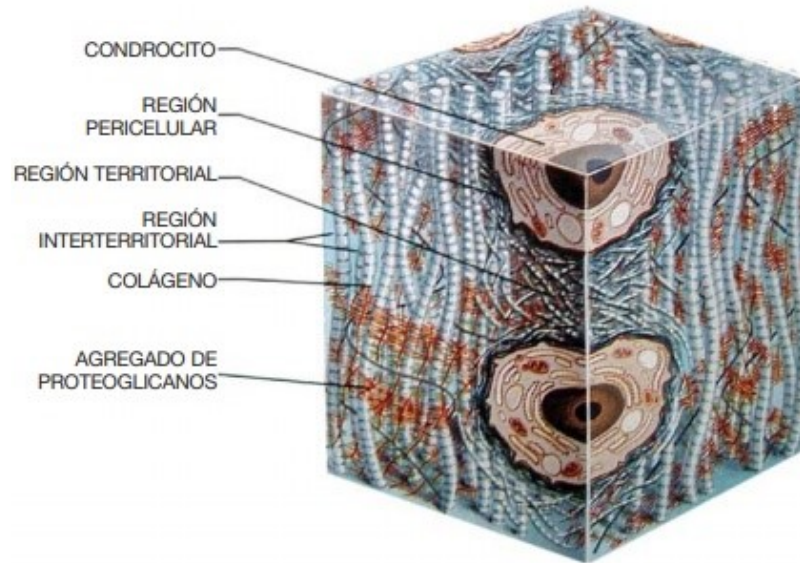


Figura 9. Organización regional de la MEC en función de la proximidad a los condrocitos. Imagen adaptada de: (Buckwalter & Martin, 1995).

La MEC está compuesta principalmente líquido tisular, que representan el 60-80 % del peso total, la cual decrece ligeramente su concentración desde la zona superficial hacia la zona profunda. Las macromoléculas estructurales que se encuentran en la MEC como el colágeno, proteoglicanos y otras proteínas representan el 20-40% del peso total (Buckwalter & Mankin, 1997; Vega et al., 2002).

El principal proteoglicano en la MEC es el agrecano, que está compuesto a su vez por centros proteicos que se enlazan covalentemente a moléculas de glucosaminoglucanos (GAG) principalmente condroitín-4-sulfato, condroitín-6-sulfato, queratán sulfato y heparán sulfato. El agrecano también se une no covalentemente por una proteína de enlace (link protein) con el ácido hialurónico, lo que forma grandes agregados de hasta 100-200 moléculas de agrecano que llegan a medir de 3 a 4 μm (Fig. 10) (Geneser, 2014; Gartner, 1997). La presencia de los grupos aniónicos carboxilo y sulfato en los GAG confiere a la MEC una composición iónica y osmótica diferencial con una alta densidad de cargas negativas que atraen cationes (principalmente Na^+ , K^+ y Ca^{2+}) y repelen aniones (Cl^- , HCO_2^-), por lo que la concentración de cationes libres en el cartílago es alta y la de aniones es baja (Fig. 11) (Trujillo 2005; Sánchez, 2008). De este modo, los proteoglicanos atraen agua y mantienen la hidratación de la MEC y de los condrocitos en el cartílago articular (Gartner, 1997; Yue et al., 2014).

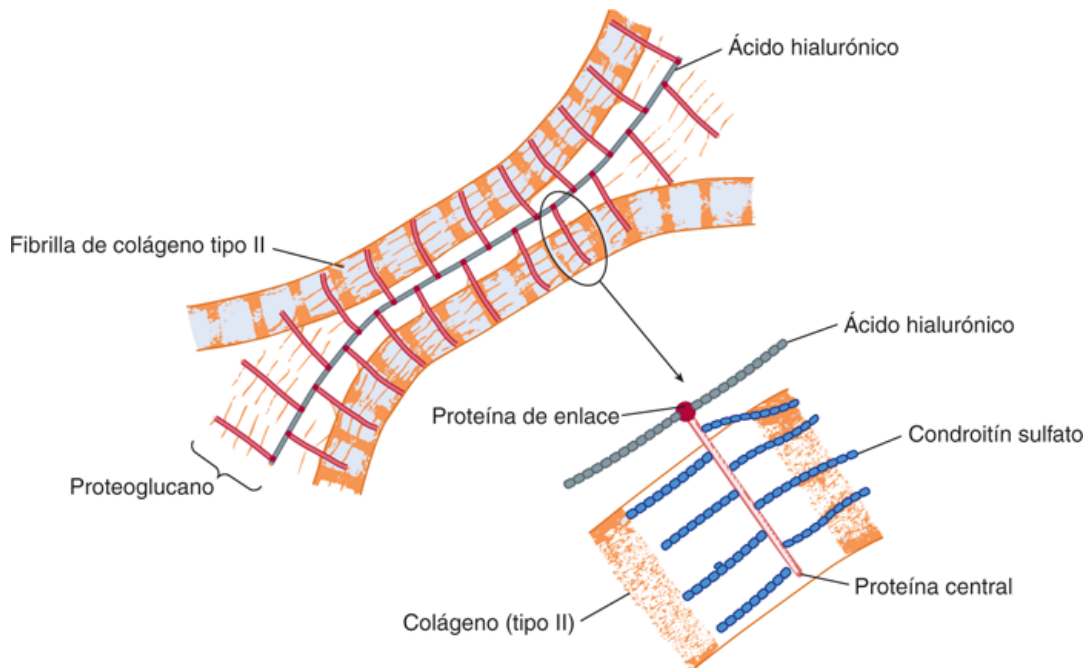


Figura 10. Representación esquemática de la organización molecular en la matriz del cartilago Tomado de: (Junqueira & Carneiro, 2003).

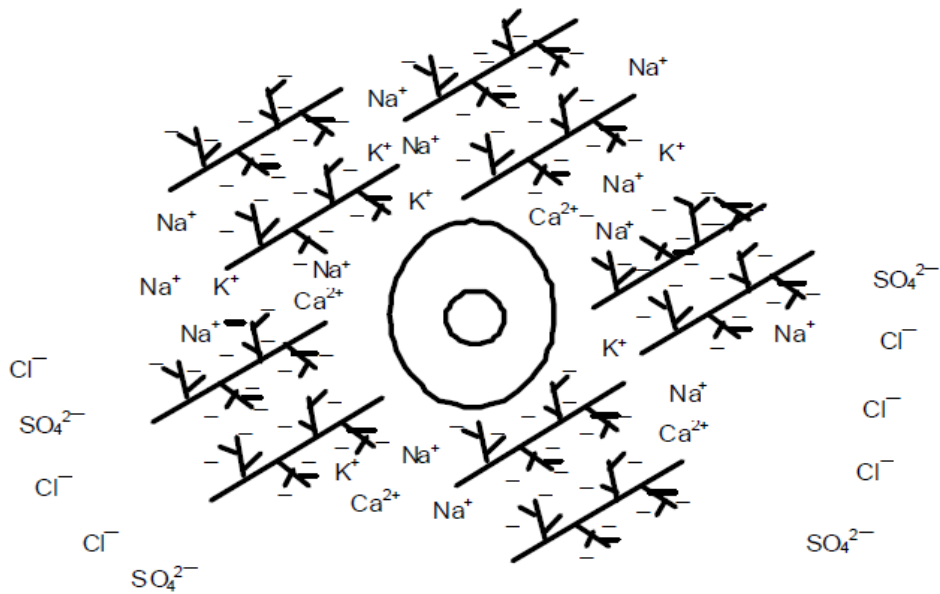


Figura 11. Representación esquemática del microambiente del condrocito articular en la matriz extracelular. Tomado de: (Sánchez, 2008).

Otros componentes de la MEC son las proteínas adhesivas, que desempeñan un papel en la interacción entre los condrocitos y la MEC, por ejemplo, la ancorina II y la condronectina que fijan los condrocitos al colágeno tipo II, y las integrinas que unen a estas células a la fibronectina y colágenos tipos II y VI (Geneser, 2014; Loeser, 2014).

2.5 Histofisiología

La capacidad del cartílago para soportar o amortiguar la fuerza mecánica durante la carga articular, dependen de: la integridad de la red de colágeno, el mantenimiento de la concentración de proteoglicanos y del efecto Donnan; en donde estos atraen agua para expandir así la red de colágeno y conferir la elasticidad y resistencia al cartílago (Trujillo, 2005; Mow & Rosemwasser, 1988). Así, la deformación del cartílago sometido a la acción de las cargas ocurre de manera gradual a medida que el contenido de agua se desplaza hacia la superficie articular. Después que cesa la fuerza, el agua vuelve a su localización inicial, atraídas por la fuerte carga negativa de los proteoglicanos, por lo que se restablece la estructura del cartílago y se disipan las fuerzas mecánicas (Fig. 12) (Buckwalter & Mankin, 1997).

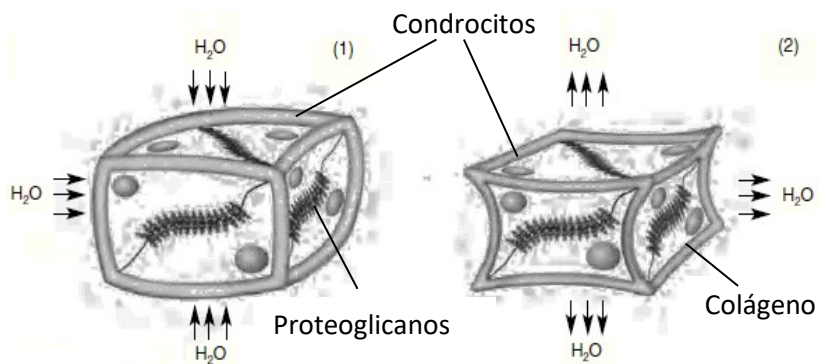


Figura 12. Comportamiento de una unidad del cartílago articular en reposo (1) y en un momento de carga (2) Imagen modificada de: (Trujillo, 2005).

2.6 Oxigenación en el cartílago articular

Para conservar la función y la composición del cartílago articular, se produce un recambio lento pero constante de sus componentes, cuya tasa depende de la edad, la carga mecánica y el entorno articular (Morris & Treadwell, 1994; Smith et al., 1996; Sah et al., 1996; Buckwalter, 1995). Parte de los materiales necesarios para este proceso son provistos por el líquido sinovial y se difunden a través de la fase acuosa o líquido tisular de la MEC del cartílago (Levick, 1984; De Andrés, 2007; Geneser, 2014). También el aporte de O_2 puede

ser suministrado por el hueso subcondral, ya que hay evidencia de que es una importante fuente de nutrientes para el cartílago inmaduro (Levick, 1995).

Hasta la fecha, la característica avascular del cartílago articular, hace pasar por desapercibido las funciones y las necesidades del O_2 de los condrocitos. Aunque son células muy bien adaptadas a la hipoxia, los condrocitos requieren O_2 para realizar su función principal que es mantener la composición de la MEC. Así, un estudio con condrocitos cultivados en perlas de alginato mantenidos bajo una condición anóxica con una presión parcial de oxígeno de $<0.1\%$ (pO_2), mostró una reducción en la actividad metabólica y en consecuencia en la producción de la MEC (Grimshaw & Mason, 2000).

En el microambiente del cartílago los niveles de O_2 son bajos al lado de otros tejidos en relación a la pO_2 . Así en la sangre arterial es de 13.2%, en el riñón 9.5%, en el intestino 7.6% mientras que en cartílago es del 5%. Además, el cartílago es relativamente grueso, por lo que el O_2 y los nutrientes deben difundirse en distancias de hasta 2-3 mm, lo que es importante ya que la distancia de difusión de O_2 para el soporte del metabolismo aeróbico, es de solo unos 200 μm . Así, la tensión de O_2 disminuye con la distancia de la superficie articular y el gradiente depende del equilibrio entre la velocidad de transporte de este gas a través del cartílago y la tasa de consumo celular (Carreau et al., 2011; Zhou et al., 2004). Las estimaciones sitúan la pO_2 media alrededor del 5%, con niveles ligeramente superiores (alrededor del 6%) en la superficie e inferiores (2-3%) en la zona profunda del cartílago articular (Fig. 13) (Falchuk et al., 1970; Lund, 1970; Silver, 1975; Urban, 1994; Najafipour & Ferrell, 1995; Zhou et al., 2004).

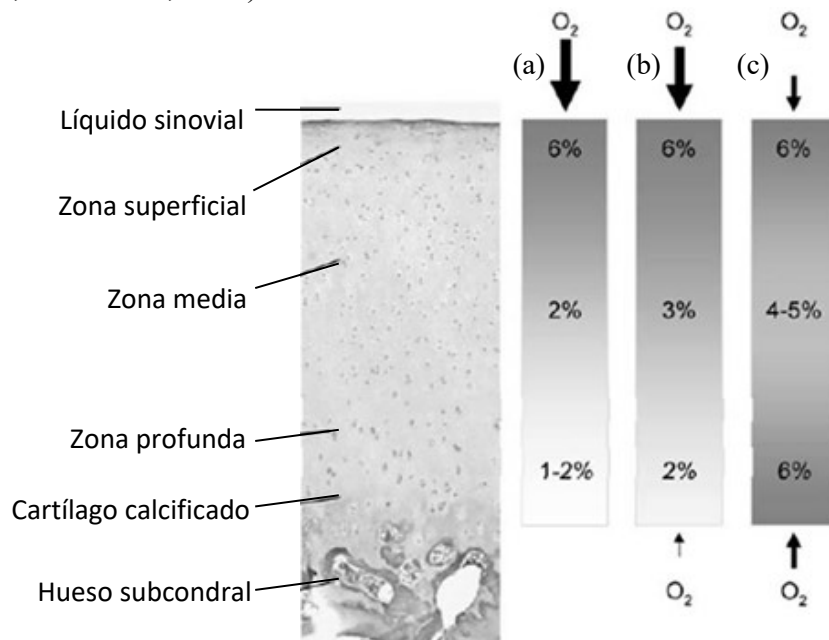


Figura 13. Estructura del cartílago articular y la aportación de oxígeno por otros tejidos. Los niveles de O_2 estimados dentro de la MEC son demostrados por tres escenarios: (a) provisión de O_2 desde el fluido sinovial, (b) O_2 suplementado mayormente desde el fluido sinovial (90%) con una pequeña contribución del hueso subcondral (10%), (c) suplemento del O_2 en cantidades iguales desde el fluido sinovial y el hueso subcondral. Modificado de; (Zhou et al., 2004).

El consumo de O₂ por los condrocitos articulares representa el 2-5% comparado al consumo por las células renales o hepáticas (Lee & Urban, 1997). Este consumo también se correlaciona con la presencia de escasas mitocondrias que sólo ocupan el 1-2% del volumen intracelular (Brighton et al., 1984), en comparación con el 15-20% en otras células (por ejemplo, el hígado). Por lo tanto, los condrocitos producen ATP principalmente a través de la glucólisis (Marcus, 1973; Otte, 1991), y con menor contribución la generación de energía dependiente del O₂ por fosforilación oxidativa (Schneider et al., 2007). Sin embargo, de forma independiente a la fosforilación oxidativa, la tasa de glucólisis depende de al menos un flujo mínimo de O₂ a través del transporte de electrones mitocondrial, por lo que este acoplamiento es necesario para la activación o estabilización de enzimas glucolíticas y por ende para la producción de energía (ATP). Así, la inhibición del transporte de electrones reduce la proporción de los productos de la glucólisis como el ATP, el piruvato y el NADH (Martin et al., 2012). Esto concuerda con la inhibición de la captación de glucosa y la producción de lactato reportada en los explantes de cartílago de varias especies mantenidos bajo <1% O₂ (Efecto Pasteur negativo) y que es revertido al proporcionar oxidantes exógenos como el mismo O₂ (Lee & Urban, 1997; Lee & Urban, 2002).

Es un dilema comprender los efectos de la tensión O₂ en la biología del cartílago, puesto que el 1-5% de O₂ correspondientes a un nivel normal o “normóxico” son referidos como “hipóxicos”, por lo tanto, la reducción hacia tensiones más bajas es requerida para someter a los condrocitos a verdaderos niveles hipóxicos (Fermor et al., 2007; Gibson et al., 2008).

2.7 Adaptación a la baja tensión de oxígeno

Las adaptación de los condrocitos en la supervivencia del entorno “hipóxico” está mediado por los factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIF-1 y HIF-2) que regulan distintos procesos homeostáticos. El factor HIF es un heterodímero, de dos subunidades, HIF-1 α que en condiciones normóxicas se degrada, pero bajo hipoxia se acumula y se asocia con la subunidad β para translocarse en el núcleo y regular la expresión de genes para el transporte de glucosa, la generación de energía anaeróbica y la síntesis de la MEC en los condrocitos (Wang & Semenza, 1993; Pfander & Gelse, 2007). Así en relación con la tensión de O₂, la acumulación y activación de HIF-1 es más activa en los condrocitos de las zonas media y profunda, lo que sugiere un fenotipo específico de estas células adaptado a la hipoxia que correlaciona con la densidad mitocondrial reducida en las zonas profundas en comparación con las zonas superiores del cartílago articular (Brucker et al., 2005; Stockwell, 1991). También importante, es el factor HIF-2 α que está involucrado en la expresión de genes para la síntesis de los componentes de la MEC como el colágeno tipo II, IX, XI y agregano de forma dependiente del gen SOX9 (Lafont et al., 2008).

2.8 Importancia de la tensión de oxígeno en el condrocito articular

Aunque los requerimientos de O_2 en el cartílago articular parezcan mínimos, estos son necesarios para el correcto funcionamiento de los condrocitos. Tal como se ha dilucidado en varios estudios sobre el sistema de transporte de membrana, el metabolismo energético y la actividad biosintética.

La disociación de la composición intracelular y extracelular es de gran importancia, ya que la MEC del cartílago es hiperosmótica y ácida (pH 6.9), lo que la vuelve un entorno hostil para los condrocitos (Fig. 14) (Stockwell, 1991b; Urban, 1994; Wilkins et al., 2000). Sin embargo, los condrocitos poseen sistemas de transporte de membrana modulados por la tensión O_2 que minimizan y disocian los cambios en la composición celular frente al entorno. El sistema NHE (del inglés “sodium–hydrogen exchanger”) mantiene el pH intracelular (7.1) bajo una tensión de 5% O_2 expulsando un H^+ en intercambio con un Na^+ en la membrana externa, utilizando el gradiente que favorece la entrada del segundo ion. Las tensiones más bajas (2.5% y 1% de O_2) reducen la extrusión de ácido por lo que las células se acidifican significativamente y su capacidad de recuperación ante la carga de ácido se ve interferida (Gibson et al., 2000; Gibson et al., 2008; Milner et al., 2006; Sánchez, 2008).

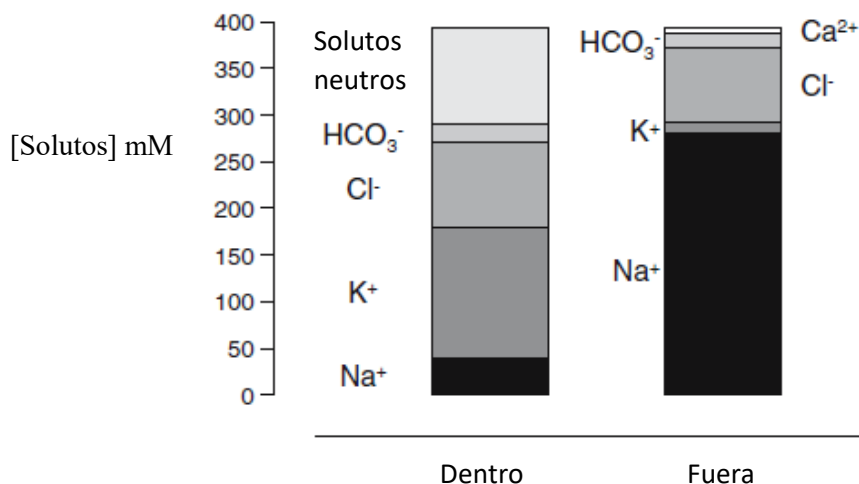


Figura. 14 Comparación de la composición iónica intracelular (dentro) y de la matriz extracelular (fuera) aproximada de los condrocitos articulares. Modificado de (Gibson, et al., 2008).

La actividad del sistema NHE a largo plazo, aumentaría la concentración intracelular iónica de Na^+ de forma secundaria a la salida de H^+ , provocando la alteración en el transporte de agua y la homeostasis del sodio. Esto se ha reportado en la artrosis avanzada, donde se presenta una disminución del contenido acuoso de la MEC del cartílago, así como la

disminución en la concentración extracelular de Na^+ , mientras que la concentración intracelular se encuentra aumentada (Urban & Bayliss, 1989).

Cuando la vía principal de producción de ATP queda desbordada bajo una condición de estrés, la demanda de energía incrementa y los condrocitos utilizan la vía oxidativa mitocondrial que puede generar más de un cuarto de la producción total de ATP. Esto se ha hecho evidente en una condición de estrés nutricional de condrocitos cultivados en medio suplementado con galactosa, en donde regulan positivamente las vías metabólicas mitocondrial en un intento de mantener el equilibrio energético, lo que proporciona flexibilidad metabólica y supervivencia celular (De Andrés, 2007; Lee & Urban, 1997; Lane et al., 2015). Además la fosforilación oxidativa es 18 veces más eficiente en la generación de ATP que la glucólisis, por lo que esta vía puede ser importante en los condrocitos de la zona superficial y media que tienen mayor densidad mitocondrial y un entorno con mayor O_2 comparado al que se encuentran los condrocitos de la zona profunda (Oegema et al., 1986; Brookes et al., 1999; Murphy et al., 1999; Stockwell, 1991).

La producción disminuida de ATP asociada a una condición hipóxica para el cartílago puede alterar la síntesis de algunos elementos de la MEC, tal como se demostró en cartílago cultivado en 1% de O_2 en el que se disminuyó la síntesis de proteoglicanos, colágeno y ácido hialurónico comparados con el cultivo al 5% de O_2 (Fermor et al., 2004; Hashimoto et al., 2006; Fermor et al., 2007). Además, la síntesis de la MEC en 5% O_2 se correlacionó con el mantenimiento de las propiedades del cartílago, como su viscoelasticidad y la permeabilidad, que influyen en la capacidad de los solutos para difundir en el cartílago articular (Fermor et al., 2007).

3. Osteoartritis (OA)

La osteoartritis u osteoartrosis, es una artropatía de tipo crónico-degenerativo-inflamatorio multifactorial de progresión lenta, que afecta a las articulaciones sinoviales y cartilagosas de distintas especies como los humanos, perros, caballos, etc. Esta enfermedad está caracterizada principalmente por la pérdida gradual de cartílago articular (Houlton, 2010; Mortellaro, 2010).

3.1 Fisiopatología

La degeneración del cartílago articular es clave en la patogénesis de la OA; sin embargo, el desarrollo de esta patología afecta a toda la estructura articular, incluyendo el hueso subcondral, el tejido sinovial, la cápsula articular, la membrana sinovial y los tejidos

blandos periarticulares (Sociedad Española de Reumatología, 2010). La arquitectura del cartílago y la composición bioquímica está estrictamente regulada por los condrocitos en respuesta a cambios en su entorno químico y mecánico (Buckwalter et al., 2005). Pero en la pérdida del equilibrio entre la actividad catabólica y anabólica, los condrocitos activan la producción de varias proteínas de respuesta inflamatoria, como interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), y enzimas que degradan la MEC, especialmente las metaloproteinasas de la matriz (MMP) y las agregasas (ADAMTS) (Fig. 15) (Glyn et al., 2015).

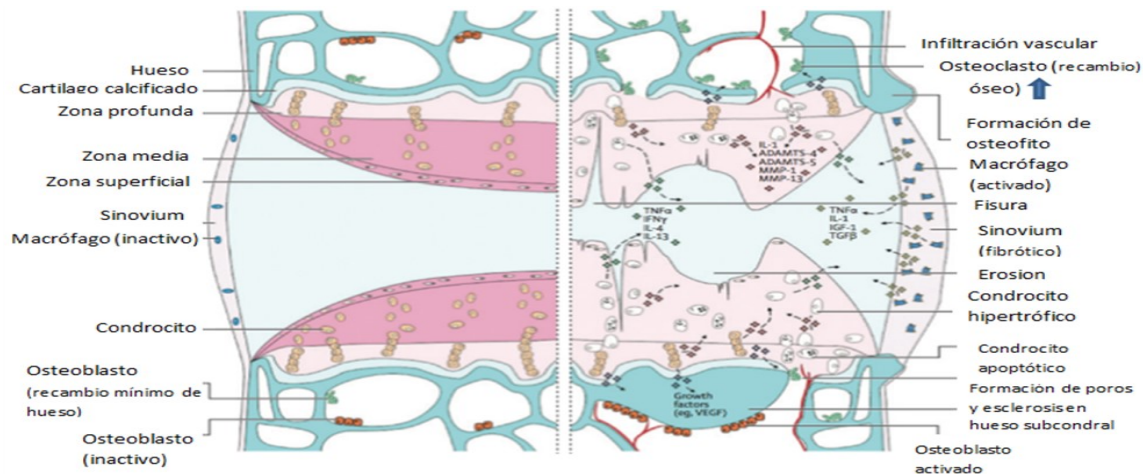


Figura 15. Cambios estructurales y vías de señalización en el desarrollo de la osteoartritis. Modificado de (Glyn et al., 2015). ADAMTS = Desintegrina y Metaloproteinasas con Motivos de tipo Trombospondina. IL = Interleucina. MMP = Metaloproteinasas de la matriz. TNF = Factor de Necrosis Tumoral. IFN = Interferón. IGF = Factor de Crecimiento similar a la Insulina. TGF = Factor de Crecimiento Transformante. VEGF = Factor de Crecimiento Endotelial Vascular.

En los condrocitos y los sinoviocitos, tanto la IL-1 β y el TNF α inducen la producción de otras moléculas como IL-6, IL-8, MMP, óxido nítrico, prostaglandina E2. Estos mediadores biológicos pueden tener impacto en las células de otros tejidos, perpetuando su producción y contribuyendo en la degradación, la apoptosis y la alteración de las vías metabólicas necesarias para la reparación de la MEC dañada, así como la disminución de la expresión del inhibidor de metaloproteinasas (TIMP) (Fernandez et al, 2002; Frisbie, 2012; Botha et al., 2008; Carmona & Prades, 2009).

Las MMP son enzimas que pertenecen a un grupo de endopeptidasas que dependen de metales como zinc, calcio, magnesio o cobalto para su activación y que pueden ser secretadas por sinoviocitos y condrocitos. En el cartílago OA actúan diversas de estas enzimas (Tabla 1) en la degradación de la MEC (Carmona & Prades, 2009; Caron, 2011; Frisbie, 2012; Cruz et al., 2014). Sin embargo, debido a la alta proporción del colágeno tipo

II en el cartílago, la MMP-13 tiene un papel destacado por el daño a este componente desde la fase temprana de la OA (McIlwraith, 2004; Xu et al., 2010). A su vez los proteoglicanos de la MEC, son degradados principalmente por las agreganasas ADAMTS 4 y 5 (Troeborg & Nagase, 2012; Sociedad Española de Reumatología, 2010). Como consecuencia también se ven afectadas la concentración extracelular tanto de Na⁺ y de agua por un aumento en la fase inicial y posteriormente una disminución en la fase avanzada de la OA (Trujillo et al., 2001, Trujillo, 2005).

Subfamilia enzimática	MMP	Substratos
Colagenasa 1	MMP-1	Colágenos I, II, III, VII, X, gelatina; agregano; entactina; proteínas de unión
Colagenasa 2	MMP-8	Colágenos I, II, III; agregano; proteínas de unión
Colagenasa 3	MMP-13	Colágenos I, II, III
Estromelisina 1	MMP-3	Colágenos III, IV, IX, X; agregano; fibronectina, laminina; elastina; perlecano; gelatinas
Gelatinasa	MMP-2	Colágenos I, IV, V, VII, X, XI; gelatinas; elastina; fibronectina; laminina
Gelatinasa	MMP-9	Colágenos IV, V, XIV; gelatinas; elastina; entactina; vitronectina

Tabla 1. Metaloproteinasas (MMP) relacionadas en la degradación de los componentes de la MEC en el cartílago OA.

La pérdida de los componentes del cartílago comienza en las capas más superficiales, pero a medida que avanza la OA, la capa profunda también es dañada (Fig. 16); por lo que finalmente las propiedades viscoelásticas del cartílago son afectadas y adquieren un soporte ineficiente de la carga normal (Brinker et al., 2016; Caron, 2011). Otro factor importante

en la destrucción del cartílago articular, además de los mediadores biológicos, es el factor mecánico (Sociedad Española de Reumatología, 2010). Puesto que los condrocitos son mecanosensibles y transforman las cargas mecánicas en señales bioquímicas para modular la expresión de genes, la síntesis de proteínas, la composición de la matriz y el desempeño biomecánico del cartílago (Ruhlen & Marberry, 2014; de Crombrughe et al., 2001; Jutila et al., 2014; Garima et al., 2007). Por lo tanto, las cargas mecánicas pueden controlar el mantenimiento o degradación de la MEC (Fig.17), en función de la magnitud y el tipo de carga que se imponga (de Crombrughe et al., 2001).

El estrés mecánico mediante la descarga y la sobrecarga mecánica, el desuso y el uso excesivo respectivamente de las articulaciones, inducen la actividad catabólica de las proteasas y el aumento la tasa de la apoptosis celular (Leong et al., 2010; Messier et al., 2013; Ambrosio et al, 2011; Koike et al., 2015; D'Lima et al., 2001; Huang et al., 2017).

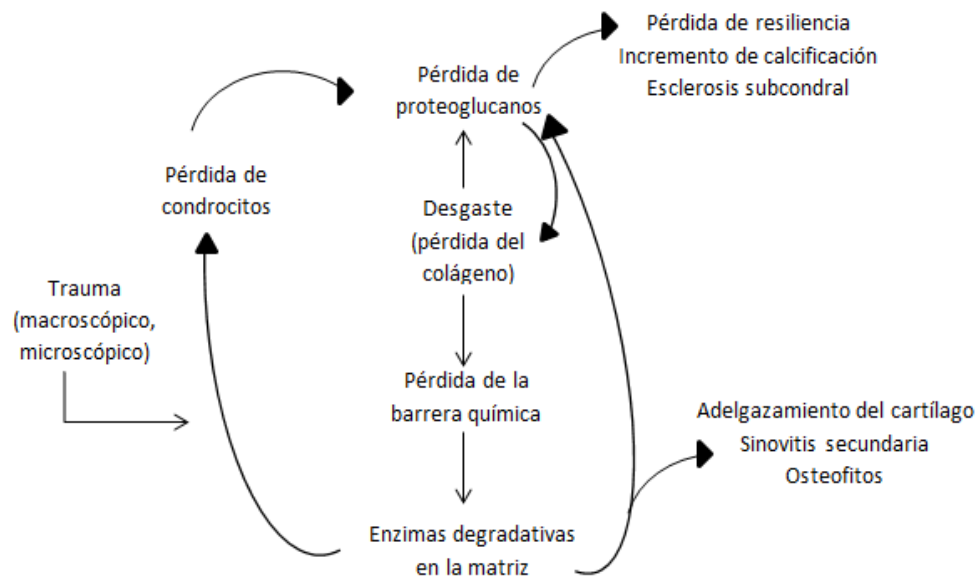


Figura 16. El ciclo de la degeneración progresiva del cartílago durante la progresión de la OA. Modificado de (Brinker et al., 2016)

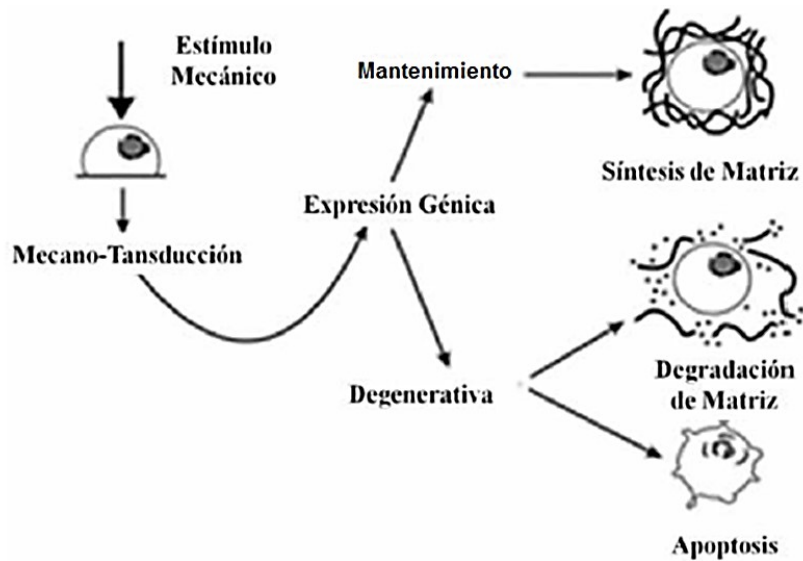


Figura 17. Mecanotransducción del condrocito. Imagen modificado de (Shieh & Athanasiou, 2003).

El estrés oxidativo, que también tiene un impacto en el desarrollo de la OA, es definido como una situación de desequilibrio con un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) o una disminución de antioxidantes. (Konigsberg, 2008). Dentro de las especies reactivas que ejercen un efecto deletéreo en los condrocitos, el óxido nítrico (NO) es el más documentado (Del Carlo & Loeser, 2006; Goodwin et al., 2010; Cao et al., 2013; Brouillette et al., 2014; Loeser, 2009; Blanco et al., 2000).

El NO o monóxido de nitrógeno es un radical gaseoso, lábil, inodoro e incoloro de una vida media entre 0.09 - >2 segundos y que al ser una molécula pequeña y neutra, su difusión es libre a través de las membranas celulares. Su síntesis se realiza a partir del aminoácido L-arginina, con la ayuda de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) (Fig. 18a) que es estimulada por diferentes citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF α , IL-17 e IL-18) en el cartílago OA (Díaz et al., 2009; Thomas et al., 2001; Fermor et al., 2007; Amin et al., 1995; Abramson et al., 2001).

La NOS existe en tres isoformas, la endotelial NOS3 (eNOS) y la neuronal NOS1 (nNOS), que son constitutivas (cNOS) y la isoforma inducible NOS2 (iNOS) que se expresa en respuesta a diferentes estímulos (Díaz et al., 2009). La presencia de esta última se ha demostrado en los condrocitos y en general su expresión se considera una condición patológica celular ya que puede producir NO durante un tiempo más prolongado (Blanco et al., 2000; Subbotina, 2006).

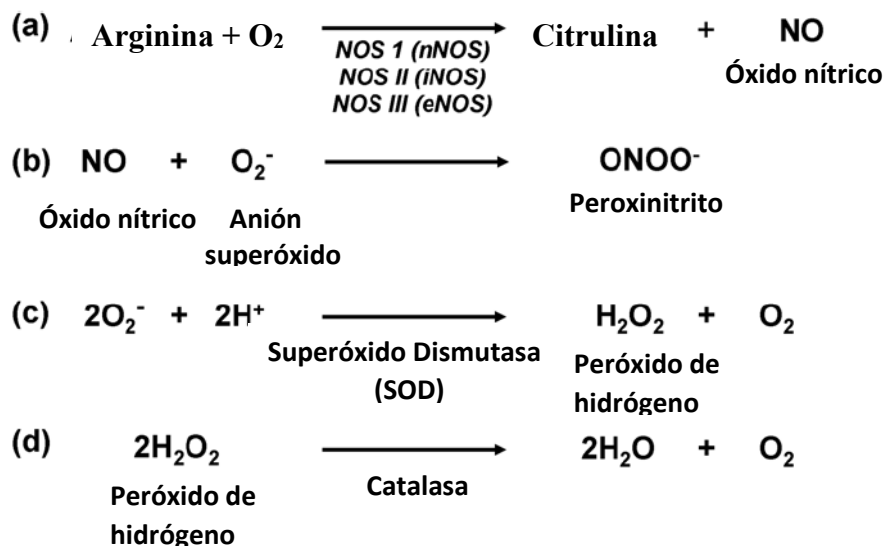


Figura 18. Bioquímica del óxido nítrico. (a) El óxido nítrico se forma mediante la conversión de arginina en citrulina. (b) El óxido nítrico es un gas altamente reactivo que puede interactuar con aniones superóxido para formar peroxinitrito. (c) Los aniones superóxido se dismutan a peróxido de hidrógeno por superóxido dismutasa, que está presente en el cartílago articular. (d) El peróxido de hidrógeno se metaboliza en agua y oxígeno por acción de una catalasa. Imagen modificada de (Fermor et al., 2007).

El NO puede extender su vida y rango de efectos en condiciones de menor oxigenación como a través de la formación de peroxinitrito (ONOO⁻) (Fig. 18b), el cual se ha sugerido como responsable de acciones patológicas del NO como la nitrosilación del colágeno u otras proteínas en los condrocitos OA y la muerte celular (Blanco et al., 2000; Takehara et al., 1995; Heyman et al., 1999; Inoue et al., 1999; Fermor et al., 2007; Deberg et al., 2005; Hwang & Kim, 2015; Del Carlo & Loeser, 2002; Kuhn et al., 2004; Whiteman et al., 2004). Cuando un sistema antioxidante normal (Fig. 1c y d) es alterado, como la regulación negativa de la superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2), vuelve susceptible a los condrocitos y en especial a las mitocondrias al daño oxidativo en el cartílago OA (Gavriilidis et al., 2013; Aigner et al., 2006; Ruiz et al., 2009; Scott et al., 2010).

La mayoría de los efectos del NO pueden derivar del daño oxidativo a la mitocondria (Fig. 19), ya que son los principales blancos de las ROS, ya que el NO conduce a la disfunción de la cadena respiratoria, por el deterioro de la función del transporte de electrones y la supresión de la fosforilación oxidativa (Balaban et al., 2005; López et al., 2013; Johnson et al., 2000; Maneiro et al., 2003; Fermor et al., 2007). Estos cambios en la mitocondria, junto con el daño a su ADN, también comprometen la viabilidad celular ya que contribuyen al efecto proapoptótico del NO (Boyd & Cadenas, 2002; Moncada & Erusalimsky, 2002; Abramson et al., 2001; Elmore, 2007; Fermor et al., 2007; Kim et al., 2010; Yui et al., 2016).

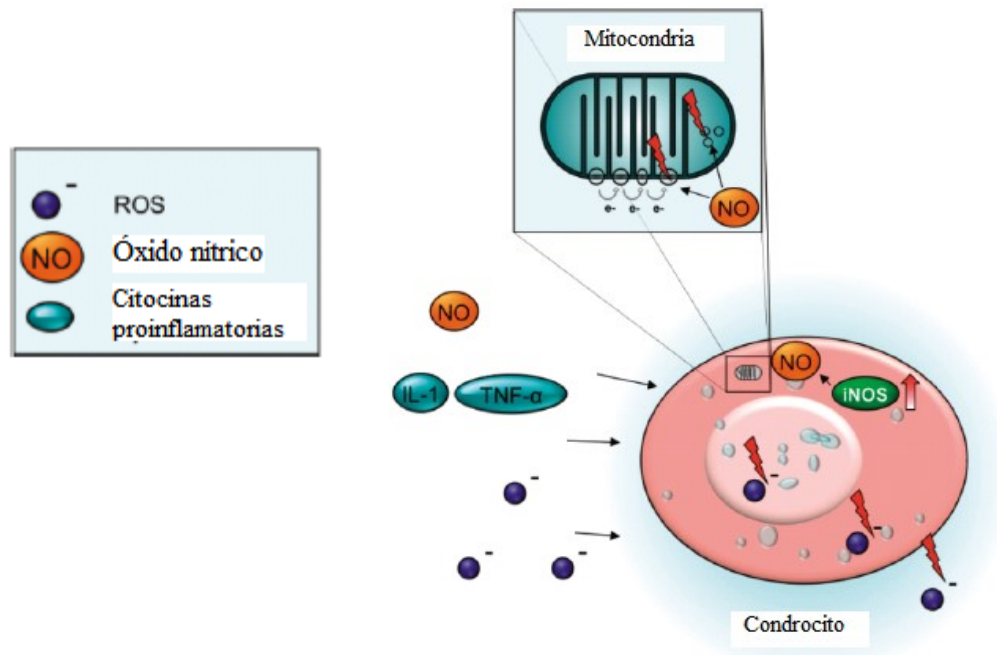


Figura 19. Daño oxidativo en el condrocito ocasionado por el NO y ROS.
 Imagen modificada de: (Ziskoven et al., 2011).

Como consecuencia de la disfunción mitocondrial, una disminución de la reserva bioenergética mitocondrial puede contribuir a un desequilibrio de la síntesis de la matriz y la degradación del cartílago (Johnson et al., 2004), por lo que la síntesis alterada de ATP mitocondrial es un factor en la patogénesis de la OA (Terkeltaub et al., 2002).

3.2 Muerte celular

En el cartílago OA los condrocitos presentan al menos dos tipos de muerte celular programada; la apoptosis y la condroptosis (Kouri & Lavalle, 2006; Hayami et al., 2004; Li et al., 2013). La apoptosis es un proceso activo, bajo un control molecular, que depende de energía y que implica la activación de un grupo de cisteín proteasas llamadas "caspasas" y una cascada de eventos para desmantelar de forma ordenada las estructuras celulares, sin generar respuesta inflamatoria (Nagata, 1997; Elmore, 2007).

Las caspasas son centrales en la apoptosis ya que son tanto iniciadoras (caspasa 8 y 9) como ejecutoras (caspasa 3) del proceso. Hay dos vías comúnmente descritas por las cuales las caspasas pueden ser activadas. Estas son la vía intrínseca (o mitocondrial) que involucra una serie diversa de estímulos (entre ellos las citocinas, la hipoxia, y el estrés oxidativo) que provocan cambios en la membrana mitocondrial interna mitocondrial y la liberación de proteínas pro-apoptóticas con la consecuente activación de caspasa 9; y la vía

extrínseca (o del receptor de muerte) que implica interacciones mediadas por receptores transmembrana con activación de la caspasa 8. Ambas vías terminan en una fase de ejecución, donde las caspasas iniciadoras activan a la caspasa 3 ejecutora (forma activa) que conduce a la fragmentación del ADN, la condensación de cromatina, la degradación de proteínas nucleares y del citoesquelético, que en última instancia causan cambios bioquímicos y morfológicos en las células apoptóticas (Elmore, 2007).

Por otro lado, la “Condroptosis”, es un proceso en el que se conjuntan la apoptosis y la autofagia, debido a esto, dentro de una misma célula se pueden presentar los marcadores específicos para cada tipo de muerte celular como la caspasa 3 y la LC3II o LC3-fosfatidiletanolamina que es una proteína citosólica asociada a microtubulos que se recluta en las membranas autofagosómicas (Roach et al., 2004; Almonte et al., 2010; Tanida et al., 2008).

La muerte de los condrocitos en la condroptosis consiste en la autodestrucción mediada por tres fenómenos (Roach et al., 2004; Pérez et al., 2005):

- ✓ El aumento del Retículo Endoplasmático y aparato Golgi crean compartimentos para la digestión de componentes citoplásmicos y orgánulos.
- ✓ La formación de múltiples vacuolas autofágicas.
- ✓ La extrusión de material celular en el espacio de las lagunas, dejando restos y restos vesiculares, distintos de los cuerpos apoptóticos formados durante la apoptosis.

3.3 Cambios histológicos en el cartílago OA

En el cartílago con OA es evidente la formación de clusters o clones que son grupos de más de 20 condrocitos de morfología redonda ubicados dentro de una laguna grande (Fig. 20) muy cerca a las fisuras y hendiduras de la capa superior del cartílago (Schumacher et al., 2002). A pesar de que representan un sello característico en el cartílago OA en la mayoría de los especímenes analizados, su biología y su papel son poco conocidos (Mankin & Lippiello, 1970; Poole et al., 1991; Kouri et al., 1998; Lee et al., 2000; Lotz et al., 2010; Kouri et al., 1996; Goyal et al., 2006). En la OA de fase temprana, los clusters se han asociado con un aumento en la proliferación de los condrocitos y la síntesis de proteínas de la MEC o de proteinasas y citocinas. En la fase avanzada con la muerte celular, el número de condrocitos se reduce y el número de lagunas vacías aumenta en el cartílago (Blanco et al., 1998; Hashimoto et al., 1998; Horton et al., 1998; Kim et al., 2000).

Debido a los procesos catabólicos, el cartílago pierde su aspecto liso y se torna irregular mostrando fibrilación de la superficie (Fig.21), pérdida de su grosor y fisuras u erosiones

que incluso llegan hasta la pérdida total del cartílago en la fase avanzada de la OA, por lo que el hueso subcondral queda expuesto (Caron, 2011; Geneser, 2014; Chevalier, 2009).

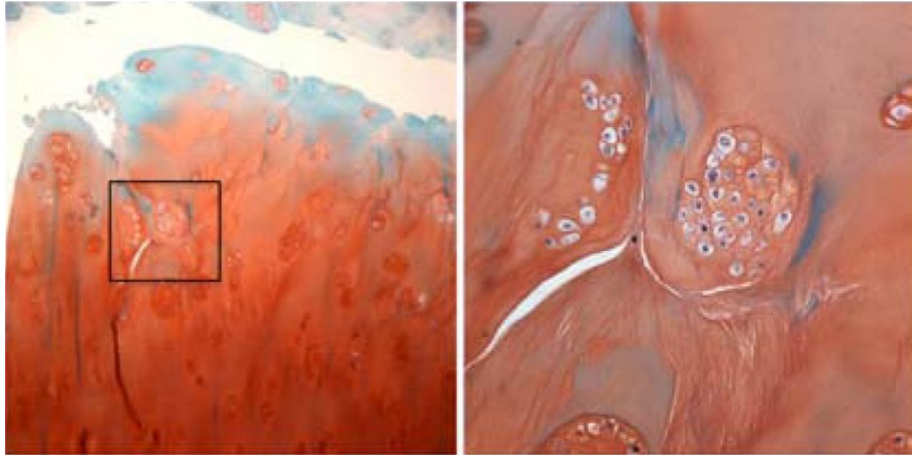


Figura 20. Cluster en el Cartílago articular OA de un hombre de 75 años teñido con safranina O. Objetivos de 10x (izquierda) y 40x (derecha). Tomado de (Lotz, et al., 2010).

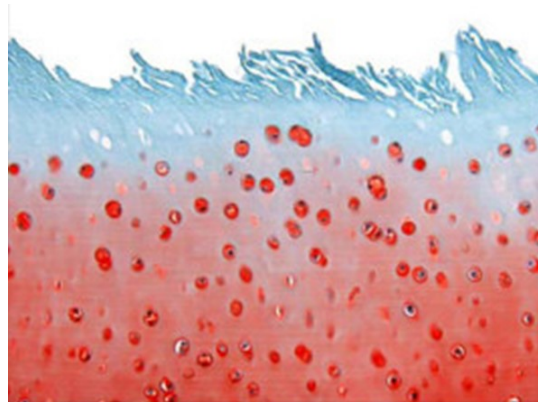


Figura 21. Fibrilación de la superficie con lagunas vacías en el cartílago articular OA del plato tibial teñido con Safranina-O. Magnificación x100. Modificado de (Boileau et al., 2009).

La progresión de la OA se divide en una fase inicial o temprana caracterizada por la formación de clusters, cambios en el fenotipo de los condrocitos y la actividad de síntesis incrementada con motivo de reparación. Y la fase avanzada o degradación del cartílago, en la cual hay condrocitos apoptóticos y en diferenciación hacia fibrocondrocitos que sintetizan una MEC cicatrizal o fibrocartílago (Fig. 22) (Chevalier, 2009).

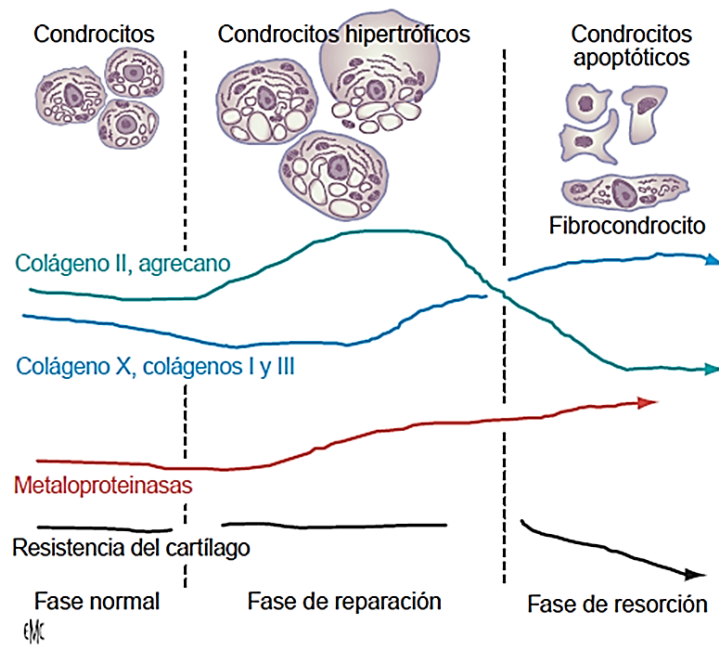


Figura 22. Evolución del fenotipo celular, proceso de síntesis y función del cartílago durante la progresión de la osteoartritis. Imagen tomada de (Chevalier, 2009).

3.4 OA en Medicina Veterinaria

La OA puede clasificarse en primaria o secundaria dependiendo de las causas de su origen. La OA primaria es producida en animales que han realizado actividad física en exceso y que el desgaste del cartílago se asocia con el envejecimiento, la edad promedio de los perros con OA primaria es de 11 años y en su mayoría están afectados bilateralmente (Telley & Smith, 1998; Brinker et al., 2016). Sin embargo, se ha señalado la existencia de cartílago envejecido sin cambios de tipo OA (Mankin, 1974). No obstante, los diversos cambios sistémicos ocurren con el envejecimiento como: la pérdida de masa muscular, aumento de la masa grasa, un estado inflamatorio de bajo grado, disminución de la producción de hormonas promotoras del crecimiento, disminución de la masa ósea y aumento de microtraumas (Loeser, 2012; Loeser, 2013).

La OA de tipo secundario, se produce como secuela post-traumática (rotura de ligamentos o daño en los meniscos) o desordenes articulares en los miembros anteriores y posteriores; de tipo congénito (displasia de cadera, luxaciones y subluxaciones del hombro y de la rótula), del desarrollo (inestabilidad, desviación angular) (Mortellaro, 2010).

En general, las razas medianas y grandes presentan una mayor incidencia de OA respecto a las razas pequeñas, ya que se ven más afectadas por las enfermedades ortopédicas primarias como la displasia de cadera (Tabla 2) (Mortellaro, 2010).

Trastorno	Razas susceptibles	Referencia
Rotura del ligamento cruzado craneal	Rottweiler, Labrador Retriever Labrador Retriever, Pastor Alemán, Golden Retriever	(Duval et al., 1999) (Whitehair et al., 1993)
Luxaciones de la rótula	Chihuahua, Pomerania, Caniche, Pequinés, Yorkshire Terrier y Pug Chow-Chow, Pastor Alemán Gran Danés, San Bernardo, Lebrél Irlandés	(Cairo, 2005) (Mele, 2007)

Tabla 2. Susceptibilidad racial en la OA secundaria de rodilla en dos trastornos implicados. Tomado de (Mele, 2007).

Además de la raza, otros factores que influyen en la OA son:

- ✓ Sexo: algunos trastornos primarios que desencadenan en OA son más prevalentes en machos, tales como; la fragmentación del proceso coronoides en el codo, que tiene una proporción 3:1 de los machos con respecto a las hembras.
- ✓ Obesidad: el exceso de peso o sobrecarga en las articulaciones es un factor que contribuye a los problemas de movilidad y progresión de la OA.
- ✓ Dieta: la sobrealimentación de los cachorros en crecimiento provoca un crecimiento más rápido, lo que aumenta a la vez la longitud del hueso y el peso corporal (Hedhammar et al., 1974).

3.5 Signos de la OA

A continuación se enumeran algunos síntomas que se observan en los individuos que padecen OA.

Claudicación. Se manifiesta de forma intermitente, es de aparición repentina o progresiva, con empeoramiento después de periodos de inactividad (temprano por la mañana), o mejoría con un corto ejercicio y reagudización después de una intensa actividad (Mortellaro, 2010).

Dolor. Ocurre con el uso de la articulación y con el descanso puede aliviarse, pero en casos avanzados, el dolor puede ocurrir con la mínima actividad o incluso estar presente durante el descanso (Brinker et al., 2016). Así que las posturas antiálgicas (posición que adopta el enfermo con el fin de evitar el dolor) son frecuentes para aliviar el dolor articular, la rigidez de la marcha, la tendencia al decúbito y la intolerancia al ejercicio (Mortellaro, 2010).

El dolor puede estar asociado con los siguientes cambios:

- Incremento de la sensibilización normal del periostio por los osteofitos marginales.
- Presión sobre la exposición del hueso subcondral.
- Microfractura de la placa subcondral y trabecular óseas.
- Pellizco o abrasión de las vellosidades sinoviales.
- Sinovitis.
- Inflamación y engrosamiento de la cápsula articular.

Rigidez. Se atribuye principalmente a los tejidos periarticulares con: edema, hipertrofia, adherencias, formación de tejido de cicatrización en músculos, ligamentos o tendones y formación de osteofitos (Brinker et al., 2016).

Crepitación. Es el sonido o vibración detectada con el movimiento de la articulación. Por lo general es asociada con la superficie articular irregular resultado de la pérdida de cartílago (Brinker et al., 2016).

3.6 Tratamiento de la OA

El tratamiento convencional de la OA se puede dividir en farmacológico, no farmacológico y quirúrgico que tienen como objetivos: aliviar el dolor, reducir la inflamación, mejorar las limitaciones funcionales, retrasar la progresión de la enfermedad y mejorar la calidad de vida. El tratamiento farmacológico se subdivide en fármacos modificadores de síntomas, como: los antiinflamatorios no esteroideos (AINES), analgésicos tópicos, opioides, infiltraciones con corticoides. Y los fármacos modificadores de la estructura o condroprotectores, como: el sulfato de glucosamina, el condroitín sulfato, la diacereína y el ácido hialurónico, que requieren de mayores estudios para la confirmación de sus efectos; En el tratamiento no farmacológico destacan: la educación sobre la enfermedad, medidas de descarga articular (ortesis), el control de peso, el control de ejercicio moderado y la fisioterapia (hidroterapia, termoterapia); El tratamiento quirúrgico está indicado en la OA con dolor intenso nocturno o en reposo y dificultad importante para la marcha. Las técnicas quirúrgicas empleadas incluyen: lavado y desbridamiento artroscópico, osteotomías (modificación de la posición o morfología ósea), artroplastia (sustitución de la articulación), artrodesis (fijación articular) e injertos autólogos de cartílago (Sociedad Española de Reumatología, 2010; Hermann et al., 2018; Houlton, 2010).

Debido a que no hay ningún tratamiento con evidencia sólida que modifique el curso de la OA, nuevos fármacos o terapias son estudiados. En este sentido, se plantea con este trabajo el uso de la oxigenación hiperbárica para el tratamiento de dicha patología.

4. Oxigenación hiperbárica (OHB)

4.1 Antecedentes históricos

Aunque las aplicaciones basadas en la tecnología hiperbárica son de reciente desarrollo, el uso de aire comprimido o hiperbárico tiene raíces muy antiguas que preceden al descubrimiento del O₂. En 1662 el físico inglés Henshaw, utilizó en el tratamiento de diversas enfermedades crónicas una cámara denominada “domicilio”, la cual funcionaba como una cámara hiperbárica e hipobárica (Simpson, 1857). Ésta terapia conocida como “baños de aire comprimido” en Europa, fue utilizada por el médico francés Junod en pacientes con enfermedades pulmonares, donde la respiración de aire en estos equipos, que podían presurizar su interior obtenían el aumento presión parcial de oxígeno (pO₂), lo cual resultó ser beneficioso pero el principio no era entendido (Subbotina, 2006).

En Inglaterra el O₂ se empleó por primera vez en la medicina por Thomas Beddoes (Beddoes & Watt, 1794). Por otro lado, el primer artículo sobre uso del aire hiperbárico fue escrito por el cirujano francés Fontaine en 1879, donde describió más de 20 procedimientos realizados en un quirófano que podía presurizarse (Fontaine, 1879).

Una de las cámaras hiperbáricas más reconocidas fue la de Orville Cunningham profesor de anestesia en la Universidad de Kansas (Cunningham, 1927). Su cámara “Hospital de bola de acero” podía presurizarse hasta a 3 atmósferas absolutas (ATA), que fue utilizada para el tratamiento de la influenza, la artritis, el glaucoma, la anemia perniciosa, la diabetes, la sífilis y ciertos tipos de cáncer (Sellers, 1965; Subbotina, 2006).

La Medicina Hiperbárica científica comienza con Paul Bert, como padre de la fisiología de la presión y John Scott Haldane, como padre de la teoría de la descompresión moderna. Ambos contribuyeron a la integración del conocimiento de la enfermedad por descompresión de los buzos para su tratamiento con OHB (Bert, 1878; Boicot 1908). Los estudios del mal de montaña o las complicaciones en los buceadores, llevaron a Bert a la conclusión de que la presión tiene un efecto químico al cambiar la proporción del O₂ en la sangre, debido a que la presión baja resulta en privación de O₂, mientras que la presión alta produce intoxicación por O₂. Así, demostró que el O₂ puede ser tóxico sobre el sistema nervioso central, este efecto es reconocido ahora como “efecto Paul Bert” (Subbotina, 2006). En 1930, las marinas de guerra y distintas universidades iniciaron los estudios con OHB para valorar su utilidad en enfermedades relacionadas con el buceo, como la embolia gaseosa arterial y la enfermedad por descompresión. Y en 1940, se amplía la investigación sobre la toxicidad del O₂ para establecer sus límites de seguridad, aspectos médicos y fisiológicos como gas comprimido (Martín, 2010).

Durante los años 30's el médico brasileño, Álvaro Osório de Almeida, contribuye con el riesgo de toxicidad de la OHB, para el tratamiento del cáncer, dada la capacidad de suministrar grandes cantidades de O₂ en la cámara hiperbárica y la sensibilidad de las células malignas a altas dosis de O₂, concluyendo que los efectos en combinación de la OHB y la radioterapia son mayores (Almeida, 1934; Almeida, 1935; Almeida, 1938).

En 1960, el cirujano cardiovascular Ite Boerema, profesor en la Universidad de Ámsterdam, considerado como “padre de la medicina hiperbárica moderna”, descubrió que se podían disolver volúmenes significativos de O₂ en el plasma bajo presión. En su publicación “vida sin sangre”, reporta como en cerdos sometidos a un intercambio de sangre por plasma o rhemacrodex con un nivel de Hemoglobina prácticamente de cero, se mantuvieron sin mostrar efectos adversos aparentes al respirar O₂ a una presión de 3ATA, viviendo por 45 minutos (Boerema et al., 1960; Subbotina, 2006). Boerema y colegas realizaban cirugías cardíacas en bebés y adultos en una sala de operaciones hiperbárica para incrementar la tolerancia del paro cardíaco (Boerema et al., 1962).

En 1976, se fundó el organismo regulador Hyperbaric Oxygen Committee, dependiente de la Undersea and Hyperbaric Medical Society, la cual revisa las nuevas investigaciones y aplicaciones clínicas para emitir recomendaciones sobre los trastornos susceptibles de ser manejados con OHB, ya sea como tratamiento primario o adjunto. Y en 1988 se fundó el organismo internacional regulador de la OHB, la International Society of Hyperbaric Medicine (Martín, 2010).

Actualmente diversos países se han desarrollado en la OHB, entre estos: Estados Unidos, México, Cuba, Panamá, Brasil, Chile, Perú, Argentina, España, Portugal, Suiza, Alemania, Italia, Francia e Inglaterra, Japón, China y Rusia (Martín, 2010).

4.2 Concepto de OHB

La OHB es un método de tratamiento de la Medicina Ortodoxa clasificada como de Ambientes Especiales en el cual un individuo se somete a presiones superiores (1.5 a 2.8 ATA) a la atmosférica a nivel del mar (1 ATA) y el paciente respira oxígeno al 100% dentro de un recipiente hermético denominado Cámara Hiperbárica (Fig. 23). Dicho recipiente está especialmente diseñado con diversos accesorios de control y protección para soportar elevadas presiones ambientales y mantener los niveles de oxígeno, con fines médicos o de investigación (Castellanos, 2017; Kindwall & Whelan, 1995).



Figura 23. Ejemplos de equipos de cámara hiperbárica para uso veterinaria en distintas especies. Imagen izquierda tomada de: <http://www.horseandman.com/medical/hbot-hyperbaric-oxygen-treatment-for-equines-heard-of-it/07/14/2010/>. Imagen derecha tomada de: <http://saintfrancisanimalhospital.org/vet-services/hyperbaric-oxygen-therapy/>

4.3 Generalidades

La presión es la suma de todas las fuerzas que actúan uniformemente sobre la superficie de un objeto. El cuerpo humano está sometido a la presión atmosférica que equivale a 1 ATA a nivel del mar o 760 mm Hg (Subbotina, 2006).

Existen dos efectos principales de la OHB y se muestran a continuación, que pueden explicarse a partir de las leyes que regulan el comportamiento de los gases y las consecuencias bioquímicas y fisiológicas de la hiperoxia (Torres et al., 2015).

El efecto mecánico volumétrico: el efecto inicial de la presurización del individuo eleva la presión hidrostática que aumenta la presión parcial de los gases y causa una reducción en el volumen de espacios llenos de gas de todas las cavidades orgánicas (vejiga urinaria, tracto digestivo, órgano de la audición, senos paranasales) siguiendo la ley de Boyle. La reducción del volumen de gas tiene una relevancia directa para tratar afecciones patológicas en las que hay burbujas de gas en el cuerpo, como la embolia gaseosa arterial y la enfermedad de descompresión (Desola, 1998; Thom, 2011).

El efecto mecánico solométrico (medición de la solubilidad): en condiciones normales de respiración, es decir bajo 21% O₂ a una presión de 1 ATA, la hemoglobina (Hb) es la vía principal de captación de O₂ para su distribución en los tejidos y en segundo lugar es el plasma que solo capta y transporta una cantidad pequeña de O₂ debido a su baja solubilidad (Cunningham & Klein, 2009). Sin embargo, la respiración en un ambiente hiperbárico incrementa la solubilidad del O₂ según la ley física de los gases de Henry que dice: a una temperatura constante, un gas en contacto con un líquido sobre el cual no ejerce acción química, es disuelto en este líquido en cantidades proporcionales a su presión parcial

(Subbotina, 2006), por lo que el aumento del volumen de O₂ disuelto y transportado por el plasma en más de 22 veces (Arteaga et al., 2011). Bajo tratamiento con OHB a 2 y 3 ATA, el O₂ disuelto en el plasma es de 3.8 y 6.8%, respectivamente y la presión arterial de oxígeno (PaO₂) es de 1400 y 2200 mm Hg (Fig. 24) (Drobnic y Turmo, 2010).

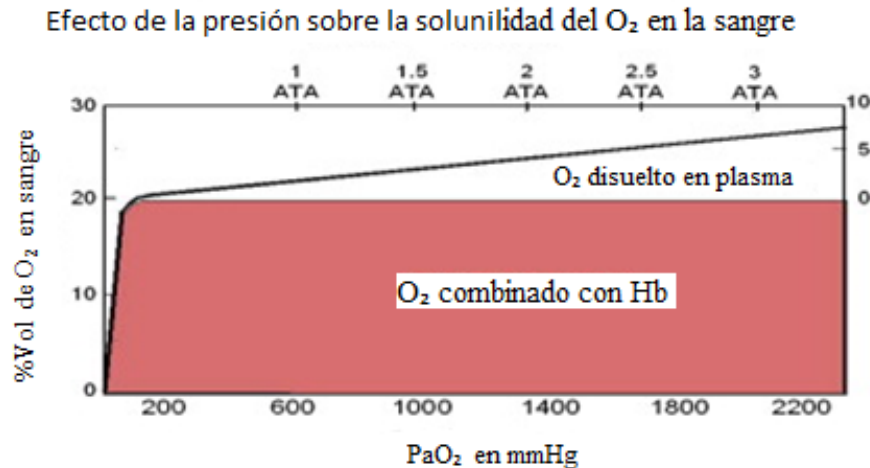


Figura 24. Incremento del porcentaje de solubilidad del O₂ en el plasma sanguíneo por efecto del incremento de la pO₂ en el ambiente hiperbárico. Tomado de (Tarun & Shweta, 2012).

4.4 Efectos terapéuticos

Son varios los efectos estudiados de la OHB además de los que superan su acción antihipóxica, como los que se muestran enseguida (Subbotina, 2006):

- Revierte el estado hipóxico, recupera la producción de energía por la célula.
- Influye sobre la contracción – dilatación de los vasos sanguíneos.
- Reduce el edema.
- Aumenta la tolerancia de la isquemia por el cerebro, disminuye la presión endocraneana.
- Reduce la frecuencia cardíaca en un 10-15%.
- Aumenta la diuresis.
- Produce un efecto hipoglucemiante.
- Controla la infección inhibiendo las bacterias anaerobias.
- Interfiere con el progreso de algunas enfermedades microbianas (mionecrosis clostridial) suprimiendo la producción de toxinas por gérmenes.
- Acelera la fagocitosis.
- Potencia la acción de algunos antibióticos.

- Modifica la farmacocinética y farmacodinámica de algunos medicamentos: diuréticos, betabloqueantes e hipoglucemiantes, etc.
- Desbloquea la hemoglobina, mioglobina y citocromo oxidasa, inactivadas por monóxido de carbono.
- Modifica la respuesta inmune del organismo.
- Modifica el efecto de los factores de crecimiento y citocinas mediante la regulación de sus niveles o de los receptores celulares para estas sustancias.
- Aumenta la producción de colágeno.
- Promueve la proliferación celular.
- Estimula la neoangiogénesis.
- Modula la producción de óxido nítrico.
- Aumenta la captación de ROS reduciendo la lesión por isquemia-reperfusión.
- Aumenta la actividad del sistema antioxidante del organismo.
- Inhibe la adhesión de los neutrófilos a los vasos sanguíneos en diferentes patologías, y manifiesta una disminución de las lesiones posteriores.
- Aumenta la sensibilidad a radio y quimioterapia de las células cancerígenas.
- Moviliza a las células madre (progenitoras) de la médula ósea.

Los hallazgos recientes apuntan a las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno como la base de los efectos de la OHB sobre la señalización, pero sus consecuencias clínicas en cualquier situación terapéutica dependerá de la dosis, el tejido y el tiempo específico de tratamiento (Sugi et al., 2015). Algunos de los procesos involucrados a estas son la movilización de células madre (Thom et al., 2006; Yu et al., 2006; Liu & Velazquez, 2008), la biogénesis mitocondrial (Gutsaeva et al., 2006), y el preacondicionamiento en la tolerancia hipóxica (Peng et al., 2008; Li et al., 2008; Yogarathnam et al., 2006).

4.5 La OHB en la Ortopedia

La terapia con OHB en la ortopedia y reumatología (Barilaro et al, 2017), se ha empleado desde hace tiempo y es reconocido su uso en los procesos hipóxicos secundarios a la radioterapia (osteonecrosis), las infecciones (ostiomielitis refractaria) o los trastornos vasculares (síndrome de Legg-Calvé-Perthes, vasculitis primaria o secundaria). Así también, en la curación de heridas, la isquemia traumática, la falta de consolidación o no unión de las fracturas, injertos comprometidos y las infecciones graves de tejidos blandos, que representan un difícil manejo y que requieren un tratamiento multidisciplinario (Leach et al., 1998; Morales et al., 2003; Tarun & Shweta, 2012; Barilaro et al, 2017).

4.6 La OHB en la investigación de los problemas del cartílago

Distintos efectos de la OHB sobre el cartílago dañado se han reconocido gracias a varios estudios. Los resultados de estos sugieren que este tratamiento puede ser efectivo para disminuir las características patológicas del cartílago articular. Como ejemplo podemos mencionar, el restablecimiento de la tensión de O₂ en el cartílago articular en un modelo de conejo con defecto osteocondral en donde la OHB incrementó la pO₂ de 11 mm Hg a 25 mmHg valores cercanos al rango basal (24.9-71.9 mmHg) en la articulación (Yuan et al., 2004; Ferrell & Najafipour, 1992). Otros efectos de la OHB en el mismo modelo de lesión osteocondral son: la disminución de los niveles séricos de queratán sulfato (indicativo de menor degradación) una mejor intensidad en la tinción con Safranina-O (proteoglicanos), la mejoría en la puntuación de distintas escalas de evaluación histológica (Sistema estándar de Salter, Escala de la Sociedad Internacional de la Reparación del Cartílago, Escala modificada para los defectos del cartílago) (Yuan et al., 2004; Yuan et al., 2009; Chen et al., 2010; Ueng et al., 2013). También de forma interesante se encontró que la OHB estimula el incremento de la proteína de choque térmico 70 (HSP70) la cual suprime la expresión de iNOS y la muerte celular por apoptosis (Yuan et al., 2004; Ueng et al., 2013). La HSP70 además se ha involucrado en el control de la síntesis de los proteoglicanos y el metabolismo del cartílago (Chen et al., 2001; Korhonen et al., 1999). Esto se resalta con el mejor mantenimiento de los proteoglicanos en el cartílago de ratas tratadas con OHB (Yuan et al., 2004; Yuan et al., 2009; Chen et al., 2010; Ueng et al., 2013).

La exposición a OHB de cultivos de condrocitos de conejo, inducidos con la citocina catabólica IL-1 β , aumentó la expresión de HSP70 a la vez que disminuyó la expresión de la iNOS y la caspasa 3 (Ueng et al., 2013). Mientras que en condrocitos humanos obtenidos de pacientes con OA avanzada la OHB disminuyó la producción de la MMP-3, e incrementó la producción del inhibidor de la metaloproteinasa tisular 1 (TIMP-1); además, disminuyó la expresión de iNOS, e incremento la expresión del agregán y el colágeno tipo II (Yuan et al., 2014).

En modelos de rata con artritis inducida por la inyección intraarticular del adyuvante completo de Freud (CFA) se demostró que la OHB mejoró la evaluación del dolor en la rodilla a la vez que disminuyó los cambios anormales en la evaluación histológica y redujo la expresión de MMP-2 y MMP-9 en el líquido sinovial (Koo et al., 2013).

De forma complementaria, se ha utilizado la OHB en la ingeniería tisular y se ha observado en los constructos de cartílago una mejora de la síntesis de glucosaminoglucanos, como en la expresión de agregano; mientras que una condición de aire hiperbárico mejoro la producción de colágeno de tipo II (Cherng et al., 2012). Posteriormente en modelos de defecto articular en conejos, las piezas de ingeniería de tejidos tratadas en condiciones hiperbáricas reiteran la mejora de su calidad, observada mediante pruebas de histoquímica y pruebas funcionales (Dai et al., 2015).

5. MARCO TEORICO

Los avances en la investigación científica y la aplicación de sus resultados en la clínica, aportan al médico los conocimientos y la disponibilidad de nuevas terapias o tecnologías. En la última década, la investigación ha considerado a la OHB en el tratamiento de algunas patologías articulares. La mayor parte de la evidencia de sus efectos benéficos se han obtenido de estudios realizados en modelos de lesión osteocondral y modelos con artritis reumatoide. En vista de sus hallazgos y más allá del restablecimiento del aporte de oxígeno en la articulación, es clara la mejoría en el proceso de reparación, la regulación de la expresión y actividad de los mediadores catabólicos y la prevención de la muerte celular programada, así como el alivio del dolor. Por lo tanto, es factible que la OHB sea un método efectivo para tratar a pacientes con OA (Nagatomo et al., 2010; Koo et al., 2013; Koo et al., 2014; Yuan et al., 2004; Yuan et al., 2009; Chen et al 2010; Ueng et al., 2013; Yuan et al., 2014).

En consideración a la falta de estudios en modelos apropiados para el mejor reconocimiento de los efectos de la OHB en la OA, en el presente trabajo se empleó un modelo de OA experimental en rata que ha sido ampliamente utilizado por el laboratorio de Patología Osteoarticular del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN (Abbud & Kouri, 2000; Rojas et al., 2015) ya que presenta las características histológicas, celulares y moleculares similares a las OA humana.

6. OBJETIVOS

General:

Analizar los efectos de la terapia de oxígeno hiperbárico en la integridad del cartílago articular durante la fase avanzada en la osteoartritis experimental en un modelo de rata Wistar.

Específicos:

En ratas control y con OA inducida, se determinará el efecto del tratamiento con OHB sobre:

1. Las características macroscópicas del cartílago articular
2. Integración y estado de los componentes celular y de la matriz extracelular
3. Expresión de los mediadores catabólicos MMP-13 e iNOS.
4. La muerte celular programada por el análisis de señal de caspasa 3 y TUNEL

7. HIPÓTESIS

Si el tratamiento con OHB modula el catabolismo del cartílago en patologías articulares entonces su aplicación en paralelo a la inducción de la OA disminuirá los cambios macroscópicos e histopatológicos característicos de la fase avanzada de la enfermedad.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

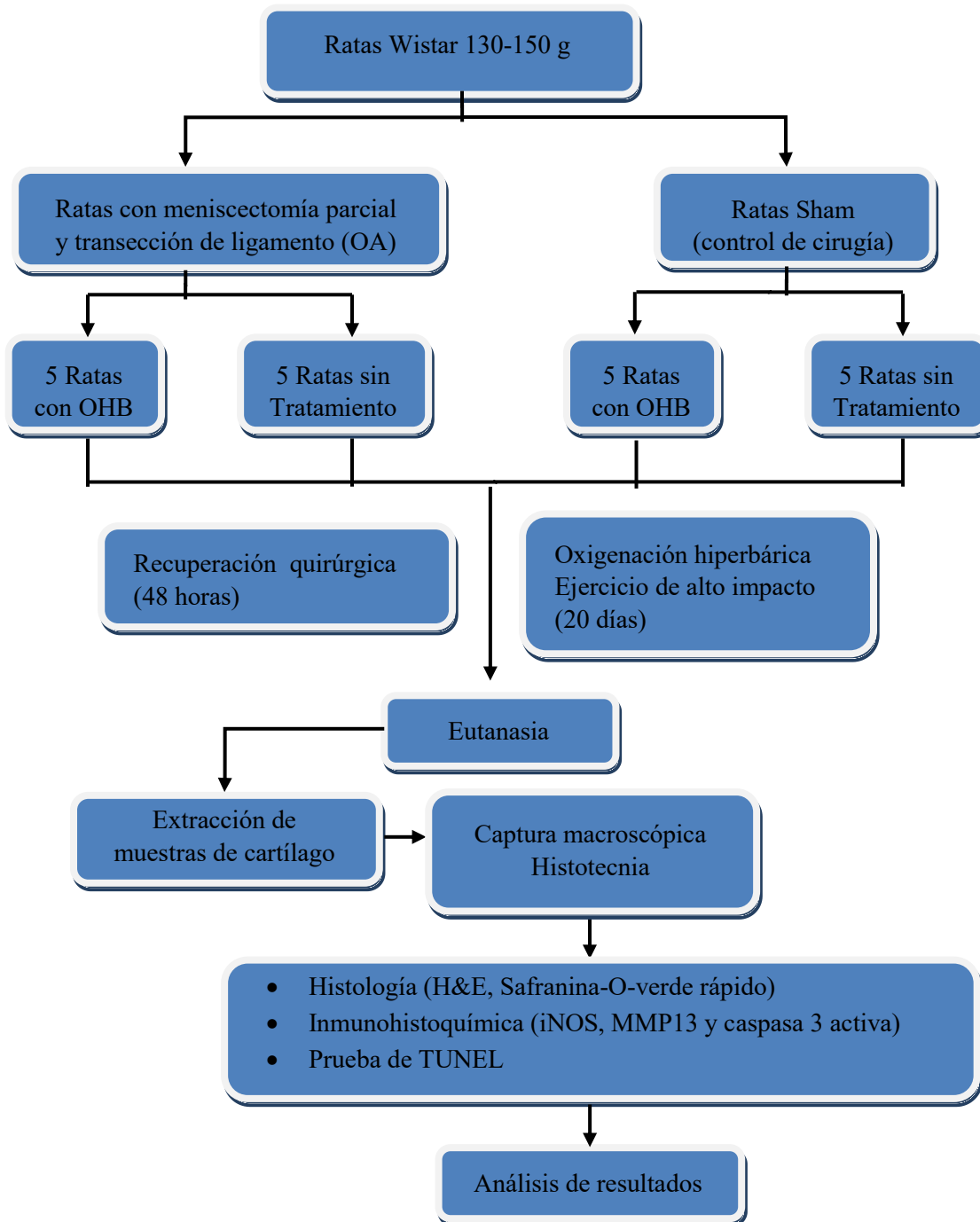


Figura 25. Esquema general de trabajo para el estudio del efecto la oxigenación hiperbárica (OHB) en el tratamiento de la osteoartritis experimental en un modelo de rata.

8.1 Animales y grupos de trabajo

Se utilizaron un total de 20 ratas macho de la especie *Rattus norvegicus* cepa Wistar, de 130-150 g de peso y con buen estado de salud. Los animales fueron proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN. Las ratas se mantuvieron en el bioterio desde su recepción, cirugía y reposo quirúrgico con alimento estándar para roedores y agua *ad libitum*, bajo condiciones de temperatura, humedad y ciclos de luz-oscuridad controlados. El protocolo fue revisado y aprobado por el comité interno para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL-CINVESTAV-IPN) que sigue los lineamientos de la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999. Después del reposo quirúrgico las ratas fueron trasladadas al laboratorio de terapia hiperbárica y se colocaron en un espacio habilitado específicamente para su mantenimiento y tratamiento, en donde se respetaron condiciones de temperatura, ciclos de luz y oscuridad, alimentación y agua. Las ratas se asignaron en 4 grupos experimentales con una n=5 cada uno y se formaron de la siguiente manera: Grupo 1: Sham o control de cirugía sin tratamiento; Grupo 2: Sham con tratamiento de OHB; Grupo 3: OA sin tratamiento; Grupo 4: OA con tratamiento de OHB.

8.1.1 Inducción de la OA

Las ratas Wistar, fueron anestesiadas por vía intraperitoneal con una solución de 0.09 ml de Clorhidrato de Ketamina (Procin[®]) y 0.02 ml de Clorhidrato de Xilazina (Anesket[®] Vet) por cada 140g de peso. Una vez anestesiadas, se posicionó el animal en decúbito dorsal y se realizó la tricotomía del área de la rodilla en la pata posterior derecha, así como el embrocado de la misma con solución Benzal. Antes de incidir, la rodilla se sostuvo en flexión para no dañar el cartílago y delimitar el sitio, por la ubicación de las siguientes referencias anatómicas: cóndilo medial, espacio articular y la meseta tibial a través de la palpación y observación. Posteriormente, bajo condiciones de asepsia, se realizó una incisión antero medial en la región medial de la rodilla, paralela al eje longitudinal (parapatelar). Se disecaron los tejidos blandos como masa muscular y cápsula articular hasta exponer e identificar el ligamento colateral medial, el cual se seccionó perpendicularmente al eje longitudinal de la extremidad. Posteriormente, el menisco fue separado cuidadosamente del cóndilo medial y la meseta tibial con una hoja de bisturí. Una vez separado se ensartó la punta roma de la aguja curva de una sutura quirúrgica hasta atravesar el menisco y se tiró suavemente de su lugar hacia arriba, para sostenerse mediante una pinza de Halsted curva y así poder seccionarlo con una hoja de bisturí número 12, (Fig. 26). Finalmente se aplicó un toque con solución de Benzal en la cavidad articular y se procedió a suturar la piel mediante un patrón discontinuo con 2 o 3 puntos simples con sutura de seda negra número 4-0. Después de la cirugía las ratas se mantuvieron durante un periodo de recuperación de 48 horas dentro de sus cajas para racks

ventilados en el bioterio en donde se movían libremente. Las ratas sometidas a este proceso fueron consideradas con OA inducida (Abbud & Kouri, 2000).

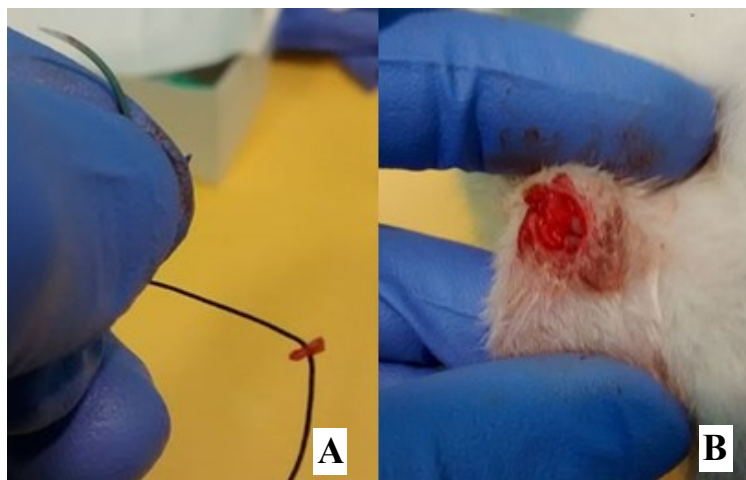


Figura 26. Menisco interno extraído en la menisectomía parcial en el modelo de OA en rata(A). Perdida de la congruencia articular entre el cóndilo femoral interno y el plato tibial (B).

8.1.2 Estrés mecánico postraumático

Después de la recuperación quirúrgica, todos los animales se sometieron a ejercicio de alto impacto, que comprendió tres series de movimientos que se realizaron diariamente dentro de una caja de plástico con una duración aproximada de 15-20 minutos, durante 20 días. Para el primer ejercicio se realizaron deslizamientos laterales de izquierda a derecha durante 2 minutos, enseguida se realizaron saltos pequeños durante 1 minuto, y por último 10 saltos largos para cada animal para los cuales se sujetaron las ratas y se dejaron caer dentro de la caja desde una altura de 30 cm (Abbud & Kouri, 2000).

8.1.3 Control cirugía o modelo Sham

La cirugía Sham se define como el procedimiento que se lleva a cabo como un control y que es similar a la cirugía normal, pero omite un elemento clave del procedimiento objeto de la investigación. Para nuestro modelo Sham, se omitió la extracción del menisco y la escisión del ligamento colateral, solo se realizó la capsulotomía medial de la rodilla derecha hasta visualizar el menisco, después se colocó un toque de solución de Benzal en la cavidad articular y se procedió al cierre de la herida con una sutura. De igual modo que los grupos OA inducidos, los individuos Sham se mantuvieron bajo 48 horas de reposo quirúrgico y posteriormente se sometieron al mismo régimen de ejercicios.

8.2 Administración de la OHB

Después del ejercicio, todos los animales fueron colocados en una caja de acrílico con divisiones para cada individuo, que se acomodó en el interior de una cámara hiperbárica especialmente diseñada para este experimento (Fig. 27 y 28). Las características de este equipo se describen en el Anexo I.

Las condiciones en el régimen de respiración fueron distintas para los grupos tratados con OHB respecto a los grupos control. En los grupos tratados se presurizó con O_2 hasta llegar a una concentración de 98% O_2 y una presión de 2.5 ATA generadas en el interior de la cámara hiperbárica, mismas que son determinantes en la dosificación del O_2 . Mientras que los grupos control con el fin de simular la condición de estrés (presurización y tiempo en la cámara) se sometieron a un tratamiento simulado en la cámara hiperbárica, que consistió en la respiración de 21% O_2 en el aire pero a una presión atmosférica de 1 ATA (Tabla 3).



Figura 27. Vista externa de la cámara hiperbárica empleada para este presente trabajo.

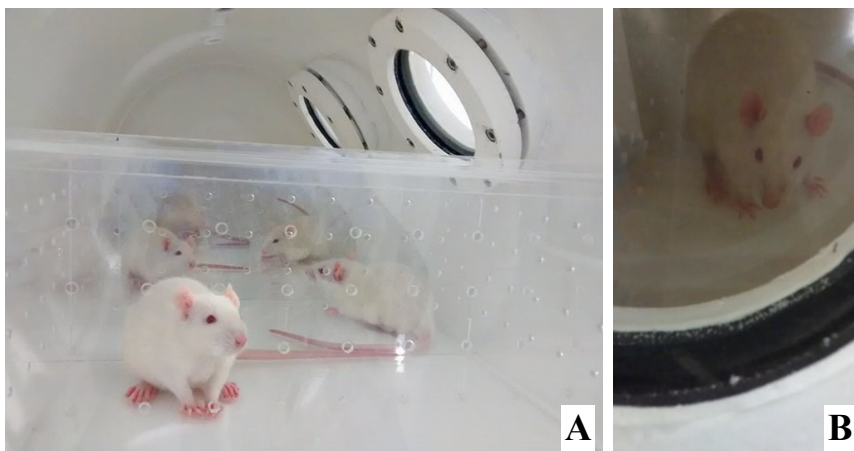


Figura 28. Vista del interior de la cámara hiperbárica, donde se muestra la colocación individual de las ratas en una caja de acrílico (A). Observación de la rata a través de una de las mirillas durante el tratamiento con OHB (B).

	Régimen de tratamiento con OHB	Régimen de tratamiento simulado
Total de exposiciones	20 sesiones	20 sesiones
Frecuencia	1 sesión/día	1 sesión/día
Tiempo de presurización:	20 min	5 min
Tiempo de isopresión:	60 min	60 min
Tiempo de descompresión	20 min	5 min
Saturación de oxígeno	97-98% O ₂	20-21% O ₂
Presión absoluta	2.5 ATA	1 ATA

Tabla 3. Régimen de respiración en el tratamiento de oxigenación hiperbárica para los grupos experimentales Sham y OA inducidos.

8.3 Eutanasia

Todos los animales fueron sacrificados al siguiente día del término del periodo de 20 días de tratamiento/ejercicio mediante la administración por vía intraperitoneal de 0.8ml de pentobarbital sódico (Pentobarbital®) siguiendo el protocolo establecido y en acuerdo a la norma NOM-062-ZOO-1999.

8.4 Toma del cartílago articular

En seguida del sacrificio se extrajo la articulación completa de la rodilla para facilitar la manipulación, y obtener la pieza de cartílago articular sobre el cóndilo femoral medial. Para esto, se dislocó la cadera con un movimiento de abertura, posteriormente se expuso la articulación al realizar un corte único con una tijera sobre la piel de la rodilla con la articulación flexionada. Después con unas tijeras pequeñas se retiró la mayor cantidad de tejido muscular circundante de la rodilla. Una vez observado las diáfisis del fémur y la tibia

se realizó un corte transverso con unas tijeras, para poder extraer la articulación completa, enseguida se retiró la rótula recorriendo el bisturí sobre la superficie anterior del fémur hasta incidir sobre la capsula articular. Una vez expuesta la cavidad articular se tomaron las precauciones para no dañar la superficie del cartílago con el bisturí. Para evitar la deshidratación, la articulación se sumergió continuamente en solución amortiguadora de fosfatos (PBS, Phosphate Buffered Saline) (Anexo II). Se continuó con la transección de los ligamentos (colateral lateral, cruzado anterior, cruzado posterior) para separar por completo la tibia del fémur. Finalmente, las piezas obtenidas se mantuvieron en un tubo Falcon de 50ml con solución preparada de paraformaldehído al 4% (Anexo III) (Fig. 29) dentro de un recipiente con hielo para mantener una temperatura cercana a los 4°C. Las muestras fijadas se trasladaron al laboratorio para la toma de fotografías macroscópicas y su procesamiento.



Figura 29. Muestras recuperadas de fémur de rata embebidas en paraformaldehído.

8.4.1 Análisis macroscópico

Para la observación y comparación de los cambios macroscópicos entre el cartílago sano y el cartílago OA con y sin tratamiento de OHB, se tomaron imágenes de la superficie articular de las muestras obtenidas mediante un microscopio estereoscópico (Leica EZ4D).

8.4.2 Análisis de imágenes

Mediante el programa informático de análisis digital “image J, <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>, recomendado por el ámbito de las ciencias de la salud (Sánchez, 2014), se obtuvieron valores cuantitativos al medir el área del cóndilo medial y la extensión de la lesión en el cartílago para cada individuo. Previamente el

programa se calibró con la barra de una escala con la distancia conocida para cambiar los pixeles generados, por medidas de longitud para cada imagen generada.

8.5 Histotecnica o preparación de tejidos para microscopia óptica

A continuación se describen los fundamentos y la secuencia de los procesos técnicos que se siguieron para la preparación histológica del cartílago articular a partir de las muestras de los fémures colectados, mismos que se utilizaron para la observación microscópica y el análisis histopatológico.

8.5.1 Fijación

La fijación es un procedimiento cuya finalidad es mantener el tejido en su estado natural, evitar su desintegración o su autólisis post mortem, manteniendo la integridad del tejido, además de endurecer el material y así conseguir una mejor capacidad de corte (Welsch, 2013; Montalvo, 2010).

Las articulaciones obtenidas se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS (Fig. 29) durante una noche (12h) a 4°C. Transcurrido el periodo de fijación, las muestras se lavaron tres veces con PBS con agitación durante 10 minutos a 4°C.

8.5.2 Descalcificación

Posteriormente las muestras se descalcificaron, con una solución quelante de EDTA 0.5M pH 7.4 (Anexo IV) durante 2 días en agitación continua a 4°C en una cámara fría. Al término del proceso de descalcificación, sobre una caja Petri con solución PBS se realizó un corte con una navaja para eliminar el exceso de hueso subcondral y mantener el cartílago del cóndilo medial (Fig. 30).

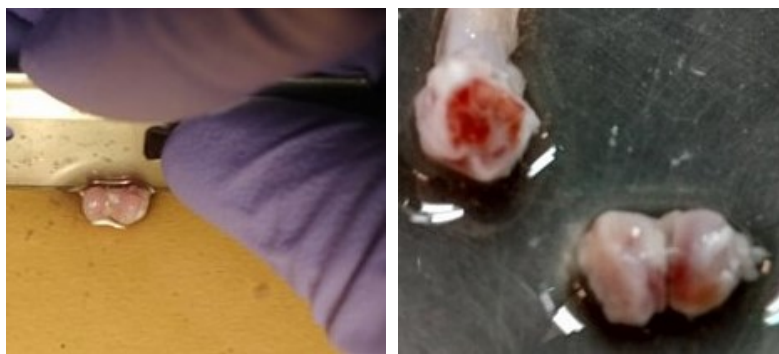


Figura 30. Separación del cartílago del resto del hueso.

8.5.3 Crioprotección

Para evitar la formación de cristales de hielo durante el congelamiento que dañen la morfología celular, los cóndilos se crio protegieron al incubarse por una noche a 4°C en una solución de sacarosa al 10% en PBS (Anexo V).

(<http://www.abcam.com/webinars/introduction-to-immunohistochemistry-webinar>).

8.5.4 Inclusión en medio de congelamiento

El propósito de la inclusión de un tejido mediante la infiltración con sustancias “de inclusión” es que el tejido fijado obtenga cierta dureza para que al cortarlo se produzcan secciones o láminas delgadas y transparentes.

Para realizar la inclusión en el medio de congelamiento (Tissue Freezing Medium® de la marca Leica), los cóndilos son colocados sobre un corcho (1x1 cm aprox.) orientados de acuerdo al plano de corte al mismo tiempo que la muestra es cubierta completamente con medio de congelación. Todo esto se realizó dentro de una caja de unicel que contenía hielo seco para facilitar la congelación de las muestras (Fig. 31).

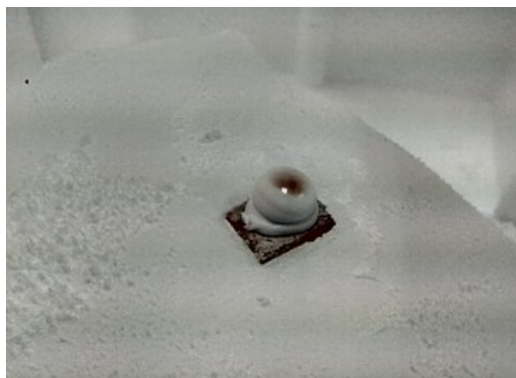


Figura 31. Muestra de cartílago incluida en medio para criocortes.

8.5.5 Criocortes

Para la toma de secciones histológicas de cartílago se empleó el método de criocortes, ya que se evita la extracción del agua (deshidratación), que se asocia con la retracción del tejido. Así, muchos componentes moleculares de los tejidos se mantienen en su configuración natural y luego pueden demostrarse con métodos histoquímicos (Welsch, 2013).

A partir de las muestras incluidas y congeladas se obtuvieron criocortes de 8 µm de grosor, en un criostato (Leica CM1100) mantenido a una temperatura de -21°C. Los cortes obtenidos se adhirieron en portaobjetos gelatinizados (Anexo VI) (Fig.32), y se

almacenaron en un congelador para su conservación hasta su posterior análisis histopatológico.

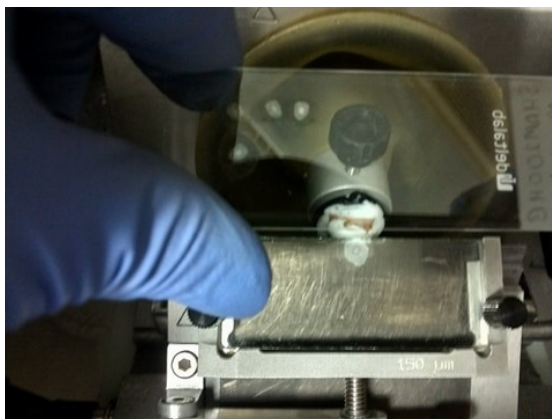


Figura 32. Toma de cortes de una muestra de cartílago en el criostato.

8.6 Estudio histopatológico

Por tinciones histológicas se estudiaron las características celulares (tipo, densidad, disposición y localización celular) y estructurales (organización de los componentes de la MEC) del cartílago. Por inmunohistoquímica se detectaron algunos mediadores biológicos involucrados en el proceso catabólico en la OA.

8.6.1 Métodos de tinción

El procedimiento de tinción permite que los diversos elementos celulares y tisulares capten los colores con afinidad variable lo que facilita la observación de tejidos al microscopio para el reconocimiento de las células y otras estructuras (Montalvo, 2010).

Tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E)

La técnica de tinción con H&E es utilizada de rutina en el estudio microscópico de las células y tejidos (Montalvo, 2010; Welsch, 2013). La Hematoxilina es un colorante básico que reacciona con los grupos aniónicos de los componentes de los tejidos, como los grupos fosfato ionizados (PO_3^-) de la heterocromatina, nucléolos, ácidos nucleicos y la MEC del cartílago. La Eosina debido a su carácter ácido reacciona con los grupos catiónicos de los componentes del tejido, por medio de enlaces electroestáticos como son los grupos amino

ionizados (NH₄⁺) del citoplasma, filamentos citoplasmáticos y fibras extracelulares. La apreciación de los núcleos mediante la hematoxilina es de una coloración azul, azul morado, violeta, mientras que el citoplasma y el material extracelular con la eosina presentan diversos grados de color rosado (Montalvo, 2010).

El procedimiento completo en los pasos del tren de tinción, así como de sus tiempos en los distintos pasos se describen al final de este trabajo (Anexo VII).

Tinción con Safranina-O-verde rápido

La safranina O es un colorante cargado positivamente (catión) por lo que es capaz de combinarse con elementos celulares de cargas negativas. Este colorante también se ha convertido en una guía básica en la identificación de procesos degenerativos como la OA, debido a que la safranina O se une por cargas a los grupos carboxilo y a los grupos sulfato (ambos con carga negativa) de los glucosaminoglucanos, los cuales abundan en la MEC del cartílago articular (Aguirre, 2012).

De igual forma el procedimiento completo se describen al final de este trabajo (Anexo VIII).

8.6.2 Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es una técnica que permite la detección y localización de proteínas celulares. En el presente trabajo ésta técnica se empleó de forma indirecta con el sistema de complejo avidina-biotina (ABC) para la detección de las siguientes proteínas sobre los tejidos de cartílago mediante anticuerpos específicos: la metaloproteinasa de la matriz 13 (MMP-13) a través del anticuerpo anti-MMP-13 (200µg/ml, dilución 1:80, Santa Cruz Biotechnology), la enzima óxido nítrico sintetasa en su isoforma inducible (iNOS) con anti-iNOs (0.052 mg/ml, dilución 1:60, abcam) y por último, el marcador de muerte celular caspasa 3 en su forma ejecutora o activa mediante la anti-caspasa-3 (0.2 mg/ml, dilución 1:60, Merck).

El método de detección ABC, se fundamenta en la gran afinidad de la avidina por la biotina, unida covalentemente al anticuerpo secundario (hasta 150 moléculas de biotina por anticuerpo). Así, al anticuerpo primario ligado a su antígeno se le une el anticuerpo secundario biotinilado, y a éste se le une la avidina marcada con un trazador enzimático, como la peroxidasa de rabano, que al llevar a cabo su actividad enzimática con el sustrato H₂O₂ y el cromógeno 3,3'.diaminobencidina (DAB) genera un precipitado visible de color marrón (Blanco et al., 2007).

Los pasos del procedimiento de inmunohistoquímica indirecta se describen en el Anexo IX.

Análisis de imagen para inmunohistoquímica

A través de una cámara digital acoplada al microscopio óptico (Leica DMLS), se capturaron 3 imágenes de la zona central del cartílago para cada muestra de los distintos grupos experimentales. Cada imagen digital fue almacenada en formato TIFF para mantener la resolución. Las imágenes fueron procesadas con el programa image J, para separar digitalmente los tres canales de la imagen. En el canal verde se obtuvo la mejor relación señal/ruido de la señal positiva del inmunomarcaje para los mediadores catabólicos MMP-13, iNOS y caspasa 3 activa en el cartílago articular de los distintos grupos experimentales. Con el ajuste del umbral de los píxeles a medir se obtuvo el valor de densidad integrada, los píxeles se dividieron por el área total de la imagen para obtener los valores en unidades arbitrarias de la expresión relativa de la proteína.

8.6.3 Prueba de TUNEL

TUNEL (en inglés: transferase-mediated dUTP nick endlabeling) es un método utilizado para la detección de muerte celular al marcar, en células individuales, el ADN degradado. Una enzima deoxiuridina trifosfato (transferasa terminal) adiciona nucleótidos marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) a los extremos 3' del ADN. La señal fluorescente es detectada en un microscopio de epifluorescencia utilizando los filtros para FITC (488-650 nm) y DAPI (370-600 nm). Los núcleos de los condrocitos se observaron en azul mientras que los núcleos TUNEL positivos se observaron en color verde (Alfaro et al, 2000; Gavrieli et al., 1992).

Análisis de imagen TUNEL

Con una cámara digital AxioCam MRm acoplada al microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axio Scope A1), se capturaron 3 imágenes de la zona central del cartílago de uno de los cuatro animales para cada grupo OA. Las imágenes se almacenaron en formato TIFF y se procesaron con la función de conteo de partículas del programa image J para la obtención del porcentaje de muerte celular.

Microfotografía Confocal

Para detallar los hallazgos de muerte celular, se capturaron imágenes de las muestras representativas de los grupos OA procesadas para TUNEL en un microscopio confocal (Zeiss LSM 700), el cual permitió el incremento del contraste y la obtención de imágenes tridimensionales de alta precisión mediante la separación de las señales de fluorescencia por excitación láser selectiva.

8.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó con el software Prism v6.01 (GraphPad Software, Inc. 2012).

Con las mediciones obtenidas del análisis de imagen del área de los cóndilos y la extensión de la lesión de los grupos OA, se evaluaron las diferencias entre las medias y se aplicó una prueba t para las medias de dos muestras emparejadas. En todos los casos, valores de $p \leq 0.01$ se consideraron estadísticamente significativos. Se construyeron gráficos de columnas y barras de error, basados en la media y la variabilidad de los datos.

Con los datos obtenidos del análisis de imagen a partir de la inmunohistoquímica para los marcadores MMP-13, iNOS y caspasa 3 activa se construyeron matrices considerando todos los grupos. Debido al tamaño pequeño de la muestra, los datos se sometieron a un análisis de varianza con procedimientos estadísticos no paramétricos, por la prueba de Kruskal-Wallis. Para las comparaciones múltiples entre los grupos Sham y OA con y sin tratamiento se utilizaron pruebas de Dunn's. Nuevamente la obtención de valores $p \leq 0.01$ se consideraron estadísticamente significativos, mientras que los datos se graficaron en cajas y bigotes estándar para mostrar los valores mínimos y máximos.

Para la estimación del porcentaje de muerte celular en la prueba de TUNEL de los grupos OA, se confeccionaron matrices con el número total de condrocitos contados en DAPI (100%) y el número de condrocitos TUNEL positivos contados en FITC, de los cuales se calculó el porcentaje de muerte celular mediante regla de tres (condrocitos TUNEL positivos $\times 100$ / condrocitos totales) y se obtuvo el valor promedio de cada grupo OA y los valores de error por la desviación estándar.

9. RESULTADOS

Análisis macroscópico

Al observar macroscópicamente los cóndilos mediales, fue evidente que la cirugía Sham no tuvo efecto en la estructura del cartílago articular, ya que mostró una superficie lisa e intacta, con el brillo y coloración característica de un tejido sano (Fig. 33 A). El tratamiento con OHB no afectó la estructura del cartílago articular de las ratas con cirugía Sham ya que no presentó diferencias cuando se comparó con el grupo no tratado (Fig. 33 B).

En los grupos con OA inducida, fue claro el daño al cartílago articular ya que se observaron las características macroscópicas típicas de la OA avanzada, ya descritas para este modelo de estudio (Abbud & Kouri, 2000; Castillo et al., 2012). En los grupos OA el cartílago mostró una apariencia física alterada con una superficie irregular, opaca y rugosa con un engrosamiento hacia los márgenes. (Fig. 33 C). Comparado al grupo OA no tratado, el grupo OA que recibió tratamiento con OHB, mostró una ligera mejoría en la apariencia física macroscópica y una lesión más focalizada (Fig. 33 D).

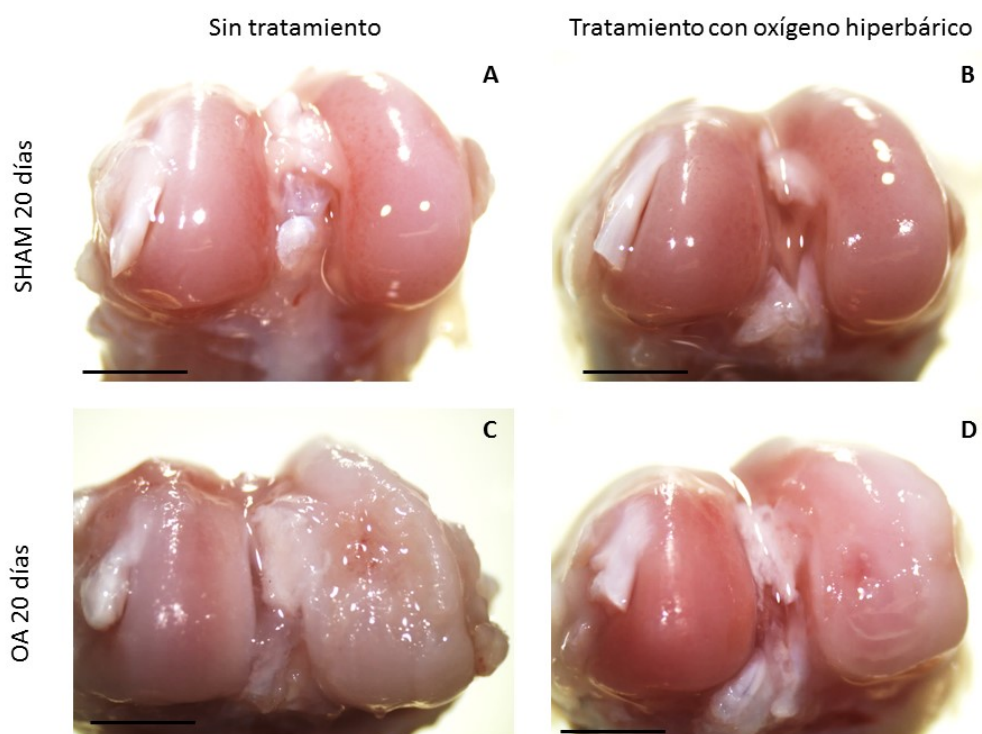
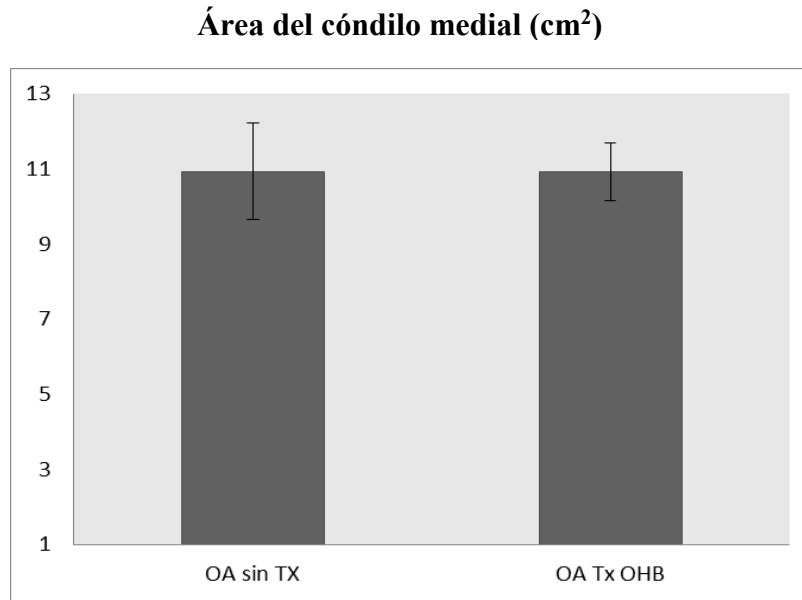


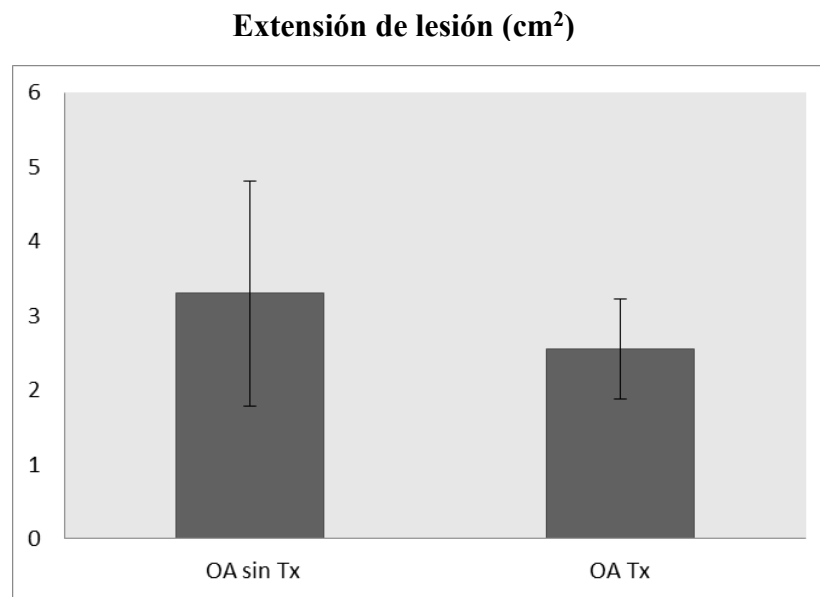
Figura 33. Apariencia macroscópica general del cartílago articular de los cóndilos femorales mediales de rata en los distintos grupos. Magnificación 12.5x; Barra de escala: 2 mm.

Para determinar si el tratamiento con OHB modifica la hipertrofia de los cóndilos con OA, se midió el área total de estos (Anexo XI). Los valores promedio del área de los cóndilos para ambos grupos no revelaron ningún cambio estadísticamente significativo (Gráfica 1).



Gráfica 1. Medidas del área de cartílago del cóndilo medial en el modelo OA inducido con y sin tratamiento. Los datos se expresaron como media \pm DE de cinco ratas de cada grupo; no hay una diferencia estadísticamente significativa en la prueba de t pareada ($P= 0.988$).Tx=tratamiento, OHB=oxigenación hiperbárica.

De la misma forma se obtuvieron las medidas de la extensión de la lesión, para evaluar si el tratamiento modificó su dimensión en la progresión de la OA (Anexo XI). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas, pero si se observó una tendencia hacia la disminución de la extensión de la lesión para el grupo OA tratado con OHB, cuando se comparó con el área de los grupos OA no tratados (2.54 mm² vs 3.29 mm² respectivamente) (Gráfica 2).



Gráfica 2. Medidas del área de la lesión del cartilago de los grupos OA con y sin tratamiento (OHB). Los datos se expresaron como media \pm DE de cinco ratas de cada grupo; no hay una diferencia estadísticamente significativa en la prueba t pareada (P= 0.453).

Análisis histopatológico

Comparado al cartílago articular de las ratas Sham no tratadas, no se observó ningún cambio en la celularidad del tejido al recibir el tratamiento de OHB. Así, en ambos grupos la estructura de este tejido se mostró íntegra con una superficie continua e intacta; además, la morfología, organización y densidad de los condrocitos no se modificó, lo que indica que ni la cirugía Sham ni el tratamiento con OHB afectan la integridad del cartílago articular (Fig. 34 A y B). Sin embargo, y comparado a los grupos Sham, la meniscectomía parcial y la disección del ligamento colateral medial generaron cambios en el cartílago articular característicos de la OA avanzada, ya descritos para este modelo animal. Se observó una superficie del cartílago discontinua y lesionada (fibrilación y erosión), junto con una pérdida de los condrocitos de morfología fusiforme de la zona superficial, y una desorganización celular en las zonas media y profunda del cartílago (Fig. 34 C). Aunque no se observan en la figura, también se detectaron los agrupamientos (clusters) de condrocitos que son una característica histológica típica del cartílago OA. Interessantemente, el tratamiento con OHB en las ratas con OA permitió una mejoría apreciable ya que se observó menor daño de la superficie del cartílago así como una mayor preservación de los condrocitos en esta misma zona en comparación con el cartílago sin tratamiento (Fig.34 D).

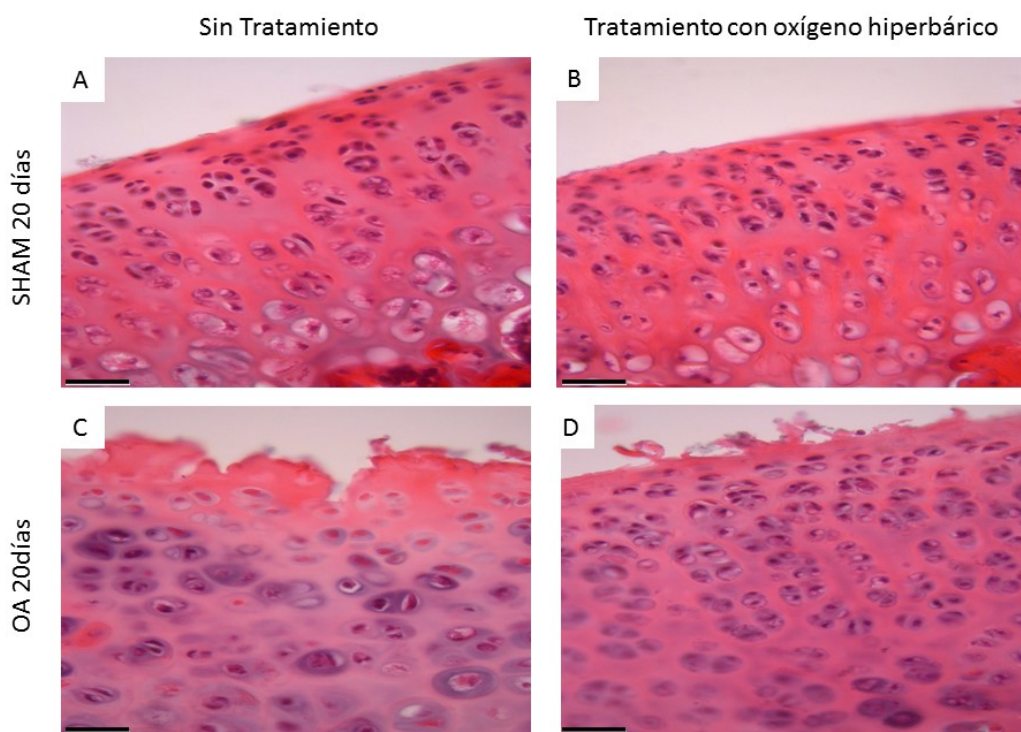


Figura 34. Tinción H&E en muestras de cartílago articular sano y OA inducido de rata para la observación del efecto del tratamiento con OHB en el componente celular. Magnificación 40x; Barra de escala: 50 μ m.

Para evaluar si el tratamiento con OHB modifica el contenido de proteoglicanos de la MEC del cartílago articular, realizamos tinciones con Safranina-O-verde rápido. Las muestras del cartílago articular de las ratas Sham con y sin tratamiento OHB mostraron una coloración roja-naranja intensa que indicó un contenido normal de proteoglicanos en todo el grosor del tejido, por lo que ni la cirugía Sham ni el tratamiento con OA afectó el contenido de proteoglicanos del cartílago (Fig. 35 A y B). Por el contrario, en el cartílago del grupo OA sin tratamiento, fue evidente una pérdida en la coloración roja-naranja en la superficie del tejido, que indica la degradación de los proteoglicanos, característico de la OA (Fig. 35 C). Sin embargo, en el cartílago OA de ratas tratadas con OHB, la degradación de los proteoglicanos fue mucho menor ya que se observó la coloración roja-naranja en todo el tejido (Fig. 35 D). Estos resultados sugieren que el tratamiento con OHB disminuyó la degradación de los proteoglicanos o bien aumentó su biosíntesis.

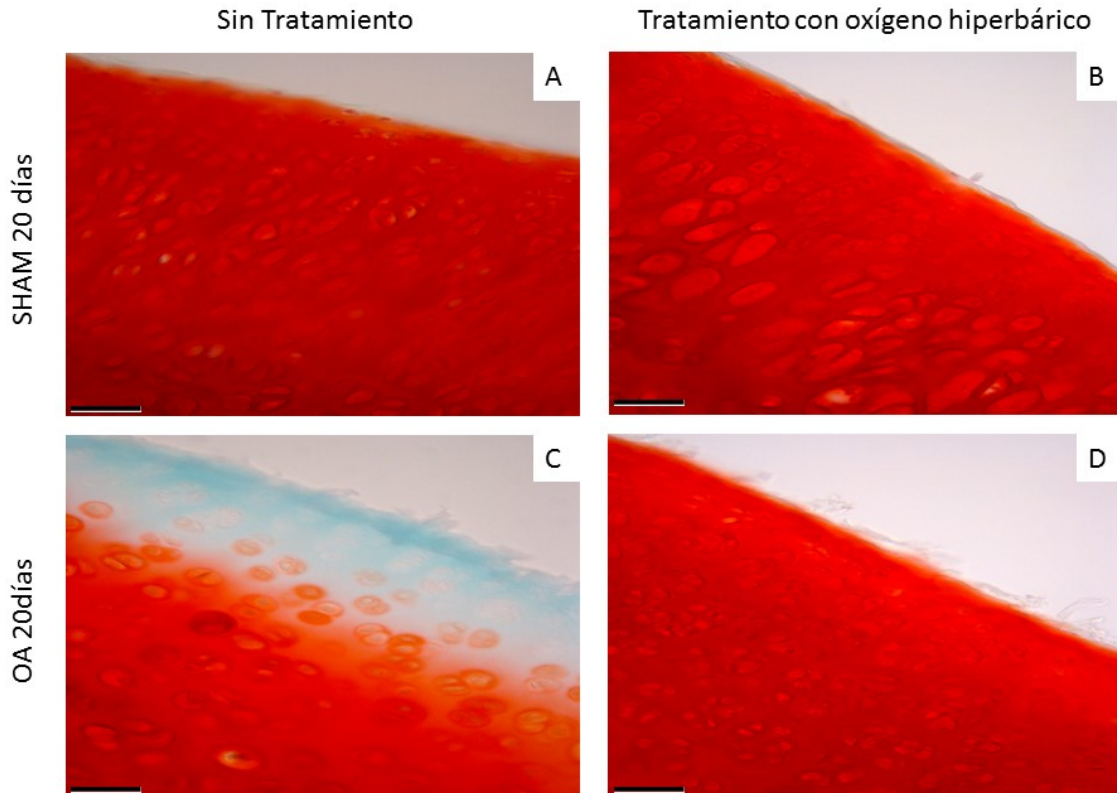


Figura 35. Tinción Safranina-O-verde rápido de cartílago de rata para la observación del efecto de la OHB en la conservación del componente proteoglicano de la MEC. Magnificación 40x; Barra de escala: 50 μ m.

Análisis de elementos catabólicos

Metaloproteinasa de la matriz 13 (MMP-13)

Para evaluar el efecto de la OHB sobre la expresión de una de las enzimas que degradan la MEC del cartílago articular realizamos ensayos de inmunohistoquímica para detectar MMP-13. En el cartílago articular de las ratas Sham con y sin tratamiento se observó una marca positiva distribuida sobre los condrocitos de todo el grosor del tejido (Fig. 36 A y B), esta respuesta en la expresión de MMP-13 se mantuvo con la misma distribución en los grupos OA aún bajo tratamiento con OHB (Fig. 36 C y D). El análisis de los píxeles de la señal obtenida muestran que no hay diferencias en la expresión relativa entre ambos grupos Sham (Fig. 36 E). Un estudio previo ha mostrado que el ejercicio de alto impacto induce la expresión de mediadores catabólicos (Rojas et al., 2015) sin afectar la integridad del cartílago articular. Por lo que la sobreexpresión de MMP-13 detectada en el cartílago Sham puede estar asociada con el ejercicio. Sorprendentemente en el cartílago articular de los grupos OA con y sin tratamiento OHB, se encontró una disminución en la expresión de MMP-13. Esta disminución fue solo significativa entre los grupos Sham no tratados y OA no tratados pero no entre los grupos Sham OHB y OA OHB (Fig. 36 C y E). Esta disminución en la expresión en los grupos OA puede estar asociada a la pérdida de la celularidad del tejido.

Los valores de la densidad integrada para la señal inmunohistoquímica utilizados para la graficación del análisis estadístico se encuentran en el Anexo XII.

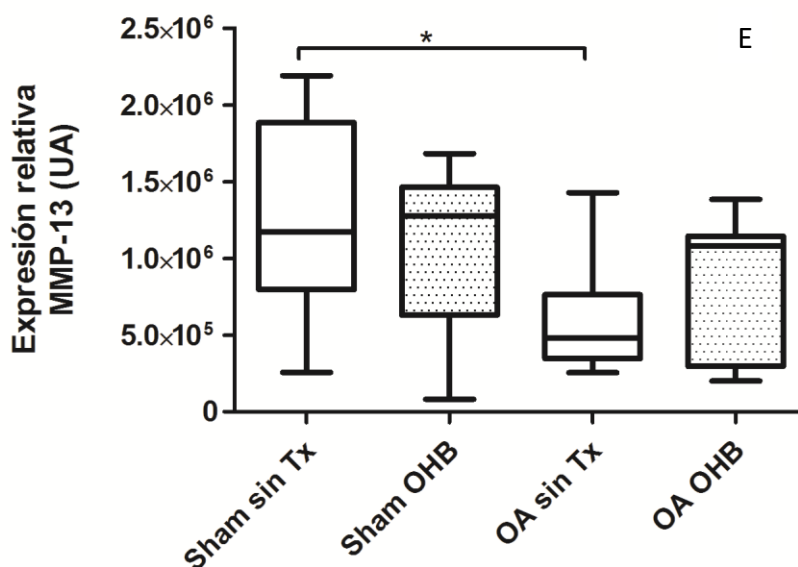
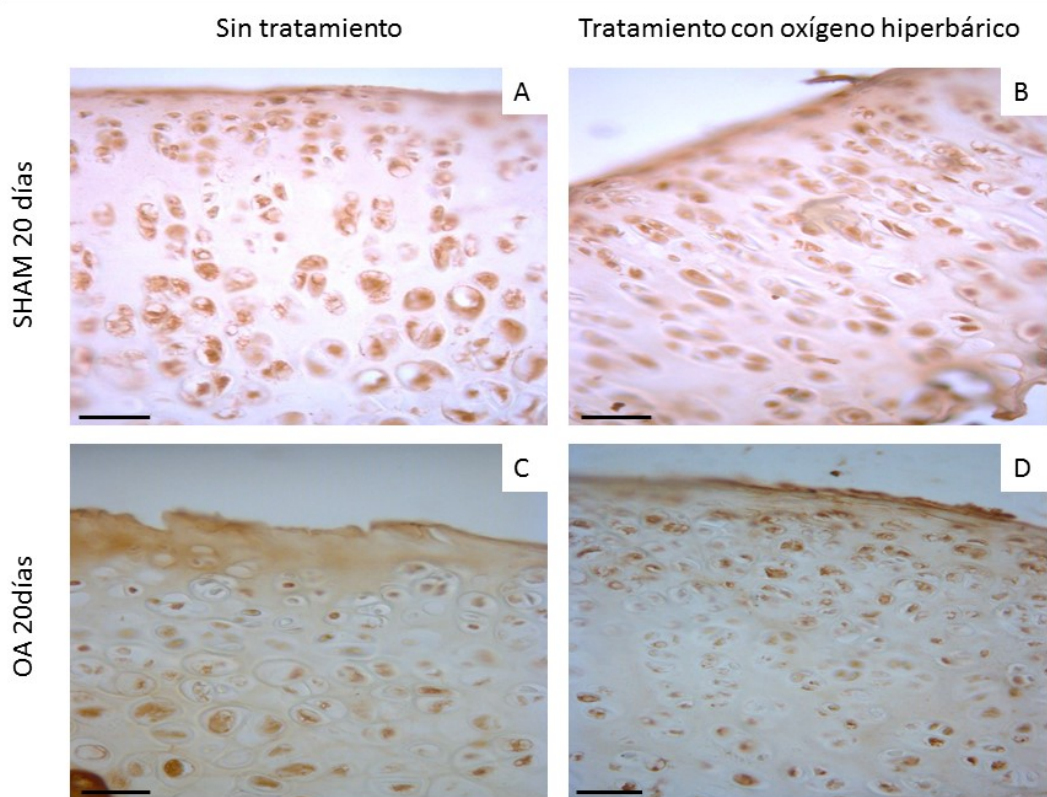


Figura 36. Marca inmunohistoquímica específica para MMP-13 en el cartílago articular de rata para la determinación de su expresión en respuesta al tratamiento de OHB. Magnificación 40x; Barra de escala: 50µm. Representación gráfica de la marca positiva para la MMP-13 en el análisis de imágenes. Valor estadísticamente significativo *(p <0.05).

Óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS)

Para evaluar el efecto de la OHB sobre la expresión de iNOS, que es mediador importante de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), realizamos experimentos de inmunohistoquímica. En el cartílago articular de las ratas Sham con y sin tratamiento de OHB se observó señal positiva a lo largo de la zona superficial y zona media, que disminuyó en la zona profunda del cartílago (Fig. 37 A, B). Inesperadamente en el cartílago OA la expresión de iNOS fue casi ausente en todo el tejido (Fig. 37 C, D), y solo se detectó ocasionalmente en algunas muestras de estos grupos (Fig. 37 E, F). En el análisis de los píxeles de la señal obtenida, en el cartílago de ratas Sham no se observaron cambios en la expresión relativa de la iNOS bajo el tratamiento de OHB. Comparado a los grupos Sham la expresión relativa de iNOS en los grupos OA con y sin tratamiento fue menor (Fig. 37 E). Diferentes estudios han demostrado que la sobrecarga mecánica crónica induce una alta producción de NO (Brandt, 2003; Smith et al., 2004), esto sugiere indirectamente que el ejercicio de alto impacto induce la expresión de iNOS. Sin embargo, en el cartílago de los grupos OA con y sin tratamiento esta respuesta fue suprimida, por lo tanto no se pudo detectar un efecto de la OHB en la expresión de iNOS (Fig. 37 E).

Los valores de la densidad integrada para la señal inmunohistoquímica utilizados para la graficación del análisis estadístico se encuentran en el Anexo XII.

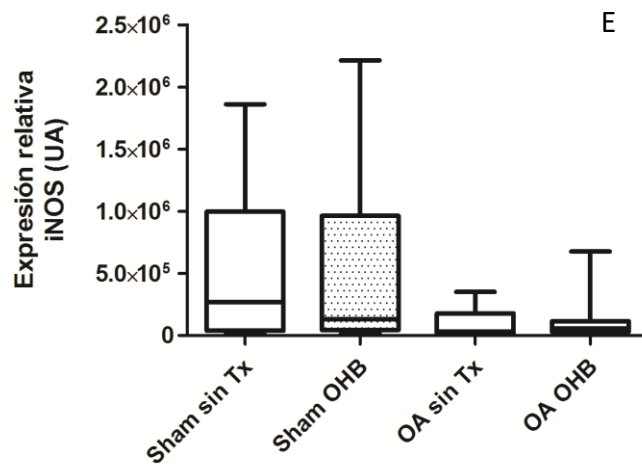
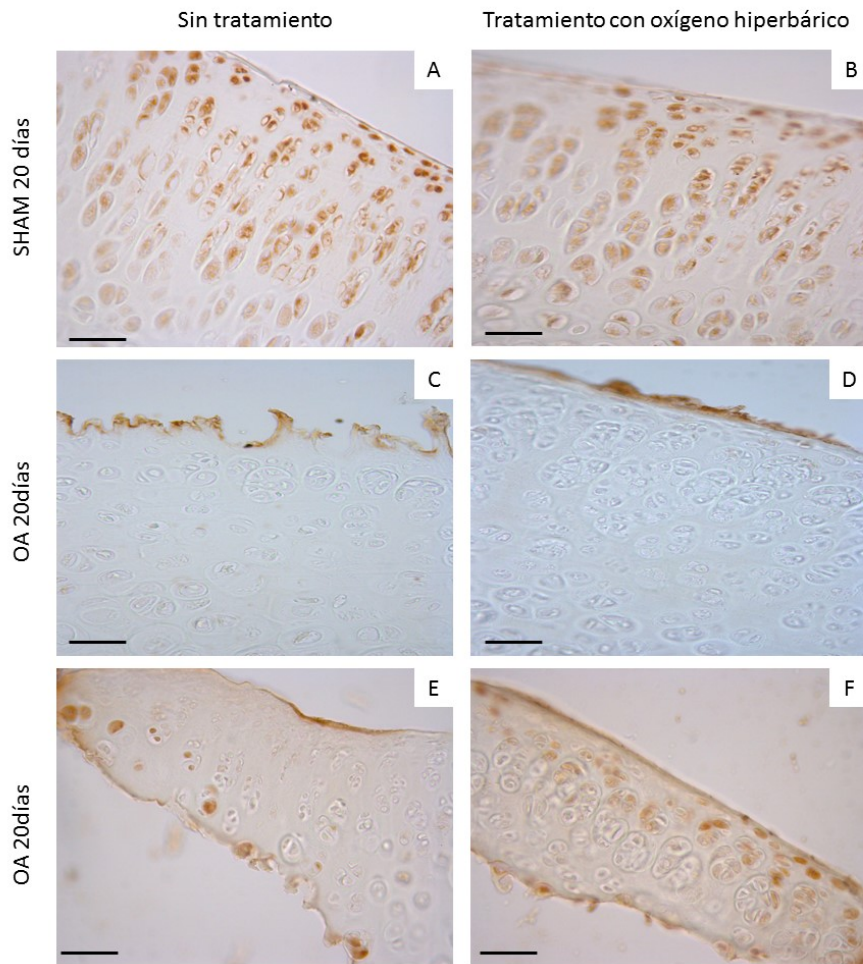


Figura 37. Marca inmunohistoquímica específica para iNOS en el cartílago articular de rata para la determinación de su expresión en respuesta al tratamiento de OHB. Magnificación 40x; Barra de escala: 50µm. Representación gráfica de los resultados obtenidos de la marca positiva para iNOS en el análisis de imagen.

Caspasa 3 activa

Para determinar el efecto del tratamiento OHB en la muerte celular de los condrocitos del cartílago articular, evaluamos por inmunohistoquímica la expresión de la forma activa de la caspasa 3. Inesperadamente, en el cartílago articular de las ratas Sham con y sin tratamiento de OHB se detectó la forma activa de la caspasa 3 en los condrocitos de las zonas superficial y media (Fig. 38 A y B). Sin embargo en los grupos OA con y sin tratamiento OHB no se detectó la presencia de la forma activa de la caspasa 3 (Fig. 38 C, D), aunque ocasionalmente se observó su expresión (Fig. 38 E, F). El análisis de los píxeles de la señal específica para la forma activa de la caspasa 3 corroboró nuestras observaciones en las imágenes ya que su presencia fue mayor para los grupos Sham respecto a los grupos OA. No se observaron diferencias entre los grupos tratados y no tratados con OHB (Figura 38 G). La disminución en la presencia de la caspasa 3 en los grupos OA pudiera ser un reflejo de la pérdida de su celularidad en el cartílago articular.

Los valores de la densidad integrada para la señal inmunohistoquímica utilizados para la graficación del análisis estadístico se encuentran en el Anexo XII.

Caspasa 3 activa

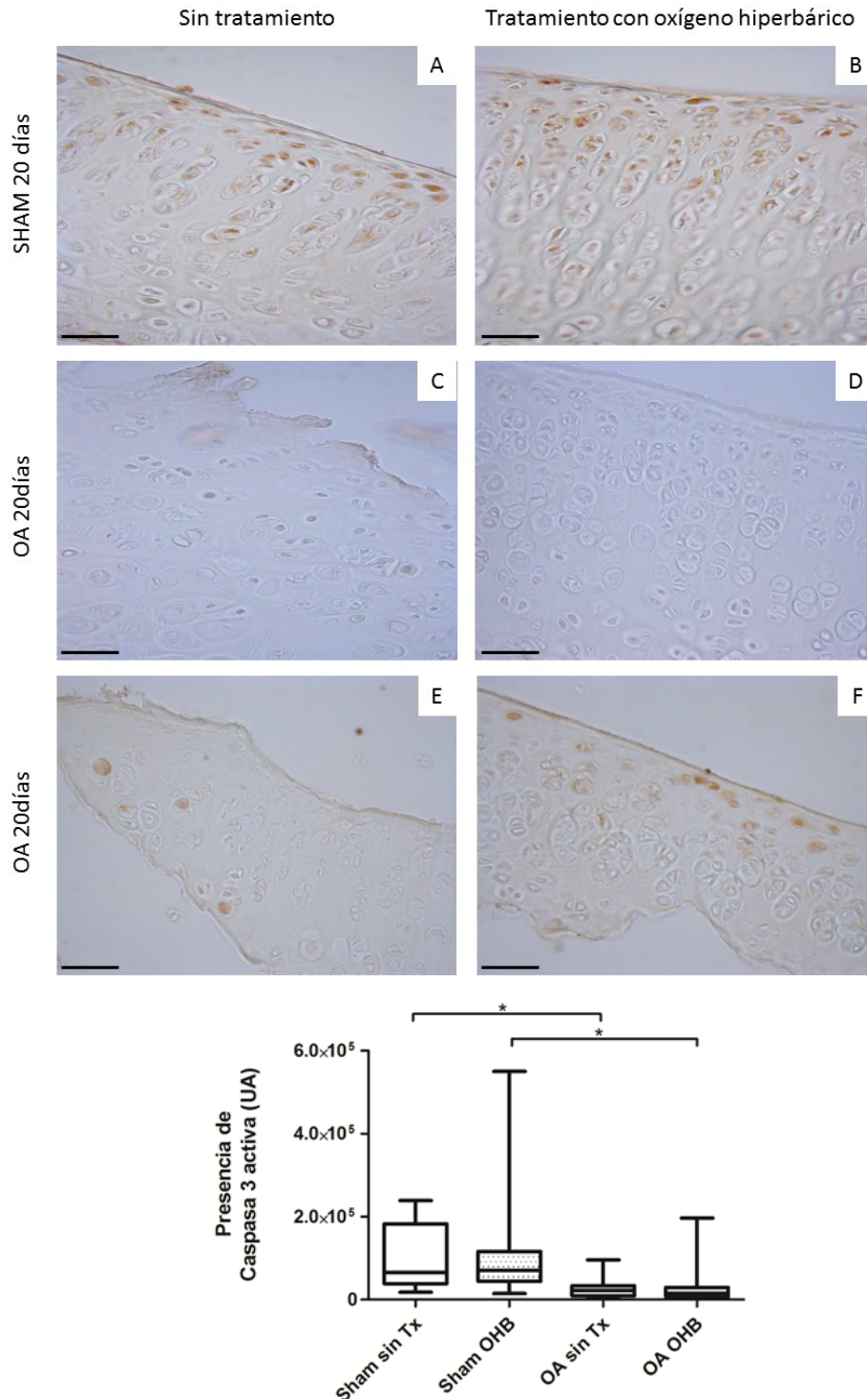


Figura 38. Marca inmunohistoquímica específica para caspasa 3 activa en el cartílago articular de rata para la determinación de los efectos del tratamiento con OHB en la muerte celular. Magnificación 40x; Barra de escala: 50 μ m. Representación gráfica de la presencia positiva para caspasa 3 activa en el análisis de imágenes. Valor estadísticamente significativo *($p < 0.05$).

TUNEL

Para corroborar el efecto del tratamiento con OHB en la muerte de los condrocitos se realizaron ensayos de TUNEL en las muestras de cartílago con OA. En el cartílago articular del grupo OA sin tratamiento se observó una marca TUNEL positiva, en los condrocitos ubicados por debajo de la zona superficial (Fig. 39 A, B). Sin embargo, en los condrocitos del grupo OA tratado con OHB se observó una disminución en los condrocitos positivos para TUNEL, y que se limitó a las zonas media y profunda del tejido (Fig. 39 C, D). De esta manera, el porcentaje de muerte celular del grupo OA tratado con OHB también fue menor en comparación con el grupo OA sin tratamiento; $2.3\% \pm 2.1$ vs $19.2\% \pm 16.6$ respectivamente.

Los datos obtenidos de las muestras para cada grupo se muestran en el Anexo XIII.

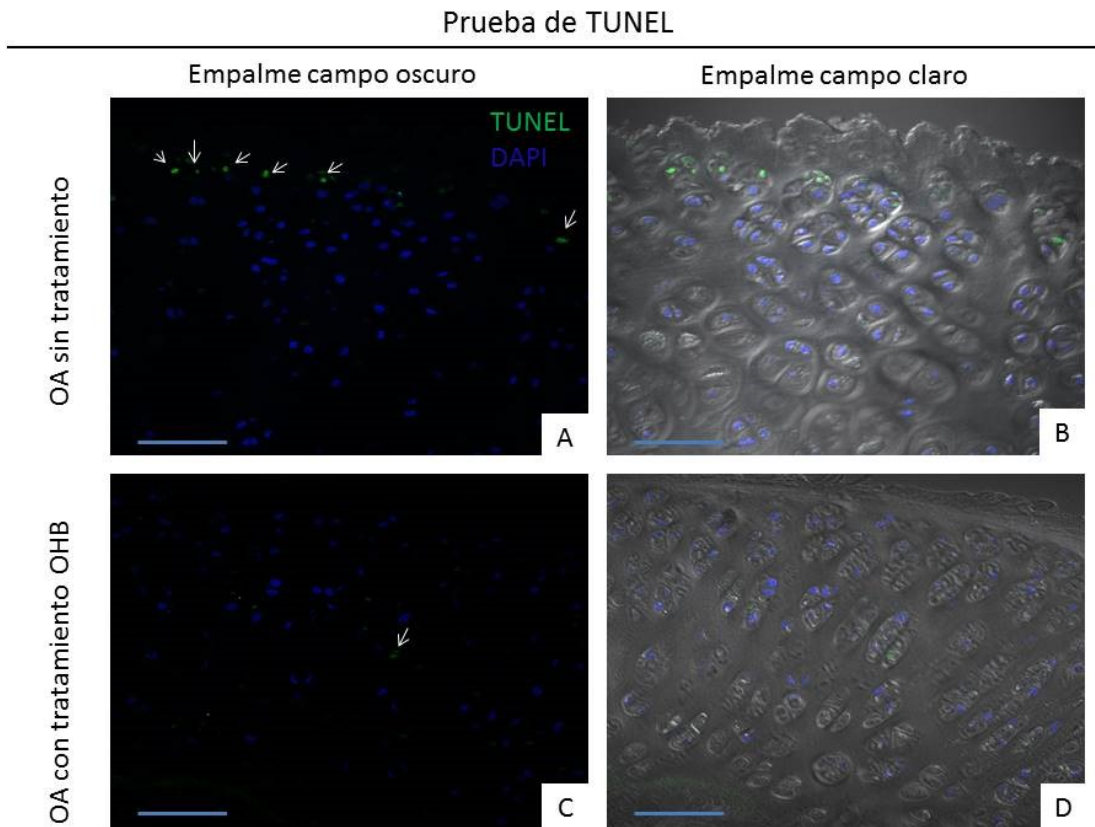


Figura 39. Marca positiva en el ensayo de TUNEL en el cartílago articular de rata para la determinación de la respuesta en la muerte celular con el tratamiento de OHB. Magnificación 40x; Barra de escala: 50µm

10. DISCUSION

En la actualidad no se ha desarrollado ninguna terapia eficaz para la cura de la OA, esto es en parte debido a la complejidad de su etiopatogenia y el curso clínico de la enfermedad. Ya que los tratamientos actuales son solo paliativos para aliviar los síntomas la búsqueda de agentes o terapias que modifiquen el curso de la OA y disminuyan o detengan la pérdida del cartílago es continua (Roman et al., 2016). En este sentido, el empleo de tratamientos alternos como la OHB se vuelven herramientas útiles para tratar de detener la degradación o regenerar el cartílago articular durante la patogénesis de la OA.

Ya que no existe un antecedente del empleo de la terapia con OHB para el tratamiento de la OA se requiere de un modelo adecuado para este tipo de estudios. Decidimos utilizar un modelo de OA postraumática en rata ya que el desarrollo de la patología guarda similitudes bioquímicas, moleculares y celulares con la OA humana (Abbud & Kouri, 2000). Sin embargo, el modelo de OA empleado en el presente trabajo incluye ejercicio de alto impacto después de una meniscectomía, por lo que en un primer acercamiento el tratamiento con OHB fue aplicado desde el inicio de la enfermedad pero en el que hubo un impacto en la rodilla a través del ejercicio continuo para inducir OA. Esto es un reto para los efectos del posible tratamiento con OHB, ya que las mejorías pudieron verse reducidas o superadas por los efectos catabólicos exacerbados por el estrés mecánico. No obstante, esta condición no aplicaría en la clínica ya que a ningún paciente diagnosticado con OA se le indica la realización de ejercicio de forma extenuante e intensa, por lo que el modelo de inducción de OA tendría que ser modificado para ahora si evaluar los efectos más claros del tratamiento con OHB. Sin embargo nuestros resultados obtenidos permiten dar una pauta experimental para futuros estudios.

Nuestras observaciones sobre la apariencia macroscópica del cartílago, revelaron una mejoría en la apariencia física y una ligera reducción en el área de la lesión en los individuos del grupo OA tratados con OHB, con respecto al grupo OA no tratados. Esta mejoría en la estructura del cartílago se vio reflejada en al menos 4 aspectos estudiados: una menor fibrilación, una preservación de los condrocitos de la zona superficial, la disminución de la pérdida de proteoglicanos y una disminución en el porcentaje de condrocitos con apoptosis (TUNEL positivos). El mejor mantenimiento de los proteoglicanos con el tratamiento con OHB se ha reportado en el cartílago con lesión osteocondral de conejos (Yuan et al., 2004; Yuan et al., 2009; Chen et al., 2010; Ueng et al 2013).

Además de la pérdida de los proteoglicanos, durante la patogénesis de la OA el colágeno tipo II de la MEC del cartílago articular también se va degradando, por lo que evaluamos si el tratamiento con OHB modifica la expresión de la enzima que la hidroliza (MMP-13). Encontramos que la expresión de MMP-13 en los grupos Sham con y sin tratamiento fue más alta que en los grupos OA. A pesar de esta respuesta, la integridad de la estructura del cartílago se mantuvo, lo que sugiere que los mecanismos de reparación en el cartílago

normal actúan correctamente para mantener el equilibrio entre el catabolismo y el anabolismo. Además, es importante considerar el efecto del estímulo mecánico (ejercicio de alto impacto) en la expresión de la MMP-13, tal como se ha descrito para la IL-1 β que también se sobre-expresa en cartílago sano sometido a ejercicio de alto impacto sin tener un efecto catabólico (Rojas et al., 2015). Es importante destacar que el impacto en las articulaciones también induce la sobreexpresión de la IL-10, un citocina anti-inflamatoria que contrarresta los efectos catabólicos de la IL-1 β (Rojas et al., 2015). Esta observación concuerda también con un aumento en la expresión de ésta misma metaloproteinasa en condrocitos sanos en cultivo sometidos a estrés mecánico (Liu et al., 2016; Lim et al., 2014). Por otro lado, en los grupos OA la expresión de MMP-13 se redujo cuando se copará a los grupos Sham. Esto puede ser explicado al suponer que su mayor expresión y/o actividad se encuentre en un momento anterior al evaluado, ya que se ha sugerido la señalización catabólica y degradación de colágeno desde la fase temprana de la enfermedad (Xu et al., 2010). Aunque no existen evidencias del efecto de la oxigenación hiperbárica sobre la expresión de la MMP-13 en el cartílago OA, se ha reportado que el tratamiento con OHB a 2.5 ATA con diferente % O₂ y tiempo de respiración suprime la producción de otras metaloproteinasas (MMP-2, MMP-3 y MMP-9), que están involucradas en la degradación de componentes menores de colágeno en el cartílago articular como el tipo IV y V (Koo et al., 2013; Yuan et al., 2014).

Respecto al estrés oxidativo, la presencia de iNOS en el cartílago normal de los grupos Sham fue evidente. Esto concuerda, con la generación de altos niveles de NO en respuesta a la sobrecarga mecánica crónica observados tanto in vivo como in vitro (Brandt, 2003; Smith et al., 2004). Ese efecto también provoca el aumento en cantidades excesivas de otras especies reactivas (superóxido, peróxido de hidrógeno y peroxinitrito) que pueden inducir estrés oxidativo en el tejido OA (Naoko et al., 2016). Sin embargo, en los grupos OA con y sin tratamiento de OHB la expresión de iNOS fue casi ausente por lo que no se pudo determinar el efecto del tratamiento con OHB. Esto contrasta con otros estudios que han mostrado una disminución en la expresión de iNOS por el tratamiento con OHB, en conejos con lesión osteocondral (Yuan et al., 2004; Ueng et al., 2013) y en condrocitos OA de humano (Yuan et al., 2014). Por otro lado, la ausencia de la presencia de iNOS observada en el cartílago OA puede ser debido al momento de análisis en la progresión de la enfermedad (fase avanzada). En este sentido, un estudio de la cinética de la producción del NO en un modelo de OA experimental en rata sin ejercicio (transección del ligamento cruzado anterior), reporta una disminución gradual del NO durante los tiempos de evaluación de 7, 14 y 21 días, mientras que en los controles Sham se incrementaron los niveles de NO en función al tiempo (Castro et al., 2006). Así, estos resultados sugieren la posibilidad de que durante fase avanzada de la OA, la actividad de iNOS se encuentre disminuida.

Por último, en el análisis de la muerte celular por apoptosis se identificaron la presencia de caspasa 3 activa y la señal positiva en el ensayo de TUNEL. En el cartílago normal de los

grupos Sham se detectó mayor presencia de células positivas en las zonas superficial y media para la caspasa 3 activa en comparación con el cartílago de los grupos OA, donde la presencia de caspasa 3 activa se redujo de manera importante. Esta respuesta contrasta con la baja expresión de caspasa 3 y la marca TUNEL positiva observadas en el cartílago normal de rata sanas sin ejercicio (Almonte et al., 2010). Por lo que, el incremento de la presencia de caspasa 3 activa en los grupos Sham quizá fue debido en respuesta al ejercicio de alto impacto, tal como lo sugieren los hallazgos de la apoptosis inducida por estrés mecánico en condrocitos cervicales normales (Kong et al., 2013) y el incremento de caspasa 3 activa tanto en condrocitos normales del plato tibial y condrocitos OA de cóndilo femoral en ratas sometidas a un ejercicio extenuante (Elsaid et al., 2012; Franciozi et al., 2013). Respecto al efecto del tratamiento, la OHB no modificó la presencia de caspasa 3 activa tanto en el cartílago de ratas Sham y OA. No obstante, se ha reportado la supresión de caspasa 3 activa mediante el tratamiento con OHB en la lesión osteocondral en un modelo de conejo (Ueng et al., 2013).

En complemento, las observaciones mediante el ensayo de TUNEL revelaron una importante disminución en el porcentaje de condrocitos muertos (TUNEL positivos) en el cartílago OA tratado con OHB cuando se comparó con cartílago OA sin tratamiento. Este efecto es soportado por la disminución de condrocitos TUNEL positivos en modelos de conejo con lesión osteocondral tratados con OHB (Yuan et al., 2004).

Finalmente, los resultados de este trabajo representan un panorama favorable para la OHB frente a los cambios que caracterizan al proceso osteoartrítico, ya que una reducción del número de condrocitos por la muerte celular (Blanco et al., 1998) y la degradación del cartílago ocurren durante la progresión de la enfermedad (Goldring et al., 2011). Aunque nuevos estudios tienen que desarrollarse para evaluar otras condiciones de tratamiento en el modelo animal como: realizar la meniscectomía y seguir el curso normal de la enfermedad sin ejercicio de alto impacto y evaluar la presencia de marcadores catabólicos y anabólicos durante la progresión de la OA (fases iniciales) bajo diferentes regímenes de tratamiento con OHB.

11. CONCLUSIONES

El tratamiento de oxigenación hiperbárica no modifico la estructura del cartílago normal.

En el cartílago OA el tratamiento con OHB conservó una mejor estructura macroscópica e histológica, disminuyó la pérdida de proteoglicanos y redujo el número de condrocitos muertos.

El tratamiento con OHB no modificó la expresión de los marcadores catabólicos evaluados MMP-13, iNOS y caspasa 3 activa ni en el cartílago sano ni con OA.

12. BIBLIOGRAFÍA

Abbud Lozoya KA y Kouri Flores JB. 2000. A Novel Rat Osteoarthritis model to assess Apoptosis and Matrix Degradation. *Pathol Res Pract*. 196(11):729-745.

Abramson SB, Attur M, Amin AR y Clancy R. 2001. Nitric oxide and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 3(6):535-541.

Aigner T, Fundel K, Saas J, Gebhard PM, Haag J, Weiss T, Zien A, Obermayr F, Zimmer R y Bartnik E. 2006. Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 54(11):3533–3544.

Aguirre Sanchez HI. 2012. Colorante Safranina O. *Investigación en discapacidad* 1(2):83-85

Alfaro Moreno E, García Cuéllar C y Dueñas González A. 2000. Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Rev Inst Nal Cancerol (Mex)* 46(4):275-280.

Almeida AO. 1934. Recherches sur l' action toxique des hautes pressions d'oxygene. *Societe de Biologie de Paris. Meeting Proceedings* 66:1225.

Almeida AO. 1935. Recherches sur l'action toxique de l'oxygene sous haute pression sur l'homme. *Archivos da Fundacao Gaffree-Guinle, Oxygenio e Cancer (supp)*:17–22.

Almeida AO. 1938. Research on the treatment of experimental and human cancer by oxygen under pressure. *Archivos da Fundacao Gaffree-Guinle, Oxygenio e Cancer (suppl)*:29–36.

Almonte Becerril M, Navarro García F, González Robles A, Vega López MA, Lavalle C y Kouri JB. 2010. Cell death of chondrocytes is a combination between apoptosis and autophagy during the pathogenesis of Osteoarthritis within an experimental model. *Apoptosis* 15(5):631-638.

Ambrosio F, Tarabishy A, Kadi F, Brown EH y Sowa G. 2011. Biological basis of exercise-based treatments for musculoskeletal conditions. *PM R*, 3(6):S59-S63

Amin AR, Di-Cesare PE, Vyas P, Attur M, Tzeng E, Billiar TR, Stuchin SA y Abramson SB. 1995. The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-

affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. *J Exp Med* 182(6):2097-2102.

De Andrés González MC. Efecto del óxido nítrico (NO) sobre la actividad mitocondrial de los condrocitos articulares humanos: su implicación en la artrosis (tesis de doctorado). A Coruña España; Universidad de la Coruña, 2007, 21-31.

Arteaga Monge L, Schmitz G y Arias González X. 2011. Medicina hiperbárica, oxigenoterapia hiperbárica. *Rev Med C.Rica y Centroame* LXVIII (599) 393-399.

Archer CW y Francis West P. 2003. The chondrocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 35(4): 40-404.

Athanasiou KA, Rosenwasser MP, Buckwalter JA, Malinin TI y Mow VC. 1991. Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage. *J Orthop Res* 9(3):330-40.

Balaban RS, Nemoto S y Finkel T. 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 120(4):483-95.

Barilaro G, Francesco Masala I, Parracchini R, Iesu C, Caddia G, Sarzi Puttini P y Atzeni F. 2017. The Role of Hyperbaric Oxygen Therapy in Orthopedics and Rheumatological Diseases. *Isr Med Assoc J*. 19(7):429-434.

Basser PJ, Schneiderman R, Bank RA, Wachtel E y Maroudas A. 1998. Mechanical properties of the collagen network in human articular cartilage as measured by osmotic stress technique. *Arch. Biochem. Biophys*. 351(2): 207-219.

Beddoes T y Watt J. 1794. Considerations of the medical use of factious airs, and on the manner of obtaining them in large quantities. 1st ed. Bristol: Bulgin and Rossier.

Bert P. 1878. La pression Barometrique. París: Masson et Cie.

Bertone AL, Hardy J, Simmons EJ y Muir WW III. 1998. Vacular and trans-synovial forces of the stationary isolated joint. *Am J Vet Res* 59(4):495-503.

Blanco García FJ, Guitian R, Vázquez Martul E, De Toro FJ y Galdo Fernández F. 1998. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. *Arthritis Rheum* 4(2):284-289.

Blanco García FJ, De Toro FJ y Galdo Fernández F. 2000. El Óxido nítrico y el cartílago articular. *Rev Esp Reumatol* 27(3): 99-106.

Blanco García FJ, Cañete Crespillo JD y Pablos Álvarez JL. Técnicas de Investigación básica en reumatología. Madrid: Médica Panamericana, 2007, pp 205-207.

Boerema I, Meyne NG, Brummelkamp WH, Bouma S, Mensch MH, Kamermans F, Stern Hanf M y Van Aalderen W. 1960. Life without blood: a study of the influence of high atmospheric pressure and hypothermia on dilution of blood. *J Cardiovasc Surg* 13:133-146.

Boerema I, Vermeulen Cranch DME y Meijne NG. 1962. Observations during operation on deeply cyanotic young children breathing oxygen at three atmospheres absolute. *Pediatr Surg* 52:796-799.

Boicot AE, Damant GCC y Haldane JS. 1908. The prevention of compressed air illness. *J Hyg* 8(3): 342-443.

Boileau C, Martel Pelletier J, Caron J, Msika P, Guillou GB, Baudouin C y Pelletier JP. 2009. Protective effects of total fraction of avocado/soybean unsaponifiables on the structural changes in experimental dog osteoarthritis: inhibition of nitric oxide synthase and matrix metalloproteinase-13. *Arthritis Res Ther* 11(2), R41.

Botha Scheepers S, Watt I, Slagboom E, De Craen AJ, Meulenbelt I, Rosendaal FR, Breedveld FC, Huizinga TW y Kloppenburg M. 2008. Innate production of tumour necrosis factor alpha and interleukin 10 is associated with radiological progression of knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 67(8):1165-1169.

Boyd CS y Cadenas E. 2002. Nitric oxide and cell signaling pathways in mitochondrial-dependent apoptosis. *Biol Chem* 383(3-4):411-423.

Brandt KD. 2003. Response of joint structures to inactivity and to reloading after immobilization. *Arthritis Rheum* 49(2):267-271.

Brighton CT, Lane JM y Koh JK. 1974. In vitro rabbit articular cartilage organ model. II. ³⁵S incorporation in various oxygen tensions. *Arthritis Rheum* 17(3):245-252.

Brighton CT, Kitajima T y Hunt RM. 1984. Zonal analysis of cytoplasmic components of articular cartilage chondrocytes. *Arthritis Rheum* 27(11):1290-1299.

Brinker, M.R. Joints, section 2, en "Review of orthopaedics", 3ª ed. Miller, M.D. y Brinker, M.R. eds. W.B. Saunders, 2000.

Brinker, Piermattei, and Flo's handbook of small animal orthopedics and fracture repair / St. Louis, Missouri: 5 ed. Elsevier, 2016.

Brookes PS, Bolanos JP y Heales SJ. 1999. The assumption that nitric oxide inhibits mitochondrial ATP synthesis is correct. *FEBS Lett* 446(2-3):261-3.

Brouillette MJ, Ramakrishnan PS, Wagner VM, Sauter EE, Journot BJ, McKinley TO y Martin JA. 2014. Strain-dependent oxidant release in articular cartilage originates from mitochondria. *Biomech Model Mechanobiol* 13(3):565–72.

Brucker PU, Izzo NJ y Chu CR. 2005. Tonic activation of hypoxia-inducible factor 1 alpha in avascular cartilage and implication for metabolic homeostasis. *Arthritis Rheum* 52(10):3181-3191.

Buckwalter JA y Martin J. 1995. Degenerative Joint Disease. Anatomy and physiology of synovial joints. *Clinical Symposia, Ciba*, 47(2).

Buckwalter JA. 1995. Osteoarthritis and articular cartilage use, disuse, and abuse: experimental studies. *J Rheumatol* 22(43):13-15.

Buckwalter JA y Mankin HJ. 1997. Articular cartilage, part 1: tissue design and chondrocyte-matrix interaction. *J Bone Joint Surg Am* 79:600-611

Buckwalter JA, Mankin HJ y Grodzinsky AJ. 2005. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect* 54:465-480.

Cairo J. Osseous pathologies during growth. 2005. *1st International Congress on the Spanish Mastiff Dog CIME* Navarrete, Spain 28-30.

Cao Y, Zhang X, Shang W, Xu J, Wang X, Hu X, Ao Y y Cheng H. 2013. Proinflammatory cytokines stimulate mitochondrial superoxide flashes in articular chondrocytes in vitro and in situ. *PLoS One* 19;8(6):e66444.

Carmona J y Prades M. 2009. Pathophysiology of Osteoarthritis. *Compendium Equine: Continuing Education for Veterinarians* 28-40.

Caron, J. Arthritis: Osteoarthritis. In: *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. Second Ed. Saunder Elsevier, St Louis, MO, USA. 2011, pp 655-668.

Carreau A, Hafny Rahbi BE, Matejuk A, Grillon C y Kieda C. 2011. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med*, 15(6), 1239-1253.

Castellanos Gutiérrez R. Oxigenación Hiperbárica, consulta virtual, <http://studylib.es/doc/5836908/oxigenacion-hiperbarica-acopl...---leader-life--camara-hi...> consultado el 14 de febrero de 2017.

Castillo EC, Hernandez Cueto MA, Vega Lopez MA, Lavallo C, Kouri JB y Ortiz Navarrete V. 2012. Effects of Vitamin D Supplementation during the Induction and Progression of Osteoarthritis in a Rat Model. *Evide Based Complement Alternative Med*, 2012: 156563.

Castro RR, Cunha FQ, Silva FS y Rocha FAC. 2006. A quantitative approach to measure joint pain in experimental osteoarthritis—evidence of a role for nitric oxide. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(8):769-776.

Chen TL, Wang PY, Luo W, Gwon SS, Flay NW, Zheng J, Guo C, Tanzaer ML y Vertel BM. 2001. Aggrecan domains expected to traffic through the exocytic pathway are misdirected to the nucleus. *Exp Cell Res*, 263(2):224-235.

Chen ACY, Lee MS, Lin SS, Pan LC y Ueng SWN. 2010. Augmentation of osteochondral repair with hyperbaric oxygenation: a rabbit study. *J Orthop Surg Res*, 5:91.

Cherng JH, Chang SC, Chen SG, Hsu ML, Hong PD, Teng SC, Chan YH, Wang CH, Chen TM y Dai NT. 2012. The effect of hyperbaric oxygen and air on cartilage tissue engineering. *Ann Plast Surg*, 69(6):650-5.

Chevalier X. 2009. Fisiopatología de la artrosis. EMC - *Aparato Locomotor*, 42(1):1-11.

Clark CC, Tolin BS y Brighton CT. 1991. The effect of oxygen tension on proteoglycan synthesis and aggregation in mammalian growth plate chondrocytes. *J Orthop Res*, 9:477-484.

Cruz R, Miranda Sanchez M, Solis Garcia D y Kouri F. 2014. Recent Patents on Metalloproteinases as Biomarkers in Osteoarthritis Diagnosis and Treatment. *Recent Patents on Biomarkers*, 4(1):1-10.

Cunningham OJ. Oxygen therapy by means compressed air. 1927. *Anesthesie Aanalgesie*, 6:64.

Cunningham James G, Klein Brandley G. Fisiología veterinaria. 4a. ed. Barcelona: Elsevier Saunders, 2009.

Dai NT, Fan GY, Liou NH, Wang YW, Fu KY, Ma KH, Liu JC, Chang SC, Huang KL, Dai LG, Chen SG y Chen TM. 2015. Histochemical and functional improvement

of adipose-derived stem cell-based tissue-engineered cartilage by hyperbaric oxygen/air treatment in a rabbit articular defect model. *Ann Plast Surg*, 74(2):S139-45.

del Carlo M y Loeser, RF. 2002. Nitric oxide-mediated chondrocyte cell death requires the generation of additional reactive oxygen species. *Arthritis Rheum*, 46(2):394-403.

del Carlo M y Loeser RF. 2006. Chondrocyte cell death mediated by reactive oxygen species-dependent activation of PKC-betaI. *Am J Physiol Cell Physiol*, 290(3):C802-811.

de Crombrughe B, Lefebvre V y Nakashima K. 2001. Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Current Opin Cell Biol*, 13(6):721-727.

Deberg M, Labasse A, Christgau S, Cloos P, Bang Henriksen D, Chapelle JP, Zegels B, Reginster JY y Henrotin Y. 2005. New serum biochemical markers (Coll 2-1 and Coll 2-1 NO2) for studying oxidative related type II collagen network degradation in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 13(3):258-265.

D'Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, Colwell CW y Lotz MK. 2001. Human chondrocyte apoptosis in response to mechanical injury. *Osteoarthritis Cartilage*, 9(8):712-719.

Desola J. 1998. Bases y fundamento terapéutico de la oxigenoterapia hiperbárica. *JANO/Medicina*, 54(1260): 5-11.

Díaz Díaz RM, Mejía M, Sandra J, Huerta M, Octavio J, Huerta A y Edwin A. 2009. Óxido nítrico: la diversidad de sus efectos sistémicos. *Rev Cient Cienc Med*, 12(1): 35-38.

Drobnic F y Turmo A. 2010. Estado actual del tratamiento con oxígeno hiperbárico de las enfermedades del aparato locomotor en medicina del deporte. *Med Clinic*, 134(7):312-315.

Duke. Fisiología de los animales domésticos. México, D.F. : Limusa, 2011 pp.711

Duval JM, Budsberg SC, Flo GL y Sammarco JL. 1999. Breed, sex and bodyweight as risk factors for rupture of the cranial cruciate ligament in young dogs. *J Am Vet Med Assoc*; 215(6): 811-814.

Elmore S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*, 35(4), 495-516.

Elsaid KA, Zhang L, Waller K, Tofte J, Teeple E, Fleming BC y Jay GD. 2012. The impact of forced joint exercise on lubricin biosynthesis from articular cartilage following ACL transection and intra-articular lubricin's effect in exercised joints following ACL transection. *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(8): 940-948.

Errington RJ, Fricker MD, Wood JL, Hall AC y White NS. 1997. Four-dimensional imaging of living chondrocytes in cartilage using confocal microscopy: a pragmatic approach. *Am J Physiol*, 272(3 Pt 1): C1040-C1051.

Estrada Flores Elvira, Uribe Aranzábal María del Carmen. Atlas e histología de vertebrados. México: UNAM , Facultad de ciencias, 2002, pág.34

Falchuk KH, Goetzl EJ y Kulka JP. 1970. Respiratory gases of synovial fluids. An approach to synovial tissue circulatorymetabolic imbalance in rheumatoid arthritis. *Am J Med*, 49(2):223– 231.

Fermor B, Weinberg JB, Pisetsky DS y Guilak F. 2004. The influence of oxygen tension on matrix turnover and physical properties of articular cartilage. Proc 50th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, San Francisco, CA, abstract 0831.

Fermor B, Christensen SE, Youn I, Cernanec JM, Davies CM y Weinberg JB. 2007. Oxygen, nitric oxide and articular cartilage. *Eur Cell Mater*, 11;13: 56-65.

Fernandez J, Mertel Pelletier J y Pelletier J. 2002. The Role of Cytokines in Osteoarthritis Pathophysiology. *Biorheology*, 39(1-2): 237-258.

Ferrell WR y Najafipour H. 1992. Changes in synovial PO₂ and blood flow in the rabbit knee joint due to stimulation of the posterior articular nerve. *J Physio*, 449:607-617.

Fontaine JA. 1879. Emploi chirurgical de l'air comprime. *Union Med*, 28:445.

Forriol Campos F. 2002. El cartilago articular: aspectos mecánicos y su repercusión en la reparación tisular. *Rev Ortop Traumatol*, 46(5):379-386.

Franciozi CE, Tarini VA, Reginato RD, Gonçalves PR, Medeiros VP, Ferretti M, Dreyfuss JL, Nader HB y Faloppa F. 2013. Gradual strenuous running regimen predisposes to osteoarthritis due to cartilage cell death and altered levels of glycosaminoglycans. *Osteoarthritis and Cartilage*, 21(7):965-972.

Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. 2010. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*, 123(24):4195-4200.

Frisbie, D. Synovial joint Biology and Pathobiology. In: *Equine Surgery*. Fourth ed. St Louis. Saunder Elsevier. 2012 Pp 1096-1113.

Garima S, Saxenaa RK, Mishra P. 2007. Differential effects of cyclic and static pressure on biochemical and morphological properties of chondrocytes from articular cartilage. *Clin Biomech*, 22(2): 248-55.

Gartner Leslie P. Histología. Texto y atlas. 1ª ed. México. McGARW-HILL Interamericana, 1997.

Gavrieli Y, Sherman Y y Ben Sasson SA. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 119(3): 490-501.

Gavriilidis C, Miwa S, von Zglinicki T, Taylor RW y Young DA. 2013. Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis is associated with down-regulation of superoxide dismutase 2. *Arthritis Rheum*, 65(2): 378-387.

Geneser Histología/ Annemarie Brüel; traducción de Karen Mikelsen.-México, D.F.: 4ª ed. Médica Panamericana, 2014.

Getty, Robert. Sisson y Grossman: Anatomía de los animales domésticos. Tomo I. 5ª edición. España: Elsevier, 1982 pp. 39-44.

Gibson JS, Cossins AR y Ellory JC. 2000. Oxygen-sensitive membrane transporters in vertebrate red cells. *J Exp Biol*, 203(9):1395-1407.

Gibson JS, Milner PI, White R, Fairfax TP y Wilkins RJ. 2008. Oxygen and reactive oxygen species in articular cartilage: modulators of ionic homeostasis. *Pflugers Arch*, 455(4): 563-573.

Glyn Jones S, Palmer AJ, Agricola R, Price AJ, Vincent TL, Weinans H y Carr AJ. 2015. Osteoarthritis. *Lancet*, 386(9991): 376-387.

Goldring MB. 2006. Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 20(5): 1003-1025.

Goldring MB, Otero M, Plumb DA, Dragomir C, Favero M, El Hachem K, Hashimoto K, Roach HI, Olivotto E, Borzì RM y Marcu KB. 2011. Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *Eur Cell Mater*, 21:202-220.

Goodwin W, McCabe D, Sauter E, Reese E, Walter M, Buckwalter JA, Martin JA. 2010. Rotenone prevents impact-induced chondrocyte death. *J Orthop Res*, 28(8):1057-1063.

Goyal N, Gupta M, Joshi K y Nagi ON. 2006. Osteoarthritic femoral articular cartilage of knee joint in man. *Nepal Med Coll J*, 8(2):88-92.

Grimshaw MJ y Mason RM. 2000. Bovine articular chondrocyte function *in vitro* depends upon oxygen tension. *Osteoarthritis Cartilage*, 8(5):386-392.

Grossin L, Cournil Henrionnet C, Pinzano A, Gaborit N, Dumas D, Etienne S, Stoltz JF, Terlain B, Netter P, Mir LM y Gillet P. 2006. Gene transfer with HSP 70 in rat chondrocytes confers cytoprotection *in vitro* and during experimental osteoarthritis. *FASEB J*. 20(1):65-75.

Gutsaeva DR, Suliman HB, Carraway MS, Denchenko IT, Piantadosi CA. 2006. Oxygen-Induced Mitochondrial Biogenesis in the Rat Hippocampus. *Neuroscience*, 137(2): 493-504.

Hardy J, Bertone AL y Muir WW 3rd. 1998. Local hemodynamics permeability and oxygen metabolism of innervated or denervated isolated quine joints. *Am J Vet Res*, 59(10):1307-1316.

Hashimoto H, Tanaka M, Suda T, Tomita T, Hayashida K, Takeuchi E, Kaneko M, Takano H, Nagata S y Ochi T. 1998. Soluble Fas ligand in the joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 41(4): 657-662.

Hashimoto K, Fukuda K, Yamazaki K, Yamamoto N, Matsushita T, Hayakawa S, Munakata H y Hamanishi C. 2006. Hypoxia-induced hyaluronan synthesis by articular chondrocytes: the role of nitric oxide. *Inflamm Res*, 55(2): 72-77.

Hayami T, Pickarski M, Wesolowski GA, McLane J, Bone A, Destefano J, Rodan GA y Duong LT. 2004. The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: Reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model. *Arthritis Rheum*, 50(4): 1193-1206.

Hedhammar A, Wu FM, Krook L, Schryver HF, De Lahunta A, Whalen JP, Kallfelz FA, Nunez EA, Hintz HF, Sheffy BE, Ryan GD. 1974. Overnutrition and skeletal disease. An experimental study in growing Great Dane dogs. *Cornell Vet*, 64(2): 5-160.

Hermann W, Lambova S y Muller Lander U. 2018. Current Treatment Options for Osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rev*, 14(2):108-116.

Heyman SN, Goldfarb M, Darmon D y Brezis M. 1999. Tissue oxygenation modifies nitric oxide bioavailability. *Microcirculation*, 6(3): 199-203.

Horton WE Jr, Feng L y Adams C. 1998. Chondrocyte apoptosis in development, aging and disease. *Matrix Biol*, 17(2):107-115.

Houlton E.F. John. Manual de alteraciones musculoesqueléticas en pequeños animales. Barcelona: Ediciones S, c2010, pp. 113-114.

Huang Z, Zhou M, Wang Q, Zhu M, Chen S y Li H. 2017. Mechanical and hypoxia stress can cause chondrocytes apoptosis through over-activation of endoplasmic reticulum stress. *Arch Oral Biol*, 84:125-132.

Huber M, Trattnig S y Lintner F. 2000. Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage. *Invest Radiol*, 35(10): 573-580.

Hwang HS y Kim HA. 2015. Chondrocyte Apoptosis in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Int J Mol Sci*, 16(11), 26035–26054.

Inoue M, Nishikawa M, Kasahara E y Sato E. 1999. Role of superoxide, NO and oxygen in the regulation of energy metabolism and suppression of senile diseases. *Mech Ageing Dev*, 111(2-3): 89–95.

Joaquín J. Sopena Juncosa, José Ma Carrillo Povedona, Mónica Rubio Zaragoza, José I. Redondo García, Ivan Serra Aguado y Carme Soler i Canet. Traumatologíaveterinaria.com [homepage on the Internet]. Estructura y function del cartílago articular. ARGOS 52 [citado en 14 Septiembre 2017]; Disponible en: http://www.traumatologíaveterinaria.com/articulaciones/docs/cartilago_articular.pdf

Johnson K, Jung A, Murphy A, Andreyev A, Dykens J y Terkeltaub R. 2000. Mitochondrial oxidative phosphorylation is a downstream regulator of nitric oxide effects on chondrocyte matrix synthesis and mineralization. *Arthritis Rheum*, 43(7): 1560-1570.

Johnson K, Svensson CI, Etten DV, Ghosh SS, Murphy AN, Powell HC y Terkeltaub R. 2004. Mediation of spontaneous knee osteoarthritis by progressive chondrocyte ATP depletion in Hartley guinea pigs. *Arthritis Rheum*, 50(4):1216-1225.

Junqueira LC, Carneiro J: Basic Histology: Text & Atlas, 10th ed. New York: McGraw-Hill, 2003.

Jutila AA, Zignego DL, Hwang BK, Hilmer J K, Hamerly T, Minor C A, Walk ST y June RK. 2014. Candidate mediators of chondrocyte mechanotransduction via targeted and untargeted metabolomic measurements. *Arch Biochem Biophys*, 545:116-123.

Kenneth W. Hinchcliff, Andris J. Kaneps, Raymond J. Geor Medicina y cirugía en los equinos de deporte: ciencias básicas y clínicas de los equinos de deporte / Buenos Aires : Inter-Médica, 2007. pp 173-177.

Kim HA, Lee YJ, Seong SC, Choe KW y Song YW. 2000. Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis. *J Rheumatol*, 27(2):455-462.

Kim J, Xu M, Xo R, Mates A, Wilson GL, Pearsall AW IV y Grishko V. 2010. Mitochondrial DNA damage is involved in apoptosis caused by pro-inflammatory cytokines in human oa chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 18(3): 424-432.

Kindwall E y Whelan H. Hyperbaric medicine practice. 2nd ed. Flagstaff: Best publishing Co, 1995.

Koike M, Nojiri H, Ozawa Y, Watanabe K, Muramatsu Y, Kaneko H, Morikawa D, Kobayashi K, Saita Y, Sasho T, Shirasawa T, Yokote K, Kaneko K, Shimizu T. 2015. Mechanical overloading causes mitochondrial superoxide and SOD2 imbalance in chondrocytes resulting in cartilage degeneration. *Sci Rep*, 5:11722.

Kong D, Zheng T, Zhang M, Wang D, Du S, Li X, Fang J, Cao X. 2013. Static Mechanical Stress Induces Apoptosis in Rat Endplate Chondrocytes through MAPK and Mitochondria-Dependent Caspase Activation Signaling Pathways. *PLoS ONE* 8(7): e69403.

Köning Horst Erich, Liebich Hans-Georg. Anatomía de los animales domésticos: texto y atlas en color Buenos Aires; México: Editorial Médica Panamericana, 2004 pp. 14-19.

Konigsberg Fainstein, Mina. Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas. México: Editorial El Manual Moderno, 2008 pp. 319-327.

Koo ST, Lee CH, Choi H, Shin YI, Ha KT, Ye H, BA, y Shim HB. 2013. The effects of pressure on arthritic knees in a rat model of CFA-induced arthritis. *Pain Physician*, 16(2): E95-102.

Koo ST, Lee CH, Shin YI, Ko HY, Lee DG y Jeong HS. 2014. Acquiring the optimal time for hyperbaric therapy in the rat model of CFA induced arthritis. *Pain Physician*, 17(2):197-202.

Korhonen K, Kuttilla K y Niinikoski J. 1999. Subcutaneous tissue oxygen and carbon dioxide tensions during hyperbaric oxygenation: an experimental study in rats. *Eur J Surg*, 165(9): 885-890.

Kouri JB, Jimenez SA, Quintero M y Chico A. 1996. Ultrastructural study of chondrocytes from fibrillated and non-fibrillated human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 4(2): 111-125.

Kouri JB, Arguello C, Luna J y Mena R. 1998. Use of microscopical techniques in the study of human chondrocytes from osteoarthritic cartilage: an overview. *Microsc Res Tech*, 40(1): 22-36.

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

Kuhn K, D’Lima DD, Hashimoto S y Lotz M. 2004. Cell death in cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 12(1): 1-16.

Laborda, Jesús. Atlas de artrología del perro. Zaragoza: Servet, 2005 pp.84-85.

Lafont JE, Talma S, Hopfgarten C y Murphy CL. 2008. Hypoxia promotes the differentiated human articular chondrocyte phenotype through SOX9-dependent and -independent pathways. *J Bio Chem*, 283:4778–4786.

Landínez Parra NS, Garzón Alvarado DA y Vanegas Acosta JC. 2010. Acercamiento a la mecanobiología del cartilago articular a través de un modelo computacional. *Rev Cub Inv Biomed*, 29(1): 79-104.

Lane JM, Brighton CT y Menkowitz BJ. 1977. Anaerobic and aerobic metabolism in articular cartilage. *J Rheumatol*, 4(4): 334-342.

Lane RS, Fu Y, Matsuzaki S, Kinter M, Humphries KM y Griffin TM. 2015. Mitochondrial respiration and redox coupling in articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther*, 17(1): 54.

Leach RM, Rees PJ y Wilmshurst P. 1998. Hyperbaric oxygen therapy. *BMJ*, 317(7166): 1140-1143.

Lee RB y Urban JP. 1997. Evidence for a negative Pasteur effect in articular cartilage. *Biochem J*, 321(1): 95-102.

Lee GM, Paul TA, Slabaugh M y Kelley SS. 2000. The incidence of enlarged chondrons in normal and osteoarthritic human cartilage and their relative matrix density. *Osteoarthritis Cartilage*, 8(1):44–52.

Lee RB y Urban JP. 2002. Functional replacement of oxygen by other oxidants in articular cartilage. *Arthritis Rheum*, 46(12): 3190–3200.

Leong DJ, Gu XI, Li Y, Lee JY, Laudier DM, Majeska RJ, Schaffler MB, Cardoso L y Sun HB. 2010. Matrix metalloproteinase-3 in articular cartilage is upregulated by joint immobilization and suppressed by passive joint motion. *Matrix Biol*, 29(5): 420-426.

Levick JR. Blood flow and mass transport in synovial joints. 1984. The cardiovascular system IV: The microcirculation. In: Renkin EM, Michel CC, eds. Handbook of physiology. Bethesda, MD: *Am Physiol Society*, 917-947.

Levick JR. 1990. Hypoxia and acidosis in chronic inflammatory arthritis; relation to vascular supply and dynamic effusion pressure. *J Reumatol*, 17(5): 579-582.

Levick JR. 1995. Microvascular architecture and exchange in synovial joints. *Microcirculation*, 2(3): 217-233.

Li Z, Liu W, Kang Z, Lv S, Han C, Yun L, Sun X, Zhang JH. 2008. Mechanism of Hyperbaric Oxygen Preconditioning in Neonatal Hypoxia-Ischemia Rat Model. *Brain Res*, 1196: 151-156.

Li G, Yin J, Gao J, Cheng TS, Pavlos NJ, Zhang C y Zheng MH. 2013. Subchondral bone in osteoarthritis: Insight into risk factors and microstructural changes. *Arthritis Res Ther* 15(6): 223.

Lim NH, Meinjohanns E, Mendal M, Bou Gharis G y Nagase H. 2014. In vivo imaging of MMP-13 activity in the murine destabilized medial meniscus surgical model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 22(6): 862-868.

Liu ZJ y Velazquez OC. 2008. Hyperoxia, Endothelial Progenitor Cell Mobilization, and Diabetic Wound Healing. *Antioxid Redox Signal*, 10(11):1869-1882.

Liu Q, Hu X, Zhang X, Duan X, Yang P, Zhao F y Ao Y. 2016. Effects of mechanical stress on chondrocyte phenotype and chondrocyte extracellular matrix expression. *Sci. Rep*, 6, 37268.

Liu C, Wang B, Xiao L, Li Y, Xu L, Zhao Z y Zhang L. 2018. Protective effects of the pericellular matrix of chondrocyte on articular cartilage against the development of osteoarthritis. *Histol Histopathol*, 33(8):757-764.

Link Thomas M. Cartilage Imaging. Significance, Techniques, and New Developments. Springer, 1a. ed. Verlag New York. 2011, pp 1-5.

Loeser RF. 2009. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthritis Cartilage*, 17(8): 971-979.

Loeser RF. 2012. The effects of aging on the development of osteoarthritis, *HSS J*, 8(1): 18-19.

Loeser RF. 2013. Aging processes and development of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 25(1):108-113.

Loeser RF. 2014. Integrins and chondrocyte-matrix interactions in articular cartilage. *Matrix Biol*, 39:11-16.

López Armada MJ, Carames B, Cillero Pastor B y Blanco García FJ. 2004. Fisiopatología de la artrosis: ¿cuál es la actualidad? *Rev Esp Reumatol*, 31(6): 365-409.

López Armada MJ, Riveiro Naveira RR, Vaamonde García C y Valcárcel Ares MN. 2013. Mitochondrial dysfunction and the inflammatory response. *Mitochondrion*, 13(2): 106-118.

Lotz MK, Otsuki S, Grogan SP, Sah R, Terkeltaub R y D'Lima D. 2010. CARTILAGE CELL CLUSTERS. *Arthritis Rheum*, 62(8): 2206-2218.

Lund Olesen K. 1970. Oxygen tension in synovial fluids. *Arthritis Rheum*, 13(6): 769-776.

Maneiro E, Martin MA, de Andres MC, Lopez Armada MJ, Fernandez Sueiro JL, del Hoyo P, Galdo F, Arenas J y Blanco FJ. 2003. Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 48(3):700-708.

Mankin HJ y Lippiello L. 1970. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. *J Bone Joint Surg Am*, 52(3): 424-434.

Mankin HJ. 1974. Discussion of pathogenesis of osteoarthrosis, Proceedings of the Symposium on Normal and Osteoarthritic Articular Cartilage pp 301-307.

Marcus RE. 1973. The effect of low oxygen concentration on growth, glycolysis, and sulfate incorporation by articular chondrocytes in monolayer culture. *Arthritis Rheum*, 16(5): 646-656.

Martín de Jesús Fermín Rafael. Pie diabético. Atención integral. 3ed McGrawHill, 2010, pp 142-148.

Martin JA, Martini A, Molinari A, Morgan W, Ramalingam W, Buckwalter JA y McKinley TO. 2012. Mitochondrial Electron Transport and Glycolysis are coupled in Articular Cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 20(4), 323-329.

McIlwraith, C. Enfermedades de las Articulaciones, Los Tendones, Los Ligamentos y Las Estructuras Relacionadas. In: Adams Claudicaciones en Equinos. 5 ed. Saunder Elsevier. Buenos aires. Argentina. 2004, pp 469-493.

Mele Esteban. 2007. Epidemiología de la osteoartritis. *Veterinary Focus* 17(3).

Messier SP, Mihalko SL, Legault C, Miller GD, Nicklas BJ, DeVita P, Beavers DP, Hunter DJ, Lyles MF, Eckstein F, Williamson JD, Carr JJ, Guermazi A, Loeser RF. 2013. Effects of intensive diet and exercise on knee joint loads, inflammation, and clinical outcomes among overweight and obese adults with knee osteoarthritis: the IDEA randomized clinical trial. *JAMA*, 310(12): 1263-1273.

Milner PI, Fairfax TP, Browning JA, Wilkins RJ y Gibson JS. 2006. The effect of O2 tension on pH homeostasis in equine articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 54(11): 3523-3532.

Moncada S y Erusalimsky JD. 2002. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(3): 214-220.

Montalvo Arenas CE. 2010 histologiaunam.mx [homepage on the Internet]. Técnica histológica. [citado en 26 Octubre 2017]; Disponible en: http://histologiaunam.mx/descargas/ensenanza/portal_recursos_linea/apuntes/3_tecnica_histologica.pdf

Morales Cudello S, Junco Sánchez R, Gálvez Álvarez MC, García Delgado BL, Rodríguez González W y Castellanos Gutiérrez R. 2003. Oxigenación hiperbárica en el tratamiento de la enfermedad de Legg-Calvé-Perthes. *Rev Cubana Ortop Traumatol*, 17(1-2): 47-52.

Morris EA y Treadwell BV. 1994. Effect of interleukin 1 on articular cartilage from young and aged horses and comparison with metabolism of osteoarthritic cartilage. *Am J Vet Res*, 55(1): 138-146.

Mortellaro CM. Artrosis u Osteoartrosis. En: Atlas de enfermedades ortopédicas y su predisposición racial. Zaragoza, España: Servet. 2010, pp 8-10.

Mow VC y Rosemwasser MP. 1988. Articular cartilage. Biomechanics. En: Woo SL, Buckwalter JA, editors. Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues. *Illinois: The American Academy Orthop Surg*, 427-63.

Muir H. 1995. The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *Bioessays*, 17(12): 1039-1048.

Murphy AN, Fiskum G y Beal MF. 1999. Mitochondria in neurodegeneration: bioenergetic function in cell life and death. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19(3): 231-245.

Myers SL y Christine TA. 1983. Hyaluronate synthesis by synovial villi in organ culture. *Arthritis Rheum*, 26(6): 764-770.

Nagata S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell*, 88(3): 355-3363.

Nagatomo F, Gu N, Fujino H, Okiura T, Morimatsu F, Takeda I y Ishihara A. 2010. Effects of exposure to hyperbaric oxygen on oxidative stress in rats with type II collagen-induced arthritis. *Clin Exp Med*, 10(1): 7-13.

Najafipour H y Ferrell WR. 1995. Comparison of synovial PO₂ and sympathetic vasoconstrictor responses in normal and acutely inflamed rabbit knee joints. *Exp Physiol*, 80(2): 209-220.

Naoko Y, Kazuo Y, Hiroto F, Haruki M. 2016. Mechanical and oxidative stress in osteoarthritis. *J Phys Fitness Sports Med*, 5(1): 81-86.

NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Oegema TR y Thompson RC. 1986. Articular Cartilage Biochemistry, in Kuettner KE, Schleyerbach R, Hascall VS (eds.) *Raven Press*, 257-271.

Otte P. 1991. Basic cell metabolism of articular cartilage. Manometric studies. *Z Rheumatol*, 50(5): 304-312.

Peng Z, Ren P, Kang Z, Du J, Lian Q, Liu Y, Zhang JH y Sun X. 2008. Up-Regulated HIF-1 α is involved in the hypoxic tolerance induced by hyperbaric oxygen preconditioning. *Brain Res*, 1212: 71-78.

Pérez HE, Luna MJ, Rojas ML y Kouri JB. 2005. Chondroptosis: An immunohistochemical study of apoptosis and Golgi complex in chondrocytes from human osteoarthritic cartilage. *Apoptosis*, 10(5): 1105-1110.

Pfander D y Gelse K. 2007. Hypoxia and osteoarthritis: how chondrocytes survive hypoxic environments. *Curr Opin Rheumatol*, 19(5): 457-462.

Poole CA, Matsuoka A y Schofield JR. 1991. Chondrons from articular cartilage. III. Morphologic changes in the cellular microenvironment of chondrons isolated from osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum*, 34(1): 22-35.

Roach HI, Aigner T y Kouri JB. 2004. Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes? *Apoptosis*, 9(3): 265-277.

Rojas Ortega M, Cruz R, Vega López MA, Cabrera González M, Hernández Hernández JM, Lavallo Montalvo C y Kouri JB. 2015. Exercise modulates the expression of IL-1 β and IL-10 in the articular cartilage of normal and osteoarthritis-induced rats. *Pathol Res Pract*, 211(6): 435-443.

Roman Blas JA, Bizzi E, Largo R, Migliore A y Herrero Beaumont G. 2016. An update on the up and coming therapies to treat osteoarthritis, a multifaceted disease. *Expert Opin Pharmacother*, 17(13): 1745-1756.

Ruhlen R y Marberry K. 2014. The chondrocyte primary cilium. *Osteoarthritis and Cartilage*, 22(8): 1071-1076.

Ruiz Romero C, Calamia V, Mateos J, Carreira V, Martinez Gomariz M, Fernandez M, Blanco FJ. 2009. Mitochondrial dysregulation of osteoarthritic human articular

chondrocytes analyzed by proteomics: a decrease in mitochondrial superoxide dismutase points to a redox imbalance. *Mol Cell Proteomics*, 8(1): 172-189.

Saari H, Konttinen YT, Tulamo RM, Antti Poika I y Honkanen V. 1989. Concentration and degree of polymerization of hyaluronate in equine synovial fluid. *Am J Vet Res*, 50(12): 2060-2063.

Sah RL, Trippel SB y Grodzinsky AJ. 1996. Differential effects of serum, insulin-like growth factor-1, and fibroblast growth factor-2 on the maintenance of cartilage physical properties during long-term culture. *J Orthop Res* 14(1): 44-52.

Sánchez Naranjo JC. 2008. Fisiología del condrocito articular. *Rev Colombiana Reumatol*, 15(1): 21-33.

Sánchez Valenciano Daniel. Análisis del software ImageJ para el análisis científico de imágenes (tesis de licenciatura). Madrid; Universidad Politécnica de Madrid, 2014.

Schneider N, Mouithys Mickalad A, Lejeune JP, Duyckaerts C, Sluse F, Deby Dupont G y Serteyn D. 2007. Oxygen consumption of equine articular chondrocytes: influence of applied oxygen tension and glucose concentration during culture. *Cell Biol Int*, 31(9): 878-886.

Schumacher BL, Su JL, Lindley KM, Kuettner KE y Cole AA. 2002. Horizontally oriented clusters of multiple chondrons in the superficial zone of ankle, but not knee articular cartilage. *Anat Rec*, 266(4): 241-248.

Scott JL, Gabrielides C, Davidson RK, Swingler TE, Clark IM, Wallis GA, Boot Handford RP, Kirkwood TB, Taylor RW y Young DA. 2010. Superoxide dismutase downregulation in osteoarthritis progression and end-stage disease. *Ann Rheum Dis*, 69(8): 1502-1510.

Sellers LM. 1964. The fallibility of the Forrestian principle. *Laryngoscope*, 74: 613-633.

Shieh AC, Athanasiou AK. 2003. Principles of Cell Mechanics for Cartilage Tissue Engineering. *Ann Biomed Eng*, 31(1): 1-11.

Silver IA. 1975. Measurement of pH and ionic composition of pericellular sites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 271(913): 261-272.

Simpson A. Compressed air as a therapeutic agent in the treatment of consumption, asthma, chronic bronchitis, and other diseases. Edinburgh: Sutherland and Knox, 1857.

Smith RL, Rush SF, Ellison BE, Wessells P, Tsuchiya K, Carter DR, Caler WE, Sandell LJ y Schurman DJ. 1996. In vitro stimulation of articular chondrocyte mrna and extracellular matrix synthesis by hydrostatic pressure. *J Orthop Res*, 14(1): 53-60.

Smith RL, Carter DR y Schurman DJ. 2004. Pressure and shear differentially alter human articular chondrocyte metabolism: a review. *Clin Orthop Relat Res*, (427): 89-95.

Sociedad Española de Reumatología (SER). Artrosis: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. Madrid: Médica Panamericana, 2010, pp 91-99, 163-178.

Sophia Fox AJ, Bedi A y Rodeo SA. 2009. The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. *Sports Health*, 1(6): 461-468.

Stockwell RA. 1991. Morphometry of cytoplasmic components of mammalian articular chondrocytes and corneal keratocytes: species and zonal variations of mitochondria in relation to nutrition. *J Anat*; 175: 251-261.

Stockwell R. 1991b. Cartilage failure in osteoarthritis: Relevance of structure and function. A review. *Clin Anat*, 4(3): 161-191.

Subbotina, Nina. Medicina Hiperbárica. 1ª ed. Buenos Aires, 2006.

Sugi T, Sasaki M, Yamashiro T, Tsuneyoshi T, Masaki A, Matsumoto A, Wataru K, Hiroyuki N y Yoshihide M. 2015. Hyperbaric Oxygen Stimulates the Proliferation and Differentiation of Raw264.7 Cel *Open J Stomatol*, 5(12): 309-320.

Takehara Y, Kanno T, Yoshioka T, Inoue M y Utsumi K. 1995. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial energy metabolism by nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*, 323: 27-32.

Tanida I, Ueno T, Komimami E. 2008. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol*, 445: 77-88.

Tarun S y Shweta A. 2012. Use of hyperbaric oxygen therapy in management of orthopedic disorders. *Apollo Medicine*, 9(4): 318-322.

Telley LP y Smith FWK. La consulta veterinaria en 5 minutos. Caninos y felinos. Ed Intermédica Buenos Aires 1998.

Terkeltaub R, Johnson K, Murphy A y Ghosh S. 2002. Invited review: the mitochondrion in osteoarthritis. *Mitochondrion*, 1(4): 301-19.

Thom SR, Bhopale VM, Velazquez OC, Goldstein LJ, Thom LH y Buerk DG. 2006. Stem Cell Mobilization by Hyperbaric Oxygen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290(4): 1378-1386.

Thom SR. 2011. Hyperbaric oxygen: its mechanisms and efficacy. *Plast Reconstr Surg*, 127(1): 131-141.

Thomas DD, Liu X, Kantrow SP y Lancaster JR. 2001. The biological lifetime of nitric oxide: Implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(1), 355–360.

Torres León JM, Domínguez Alegría AR, Navarro Téllez M, Brinquis Crespo MA, Espigares Correa A y Pérez Mochales JF. 2015. Patologías tratadas con oxigenoterapia hiperbárica en el Hospital Central de la Defensa. *Sanid Mil*, 71(2): 77-83.

Troeberg L y Nagase H. 2012. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta*, 1824(1): 133-145.

Trujillo E, Trujillo MM, González T, Mobasheri A y Martín Vasallo P. 2001. The intracellular Na⁺ and K⁺ concentrations measured by atomic absorption spectrophotometer in human healthy and osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 9: 1-69.

Trujillo Martín E. 2005. Canales de agua e iones en el cartílago articular. *Rev Esp Reumatol*, 32(1): 13-17.

Ueng WN, Yuan LJ, Lin SS, Niu C, Chan YS, Wang IC, Yang CY y Chen WJ. 2013. Hyperbaric oxygen treatment prevents nitric oxide-induced apoptosis in articular cartilage injury via enhancement of expression of heat shock protein 70. *J Orthop Res*, 31(3): 376-384.

Urban JPG y Bayliss M. 1989. Regulation of proteoglycan synthesis rate in cartilage in *vitro*: influence of extracellular ionic composition. *Biochim Biophys Acta*, 992(1): 59-65.

Urban JP. 1994. The chondrocyte: a cell under pressure. *Br J Rheumatol*, 33(10): 901-908.

Vega Álvarez JA, García Suárez O, Fernández Monjil D, del Valle Soto M E. 2002. Bioquímica y biología del cartílago articular. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol*, 46(5):379-486.

Wang GL y Semenza GL. 1993. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem*, 268(29): 21513–21518.

Welsch Ulrich. Sobotta: Histología. 3ªed. México: Médica Panamericana, 2013, pp253-256

Whitehair JG, Vasseur PB y Willits NH. 1993. Epidemiology of cranial cruciate ligament rupture in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 203(7): 1016-1019.

Whiteman M, Armstrong JS, Cheung NS, Siau JL, Rose P, Schantz JT, Jones DP, Halliwell B. 2004. Peroxynitrite mediates calcium-dependent mitochondrial dysfunction and cell death via activation of calpains. *FASEB J*, 18(12): 1395–1397.

Wilkins RJ, Browning JA y Urban JP. 2000. Chondrocyte regulation by mechanical load. *Biorheology*, 37(1-2): 67-74.

Xu L, Servais J, Polur I, Kim D, Lee PL, Chung K y Li Y. 2010. Attenuation of osteoarthritis progression by reduction of the discoidin domain receptor 2 in mice. *Arthritis Rheum*, 62(9): 2736-2744.

Yogarathnam JZ, Laden G, Madden LA, Seymour AM, Guvendik L, Cowen M, Greenman J, Cale A y Griffin S. 2006. Hyperbaric Oxygen: A New Drug in Myocardial Revascularization and Protection? *Cardiovasc Revasc Med*, 7(3): 146-154.

Yu XH, Yang YJ, Wang X, Wang QH, Xie M, Qi BX, Liu CT, Wang XL, Jia YJ y Zhong L. 2006. Effect of Hyperbaric Oxygenation on Neural Stem Cells and Myelin in Neonatal Rats with Hypoxic-Ischemic Brain Damage. *Chinese J Contemp Pediat*, 8(1): 33-37.

Yuan LJ, Ueng WN, Lin SS, Yeh WL, Yang CY y Lin PY. 2004. Attenuation of apoptosis and enhancement of proteoglycan synthesis in rabbit cartilage defects by hyperbaric oxygen treatment are related to the suppression of nitric oxide production. *J Orthop Res*, 22(5): 1126-1134.

Yuan LJ, Niu C, Lin SS, Chan YS, Yang CY, Chen WJ y Ueng WN. 2009. Additive effects of hyperbaric oxygenation and platelet-derived growth factor-BB in chondrocyte transplantation via up-regulation expression of platelet-derived growth factor- β receptor. *J Orthop Res*, 27(11): 1439-1446.

Yuan LJ, Niu C, Lin SS, Yang CY, Chan YS, Chen WJ y Ueng WN. 2014. Effects of low-intensity pulsed ultrasound and hyperbaric oxygen on human osteoarthritic chondrocytes. *J Orthop Surg Res*, 9:5.

Yue G, Shuyun L, Jingxiang H, Weimin G, Jifeng C, Li Z, Bin Z, Jiang P, Aiyuan W, Yu W, Wenjing X, Shibi L, Mei Y y Quanyi G. 2014. The ECM-Cell Interaction of Cartilage Extracellular Matrix on Chondrocytes. *BioMed Res Int*, 2014(648459): 8.

Yui N, Yudoh K, Fujiya H y Musha H. 2016. Mechanical and oxidative stress in osteoarthritis. *J Phys Fitness Sports Med*, 5(1): 81-86.

Zhou S, Chiu Z y Urban JPG. 2004. Factors affecting the oxygen concentration gradient from the synovial surface of articular cartilage to the cartilage-bone interface: a modelling study. *Arthritis Rheum*, 50(12): 3915-3924.

Ziskoven C, Jäger M, Kircher J, Patzer T, Bloch W, Brixius K y Krauspe R. 2011. Physiology and pathophysiology of nitrosative and oxidative stress in osteoarthritic joint destruction. *Can J Physiol Pharmacol*, 89(7): 455-466.

ANEXO I. Cámara hiperbárica para uso en animales.

La cámara hiperbárica utilizada para el tratamiento de OHB de animales pequeños se diseñó y construyó con las siguientes características:

Se construyó un cilindro de acero al carbón con medidas de 365 mm de diámetro interno por 830 mm de longitud con un peso de 50Kg. A este cilindro, se le adaptó una compuerta con un sistema de cierre hermético por medio de varios tornillos con cabeza allen que comprimen sobre un sello de goma (O-ring) adecuada al marco de la compuerta. También sobre un costado, la cámara hiperbárica conto con dos mirillas de acrílico de 100mm de diámetro para la visualización de los animales y la iluminación del interior. En el espacio interno se acomodó para el ingreso de varios animales, una caja de acrílico que medía 150 mm de alto por 285 mm de ancho y 770 mm de largo, la cual se dividió en 5 espacios para el alojamiento por separado de cada individuo, sus paredes contaron con pequeños orificios de 5mm de diámetro para permitir la circulación del oxígeno y el aire durante el uso de la cámara hiperbárica (véase Fig. 27 y 28).

La “cámara hiperbárica de tipo híbrido” por su presurización con aire u oxígeno presentó una resistencia en la presión de diseño de 10 ATA y una presión máxima de trabajo de 2.5 ATA. El sistema de suministro de aire comprimido respirable incluyó una compresora y un tanque de aire para almacenar y alimentar al sistema de presurización de la cámara.

Además para el manejo y seguridad en la operación de la cámara hiperbárica, se dispuso de varios dispositivos y accesorios en el panel de control para monitorear, controlar y mantener la presión atmosférica elevada en el interior de la cámara de forma segura. Su panel de control se equipó con una válvula de escape calibrada a una presión de 3.0 ATA para su activación, un sensor de oxígeno para la determinación de porcentaje de saturación de O₂, dos medidores de flujo para el control manual de la entrada y salida de oxígeno para la reposición constate de consumo, tres válvulas de esfera de ½" con cierre de palanca para el control de la compresión con aire u oxígeno, una válvula para la descompresión, un temporalizador para medir el tiempo, un higrómetro y distintos manómetros para la lectura de la presión y las condiciones de temperatura y humedad en el interior de la cámara hiperbárica, así como para la lectura de la presión de aire en el tanque de aire y en el tanque oxígeno.

ANEXO II. PBS1X (1L)

1. Pesar en la balanza analítica:
8g de Cloruro de sodio (NaCl) 3.70×10^4 mM.
0.24g de Fosfato de monopotasio (KH_2PO_4) 14.7mM.
1.15g de Fosfato disódico (Na_2HPO_4) 78.1mM.
2.2g de Cloruro de potasio (KCl) 26.8mM.
2. Diluir todos los componentes en 800ml de agua Milli-Q.
3. Equilibrar a pH de 7.4 en el pHmetro.
4. Aforar a un volumen de 1000ml con agua Milli-Q.

ANEXO III. Paraformaldehido 4% (50 ml)

1. Medir con una probeta 50 ml de PBS1X.
2. Calentar en un matraz hasta tener una temperatura de 55°C .
3. Añadir 2 g de paraformaldehido a la solución.
4. Mantener en agitación a temperatura $55-60^\circ\text{C}$ hasta su completa disolución.
5. Atemperar y almacenar a 4°C .

Nota: su periodo de utilidad una vez preparado es de 2 semanas.

ANEXO IV. Solución EDTA 0.5M pH 7.4 (500ml)

1. Pesar 93g de EDTA y añadir en un vaso de precipitado con 400ml de agua bidestilada.
2. Añadir perlas de hidróxido de sodio (NaOH) hasta que el EDTA se disuelva.
3. Verificar el pH de la solución y equilibrar a pH 7.4 mientras la solución se mantiene en agitación suave a temperatura ambiente (TA).
4. Afora la solución a un volumen de 500ml.
5. Filtrar la solución con un papel filtro.
6. Almacenar en un envase de 500ml a temperatura ambiente.

ANEXO V. Solución de sacarosa al 10% (25ml)

1. Pesar 2.5g de sacarosa.
2. Disolver la sacarosa en un tubo Falcon con 25ml de PBS1X.
3. Se almacena a 4°C .

ANEXO VI. Gelatinización de portaobjetos

Previamente a la gelatinización, los portaobjetos se limpiaron con lavados en extrán, se escurrieron y se desengrasaron en alcohol, por último se dejaron secar y se procedió a la preparación de la gelatina:

1. Pesar 0.25g de gelatina de cerdo (Ted Pella) en polvo.
2. Disolver la gelatina en 50 ml de agua bidestilada a 60°C.
3. Agregar y disolver 0.025g de Sulfato de potasio y cromo ($\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$).
4. Dejar atemperar la solución a temperatura ambiente durante 2 horas.
5. Pasar la solución a un vaso Coplin.
6. Introducir las laminillas en la solución de gelatina.
7. Colocar los portaobjetos en una gradilla y dejar secar a 37°C toda la noche.
8. Retirar del horno y almacenar en su caja a TA.

ANEXO VII. Tinción H-E

Los pasos y tiempos en el tren de tinción fueron los siguientes:

1. PBS1X, 10 min.
2. H₂O destilada, 10seg.
3. Hematoxilina de Harris, 8 min.
4. H₂O corriente, 2 min.
5. Alcohol ácido 1%, 3 sumergidas.
6. H₂O corriente, 2 min.
7. Bicarbonato de sodio 0.1% pH 8.7, 30seg.
8. H₂O corriente, 2 min.
9. Etanol 95%, 10 sumergidas.
10. Eosina 0.25%, 45 seg.
11. Etanol (1) 95%, 1 min.
12. Etanol (2) 100%, 1 min.
13. Etanol (3) 100%, 1 min.
14. Xileno (1), 1 min.
15. Xileno (2), 1 min.
16. Montar cubreobjetos con resina a base de Xileno (Poly-mount[®]).

ANEXO VIII. Tinción Safranina-O-verde rápido

Los pasos y tiempos en el tren de tinción fueron los siguientes:

1. PBS1X, 5 min.
2. H₂O destilada, 2 min.
3. Verde rápido al 0.01%, 10 min.
4. Ácido acético al 1%, 10 seg.
5. Safranina O al 0.1%, 40 min.
6. Etanol (1) 50%, 10 sumergidas.
7. Etanol (2) 70%, 30 seg.
8. Etanol (3) 95%, 30 seg.
9. Etanol (4) 100%, 30 seg.
10. Xileno (1), 1 min.
11. Xileno (2), 1 min.
12. Montar cubreobjetos con resina Poly-mount[®].

ANEXO IX. Inmunohistoquímica

Para el análisis “*in situ*” de la presencia y distribución de los mediadores catabólicos y de muerte celular se realizó distintas pruebas de inmunohistoquímica indirecta con el sistema de detección ABC y el emplearon los siguientes anticuerpos específicos: anti-MMP-13 (200µg/ml, dilución 1:80, Santa Cruz Biotechnology), anti-iNOs (0.052 mg/ml, dilución 1:60, abcam), anti-caspasa-3 (0.2 mg/ml, dilución 1:60, Merck). La metodología de esta prueba se muestra a continuación:

- 1) Secar con aire caliente los portaobjetos con las muestras guardados en congelación.
- 2) Delimitar el espacio de las muestras con una barrera hidrofóbica (PAP Pen[®] vector laboratories).
- 3) Permeabilización con solución de PBS1X con Tritón X-100 al 0.3% por 3 min a TA.
- 4) Bloquear con PBS1X con suero normal de caballo al 1.5% durante 20 min a TA.
- 5) Se añade el anticuerpo primario en PBS1X BSA 0.2% Tritón X-100 al 0.01%.
- 6) Incubación durante una noche a 4°C.
- 7) Lavar 3 veces con PBS1X durante 5 min cada lavado a TA.
- 8) Incubar con el anticuerpo secundario biotinilado goat anti-rabbit 1:200 en PBS1X con suero normal de caballo al 1.5% durante 1 hora a TA.
- 9) Lavar 3 veces con PBS1X durante 5 min cada lavado a TA.
- 10) Incubar con el complejo ABC (vector labs) en PBS1X durante 1 hora a TA.
- 11) Lavar 3 veces con PBS1X durante 5 min cada lavado a TA.
- 12) Revelar con DAB al 0.05%, H₂O₂ 0.01% en PBS1X durante 30 min a TA.

- 13) Parar reacción con agua corriente.
- 14) Deshidratación con concentraciones ascendentes de etoH 50%, 75%, 95%, 100% por 1 min cada uno.
- 15) Clarificar en Xileno (1), 1 min.
- 16) Incubar en Xileno (2), 1 min
- 17) Montar cubreobjetos con resina Poly-mount[®].

ANEXO X. Prueba de TUNEL

El análisis *in situ* de la apoptosis se realizó utilizando un kit de detección de muerte celular, DeadEnd Fluorometric TUNEL System (Promega) Para esta prueba se procesaron las muestras obtenidas de 4 individuos para cada grupo OA.

- 1) Secar al aire.
- 2) Hacer dos lavados con PBS1X durante 5 min cada uno.
- 3) Permeabilizar con PBS1X con Tritón X-100 al 0.2% por 5 min.
- 4) Hacer dos lavados con PBS1X de 5min cada uno.
- 5) Mantener en 100µl de buffer de equilibrio durante 10 min a TA.
- 6) Incubar las muestras una hora con 34µl de la mezcla de nucleótidos y 0.69 µl de enzima Deoxinucleotidil transferasa terminal (rTdT) a 37°C en buffer de equilibrio.
- 7) Lavar una vez con solución salina-citrato de sodio 2X (SSC2X) durante 15min a TA.
- 8) Lavar con PBS1X 5 veces durante 3min cada uno a TA.
- 9) Incubar con DAPI (1/1000) durante 5 min.
- 10) Lavar con PBS1X 5 veces por 3 min cada uno a TA.
- 11) Montar cubreobjetos con resina Poly-mount[®].

ANEXO XI. Medidas en las imágenes macroscópicas

Grupo OA sin tratamiento	Área del cóndilo medial (mm²)	Área de la lesión (mm²)
1	9.605	1.585
2	12.782	2.623
3	11.661	3.134
4	10.144	5.673
5	10.446	3.472
Promedio	10.9276	3.2974

Medidas obtenidas por análisis de imagen para la evaluación macroscópica en el grupo OA sin tratamiento.

Grupo OA con tratamiento OHB	Área del cóndilo medial (mm²)	Área de la lesión (mm²)
1	9.911	2.696
2	10.835	3.222
3	11.416	2.128
4	11.912	1.611
5	10.519	3.072
Promedio	10.9186	2.5458

Medidas obtenidas por análisis de imagen para la evaluación macroscópica en el grupo OA con tratamiento.

ANEXO XII. Densidad integrada de la señal positiva para los mediadores catabólicos analizados por inmunohistoquímica

Sham sin Tx	Sham OHB	OA sin Tx	OA OHB
2189900.000	1391518.000	660359.300	742271.900
1080356.000	1333938.000	478531.100	1079289.000
1266678.000	1681316.000	1009855.000	1131249.000
1931068.000	1219440.000	346355.200	1144973.000
1741236.000	82959.520	431332.800	1383546.000
2144601.000	811324.400	622444.300	1083201.000
804697.400		406442.300	268529.700
697530.700		480044.300	200483.800
1066828.000		528732.900	250861.900
1485361.000		764354.700	431366.500
793179.900		1378293.000	297900.700
257271.700		1427514.000	545525.100
		338549.900	1280408.000
		254168.100	1117056.000
		276736.600	1319535.000

Valores en unidades arbitrarias (UA) de la densidad integrada para MMP-13.

Sham sin Tx	Sham OHB	OA sin Tx	OA OHB
711083.900	458767.100	121876.400	55065.260
997694.600	963454.000	178642.900	63118.380
924890.700	795159.100	10258.350	50881.890
1758012.000	1847037.000	231533.600	128349.100
1862442.000	1909251.000	350499.400	314238.900
1625079.000	2212898.000	249580.900	676682.200
267705.300	58672.650	44637.210	115888.500
38220.220	45187.750	22088.680	14203.440
152344.100	134774.300	793.605	21075.560
182588.000	17220.940	65965.880	17842.720
97385.090	35755.070	6227.245	38642.140
463632.500	42857.430	24274.610	60535.130
9269.922	88353.470	26199.630	30834.970
18070.880	70108.550	32480.860	80607.910
31485.820	132421.000	18683.120	40554.590

Valores en UA de la densidad integrada para iNOS.

Sham sin Tx	Sham OHB	OA sin Tx	OA OHB
238869.000	50047.760	22156.610	7265.805
220839.000	72358.340	29158.960	4193.163
236168.000	52255.750	13461.130	8720.244
182771.600	550496.600	33824.110	101705.100
65477.250	94318.000	44475.090	79429.640
100966.500		95955.980	196653.400
38504.610	14571.370	60404.540	29570.340
39476.430	38177.760	27721.990	14104.260
17581.870	70706.120	9273.615	16872.310
78349.480	134975.200	16462.150	26704.500
88489.450	195385.600	29973.050	12150.630
30590.880		14845.520	7226.012
40596.410	98003.950	6984.783	15090.310
55094.970	54752.860	6152.831	25693.530
18160.990	22536.070	6584.705	5959.777

Valores en UA de la densidad integrada para Caspasa 3 activa.

**ANEXO XIII. Porcentaje de muerte celular
obtenida mediante ensayo de TUNEL**

Muestra	%MUERTE OA sin Tx	%MUERTE OA OHB
1.1	26.92307692	0.68493151
1.2	45	3.65853659
1.3	20.68965517	1.92307692
2.1	3.448275862	0
2.2	56.75675676	5.61797753
2.3	9.615384615	5.61797753
3.1	28.57142857	5.55555556
3.2	14.60674157	2.7027027
3.3	14.54545455	0
4.1	3.278688525	1.19047619
4.2	4.444444444	0
4.3	3.389830508	1.63934426
PROMEDIO	19.27247812	2.38254823
DESVIACION ESTANDAR	16.65757116	2.13757336

Valores en el porcentaje de muerte celular en muestras de cartílago osteoartítico del grupo OA con y sin tratamiento de OHB.