



# **Universidad Nacional Autónoma de México**

---

Posgrado en Ciencias de la Producción y Salud Animal  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

## **"Efecto de la administración intraarticular de Nanopartículas de Quitosán con Glutación, en Osteoartrosis"**

### **Tesis**

que para optar por el grado de  
**Maestra en Ciencias de la Producción y Salud Animal**

**Presenta:**

**MVZ. Iliane Zetina Marin**

**Tutora: Dra. Patricia Ramírez Noguera**  
**FES Cuatitlán**

**Comite Tutorial:**

**Dra. María Masri Daba (Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia)**  
**Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte (Instituto de Investigaciones Biomédicas)**

**Cuautitlán Izcalli, Estado de México**

**Junio 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



# Reconocimientos

Este trabajo fue apoyado por los proyectos: PAPIIT IN219715 y PAPIME PE102118.

Gracias al Laboratorio 9 de Toxicología Celular, de mi alma mater la FES-Cuautitlán, por brindarme la oportunidad de continuar con mi formación académica.

Al Instituto Nacional de Rehabilitación por su asesoría en la planeación e instrucción de los procedimientos médico-quirúrgicos con las ratas Wistar.

Gracias al Hospital de Pequeñas Especies, por facilitarnos su equipo de radiología para la elaboración de este trabajo, así como del MVZ Jorge Rodríguez por su apoyo técnico en la misma materia.

Agradezco todo el apoyo brindado por el Laboratorio de Apoyo a Histología y Biología, de la sección de Ciencias Morfológicas de la FESC y al trabajo realizado por el MVZ Germán Garrido. Así como al Departamento de Patología de la FMVZ y al trabajo realizado por Karen Guitareo Quintana.

Este trabajo no podría haber sido posible sin el apoyo del Dr. Gabriel Ospina y la Dra. Margarita Chavarín del Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas CU.

# Dedicatoria

A mi Mami, por aguantarme todas mis loqueras y ayudarme a hacer mis sueños realidad.

Por estar en cada paso de mi vida y darme el apoyo incondicional que solo una madre sabe dar.

# Agradecimientos

Agradezco la ayuda de toda la gente que participó en la colaboración de este trabajo de investigación.

Gracias a la Dra. Patricia Ramirez y el Dr. Roberto Díaz, por darme la oportunidad de participar en este proyecto y unirme a su grupo de trabajo. Le estoy agradecida a todo el Laboratorio 9 de UIM, por su apoyo y compañía a lo largo de todo este proceso.

También le doy las gracias a la Dr. María Masri por todo el apoyo que me brindó en este proyecto.

En especial quiero agradecer el apoyo de la Dra. Margarita Chavarin, que sin su gran apoyo y guía este trabajo no hubiera podido salir adelante.

Gracias a mis maestros que me han enseñado tanto, al MC Moises Valderrama y al MVZ Jesús Valdez por sus valiosos consejos e increíble amistad.

Y gracias de todo corazón a mis alumnos y amigos, que sin su colaboración no habría sobrevivido.



# Resumen

La osteoartrosis es una enfermedad degenerativa e incapacitante, que afecta tanto a personas como animales y los limita en su calidad de vida y función zootécnica. Debido a la capacidad limitada del cartílago para regenerarse, se han realizado numerosas investigaciones para hallar medicamentos que retrasen el desarrollo de esta enfermedad. En estudios previos se ha observado la capacidad *in vitro* de Nanopartículas de Quitosán con Glutación (Np-GSH) para regular el estado óxido-redox en condrocitos humanos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de las Np-GSH en un modelo *in vivo*, utilizando ratas macho Wistar con Osteoartrosis inducida quirúrgicamente. Para lo cual se realizaron evaluaciones a partir de exámenes radiográficos, bioquímicos (cuantificación de GSH y TBARS), histopatológicos e inmunohistoquímicos (Col-2 y MMP-13), con el fin de evaluar el progreso de la enfermedad tras la administración de una dosis única de Np-GSH. Nanopartículas de Quitosán sin el principio activo (GSH) demostraron generar inflamación y fibrosis de la articulación a la dosis empleada de 0.6mg/kg en comparación con el grupo tratado con ácido hialurónico. Los efectos adversos generados por las Nanopartículas de quitosán parecen estar asociados a la dosis alta de Quitosán. Por otra parte las Np-GSH demostraron tener un efecto protector significativo, comparado con las Nanopartículas sin GSH. Los efectos celulares asociados a la condroprotección se observan en el análisis histopatológico, que sugieren un papel importante del GSH en la regulación del progreso de la enfermedad. Los resultados de este trabajo sientan las bases para continuar en el estudio de los efectos biológicos observados *in vivo* asociados a la administración intraarticular de sistemas de nanopartículas que pueden contribuir a la regulación del estado óxido reducción y la disminución en el progreso de la enfermedad.

# Abstract

The osteoarthritis is a degenerative and disabling disease for both humans and animals, resulting in an incapacitating disease that affects their quality life and horse's occupation. Due to the cartilage's limited capacity for regeneration, numerous studies have been conducted to find new drugs that modify the disease's progression. Previous studies have shown the capacity of Chitosan Nanoparticles with Glutathione (Np-GSH) to regulate the oxido-redox status in *in vitro* human's chondrocytes. The objective of this work was to evaluate the Np-GSH capacity *in vivo*, using Wistar rats with induced surgical osteoarthritis. Radiographic, biochemical (GSH and TBARS quantification), histopathological and immunohistochemical (Col-2 and MMP-13) analyzes were evaluated to see the progress of the osteoarthritic lesions after the administration of a single dose of Np-GSH. Chitosan nanoparticles without GSH proved to generate inflammation and fibrosis of the joint at a dose of 0.6mg/kg, comparing with the group treated with hyaluronic acid and Np-GSH. Np-GSH showed to have a significant protective effect compared to the nanoparticles without GSH. The cellular effects associated to the chondroprotection were observed in the histopathological analysis, suggesting an important GSH role on disease progression. The present study provides strong knowledge to continue the search of the biological effects observed *in vivo* associated with the intraarticular administration of nanoparticulated systems that could contribute in the redox balance and the disease progress events.



# Índice

ABREVIATURAS	10
ÍNDICE DE FIGURAS	12
ÍNDICE DE TABLAS	12
ÍNDICE DE GRÁFICAS	13
INTRODUCCIÓN	14
MARCO TEÓRICO	17
Cartílago Articular	17
Matriz Extracelular Cartilaginosa (MEC)	17
Fisiología del Cartílago Hialino	19
Nutrición	19
Recambio de la MEC	20
Señalización	21
Senescencia	21
Osteoartrosis	22
Tratamientos farmacológicos	25
Fisiopatología de la OA	27
Osteoartrosis y Estrés Oxidativo	29
Papel del Glutación en el Estrés Oxidativo	31
Nanopartículas de Quitosán	33
Nanotecnología	33
Quitosán	34
JUSTIFICACIÓN	35
HIPÓTESIS	35
OBJETIVO GENERAL	36
OBJETIVOS PARTICULARES	36
MATERIALES Y MÉTODO	37
Materiales y Equipos	37

Materiales 37

Biológicos 38

Equipos 38

## Metodología 38

Preparación de Nanopartículas 38

Caracterización de las Nanopartículas 39

Población de Estudio e Inducción de OA 39

Administración de Tratamientos 40

Estudio Radiográfico 41

Sacrificio y Procesamiento de la Muestra 41

Cuantificación de GSH 41

TBARS 42

Histopatología 42

Inmunohistoquímica 43

Análisis estadístico 44

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN 45

Preparación y Caracterización de Nanopartículas 45

Concentración de Quitosán y GSH 47

Inducción de la Osteoartrosis y Administración de Tratamientos 47

Evaluación Radiográfica 48

Cuantificación de Glutación 50

Cuantificación de TBARS 52

Evaluación Histopatológica e Inmunohistoquímica 53

## CONCLUSIONES 68

## PERSPECTIVAS 69

## REFERENCIAS 70

## ANEXOS 77

# ABREVIATURAS

<b>ADAM</b>	Agreganasa
<b>AH</b>	Ácido Hialurónico
<b>AINE</b>	Antiinflamatorio no esterooidal
<b>bFGF</b>	Factor de Crecimiento de Fibroblastos
<b>BMP</b>	Proteína Morfogénica del Hueso
<b>cNOS</b>	NOS constitutiva
<b>Col</b>	Colágena
<b>COX</b>	Ciclooxigenasa
<b>GAG</b>	Glicosaminoglicano
<b>GP</b>	Glicoproteínas
<b>GPx</b>	Glutación Peroxidasa
<b>GSH</b>	Glutación
<b>GSSG</b>	Glutación oxidado
<b>HE</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>IGF</b>	Factor de Crecimiento Insulínico
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IL-1Ra</b>	Antagonista de IL-1
<b>MDA</b>	Malondialdehido
<b>MEC</b>	Matriz Extracelular Cartilaginosa
<b>MMP</b>	Metaloproteinasa
<b>MT-MMP</b>	Metaloproteinasa tipo Membrana
<b>NFG</b>	Factor de Crecimiento Nervioso
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>NOS</b>	Óxido Nítrico Sintetasa
<b>NP</b>	Nanopartícula
<b>Np-GSH</b>	Nanopartícula de Quitosán con Glutación
<b>Np-Q</b>	Nanopartícula de Quitosán
<b>OA</b>	Osteoartrosis

<b>PG</b>	Proteoglicanos
<b>PGE</b>	Prostaglandina E
<b>ROS</b>	Especies reactivas del Oxígeno
<b>SOD</b>	Superóxido Dismutasa
<b>Sol. Hartmann</b>	Solución Hartmann
<b>TGF</b>	Factor de Crecimiento Transformante
<b>TIMP</b>	Inhibidor Tisular de Metaloproteinasas
<b>TLCC</b>	Transección del Ligamento Cruzado Craneal
<b>TNF</b>	Factor de Necrosis Tumoral
<b>UV</b>	Ultravioleta

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Reacción óxido-reducción del GSH	31
<b>Figura 2.</b> Resumen del metabolismo del GSH	32
<b>Figura 3.</b> Estructura química del quitosán	34
<b>Figura 4.</b> Modelos para generación de osteoartritis	40
<b>Figura 5.</b> Articulación de la rodilla antes y después de TLCC	47
<b>Figura 6.</b> Radiografías de los grupos con Sol. Hartman y Np-GSH	49
<b>Figura 7.</b> Histopatologías de las rodillas, tinción HE y van Gieson de los diferentes tratamientos	54
<b>Figura 8.</b> Histopatologías de las rodillas, tinción naranja de acridina de los diferentes tratamientos.	58
<b>Figura 9.</b> Histopatologías de las rodillas, tinción azul de toluidina y safranina O de los diferentes tratamientos.	59
<b>Figura 10.</b> Inmunohistoquímicas de las rodillas con Colágena 2A1 y MMP-13	63

# ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Media, moda, desviación estándar y concentración de las diferentes nanopartículas	46
<b>Tabla 2.</b> Tratamientos de cada grupo experimental	48

# ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Distribución de tamaño de las diferentes nanopartículas	45
<b>Gráfica 2.</b> Grados de lesión según la escala Kellgren y Lawrence de los diferentes tratamientos	50
<b>Gráfica 3.</b> Concentración de GSH en cartílago y meniscos de los diferentes tratamientos	51
<b>Gráfica 4.</b> Concentración de MDA en cartílago y meniscos de los diferentes tratamientos	52
<b>Gráfica 5.</b> Efecto de los diferentes tratamientos sobre las características morfológicas del cartílago (Distribución celular, Morfología celular, Población, Tide Mark y Hueso Subcondral)	57
<b>Gráfica 6.</b> Efecto de los diferentes tratamientos sobre las características morfológicas del cartílago (Superficie, MEC, Pérdida de PG, Col-2 y MMP-13)	62
<b>Gráfica 7.</b> Rangos según la prueba de Kruskal-Wallis sobre evaluación del examen histopatológico.	66

# INTRODUCCIÓN

La osteoartritis es una enfermedad degenerativa, progresiva e incapacitante del cartílago articular, acompañada por cambios en el hueso y tejido blando subyacentes. Se caracteriza principalmente por la erosión progresiva del cartílago articular, donde el mismo proceso inflamatorio causa la degradación de la matriz extracelular, junto con la muerte de los condrocitos.

El cartílago se caracteriza por tener una capacidad muy limitada de reparación. El proceso inflamatorio colabora en el deterioro de la articulación por liberación de metaloproteinasas, mediadores inflamatorios y citocinas, las cuales degradan a los proteoglicanos, así como disminuyen su síntesis, causando la depleción de la matriz cartilaginosa<sup>1, 2</sup>.

Por otro lado, la isquemia y la reperfusión generadas por la artritis, conducen a la producción de radicales libres y especies reactivas del oxígeno, que a su vez degradan las cadenas de ácido hialurónico y glicosaminoglicanos, inhiben su síntesis, incrementan la producción de citocinas y metaloproteinasas e induce la apoptosis de los condrocitos<sup>3</sup>.

Actualmente no existe un tratamiento efectivo que detenga el avance de esta enfermedad<sup>4</sup>. Las lesiones articulares se tratan convencionalmente con anti-inflamatorios no esteroideos (AINE's), así como con glicosaminoglicanos, con el fin de detener el proceso inflamatorio, reducir el dolor y mejorar la función de la articulación, sin embargo solo representan un tratamiento sintomático, cuya efectividad es aún cuestionable<sup>5, 6, 7, 8</sup>. Nuevas investigaciones se han centrado en el uso de mediadores de la inflamación, como en la administración de bifosfonatos, el uso de terapia génica o suero autólogo y si bien en muchos casos se les han encontrado un efecto positivo, los resultados obtenidos son contradictorios<sup>5, 8, 9, 10, 11</sup>.

Estudios recientes han sugerido el empleo de sustancias antioxidantes dentro del líquido sinovial, que puedan generar efectos importantes en el tratamiento de la osteoartritis. Específicamente, sustancias que regulen directamente el proceso oxidativo, más que la eliminación de los radicales libres o la supresión del proceso inflamatorio<sup>3, 7, 12, 13</sup>. Uno de estos antioxidantes es el glutatión, un tripéptido el cual juega un papel importante en la apoptosis, ya que la disminución de la cantidad de glutatión es limitante en la regulación del estado redox, modulando la cantidad de radicales libres o ayudando en la reacción catalítica de enzimas antioxidantes como la

glutathionperoxidasa<sup>13, 14</sup>. Otra molécula de interés en este trabajo es el quitosán, un biopolímero natural con capacidad antioxidante, al interrumpir la reacción en cadena de la oxidación, reduciendo la lipoperoxidación e incrementando la actividad de enzimas antioxidantes. Aunado a esto se le han atribuido propiedades antiinflamatorias, al inhibir a las metaloproteinasas<sup>12</sup>.

Considerando que dentro de los eventos celulares que contribuyen a la osteoartritis se encuentra el desequilibrio óxido-reducción, inflamación y la baja contribución de los complejos antioxidantes para controlar este estado, así como la desorganización y función de proteoglicanos y colágena de la MEC en donde el aporte de actividad antioxidante es importante. En el laboratorio 9 de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación se inició el estudio de la respuesta antioxidante inducida por nanopartículas de quitosán con glutatión en condrocitos humanos.

Previamente, estudiamos el efecto dosis-respuesta antioxidante *in vitro*, de las células de cultivos primarios de condrocitos humanos extraídos de cartílago hialino, que fueron expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub> y a las nanopartículas. Además, por medio de microscopía de fluorescencia y confocal, se demostró la ubicación de las nanopartículas tanto en el citoplasma celular cerca de la perifería del núcleo, así como dentro de este en menor medida, sin afectar la morfología ni la viabilidad celular de los cultivos de condrocitos utilizados<sup>16</sup>.

De acuerdo a los resultados obtenidos el GSH contenido en las NP pudo ser vectorizado a los condrocitos y ser utilizado por la célula para modular el estado oxido-reducción, disminuyendo la producción de ROS y radicales libres inducidos por agentes xenobióticos oxidantes, aumentando los niveles de GSH, así como la actividad de la GPx, y disminuyendo la lipoperoxidación. Estos resultados son muy importantes tomando en cuenta que la síntesis de GSH se desarrolla exclusivamente en el citoplasma celular y su cantidad en condiciones de un desequilibrio óxido reducción puede estar en defecto. Por lo que los resultados permiten considerar a estas nanoestructuras como una herramienta en estudio útil para reducir el daño asociado al estrés oxidativo en diversas enfermedades

Con estos antecedentes en este trabajo de investigación preparamos sistemas nanoparticulados a partir de quitosán y que puedan ayudar al glutatión a ser vectorizado al interior de la célula en un modelo de osteoartritis inducida quirúrgicamente<sup>15</sup>.



Para el estudio *in vivo* de la osteoartrosis, se ha implementado el uso de modelos experimentales inducidos quirúrgicamente, que permiten obtener lesiones altamente reproducibles, con poca variabilidad y de rápido progreso, que homogenicen la gran gama de variables existentes, haciéndolo ideal para estudios de corto tiempo<sup>7, 9, 17</sup>.

# MARCO TEÓRICO

## Cartílago Articular

Se conoce a las articulaciones sinoviales o diartrosis como aquellas uniones entre dos o más huesos, que presentan un espacio entre sí, lo que permite generar movimientos amplios<sup>18</sup>. Es importante considerar a las articulaciones como órganos complejos, compuestos de diferentes tejidos.

Estos están compuestos por una base ósea recubierta en su superficie articular por un tejido especializado, **cartílago articular**, y aislada del resto de los tejidos por una cápsula articular. La cápsula mantiene a la articulación en su posición junto con ligamentos extraarticulares y en algunas articulaciones también por ligamentos intraarticulares y meniscos (aparato fibroso)<sup>18, 19</sup>. Los meniscos, constituidos de fibrocartílago, ayudan a adosar superficies articulares irregulares y estabilizan la articulación junto con la acumulación de grasa<sup>19</sup>.

El protagonista en toda articulación es el cartílago articular (de tipo hialino), el cual recubre y da protección a las superficies óseas de la articulación<sup>18</sup>. Su apariencia es lisa, brillante, húmeda y de color blanco a ligeramente azulado, sin embargo con la edad este tiende a volverse más amarillento, mate, rugoso y menos hidratado conforme va perdiendo también sus propiedades mecánicas. Es deformable y viscoelástico lo que le permite amortiguar los choques, pero sobre todo se caracteriza por ser un tejido avascular y no inervado. La célula residente es el condrocito, una célula ovalada que se aloja en pequeñas lagunas inmersas a su vez en la matriz extracelular (matriz cartilaginosa)<sup>18, 19</sup>.

### **Matriz Extracelular Cartilaginosa (MEC)**

El cartílago está compuesto en su mayor parte de agua (60-80%) y una matriz extracelular formada por fibras de colágena tipo II (>60%), hundidas en un gel de sustancia fundamental rico en Proteoglicanos (PG) y Glicoproteínas (GP), sintetizados por la única célula residente del cartílago, el condrocito<sup>1, 19</sup>.

La Matriz ExtraCelular (MEC) está constituida por<sup>19</sup>:

**- Fibras de colágeno:**

En el cartílago existe colágena tipo I en cápsula y ligamentos y tipo II en cartílago, meniscos y sinovia. Existen otros tipos de colágena que ayudan a la unión de las fibras tipo I y II, como son el tipo VI unión a tipo II y XV unión a tipo I. Los colágenos V, IX, XI no polimerizan espontáneamente, pero participan en la fibrogénesis, asociándose a las fibras de colágena. La presencia de estas colágenas parece controlar el diámetro de las fibras y participan en la organización de la matriz al interactuar con otras moléculas. El tipo X está asociado a la maduración, ya que está presente en cartílago de crecimiento, sin embargo también es característico del tejido hipertrofiado.

**- Ácido Hialurónico (AH):**

Es un polímero lineal no sulfatado que contiene un gran número de unidades disacáridas, compuestas de ácido glucurónico y N-acetil-glucosamina. Con un peso molecular de 2000 kDa, tiene propiedades hidrodinámicas que determinan la composición química del medio ambiente pericelular y al mismo tiempo interactúa con otras moléculas para generar señales. En el agua el AH forma una red densa de moléculas entrelazadas, estabilizadas por puentes de hidrógeno que oponen una fuerte resistencia al desplazamiento, dando la viscosidad, elasticidad y turgencia. Al envejecer el AH tiende a aumentar en concentración pero con menor peso molecular, perdiendo elasticidad.

**- Glicoproteínas (GP):**

Son proteínas glicosiladas de 40-48 kDa, que confieren estabilidad molecular (proteínas de unión). Algunos ejemplos son: COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein), tromboespondina-5, la familia de las matrilinas y la fibronectina.

**- Proteoglicanos (PG):**

Son macromoléculas compuestas por un filamento proteico central, el cual se une a varias cadenas lineales de glicosaminoglicanos y oligosacáridos. Su función es ser el cemento que rellena los espacios entre las fibras de colágeno, formando un gel que solidifica creando una red molecular altamente organizada que determina el tamaño y espacio entre las fibras de colágena, confiriendo cohesión, turgencia y resistencia. También proveen hidrofília al tejido, gracias a sus cargas electromagnéticas que fijan al agua, las cuales disminuyen con la edad y la acción proteica, ya que los PG se rompen fácilmente en medios alcalinos y por cargas negativas.

# Fisiología del Cartílago Hialino

## Nutrición

La función del líquido sinovial es ejercer como una sustancia lubricante y amortiguadora para la articulación, pero aún más importante, es el responsable de la nutrición del cartílago articular. Debido a que el cartílago es avascular, los nutrientes y el oxígeno deben alcanzar al condrocito de distintas maneras, desde el líquido sinovial. Muchas de las sustancias nutritivas pueden quedar almacenadas en la MEC generando un gradiente favorable para su paso hacia el condrocito, a través de los cambios de osmolaridad externa, que ocasionan movimientos de agua a través de la membrana del condrocito, que es libremente permeable a ella gracias a la expresión de acuaporina-1. Así como también gracias al movimiento articular que comprime al líquido sinovial, hacia la matriz extracelular<sup>19</sup>.

La composición del líquido sinovial, así como de la MEC son esenciales para la nutrición y correcto funcionamiento del condrocito, ya que este es muy susceptible a los cambios osmóticos, concentración de oxígeno y glucosa. Y una alteración en alguno de estos componentes en el líquido sinovial, lleva a un funcionamiento inadecuado del condrocito con aumento en la producción de radicales libres, disminuyendo entre otros factores, la liberación de los proteoglicanos<sup>1</sup>.

El cartílago posee un metabolismo anaerobio, cuya nutrición es a través de la difusión de los nutrientes desde el líquido sinovial y a través de la MEC<sup>20</sup>. La membrana sinovial funge como una barrera hematoarticular, la cual deja pasar el plasma y solutos de bajo peso molecular (urea, glucosa, albúmina), electrolitos y oxígeno a través del espacio intersticial. Posteriormente en la MEC, su gel de AH, GP y PG, actúan como un filtro selectivo, que deja pasar libremente agua y sustancias pequeñas sin carga eléctrica (glucosa), mientras que las moléculas con carga ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$ ) son retenidas<sup>19</sup>.

El líquido sinovial a su vez, pasa lentamente hacia los vasos linfáticos de la cápsula para su recambio y eliminación de los desechos celulares. La circulación del líquido intersticial se debe al movimiento (fases de compresión y descompresión). Sin un movimiento constante el cartílago entra en un estado de hipoxia y privación de las sustancias nutritivas, acumulando desechos metabólicos que bajan el pH, activan las proteasas y favorecen los procesos de destrucción de la MEC.

En el cartílago en desarrollo, la nutrición proviene del hueso subcondral, ya que la capa basal aún no se ha calcificado y el líquido intersticial circula en el cartílago a través de los poros de la matriz<sup>18, 19</sup>.

## **Recambio de la MEC**

Para conservar el ambiente apropiado que le de sustento a los condrocitos, es necesario el recambio del líquido sinovial, así como de la MEC. El recambio de la MEC está regulado por una serie de factores como son la distribución de la carga mecánica y el efecto de citocinas, producidos por sinoviocitos y condrocitos<sup>19</sup>.

En el cartílago el principal factor anabólico, es el Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Activado por los estímulos mecánicos, el TGF- $\beta$  es liberado de forma latente por los condrocitos, regulando la transcripción para la síntesis de las proteínas del cartílago articular.

En condiciones normales, existe una constante síntesis de pequeñas cantidades de TGF- $\beta$  por parte de los condrocitos, que a través de la señalización autócrina y parácrina, activan la transcripción de los compuestos de la matriz, de igual forma los sinoviocitos se ven estimulados para la síntesis del líquido sinovial<sup>19, 20</sup>.

Otros factores anabólicos son el Factor de Crecimiento Insulínico tipo 1 (IGF-1) y el Factor de Crecimiento de Fibroblastos (bFGF). Así mismo la insulina tiene el mismo efecto, mientras que los glucocorticoides ayudan a la diferenciación de los condroblastos a condrocitos, pero inhiben su proliferación y la producción de matriz, aumentando el catabolismo (atrofia del tejido).

Los versicanos y otros pequeños proteoglicanos (biglicanos) tienen la capacidad de fijar y en consecuencia secuestrar al TGF- $\beta$  y bFGF impidiendo que realicen su función. La destrucción de estos da pie a la liberación de los factores anabólico estimulando la síntesis de cartílago<sup>19</sup>.

La degradación del AH depende de la presencia y actividad de enzimas específicas (hialuronidasas y condroitinasas), así como también de la presencia de radicales libres<sup>19</sup>.

Los factores de crecimiento además de estimular la síntesis de MEC, estimulan la activación de enzimas denominadas metaloproteinasas (MMP) a través de citocinas

proinflamatorias, que degradan los componentes de la MEC. La hidrólisis de la proteína central en sitios específicos por acción de las MMP, provoca la liberación de grandes fragmentos de proteoglicanos que difunden fuera del tejido hacia la cavidad sinovial, que serán posteriormente drenados por la linfa, ayudado por el movimiento de la articulación<sup>19, 21</sup>. Las principales metaloproteinasas en el cartílago son: colagenasas (1, 8, 13), gelatinasas (2 y 9) y matrilisinas (7 y 26). Sin embargo, existen otras MMP como las MT-MMP (Membrane Type-MMP), MMP unidas a la membrana celular, Agrecanasas (ADAM) y tromboespondinas (ADAMTS)<sup>18, 22, 23</sup>.

Se encuentran de manera normal concentraciones de MMP inactivas en el cartílago y membrana y solo una muy pequeña cantidad es activada, mientras otra es inhibida por la acción de inhibidores endógenos que incluyen a la 2-macroglobulina e inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs)<sup>22, 23</sup>.

## **Señalización**

El cartílago carece de mecanorreceptores, sin embargo las interacciones entre los condrocitos y la matriz extracelular actúa como tales, transmitiendo la información a los condrocitos a partir de las fuerzas de presión y tensión del cartílago.

Integrinas sobre la membrana celular de los condrocitos, interactúan con las fibras de colágena y otros elementos de la matriz cartilaginosa, generando señales para advertir al condrocito de la necesidad de mitosis o síntesis de matriz u otras moléculas<sup>19</sup>.

## **Senescencia**

Con la edad, el cartílago se caracteriza por presentar mayor rigidez, disminuyendo la densidad celular debido a la apoptosis. Las fibras de colágena se espesan, haciéndose menos solubles y más resistente al ataque enzimático, sin embargo, las fibras se hacen menos resistentes a la tracción y más quebradizas.

Estos cambios se han visto relacionados con un aumento del estrés oxidativo, así como por la falta de señalización mecánica (ejercicio). A su vez la pérdida de elasticidad del cartílago senescente aumenta el tiempo de recuperación del volumen inicial retrasando la circulación del líquido intersticial y causando una mala oxigenación de los condrocitos, agravando el daño<sup>1, 19</sup>.

Las lesiones senescentes se diferencian de las osteoartrósicas, por encontrarse en sitios de poco apoyo mecánico, representadas por fisuras superficiales, no tan graves como en la OA, con úlceras que no tienden a agravarse. En la OA, la lesión tiende a ser más profunda, sus bordes más netos, las células más escasas y agrupadas en clonas<sup>19</sup>.

## Osteoartrosis

La osteoartrosis es una enfermedad de evolución progresiva que afecta a un alto número de especies y que se caracteriza por la degradación progresiva del cartílago con inflamación y dolor de la articulación, lo que lleva a una limitación del movimiento<sup>1, 2, 19</sup>.

La enfermedad se genera a partir de un estrés mecánico, que sobrepasa la capacidad del cartílago para remodelarse y atender a las necesidades biomecánicas de la articulación, desencadenando en un desequilibrio entre la síntesis (anabolismo) y la degradación (catabolismo) del cartílago en el recambio habitual de la matriz extracelular<sup>2</sup>. De manera secundaria y con intención de limpiar el espacio intraarticular de los detritus celulares, causados por la degeneración del cartílago, se desencadena un proceso inflamatorio<sup>19</sup>.

Este estrés es causado principalmente por contusiones repetitivas o bien se puede desencadenar de manera aguda debido a un trauma, causando la fractura y desprendimiento de una porción de hueso subcondral (fragmento osteocondral), que a su vez ocasiona compresión sobre las superficies articulares opuestas, generando estrés y más daño.

El daño generalmente inicia en el hueso, quien es más sensible a las cargas impulsivas y repetitivas, y que en un intento por adaptarse va formando hueso nuevo (remodelación por estrés), menos elástico y más duro, lo que aumenta el estrés sobre el cartílago. El estrés mecánico genera la ruptura de la envoltura superficial de las fibras de colágeno y provocan la aparición de fisuras en la superficie del cartílago (microfracturas) y adelgazamiento del cartílago, culminando en la ruptura del cartílago a nivel de la línea basal<sup>19, 24</sup>.

El desarrollo de la osteoartrosis se caracteriza por una proliferación inicial, seguida de apoptosis, cambios en la actividad de la síntesis de matriz extracelular, modulación fenotípica de los condrocitos con cambio en el tipo de colágena sintetizada, degradación del cartílago con exposición del hueso subcondral y formación de osteofitos<sup>25</sup>

Es una enfermedad multifactorial, donde conviven diversos factores que pueden predisponer a la enfermedad, relacionados con la resistencia del cartílago o predisposición a general estrés anormal sobre este. Ejemplos de estos factores son el sexo, peso, edad, malformaciones congénitas o adquiridas, conformación (dismorfia articular), mutaciones genéticas (cartílago displásico), actividad deportiva, enfermedades metabólicas y estados hormonales. Presentándose con mayor frecuencia en hembras, geriatras, obesos, diabéticos y deportistas de alto nivel, y según el factor con mayor incidencia en ciertas articulaciones<sup>19</sup>.

En la osteoartrosis, la manifestación clínica más importante es la claudicación (cojera). Esta se manifiesta como una irregularidad en el andar, que impide un movimiento adecuado. La irregularidad en el andar es más manifiesta o más fácilmente perceptible según el grado de dolor que presente el paciente, y que a su vez está asociado (aunque no siempre) al grado de lesión que presenta la articulación<sup>2</sup>. Luego de varios años de evolución, el dolor tiende a disminuir conforme las articulaciones adoptan una postura rígida<sup>19</sup>.

Otro signo común en la OA avanzada es la efusión sinovial (aumento en la cantidad de líquido sinovial), que puede ir de leve a severo, pero que cuyas características bioquímicas y celulares se modifican poco (trasudado). Esta efusión ocasiona la distensión de la cápsula articular, que a su vez desencadenará en dolor y la posible formación de hernias sinoviales<sup>19</sup>.

Si bien su diagnóstico se puede llevar a cabo mediante el examen clínico, para su diagnóstico definitivo en la clínica, se emplea con mayor frecuencia, la radiología, el ultrasonido y/o la artroscopia. Los cuales muestran cambios asociados a la alteración en la morfología del cartílago vistos en el estudio histopatológico.



## **Radiología**

La radiología es el principal elemento para la evaluación de la OA, sin embargo, esta solo permite evaluar los cambios producidos en tejidos óseos, que aparecen hasta etapas tardías de la enfermedad. Es importante también mencionar, que los cambios radiográficos y el grado de dolor no siempre van de la mano, pudiendo existir cambios radiográficos sin presencia de dolor y viceversa.

Entre los cambios radiográficos a observar en articulaciones con OA se encuentran estrechamiento del espacio articular, esclerosis del hueso subcondral con formación de quistes y osteofitos en la periferia de la articulación, fragmentos osteocondrales intraarticulares, deformación de la articulación por formación de puentes óseos y anquilosis fibrosa, subluxaciones y fibrosis de la médula ósea<sup>19, 26</sup>.

## **Histopatología**

En la práctica, no resulta conveniente realizar histopatologías para la evaluación de la OA, dado la necesidad de causar más daño para la toma de la muestra necesaria, por lo que su uso está casi limitado a la investigación de la enfermedad<sup>19, 27, 28, 29</sup>.

Algunos de los cambios más frecuentes son<sup>19, 22, 27, 28, 29</sup>:

1. Pérdida de la coloración metacromática por disminución de las cargas negativas llevadas por los proteoglicanos.
2. Superficie edematosa, fibras separadas y matriz interfibrilar más translúcida, en ocasiones con granulaciones densas.
3. Apoptosis en proceso; condrocitos con signos de degeneración, que pueden incluir aspecto denso, mala conservación de las membranas, filopodios, acumulación de vesículas y granulaciones densas, acumulación de microfibrillas en el citoplasma, núcleo y citoplasma se segmentan y retraen.
4. Pérdida de la densidad celular y numerosas lagunas vacías, causadas por la apoptosis.
5. Aparición de cúmulos de células (clonas o grupos isogénicos), con intensa actividad de síntesis de proteoglicanos, en un intento de reparación.
6. Células hipertrofiadas con signos de hiperactividad metabólica; aparato de Golgi muy desarrollado y numerosas membranas ergatoplasmáticas.
7. Línea basal engrosada, interrumpida o ausente.
8. Trabéculas muy activas con gran número de osteoblastos y osteoclastos, con disminución transitoria en su grosor por resorción ósea.
9. Fisuras horizontales y superficiales que después son verticales y oblicuas.
10. Úlceras con un fondo de fibrocartilago necrosado o hueso denso.

11. Las zonas alrededor de la úlcera, están decoloradas y con clonas.
12. Osteofito: fibrocartilago más celular y menos rico en sustancia fundamental
13. El hueso subcondral aumenta de manera tardía
14. Médula ósea fibrosa y con capilares dilatados

## Tratamientos farmacológicos

Actualmente no existe cura para la osteoartritis y los tratamientos disponibles ayudan solo temporalmente a la reducción de la inflamación y el dolor, sin embargo, ninguno ha demostrado ser efectivo para detener o reducir el incremento progresivo del daño articular<sup>4, 9</sup>.

La mayoría de los protocolos para tratar la OA, se centran en controlar el dolor e inflamación en fase aguda, mediante antiinflamatorios. Mientras que el control del dolor en fase crónica busca oponerse a la destrucción sin olvidar la rehabilitación de la discapacidad funcional, por lo que se buscan elementos menos dañinos en su uso crónico, que mejoren la calidad de vida del paciente.

El tratamiento más utilizado en la mayoría de las especies, es el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), los cuales inhiben selectivamente las ciclooxigenasas (COX), lo que produce un efecto antiinflamatorio y analgésico, al inhibir la síntesis de PGE-2. Y si bien los AINEs controlan efectivamente el dolor de manera rápida, la inhibición de PGE-2 inhibe también la capacidad del cartilago de regenerar su MEC, por lo que a largo plazo se continúa el deterioro de este<sup>30, 31</sup>.

Aunado a esto, la inhibición de los COX, desvían el metabolismo del ácido araquidónico hacia la producción de leucotrienos, quienes tienen un mayor efecto inflamatorio, al estimular la liberación de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . No solo eso, el uso continuo de AINEs trae efectos secundarios como hemorragias gastrointestinales y daño renal, entre otros. Debido a esto, su uso está reservado para los casos donde el dolor es incapacitante, y siempre administrados de manera intermitente<sup>19</sup>.

Por otro lado, los corticoesteroides, controlan el proceso inflamatorio al inhibir a las células del sistema inmune y MMP, así como a la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos. Su gran ventaja es su administración intraarticular con efecto desde uno hasta 6 meses, a diferencia de los AINEs que deben ser administrados por vía oral 2-3 veces al día<sup>32, 33</sup>.

Pero nuevamente, diversos estudios han probado que también inhibe la deposición de colágena, retrasando la cicatrización, inhibe la síntesis y deposición del condroitín, e induce la ruptura de fibras de colágeno y PG. Sobre el condrocito inhibe su metabolismo e induce su muerte prematura. Con la repetición de las dosis, el daño se va incrementando, provocando el adelgazamiento del cartílago, así como el desarrollo de fisuras, fibrilaciones y quistes<sup>33</sup>.

Existen otros tratamientos, conocidos como condroprotectores o nutracéuticos, que tiene un efecto visible lento (2-6 semanas), pero que de igual manera, su efecto permanece por un largo periodo después de su interrupción (3-5 meses), con una eficacia equivalente a la de los antiinflamatorios y una toxicidad nula o casi inexistente.

Se ha descrito su capacidad para inhibir las MMP, la liberación de PGE-2, la producción de NO y la degradación de los GAG, al mismo tiempo que estimulan la síntesis de AH<sub>s</sub>. Si bien en algunos casos se ha observado una disminución en el avance de la OA, reflejado en la estabilización del espacio articular, los estudios clínicos son contradictorios y su eficacia terapéutica resulta controversial<sup>7, 8, 19, 34</sup>.

Los condroprotectores mayormente empleados son:

- Sulfato de Glucosamina
- Condroitín sulfato
- Diacereína
- Ácido hialurónico

Este último es administrado en una serie de inyecciones intraarticulares, con efecto por 3-12 meses. En la OA se produce la despolimerización del AH, lo que provoca que el líquido sinovial pierda viscosidad. Por ello el AH se considera un viscosuplemento, que al restaurar las propiedades del líquido sinovial, ayuda a reducir la inflamación sinovial, proteger el cartílago de la erosión y promover la síntesis de AH endógena.

También se ha visto su capacidad para actuar sobre determinados ROS, inhibir la proliferación, migración y fagocitosis leucocitaria, así como la síntesis de PGE-2 y NO, y reducir la apoptosis.

Algunos estudios han reportado una reconstitución significativa de la capa superficial del cartílago, así como aumento de la densidad de los condrocitos y del aspecto de la matriz extracelular<sup>19, 32, 35, 36, 37</sup>.

## Fisiopatología de la OA

El proceso generado por el estrés, inicia con la estimulación del condrocito para producir TGF- $\beta$ , BMPs (Proteína Morfogénica del Hueso) e IGF-1, que estimulan la proliferación de condrocitos y la síntesis de matriz cartilaginosa, en un intento por reparar el cartílago dañado<sup>25</sup>.

Si bien en las primeras fases de la enfermedad se suele observar un aumento en la producción y depósito de fibras de colágeno y proteoglicanos, estos se encuentran en cúmulos desordenados. Aunado a esto, el aumento de factores de crecimiento causa una alteración en la expresión génica del condrocito, alterando el tipo de proteínas que este sintetiza, con lo que ahora producirán colágena tipo I y III, biomecánicamente inferior al tipo II, por lo que la nueva MEC sintetizada resulta biomecánicamente inadecuada para la articulación. Esta reparación incompleta crea un cartílago frágil con tendencia a desprenderse y degenerarse<sup>18, 19</sup>.

Los condrocitos generados en esta proliferación son característicos de una célula inmadura y el estímulo continuo de estos factores llevarán al condrocito a hipertrofiarse, caracterizándose por producir colágena tipo X<sub>1</sub>,<sup>25</sup>.

A pesar de los intentos del cartílago por reparar el daño, su acción es insuficiente para contrarrestar los daños inflamatorios, estos mecanismos además alcanzan un límite, después del cual dejan de funcionar y finalmente predomina el catabolismo articular<sup>25</sup>.

Por otra parte la sobreexpresión de TGF- $\beta$ , estimula la síntesis de citocinas proinflamatorias por parte del condrocito, como son IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , quienes desencadenan el proceso inflamatorio. Estos a su vez estimulan la síntesis y activación de MMP, inducen la liberación de radicales libres, aumentan la producción de prostaglandinas y disminuyen la expresión genética de los componentes de la matriz cartilaginosa, causando la depleción del cartílago en el proceso degenerativo de la osteoartritis<sup>1, 2, 19, 21, 25</sup>.

La destrucción de las fibras de colágena y de los proteoglicanos por parte de MMP producirá detritus dentro de la cavidad articular resultantes de su digestión enzimática, los cuales tienen efectos proinflamatorios, originando un ciclo vicioso la síntesis de interleucinas proinflamatorias y la activación de las MMP<sub>1</sub>, induciendo la condrolisis y la producción de óxido nítrico<sup>19</sup>.

La eliminación de las cargas negativas de los proteoglicanos mediante la digestión enzimática (despolimerización de las cadenas de GAG) produce edema y reblandecimiento de los tejidos. Mientras que la depolimerización del AH y su dilución disminuyen su viscosidad, y reducen su efecto protector y lubricante, al mismo tiempo que la acumulación de sus residuos causa acidosis al disminuir el pH<sup>19</sup>.

Por otra parte, el aumento en el anabolismo, durante la fase inicial, provoca disminución de la glucosa en el líquido sinovial, debido a su utilización masiva, así como un retardo en su difusión desde el plasma, igual que con el oxígeno<sup>18</sup>. Estos cambios en el ambiente extracelular del condrocito y la alteración de la MEC, inducen la despolarización del condrocito, haciendo que no responda igual ante los cambios de osmolaridad externa, debido a una regulación inadecuada de los canales iónicos, lo que favorece la producción de radicales libres, llevando eventualmente a la apoptosis<sup>1</sup>.

La apoptosis de los condrocitos o condroapoptosis, se diferencia de otras por no ser dependiente de fagocitosis, los detritus celulares permanecen en el sitio de muerte por largos periodos y desaparecen probablemente por autólisis. El estrés oxidativo o bien la ausencia de señalización por TGF- $\beta$  e IGF-1 induce a los condrocitos hipertrofiados a liberar antes de morir, vesículas citoplasmáticas que sirven como núcleos de mineralización en la MEC, que junto con la activación de la osificación subcondral y periarticular contribuye a la formación de osteofitos<sup>19</sup>.

TGF- $\beta$  y BMP-2 estimulan la proliferación de células mesenquimales sobre el hueso subcondral, en un intento por reparar el cartílago, inician una condrogenesis, creando una masa que se extiende más allá del cartílago articular (condrofito), que se hipertrofiará (condro-osteofito) y finalmente mineralizará completamente por osificación endocondral (osteofito)<sup>38, 39</sup>.

La formación de osteofitos, es por lo tanto un intento del cartílago, por fortalecer aquellas áreas con una sobre carga. Sin embargo, el intento es fallido y lo único que conseguimos es la deformación e inmovilización de la articulación con posterior lesión de la superficie contraria e inmovilidad<sup>38</sup>.

Por el contrario, la IL-6 y IL-1 $\beta$  produce un efecto de resorción en el tejido óseo, ya que su papel es promover la diferenciación de los osteoclastos a partir de las células precursoras, una vez que el daño ha alcanzado al hueso subcondral, creando quistes subcondrales (áreas de desmineralización)<sup>5</sup>.

La resorción del hueso subcondral, libera cristales de hidroxiapatita y pirofosfatos de calcio al líquido sinovial, causantes de irritación a la membrana sinovial, que responden aumentando la producción de líquido sinovial (efusión). La efusión ocasiona que la presión negativa de la MEC se pierda o llegue a tornarse positiva, afectando el intercambio de sustancias y la oxigenación. De la misma manera provoca que las superficies articulares, que normalmente se adhieren fuertemente entre sí, tiendan a separarse comprometiendo la estabilidad articular. Aunado a la irritación de la membrana sinovial, los detritus de la MEC, al ser fagocitados por los sinoviocitos, estos estimulados para sintetizar mediadores inflamatorios, perpetuando el proceso catabólico<sup>19</sup>.

Si bien el cartílago no cuenta con terminaciones nerviosas, IL-1 $\beta$  también estimula la producción del Factor de Crecimiento nervioso (NGF) por parte del condrocito, quien a su vez estimula a las células inflamatorias, así como al condrocito para la producción de PGE-2, quien participa en la sensibilización de las neuronas en hueso y cápsula, causando dolor<sup>30, 40-43</sup>. PGE-2 sensibiliza los condrocitos a la apoptosis estimulada por NO, efecto inflamatorio, potencializa otros mediadores<sup>19, 30</sup>.

El NGF por su capacidad para capacidad para la diferenciación de los monocitos y la proliferación y degranulación de mastocitos, activa su quimiotaxis<sup>37</sup> y mejora la reparación de ligamentos, desacelera la diferenciación de condrocitos e inhibe a la IL-1 $\beta$  en sinoviocitos. Tratamientos basados en la inhibición de NGF para controlar el dolor, generan un aumento en la velocidad del deterioro de la articulación, si bien si disminuyeran el dolor<sup>40</sup>.

Los mecanismos por los cuales se produce el dolor se desconocen, sin embargo se asocia a la sensibilización de las fibras nociceptivas aferentes (PAN), debido a la inflamación y edema en la cápsula sinovial y hueso subcondral. Que estimuladas por citocinas sensibilizan a la neurona a estímulos antes no dolorosos (alodinia)<sup>19</sup>.

## Osteoartrosis y Estrés Oxidativo

Los radicales libres (ROS) son definidos como moléculas o fragmentos moleculares con uno o dos electrones desapareados. Un electrón desapareado incrementa la reactividad química de un átomo o molécula, que busca complementar su último orbital, para lo cual reaccionarán con otras moléculas, alterando la composición de estas. Los

radicales libres, tienen la característica de tener una vida media muy corta (millonésimas de segundos), debido a su alta reactividad<sup>14</sup>.

El condrocito puede producir ROS como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical hidroxilo (OH) y el óxido nítrico (NO). La enzima superóxido dismutasa (SOD) neutraliza el  $O_2^{\cdot-}$  y lo transforma en  $H_2O_2$ , evitando se combine con otros radicales en la formación de compuestos más agresivos como es el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) y el OH, que posteriormente dan inicio a la peroxidación lipídica. Posteriormente la catalasa y gluatión peroxidasa (GPx) convierten al  $H_2O_2$  en  $H_2O$  <sup>19</sup>.

Entre el 3 y 10% del  $O_2$  es convertido a ROS, de manera normal la generación controlada de ROS, son esenciales para la proliferación, diferenciación celular y regulación génica, entre otras funciones fisiológicas<sup>13</sup>. Como consecuencia del estímulo de citocinas proinflamatorias, hipoxia o estrés mecánico, los condrocitos inician la generación de ROS, como es el caso del NO o el  $H_2O_2$ . <sup>44, 45</sup>.

La acumulación de ROS es suficiente para que los complejos antioxidantes no puedan controlarlos, el daño sobrepasa a la célula afectando a los proteoglicanos y colágena de la MEC. Modifican la estructura de proteínas, oxidándolas y nitrosilando ciertos aminoácidos, evitando su adecuado funcionamiento<sup>14, 45</sup>. Altas concentraciones de ROS, son capaces de alterar el ADN e inducir mutaciones, inactivar enzimas e inhibir la síntesis de diferentes moléculas intra y extracelulares, dañando irreversiblemente la célula y llevándola a la necrosis o apoptosis, que aunado a los detritus ocasionados por la oxidación de la MEC, promueven un mayor daño por inflamación hacia los condrocitos y la membrana sinovial<sup>19, 45</sup>.

El NO es producido gracias a una enzima NO sintetasa (NOS), habiendo NOS constitutivas (cNOS), las cuales están presentes de manera normal en los tejidos o inductivas, que se forman solo después de un estímulo. Los condrocitos no cuentan con cNOS y solo producen iNOS después del estímulo por  $IL-1\beta$  y  $TNF-\alpha$  y una vez dañados, continuarán produciendo NO aun en ausencia de un estímulo.

El NO inhibe la síntesis del colágeno y proteoglicanos, activa MMP, simultáneamente inhibe la producción y actividad de los TIMPs, destruye al AH, reduce la viscosidad del líquido sinovial, disminuye la expresión del antagonista de IL-1 ( $IL-1Ra$ ), incrementa de la susceptibilidad al daño inducido por otros oxidantes, aumenta síntesis de PGE-2 y potencializa los efectos de  $TNF-\alpha$  y la  $IL-1\beta$ , <sup>19, 44, 45</sup>.

También los radicales hidroxilos (OH) reaccionan con ácidos grasos no saturados de las membranas lipídicas para iniciar una reacción autocatalítica y continúa como una reacción en cadena, resultando en la formación de radicales lipídicos más estables, que desestabilizan las estructuras de la MEC<sup>45, 46</sup>.

El malondialdehído (MDA), un producto de la lipoperoxidación lipídica, también generan estrés oxidativo al reaccionar con residuos de la histidina y lisina de las proteínas de la MEC, para formar aductos estables que contribuyen con la degradación de la matriz<sup>45, 46</sup>.

## Papel del Glutati3n en el Estr3s Oxidativo

Las GPx son el mecanismo protector m3s importante por tener m3s sustratos espec3ficos y con mayor afinidad a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que las catalasas<sup>19</sup>. Pero para su funcionamiento, la enzima requiere de Glutati3n (GSH) como cofactor, activando y acelerando la actividad de la GPx<sup>13</sup>.

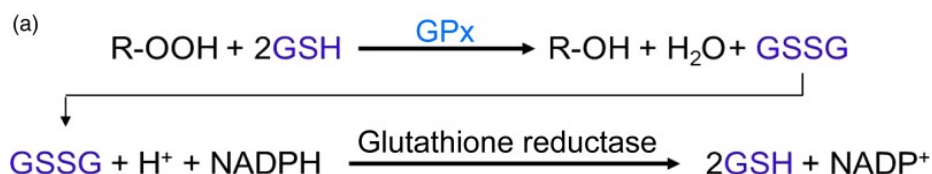


Figura 1. Se muestra la reacci3n de 3xido-reducci3n de GSH, La reacci3n oxido-reducci3n, catalizada por la GPx, involucra la transferencia de 2 electrones (provenientes cada uno de una mol3cula de GSH), para reducir el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una mol3cula de agua. El producto final de la oxidaci3n de GSH es glutati3n oxidado (GSSG), constituido por dos mol3culas de GSH unidas por un puente disulfuro, que es regenerado a su forma reducida (GSH) por la glutati3n-reductasa (GSH-R), utilizando un NADPH +H, como donador de electrones<sup>14</sup>.

El GSH, un trip3ptido constituido por glutamina, ciste3na y glicina ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinilglicina), proporcionan un electr3n para la reducci3n de los agentes oxidantes, catalizada por la enzima GPx. Sin embargo, el GSH tambi3n tiene la capacidad de interactuar directamente con los ROS (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO y OH, etc)<sup>13</sup>.

El GSH es sintetizado en su forma reducida, que tras donar su electr3n pasa a su forma oxidada (GSSG). La concentraci3n GSH:GSSG intracelular es el determinante principal del estado redox de la c3lula<sup>13, 15</sup>.



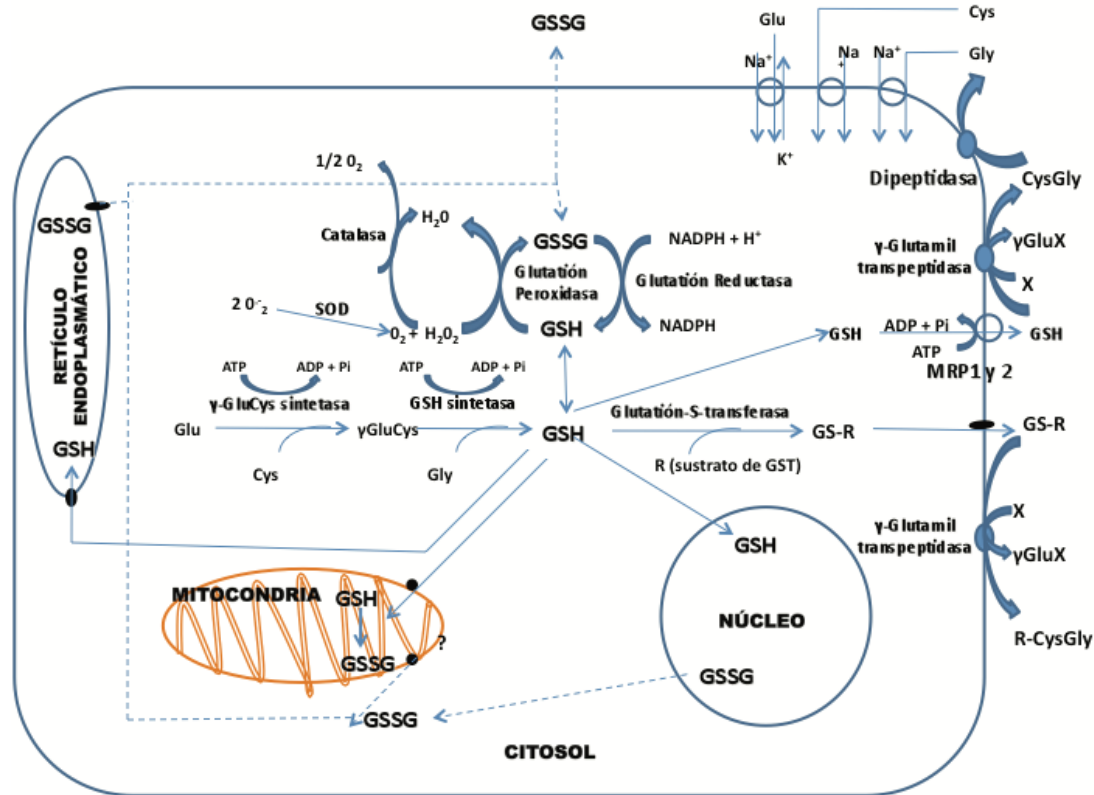


Figura 2. Resumen del metabolismo de GSH. Los precursores (glisina, cisteína y glutamina) entran al citosol, donde la GSH-sintetasa los transforma en GSH, quien regulará el estrés oxidativo de los organelos y célula en general, o bien saldrá de la célula, en donde necesita ser degradada en sus precursores para poder reingresar a la célula<sup>14</sup>.

Su capacidad como antioxidante y como cofactor de la GPx, lo hacen el sistema antioxidante más importante de la célula, en el mantenimiento del potencial de óxido-reducción de la célula, al mantener en estado reducido los grupos tiol de las proteínas y así permite la generación de diversas cascadas de señalización intracelular, esenciales para proliferación celular<sup>14, 47</sup>.

El GSH mantiene una concentración estable en promedio de 12mM, gracias a la inhibición de la Glutation-sintetasa por el mismo GSH, de tal manera que existe un equilibrio celular entre la síntesis y el consumo de este metabolito. Lo que resulta esencial, ya que al disminuir su concentración permite la activación de caspasas y la progresión de los mecanismos de apoptosis<sup>14, 15</sup>.

El estado redox en el cartílago es más oxidante durante la senescencia, por la pérdida de actividad de sus enzimas, tanto para la síntesis del GSH (GSH sintetasa), como para la reducción de GSSG (GSH Reductasa)<sup>13</sup>.

En la OA, también se ha observado la disminución de la concentración de antioxidantes, entre ellos el GSH, lo que conlleva a la acumulación incontrolable de radicales libres y exacerba el daño celular<sup>48</sup>.

## Nanopartículas de Quitosán

### Nanotecnología

La nanotecnología ha ganado popularidad como sistemas de liberación de fármacos, en la forma de nanopartículas, con las cuales podemos introducir sustancias que de otra forma no pueden penetrar al interior de la célula como es el caso del GSH<sup>34</sup>.

Las nanopartículas se definen como partículas con un tamaño entre los 10-1000nm, en las cuales un fármaco puede encontrarse disuelto, entrelazado, encapsulado o anclado a la nanopartícula<sup>49</sup>, para con ello vectorizar, proteger y liberar controladamente dicho fármaco. Estas propiedades permiten mejorar la biodistribución y favorecer su interacción con tejidos específicos<sup>50</sup>.

Las nanopartículas más allá de vectorizar otras drogas, nos permiten mejorar su estabilidad física y química, proteger al principio de la degradación, aumentar la absorción y biodisponibilidad, penetrar células que de otra forma serían inalcanzables para el principio activo, concentrar el fármaco en un tejido o incluso en un tipo celular específico y minimizar el efecto tóxico de algunas drogas<sup>50, 51</sup>.

Para la preparación de nanopartículas se requieren de moléculas biocompatibles y biodegradables que aseguren su inocuidad, como los polímeros<sup>50</sup>.

Uno de los métodos de formación de nanopartículas, es a través de la gelación iónica, el cual está basado en las interacciones electrostáticas entre un polímero como es el caso del quitosán (gracias a sus grupos amino) y un polianión, como el tripolifosfato<sup>49</sup>. Al mismo tiempo, durante la formación de las nanopartículas, se pueden atrapar proteínas o péptidos de interés como puede ser el GSH<sup>49, 52</sup>.

Tradicionalmente drogas de tamaño molecular pequeño, atraviesan la membrana celular por difusión pasiva o transporte activo, mientras que las nanopartículas

penetran por endocitosis. Existen varios mecanismos de endocitosis, en el caso de las nanopartículas con carga positiva, como las de quitosán, estas tienen una interacción por diferencia de cargas, por lo que se ha propuesto que la vía de endocitosis por la que penetran está mediada por clatrina<sup>51</sup>. Se ha demostrado que las NP, evitan la lisis por su tipo de carga, protegiendo a la proteína a vectorizar de la degradación y permitiendo su liberación en el citoplasma<sup>52</sup>.

## Quitosán

El quitosán es un biopolímero natural atóxico, producto de la deacetilación de la quitina, compuesto por residuos de  $\beta$ -(1-4)- *N*-glucosamina y *N*-acetyl-glucosamina. Se caracteriza principalmente por ser insoluble en agua y solventes orgánicos, pero soluble en soluciones acuosas ácidas ( $\text{pH} < 6.5$ ), debido a la protonación de los residuos de glucosamina a su forma soluble  $\text{R-NH}_3^+$  <sup>12, 53</sup>.

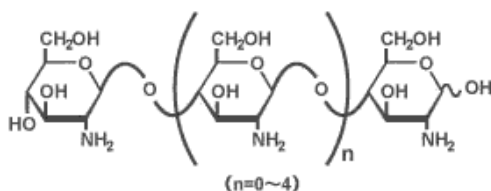


Figura 3: Estructura química del quitosán

El quitosán ha demostrado tener múltiples cualidades que lo hacen ideal como tratamiento por sí solo, dentro de estas propiedades se incluyen efecto antiinflamatorio, antioxidante, antibacteriano y antitumoral, también se ha demostrado que ayuda a reducir los ácidos grasos en suero, protege las funciones mitocondriales e inhibe la apoptosis. Igualmente tiene propiedades mucoadhesivas, debido a su interacción electrostática con la mucosa y capacidad de formación de geles, al mismo tiempo que crea un ambiente ideal para la proliferación celular<sup>12, 53, 54</sup>.

Dentro de sus efectos antiinflamatorios, se ha observado que el quitosán tiene la capacidad de inhibir la actividad de las MMP, así como de regular la expresión genética de varias citocinas proinflamatorias ( $\text{IL-1b}$ ,  $\text{IL-6}$  and  $\text{TNF-}\alpha$ ), sin afectar a las antiinflamatorias<sup>12</sup>.

La actividad antioxidante del quitosán, se debe a su capacidad de eliminar radicales al interrumpir la reacción en cadena de la oxidación, incrementando la actividad de las enzimas antioxidantes, como la GSH-Px, catalasa y SOD. Con lo que reduce al MDA<sup>12</sup>.

Como sistema para vectorizar otras sustancias, el quitosán ha demostrado ser atóxico, biocompatible, biodegradable, no alergénico y de costo relativamente bajo<sup>12</sup>. Además de estas características únicas, las nanopartículas han demostrado una actividad superior a las del quitosán no nanoparticulado<sup>53, 54</sup>.

## JUSTIFICACIÓN

Considerando que dentro de los eventos celulares que contribuyen a la osteoartritis se encuentra el desequilibrio óxido-reducción, inflamación y la baja contribución de los complejos antioxidantes para controlar este estado, así como la desorganización y función de proteoglicanos y colágena de la MEC en donde el aporte de actividad antioxidante es importante.

En el laboratorio 9 de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación se inició el estudio de la respuesta antioxidante inducida por nanopartículas de quitosán con glutatión *in vivo*.

Considerando que existe una alta incidencia de osteoartritis tanto en humanos como en los animales y la efectividad poco significativa de los tratamientos convencionales utilizados para el tratamiento de esta enfermedad, es necesario estudiar sistemas de liberación de sustancias activas que tengan capacidad de ejercer efectos biológicos importantes asociados a la modulación óxido reducción celular y que ejerzan un efecto benéfico y consistente para que puedan ser considerados como fármacos. El uso de nanopartículas nos brinda la posibilidad de administrar medicamentos que actúen directamente sobre la célula, reduciendo el volumen de medicamento necesario para lograr el efecto deseado.

## HIPÓTESIS

Las Nanopartículas de Quitosán-GSH, administradas intraarticularmente a ratas Wistar macho con osteoartritis quirúrgica inducida, pueden modular efectos asociados al estado óxido-reducción en la osteoartritis inducida en ratas Wistar promoviendo una reducción de las alteraciones producidas en la articulación afectada.

## OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de Nanopartículas preparadas a base de Quitosán-GSH (Np-GSH), en un modelo de osteoartritis inducida quirúrgicamente en ratas Wistar macho y su actividad asociada a la capacidad moduladora óxido-reducción

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la evolución clínica de las lesiones osteoartrosicas inducidas quirúrgicamente a ratas Wistar macho tras la administración de las nanopartículas.
- Estimar la modulación óxido-reductora relacionada a la exposición de Np-GSH, en ratas con osteoartritis inducida, mediante la cuantificación de Glutación y lipoperoxidación (TBARS).
- Evaluar la evolución de las lesiones osteoartrosicas en ratas Wistar tras la administración de las nanopartículas, por medio del examen histopatológico.
- Evaluar la evolución de las lesiones osteoartrosicas tras la administración de las nanopartículas a las ratas con osteoartritis quirúrgica, por medio de inmunohistoquímica contra Colágena tipo 2 y Metaloproteinasa 13.

# MATERIALES Y MÉTODO

## Materiales y Equipos

### Materiales

- Pluronic F-68 (Sigma)
- Quitosán 75% deacetilado (Sigma)
- Tripolifosfato de sodio P2O5 96.29% (Mexichem quimer)
- L-Glutatión reducido (Sigma-Aldrich)
- Glicerol 99% (Sigma)
- Ácido acético glacial 99.4% (Cedrosa)
- Instrumental quirúrgico
- Sutura Ácido Poliglicólico 5-0
- Xilacina 2% (Pisa)
- Ketamina 10% (Pisa)
- Buprenorfina (Pisa)
- Gentamicina 10% (AgroVet)
- Solución Hartman (Pisa)
- Ácido Hialurónico - Legend ® (Bayern)
- Ácido 2,2'-dinitro-5-5'-ditiodibenzoico (Sigma-Aldrich)
- D8130-5G Ácido 5-sulfosalicílico dihidratado (Merck)
- EDTA 0.5 mM (C10H14N2Na2O8.2 H2O) (J. T. Baker)
- Protein Assay dye Reagent concentrate (Bio-rad)
- Ácido Perclórico 70-72% (J-T. Baker)
- Ácido 2-tiobarbitúrico 98%(Sigma-Aldrich)
- Buffer de lisis
- Paraformaldehído al 4%
- Sacarosa >99.5%(Sigma)
- Surgipath ® Decalcifier II (Leica)
- Neg-50 ® (Thermo)
- PBS 0.1M
- Col2A1 (M2139) (Santa Cruz Biotechnology)
- MMP-13 (C-3) (Santa Cruz Biotechnology)
- Donkey anti-mouse IgG (H+L) Biotin (Millipore)
- ABC Elite PK-6100 (Vector)
- Peroxidase Substrate Kit DAB SK-4100 (Vector)
- Violeta de Cresilo C5042 (Sigma)

## **Biológicos**

- Rata cepa Wistar

## **Equipos**

- Medidor pH Series 510 (Oakton)
- Microcentrifuga con control de temperatura (Centrifuge 5702 R, Eppendorf)
- Agitador (Bio- Rad, Compact Rocker)
- Ultracentrífuga XL-100K (Beckman Coulter)
- NanoSight NS300 (Malvern)
- Computed Radiography FCR Prima (Fujifilm)
- Stir-pak ® model 50002-30 (Cole-Parmer)
- Lector de microplaca (iMark Bio –rad)
- Lector de microplaca Multiskan Go (Thermo)
- Criostato MEV (Slee)
- Microscopio Óptico Olympus CH30
- Microscopio de Fluorescencia West Germany (Zeiss)

## **Metodología**

### **Preparación de Nanopartículas**

Las Nanopartículas de Quitosán con Glutación (NP-GSH) se prepararon por medio de gelación iónica<sup>53</sup>, a partir de 2 soluciones a base de ácido acético al 1% a un pH 4.1-4.2. La primera solución con Pluronic F-68 al 1%, Quitosán al 0.3% y GSH al 1% y la segunda solución con 0.1% de sTPP. Ambas soluciones se mezclaron en relación 1:1 manteniéndolas en agitación por una hora, según lo descrito por López-Barrera 2016<sup>16</sup>.

Con objeto de adquirir una concentración de quitosán equiparable a la del ácido hialurónico (10mg/ml), empleado como tratamiento control en este estudio, las nanopartículas ya formadas fueron ultracentrifugadas a 122'253 g/4°C/60min. Tras ello, se recuperó el anillo formado, con lo que las nanopartículas se concentraron aproximadamente 3 veces.

A diferencia de estudios previos, para esterilizar las NP antes de su administración, estas fueron expuestas a luz ultravioleta por 14 horas y mantenidas en refrigeración (4°C) hasta su uso.

Bajo la misma metodología se prepararon las Nanopartículas de Quitosán (NP-Q), omitiendo únicamente la adición del GSH.

## **Caracterización de las Nanopartículas**

Para la caracterización de las nanopartículas se ocupó el equipo NanoSight NS300 de Malvern, que se basa en la dispersión de luz dinámica para proporcionar información sobre la distribución de tamaño, tamaño promedio y concentración de las nanopartículas.

## **Población de Estudio e Inducción de OA**

Todos los estudios fueron realizados siguiendo el protocolo aprobado por el comité del CICUAE (FESC/CICUAE/06/03/2018), de la FES-Cuautitlán, UNAM. 50 ratas *Rattus norvegicus* cepa Wistar machos (280-320g) fueron obtenidas de la Unidad de Aislamiento y Bioterio, en la Unidad de Investigación Multidisciplinario de la FESC. Las ratas fueron mantenidas en el Bioterio de la UIM y separadas aleatoriamente en 4 grupos de acuerdo al tratamiento a administrar.

Ratas Wistar machos de 280-320g de peso se colocaron en cajas con 5 individuos, con alimento y agua ad libitum, con revisiones cada 24 horas. Todo animal que mostrara dolor o claudicación ajena a la lesión inducida, infección u otra patología, fue eliminado del estudio. Después de 7 días posteriores a la intervención quirúrgica y al tratamiento correspondientes se llevaron a punto final, colectando ambas rodillas para estudios posteriores. Todos los procedimientos se apegaron a lo descrito según la NOM-062-ZOO-1999.

La lesión osteoartrósica se indujo por la Transección del Ligamento Cruzado Craneal (TLCC) de la rodilla, que junto con la menisectomía ha sido ampliamente estudiado y descrito como un método de rápido progreso y altamente reproducible, ideal para estudios de corto plazo<sup>17, 55</sup>. La TLCC a diferencia de la menisectomía, es un procedimiento menos agresivo de OA con destrucción limitada o parcial del cartílago,



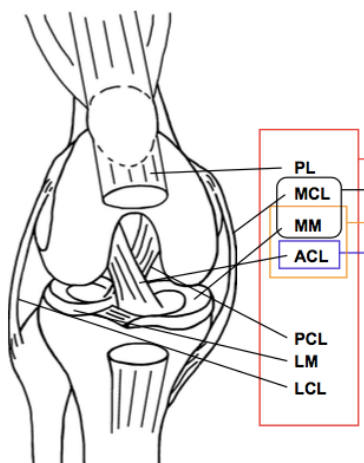


Figura 4. Modelos para la generación de osteoartritis<sup>56</sup>. PL (Ligamento Patelar), MCL (Ligamento Colateral Medial), MM (Menisco Medial), ACL (Ligamento Cruzado Craneal), PCL (Ligamento Cruzado Caudal), LM (Menisco Lateral), LCL (Ligamento Colateral Lateral).

ideal para la evaluación de medicamentos modificadoras de la enfermedad en etapas tempranas<sup>23, 56</sup>, que permite observar efectos sutiles de la droga que de otra forma podrían pasar desapercibidos ante una degeneración acelerada<sup>57</sup>.

En la preparación prequirúrgica, los animales se trasladaron al quirófano, donde se les administró ketamina-xilacina (50mg-10mg/kg/IM), para una anestesia general. Posteriormente se administró también gentamicina (6mg/kg/IM) y buprenorfina (0.05mg/kg/SC).

Cada individuo se pesó y se les tomaron radiografías, antes de proseguir con el protocolo de tricotomía y embrocado de la rodilla a operar. La rodilla a operar fue elegida aleatoriamente para cada rata.

La Transección del Ligamento Cruzado Craneal (TLCC) se realizó según lo descrito por Hayami y Pickarski 2006<sup>23</sup>, incidiendo medialmente, seguido de la luxación lateral de la patela y colocando la articulación en flexión, para exponer el ligamento cruzado craneal y seccionarlo. La reconstrucción de los planos para cerrar la herida fue realizado mediante surgete continuo empleando sutura de ácido poliglicólico 5-0.

Como tratamiento posquirúrgico, se continuó con la administración de buprenorfina (0.05mg/kg/BID/SC) por 3 días, así como de gentamicina (6mg/kg/SID/PO) por 5 días.

## Administración de Tratamientos

### Tratamientos

1. Ácido Acético al 1%
2. Solución Hartmann, Solución Ht inyectable estéril marca Pisa
3. Ácido Hialurónico, Legend 10mg/ml marca Bayer
4. NP-GSH, fabricadas según la metodología anteriormente descrita.
5. NP-Q, fabricadas según la metodología anteriormente descrita.

Cada tratamiento se administró a 10 ratas, 7 días posteriores a la cirugía. Inyectando 40 $\mu$ l intraarticularmente mediante una jeringa insulínica, los tratamientos fueron aplicados bajo anestesia siguiendo el mismo protocolo que para la cirugía, y en ambas rodillas donde el lado contralateral a la lesión se consideró el Control, y TLCA al experimental.

## **Estudio Radiográfico**

Se realizaron estudios de radiología computarizada (Computed Radiography FCR Prima (Fujifilm)) previo a la cirugía, a la administración de tratamientos y al sacrificio, realizando dos tomas por rata (mediolateral y craneocaudal) de ambas rodillas, para evaluar el grado de lesión osteoartrósica.

## **Sacrificio y Procesamiento de la Muestra**

A los 14 días postquirúrgicos los animales fueron llevados a punto final para recuperar ambas rodillas: 5 ratas de cada grupo fueron destinadas para el estudio histopatológico, manteniendo la integridad de la cápsula, mientras que a las ratas restantes, se les raspó el cartílago articular para el análisis bioquímico de cuantificación de GSH y TBARS.

En estas últimas, el cartílago recuperado fue puesto en 400 $\mu$ l de Buffer de lisis y puesto en congelación hasta su procesamiento. Las muestras se lisaron mediante su fraccionamiento con navaja de bisturí y posteriormente un homogenizador, El extracto de centrifugó a 13'281 g/15 min/4°C, para recuperar el sobrenadante, a partir del cual se realizó la cuantificación de GSH y TBARS.

## **Cuantificación de GSH**

El contenido de GSH total, fue cuantificado por el método espectrofotométrico<sup>16, 58</sup>, basado en la reacción del GSH/GSSG contenido en la muestra con el ácido 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoico) (DTNB) con lo cual se produce GS-TNB y TNB que es un producto color amarillo.

Una porción de la muestra obtenida de la homogenización se utilizó para determinar la concentración de proteína total de acuerdo al método de Bradford. Tras la centrifugación de la muestra (13'281 g/ 10min / 4°C), al sobrenadante obtenido se le adiciono ácido sulfosalicilico al 5%, se dejó en incubación por 15 minutos y posteriormente se centrifugó a 13'281 g / 10min / 4°C. Al sobrenadante se le agregó DTNB y se dejó incubando a 37°C / 10 min. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de  $\lambda = 425$  nm.

El contenido total de GSH se cuantificó por espectrofotometría<sup>16, 58</sup>, basado en la reacción del GSH/GSSG, contenido en la muestra, con el ácido 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoico) (DTNB) que produce GS-TNB y TNB de color amarillo.

## **TBARS**

El ensayo de lipoperoxidación se realizó de acuerdo a los descrito por Ohkawa et al . (1979) con algunas modificaciones<sup>16, 59</sup>. La técnica consiste en la cuantificación del Malondialdehído (MDA) que es un producto resultado de la oxidación de lípidos, el cual al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico forma un aducto color rosa.

Un volumen determinado de muestra se adicionó con ácido perclórico al 2.5% / 10 min/ temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 13'281 g/ 10 min / 4°C. Se extrajo el sobrenadante al que se le adiciona un volumen determinado de ácido tiobarbitúrico a una concentración de 0. 67% y se dejó en incubación a 90°C/30 min. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de  $\lambda = 540$  nm.

## **Histopatología**

Las muestras histopatología se procesaron en el Laboratorio de Apoyo a Histología y Biología, de la sección de Ciencias Morfológicas de la FESC, realizando diferentes tinciones y las inmunotinciones en el Laboratorio del Dr. Gabriel Gutierrez Ospina del Instituto de Investigaciones Biomédicas CU.

Las muestras se fijaron en paraformaldehído al 4% por 72 horas y posteriormente se descalcificaron con Surgipath-Decalcifier II (Leica) por 72 horas y se sumergieron en paraformaldehído al 4% por otras 72 horas. Posteriormente las muestras se sumergieron en cambios consecutivos de una solución de PBS con sacarosa al 15% y 30%, por 24 horas respectivamente. Para realizar los cortes frontales de las rodillas de

20  $\mu\text{m}$  por congelación a  $-21^{\circ}\text{C}$ , se impregnaron con Neg-50® en el criostato, donde se colocaron en laminillas previamente cubiertas con una solución de gelatina.

Para el estudio histopatológico, las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Apoyo a Histología y Biología, de la sección de Ciencias Morfológicas de la FESC, realizando diferentes tinciones.

Inicialmente se realizó una tinción de Hematoxilina-Eosina (HE), como tinción básica para la evaluación morfológica de las células y la matriz cartilaginosa<sup>60</sup>, en la cual se evaluaron las siguientes características: distribución celular, población, morfología celular, hueso subcondral, tide mark, superficie articular y MEC.

Con objeto de evaluar la presencia y distribución de las fibras de colágena, se empleó la tinción de van Gieson, la cual se basa en la selectividad del colorante fucsina por la colágena. Dicha tinción fue empleada en conjunto con HE, para una mejor evaluación de las características de superficie articular y MEC<sup>60, 61, 62</sup>.

Por otra parte, la concentración de proteoglicanos, fue evaluada mediante la tinción Azul de Toluidina y Safranina O. Si bien la intensidad de la coloración por Safranina O es directamente proporcional a la concentración de proteoglicanos, en cartílago degenerado la sensibilidad de este colorante es menor, en donde el azul de toluidina presenta una mayor afinidad a los grupos sulfuro de los GAG restantes<sup>29, 60, 63</sup>.

Adicionalmente se realizó la tinción de Naranja de Acridina por microscopía de fluorescencia, que nos permite evaluar daño celular temprano, asociado a procesos de necrosis y apoptosis en la población en el cartílago.

## **Inmunohistoquímica**

Las muestras fueron procesadas para inmunomarcaje indirecta con los anticuerpos monoclonales de ratón Col2A1 (M2139) y MMP-13 (C-3) de Santa Cruz Biotechnology, utilizando un anticuerpo secundario contra ratón biotinilado (Donkey anti-mouse IgG (H+L) Biotin, Millipore) y el complejo avidina-biotina (ABC Elite PK-6100, Vector). La unión del anticuerpo se reveló con el kit de DAB-peroxidasa (Peroxidase Substrate Kit DAB SK-4100 Vector) y contratinción con Violeta de Cresilo (C5042, Sigma).

La presencia de colágena de tipo II (Col2A1), se encuentra relacionada con la presencia de tejido sano, que al hipertrofiarse tras un daño, empieza a ser reemplazado por colágena de tipo X. Por otro lado, la presencia de metaloproteinasa 13 (MMP-13) es el marcador de inflamación más utilizado en la evaluación del cartílago, al ser la proteasa principal en la degradación del cartílago articular<sup>19, 64</sup>.

## **Análisis estadístico**

Para las pruebas bioquímicas, cada experimento fue realizado por triplicado. Los datos expresan un promedio  $\pm$  SEM y fueron analizados usando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por una prueba *post hoc* de comparaciones múltiples de medias de Tukey con el programa Prism (Graphpath), considerando diferencias significativas si  $p < 0.05$ .

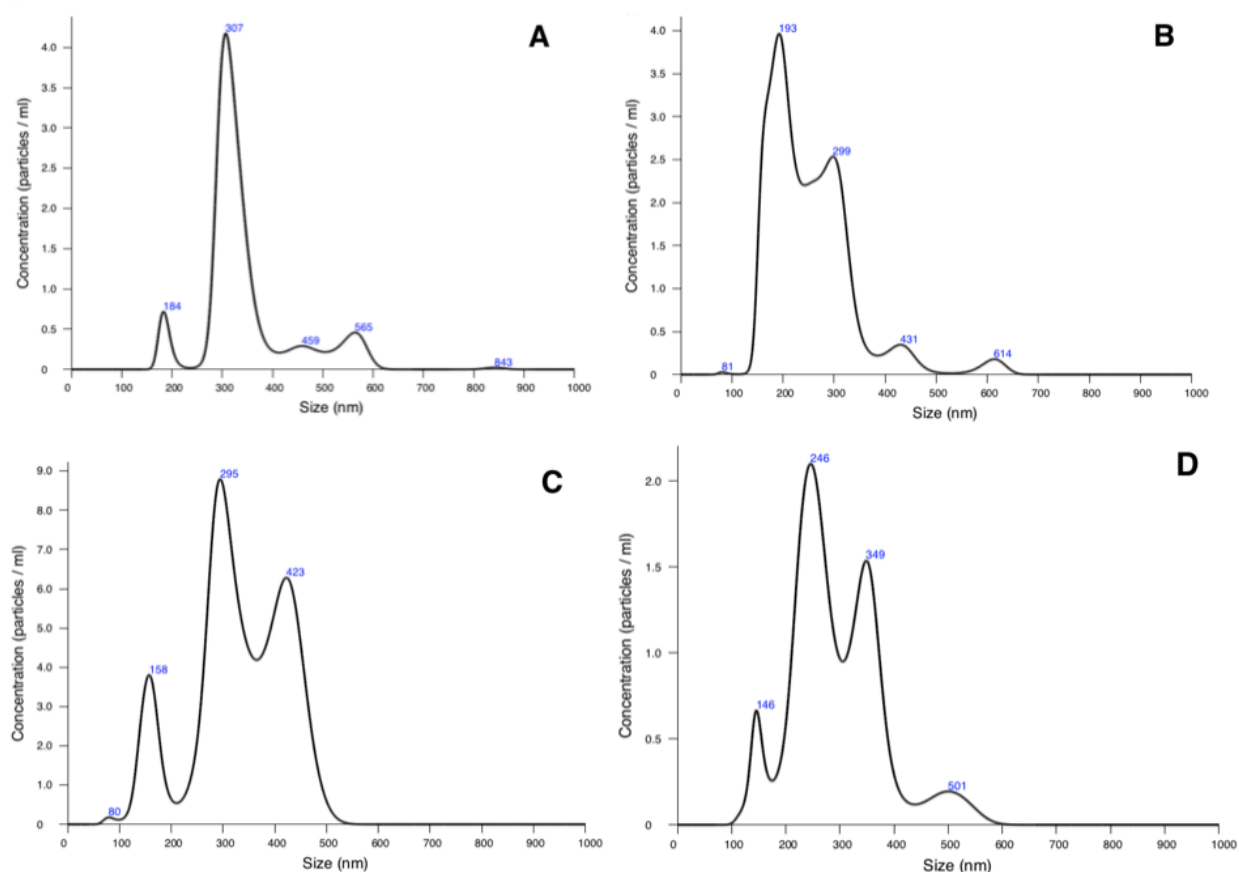
En el caso del análisis radiográfico e histopatológico de cada característica (ver anexo 2), los datos fueron analizados empleando un análisis de varianza de dos vías (ANOVA), seguido por una prueba *post hoc* de comparaciones múltiples de medias de Tukey, considerando diferencias significativas si  $p < 0.05$ .

Aunado a lo anterior, las características del examen histopatológico se analizaron todos en conjunto, utilizando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por una prueba *post hoc* de comparaciones múltiples de medias de Kruskal-Wallis, considerando diferencias significativas si  $p < 0.05$

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Preparación y Caracterización de Nanopartículas

Se prepararon dos grupos de NP de quitosán, con y sin glutatión, a partir del método de gelación iónica descritos en los métodos. Posteriormente se centrifugaron y esterilizaron con luz UV. Para evaluar el efecto de la luz UV sobre la estructura de las NP, se tomaron muestras antes y después de ser esterilizadas y se caracterizaron utilizando el equipo NanoSight NS300 de Malvern, para conocer el promedio y distribución por tamaño, y concentración. Los resultados se muestran en la gráfica y tabla 1.



Gráfica 1. Distribución de tamaño de las diferentes nanopartículas: A) Np-GSH previo a su esterilización. B) Np-GSH tras ser expuestas 14 horas a la luz UV. C) Np-Q previo a su esterilización con luz UV. D) Np-Q tras ser expuestas a 14 horas a la luz ultravioleta.

	Nanopartículas de Quitosán con Glutación		Nanopartículas de Quitosán	
	Pre UV	Post UV	Pre UV	Post UV
Media (nm)	345.3	253.3	330.0	292.1
Moda (nm)	306.8	192.5	294.4	246
Desviación Estándar	93.8	85.4	92.3	85.2
Concentración, partículas/ml	3.34x10 <sup>10</sup>	5.51x10 <sup>10</sup>	1.49x10 <sup>10</sup>	3.15x10 <sup>10</sup>

Tabla 1. Media, moda y SD del tamaño de las diferentes nanopartículas antes y después de su esterilización con luz UV. De igual manera, se muestra la concentración de NP/ml en las diferentes fases.

Se ha reportado en trabajos anteriores<sup>16</sup>, la esterilización de las Np-GSH por filtración, sin embargo, no fue posible esterilizarlas por este método ya que se produce una pérdida importante de las misma. El proceso de centrifugación genera aglomerados que obstruyen los poros del filtro, reteniendo gran cantidad de NP<sub>52</sub>, lo que motivo a utilizar como medio de esterilización la luz UV.

Se ha estudiado anteriormente el efecto de la luz UV sobre el quitosán y se ha observado un entrecruzamiento en la organización de la cadena polimérica por la formación de nuevos enlaces. Lo que ocasiona disminución del peso molecular, aumentando el índice de polimerización, conservación de sus propiedades terapéuticas y aumento de la estabilidad de los compuestos estudiados. Características que se han aprovechado en la fabricación de films menos ásperas y con mayor porosidad<sup>65, 66</sup>.

En la gráfica 1 y tabla 1, se muestra una disminución en el tamaño promedio de las NP, sin afectar demasiado su distribución de tamaños, así como un aumento en la concentración de las NP. Los cambios hacia el quitosán tras su exposición a luz UV, pudieron haber contribuido a la reorganización de nuestras NP en partículas de menor tamaño y mayor estabilidad.

## Concentración de Quitosán y GSH

Mediante la ultracentrifugación las NP se concentraron aproximadamente 1:3, obteniéndose una concentración de quitosán de 4.436mg/ml.

La concentración de 11.3mM de GSH de las NP se determinó por espectrofotometría. Esta concentración no varió mucho con respecto a la concentración de GSH antes de su esterilización con luz UV, que fue de 14.31mM. Si bien existió una pérdida en la cantidad del principio activo, las NP-Q demostraron tener la capacidad de proteger al GSH de su degradación.

## Inducción de la Osteoartrosis y Administración de Tratamientos

Se indujo osteoartrosis por Transección del Ligamento Cruzado Craneal (TLCC) según la técnica de Kamekura 2005 en una sola rodilla “TLCC”, seguido de la administración de los tratamientos a los 7 días y su sacrificio a los 14 días postquirúrgicos, dejando la rodilla contralateral como “Control”. Los tratamientos fueron administrados en ambas rodillas, con 40 $\mu$ l en cada una, mediante una jeringa insulínica.

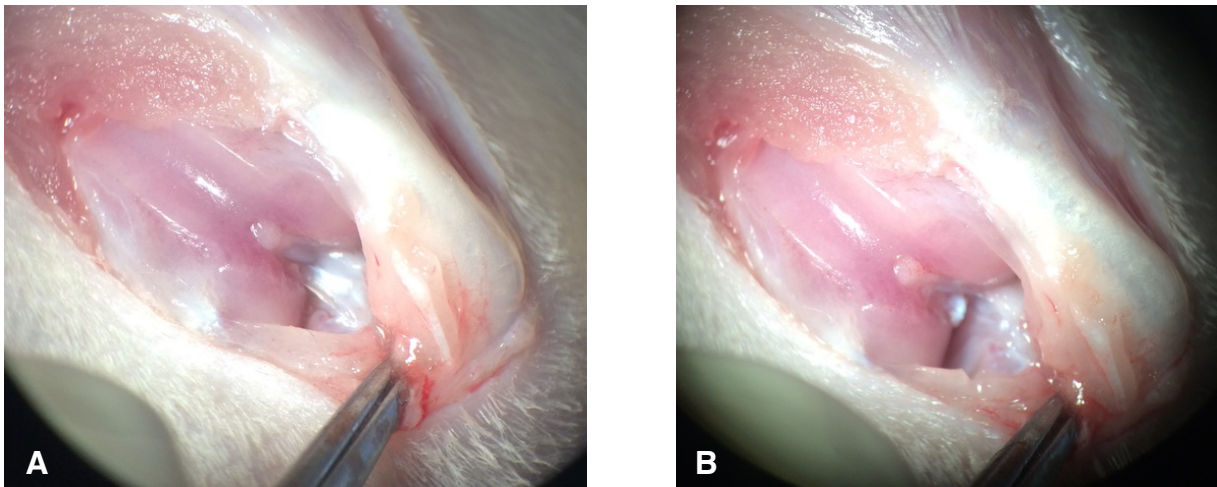


Figura 7. Fotografía de la rodilla durante la TLCC. A) se observa al fondo el ligamento cruzado craneal aun intacto y B) después de su transección.



## Grupos Experimentales

50 ratas Wistar macho de 280-320g, que se organizaron en 5 grupos cada una de 10 individuos (n=10), los tratamientos de cada grupo se muestra a continuación en la tabla 2.

Grupo	Tratamiento
1	Solución Hartman (Pisa®)
2	Ácido Acético al 1% (vehículo de las Nanopartículas)
3	Nanopartículas de Quitosán (Np-Q)
4	Nanopartículas de Quitosán con Glutati6n (Np-GSH)
5	Ácido Hialur6nico (Legend®)

Tabla 2. Tratamientos de cada grupo experimental.

Las ratas mostraron una severa claudicaci6n un d1a despu3s de la cirug1a, que fue disminuyendo progresivamente hasta el d1a 4 posquir3rgico. La claudicaci6n e inflamaci6n presente, fue a consecuencia del procedimiento quir3rgico, que involucr6 la incisi6n de la c1psula articular. Posterior a la cicatrizaci6n, los 10 d1as restantes las ratas no mostraron ninguna incomodidad para apoyar el miembro lesionado.

Ninguno de los animales mostr6 reacci6n adversa alguna a los tratamientos administrados. Sin embargo 2 ratas presentaron dehiscencia de puntos e infecci6n de la incisi6n de la piel en la primera semana posquir3rgica, por lo que fueron retiradas del estudio.

La inducci6n quir3rgica de OA a partir de TLCC, gener6 a las 2 semanas una lesi6n moderada, ideal para la evaluaci6n de los cambios agudos de la enfermedad.

## Evaluaci6n Radiogr1fica

Se realizaron estudios radiogr1ficos de las ratas, a los 0, 7 y 14 d1as postquir3rgicos, que corresponden a los periodos previo a la inducci6n quir3rgica de OA, previo a la administraci6n de los tratamientos y previo al sacrificio, respectivamente.

Al d1a 0 ninguno de los animales mostr6 lesi6n alguna y todos obtuvieron una calificaci6n de "0" en la escala de Kellgren y Lawrence (ver anexo 1). Posterior a la

inducción quirúrgica de OA, al día 7 las ratas mostraban cambios radiográficos en la rodilla con TLCC, que consistían en la presencia de irregularidades sobre la superficie articular, presencia de osteofitos y cambios en la densidad sugestivos de esclerosis. Todos con una calificación promedio de “2”, en relación a las rodillas contralaterales control en las que no se observaron cambios.

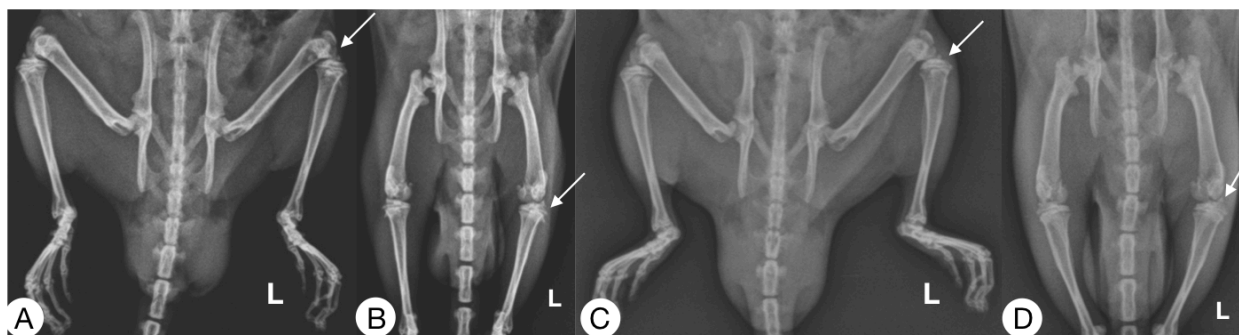
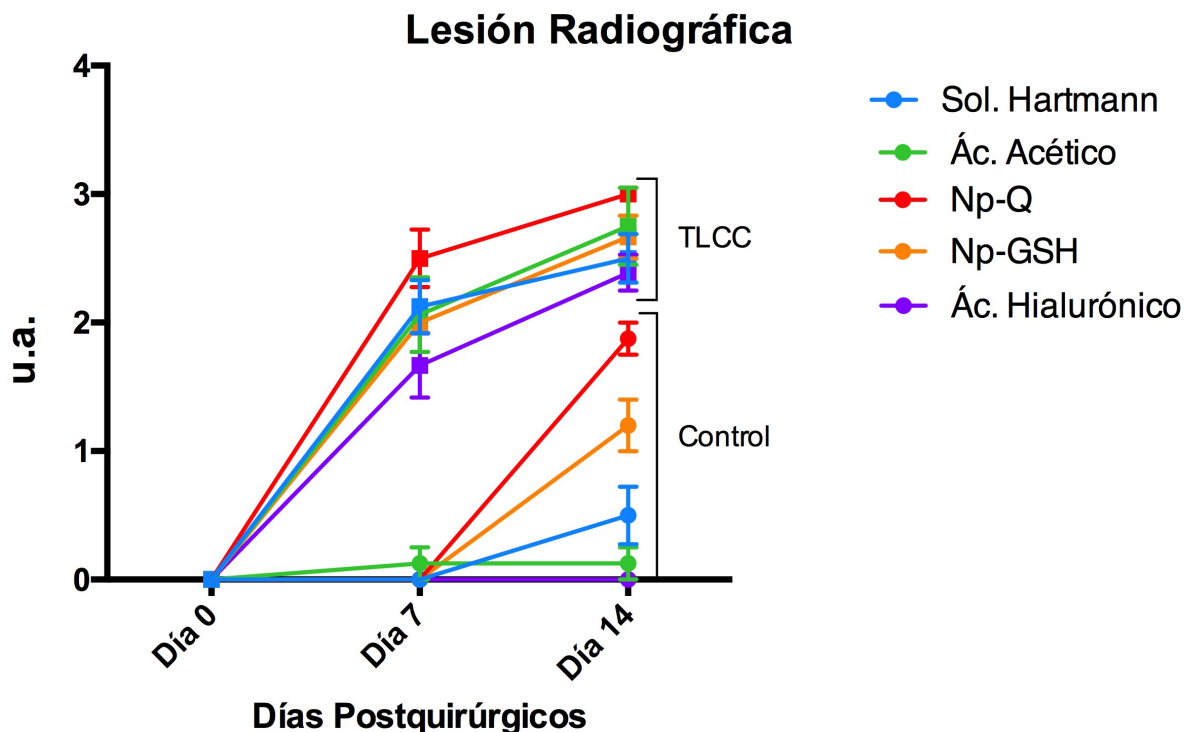


Figura 6. Se muestran dos tomas radiográficas (Medio-Lateral y Antero-Posterior) de ratas a los 14 días postquirúrgicos. Miembro pelviano derecho Control e izquierdo TLCC. A-B rata tratada con Sol. Hartman. C-D rata tratada con Np-GSH.

En la evaluación radiográfica del día 14, los grupos con TLCC mostraban cambios radiográficos más severos, con calificaciones de 2 a 3.5 según la escala de Kellgren y Lawrence (1955). Los cambios más visible se encontraron en los animales tratados con Np-Q, mientras que los animales tratados con AH fueron los que mejor conservaron la estructura ósea entre las rodillas con TLCC. Si bien existieron diferencias significativas entre los tratados con Np-Q y AH, éstas no mostraron diferencias significativas respecto a los demás tratamientos con TLCC. Las ratas tratadas con Np-GSH mostraron cambios ligeramente mayores a las tratadas con AH y Sol. Hartman, sin embargo tampoco mostraron diferencia estadísticas entre ellas ( $\alpha=0.05$ ).

Interesantemente los cambios radiográficos más importantes se observaron en las rodillas Control después de la administración de los diferentes tratamientos. Los animales tratados con Sol. Hartmann, ác. Acético y AH, no mostraron cambios radiográficos o bien en algunos cambios fueron muy sutiles. Estos podrían asociarse al inicio de un estrés mecánico por el esfuerzo compensatorio de la rodilla contralateral o bien ser parte del proceso inflamatorio por la artrocentesis, y no por el tratamiento administrado.

Sin embargo, los grupos tratados con las NP, mostraron cambios estadísticamente significativos ( $\alpha=0.05$ ), respecto a los otros grupos Control. Estos cambios fueron desde una superficie articular irregular, hasta la presencia de posibles osteofitos. El grupo Control tratado con Np-GSH mostró cambios con calificaciones de 1 (daño leve), mientras el grupo Control con Np-Q tuvo una degeneración mucho mayor, llegando a lesiones grado 2 (daño moderado), no obstante no mostró diferencias estadísticas significativas respecto a los grupos TLCC con AH y Sol. Hartmann ( $\alpha=0.05$ ).



Gráfica 2. Se muestran los grados de lesión según la escala Kellgren y Lawrence 1955 (u.a.) en diferentes periodos de tiempo con los diferentes tratamientos (ANOVA;  $F_{(9, 80)}=79.19$ ;  $p<0.001$ ).

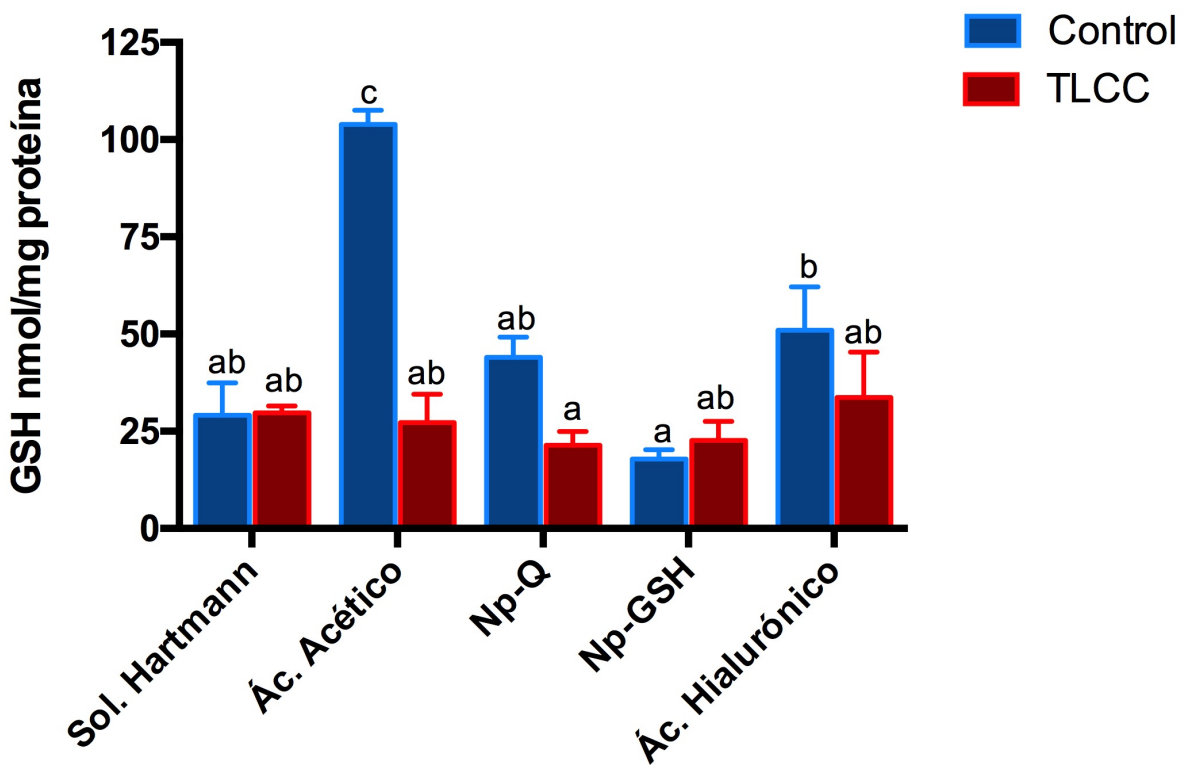
## Cuantificación de Glutación

La concentración de GSH y TBARS dentro de la articulación se cuantificó del cartílago articular y meniscos. Las muestras se obtuvieron de un lisado y homogenizado.

La gráfica 3 muestra la concentración más alta de GSH en el grupo control con ácido Acético. El marcado incremento en el aumento de GSH en este grupo se atribuye a la

activación de los mecanismos reguladores del estrés oxidativo ante una sustancia ácida. Contrariamente a lo que se observa en los grupos con NP, las cuales cuentan como vehículo al ácido Acético. Adicionalmente los grupos con daño articular, si bien mostraron una disminución en el GSH, resultado del estrés oxidativo que se presenta durante la enfermedad, estos no mostraron diferencias significativas con respecto al control con solución Hartman ( $\alpha=0.05$ ).

Contrariamente a lo esperado, las concentraciones más bajas de GSH se observaron en las articulaciones expuestas a Np-GSH, tanto Control como TLCC. Sin encontrarse diferencias estadísticas significativas respecto a los otros grupos. Resultados similares se observaron en un estudio con condrocitos *in vitro*, en donde altas concentraciones de Np-GSH (0.6mM de GSH) mostraron concentraciones más bajas de GSH que en las células no tratadas, sin que las diferencias fueran estadísticamente significativas entre ambos grupos.

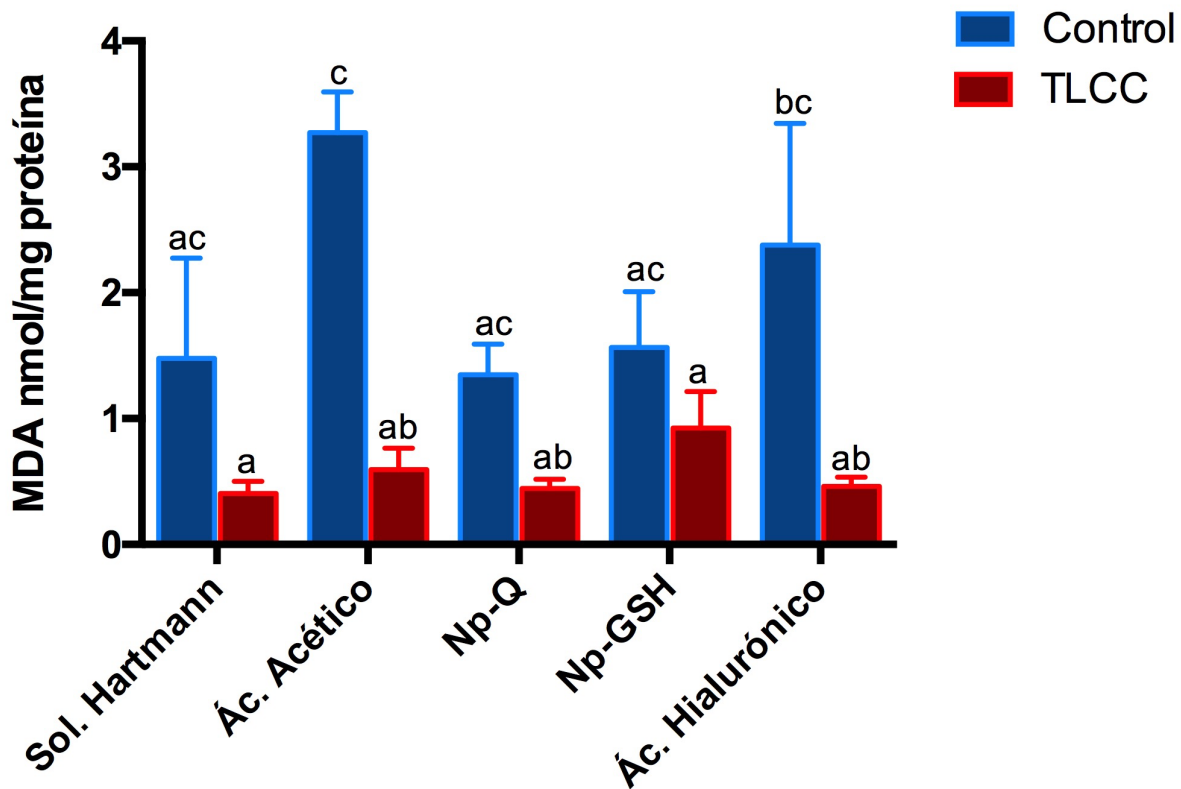


Gráfica 3. Se muestra el promedio  $\pm$  SEM de la concentración de GSH en cartílago y meniscos de las ratas a los 14 días postquirúrgicos con los diferentes tratamientos. Barras con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre las medias (ANOVA;  $F_{(9, 24)}=15.11$ ;  $p<0.0001$ ;  $r^2=0.85$ ).

## Cuantificación de TBARS

Contrario a lo reportado en otros estudios<sup>16, 67, 68, 69</sup>, en este estudio los grupos sin lesión OA mostraron las concentraciones de MDA más altas, al evaluarlas mediante el método espectrofotométrico para TBARS.

El grupo tratado únicamente con ácido acético, mostró la concentración de MDA (3.271nmol/mg proteína) mas alta, seguramente por microambiente oxidante que genera, sin embargo este efecto no se observó en las articulaciones control tratadas con NP, lo que sugiere un efecto protector de estas NP. Existen trabajos que muestran la capacidad antioxidante del quitosán por lo que es probable que este induciendo una menor concentración de MDA (1.349nmol/mg proteína)<sup>16</sup>.



Gráfica 4. Se muestra el promedio  $\pm$  SEM de la concentración de MDA en cartílago y meniscos de las ratas a los 14 días postquirúrgicos con los diferentes tratamientos. Barras con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre las medias (ANOVA;  $F_{(9, 26)}=5.623$ ;  $p<0.0003$ ;  $r^2=0.6606$ ).

## Evaluación Histopatológica e Inmunohistoquímica

Para el examen histopatológico se realizaron tinciones para Hematoxilina-Eosina, van Gieson, Azul de Toluidina, Safranina O y Naranja de Acridina. Igualmente se realizaron inmunohistoquímicas para Colágena tipo 2A1 (Col-2) y Metaloproteinasa 13 (MMP-13).

La evaluación de los cortes histopatológicos se realizó mediante una guía modificada a partir del sistema Mankin (ver anexo 2), calificando individualmente cada característica morfológica<sup>28, 29, 56</sup>.

### Distribución Celular

La distribución de los condrocitos residentes en el cartílago articular, bajo el estímulo de estrés, pasan de una organización columnar a formar pequeños grupos de células (grupos isogénicos) y posteriormente si el estrés continúa, la pérdida celular por apoptosis promueve la presencia de espacios amplios entre célula y célula, dejándolas aisladas. Este cambio en su distribución es muy evidente entre los grupos control y los grupos con TLCC, en donde la pérdida de la organización columnar se vio más afectada, existiendo una distribución diferencial en las área (ANOVA; disease factor:  $F_{(1, 30)}=66.59$ ;  $p<0.0001$ );.

Como se puede observar tanto en la Figura 7, como en la gráfica 5 (ANOVA; treatment factor:  $F_{(4, 30)}=13.52$ ;  $p<0.0001$  e interacción:  $F_{(4, 30)}=1.191$ ;  $p=0.3348$ ), la pérdida de organización del cartílago sano tratado con Np-Q resulta equiparable a la de los grupos con TLCC y en conjunto, las Np-Q mostraron tener un efecto deteriorante que afecta al cartílago. No así las Np-GSH, que mostraron una capacidad para conservar la organización celular en la OA, mejor que el grupo con Sol. Hartmann y muy similar al HA.

### Población

La reducción en la población celular residente del cartílago, se hace evidente no solo en la disminución del número de células, sino también en la distribución de éstas. Pudiendo encontrar desde células aisladas, hasta áreas completamente desprovistas de celularidad. Los cambios observados en los diferentes grupos van de la mano con los cambios observados en la distribución celular (ver figura 7). Igualmente, las áreas con mayores cambios en la MEC se observan en las áreas acelulares del cartílago.

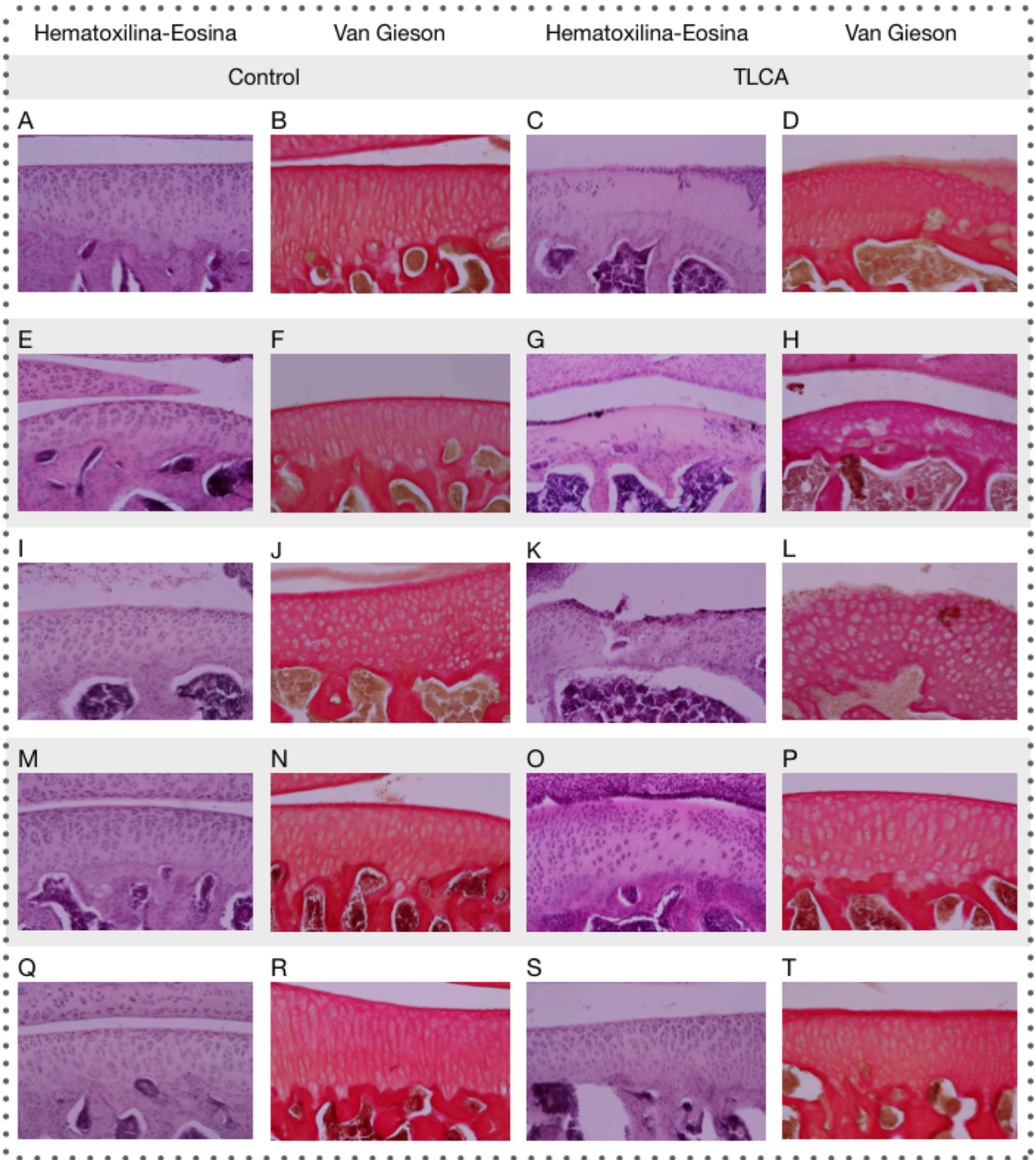


Figura 7. Histopatologías de las rodillas (20x), tinción de HE y van Gieson de los diferentes tratamientos: Solución Hartman (A-D), Ácido Acético (E-H), Np-Q (I-L), Np-GSH (M-P) y Ácido Hialurónico (Q-T).

Si bien, no se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos (ver gráfica 5) (ANOVA; disease factor:  $F_{(1, 27)}=33.52$ ;  $p<0.0001$ , treatment factor:  $F_{(4, 27)}=1.6$ ;  $p=0.2029$  e interacción:  $F_{(4, 27)}=0.6332$ ;  $p=0.6432$ ), cabe destacar, que en el examen histopatológico del cartílago con TLCC tras la administración de Np-GSH así como de AH, éstas no presentaban áreas completamente acelulares, si no que por el contrario presentaban algunas células aisladas en las áreas de mayor estrés, y en el caso de las Np-GSH un mayor número de grupos isogénicos como respuesta del cartílago para reponer las células perdidas (ver figura 7).

### **Morfología Celular**

Los condrocitos osteoartrósicos tienden a hipertrofiarse, causando alteraciones en la producción de la MEC, que posteriormente contribuyen a la debilidad y degradación de ésta. La presencia de un mayor número de condrocitos hipertróficos, habla del grado de daño hacia la articulación, así como de los intentos de reparación de la articulación.

En los diferentes tratamientos administrados, solo los tratados con Np-Q mostraron una alteración en la morfología de los condrocitos, tanto en el aumento del número de condrocitos hipertróficos, como la presencia de células similares a fibrocitos sobre las áreas más dañadas (ANOVA; disease factor:  $F_{(1, 27)}=1.713$ ;  $p=0.2016$ , treatment factor:  $F_{(4, 27)}=9.142$ ;  $p=0.0001$  e interacción:  $F_{(4, 27)}=2.653$ ;  $p=0.0548$ ). El aumento en la hipertrofia de los condrocitos fue incluso más severo en el grupo control tratado con las Np-Q (ver gráfica 5). No así las Np-GSH, que probaron conservar la morfología de los condrocitos de la misma manera que el AH.

### **Tide Mark**

La “tide mark” o línea basal, es la frontera que delimita la zona del cartílago articular, del cartílago calcificado antes de entrar en contacto con el hueso subcondral. La pérdida de dicha línea es indicativa de que el daño articular ha llegado a los estratos más profundos del cartílago y es el inicio de los cambios en el hueso subcondral que posteriormente darán pie a la osificación<sup>34</sup>.

Nuevamente y como se puede observar en la figura 7, las Np-Q mostraron tener una lesión muy severa, tanto en el grupo Control como el de TLCC. Pero resulta más interesante observar los cambios en los grupos expuestos a las Np-GSH. Si bien, el grupo Control de las Np-GSH mostraron una interrupción de la línea basal, la cual no se observó en los demás grupos Control. En los grupos con TLCC, fueron los tratados



con AH que mostraron un daño más severo a la línea basal, mientras que las NP-GSH demostraron proteger mejor este estrato del cartílago inclusive con respecto a su Control (ver gráfica 5) (ANOVA; disease factor:  $F_{(1, 29)}=19.52$ ;  $p=0.0001$ , treatment factor:  $F_{(4, 29)}=4.667$ ;  $p=0.005$  e interacción:  $F_{(4, 29)}=5.479$ ;  $p=0.0021$ ).

### **Hueso Subcondral**

Muy similar a los cambios observados en la línea basal, se observaron cambios a nivel del hueso subcondral, relacionado con la propagación del estrés osteoartrosico hacia las capas más profundas.

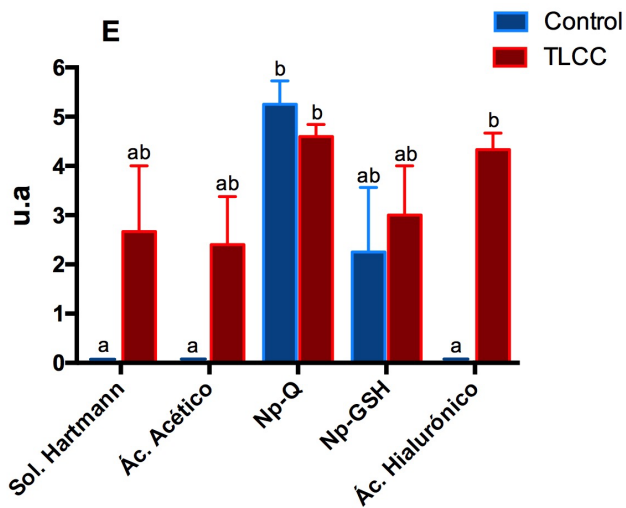
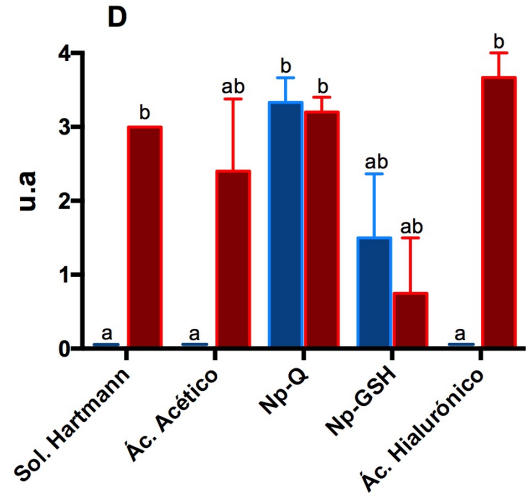
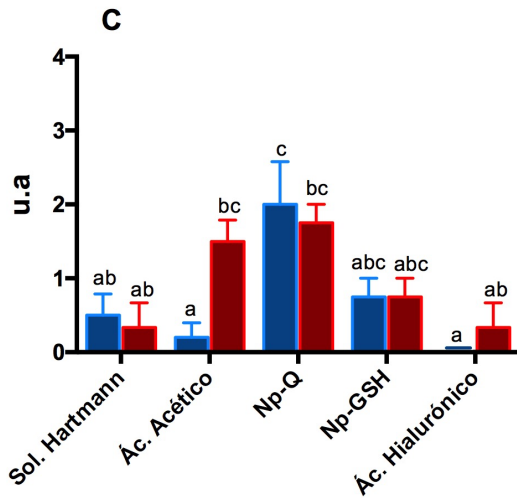
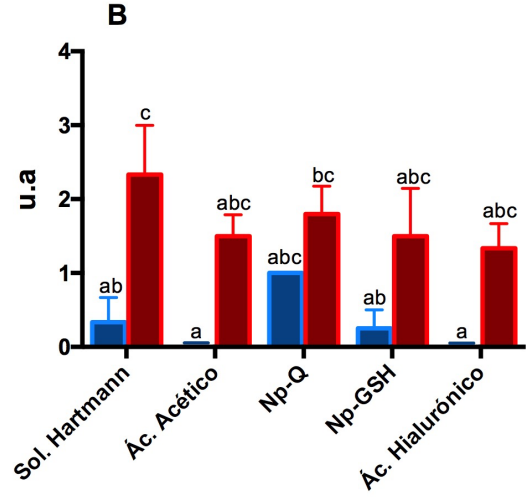
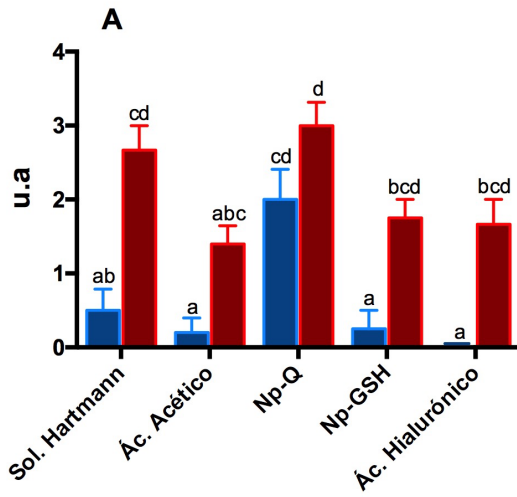
Confirmando lo encontrado en la evaluación radiográfica, en esta evaluación las Np-GSH no mostraron ninguna capacidad para proteger este estrato, observándose incluso cambios en el hueso subcondral del grupo Control, contrario a los hallazgos en el cartílago articular (ANOVA; disease factor:  $F_{(1, 27)}=14.51$ ;  $p=0.007$ , treatment factor:  $F_{(4, 27)}=8.424$ ;  $p=0.0001$  e interacción:  $F_{(4, 27)}=2.923$ ;  $p=0.038$ ).

### **Superficie**

Tratándose de lesiones agudas, los cambios observados sobre la superficie articular de los grupos TLCC fueron mínimos, siendo ligeras irregularidades sobre la superficie casi indiferenciables de los grupos Control (ver gráfica 6) (ANOVA; disease factor:  $F_{(1, 29)}=9.594$ ;  $p=0.0043$ , treatment factor:  $F_{(4, 29)}=84.61$ ;  $p<0.0001$  e interacción:  $F_{(4, 29)}=5.125$ ;  $p=0.003$ ). Únicamente las Np-Q mostraron lesiones más severas, tanto en el grupo Control como el grupo TLCC, llegando incluso a observarse úlceras severas en el cartílago articular, observables en la figura 7.

### **MEC**

En el caso de la constitución de la matriz cartilaginosa, los cambios entre grupos Control y grupos TLCC fueron más evidentes que en la superficie (ver gráfica 6) (ANOVA; disease factor:  $F_{(1,29)}=9.594$ ;  $p=0.0043$ , treatment factor:  $F_{(4, 29)}=84.61$ ;  $p<0.0001$  e interacción:  $F_{(4, 29)}=5.125$ ;  $p=0.003$ ). Aquí nuevamente destacan las Np-Q, que mostraron un cambio mayor de la MEC, hacia un cartílago con características de tejido fibroso. Contrariamente a estos resultados, las Np-GSH mostraron una mejor conservación de la matriz.



Gráfica 5. Efecto de los diferentes tratamientos sobre las características morfológicas del cartílago: A) Distribución Celular, B) Población, C) Morfología Celular, D) Tide Mark y E) Hueso Subcondral). Barras con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre las medias ( $p < 0.05$ ).

## Naranja de Acridina

Adicionalmente se realizó una tinción con naranja de acridina, que nos permite evaluar daño celular temprano, asociado a procesos de necrosis y apoptosis. Plemel et al (2017) demostraron una disminución en la coloración roja en el citoplasma y núcleo coincidente con el aumento en la muerte celular, esto debido a la disminución de la concentración de RNA de la célula, en conjunto con la degradación del DNA<sup>79</sup>. Recordar que al tratarse de un tejido fijado con parformaldehído, el cual puede llevar a la depolimerización del DNA, la naranja de acridina tiñe por igual DNA y RNA en una coloración roja<sup>78</sup>.

En los grupos con TLCC se observó una menor coloración, así como células con núcleos completamente verdes especialmente en las zonas cercanas a las áreas acelulares, posiblemente relacionadas con el daño celular en esa zona. Interesantemente los grupos tratados con Np-GSH fueron los únicos que mostraron diferencias en comparativa con los otros grupos, que se manifestó en una mejor delimitación de las células a partir de su coloración.

Debemos mencionar que los grupos tratados con AH mostraron una fluorescencia exclusivamente verde, esto asociado posiblemente a cambios en el tejido, entre ellos el pH, el cual puede inhibir la emisión del espectro rojo de la tinción<sup>78,79</sup>.

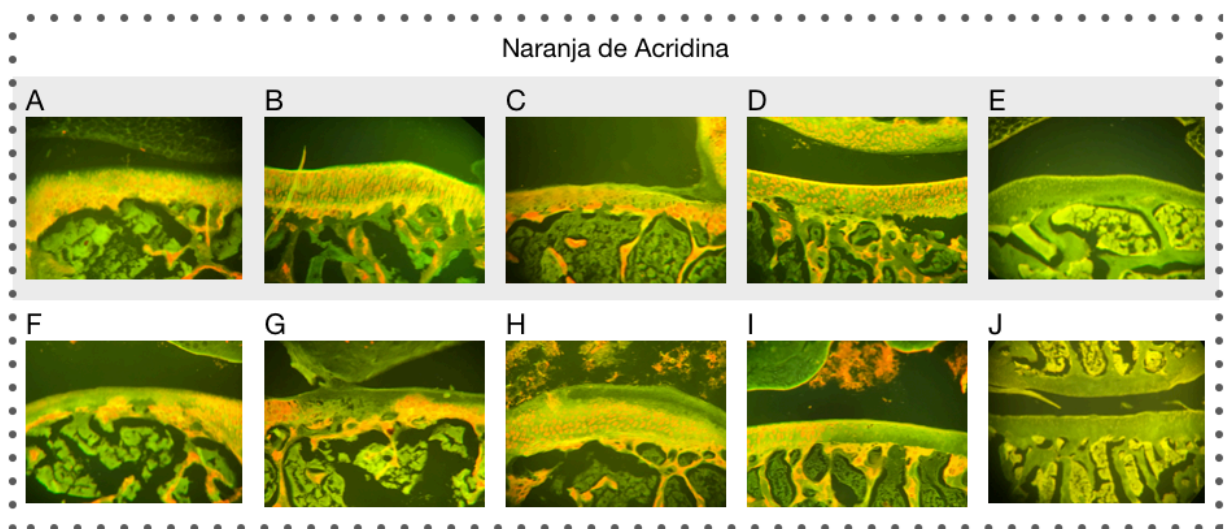


Figura 8. Histologías de las rodillas (10x), tinción de Naranja de Acridina de los diferentes tratamientos Control (A-E) y TLCC (F-J): Solución Hartman (A y F), Ácido Acético (B y G), Np-Q (C y H), Np-GSH (D y I) y Ácido Hialurónico (E y J).

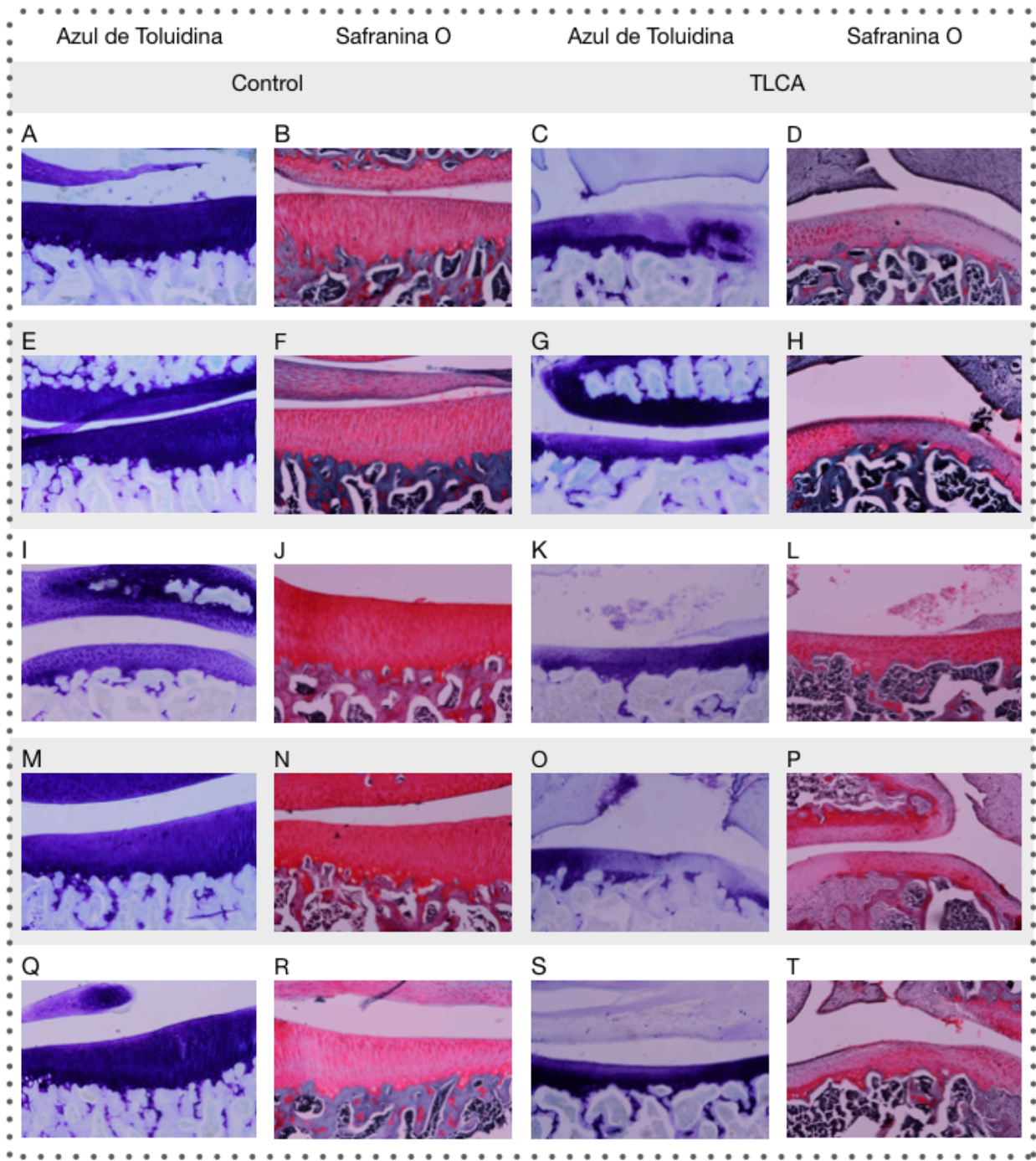


Figura 9. Histopatologías de las rodillas (10x), tinción de Azul de Alciano y Safranina O de los diferentes tratamientos: Solución Hartman (A-D), Ácido Acético (E-H), Np-Q (I-L), Np-GSH (M-P) y Ácido Hialurónico (Q-T).

## **Pérdida de Proteoglicanos**

Tanto la tinción de Azul de Toluidina, como la de Safranina O nos permiten ver la presencia de proteoglicanos (PG) dentro del cartílago articular, mientras que la intensidad de la coloración por Safranina O es directamente proporcional a la concentración de proteoglicanos, el azul de Toluidina tiene teóricamente una mejor afinidad en cartílagos osteoartrósicos.

Como es lógico, los grupos controles presentan una mayor coloración que se observan tanto en la figura 9, como en la gráfica 6 donde tienen la calificación más baja (menor pérdida de proteoglicanos). Mientras que los grupos TLCC muestran una pérdida de la coloración especialmente en las áreas con pérdida celular, lo que es de esperarse dado que son estas células las encargadas de sintetizar a los PG .

Sin embargo, los grupos de NP mostraron una ligera pérdida, perceptible aún en las áreas con células viables del grupo Control, por una disminución en la intensidad especialmente en la tinción de azul de Toluidina. Aunque solo el grupo TLCC con Np-Q mostró diferencias significativas con respecto a los Controles de los demás tratamientos, el grupo control presentó una pérdida de coloración equiparable a los grupos TLCC con sol. Hartman, ácido Acético y AH, mientras que la pérdida de coloración de las Np-GSH fue más moderada (ANOVA; disease factor:  $F_{(1, 27)}=48.46$ ;  $p<0.0001$ , treatment factor:  $F_{(4, 27)}=7.583$ ;  $p=0.0003$  e interacción:  $F_{(4, 27)}=1.316$ ;  $p=0.2892$ ).

## **Colágena 2**

La presencia de Col-2, estimada según la inmunoreactividad o inmunotinción es heterogénea entre los individuos y no se encontró diferencias significativas entre ningún grupo (ANOVA; disease factor:  $F_{(1, 29)}=0.4921$ ;  $p=0.4886$ , treatment factor:  $F_{(4, 29)}=1.132$ ;  $p=0.3608$  e interacción:  $F_{(4, 29)}=0.3968$ ;  $p=0.8092$ ).

Sin embargo, cabe destacar algunas características observadas que no se tomaron en cuenta en la evaluación estadística, como la organización de las fibras, donde encontramos la mayor diferencia entre los grupos, ya que en los grupos con TLCC las fibras muestran una organización alterada con respecto a sus Controles.

Adicionalmente los tratamientos con Np-Q mostraron aumentar la intensidad de la inmunoreactividad al mismo tiempo parecían aglomerar las fibras de colágena, mientras que las Np-GSH conservaban una mejor organización de las fibras a pesar de

no incrementar la señal. Interesantemente los grupos tratados con AH, en condiciones Control y TLCC, mostraron la inmunoreactividad más intensa y mejor organización de las fibras, incluso respecto al grupo Control de la Sol. Hartmann.

### **Metaloproteinasa 13**

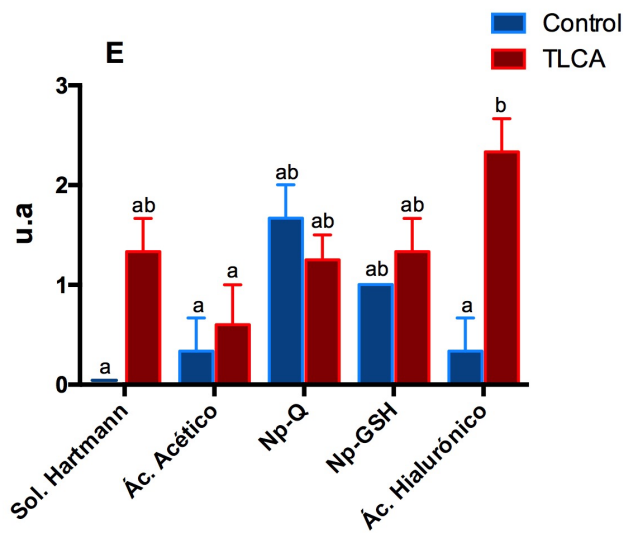
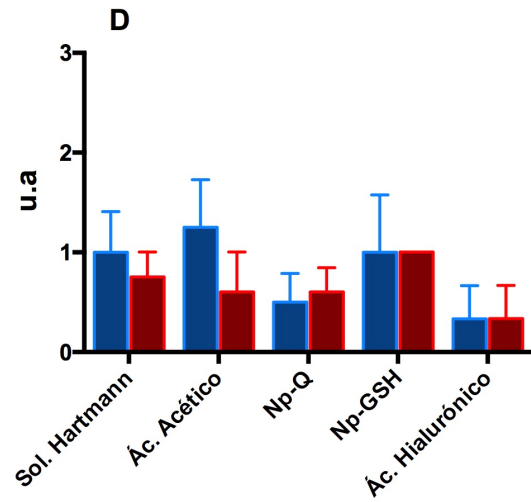
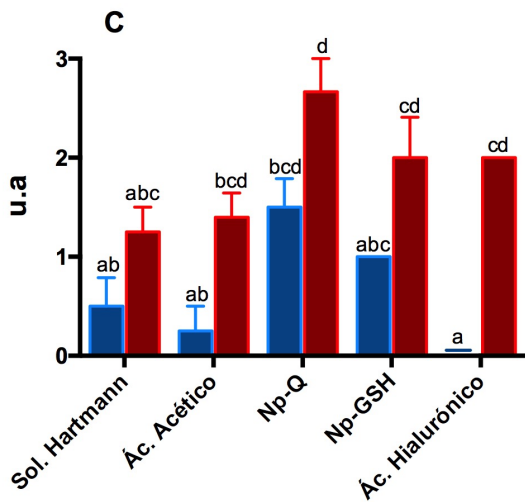
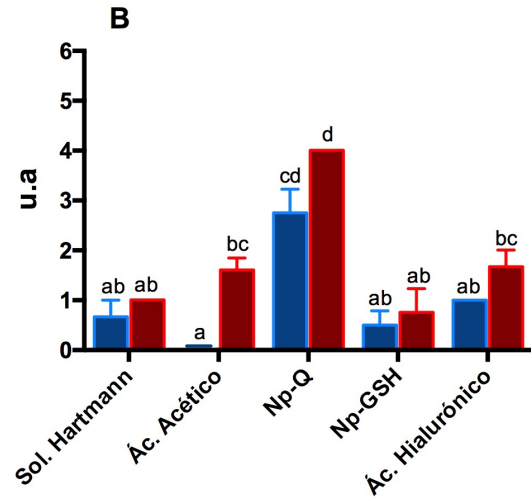
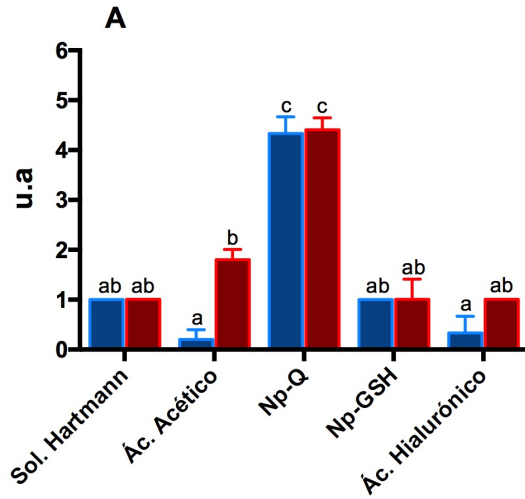
MMP-13 es uno de los marcadores de inflamación en la OA, ya que es una de las principales causantes de la degradación del cartílago. La MMP-13 es detectable en articulaciones sanas, ya que participa en el recambio normal de la MEC<sup>19, 21</sup>. Sin embargo se ha comprobado que después de la inducción de OA por TLCC, ésta incrementa drásticamente desde la primer semana<sup>68</sup>.

Los grupos controles con Sol. Hartmann, ác. Acético y AH, no mostraron señal alguna o bien mostraron 1 o 2 puntos aislados en la articulación, lo que no presenta algo anormal<sup>19, 70</sup>. Dentro de los controles, sin embargo, las NP mostraron un aumento de ligero (Np-GSH) a moderado (Np-Q) de la señal, similar a lo encontrado en los grupos con TLCC. A pesar de ello, las NP tuvieron una menor concentración de MMP-13 en comparación al grupo TLCC de AH, quien tuvo la mayor concentración de MMP-13 en todo el estudio, lo que confirma que si bien el AH tiene una función mecanoprotectora, no así antiinflamatoria (ANOVA; disease factor:  $F_{(1, 23)}=11.48$ ;  $p=0.0025$ , treatment factor:  $F_{(4, 23)}=3.669$ ;  $p=0.0188$  e interacción:  $F_{(4, 23)}=4.203$ ;  $p=0.0107$ ).

Pocas fueron las características histopatológicas que mostraron diferencias estadísticas significativas entre los diferentes tratamientos. A esto debemos mencionar que, de manera general, entre los individuos del mismo grupo existió gran variabilidad en el grado de lesión presentada. Recomendamos para estudios subsecuentes, ampliar el tamaño de la población de estudio y así poder reducir la variabilidad de dichos hallazgos.

De manera general, exceptuando por el grupo tratado con Np-Q, los grupos sin OA, presentaron algunas alteraciones en la morfología del cartílago, las cuales podrían estar asociadas al estrés mecánico causado por la compensación ambulatoria de la rodilla contralateral o bien por la inflamación causada por el procedimiento de la artrocentesis.

El ácido Acético, el cual fue empleado como control para el vehículo de las nanopartículas, fue el único tratamiento que estimuló el aumento de GSH así como de MDA, sugiriendo una posible estimulación causada por el pH del vehículo (pH 4.1).



Gráfica 6. Efecto de los diferentes tratamientos sobre las características morfológicas del cartílago: A) Superficie, B) MEC, C) Pérdida de PGs, D) Col-2 y E) MMP-13). Barras con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre las medias ( $p < 0.05$ ).



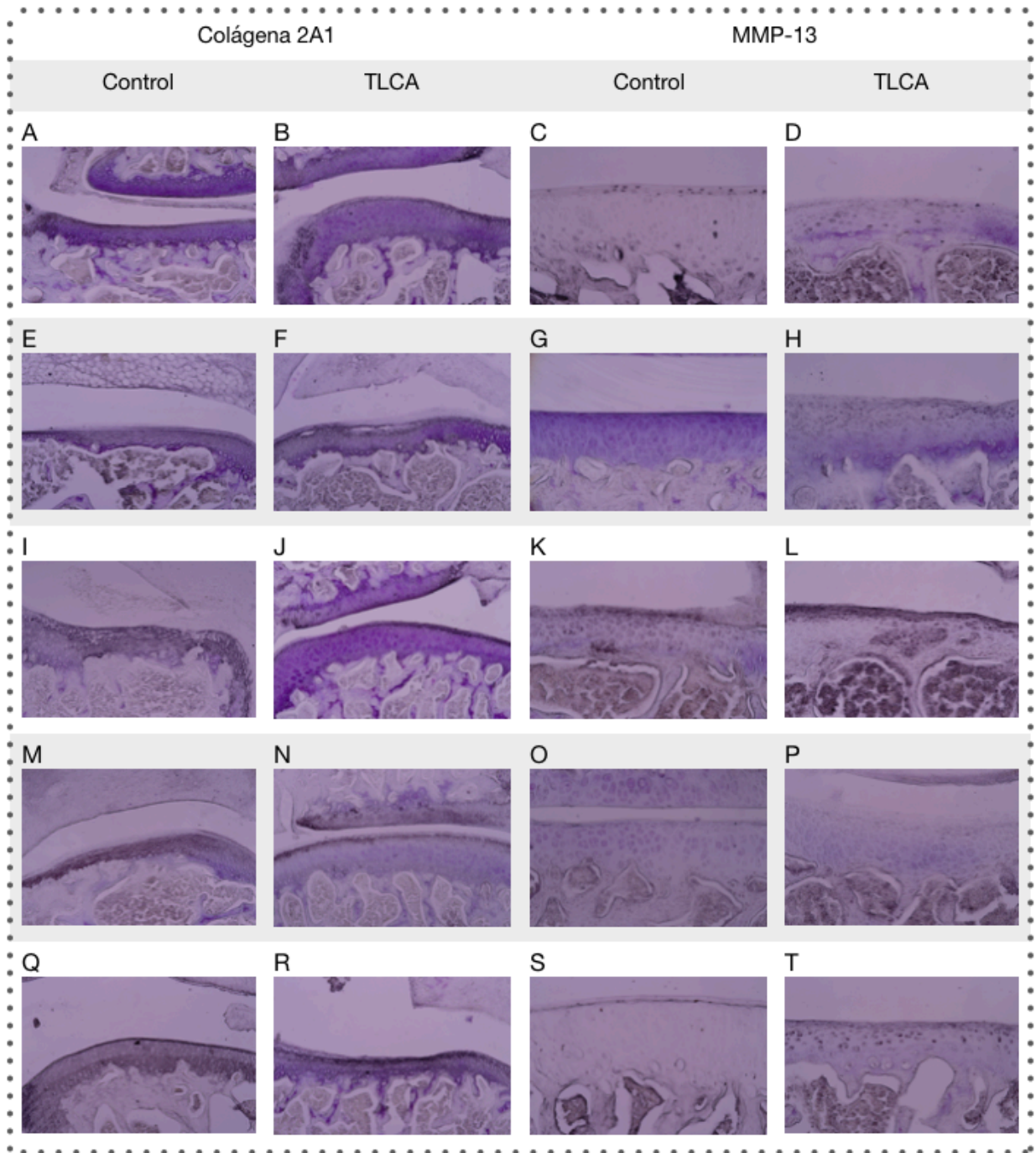


Figura 10. Micrografía de las rodillas inmunoteñidas para Colágena 2A1 (10x) y Metaloproteinasa-13 (20x) de los diferentes tratamientos: Solución Hartman (A-D), Ácido Acético (E-H), Np-Q (I-L), Np-GSH (M-P) y Ácido Hialurónico (Q-T).

Sin embargo, estos hallazgos no coincidieron con lo observado en las evaluaciones histopatológicas, donde el ácido Acético demostró ser equiparable a la Sol. Hartman. Wen et al. (2013) trabajaron con Np-Q en ácido acético a un pH de 5, sin encontrar efectos negativos debido al pH de la solución<sup>54</sup>, y si bien nosotros demostramos que se puede trabajar con el vehículo a pH 4.1, es apropiado considerar trabajar con vehículos a pH fisiológico con objeto de restar los posibles efectos negativos observados en las pruebas bioquímicas.

El Quitosán ha demostrado disminuir las concentraciones de MDA, al mismo tiempo que aumenta la actividad de enzimas antioxidantes y estos efectos se ven incrementados en mayor grado cuando el quitosán se encuentra nanoparticulizado<sup>16, 54</sup>, lo que se esperaría controlara el proceso degenerativo de las OA *in vivo*. No obstante, en nuestro estudio se observaron cambios degenerativos mayores, aún en condiciones control, al emplear NP únicamente de Quitosán.

Por otro lado, se han descrito reacciones inflamatorias severas a dosis altas de Quitosán y sus NP<sup>75, 76, 77</sup>, sugiriendo que los efectos nocivos observados en este estudio pudieran deberse a una concentración elevada del Quitosán por encima de los niveles tolerables para el organismo, induciendo un mayor proceso inflamatorio asociado con el aumento de MMP-13, que desencadenó en la degradación articular observada en los estudios histopatológicos.

Injertos con base en Quitosán empleados en el tratamiento de la OA para su regeneración, han demostrado ser una matriz ideal para la proliferación de los condrocitos, gracias a sus similitudes con los PG y al AH en estructura y propiedades mecánicas. Sin embargo, el tejido nuevo tiende a ser fibrocartilago con menor concentración de PG y mecánicamente inferior al nativo<sup>71, 72</sup>. Efectos similares se observaron en este mismo estudio, donde se presentó una mayor fibrosis del tejido articular, con menor cantidad de PG.

A pesar de que el Quitosán comparte similitudes estructurales con los GAG presentes en los PG, que han demostrado estimular la condrogénesis<sup>19, 72</sup>, el Quitosán parece interactuar con los factores de crecimiento para la estimulación de los fibrocitos y no así de otras células<sup>73, 74</sup>. Esto puede explicar porque a pesar de existir un aumento en la viabilidad de las células, estas contaban con una morfología similar a la de los fibrocitos.

Otros dos efectos que se observaron al utilizar Np-Q intraarticular, fue el aumento en la producción de Col-2 y una mayor cantidad de MMP-13. Si bien Pickarski demostró que existe un aumento en la producción de Col-2 así como de MMP-13 desde la semana 1 empleando la técnica de TLCC<sub>70</sub>, en nuestro caso la presencia de estos dos compuestos fue perceptiblemente mayor bajo el estímulo de Np-Q, en comparación a las articulaciones con TLCC tratadas con Sol. Hartman y ác. Acético.

Las características de la Col 2 observadas con nuestras NP son el resultado de la estimulación de una síntesis estable, aunada a la fuerte interacción del Quitosán con la colágena, formando un complejo molecular que pudiera conferir estabilidad mecánica y a su vez, una mayor estabilidad protectora contra la degradación de la colágena<sup>71, 72, 75</sup>.

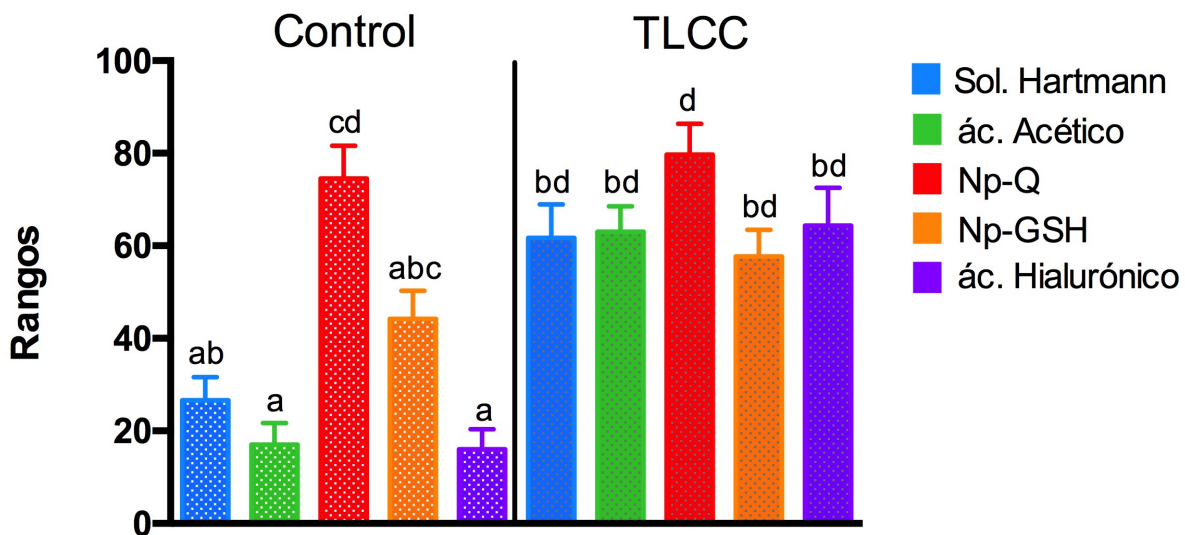
Por su parte, las Np-GSH mostraron los mismos efectos positivos que las Np-Q, hablando del aumento en la síntesis de Col-2. Sin embargo, los cambios degenerativos casi no se observaron en las articulaciones tratadas con las Np-GSH, sugiriendo un efecto benéfico del GSH hacia la regulación de la enfermedad y los efectos secundarios del Quitosán. De manera global, las Np-GSH lograron proteger a los condrocitos de la apoptosis, lo que se observó en una menor pérdida de la población en los grupos tratados con estas NP, así como una mejor conservación de la morfología celular, en comparación con las NP-Q y a su vez una mejor conservación de la MEC, indicando la capacidad del GSH para ayudar a dichas células a mantener la constitución correcta de la MEC.

Los únicos cambios severos en las Np-GSH fueron aquellos dentro del hueso subcondral, los cuales se hacen evidentes tanto en las radiografías como en los cortes histopatológicos y que presentaron similitudes con los cambios observados con las Np-Q. El número mayor de cambios en los estratos más profundos de la articulación en comparación con la superficie articular, nos lleva a pensar en la posible incapacidad de las Np-GSH de llegar a estos estratos, permaneciendo atrapado exclusivamente en el cartílago articular debido posiblemente a la carga positiva de las NP que interactúan con la MEC cargada negativamente por lo que su efecto terapéutico queda limitado a la MEC en sus estratos superficiales, no pudiendo llegar al hueso subcondral. Surge aquí la pregunta del comportamiento de las Np-GSH sobre el hueso subcondral en casos de OA avanzada, donde la erosión del cartílago deje al descubierto a esta estructura<sup>19, 53</sup>.

Igual que en otros estudios<sup>32, 36, 37</sup>, el AH demostró tener la capacidad de regular el proceso OA pero sin ningún efecto antiinflamatorio. Los cambios observados no fueron diferentes significativamente respecto a los animales tratados con Sol. Hartman, no obstante los efectos más importantes del AH se reportan a largo plazo, siendo 2

semanas insuficientes para realmente ver una diferencia respecto a las articulaciones con OA no tratadas.

Cabe mencionar que en el caso de la exposición a las nanopartículas, el efecto evaluado es un efecto subagudo. Para poder comparar completamente la efectividad de los tratamientos propuestos en este trabajo, consideramos que se debe profundizar en relación a la organización celular del cartílago y las señales celulares asociadas a la modulación del estrés oxidativo por el GSH nanovectorizado, en vista de los cambios benéficos observados *in situ* tras la administración de un dosis única de Np-GSH, que sugieren la capacidad para ejercer efectos biológicos asociados a la proliferación celular, remodelación de la matriz extracelular y modulación asociada a la antioxidación dependiente de GSH.



Gráfica 7. Prueba de rangos de Kruskal-Wallis sobre la evaluación del examen histopatológico. Barras con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre los rangos (ANOVA;  $p < 0.0001$ ; Kruskal-Wallis = 58.20).

# CONCLUSIONES

Las NP-GSH de  $253.3\text{nm} \pm 85.4\text{nm}$  y esterilizadas mediante luz UV, resultaron útiles para la administración intraarticular de GSH, sin inducir efectos agudos en las ratas tratadas. El vehículo (ácido acético) de las NP estudiadas en este trabajo mostró ser biocompatible para el cartílago al administrarlo intraarticularmente.

Sin embargo, los hallazgos histopatológicos sugieren que las Np-Q generan eventos asociados a la inflamación y fibrosis, tras una única administración a una dosis de  $0.6\text{mg/kg}$ .

A pesar de dichos efectos secundarios, las Np-Q también demostraron estimular la síntesis de colágena de tipo 2, aunado a una capacidad para protegerla de la degradación, a partir de la interacción del quitosán con la colágena.

Los efectos sobre la Col-2, pero no así los eventos asociados a inflamación y fibrosis fueron observados en las ratas tratadas con Np-GSH. Estas nanopartículas no indujeron los efectos significativos adversos que se observaron por nanopartículas de quitosán, si no que los efectos celulares relacionados sugieren inducir efectos protectores.

Este efecto condroprotector se hizo evidente en el análisis histopatológico, donde se observó una menor pérdida de la población celular con una mejor conservación de su morfología, así como una mejor conservación de la MEC. Sugiriendo un papel importante del GSH en la regulación del condrocito para resistir la apoptosis y poder llevar a cabo el mantenimiento de la MEC.

El trabajo realizado aquí, provee conocimiento sólido para continuar con el estudio de los efectos biológicos observados *in vivo*, asociados a la administración intraarticular de sistemas nanoparticulizados, que contribuyan en el proceso degenerativo de la osteoartritis.

# PERSPECTIVAS

Si bien las Np-GSH, demostraron ser estables para su administración intraarticular, se requiere de mayor investigación con respecto a las características fisicoquímicas asociadas y los efectos relacionados con su actividad terapéutica.

Es necesario continuar con el estudio de toxicocinético y farmacocinético de las NPs estudiadas con objeto de abundar en el conocimiento de las propiedades biológicas relacionadas a los efectos estudiados en este trabajo de investigación.

Este estudio contribuyó a conocer los efectos de las NP *in vivo*, y la capacidad de las Np-GSH para modular el estado redox, proteger a los condrocitos de la apoptosis y aumentar su capacidad para sostener la síntesis de Col-2 y MEC, así como protegerla de su degradación. Sería interesante conocer que rutas de señalización celular están relacionadas con los efectos significativos estudiados.

Creemos que es importante conocer el efecto dosis-respuesta y la relación con el tiempo de los efectos estudiados. Consideramos que la contribución de las nanopartículas preparadas a base de quitosán desde el punto de vista de los cambios celulares inducidos benéficos para la articulación cuando tienen GSH así como a las propiedades mecánicas que pudieran estar asociadas a la integridad articular son interesantes de seguir estudiando *in vivo* e *in vitro*. Existen estudios que han demostrado la permanencia intraarticular de NP con Quitosán hasta por 24 días<sup>75</sup>, a diferencia de la vida media del AH de 13 horas con efecto residual de 7 días<sup>37</sup>.

A pesar de que en este estudio se evaluó el efecto de las Np-GSH tras 7 días de su administración única, será de interés observar su comportamiento a largo plazo, siendo que estas podrían seguir teniendo una actividad terapéutica por mucho más tiempo, aportando protección al cartílago y permitiéndole quizá darle oportunidad al tejido dañado de una mayor reparación, aunado quizá a terapia celular, en casos crónicos de osteoartritis.

# REFERENCIAS

1. Sánchez-Naranjo JC, López-Zapata DF. Fisiopatología celular de la osteoartritis: el condrocito articular como protagonista; *Latreia*. 2001; 24(22): 167-178.
2. Stashak TS. Enfermedades de las articulaciones, los tendones, los ligamentos y las estructuras relacionadas. En: Adams: Claudicación en el caballo. 5ta ed. USA: Ed. Inter-Médica; 2004. p. 469-684.
3. Adarmes H, Solis JP, Müller A, Galleguillos M. Determinación de nitrito como metabolito estable del óxido nítrico en el líquido sinovial de articulación metacarpofalángica equina. *Arch Med Vet*. 2009; 41, 255-259.
4. Masri-Daba M, Ibarra-Ponce de León C, Lombardero-Goldaracena G, Paasch-Martínez L. Situación actual de la reparación condral en el equino. *Vet. Méx*. 2006; 37 (3): 369-378.
5. Polli M, Caggiano N, Rolando J, Perrone G, Marino M, De Simone E, Chiappe BA; Variación del nivel de citoquinas en líquido sinovial de equinos con enfermedad articular tratados con bisfosfonatos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. 2013; 7(1):69-83.
6. Pineda-Aranda A. Evaluación morfológica de células pluripotenciales mesenquimales de equino en un polímero biodegradable. [Tesis maestría]. [México]: UNAM; 2011. 64p.
7. Frisbie DD, Kawacak CE, Mcllwraith W, Werpy NM. Evaluation of polysulfated glycosaminoglycan or sodium hyaluronan administered intra-articularly for treatment of horses with experimentally induced osteoarthritis. *AJVR*. 2009 Feb; 70(2): 203-209.
8. Fernández-Dorta L. Glucosamina y sulfato de condroitina en el tratamiento de la osteoartritis. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2016; 47 (2): 93-99.
9. Sandoval JA, López C, Carmona JU. Terapias con potencial regenerativo articular en el caballo. *Arch Med Vet*. 2013; 45: 229-236.
10. Frisbie DD, Ghivizzani SC, Robbins PD, Evans CH, Mcllwraith CW. Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. *Gene Therapy* 2002; 9: 12-20.
11. Frisbie DD, et al. Clinical, biochemical, and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis. *AJVR*. 2007 Mar; 68 (3): 290-296.
12. Dai-Hung Ngo, Thanh-Sang Vo, Dai-Nghiep Ngo, Kyong-Hwa Kang, Jae-Young Je, Hoang Nguyen-Duc Pham, Hee-Guk Byun, Se-Kwon Kim. Biological effects of chitosan and its derivatives. *Elservier - Food Hydrocolloids*. 2025; 51: 200-216.
13. Rebrin I and Sohal RS. Pro-oxidant shift in glutathione redox state during aging. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008; 60.

14. Martínez-Sámano J, Torres-Durán PV, Juárez-Oropeza MA. El glutati6n y su asociaci6n con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. *REB*. 2011; 30(2): 56-67.
15. Delgadillo-Lara CA. Estudio de la localizaci6n de nanopartículas a base de ácido-poliláctico-co-glic6lico (PLGA) con curcumina y su actividad sobre las enzimas glutati6n peroxidasa y reductasa [Tesis pregrado]. [México]: FESC; 2016. 79 p.
16. López-Barrera LD, Díaz-Torres R, López-Macay A, López-Reyes AG, Piña-Olmos S and Ramirez-Noguera P. Oxidative stress modulation induced by chitosan-glutathione nanoparticles in chondrocytes. *Pharmazie*. 2019; 74. doi:10.1691/ph.2019.8166
17. Kuyinu EL, Narayanan G, Nai LS and Laurencin CT. Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes. *J Orthop Surg Res*. 2016; 11: 19. doi: 10.1186/s13018-016-0346-5
18. König HE, Liebich HG. Anatomía de los Animales Domésticos: Aparato Locomotor. 2da ed. España: Editorial Médica Panamericana; 2005.
19. Quintero M, Monfort J, Mitrovic DR. Osteoartrosis: Biología, fisiopatología, clínica y tratamiento. España: Editorial Médica Panamericana; 2010.
20. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of The Cell*. 6th Edition. United States: Garland Science; 2015.
21. Adarmes H, Riveros A, Galleguillos M, Gonzaloez E. Contenido de glicosaminoglicanos del líquido sinovial de la articulaci6n metacarpofalángica de caballos castrados y yeguas de diferentes edades. *Arch. Med. Vet*. 2003 Ene; 35 (1) <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2003000100005>
22. Galleguillos M, Carrillo R, Flores G, Adarmes H. Metaloproteinasas y Osteoarthritis. *Avances en Ciencias Veterinarias*. 2013; 28 (1): 19-24
23. Hayami T, Pickarski M, Wesolowski GA, McLane J, Bone A, Destefano J, et al. The role of subcondral 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*. 2004; 50 (4): 1193-1206.
24. Shibakawa A, et al. The role of subchondral bone resorption pits in osteoarthritis: MMP production by cells derived from bone marrow. *OsteoArthritis and Cartilage*. 2005; 13, 679-687. doi:10.1016/j.joca.2005.04.010
25. Sandell LJ and Aigner T. Articular cartilage and changes in Arthritis: Cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*. 2001; 3 (107)
26. Braun HJ and Gold GE. Diagnosis of Osteoarthritis: Imaging. *Bone*. 2012; 51(2): 278–288. doi:10.1016/j.bone.2011.11.019.
27. Vidinov N, Djerov A. Ultrastructural changes in the transitional zone between articular cartilage and synovial membrane during the development of experimental



- osteoarthritis. *International Orthopaedics (SICOT)*. 2002; 26:137–140 DOI 10.1007/s00264-002-0340-x
- 28.Pritzker KPH, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *OsteoArthritis and Cartilage*. 2006; 14: 13-29. doi:10.1016/j.joca.2005.07.014
- 29.Mainil-Varlet P, et al. Histological Assessment of Cartilage Repair: A Report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS). *Journal of Bone and Joint Surgery*. 2003; 85-A (2): 45 - 57.
- 30.Chen L, Yang G, Grosser T. Prostanoids and inflammatory pain. Elsevier: *Prostaglandins & other Lipid Mediators*. 2013; 104–105: 58–66.
- 31.van Lara M, et al. Pain Treatment in Arthritis-Related Pain: Beyond NSAIDs. *Open Rheumatol J*. 2012; 6: 320–330. doi: 10.2174/1874312901206010320
- 32.Ayhan E, Kesmezacar H, Akgun I. Intraarticular injections (corticosteroid, hyaluronic acid, platelet rich plasma) for the knee osteoarthritis. *World J Orthop*. 2014; 5(3): 351-361. doi:10.5312/wjo.v5.i3.351
- 33.Hauser RH. The Deterioration of Articular Cartilage in Osteoarthritis by Corticosteroid Injections. *Journal of Prolotherapy*. 2009; 2: 107-123
- 34.Clegg DO, et al. Glucosamine, Chondroitin Sulfate, and the Two in Combination for Painful Knee Osteoarthritis. *New England j med*. 2006; 354(8): 795-808
- 35.Kolarz G, Kotz R, and Hochmayer I. Long-Term Benefits and Repeated Treatment Cycles of Intra-Articular Sodium Hyaluronate (Hyalgan) in Patients With Osteoarthritis of the Knee. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2003; 32(5):310-319
- 36.Yanagisawa et al. Weekly injections of Hylan G-F 20 delay cartilage degeneration in partial meniscectomized rat knees. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2016; 17:188. DOI 10.1186/s12891-016-1051-6
- 37.Rezende MU, Hernandez AJ, Gomes Cardim Mendes Oliveira CR, Bolliger Neto R. Experimental osteoarthritis model by means of medial meniscectomy in rats and effects of diacerein administration and hyaluronic acid injection. *Sao Paulo Med J*. 2015; 133(1): 4-12. DOI: 10.1590/1516-3180.2013.6730001
- 38.Blaney Davidson EN, Vitters EL, van Beuningen HM, van de Loo FAJ, van den Berg WB, and van der Kraan PM. Resemblance of Osteophytes in Experimental Osteoarthritis to Transforming Growth Factor –Induced Osteophytes. *American College of Rheumatology, Arthritis & Rheumatism*. 2007; 56 (12): 4065-4073. DOI 10.1002/art.23034
- 39.Hashimoto S, Creighton-Achermann L, Takahashi K, Amiel D, Coutts RD and Lotz M. Development and regulation of osteophyte formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2002; 10: 180–187. doi:10.1053/joca.2001.

40. Pecchi E, Priam S, Gosset M, Pigenet A, Sudre L, Liguillon C, Berenbaum F and Houard X. Induction of nerve growth factor expression and release by mechanical and inflammatory stimuli in chondrocytes: possible involvement in osteoarthritis pain. *Arthritis Res Ther.* 2014; 16 (1): R16. doi: 10.1186/ar4443
41. Marshall JS, Gomi K, Blennerhassett MG and Bienenstock J. Nerve Growth Factor Modifies the Expression of Inflammatory Cytokines by Mast Cells Via a Prostanoid-Dependent Mechanism. *J Immunol.* 1999; 162: 4271-4276. <http://www.jimmunol.org/content/162/7/4271>
42. Seidel MF, Wise BL and Lane NE. Nerve growth factor: an update on the science and therapy. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013 Sep; 21(9): 1223–1228. doi: 10.1016/j.joca.2013.06.004
43. Nencini S, Ringuet M, Kim DH, Chen YJ, Greenhill C and Ivanusic JJ. Mechanisms of nerve growth factor signaling in bone nociceptors and in an animal model of inflammatory bone pain. *Molecular Pain.* 2017; 13:1-19. DOI: 10.1177/1744806917697011
44. Blanco García FJ, de Toro FJ y Fernández FG. El óxido nítrico y el cartílago articular. *Rev Esp Reumatol.* 2005;32(3):126-33
45. Henrotin YE, Bruckner P and Pujol JPL. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *OsteoArthritis and Cartilage.* 2003; 11: 747–755. doi:10.1016/S1063-4584(03)00150-X
46. Tikku ML, Allison GT, Naik K y Larry SK. Malondialdehyde oxidation of cartilage collagen by chondrocytes. *OsteoArthritis and Cartilage.* 2003; 11: 159–166
47. Kerksick C and Willoughby D. The Antioxidant Role of Glutathione and N-Acetyl-Cysteine Supplements and Exercise-Induced Oxidative Stress. *Journal of the International Society of Sports Nutrition.* 2005; 2(2): 38-44.
48. Angthong C, Phumala Morales N, Sutipornpalangkul W, Khadsongkram A, Pinsornsak P and Boonchana Pongcharoen B. Can levels of antioxidants in synovial fluid predict the severity of primary knee osteoarthritis: a preliminary study. *SpringerPlus.* 2013; 2: 652
49. Mohanraj VJ and Y Chen Y. Nanoparticles – A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 2006; 5 (1): 561-573.
50. Gómez-Gaete C. Nanopartículas Poliméricas: Tecnología Y Aplicaciones Farmacéuticas. *Rev. Farmacol. Chile.* 2014; 7(2): 7-16.
51. Kou L, Sun J, Zhai Y and He Z. The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2013; 8: 1-10.
52. Gan Q, Wang T, Cochrane C and Paul McCarron P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for

- gene delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2005; 44: 65–73. doi:10.1016/j.colsurfb.2005.06.001
53. Pereira P, et al. *Chitosan Nanoparticles for Biomedical Applications*. USA. Nova Science Publishers. 2010
  54. Zheng-Shun Wen, Li-Jia Liu , You-Le Qu, Xiao-Kun OuYang, Li-Ye Yang and Zi-Rong Xu. Chitosan Nanoparticles Attenuate Hydrogen Peroxide-Induced Stress Injury in Mouse Macrophage RAW264.7 Cells. *Marine Drugs*. 2013; 11: 3582-3600. doi:10.3390/md11103582
  55. Temple E, Jay GD, Elsaid KA and Fleming BC. Animal Models of Osteoarthritis: Challenges of Model Selection and Analysis. *AAPS J*. 2013 Apr; 15 (2): 438–446. doi: 10.1208/s12248-013-9454-x
  56. Kamekura S, Hoshi K, Shimoaka T, Chung U, Chikuda H, Yamada T, Uchida M, Ogata N, Seichi A, Nakamura K and Kawaguchi H. Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *OsteoArthritis and Cartilage*. 2005; 13: 632-641. doi:10.1016/j.joca.2005.03.004
  57. Piskin A, Gulbahar MY, Tomak Y, Gulman B, Hokelek M, Kerimoglu S, Koksall B, Alic T, Kabak YB. Osteoarthritis models after anterior cruciate ligament resection and medial meniscectomy in rats - A histological and immunohistochemical study. *Saudi Med J*. 2007; 28 (12): 1796-1802
  58. Rahman I, Kode A and Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*. 2006; 1 (6): 3159 - 3165
  59. Ohkawa H, Ohishi N and Yagi K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analytical Biochemistry*. 1979; 95: 351-358
  60. Schmitz N, Laverty S, Kraus VB and Aigner T. Basic methods in histopathology of joint tissues. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2010; 18: 113-116
  61. Carson FL and Cappellano CH. *Histotechnology - A Self Instructional Text*. Texas-USA: ASCP Ed.; 4th Edition; 2015
  62. Huang DK, Zhang YX, Man SQ, Yu FZ and Shen JJ. Comparison of collagen fiber staining between Van-Gieson staining and Masson trichrome staining of hepatic specimens in mice with *Schistosoma japonicum* infection. *PubMed*. 2012; 24(4): 468-70.
  63. Aguirre Sánchez HI. Colorante safranina O. *Medigraphic Investigación en Discapacidad*. 2012; 1(2): 83-85
  64. Juneja SC, Ventura M, Jay GD and Veillette C. A Less Invasive Approach of Medial Meniscectomy in Rat: A Model to Target Early or Less Severe Human Osteoarthritis. *J Arthritis* 2016; 5(2). <http://dx.doi.org/10.4172/2167-7921.1000193>

65. Mucha M and Pawlak A. Complex study on chitosan degradability. *Polimery*. 2002; 47(7): 509-516
66. Sionkowska A, Planecka A, Lewandowska K, Kaczmarek B, Szarszewska P. Influence of UV-irradiation on molecular weight of chitosan. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivaties*. 2013; 18: 21-28
67. Bai B and Li Y. Danshen prevents articular cartilage degeneration via antioxidation in rabbits with osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2016; 24: 514-520
68. Vyas S, Sharma H and Vyas RK. Oxidative stress and Antioxidant level in the serum of osteoarthritis patients. *International Journal of Scientific and Research Publications*. 2015; 5(4).
69. Ostalowska et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in synovial fluid of patients with primary and secondary osteoarthritis of the knee joint. *OsteoArthritis and Cartilage*. 2006; 14: 139-145. doi:10.1016/j.joca.2005.08.009
70. Pickarski M, Hayami T, Zhuo Y and Duong LT. Molecular changes in articular cartilage and subchondral bone in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2011; 12(197). <http://www.biomedcentral.com/1471-2474/12/197>
71. Haoy T, Wena N, Caoz JK, Wangy HB, Lùx SH, Liuy T, Liny QX, Duany CM and Wangy CY. The support of matrix accumulation and the promotion of sheep articular cartilage defects repair in vivo by chitosan hydrogels. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2010; 18: 257-265. doi:10.1016/j.joca.2009.08.007
72. Yan LP, et al. Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering applications. *Wiley Online Library*. 2010. doi: 10.1002/jbm.a.32869
73. Young ME, et al. Characterization of gelatin/chitosan/hyaluronan scaffold-polymer. *Electron. J. Biotechnol*. 2010 Sep; 13 (5). ONLINesversión On-line ISSN 0717-3458
74. Howling GI, Dettmar PW, Goddard PA, Hampson FC, Dornish M and Wood EJ. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin "fibroblasts and keratinocytes" in vitro. *Biomaterials*. 2001; 22: 2959-2966.
75. Kojima K, Yoshiharu O, Kojima K, Miyatake K, Fujise H, Shigemasa Y and Minami S. Effects of Chitin and Chitosan on Collagen Synthesis in Wound Healing. *J. Vet. Med. Sci*. 2004; 66(12): 1595–1598
76. Hua-Ding Lu, Hui-Qing Zhao, Kun Wang, Lu-Lu Lv. Novel hyaluronic acid–chitosan nanoparticles as non-viral gene delivery vectors targeting osteoarthritis. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011; 420: 358–365
77. Mi Lan Kang, Ji-Yun Ko, Ji Eun Kim and Gun-Il Im. Intra-articular delivery of kartogenin-conjugated chitosan nano/ microparticles for cartilage regeneration. *Biomaterials*. 2014; 35: 9984-999

78. von Bertalanffy L. Acridine Orange Fluorescence in Cell Physiology, Cytochemistry and Medicine. *Protoplasma*. 1963; 57: 51-83. <https://doi.org/10.1007/BF01252046>
79. Plemel JR, Caprariello AV, Keough MB, Henry TJ, Tsutsui S, Chu TH, Schenk GJ, Klaver R, Yong VW and Stys PK. Unique spectral signatures of the nucleic acid dye acridine orange can distinguish cell death by apoptosis and necroptosis. *J. Cell Biol.* 2017; 216 (4): 1163–1181. <https://doi.org/10.1083/jcb.201602028>

# ANEXOS

## Anexo 1:

Características a evaluar en el examen radiográfico	
0	Sin cambios radiográficos.
1	Cambios sutiles. Posible inicio de osteofitos.
2	Cambios mínimos. Presencia de osteofitos y posible esclerosis y quistes.
3	Cambios moderados. Múltiples osteofitos, poca esclerosis y posible deformación de los bordes del hueso.
4	Cambios severos. Osteofitos grandes, esclerosis severa y deformidad de los bordes del hueso.

Kellgren and Lawrence 1955

**Anexo 2:**

Características a evaluar en el examen histopatológico

Grado / Calificación	0	1	2	3	4	5	6
<b>Distribución Celular</b>	Columnar	Pocos grupos isogénicos	Moderados grupos isogénicos	Muchos grupos isogénicos	Cel individuales y desorganizadas		
<b>Población</b>	Normal	Poca pérdida celular. Lagunas vacías aisladas	Moderada pérdida celular. Área completa acelular	Marcada pérdida celular. 2 o más áreas acelulares	Extensa pérdida celular. Toda una superficie acelular		
<b>Morfología Celular</b>	Normal	Hipertrofia leve	Hipertrofia moderada	Hipertrofia severa	Fibroцитos		
<b>Tide Mark</b>	Normal			Interrumpida	Pérdida de la línea		
<b>Hueso Subcondral</b>	Normal				Remodelaje aumentado. Disminución en el grosor de las trabéculas.	Necrosis/esclerosis	Quieste subcondral y osteofitos
<b>Superficie Articular</b>	Intacta	Superficie Irregular	Fisuras superficiales	Fisuras profundas	Erosiones y/o disminución en el grosor del cartilago	Exposición del Hueso Subcondral	Microfracturas del hueso son reparación del tejido
<b>MEC</b>	Normal	Edema y fibrilación superficial	Edema y fibrilación profunda	Edema y fibrilación severa. Pérdida de las fibras de colágena	Quiestes en la MEC	Fibrocartilago y pérdida de la MEC	Tejido fibroso
<b>Pérdida de Proteoglicanos</b>	Normal	Disminución en 1/3	Disminución en 2/3	Disminución en más de 2/3			
<b>Col 2A1</b>	Marcada	Moderada	Débil	Sin señal			
<b>MMP 13</b>	Sin señal	Débil	Moderada	Marcada			

**Anexo 3:**



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
COMITÉ INTERNO PARA EL CUIDADO Y USO  
DE LOS ANIMALES EN EXPERIMENTACIÓN  
CICUAE-FESC  
OFICIO: FESC/CICUAE/20/07/2018

**DRA. PATRICIA RAMÍREZ NOGUERA  
ACADÉMICA DE LA FES-CUAUTITLÁN  
P R E S E N T E**

En respuesta a las correcciones solicitadas (según oficio : FESC/CICUAE/06/03/2018) por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación CICUAE-FESC a su protocolo de experimentación: **“Efecto de la administración intraarticular de nanopartículas de quitosán con glutatión, en osteoartritis”.**

Clave CICUAE: **C 18\_02.**

El comité le notifica:

Las correcciones solicitadas fueron solventadas satisfactoriamente.

Por lo que la resolución del Comité fue **APROBAR** el presente protocolo.

Se le solicita notificar por escrito a este Comité cuando su proyecto experimental con los animales quede concluido.

Sin otro en particular, le envío un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Cuautitlán Izcalli Estado de México a 27 de julio de 2018.  
VICEPRESIDENTE DEL CICUAE-FESC

M. en D. OLIVIA ADAMS VAZQUEZ.



C.c.p. Archivo CICUAE-FESC  
CMM/cmm