



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA

EFFECTOS DEL EJERCICIO SOBRE LA CONFORMACIÓN INTERNA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR DE RODILLA EN RATÓN COMO MODELO ANIMAL

TESIS

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Ingeniería Mecánica

Presenta:

Q.F.B. Abisag Marín Espinoza

Director de tesis:

Dra. Laura Alicia Ibarra Bracamontes

Codirector de tesis:

Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina

Morelia, Mich., Diciembre 2012



A la memoria del Sr. Antonio Marín Hernández.

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

RECONOCIMIENTOS:

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Programa SANTADER –ECOS por haberme brindado el apoyo económico que ha hecho posible este trabajo para poder realizar los estudios de Maestría.

A la Facultad de Ingeniería Mecánica por permitirme estudiar mi grado de maestría y alcanzar una de mis metas profesionales.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por su función formadora en sus aulas de capital humano, que constituyen el futuro de México

Al laboratorio de Biología de Sistemas del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

DEDICATORIA:

A Dios.

Gracias Señor por darme la sabiduría y la fuerza de cada día para continuar en mi vida profesional.

A mi madre

Imelda Espinosa Baltasar

Por darme todo tu apoyo incondicional, por todas tus oraciones que han sido de gran ayuda, por tu gran ejemplo de mujer trabajadora que te ha caracterizado siempre.

A mi hermano.

Omar Marín Espinoza

Gracias por ser mi amigo y apoyarme en todo.

A mi novio.

Julio Cesar Pérez Reyes

Por darme tú apoyo, comprensión y por compartir tu conocimiento que han sido de gran ayuda, por tu amor que me sirve para ser una mujer llena de sueños y metas.

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. **Gabriel Gutiérrez Ospina** por su supervisión durante el desarrollo del presente trabajo. El Dr. Gutiérrez Ospina recibió apoyo a través de un proyecto de estancia de consolidación otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 94312).

A la Dra. Margarita Gómez-Chavarín por la asesoría durante la realización de los procedimientos de análisis estadístico de los datos presentados en la presente propuesta

A la Dra. Armida Báez Saldaña por la asesoría durante la realización de los procedimientos de ELISA dirigidos a la obtención de los datos relativos a las concentraciones de citosinas en el cartílago.

A las doctoras. Alma Lilia Fuentes y Esperanza Herrera por el apoyo técnico en técnicas de inmunohistoquímica y por permitir el acceso al equipo de microscopia del Laboratorio de Ecofisiología Animal del Instituto de Investigaciones Sobre Recursos Naturales.

A Hugo Olvera por el apoyo técnico relativo a las técnicas de histoquímica.

A los compañeros de la maestría y amigos en general.

Por su apoyo, enseñanza y comprensión en las materias. Por las experiencias, aventuras, recuerdos, consejos, ayuda, apoyo y confianza que han compartido en mi vida, gracias por creer en mí y por su motivación.

A los sinodales.

Por dedicarme su tiempo y su conocimiento

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a chronic degenerative illness of synovial articulations of wide movement. Although has been proposed the fact that the stress associated to exercise can predispose the development of OA, data in literature are inconsistent. In this work was used an animal model to study the impact of different levels of mechanical stress correlated to exercise and its osteoarthritic potential. According to the experimental results, it has been observed that free access of exercise induces an increment of cell and acellular components of the femoro-tibial articular cartilage. Based on the above, it can be stated that manipulation of chronicity and the intensity of exercise could help to evaluate the impact either beneficial or noxious of exercise on the articulations extremities in vivo.

RESUMEN

La osteoartritis es un padecimiento crónico degenerativo de las articulaciones sinoviales de amplio movimiento. Aunque se ha propuesto que el estrés relacionado con el ejercicio puede predisponer su desarrollo, los datos en la literatura son inconsistentes. En este trabajo de tesis se trabajó con un modelo animal para estudiar el impacto de los distintos niveles de estrés mecánico asociado al ejercicio y su potencial osteoartrítico. De acuerdo a los resultados experimentales, se ha podido observar que el ejercicio de acceso libre induce un incremento de los componentes celulares y acelulares del cartílago articular femoro-tibial. Estos resultados nos permiten suponer que la manipulación de la cronicidad y la intensidad del ejercicio nos permitirán evaluar el impacto benéfico o nocivo del ejercicio sobre las articulaciones de las extremidades *in vivo* en futuros estudios.

ÍNDICE

| | |
|---|------------|
| <i>DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS</i> | <i>iii</i> |
| <i>ABSTRACT</i> | <i>vi</i> |
| <i>RESUMEN</i> | <i>vii</i> |
| <i>LISTA DE TABLAS</i> | <i>12</i> |
| <i>GLOSARIO</i> | <i>13</i> |
| <i>Capítulo 1 INTRODUCCIÓN</i> | <i>15</i> |
| 1.1. Planteamiento del problema | 16 |
| 1.2. Justificación | 16 |
| 1.3. Objetivos y aportaciones esperadas | 17 |
| 1.3.1. Objetivo general | 17 |
| 1.3.2. Objetivos específicos | 17 |
| 1.4. Hipótesis | 17 |
| 1.5. Antecedentes | 18 |
| <i>Capítulo 2 MARCO TEÓRICO</i> | <i>21</i> |
| 2.1. Estructura general del cartílago hialino articular | 21 |
| 2.2. Cartílago articular | 22 |
| 2.2.1. Condrocitos | 23 |
| 2.2.2. Matriz extracelular | 24 |
| 2.2.3. Mecanismo de acción del ácido hialurónico | 25 |
| 2.3. Líquido sinovial | 25 |

| | |
|---|----|
| 2.4. Membrana sinovial | 26 |
| 2.5. Osteoartritis | 26 |
| <i>Capítulo 3 ASPECTOS BIOÉTICOS</i> | 28 |
| 3.1. Introducción | 28 |
| 3.2. Disposiciones generales | 29 |
| 3.3. Cuidado y uso de animales de laboratorio | 30 |
| 3.4. Criterios cumplidos en el presente trabajo | 33 |
| <i>Capítulo 4 MATERIALES Y MÉTODOS</i> | 34 |
| 4.1. Modelo animal | 34 |
| 4.2. Metodología | 34 |
| 4.2.1. Tinciones histoquímicas | 35 |
| 4.2.2. Cuantificación de los condrocitos | 36 |
| <i>Capítulo 5 RESULTADOS</i> | 38 |
| 5.1. Consumo de alimento, peso corporal y grasa intervisceral | 42 |
| 5.2. Densidad de condrocito en el cartílago articular | 43 |
| 5.3. Evaluación cualitativa de la matriz extracelular condral | 44 |
| 5.4. Estadística de los datos experimentales | 46 |
| 5.4.1. Análisis estadístico de dos medias con t-student | 47 |
| 5.4.2. Análisis de varianza | 51 |
| 5.4.3. Prueba de Tukey | 55 |
| <i>Capítulo 6 CONCLUSIONES</i> | 57 |
| 6.1. Discusión general | 57 |
| 6.2. Conclusiones del trabajo de tesis | 58 |

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| 6.3. Perspectivas a futuro | 59 |
| <i>ANEXOS</i> | <i>60</i> |
| <i>ACCIONES DE DIFUSIÓN</i> | <i>63</i> |
| <i>BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA</i> | <i>65</i> |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| <i>Figura 1. Factores de riesgo para el desarrollo de osteoartritis</i> | 18 |
| <i>Figura 2. Representación esquemática de las zonas del cartílago articular [12]</i> | 22 |
| <i>Figura 3. Estructura del cartílago articular [12]</i> | 23 |
| <i>Figura 4. Matriz extracelular [14]</i> | 24 |
| <i>Figura 5. Agregados de proteoglicanos [12]</i> | 25 |
| <i>Figura 6. Fotografía de un cartílago articular de ratón. En A) se muestra un cartílago articular sin daño y en B) se muestra un cartílago con osteoartritis con daño sobre la superficie articular.</i> | 27 |
| <i>Figura 7. La fotografía ilustra la rueda de ejercicio con un ratón en su interior ejercitándose</i> | 35 |
| <i>Figura 8. Muestra la gráfica del peso promedio de los ratones</i> | 41 |
| <i>Figura 9. Muestra la gráfica del consumo de alimento diario.</i> | 41 |
| <i>Figura 10. Los animales ejercitados tendieron a consumir más alimento, mantuvieron su peso y mostraron mejor grasa inter-visceral. A. Gráfica que muestra el consumo semanal de alimento de ratones controles y ejercitados en un periodo de 9 semanas (ANOVA: F y p; Tukey: p). B. gráfica que muestra el peso corporal de ratones control y ejercitados en un periodo de 9 semanas (ANOVA: F y p; Tukey: p). C y D. fotografías que ilustran la grasa inter-visceral (flechas) observada en ratones control y ejercitados, respectivamente.</i> | 42 |
| <i>Figura 11. La densidad de células condrales en el cartílago articular femoro-tibial incrementa en respuesta al ejercicio. A. Cortes histológicos coronales del cartílago articular femoro-tibial que documentan el incremento de la cantidad de condroblastos y condrocitos en los ratones ejercitados. B. Gráficas que muestran la densidad de células condrales (t de Student: $t=3.863$; $***p<0.0001$) o de nidos condrocíticos (t de Student: $t = 2.615$; $**p<0.005$), respectivamente, en cartílagos articulares femoro-tibiales obtenidos de ratones control y ejercitados. C. El área total analizada para cada grupo de ratones fue esencialmente la misma.</i> | 43 |
| <i>Figura 12. Se ilustra la morfología del cartílago articular de un tinción con Hematoxilina Eosina en donde la figura A es del grupo control y la figura B es del grupo ejercitado.</i> | 44 |
| <i>Figura 13. La síntesis y deposición de proteoglicanos, glicoproteínas y colágeno en la matriz del cartílago articular femoro-tibial parece incrementarse en respuesta al ejercicio. A y B. La imagen muestran cortes coronales del cartílago articular teñidos con Azul de Toluidina (A y B), PAS (C y D), Tricrómico de Masson (E y F) y Oro Coloidal (G y H) en ratones control (A, C, E, y G) y ejercitados (B, D, F, y H). El inserto en F ilustra la deposición de matriz ósea (teñida de rojo) en los extremos del cartílago articular sujeto a estrés mecánico relacionado con el ejercicio.</i> | 46 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| <i>Tabla 1. Tinciones histoquímicas utilizadas para el estudio cualitativo de los componentes del cartílago en ratones control y en aquellos expuestos a ejercitación.</i> | 37 |
| <i>Tabla 2. Datos del consumo de alimento diario por ratón en cada uno de los grupos de estudio.</i> | 38 |
| <i>Tabla 3. Datos de las medias que se obtuvieron semanalmente en el consumo de alimento diario de cada ratón.</i> | 40 |
| <i>Tabla 4. Datos de los pesos corporales de cada ratón registrados semanalmente.</i> | 41 |
| <i>Tabla 5. Tabla de ANOVA para un solo factor</i> | 52 |
| <i>Tabla 6. Consumo de alimento diario (gramos)</i> | 53 |
| <i>Tabla 7. tabla de peso promedio por ratón (gramos)</i> | 54 |

GLOSARIO

| | |
|-------------------|--|
| Ácido hialurónico | Polímero compuesto por unidades diméricas repetidas de ácido glucurónico y N-acetil-glucosamina. Suele tener un peso molecular extremadamente grande (hasta dos millones de daltones) y forma un centro de los agregados de proteoglicanos presentes en la matriz extracelular. |
| Aminoácidos | Es una molécula orgánica con un grupo amino (-NH ₂) y un grupo carboxílico (-COOH; ácido). Los aminoácidos más frecuentes y de mayor interés son aquellos que forman parte de las proteínas. |
| Aneural | Un tejido que es aneural es un tejido no suministrado por los nervios. Sin una inervación. |
| Artrosis | Enfermedad de las articulaciones articulares debido a un desequilibrio en la homeostasis de la matriz extracelular. Que implica la degradación del cartílago y la pérdida de la función articular normal. |
| Avascular | No existe suministro de sangre por los vasos sanguíneos. |
| Cartílago | Tejido conectivo con una matriz extracelular rica en colágeno tipo II y proteoglicanos, especialmente condroitin sulfato. El cartílago es más flexible y comprensible que el hueso y a menudo sirve como un esqueleto en etapas tempranas del desarrollo, siendo mineralizado a medida que el vertebrado crece. El cartílago es producido por los condrocitos que quedan rodeados por la matriz que ellos mismos secretan. |
| Células troncales | También conocidas como células madre, es un tipo especial de células indiferenciadas que tienen la capacidad de dividirse indefinidamente sin perder sus propiedades y llegar a producir células especializadas. |
| Condrocitos | (Del griego chondros que significa cartílago y kytos significa célula), son células que se forman a partir de condroblasto y forman parte del tejido cartilaginoso. Específicamente es un |

condroblasto inmerso en su laguna de Matriz Extracelular. Se encuentran en el cartílago, producen y mantienen la matriz cartilaginosa, la cual consiste principalmente de colágeno, proteoglicanos y glucoproteínas.

| | |
|---------------------|---|
| Colágeno | Principal elemento de la estructura de la matriz extracelular. Posee una composición en aminoácidos: muy rica en glicina, prolina, hidroxiprolina, lisina e hidroxilisina. Su estructura es inusual: una triple hélice de polipéptidos. |
| Fagocitosis | Proceso mediante el cual ciertos tipos de células destruyen los microorganismos. |
| Fibrinógeno | Factores de la coagulación que se consumen durante la formación de la fibrina y, por tanto, están ausentes del suero. |
| Glucosaminoglicanos | Polisacárido formado por unidades repetidas de disacáridos en los que un azúcar es la N-acetilgalactosamina o la N-acetilglucosamina. Habitualmente la unidad de disacárido contiene un grupo de carboxilo, y a menudo uno o varios sulfatos, por lo que la mayor parte de los glucosaminoglicanos tiene una densidad elevada de cargas negativas. Los glucosaminoglicanos frecuentemente se combinan con una proteína para formar proteoglicanos y son un componente importante de la matriz extracelular de vertebrados. |
| Histología | (Del griego histós que significa "tejido" y -logía significa tratado, estudio, ciencia) es la ciencia que estudia todo lo referente a los tejidos orgánicos: su estructura microscópica, su desarrollo y sus funciones. |
| Matriz extracelular | Cualquier material producido por las células y secretado al material circundante, pero normalmente se aplica este término a la porción no celular de los tejidos animales. La matriz extracelular del tejido conectivo es particularmente importante y las propiedades de esta matriz determina las propiedades del tejido. En términos generales existen tres componentes principales: elementos fibrosos (particularmente colágeno, elastina o reticulina), proteínas de unión (como fibronectina, laminina), y moléculas de relleno (generalmente glucosaminoglicanos). La matriz puede ser mineralizada para resistir la compresión (como en el hueso) o rica en fibras resistentes a la tensión. |
| Osteoartritis | La osteoartritis es una enfermedad de las articulaciones o coyunturas que afecta principalmente al cartílago. |
| Proteoglicanos | Molécula grande que contiene un gran número de |

glicosaminoglicanos a una molécula proteica central.

Capítulo 1 INTRODUCCIÓN

El cartílago articular es repetidamente sometido a impacto de alta fuerza durante el día, en particular la superficie del cartílago articular de rodilla puede ser afectada por diferentes motivos de desgaste, y esto puede dar lugar principalmente a la aparición de osteoartritis.

En la literatura se pueden encontrar algunos estudios relativos a la osteoartritis, en los cuales se realizan estudios *in vivo* usando un modelo animal que les permite saber más sobre este padecimiento [1, 2, 3 y 4]. El método más usado en dichos estudios es induciendo lesiones quirúrgicas, por razones obvias el daño en la articulación no se lleva a cabo por este método quirúrgico. Sin embargo, el estrés mecánico como es el caso del ejercicio intenso puede causar un daño en la articulación. En nuestro caso, se decidió usar animales roedores para ocasionar daños en las articulaciones con un menor tiempo y costo en comparación con animales de dimensiones mayores.

A pesar de la importancia que tiene la actividad física para el mantenimiento del cartílago articular, algunos tipos de movimiento repetitivos pueden acelerar la degeneración de la articulación [5].

En este trabajo se evalúa el impacto del ejercicio en el desarrollo de la osteoartritis en el cartílago articular de la rodilla en ratones CD1. Dichos animales fueron agrupados en dos condiciones, un grupo control y un grupo experimental, este último tuvo acceso voluntario a una rueda de ejercicio.

Se cuantificaron los condrocitos por métodos histológicos, los cuales muestran mayor proliferación en el grupo de los ejercitados, así como aumento en la síntesis de proteoglicanos, colágeno y proteínas.

Se sabe que el cartílago articular tiene la capacidad de regenerarse y conservar la función mecánica, la cual determina la organización y la distribución de las fibras de colágeno, proteoglicanos y mantiene el agua intersticial, en condiciones de ejercicio.

1.1. Planteamiento del problema

La Osteoartritis Articular (OA) es un problema de salud frecuente. Los factores de riesgo de la misma se desconocen con certeza. Una de sus causas puede ser el resultado de un daño traumático asociado al sobre uso de las articulaciones. Por ello, en este trabajo, evaluamos el impacto del ejercicio sobre el cartílago articular de rodilla en ratones.

1.2. Justificación

La osteoartritis es la enfermedad reumática más frecuente a nivel mundial y una de las principales causas de dolor articular y discapacidad de la población adulta. Aunque es difícil determinar su incidencia y prevalencia, se estima que más del 80% de los pacientes mayores de 60 años presentan alteraciones radiológicas compatibles con OA en al menos una articulación. En México se ha encontrado que la prevalencia de artrosis es de 2.3% en población adulta. De hecho, el Instituto Mexicano de Seguro Social (IMSS), considera a la OA como uno de los diez principales motivos de consulta al Médico Familiar [6]. Es por ello que el estudio de las causas y mecanismos de la OA tiene gran significado no sólo en el contexto de su etiología, sino para el desarrollo de estrategias de prevención y rehabilitación.

1.3. Objetivos y aportaciones esperadas

1.3.1. Objetivo general

Evaluar los efectos del ejercicio frecuente sobre la citoarquitectura del cartílago articular en la rodilla de ratón.

1.3.2. Objetivos específicos

- Evaluar los efectos sobre el peso y consumo de alimento de un régimen de ejercicio de libre acceso en ratones.
- Evaluar los posibles cambios en el número de células del cartílago articular femoro-tibial en ratones sujetos a un régimen de ejercicio de libre acceso.
- Evaluar cualitativamente los posibles cambios en la composición de la matriz del cartílago articular femoro-tibial en ratones sujetos a un régimen de ejercicio de libre acceso.

1.4. Hipótesis

El ejercicio frecuente conducirá a cambios en la estructura interna del cartílago articular femoro-tibial del ratón.

1.5. Antecedentes

Si bien la causa de la osteoartritis (OA) se desconoce con certeza, en la actualidad se considera que la misma tiene un origen multifactorial en el que se involucran múltiples factores y mecanismos etiopatogénicos (ver Figura 1). Así, estudios recientes han documentado que deficiencias y/o desequilibrios nutricionales conducen a trastornos metabólicos que promueven el desarrollo de OA, debido a sus efectos nocivos sobre el propio cartílago articular, la dieta de carbohidratos y la deficiencia de vitamina causa daño metabólico de cartílago como son las vitaminas E, B2, y C, demostrando un efecto inhibitorio sobre la OA. Por lo tanto, parece razonable sugerir una dieta bien equilibrada, baja en carbohidratos y grasas junto con suplementos nutricionales, vitaminas y minerales esenciales, lo cual beneficiará a los individuos susceptibles a enfermedades degenerativas articulares [7]. La obesidad se reconoce como un importante factor de riesgo para la OA de caderas y rodillas, ya que el exceso de peso puede conducir a la sobrecarga y degradación del cartílago articular [8]. Se ha comprobado que en personas obesas, la pérdida de peso puede reducir notablemente el riesgo de padecerla. Otro factor de riesgo es el desequilibrio hormonal, la reducción de las concentraciones séricas de estrógenos incrementa la frecuencia de la OA en mujeres después de los 50 años de edad. Aunque el mecanismo que subyace a este fenómeno es poco claro, la osteoporosis asociada a la caída de los niveles séricos de estrógenos en mujeres menopáusicas o post-menopáusicas se asume predispone el desarrollo de la misma [9].

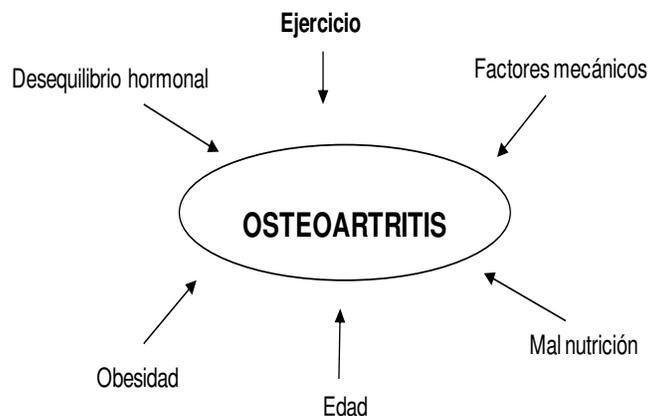


Figura 1. Factores de riesgo para el desarrollo de osteoartritis

La edad, también es un factor de riesgo para el desarrollo de OA. Se ha mostrado que después de los 30 años de edad se deteriora la capacidad del cartílago para sintetizar las macromoléculas que constituyen a su matriz, así como los factores de crecimiento que mantienen a sus poblaciones celulares saludables [10].

Estudios experimentales previos han mostrado que el exceso del uso de una articulación puede provocar también el desarrollo de osteoartritis. Jong et al. en 2011 [5] trabajaron con ratas Wistar para observar el efecto del ejercicio en las articulaciones de la rodilla. Durante los experimentos contaron con dos grupos: un grupo control el cual no se ejercitó y el grupo ejercitado. Estos animales se sometieron a la siguiente condición: se diseñó una rueda de ejercitación con motor y se ejercitaron con una frecuencia de 5 días a la semana, con una velocidad de 1.5 km/hr. El análisis que usaron fue histología e histoquímica donde después de 10 semanas, reveló que la ejercitación acelera el desarrollo de la osteoartritis.

Así mismo, un estudio realizado por Julkunen et al. en 2010 [11] fue llevado a cabo con hámsteres y se agruparon en un grupo control, el cual llevó una vida sedentaria, y un grupo de ejercitación, el cual se ejercitó por medio de una rueda de ejercicio. Se consideró la edad y el tiempo de ejercitación (hámsteres de 3, 12 y 15 meses de edad se ejercitaron durante 1 a 3 meses; hámsteres de 6 meses de edad se ejercitaron durante 6 meses). Se realizaron pruebas de histología donde los resultados revelaron que a los 15 meses de edad los daños que se ocasionaron por el ejercicio fueron irreversibles, concluyendo que a una edad avanzada las propiedades del cartílago articular ya no son las mismas y puede llegar a ocasionar daños en el cartílago articular.

Finalmente, el estrés mecánico articular, también ha sido señalado como un factor de riesgo determinante en el desarrollo de la OA [5, 11]. Este factor, sin embargo, estimula la producción de matriz extracelular y el recambio de las poblaciones celulares cartilaginosas en diversos modelos animales. Dada esta discrepancia, se hace necesario el evaluar el papel del estrés mecánico, especialmente de aquel asociado con regímenes de ejercicio, sobre el desarrollo de patologías osteoarticulares con la finalidad de conocer su verdadero impacto y generar recomendaciones médicas en función del biotipo de los individuos. En nuestros tiempos es común que se recomiende a personas de distintos biotipos realizar ejercicios sin

considerar el daño que esto podría causar, bajo la premisa de que el ejercicio ayudará a mejorar el bienestar del individuo. Por esta razón, en este trabajo evaluamos los efectos de la ejercitación de “alto impacto” sobre la histología del cartílago femoral de la articulación tibio-femoral en ratones CD1, a través de cuantificar el número de células del linaje cartilaginoso y evaluar cualitativamente la distribución de las macromoléculas de la matriz extracelular.

Capítulo 2 MARCO TEÓRICO

2.1. Estructura general del cartílago hialino articular

El tejido cartilaginoso constituye, en su conjunto, una clase de tejido conjuntivo especializado. Aunque existen tres subtipos denominados fibroso, elástico y hialino, es este último del cual está constituido el cartílago articular. En términos generales, el cartílago hialino articular se conforma por cuatro zonas superpuestas referidas como superficial, de transición, radial y osteo-condral (Figura 2). La composición citológica de la matriz extracelular difiere entre las zonas [12]. De esta forma, la zona superficial presenta una membrana fibrosa conocida como pericondrio. Por debajo de ésta se encuentran las células troncales que restituyen las poblaciones celulares condrocíticas; es por ello que la lámina superficial muestra una escasa actividad metabólica celular. La matriz extracelular tiene pocos proteoglicanos y una elevada concentración de fibras de colágeno organizadas en haces que corren paralelos a la superficie. Esta zona soporta las fuerzas de cizallamiento asociados al movimiento articular.

La lámina intermedia o de transición muestra una elevada actividad metabólica relacionada tanto con la multiplicación de numerosos condroblastos, como con la abundante producción de los componentes fibrosos (colágena) y amorfo (proteoglicanos) de la matriz extracelular por parte de estas células. En la matriz extracelular, el colágeno se dispone de forma oblicua a la superficie. La zona intermedia soporta y amortigua la fuerza de compresión.

La zona radial posee una población de condrocitos hipertróficos organizadas en columnas. Aunque la actividad celular metabólica general y sintética en particular disminuye significativamente, la matriz extracelular es rica en proteoglicanos y fibras de colágeno depositadas también radialmente. Como en el caso de la zona intermedia, la zona radial también soporta fuerzas de compresión.

Finalmente, el componente celular de la zona osteo-condral es escaso. La matriz cartilaginosa es substituida por una ósea, rica en hidroxapatita, en la que las fibras de colágeno superan al componente amorfo. La zona osteo-condral es la capa de anclaje del cartílago al hueso que permite soportar fuerzas de cizallamiento.

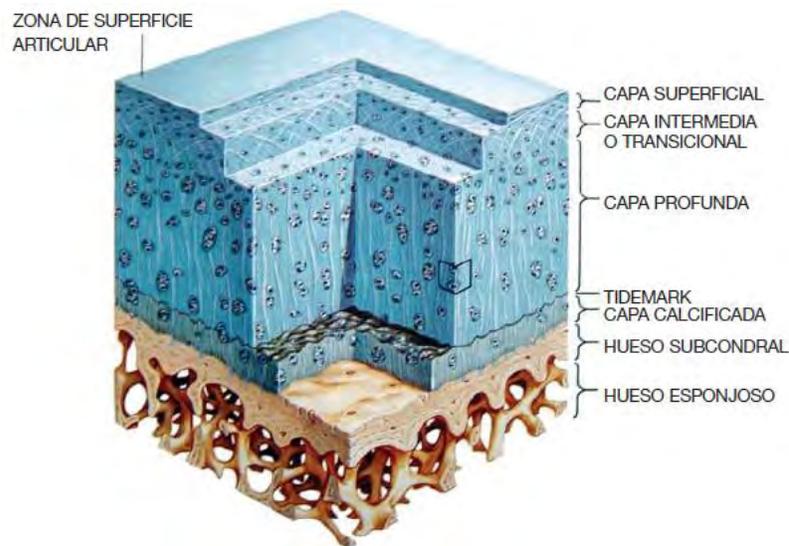


Figura 2. Representación esquemática de las zonas del cartílago articular [12]

El tejido articular está compuesto principalmente por los siguientes elementos que se describen a continuación:

- Cartílago
- Líquido sinovial
- Membrana sinovial

A continuación se describen cada uno de estos elementos del tejido articular.

2.2. Cartílago articular

El cartílago es un componente muy especial de nuestro organismo, con características únicas que le permiten cumplir una variedad de funciones. Existen distintos tipos de cartílagos, el que la mayoría tenemos más presente es el que se encuentra en los extremos de los huesos, donde

estos se articulan, por ello este cartílago es llamado cartílago articular. El cartílago articular sano permite la movilidad fluida de nuestras articulaciones sin dolor y con una fricción mínima entre los huesos. El cartílago articular está formado por los siguientes componentes (figura 3):

- a) Condrocitos
- b) Matriz extracelular.

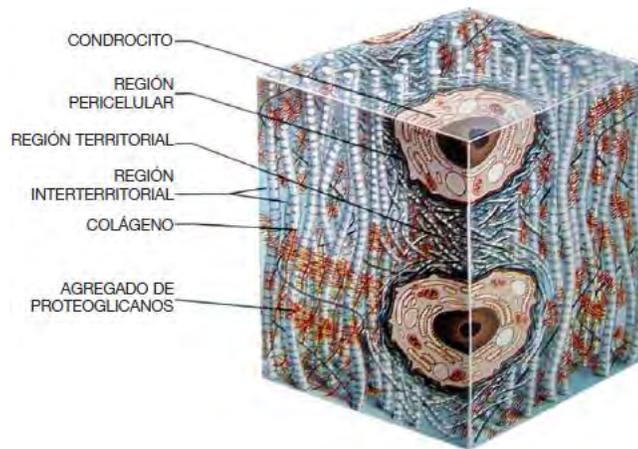


Figura 3. Estructura del cartílago articular [12]

2.2.1. Condrocitos

Los Condrocitos son las células del cartílago y se encuentran en una proporción del 5 - 10%. Los condrocitos reciben sus nutrientes y oxígeno del líquido sinovial mediante difusión a través de la membrana del cartílago [13]. Los condrocitos producen colágeno, proteoglicanos y algunas enzimas para el metabolismo del cartílago. Se sitúan en unas lagunas dentro de la matriz extracelular, a las que se adaptan. Producen la matriz extracelular adyacente, pero también son capaces de despolimerizarla y eliminarla para ensanchar sus lagunas. La función celular viene determinada por cambios sufridos en la propia matriz extracelular, variaciones de la presión en la membrana celular, la edad y determinados factores de crecimiento [12, 14].

2.2.2. Matriz extracelular

Es una red de fibrillas fuertes de colágeno que le dan estructura al cartílago, en donde están inmersas las moléculas de proteoglicanos. La matriz extracelular le confiere sus propiedades mecánicas únicas al cartílago, siendo la más destacada su capacidad de absorción y distribución de las cargas a las que es sometido durante nuestras actividades diarias (figura 4). La alteración en esta matriz es el inicio de muchas de las **lesiones del cartílago articular**.

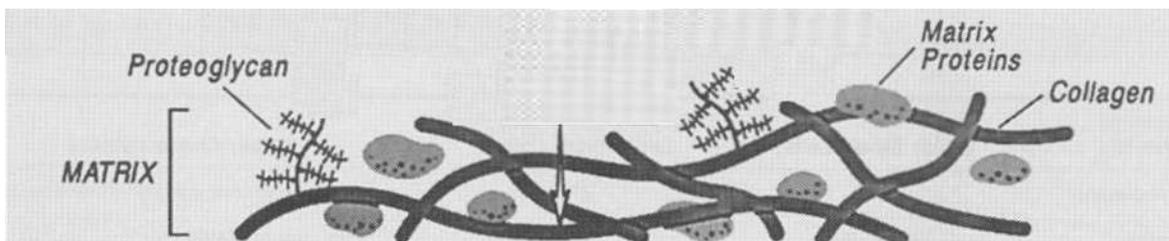


Figura 4. Matriz extracelular [14]

Composición de la matriz extracelular [12, 14]:

a) Agua (65-80%). Permite la deformación del cartílago en respuesta al estrés, fluyendo hacia dentro y fuera del mismo. El agua no está distribuida homogéneamente a lo largo de todo el cartílago (65% está en la zona profunda y el 80% se encuentra en la superficie). El agua es muy importante para la nutrición del cartílago y para la lubricación articular.

b) Colágeno (10-20%). Existen varios tipos de colágeno, principalmente se puede mencionar los siguientes:

Tipo I: su localización es en hueso, piel, tendones, etc.

Tipo II: su localización es en cartílago articular, en núcleos pulposos del disco intervertebral.

En el cartílago articular se tiene mayoritariamente del tipo II (90-95%), lo que le confiere al cartílago una gran resistencia a la tensión. Está formado principalmente por los aminoácidos

glicina, hidroxiprolina y prolina. En el cartílago encontramos en menor proporción colágeno del tipo V, VI, IX, X, y XI.

c) Proteoglicanos (10-15%). Son macromoléculas complejas (proteínas polisacáridas) responsables de la resistencia a la compresión del cartílago. Los proteoglicanos son producidos por los condrocitos y son secretados dentro de la matriz extracelular. Los proteoglicanos se unen al ácido hialurónico formando agregados de proteoglicanos (ver figura 5). Tienen una vida media de 3 meses, presentan una gran capacidad para retener agua (regula la hidratación de la matriz) y son los responsables de la estructura porosa del cartílago.

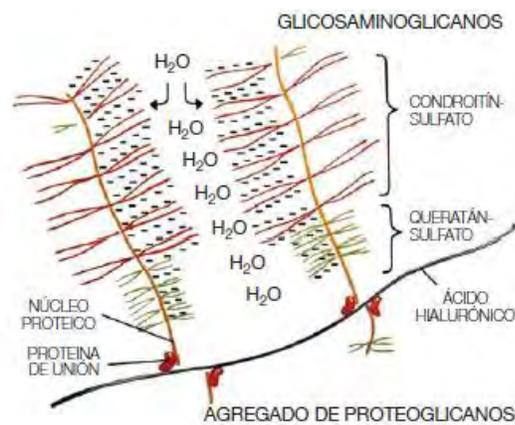


Figura 5. Agregados de proteoglicanos [12]

2.2.3. Mecanismo de acción del ácido hialurónico

El ácido hialurónico presenta las siguientes acciones sobre la mecánica articular [15]:

- Regulación del contenido de agua.
- Estimulación de la agregación de proteoglicanos.
- Aumento de la resistencia a la fricción.
- Recuperación de las propiedades de visco-elasticidad del líquido sinovial.

2.3. Líquido sinovial

El líquido sinovial deriva del griego syn (con) y del latín ovum (huevo), sugiriendo que el líquido sinovial se asemeja a la clara de huevo, con frecuencia es llamado “líquido articular”. El líquido sinovial es un líquido viscoso presente en los espacios articulares. El líquido sinovial es un ultrafiltrado (dializado) del plasma de la sangre que se adiciona al fluido producido por la membrana sinovial. Llena la cavidad articular y actúa como lubricante, manteniendo al mínimo la fricción entre los huesos durante el movimiento o mientras se soportan pesos. El líquido sinovial provee de nutrientes al cartílago mediante difusión.

El líquido sinovial está compuesto por el ácido hialurónico, lubricina (una glicoproteína lubricante), proteinasa, colagenasa y prostaglandinas. Su composición electrolítica es la que corresponde a un trasudado del plasma sanguíneo. Contiene proteoglicanos elaborados por las células de la membrana sinovial. Su concentración proteínica alcanza aproximadamente el 1%, con un índice de albumina de 4 y no contiene fibrinógeno [16].

2.4. Membrana sinovial

La membrana sinovial permite el intercambio de nutrientes entre la sangre y el líquido sinovial. La membrana sinovial está compuesta por un tejido conectivo vascularizado. En la membrana sinovial existen principalmente dos tipos de células: Células de tipo A que se encargan de la fagocitosis y las células de tipo B (células tipo fibroblastos) las cuales producen el líquido sinovial [12]. La membrana sinovial cubre el interior de la cápsula articular, no cubre al cartílago. Su función es producir líquido sinovial y la secreción de ácido hialurónico para evitar la erosión y el desgaste del cartílago [17].

2.5. Osteoartritis

La osteoartritis (OA) es una enfermedad que afecta a las articulaciones sinoviales de amplio movimiento y que se caracteriza por la degeneración progresiva de los componentes de las

mismas incluyendo a los huesos, meniscos, membrana sinovial, ligamentos, cápsula sinovial y los músculos correspondientes [18]. Esta enfermedad es la más común de las artropatías siendo su signo más temprano la condritis inflamatoria [19]. Si bien el componente inflamatorio es esencial para la progresión del padecimiento, se considera que el establecimiento de la enfermedad refleja un proceso de degeneración intrínseco del cartílago articular adquirido de manera secundaria a alteraciones bioquímicas y metabólicas previas. En la figura 6 se muestra la cabeza del fémur de un ratón exponiendo la cubierta del cartílago articular. En la figura 6A se muestra un cartílago articular sano y en la figura 6B se muestra un cartílago articular con daño sobre la superficie relacionado con la osteoartritis.

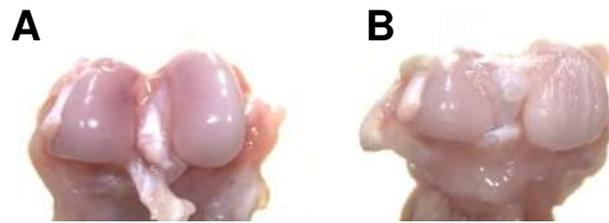


Figura 6. Fotografía de un cartílago articular de ratón. En A) se muestra un cartílago articular sin daño y en B) se muestra un cartílago con osteoartritis con daño sobre la superficie articular.

Capítulo 3 ASPECTOS BIOÉTICOS

3.1. Introducción

Principios de bioética empleados en el presente trabajo: *NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999, ESPECIFICACIONES TÉCNICAS PARA LA PRODUCCIÓN, CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO* [20].

Es función de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, fomentar la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio mediante la aplicación de técnicas tendientes a garantizar la producción, proteger la salud y favorecer el buen uso de los animales de laboratorio.

En la actualidad, la falta de planeación en la producción de animales de laboratorio, la carencia de criterios uniformes relacionados con las actividades encaminadas al cuidado, manejo y utilización de animales con fines de investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y enseñanza, han provocado que el cuidado, el trato y la aplicación de técnicas experimentales practicadas en estos animales, sea ejercida en forma inadecuada, representando graves daños en el bienestar de los mismos.

Para lograr resultados confiables en la investigación científica, la docencia biomédica y el control de calidad, así como utilizar el menor número de animales posible, es necesario contar con animales de laboratorio en condiciones óptimas.

Cuando se utilizan para fines experimentales procedimientos cuestionables, inaceptables o contrarios a los principios de ética, éstos pueden causar graves daños en el bienestar de los animales.

En virtud de lo anterior y como consecuencia del proceso de globalización en el que México se encuentra inmerso, es necesario establecer criterios uniformes que permitan regular

eficientemente la operación de las actividades relacionadas con la producción, cuidado, manejo y uso de los animales de laboratorio, a fin de favorecer el bienestar de éstos, protegiendo al mismo tiempo su salud.

En diciembre de 1999, se publicó en el *Diario Oficial de la Federación* el Proyecto de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, titulado “Técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”, iniciando con ello el trámite a que se refiere la Ley Federal sobre Metrología y Normalización. En junio de 2001, se publicaron las respuestas a los comentarios recibidos con relación a dicho proyecto.

Para la correcta aplicación de esta Norma se deben consultar las siguientes normas oficiales mexicanas:

NOM-033-ZOO-1995, “Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres”.

NOM-046-ZOO-1995, “Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica”.

NOM-051-ZOO-1995, “Trato humanitario en la movilización de animales”.

NOM-087-ECOL-1995, “Requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos que se generan en establecimientos que presten atención médica”.

3.2. Disposiciones generales

Todo bioterio independientemente de su tipo, tienen que designar como personas encargadas del cumplimiento de las normas a:

- a) Un Médico Veterinario responsable que estará adscrito de tiempo completo o tiempo parcial dependiendo del tamaño y las necesidades del bioterio.

- b) Un responsable administrativo que será el director o la persona que éste designe para estos fines.

La institución debe asegurar los servicios médicos veterinarios a cualquier hora del día y de la semana para garantizar la salud y bienestar de los animales.

Se debe contar además con un Comité Interno para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. Cuando una institución se encuentre en la categoría B (uso en investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y enseñanza) o bien en la clasificación C (mixtos), debe conformar un Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de carácter institucional.

La función del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio es la de asegurar la existencia de un mecanismo institucional encargado de revisar que el cuidado y uso de los animales de laboratorio con propósitos de investigación, pruebas y/o enseñanza, sea de manera apropiada y humanitaria.

Es una obligación de la institución donde se realiza investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y enseñanza, con animales de laboratorio, asegurar que el personal profesional, técnico y estudiantil, esté capacitado para realizar los procedimientos con animales de laboratorio.

3.3. Cuidado y uso de animales de laboratorio

Entre los animales que comprende la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, se encuentran roedores como: rata, ratón, cobayo, hámster y jerbo.

A continuación se mencionan las condiciones que deben cumplirse para el cuidado de los roedores para su uso en laboratorio:

I. Confinamiento o encierro primario.

El equipo para alojar a los animales debe estar diseñado para facilitar el bienestar del animal, satisfacer las necesidades de la investigación y reducir o eliminar las variables experimentales. Por lo anterior, el equipo para confinar al animal o encierro primario debe:

- a) Proporcionar el espacio adecuado que permita movimientos y adopciones de las posturas normales de la especie.
- b) Ser adecuado en ventilación y conforme a las necesidades biológicas de la especie.
- c) Resistente al lavado y desinfección frecuente.

En el caso particular de los roedores, éstos deben mantenerse en algún tipo de jaulas o cajas que posean pisos y paredes continuas sólidas y con tapa removible de reja o perforadas.

El diseño del confinamiento debe facilitar la limpieza y saneamiento rutinario y también las faenas de cambio, llenado y suministro de agua y alimento, así como permitir la observación de los animales.

II. Salud animal.

Los roedores deben estar libres de enfermedades zoonóticas y parásitos externos, a menos que el procedimiento experimental aprobado por el Comité indique lo contrario.

III. Alimentación y provisión de agua.

El alimento debe proporcionarse a libre acceso o en forma restringida dependiendo de las necesidades de la cepa y de los procedimientos experimentales. El alimento debe ser palatable, de una fórmula nutricional constante y certificado en cuanto a su composición. El agua debe ser potable y suministrarse a libre acceso durante toda la vida del animal.

IV. Cama.

Los roedores alojados en cajas con piso sólido deben tener el material de cama suficiente que garantice la absorción de su orina, excremento y desperdicio de agua, favorecer su aislamiento térmico y construcción de nido.

V. Eutanasia

Se deben describir los procedimientos empleados para inducir de manera humanitaria la muerte de los animales (eutanasia) empleados en la investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y enseñanza, con el propósito de eliminar o disminuir al mínimo el dolor y el estrés previo y durante el procedimiento.

Se puede suministrar diferentes tipos de anestésicos durante el procedimiento de la eutanasia en los animales de laboratorio, los más utilizados son del tipo:

a) Fármacos no inhalables.

La administración intravenosa de fármacos que causan la muerte es el método más rápido y confiable de llevar a cabo la eutanasia. El personal debe poseer la habilidad para realizarlo y el animal debe estar inmovilizado. Es el método más recomendable siempre y cuando no cause miedo o estrés al animal. Sólo se permite la inyección intracardiaca en animales bajo sedación profunda, anestesiados, o comatosos. No se permite la administración intramuscular, subcutánea, intratorácica, intrapulmonar, intrarenal, intraesplénica, intratecal o cualquier otra inyección no intravascular de los agentes eutanásicos.

b) Derivados del ácido barbitúrico.

Todos los barbitúricos son recomendados para la eutanasia, ya que inducen inconsciencia con sólo el dolor mínimo o transitorio de la venipuntura. Los más deseables son los más potentes, de más larga acción, estables en solución y baratos, tales como el pentobarbital sódico y el secobarbital. La velocidad de acción de los barbitúricos depende de la dosis, la concentración, velocidad y vía de administración, las cuales deben combinarse para inducir la eutanasia suavemente y con mínima incomodidad para el animal. La dosis de pentobarbital sódico administrado por vía intravenosa es de 90 a 210 mg/kg, para la mayoría de las especies; ratas y ratones requieren una dosis mayor (120 a 210 mg/kg). La dosis de secobarbital sódico es de 88 mg/kg.

3.4. Criterios cumplidos en el presente trabajo

Los experimentos con animales en el presente trabajo fueron desarrolladas siguiendo las normas oficiales, pudiéndose señalar los siguientes criterios considerandos:

- El animal que se eligió es el adecuado para los experimentos que se llevaron a cabo, debido que la vida media del roedor (en este caso ratón) es mucho más corta y el costo en relación a su alimentación es económica.
- El espacio en donde estuvieron viviendo fue en jaulas de policarbonato con dimensiones de 26 x 76 cm. Cada jaula se desinfectaba y se hacía un previo cambio de cama, con la finalidad de que cada ratón se mantuviera en condiciones óptimas para su estudio de investigación.
- El alimento fue libre de aditivos, drogas, hormonas, antibióticos, pesticidas y contaminantes. El alimento estaba en buenas condiciones y fuera de caducidad. La cantidad de alimento consumido fue una variable de control.
- El agua fue siempre *ab libitum*, se utilizaron bebederos con agua purificada para evitar la adquisición de parasitosis.
- Los animales se observaron día con día para descartar que no se encontraran enfermos y observar su actividad diaria.
- Los animales no fueron sometidos a algún tipo de estrés.
- Los animales con los que se trabajó estuvieron en buenas condiciones de salud.
- Contaron con un especialista veterinario para resolver todo tipo de duda.
- Para la eutanasia se utilizaron barbitúricos.
- Los procedimientos a los que los ratones fueron sometidos se aprobaron por el Comité de Ética para el Manejo de Animales del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (numero de folio de proyecto 080).

Capítulo 4 MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente capítulo se presenta el modelo animal utilizado para los estudios sobre el efecto del ejercicio. También se presenta la metodología seguida en donde se describe las diferentes técnicas de tinción histológica que se usaron para identificar las diversas macromoléculas presentes en el cartílago articular de cada muestra obtenida.

4.1. Modelo animal

El modelo animal utilizado en la investigación fue ratón macho adulto de la cepa CD1 adquiridos del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, y fueron trasladados al Bioterio del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH.

4.2. Metodología

Los animales fueron colocados en cajas individuales con agua *ad libitum*, sin embargo el alimento se restringió en periodos de 12 horas al día, con ciclo naturales de luz-obscuridad. Los ratones se agruparon bajo dos condiciones: el primero fue un grupo control de tamaño de muestra (con una $n=3$) mantenido en condiciones normales de bioterio; el segundo grupo de ratones denominados intensivo (con una $n=6$) tuvo acceso libre a una rueda de ejercitación (ver figura 7) por 65 días. la observación de la actividad de los ratones se realizo veces al día a lo largo del periodo de estudio. Durante este periodo se registró el consumo de alimento y el peso corporal del ratón. Se pesaba diariamente el alimento al momento de colocar y al retirarlo, la diferencia obtenida del peso del alimento fue registrada como el consumo diario de por ratón. El peso corporal del ratón se registraba 1 vez a la semana.



Figura 7. La fotografía ilustra la rueda de ejercicio con un ratón en su interior ejercitándose

Inicialmente se contaba con 20 ratones, los cuales se hospedaron en el bioterio de la UMSNH y se habían agrupado en 3 grupos: a) un grupo control, en donde el ratón llevaba una vida sedentaria, b) un grupo de ejercicio moderado, en dicho grupo se habían agrupado en par de ratones en una sola jaula compartiendo una rueda de ejercitación, c) un grupo de ejercicio intensivo, en dicho grupo se contaba con un ratón por caja y una sola rueda de ejercitación para su uso voluntario. A medida que el experimento se fue desarrollando, se tuvo que descartar el segundo grupo de los que realizaban ejercicio moderado ya que entre los ratones que compartían la misma jaula se disputaban el uso de la rueda de ejercicio, llegando incluso a morir alguno de ellos durante la pelea. Por lo anterior, los resultados que se presentan en esta tesis se redujeron a sólo dos grupos de experimentación.

4.2.1. Tinciones histoquímicas

Con el objetivo de evaluar cualitativamente posible cambios en la estructura interna del cartílago articular en los ratones que tuvieron acceso a la rueda de ejercicio, se tomaron muestras de cartílago tanto a los ratones del grupo control y del grupo ejercitado y se sometieron a los siguientes estudios que se describen a continuación.

Con el objeto de evaluar cualitativamente posibles cambios en la composición de la matriz extracelular asociados con el ejercicio, se realizaron cortes histológicos del cartílago articular y fueron teñidos con técnicas histológicas especiales para destacar diferentes tipos de glicosaminoglicanos y colágeno. La descripción de cada técnica se resumen en la tabla 1 y los protocolos de las tinciones se presentan en la sección de los anexos. Para ello, cumplido el

periodo de entrenamiento, los ratones de ambos grupos fueron sacrificados mediante una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico (45mg/Kg de peso corporal) y rápidamente decapitados. Se realizó una incisión vertical abdominal, se observó la cantidad relativa de grasa intervisceral. Posteriormente, se extrajeron los cartílagos articulares femoro-tibiales, uno de los cuales se colocó en una solución amortiguada de paraformaldehído (4%) y el otro fue congelado en hielo seco. Las muestras fijadas en paraformaldehído fueron incluidas en parafina, cortadas coronalmente (5 μ m de grosor) y teñidas con diversas tinciones histoquímicas. Las preparaciones fueron observadas bajo un microscopio de campo claro (Leica), el cual está equipado con un sistema fotográfico digital.

4.2.2. Cuantificación de los condrocitos

Con el objeto de evaluar la actividad proliferativa del cartílago articular femoro-tibial en respuesta o no al ejercicio, se estimó la densidad de condroblastos y condrocitos en los ratones control y en aquellos ejercitados. Para ello, se dibujaron los perfiles de los cartílagos articulares observados (2.5X) en 3 cortes teñidos con Hematoxilina y Eosina por animal, con ayuda de una cámara lúcida. Estos perfiles fueron escaneados, digitalizados y sus áreas medidas con el programa Image (NIH). Posteriormente se contó el número de condroblastos y condrocitos en 15 campos (100X) por corte seleccionados al azar. Finalmente se multiplicó el promedio del área cartilaginosa por el promedio de células por campo estimadas para los dos grupos de animales, obteniéndose así el total de células por unidad de área por grupo. Aunque este método probablemente sobreestima el número de células al asumir una distribución homogénea, el mismo criterio fue utilizado para todas las muestras procurando evaluar la misma área total de cartílago.

Tabla 1. Tinciones histoquímicas utilizadas para el estudio cualitativo de los componentes del cartílago en ratones control y en aquellos expuestos a ejercitación.

| Tinción | Mecanismo de acción | Tinción en el cartílago |
|-------------------------------|---|--|
| Hematoxilina-Eosina (HE). | Hematoxilina-básico colorea estructuras ácidas de color morado. Eosina-ácido colorea estructuras básicas de color rosa. | Ácido: el núcleo de la célula. Básica: el citoplasma de la célula |
| Azul de toluidina. | Se comporta como colorantes ortocromáticos básicos (color azul) o metacromáticos ácidos (color violeta-roja). | Ácido: proteoglicanos sulfatados, condroblastos y matriz inmadura. Básica: cuando hay estructuras ricas de aminoácidos se tornan de un color rojo. |
| Ácido peryódico-Schiff (PAS). | El ácido peryódico (HIO_3) lleva una oxidación hasta formar un aldehído y reacciona con el reactivo de Schiff hasta dar una coloración rojo de magenta característico. | Carbohidratos forman estructuras de glucógeno, glicoproteínas, glucosaminoglicanos, mucopolisacáridos. |
| Tricrómico de Masson. | El ácido fosfomolibdico su tinción es selectiva para colágeno y se unirá a colorantes ácidos. El azul de molibdeno lleva métodos tricrómicos o tinción acido-base. | Básico: Colágeno color azul o verde. Para diferenciar a los condrocitos Citoplasma con color rojo. |
| Oro coloidal. | Colorante para proteínas, a pH 3 las partículas de oro están cargadas negativamente y se unen específicamente a proteínas. | Ácido: Proteínas de color rojo oscuro. |

Capítulo 5 RESULTADOS

A continuación se presentan en las Tablas 5.1 y 5.2, los resultados obtenidos para el consumo de alimento diario a lo largo del estudio realizado, con $N = 65$ días de estudio, un grupo control con $n_1 = 3$ ratones y un grupo Ejercitado con $n_2 = 6$ ratones sometidos a ejercicio.

Tabla 2. Datos del consumo de alimento diario por ratón en cada uno de los grupos de estudio.

| No. día del experimento | GRUPO CONTROL | | | GRUPO EJERCITADO | | | | | |
|-------------------------|---------------|------|------|------------------|-----|------|------|------|-----|
| | C1 | C2 | C3 | I1 | I2 | I3 | I4 | I5 | I6 |
| 1 | 3.7 | 4.95 | 4.95 | 2.9 | 3.7 | 7.7 | 7.6 | 7.6 | 4.9 |
| 2 | 5.3 | 7.85 | 7.85 | 3.8 | 4.2 | 7.6 | 7.2 | 7.2 | 5.5 |
| 3 | 6.1 | 7 | 7 | 3 | 5.6 | 8.5 | 8.3 | 8.3 | 7.2 |
| 4 | 7.6 | 9.3 | 9.3 | 5.7 | 7.2 | 8.4 | 8.8 | 8.8 | 8 |
| 5 | 8.1 | 8.5 | 8.5 | 7.1 | 8.1 | 7.5 | 9.4 | 9.4 | 8.2 |
| 6 | 2.4 | 12 | 12 | 7 | 7.5 | 9.5 | 9.3 | 9.3 | 8.3 |
| 7 | 8.9 | 8.5 | 8.5 | 8.1 | 9.4 | 11.1 | 9.5 | 9.5 | 8.9 |
| 8 | 7.5 | 7.6 | 7.6 | 8.9 | 7.4 | 8.4 | 7.5 | 7.5 | 7 |
| 9 | 7.1 | 6 | 6 | 7.7 | 7.3 | 7.8 | 7 | 7 | 6.7 |
| 10 | 6.8 | 6.4 | 6.4 | 8.2 | 6.2 | 9.3 | 6.8 | 6.8 | 6.7 |
| 11 | 6.2 | 5.4 | 5.4 | 7.2 | 8.5 | 6.6 | 5.9 | 5.9 | 6.7 |
| 12 | 5.8 | 5.65 | 5.65 | 6.6 | 6.7 | 5.6 | 10.2 | 10.2 | 6.5 |
| 13 | 6.1 | 5.75 | 5.75 | 8.2 | 6.6 | 7.6 | 6 | 6 | 6.5 |
| 14 | 6.2 | 5.9 | 5.9 | 8.8 | 7.9 | 6.6 | 6.4 | 6.4 | 6.6 |
| 15 | 5.7 | 4.75 | 4.75 | 5.9 | 5.7 | 4.8 | 5.5 | 5.5 | 5 |
| 16 | 5.2 | 5.15 | 5.15 | 6 | 7.7 | 4.9 | 6.3 | 6.3 | 4.8 |
| 17 | 6.2 | 5.35 | 5.35 | 7.3 | 7.2 | 5 | 7 | 7 | 5.7 |
| 18 | 4.6 | 4.15 | 4.15 | 5.2 | 6.8 | 5.8 | 6.2 | 6.2 | 4.7 |
| 19 | 5.6 | 5.25 | 5.25 | 4.7 | 6.2 | 4.8 | 5.7 | 5.7 | 5.2 |
| 20 | 5.4 | 4.95 | 4.95 | 6.2 | 6.3 | 5.3 | 6 | 6 | 4.8 |

| | | | | | | | | | |
|----|-----|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|
| 21 | 5.2 | 4.8 | 4.8 | 6.1 | 5.3 | 4.2 | 4.9 | 4.9 | 5.1 |
| 22 | 6 | 5.65 | 5.65 | 6.3 | 7.4 | 5.2 | 5.2 | 5.1 | 5.1 |
| 23 | 7 | 5.7 | 5.7 | 8.5 | 8.4 | 4.7 | 4.4 | 4.6 | 6.6 |
| 24 | 6 | 5.55 | 5.55 | 8.2 | 10.6 | 4.7 | 6.1 | 3.3 | 4 |
| 25 | 6.3 | 5.7 | 5.7 | 7.8 | 7.7 | 5.4 | 4.4 | 5 | 5.5 |
| 26 | 5.6 | 5.35 | 5.35 | 6.5 | 5.2 | 4.5 | 5.2 | 4.6 | 5.1 |
| 27 | 5.8 | 5 | 5 | 4.9 | 5.3 | 3.6 | 4.7 | 4.5 | 6 |
| 28 | 6.1 | 6 | 6 | 6.7 | 6.9 | 6 | 5.2 | 4.4 | 5.2 |
| 29 | 7.2 | 6.15 | 6.15 | 8 | 7.4 | 6.3 | 6.5 | 5.3 | 6 |
| 30 | 6.9 | 6.15 | 6.15 | 7.4 | 7.2 | 5.8 | 7.6 | 6.8 | 6.5 |
| 31 | 5.9 | 4.95 | 4.95 | 7.8 | 7 | 6 | 7.2 | 4.3 | 5.6 |
| 32 | 3.9 | 4.25 | 4.25 | 5.6 | 7 | 5.4 | 4.7 | 4.3 | 4.4 |
| 33 | 6.2 | 5.8 | 5.8 | 8.6 | 6.8 | 6.2 | 7.1 | 5.8 | 5.6 |
| 34 | 4.6 | 5.05 | 5.05 | 6.9 | 6.4 | 5 | 5.5 | 5.1 | 5.5 |
| 35 | 5.9 | 5.85 | 5.85 | 6.7 | 7.3 | 4.7 | 7.4 | 5.5 | 5 |
| 36 | 5.6 | 6.25 | 6.25 | 7 | 6.1 | 5.6 | 4.6 | 4.9 | 5.2 |
| 37 | 5.6 | 6.25 | 6.25 | 7 | 6.1 | 5.6 | 4.6 | 4.9 | 4.9 |
| 38 | 7.1 | 5.3 | 5.3 | 8.6 | 7 | 5.1 | 6.9 | 5 | 4.5 |
| 39 | 5.6 | 4.95 | 4.95 | 8.4 | 6.3 | 5.2 | 6.3 | 5.1 | 5 |
| 40 | 5 | 4.75 | 4.75 | 8.2 | 7.1 | 5.4 | 6.2 | 4.4 | 4.9 |
| 41 | 4.8 | 4.15 | 4.15 | 6 | 5.4 | 4.7 | 4.4 | 4.4 | 5.1 |
| 42 | 5 | 5.25 | 5.25 | 7.4 | 6.6 | 5.4 | 7.2 | 4.2 | 5.1 |
| 43 | 6.3 | 6.15 | 6.15 | 10.4 | 7.5 | 6.2 | 6.8 | 6.5 | 4.7 |
| 44 | 4.9 | 5.4 | 5.4 | 6.6 | 6.5 | 5.8 | 5 | 5.3 | 5.1 |
| 45 | 4.4 | 5.5 | 5.5 | 5.7 | 5.5 | 6.2 | 6.1 | 5.3 | 5.8 |
| 46 | 6.4 | 6.05 | 6.05 | 7.7 | 7.1 | 5.6 | 5.9 | 5.8 | 4.8 |
| 47 | 4.7 | 5.2 | 5.2 | 8.2 | 6.1 | 3.6 | 6.6 | 4 | 5 |
| 48 | 6.1 | 5.5 | 5.5 | 7.5 | 6.8 | 5.5 | 5 | 4.8 | 5.8 |
| 49 | 5.2 | 5.4 | 5.4 | 8.8 | 7.7 | 5.4 | 6 | 5.8 | 5.4 |
| 50 | 5.2 | 5.4 | 5.4 | 7.5 | 6.2 | 5.6 | 4.6 | 5.6 | 5 |

| | | | | | | | | | |
|----|-----|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 51 | 5.4 | 5.2 | 5.2 | 6.7 | 6 | 5.7 | 6.4 | 4.2 | 6.3 |
| 52 | 5.7 | 5.05 | 5.05 | 7.3 | 5.7 | 4.7 | 5.7 | 5.4 | 5.5 |
| 53 | 4.7 | 5.65 | 5.65 | 6.4 | 4.9 | 3.6 | 5.7 | 4.5 | 4.1 |
| 54 | 5.7 | 5.05 | 5.05 | 7.4 | 7.1 | 6 | 5.9 | 5 | 5.6 |
| 55 | 5.2 | 6 | 6 | 6.6 | 7 | 5.8 | 5.2 | 4.6 | 6.2 |
| 56 | 5.7 | 4.75 | 4.75 | 8.6 | 6.9 | 5.1 | 5.4 | 5.1 | 5.8 |
| 57 | 3.9 | 5.1 | 5.1 | 9.3 | 5.3 | 5 | 5.7 | 5.1 | 5.6 |
| 58 | 5.3 | 4.75 | 4.75 | 8 | 5.8 | 6.5 | 8.5 | 4.6 | 5.5 |
| 59 | 6.6 | 5.85 | 5.85 | 6.3 | 7.1 | 6.2 | 6.1 | 5.4 | 5.9 |
| 60 | 5.8 | 5.7 | 5.7 | 7.6 | 6.4 | 6.3 | 6.3 | 4.8 | 6.4 |
| 61 | 7.5 | 5.5 | 5.5 | 9.5 | 6.9 | 6 | 8.8 | 6.1 | 7.3 |
| 62 | 5.6 | 5.75 | 5.75 | 7.4 | 6.7 | 6 | 5.8 | 5.5 | 6.4 |
| 63 | 6.7 | 5.5 | 5.5 | 6.9 | 6.4 | 6.2 | 6.7 | 5.3 | 6.3 |
| 64 | 5.8 | 5.2 | 5.2 | 6.9 | 6.2 | 4.1 | 6.1 | 5.2 | 5 |
| 65 | 5.3 | 4.9 | 4.9 | 8 | 7.7 | 5.5 | 7.1 | 5.7 | 5.2 |

Tabla 3. Datos de las medias que se obtuvieron semanalmente en el consumo de alimento diario de cada ratón.

| RATÓN | SEMANAS | | | | | | | | | TOTAL | MEDIA |
|-------|---------|------|------|-------|------|------|------|------|------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | | |
| C1 | 6.01 | 6.53 | 5.41 | 6.11 | 5.8 | 5.53 | 5.43 | 5.37 | 5.91 | 52.11 | 5.77 |
| C2 | 8.3 | 6.1 | 4.91 | 5.56 | 5.44 | 5.27 | 5.6 | 5.30 | 5.45 | 51.93 | 5.65 |
| C3 | 8.3 | 6.1 | 4.91 | 5.56 | 6.72 | 5.27 | 5.6 | 5.30 | 5.45 | 53.22 | 5.78 |
| I1 | 5.37 | 7.94 | 5.91 | 6.99 | 7.29 | 7.51 | 7.84 | 7.21 | 7.86 | 63.93 | 6.99 |
| I2 | 6.53 | 7.23 | 6.46 | 7.36 | 7.01 | 6.37 | 6.74 | 6.26 | 6.37 | 60.33 | 6.68 |
| I3 | 8.61 | 7.41 | 4.97 | 34.10 | 5.63 | 5.29 | 5.47 | 5.21 | 6.03 | 82.73 | 6.48 |
| I4 | 8.60 | 7.11 | 5.94 | 5.03 | 6.57 | 5.74 | 5.91 | 5.56 | 6.84 | 57.31 | 6.23 |
| I5 | 8.60 | 7.11 | 5.94 | 4.50 | 5.30 | 4.70 | 5.36 | 4.91 | 5.26 | 51.69 | 5.52 |
| I6 | 7.27 | 6.67 | 5.04 | 5.36 | 5.51 | 5.00 | 5.23 | 5.50 | 6.20 | 51.79 | 5.67 |

Tabla 4. Datos de los pesos corporales de cada ratón registrados semanalmente.

| RATÓN | SEMANAS | | | | | | | TOTAL | MEDIA |
|-------|---------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | | |
| C1 | 42.1 | 39.1 | 42.7 | 42.6 | 41.4 | 43.1 | 44.5 | 295.5 | 47.22 |
| C2 | 40.9 | 40.9 | 42 | 40.8 | 41 | 42.3 | 43.5 | 291.4 | 46.60 |
| C3 | 38.9 | 38.4 | 39.5 | 39.1 | 39 | 41.3 | 41 | 277.2 | 44.32 |
| I1 | 42.3 | 38.5 | 40.6 | 42 | 42.1 | 44.8 | 49.6 | 299.9 | 47.73 |
| I2 | 42.3 | 38.5 | 40.6 | 42 | 42.1 | 44.8 | 49.6 | 299.9 | 47.73 |
| I3 | 46.8 | 44 | 41.8 | 44 | 41.5 | 42.2 | 44.6 | 304.9 | 48.71 |
| I4 | 42.7 | 34 | 40.6 | 42.2 | 39.3 | 43.1 | 35.4 | 277.3 | 44.04 |
| I5 | 37.6 | 39.2 | 35.3 | 39.1 | 36.6 | 38.2 | 41.1 | 267.1 | 42.65 |
| I6 | 37.6 | 39.2 | 35.3 | 39.1 | 36.6 | 38.2 | 41.1 | 267.1 | 42.65 |

Las gráficas correspondientes a las tablas 3 y 4 se muestran a continuación.

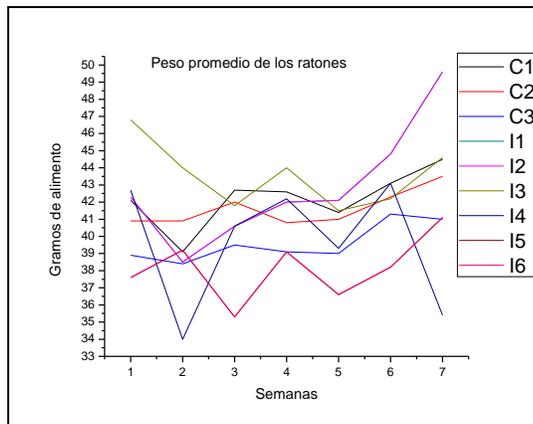


Figura 8. Muestra la grafica del peso promedio de los ratones

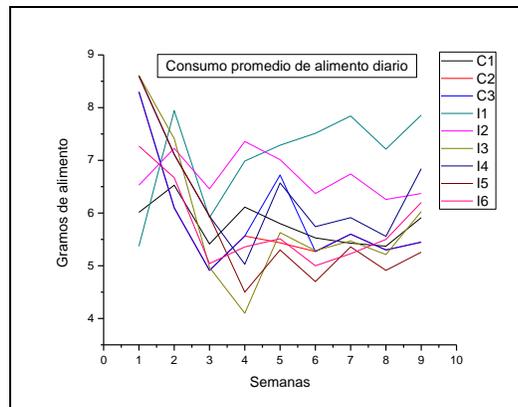


Figura 9. Muestra la grafica del consumo de alimento diario.

5.1. Consumo de alimento, peso corporal y grasa intervisceral

Si bien los ratones ejercitados tendieron a consumir más alimento a lo largo de las nueve semanas de entrenamiento (Figura 8A), las diferencias entre los grupos fueron no significativas. Con respecto al peso corporal, no se encontraron diferencias entre los ratones control y los ejercitados (Figura 8B). No obstante estos resultados, la evaluación macroscópica de grasa abdominal inter-visceral documentó que los animales control tuvieron un incremento de este parámetro en comparación con los animales ejercitados (Figura 8C).

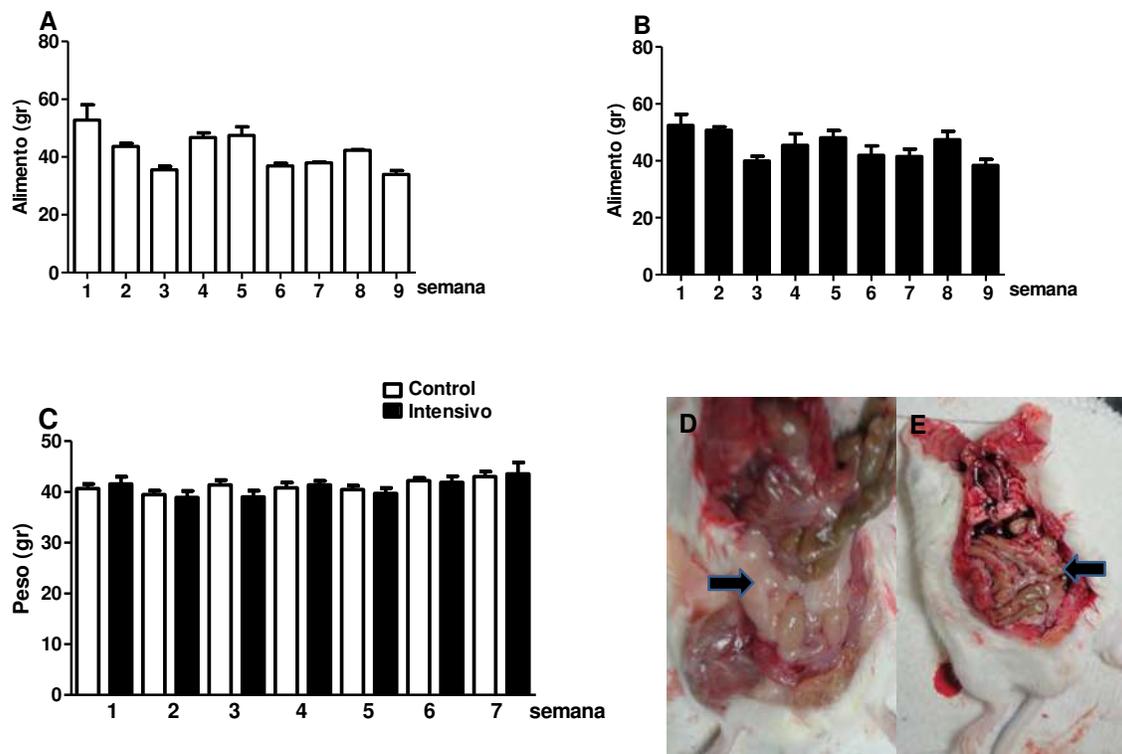


Figura 10. Los animales ejercitados tendieron a consumir más alimento, mantuvieron su peso y mostraron mejor grasa inter-visceral. A. Gráfica que muestra el consumo semanal de alimento de ratones controles y ejercitados en un periodo de 9 semanas (ANOVA: F y p; Tukey: p). B. gráfica que muestra el peso corporal de ratones control y ejercitados en un periodo de 9 semanas (ANOVA: F y p; Tukey: p). C y D. fotografías que ilustran la grasa inter-visceral (flechas) observada en ratones control y ejercitados, respectivamente.

5.2. Densidad de condrocito en el cartílago articular

Cualitativamente, a la inspección visual, la cantidad de condroblastos y condrocitos incrementó en los cartílagos articulares femoro-tibiales provenientes de los ratones ejercitados (Figura 9A). La estimación de la densidad celular confirmó esta apreciación pues los cartílagos articulares de ratones ejercitados mostraron un número significativamente mayor de células condrales (Figura 9B) y de nidos condrocíticos (Figura 9C) por unidad de área que aquellos obtenidos de los ratones control.

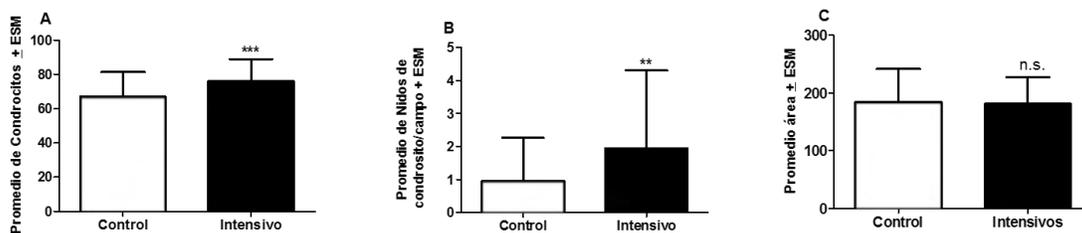


Figura 11. La densidad de células condrales en el cartílago articular femoro-tibial incrementa en respuesta al ejercicio. A. Cortes histológicos coronales del cartílago articular femoro-tibial que documentan el incremento de la cantidad de condroblastos y condrocitos en los ratones ejercitados. B. Gráficas que muestran la densidad de células condrales (t de Student: $t=3.863$; $***p<0.0001$) o de nidos condrocíticos (t de Student: $t = 2.615$; $**p<0.005$), respectivamente, en cartílagos articulares femoro-tibiales obtenidos de ratones control y ejercitados. C. El área total analizada para cada grupo de ratones fue esencialmente la misma.

En la figura numero 10 se muestra la tinción de Hematoxilina Eosina, esta tinción fue la que se uso de referencia para la densidad de células condrales en el cartílago articular, se puede observar que en la figura A corresponde a un cartílago articular de un ratón control mientras que en la figura B corresponde a un ratón ejercitado. La cantidad de macromoléculas que se muestran en la histología de ratón control es mayor con respecto al ejercitado se mostro haciendo un conteo de condrocitos y nidos por campo con ayuda de un microscopio.

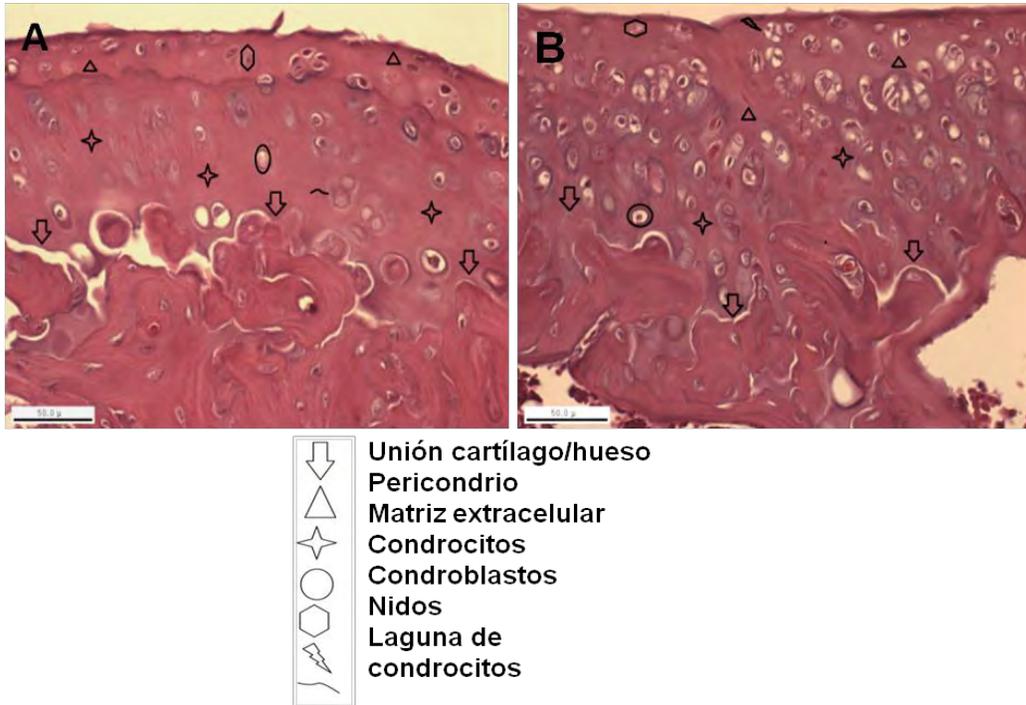


Figura 12. Se ilustra la morfología del cartílago articular de un tinción con Hematoxilina Eosina en donde la figura A es del grupo control y la figura B es del grupo ejercitado.

5.3. Evaluación cualitativa de la matriz extracelular condral

Una vez que los ratones fueron sacrificados, uno de los cartílagos articulares de cada ratón se conservaron en formaldehído en donde se guardaron hasta su estudio histológico. Con el objetivo de observar posibles cambios en la matriz extracelular del cartílago articular que estuvieran relacionados con el ejercicio, se realizaron cortes histológicos con un grosor de 50 micras, los cuales fueron teñidos con diferentes técnicas de tinción histológicas. Se eligieron diferentes tinciones con la finalidad de hacer una búsqueda de las principales macromoléculas que están presentes en el cartílago articular, las cuales fueron:

- A) Tinción con Hematoxilina-Eosina, la cual se usa para la búsqueda de células permitiendo resaltar su núcleo de color rosa.
- B) Tinción con azul de toluidina, su principal objetivo es marcar los proteoglicanos los cuales se tiñen de color azul permitiendo observar pequeñas redes y resaltando su estructura.

- C) Tinción con ácido peryódico – Schiff (PAS), su principal objetivo es teñir los carbohidratos de color rojo resaltando su presencia en el cartílago articular, por ejemplo se encuentran moléculas de glucoproteínas, glucosaminoglicanos, glucógeno, etc.
- D) Tinción con tricrómica de Masson, su principal objetivo es la búsqueda de colágeno y se tiñen de color azul resaltando las redes de colágeno.
- E) Tinción con oro coloidal, su principal objetivo es la búsqueda de proteínas y se tiñen de color rojo oscuro.

De acuerdo a lo anterior, la inspección cualitativa de la matriz extracelular condral con azul de toluidina reveló cambios significativos en la calidad de la matriz (Figuras 10A y B). Si bien, la cualidad tintorial no se modifica, el hecho de que haya tonalidades azules perilacunares más intensas en los cartílagos provenientes de los ratones ejercitados sugiere un incremento en la síntesis de proteoglicanos básicos. Por otra parte, se observó una diferencia en la “textura” del cartílago en los ratones control, la cual fue homogénea y de apariencia semejante al cristal pulido o esmerilado, en contraste con los del grupo ejercitado que mostraron un incremento en el componente fibrilar organizado tanto oblicua como radialmente en los estratos intermedios y radiales del cartílago. Lo anterior muestra evidencia de un aumento en la síntesis y depósito de colágeno. En el estrato radial, la matriz que rodea algunos nidos condrocíticos muestra una tonalidad púrpura sólo en el caso de los ratones ejercitados, lo que sugiere que éstos secretan proteoglicanos ácidos.

En concordancia con los resultados anteriores, los cortes del cartílago articular fémoro-tibial teñidos con PAS también sugieren un incremento en la producción de glicoproteínas de matriz por parte del componente celular condral; la intensidad de la tinción es mayor y la apariencia de la matriz es más granulada en los cartílagos de los ratones ejercitados en comparación con los del grupo control (Figuras 10C y D). La tinción de la matriz condral con el colorante Tricrómico de Masson revela depósitos de material granular en la región perilacunar de los condroblastos en la lámina intermedia, indicando un proceso activo de síntesis de colágeno (Figuras 10E y F). Finalmente, la coloración oro coloidal permitió identificar la presencia de proteínas en la matriz extracelular (Figuras 10G y H).

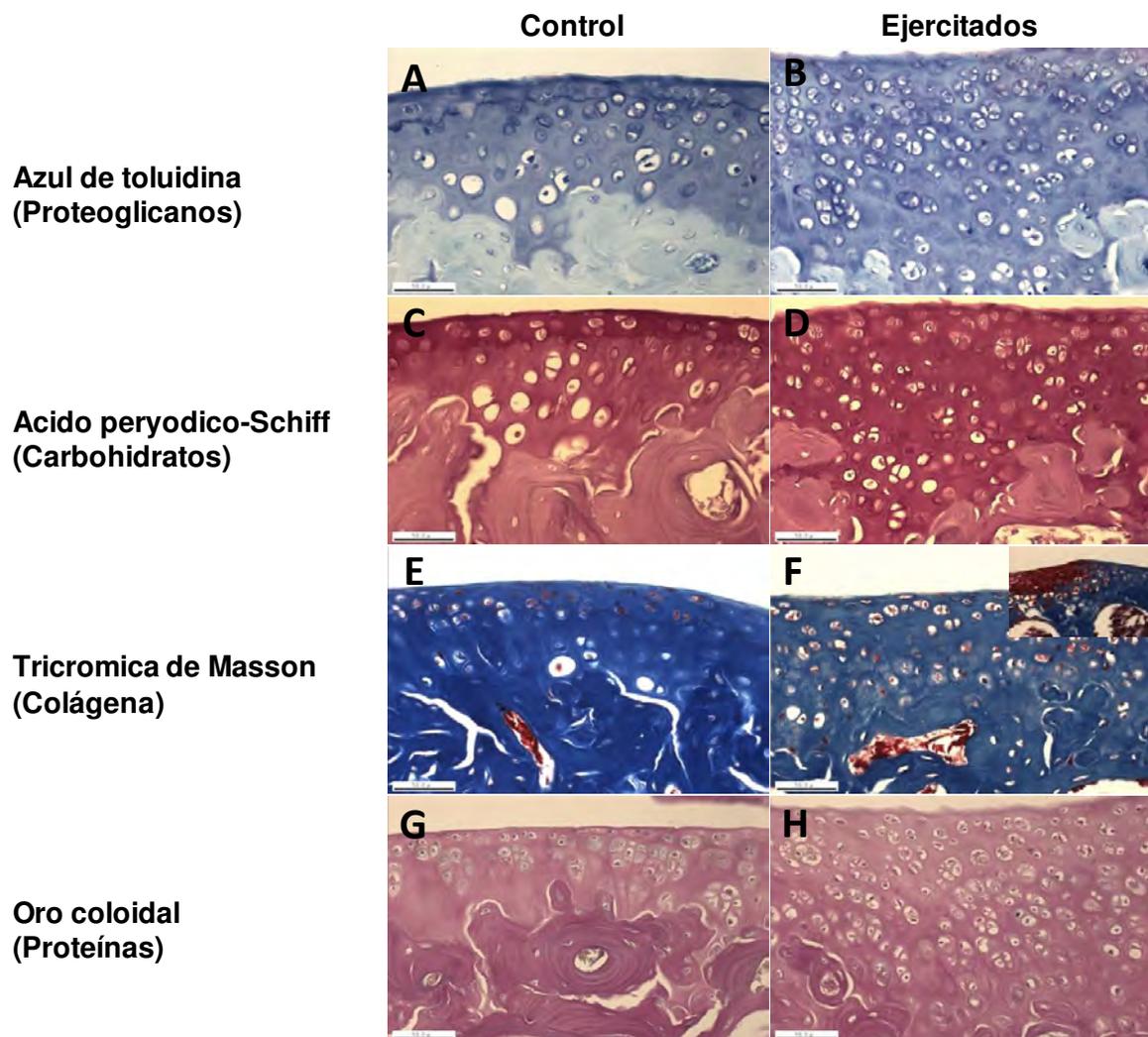


Figura 13. La síntesis y deposición de proteoglicanos, glicoproteínas y colágeno en la matriz del cartílago articular femoro-tibial parece incrementarse en respuesta al ejercicio. A y B. La imagen muestran cortes coronales del cartílago articular teñidos con Azul de Toluidina (A y B), PAS (C y D), Tricrómico de Masson (E y F) y Oro Coloidal (G y H) en ratones control (A, C, E, y G) y ejercitados (B, D, F, y H). El inserto en F ilustra la deposición de matriz ósea (teñida de rojo) en los extremos del cartílago articular sujeto a estrés mecánico relacionado con el ejercicio.

5.4. Estadística de los datos experimentales

Las diferencias entre grupos relativas al consumo de alimento y peso corporal fueron evaluadas mediante pruebas de t-student, sobre dos medias, pruebas de análisis de varianza de

una vía y seguida de la prueba post hoc de Tukey. Las diferencias grupales relativas a la densidad de los condrocitos fueron evaluadas utilizando una prueba de t-student. En ambos casos el ajuste del nivel de significancia fue a un valor de $p < 0.05$ [21].

5.4.1. Análisis estadístico de dos medias con t-student

Para el análisis inferencial entre dos medias se consideró:

- La prueba de t student.
- Se estimó el valor de la media y varianza en cada uno de los grupos de estudio.

Se sabe que para dos muestras aleatorias independientes de tamaños n_1 y n_2 , respectivamente, provenientes de dos poblaciones con medias μ_1 y μ_2 y varianzas σ_1^2 y σ_2^2 , la variable aleatoria correspondiente es:

$$Z = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}}$$

Tal que tiene una distribución normal estándar. Si consideramos que $\sigma_1 = \sigma_2 = \sigma$, es entonces el estadístico anterior se reduce a:

$$Z = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sigma \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Los dos estadísticos anteriores sirven como base para el desarrollo de los procedimientos de prueba sobre dos medias.

La hipótesis bilateral sobre dos medias en general pueden escribirse como:

$$H_1 : \mu_1 - \mu_2 \neq d_0$$

$$H_1 : \mu_1 - \mu_2 \neq d_0$$

Con una región crítica de las dos colas.

Para el caso de observaciones pareadas en donde no hay interacción entre los tratamientos y las unidades experimentales, el valor de estadístico de prueba corresponde a:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - d_0}{s_p \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}}$$

Para el caso de varianzas desconocidas, donde:

$$s_p^2 = \frac{s_1^2(n_1 - 1) + s_2^2(n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}$$

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n a_j = \frac{a_1 + a_2 + \dots + a_n}{n}$$

La hipótesis bilateral no se rechaza cuando:

$$t_{\alpha/2, n_1 + n_2 - 2} < t < t_{\alpha/2, n_1 + n_2 - 2}$$

DATOS RELACIONADOS CON LOS GRUPOS ESTUDIADOS

De acuerdo al experimento realizado para comparar la cantidad de comida consumida diariamente entre un grupo de ratones control y un grupo de ratones ejercitados, en donde se espera obtener menor consumo de alimento en el grupo de los controles con respecto a los ejercitados, mostrando una diferencia de 1 gramo, con un nivel de significancia de 0.05. Los estudios se realizaron para conocer los cambios que ocurren en la matriz extracelular del cartílago articular en rodilla de ratón. Para ello se plantearon las siguientes hipótesis:

$$H_0: \mu_c - \mu_e \leq 1$$

$$H_1: \mu_c - \mu_e > 1$$

Donde μ_c y μ_e representan las medias poblacionales de los grupos controles y grupos ejercitados respectivamente.

Para comprobar las hipótesis anteriores, se tuvo una muestra $n_1=3$ para el grupo control y una muestra $n_2=6$ para el grupo de los ratones ejercitados. El tiempo de duración del experimento fue de 65 días. Para cada uno de los ratones se obtuvieron los siguientes promedios de alimento diario durante el periodo de estudio:

| GRUPO CONTROL | | | GRUPO EJERCITADO | | | | | |
|---------------|------|------|------------------|------|------|------|------|------|
| C1 | C2 | C3 | I1 | I2 | I3 | I4 | I5 | I6 |
| 5.78 | 5.75 | 5.75 | 7.11 | 6.71 | 5.91 | 6.37 | 5.73 | 5.73 |

A partir de la tabla anterior se obtuvieron los siguientes promedios, donde \bar{x}_1 = grupo control y \bar{x}_2 = grupo ejercitado:

$$\bar{x}_1 = 5.76 \text{ gramos}$$

$$\bar{x}_2 = 6.26 \text{ gramos}$$

Y sus respectivas desviaciones estándar:

$$S_1 = 0.02 \text{ gramos}$$

$$S_2 = 0.57 \text{ gramos}$$

A partir de los resultados anteriores, se calculó el siguiente estadístico de prueba para la diferencia de medias poblacionales:

$$t = \frac{(\bar{x}_2 - \bar{x}_1) - d_0}{s_p \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}}$$

Donde:

$$s_p^2 = \frac{s_1^2(n_1 - 1) + s_2^2(n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}$$

De acuerdo a los datos se obtiene que:

$$s_p^2 = \frac{(0.0004)(2) + (0.325)(5)}{3 + 6 - 2} = 0.23$$

$$s_p = \sqrt{0.23} = 0.48$$

$$t = \frac{(6.26 - 5.76) - 1}{(0.48)\sqrt{1/3 + 1/6}} = \frac{-0.5}{(0.48)(0.707)} = -1.47$$

$$v = n_1 + n_2 - 2$$

Con $v = 7$ grados de libertad.

$\alpha = 0.05$ de un nivel de significancia

La región crítica se encuentra en: $t > 1.895$

Conclusión.

A partir de los resultados obtenidos se concluye que la diferencia entre el consumo diario en ambos grupos es de 1 gramo o menos con un nivel de significancia del 0.05.

PESO CORPORAL

Se llevó a cabo un experimento para comparar el peso corporal por semana en grupos de ratones controles con grupo de ratones ejercitados, en donde se espera obtener mayor peso corporal en el grupo controles con respecto a los ejercitados, mostrando una diferencia de 2 gramos, con un nivel de significancia de 0.05. Los estudios se realizaron para conocer los cambios que ocurren en la matriz extracelular del cartílago articular en rodilla de ratón. Para ello se plantearon las siguientes hipótesis:

$$H_0: \mu_c - \mu_e \leq 2$$

$$H_1: \mu_c - \mu_e > 2$$

Donde μ_c y μ_e representan las medias poblacionales de los grupos controles y grupos ejercitados respectivamente.

Para comprobar las hipótesis anteriores, se tuvo una muestra $n_1=3$ para el grupo control y una muestra $n_2=6$ para el grupo de los ratones ejercitados. El tiempo de duración del experimento fue de 65 días. Para cada uno de los ratones se obtuvieron los siguientes promedios en su peso corporal durante el periodo de estudio:

| GRUPO CONTROL | | | GRUPO EJERCITADO | | | | | |
|---------------|-------|------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| C1 | C2 | C3 | I1 | I2 | I3 | I4 | I5 | I6 |
| 42.21 | 41.63 | 39.6 | 42.84 | 42.84 | 43.56 | 39.61 | 38.16 | 38.16 |

A partir de la tabla anterior se obtuvieron los siguientes promedios donde \bar{x}_1 = grupo control y \bar{x}_2 = grupo ejercitado:

$$\bar{x}_1 = 41.15 \text{ gramos}$$

$$\bar{x}_2 = 40.86 \text{ gramos}$$

Y las siguientes desviaciones estándar:

$$S_1 = 1.37 \text{ gramos}$$

$$S_2 = 2.50 \text{ gramos}$$

A partir de los resultados anteriores, se calculó el siguiente estadístico de prueba para la diferencia de medias poblacionales:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - d_0}{s_p \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}}$$

Donde:

$$s_p^2 = \frac{s_1^2(n_1 - 1) + s_2^2(n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}$$

$$s_p^2 = \frac{(1.88)(2) + (6.25)(5)}{3 + 6 - 2} = 5.00$$

$$s_p = \sqrt{5.00} = 2.236$$

$$t = \frac{(41.15 - 40.86) - 2}{2.236 \sqrt{1/3 + 1/6}} = \frac{-1.71}{(2.236)(0.707)} = -1.08$$

Con $v = 7$ grados de libertad y

$\alpha = 0.05$ de nivel de significancia

La región crítica se encuentra en $t > 1.895$

Conclusión: A partir de los resultados obtenidos se concluye que existe una diferencia de 2 gramos o menos entre el peso corporal de los ratones del grupo control y los del grupo ejercitado, con un nivel de significancia del 0.05.

5.4.2. Análisis de varianza

El análisis de Varianza (ANOVA) es un procedimiento muy común utilizado para trabajar con pruebas de hipótesis para de medias poblacionales. El análisis de varianza es una colección de modelos estadísticos y sus procedimientos asociados, en el cual la varianza está particionada en ciertos componentes debidos a diferentes variables explicativas.

En este caso se hará la comparación de tratamientos con un control, es decir se hará un análisis con un solo factor y diferentes niveles (k).

Tabla 5. Tabla de ANOVA para un solo factor

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrados medios | calculada |
|---------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|---------------------|
| Tratamiento | SSA | K-1 | $s_1^2 = \frac{SSA}{k-1}$ | $\frac{S_1^2}{S^2}$ |
| Error | SSE | N-K | $s^2 = \frac{SSE}{N-k}$ | |
| Total | SST | N-1 | | |

A continuación se presentan las fórmulas involucradas para el análisis de Varianza para tamaños desiguales de muestra:

- I. Suma total de cuadrados (SST).

$$SST = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} y_{ij}^2 - \frac{T^2}{N},$$

Donde

$$T^2 = \left(\sum_{i=1}^k T_i \right)^2 \quad N = \sum_{i=1}^k n_i$$

- II. Suma de cuadrados en tratamiento (SSA).

$$SSA = \sum_{i=1}^k \frac{T_i^2}{n_i} - \frac{T^2}{N}$$

- III. Suma de cuadrados del error (SSE).

$$SSE = SST - SSA$$

1. CONSUMO DE ALIMENTO DIARIO.

$$H_0: \mu_c = \mu_e$$

H_1 : al menos una de las medias no son iguales.

$$\alpha = 0.05$$

Tabla 6. Consumo de alimento diario (gramos)

| GRUPOS DE ESTUDIO | | | |
|-------------------------|---------------|------------------|-------|
| | Grupo control | Grupo ejercitado | |
| | 5.78 | 7.11 | |
| | 5.75 | 6.71 | |
| | 5.75 | 5.91 | |
| | | 6.37 | |
| | | 5.73 | |
| | | 5.73 | T.. |
| Total (T _i) | 17.28 | 37.56 | 54.84 |
| Media | 5.76 | 6.26 | 6.01 |

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrados medios | Calculada f |
|---------------------|-------------------|--------------------|------------------|---------------|
| Tratamientos SSA | 0.5 | 1 | 0.5 | 2.158 |
| Error SSE | 1.622 | 7 | 0.2317 | |
| Total SST | 2.122 | 8 | | |

De los totales por tratamiento se obtienen que:

Cálculos: $T_1 = 17.28$, $T_2 = 37.56$ y $T.. = 54.84$

Aplicando las formulas se obtiene que:

$$SST = (5.78)^2 + (5.75)^2 + (5.75)^2 + (7.11)^2 + \dots + (5.73)^2 - (54.84)^2/9 = 336.2804 - 334.1584 = 2.122$$

$$SSA = (17.28)^2/3 + (37.56)^2/6 - (54.84)^2/9 = 99.5328 + 235.1256 - 334.1584 = 0.5$$

$$SSE = 2.122 - 0.5 = 1.622$$

Para un nivel de significancia de 0.05 con $v_1 = k - 1 = 1$ y $v_2 = N - k = 7$ grados de libertad, se obtiene una Región crítica de: $f > 5.59$

Conclusión: se acepta H_0 , es decir los valores promedios en el consumo de alimento diaria de los grupos controles y ejercitados no presentan una diferencia significativa con un $\alpha = 0.05$.

2. PESO PROMEDIDO DE LOS RATONES.

$H_0: \mu_c = \mu_e$

H_1 : al menos una de las medias no son iguales.

$\alpha = 0.05$

Tabla 7. tabla de peso promedio por ratón (gramos)

| GRUPOS DE ESTUDIO | | | |
|-------------------|---------------|------------------|--------|
| | Grupo control | Grupo ejercitado | |
| | 42.21 | 42.84 | |
| | 41.63 | 42.84 | |
| | 39.60 | 43.56 | |
| | | 39.61 | |
| | | 38.16 | |
| | | 38.16 | T.. |
| Total (T_i) | 123.44 | 245.17 | 368.61 |
| Media | 41.15 | 40.86 | 41.005 |

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrados medios | Calculada f |
|---------------------|-------------------|--------------------|------------------|---------------|
| Tratamientos SSA | 0.1624 | 1 | 0.1624 | 0.032 |
| Error SSE | 35.0298 | 7 | 5.0043 | |
| Total SST | 35.1922 | 8 | | |

De los tratamientos se obtiene que:

Cálculos: $T_1 = 123.44$ $T_2 = 245.17$ y $T.. = 368.61$

Aplicando las fórmulas se obtiene que:

$$SST = (42.21)^2 + (41.63)^2 + (39.6)^2 + (42.84)^2 + \dots + (38.16)^2 - (368.61)^2/9 = 15132.2291 - 15097.0369 = 35.1922$$

$$SSA = (123.44)^2/3 + (245.17)^2/6 - (368.61)^2/9 = 5079.1445 + 10018.0548 - 15097.0369 = 0.1624$$

$$SSE = 35.1922 - 0.1624 = 35.0298$$

Para un nivel de significancia de 0.05 con $v=1$ y $v=7$ grados de libertad, se obtiene una región crítica de $f > 5.59$

Conclusión: se acepta H_0 , es decir los valores promedio en el peso de los ratones de los gramos control y ejercitados no presentan una diferencia significativa con una $\alpha = 0.05$

5.4.3. Prueba de Tukey

Es un método estándar para realizar comparaciones pareadas permitiendo la formación de intervalos de confianza del $100(1 - \alpha) \%$ simultáneos para todas las comparaciones pareadas. El método se basa en la distribución de rango *estudentizado*. $q(\alpha, K, v)$ con k y v grados de libertad e implica encontrar una diferencia significativa entre las medias i y j ($i \neq j$) si $(\bar{y}_i - \bar{y}_j)$ excede el valor de $q(\alpha, K, v)s\sqrt{1/n}$

1 CONSUMO DE ALIMENTO DIARIO

Para el caso de la cantidad de alimento promedio que es consumido diariamente por cada uno de los ratones en los 2 grupos se obtuvo:

| GRUPO CONTROL | | | GRUPO EJERCITADO | | | | | |
|--------------------|------|------|--------------------|------|------|------|------|------|
| C1 | C2 | C3 | I1 | I2 | I3 | I4 | I5 | I6 |
| 5.78 | 5.75 | 5.75 | 7.11 | 6.71 | 5.91 | 6.37 | 5.73 | 5.73 |
| $\bar{y}_1 = 5.76$ | | | $\bar{y}_2 = 6.26$ | | | | | |

De la tabla de la ANOVA se obtuvo una varianza de $s^2 = 0.2317$ con $k=2$ y $v=7$ grados de libertad

Por lo tanto, para $\alpha=0.05$ se obtiene un valor de la distribución de:

$$q(0.05,2,7)=3.34$$

Entonces todas las diferencias absolutas se deben de comparar con:

$$q[\alpha, K, v]s\frac{\sqrt{1}}{n} = \frac{(3.34)\sqrt{0.2317}}{3} = 0.9282$$

En donde se tomó el tamaño de muestra menor. Comparando en la diferencia de medias entre los 2 grupos de estudio:

$$\bar{y}_2 - \bar{y}_1 = 0.5$$

Conclusión. Se observa que las dos medias no muestran una diferencia significativa utilizando el procedimiento Tukey con una $\alpha=0.05$

2 PESO PROMEDIO DE LOS RATONES

Para el caso de la cantidad de alimento promedio es consumido diariamente por cada uno de los ratones en los dos grupos se obtuvo:

| GRUPO CONTROL | | | GRUPO EJERCITADO | | | | | |
|---------------------|-------|------|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| C1 | C2 | C3 | I1 | I2 | I3 | I4 | I5 | I6 |
| 42.21 | 41.63 | 39.6 | 42.84 | 42.84 | 43.56 | 39.61 | 38.16 | 38.16 |
| $\bar{y}_1 = 41.14$ | | | $\bar{y}_2 = 40.86$ | | | | | |

De la tabla de la ANOVA se obtuvo una varianza de $s=5.0043$ con $k=2$ y $v=7$ grados de libertad

Por lo tanto, para $\alpha=0.05$ se obtiene un valor de la distribución de:

$$q(0.05,2,7)=3.34$$

Entonces todas las diferencias absolutas se deben de comparar con:

$$q[\alpha, K, v]s\frac{\sqrt{1}}{n} = \frac{(3.34)\sqrt{5.0043}}{3} = 4.314$$

En donde se tomó el tamaño de muestra menor. Comparando en la diferencia de medias entre los 2 grupos de estudio:

$$\bar{y}_2 - \bar{y}_1 = 0.5$$

Conclusión. Se observa que las dos medias no muestran una diferencia significativa utilizando el procedimiento Tukey con una $\alpha=0.05$

Capítulo 6 CONCLUSIONES

6.1. Discusión general

La osteoartritis es un padecimiento crónico degenerativo que afecta, entre otros componentes articulares, al cartílago articular. Si bien su etiología se considera multifactorial, en fechas recientes se ha puesto énfasis en la posibilidad de que el estrés mecánico pudiese condicionar el desarrollo de la patología. Aunque existen trabajos tanto *in vitro* como *in vivo* que apoyan este concepto [5, 13], otros resultados indican que el estrés mecánico favorece el recambio y la remodelación del cartílago articular [14]. Las diferencias en el diseño de los experimentos (e.g., *in vivo* versus *in vitro*) y en el grado de estrés al que se somete el tejido (e.g., ejercicio intenso forzado) son elementos, entre otros, que podrían explicar las discrepancias entre los estudios. Es por ello que en el presente trabajo se probó el ratón como modelo animal tal que permitiera evaluar de manera práctica los efectos del estrés mecánico relacionado con el ejercicio. En este trabajo de tesis se aportó evidencia que indica que el ejercicio a libre acceso durante nueve semanas conduce a un incremento de los elementos celulares y de los constituyentes acelulares del cartílago articular fémoro-tibial. Aunque no se mostró de manera concluyente, las observaciones cualitativas y cuantitativas aquí reportadas sugieren en conjunto que el incremento en el componente celular responde a aumentos en la proliferación de condroblastos, mientras que aquellos de los componentes acelulares reflejan el aumento en la síntesis de proteoglicanos y colágeno por parte de los condroblastos y condrocitos. Estos resultados son absolutamente compatibles con los reportados por Ting Kuo [22]. Así, el ejercicio practicado voluntariamente por nueve semanas promueve la remodelación del cartílago articular femoro-tibial en el ratón. Sin embargo, en base a los resultados obtenidos no se puede concluir de manera definitiva que el sostenimiento del ejercicio conduce a una degeneración articular.

Una de las posibles limitaciones de nuestro estudio es el hecho de que el régimen de ejercicio fue auto-impuesto de manera voluntaria. Esta situación podría generar dudas de la eficacia del diseño. Sin embargo, los hechos de que los ratones ejercitados tendieran a consumir más

alimento, mantuvieran su peso, tuviesen menor cantidad de grasa inter-visceral y que presentaran cartílagos articulares hipertróficos, apoya la efectividad del protocolo.

En la actualidad, es común el que los médicos aconsejen a pacientes que sufren de alteraciones metabólicas (e.g., diabetes *mellitus*), de sobrepeso y/o endocrinológicos la realización de rutinas de ejercitación de distinta demanda, sin considerar la posibilidad de que dichos estados mórbidos podrían de por sí haber ya afectado a las articulaciones. Modelos como el propuesto en esta tesis, permitirían en un futuro inmediato evaluar los efectos que distintas rutinas forzadas o de libre acceso con diferentes demandas físicas pudiesen tener sobre la morfofisiología articular, ya que en ratones se observan distintos fenotipos patológicos equivalentes a los observados en la población humana. En este contexto el presente trabajo abre toda una línea de investigación en modelos animales con potencial trasnacional.

6.2. Conclusiones del trabajo de tesis

Como conclusiones derivadas del presente trabajo de tesis, se pueden citar los siguientes:

- El ejercicio a libre acceso durante nueve semanas condujo a un incremento de los elementos celulares y de los constituyentes acelulares del cartílago articular fémoro-tibial.
- El incremento de los componentes celulares responde a un aumento en la proliferación de condroblastos.
- Se observó un incremento de la proliferación de los proteoglicanos y colágeno.
- El ejercicio voluntario que se practicó por nueve semanas promovió la remodelación del cartílago articular en el ratón.
- No se obtuvieron resultados conclusivos respecto al consumo diario y al peso del ratón en ejercitación durante el periodo de estudio.

6.3. Perspectivas a futuro

Para trabajos a futuros podrían considerarse los siguientes aspectos:

- Prolongar el periodo de ejercitación para evaluar el potencial osteoartrogénico del mismo.
- Trabajar con animales obesos en un periodo de ejercitación para evaluar el potencial osteoartrogénico del mismo.
- Trabajar con animales diabéticos.
- Realizar el estudio con diferentes periodos de ejercitación para valorar los diferentes niveles de estrés mecánico en relación al ejercicio.
- Adaptar un aparato de ejercitación que cuantifique la duración del ejercicio.

ANEXOS

Protocolos de las técnicas de tinción histológicas.

I. Tinción con Hematoxilina-Eosina

1. Lavar la laminilla con PBS tres veces durante 10 minutos.
2. Bañar en paraformaldehído durante 10 minutos.
3. Lavar 3 veces con PBS de forma rápida.
4. Hacer la tinción de núcleos con Hematoxilina durante 10 minutos.
5. Hacer el viraje de azul con agua (de la llave) durante 2 minutos.
6. Pasar rápidamente por alcohol-ácido durante 1 segundo.
7. Hacer el viraje a color café y eliminar el exceso de tinción de núcleos y enjuagar con agua bidestilada durante 40 segundos.
8. Pasar por carbonato de litio para restablecer la tonalidad azul de los núcleos por 10 segundos.
9. Enjuagar con agua bidestilada.
10. Pasar por etanol al 70 % durante 1 minuto.
11. Hacer la tinción de citoplasma con Eosina durante 25 segundos a 1 minuto.
12. Deshidratar la laminilla con etanol al:
 - 50%
 - 70%
 - 96%
 - 100%

II. Tinción con azul de toluidina

1. Lavar la laminilla con PBS tres veces durante 10 minutos.
2. Bañar en Paraformaldehído durante 10 minutos.
3. Lavar 3 veces con PBS de forma rápida.
4. Teñir con solución de azul de toluidina por 10 – 20 minutos.
5. Enjuagar con agua destilada.

6. Montar en glicerina.
7. Pasar por etanol al 95% durante un minuto.
8. Pasar por etanol al 100% durante un minuto.
9. Aclarar con xileno.

III. Tinción con Ácido Peryódico Schiff (PAS)

Para preparar el Reactivo de Schiff con los siguientes compuestos.

| | |
|------------|----------------------------------|
| 1 gr. | Fucsina básica |
| 200ml. | Agua destilada |
| 2 gr. | Metabisulfito de sodio o potasio |
| 10ml. | 1N Ácido clorhídrico |
| 0.5 -1 gr. | Carbón activo |

Posteriormente se siguió el siguiente Protocolo de PAS:

1. Lavar la laminilla con PBS tres veces durante 10 minutos.
2. Bañar en paraformaldehído durante 10 minutos
3. Lavar 3 veces con PBS.
4. Bañar en ácido peryódico al 0.5% por 15 minutos.
5. Lavado en agua corriente por 5 minutos.
6. Lavado en agua destilada.
7. Teñir con el reactivo de Schiff por 10 a 15 minutos (lo da el tejido cuando esté rosado)
8. Lavar en agua (de la llave) por 5 minutos.
9. Lavar en agua destilada.
10. Teñir en Hematoxilina de 3 a 5 minutos.
11. Lavar en agua corriente durante 5 minutos.
12. Deshidratar la laminilla con etanol al:
 - 50%
 - 70%
 - 96%
 - 100%

IV. Tinción con Tricrómica de Masson

1. Lavar la laminilla con PBS tres veces durante 10 minutos.
2. Bañar en paraformaldehído durante 10 minutos
3. Lavar 3 veces con PBS.
4. Teñir con Hematoxilina férrica durante 10 minutos.
5. Lavar en agua corriente durante 10 minutos.
6. Lavar en agua destilada.
7. Teñir con la solución de escarlata-fucsina ácida durante 2-5 minutos.
8. Lavar en agua destilada.
9. Tratar con la solución de ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico durante 10-15 minutos si se va a colorear con la solución de azul de anilina, o en la solución acuosa de ácido fosfotúngstico al 5% durante 15 minutos si se desea teñir con verde luz.
10. Teñir con solución de azul de anilina 15 minutos o con solución de verde luz 5 minutos.
11. Lavar en agua destilada.
12. Diferenciar en la solución de ácido acético al 1% durante 3-5 minutos.
13. Deshidratar la laminilla con etanol al:
 - 50%
 - 70%
 - 96%
 - 100%

ACCIONES DE DIFUSIÓN

Presentado en el II Simposium de Bioingeniería. Internacional. Realizado en Morelia, Mich. en las instalaciones de la Fac. de Ing. Mecánica de la UMSNH, los días 30 y 31 de Agosto del 2012.



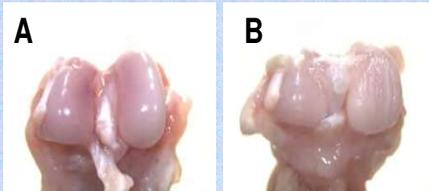
EFFECTO DEL EJERCICIO SOBRE LA CONFORMACIÓN INTERNA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR DE RODILLA EN RATÓN COMO MODELO ANIMAL

ABISAG MARIN ESPINOZA^a, LAURA A. IBARRA BRACAMONTES^b, GABRIEL GUTIERREZ OSPINA^b,
^aFACULTAD DE INGENIERIA MECANICA UMSNH, ^bINSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS UNAM

RESUMEN

La osteoartritis es un padecimiento crónico degenerativo de las articulaciones sinoviales de amplio movimiento. Aunque se ha propuesto que el estrés relacionado con el ejercicio puede predisponer su desarrollo. En este trabajo instrumentamos un modelo animal de distintos niveles de estrés mecánico asociado al ejercicio y su potencial osteoartrítico.

La fotografía ilustra la rueda de ejercicio con un ratón en movimiento.



Fotografía de un cartílago articular de un ratón. A) un cartílago articular sin daño sobre la superficie articular. B) un cartílago articular con daño en la membrana superficial.

DESARROLLO EXPERIMENTAL.

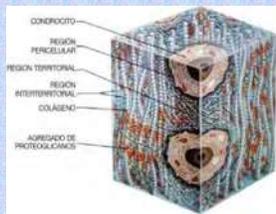
Los ratones machos se agruparon en dos condiciones. El primero fue un grupo control (n=3). El segundo grupo ejercitado (n=6) tuvo acceso libre a una rueda de ejercitación por 65 días; el registro de actividad fue realizado visualmente dos veces al día a lo largo del periodo. Durante éste tiempo se determinó el consumo de alimento y el peso corporal.

En IIB de la UNAM se realizaron estudios histológicos que se muestran a continuación.

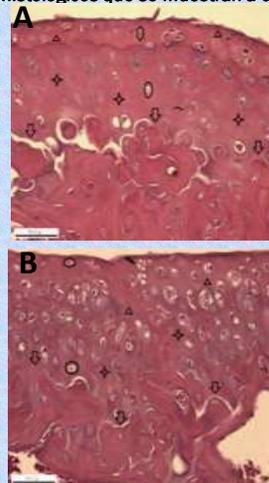
INTRODUCCIÓN.

El cartílago articular es repetidamente sometido a altos impactos durante el día, la superficie del cartílago articular se puede ver afectada por desgaste, y con ello comenzar la patología de la osteoartritis.

En este trabajo se evaluó el impacto del ejercicio en el desarrollo de la osteoartritis en el cartílago articular de la rodilla en ratones CD1.



Estructura del cartílago



La morfología del cartílago articular se ilustra en las siguientes histologías A) grupo control y B) grupo ejercitado.

Unión cartílago/hueso
 Pericondrio
 Matriz extracelular
 Condrocitos
 Condroblastos
 Nidos
 Laguna de condrocitos

CONCLUSIONES

El ejercicio a libre acceso durante 65 días conduce a un incremento de los elementos celulares y los constituyentes acelulares y promueve la remodelación del cartílago articular de un ratón.



BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- [1] Alison M. Bendele, animal models of osteoarthritis, artículo de Hylonome. J Musculoskel Neuron Interact. Vol. 363-376 (2001)
- [2] Maureen Pickarski, Tadashi Hayami, Ya Zhuo and Le T Duong, Molecular changes in articular cartilage and subchondral bone in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. Musculoskeletal Disorders. Vol. 12-197 (2011).
- [3] Hong Li, Ali Hosseini, Jing-Sheng Li, Thomas J. Gill IV, Guoan Li, Quantitative magnetic resonance imaging morphological analysis of knee cartilage in healthy and anterior cruciate ligament-injured knees. Springer-Verlag. Vol. 1723-6 (2011).
- [4] Baris Kocaoflu, Umut Akgun , Bülent Erol, Mustafa Karahan, Selim Yalçın, Preventing blood-induced joint damage with the use of intra-articular iron chelators. Springer-Verlag. Vol. 129, 1571–1575 (2009).
- [5] Yun Jong Lee, Ji Ah Park, Sei Hoon Yang, Kwang Yong Kim, Byoung Kwon Kim, Eun Young Lee, Eun Bong Lee, Jeong-Wook Seo, Frank Echtermeyer, Thomas Pap, Yeong Wook Song. Evaluation of osteoarthritis induced by treadmill-running exercise using the modiWed Mankin and the new OARSI assessment system. Rheumatol. Vol. 3, 1571–1576 (2011).
- [6] Cariño Ortega Carlos Alberto, Landeros Gallardos Carlos Alberto. Guía de práctica clínica diagnóstico y tratamiento de la osteoarthritis de la rodilla. Editor general Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud. Publicado por CENETEC.
- [7] A. Mobasheri, S.J. Vannucci, C.A. Bondy, S.D. Carter, J.F. Innes, M.F. Arteaga, E. Trujillo, I. Ferraz, M. Shakibaei and P. Martín-Vasallo. Glucose transport and metabolism in chondrocytes: a key to understanding chondrogenesis, skeletal development and cartilage degradation in osteoarthritis. Histology and histopathology. Vol. 17, 1239-1267 (2002).
- [8] Hansjoerg Heep, Gero Hilken, Sebastian Hofmeister, Christian Wedemeyer. Osteoarthritis of Leptin-Deficient ob/ob Mice in Response to Biomechanical Loading in Micro-CT. International Journal of Biological Sciences. Vol. 5, N. 3, 265-275 (2009).

- [9] Yvonne H Sniekers, Harrie Weinans, Gerjo JVM van Osch, Johannes PTM van Leeuwen. Oestrogen is important for maintenance of cartilage and subchondral bone in a murine model of knee osteoarthritis. *Arthritis research therapy*. Vol. 12, N.1, 183 (2010).
- [10] A R Poole, M Kobayashi, T Yasuda, S Lavery, F Mwale, T Kojima, T Sakai, C Wahl, S El-Maadawy, G Webb, E Tchetina, W Wu. Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. Vol. 61, 78-81 (2002).
- [11] Petro Julkunen, Esa P. Halmesmaki, Jarkko Iivarinen, Lassi Rieppo, Tommi Narhi, Juho Marjanen, Jarno Rieppo, Jari Arokoski, Pieter A. Brama, Jukka S. Jurvelin and Heikki J. Helminen. Effects of growth and exercise on composition, structural maturation and appearance of osteoarthritis in articular cartilage of hamsters. *Journal of Anatomy*. Vol. 217, 262-274 (2010).
- [12] Joaquín J. Sopena Juncosa, José M^a Carrillo Poveda, Mónica Rubio Zaragoza, José I. Redondo García, Iván Serra Aguado, Carme Soler i Canet. Estructura y función del cartílago articular. *Revista ARGOS*. Vol. 52, 24-26 (2004).
- [13] Ronny Maik Schulz y Augustinus Bader. Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes. *Eur Biophys*. Vol. 36, 539-568 (2007).
- [14] Miller, M.D y Brinker, eds. *Review of Orthopaedics (Third edition)*. Section 2: Joints, pag. 40 – 47. Editorial W.B. Saunders (2000).
- [15] Alexandre Tarrago. Osteoarthritis: diagnóstico de la enfermedad y evaluación del paciente. *Revista ARGOS*. Vol. 36, 26 -28 (2003).
- [16] José María Ladero Quesada. *Manual NORMON (octava edición) Parte I: Pruebas complementarias*. Capítulo 5: Líquido Sinovial.
- [17] Artículo: Segunda falange. RENQUERAS, centro veterinario para el diagnóstico por imágenes y terapia complementaria. <http://www.equimágenes.com/index.php/clase-musculo-esqueletico/ranqueras-artic>
- [18] Hang-Korng Ea, Christelle Nguyen, Dominique Bazin, Arnaud Bianchi, Jérôme Guicheux, Pascal Reboul, Michel Daudon, and Frédéric Liote. Articular Cartilage Calcification in Osteoarthritis. *Arthritis Rheumatism*. Vol. 63, N. 1, 10-18 (2011).

- [19] Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional. 7ª edición. Elsevier capítulo 26, Hueso, articulaciones y tumores de partes blandas, 1277-1318 (2009).
- [20] Norma oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.
www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF
- [21] Walpole, Myers. Probabilidad y Estadística. Cuarta edición. Editorial McGraw-Hill, 485-510 (2000).
- [22] Ting-Kuo Chang, Chang-Hung Huang, Chun-Hsiung Huang, Hsuan-Chiang Chen, Cheng-Kung Cheng. The influence of long-term treadmill exercise on bone ass and articular cartilage in ovariectomized rats. *Musculoskeletal Disorders*. Vol. 11, 185 (2010).
- [23] Blandine Poulet, Richard W. Hamilton, Sandra Shefelbine, and Andrew A. Pitsillides. Characterizing a novel and adjustable noninvasive murine joint loading model. *Arthritis rheumatism*. Vol. 63, N. 1, 137-147 (2011).