



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

**“ACTIVIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE *Arnica mexicana*
SOBRE EL CITOESQUELETO EN CONDROCITOS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

PRESENTA:

M.C. y P. DENISE FLORES SAN MARTIN



México D.F. 15 de Diciembre, 2011

DIRECTORAS DE TESIS:

DRA. NURY PÉREZ HERNÁNDEZ

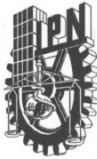
DRA. ELIZABETH PÉREZ HERNÁNDEZ

ASESORES:

DRA. CYNTHIA ORDAZ PICHARDO

DRA. MÓNICA ASCENCIÓN DE NOVA OCAMPO

DR. DAVID GUILLERMO PÉREZ ISHIWARA



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México D.F. siendo las 12:00 horas del día 6 del mes de diciembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de La ENMyH para examinar la tesis titulada:
Actividad del aceite esencial de *Amica Mexicana* sobre el citoesqueleto en condrocitos

Presentada por el alumno:

FLORES

Apellido paterno

SAN MARTIN

Apellido materno

DENISE

Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	4	7	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRIA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Nury Pérez Hernández

Dra. Elizabeth Pérez Hernández

Dra. Mónica Ascensión De Nova Ocampo

Asesor

Dra. Cynthia Ordaz Pichardo

Asesor

Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara

Asesor



SECRETARIA DE
EDUCACION PUBLICA

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA

Dr. César Augusto Sánchez Reyes López

SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México D.F. el día 15 del mes de Diciembre del año 2011, el (la) que suscribe Denise Flores San Martín alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular con número de registro B091476, adscrito a Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Nury Pérez Hernández y Dra. Elizabeth Pérez Hernández y cede los derechos del trabajo titulado ACTIVIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE *Arnica mexicana* SOBRE EL CITOESQUELETO EN CONDROCITOS, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección fsmdenise@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Denise Flores San Martín', is written over a horizontal line.

Denise Flores San Martín

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

- **A mi familia:**
José Amador, quien forma parte de mi vida y está siempre apoyándome. Arely, gracias por tu paciencia y cariño. Los amo.

 - **A mis padres:**
Que me apoyan desde la distancia en todos mis proyectos de vida.

 - **Especialmente agradezco a la Dra. Nury Pérez Hernández por su enseñanza, paciencia, constancia en el proyecto y sobretodo por su confianza en mí desde el inicio.**

 - **A la Dra. Elizabeth Pérez Hernández, quien me guió, enseñó con paciencia y confió en mí.**

 - **A mis asesores, Dra. Cynthia Ordaz Pichardo, Dra. Mónica De Nova Ocampo y Dr. Guillermo Pérez Ishiwara quienes dedicaron su tiempo y me dieron sugerencias para este trabajo.**

 - **Al grupo de Médicos especialistas de Patología del Hospital de Ortopedia “Dr. Victorio de la Fuente Narváez”-IMSS, gracias por su atención y enseñanza.**

 - **A la Maestra en Ciencias María de Jesús Perea Flores del Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías-IPN gracias por su amistad, paciencia y tiempo para obtener las mejores imágenes de este proyecto.**

 - **A la Maestra en Ciencias Abigail Aguilar Contreras del Herbario Medicinal del IMSS-Siglo XXI gracias por su atención.**
-

ÍNDICE

	Páginas
ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Componentes del cartílago articular	3
1.1.1 Matriz extracelular	
1.1.1.1 Agua	3
1.1.1.2 Proteoglicanos	3
1.1.1.3 Colágena	4
1.1.2 Condrocitos	5
1.1.2.1 Actina	6
1.1.2.2 Tubulina	7
1.1.2.3 Vimentina	7
1.1.3 Interacción citoesqueleto-Matriz extracelular	8
1.1.4 Osteoartritis	9
1.2 Antecedentes	11
1.2.1 Cambios del citoesqueleto en OA	11
1.2.2 Tratamiento de la OA	14
2 JUSTIFICACIÓN	15

3 HIPÓTESIS	16
4 OBJETIVOS	16
4.1 Objetivo general	16
4.2 Objetivos específicos	16
5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	17
6 MATERIAL Y MÉTODOS	
6.1 Material vegetal	18
6.2 Obtención del aceite esencial de <i>Arnica mexicana</i>	18
6.3 Caracterización del aceite esencial de <i>Arnica mexicana</i>	18
6.4 Obtención del cartílago articular	18
6.5 Ensayos de viabilidad	19
6.6 Tratamiento de los explantes de cartílago articular con AEAM	20
6.7 Ensayos de inmunohistofluorescencia	20
6.8 Microscopía láser confocal	22
6.9 Métodos estadísticos	22
7 RESULTADOS	
7.1 Identificación y Caracterización del aceite esencial de <i>A. mexicana</i>	23
7.2 Efecto del AEAM sobre la viabilidad en condrocitos	26
7.3 Efecto del AEAM sobre proteínas del citoesqueleto	27
7.4 Efecto de los monoterpenos sobre filamentos intermedios de vimentina de condrocitos	33
7.5 Interacción de AEAM y acrilamida	35
8 DISCUSIÓN	37
9 CONCLUSIONES	42

10 PERSPECTIVAS	43
11 BIBLIOGRAFIA	44

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Articulación normal de la rodilla	1
Figura 2. Estructura del agregano	4
Figura 3. Proteínas del citoesqueleto en condrocitos	6
Figura 4. Citoesqueleto de condrocitos bovinos primarios visualizados por microscopía láser confocal	7
Figura 5. Interacción citoesqueleto-matriz extracelular en condrocitos	8
Figura 6. Desequilibrio de los procesos catabólicos y anabólicos del cartílago articular en OA	11
Figura 7. Inmunomarcaje de vimentina en condrocitos normales y osteoarthríticos	12
Figura 8. Efecto de la IL-1B en la distribución de actina cultivo de condrocitos humanos	13
Figura 9. Efecto de acrilamida sobre vimentina, tubulina y actina en condrocitos bovinos	13
Figura 10. Cromatograma para el aceite esencial de <i>A. mexicana</i>	23
Figura 11. Representaciones moleculares de los cinco compuestos más abundantes en el AEAM	25
Figura 12. Porcentaje de viabilidad celular del aceite esencial de <i>A. mexicana</i> a concentraciones de 10-100 µg/ml sobre condrocitos comparado con control normal a las 48 y 96 h de exposición	26
Figura 13. Microfilamentos de actina	28
Figura 14. Microtubulos de tubulina	30
Figura 15. Filamentos intermedios de vimentina	32
Figura 16. Efecto del camphor y celecoxib en los filamentos intermedios de Vimentina en condrocitos	34

Figura 17. Interacción de acrilamida y AEAM sobre los filamentos intermedios de Vimentina.	36
Figura 18. Estructuras químicas de terpenos	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Organización estructural del cartílago articular	2
Tabla 2. Composición química del aceite esencial de <i>A. mexicana</i>	24
Tabla 3. Comparación de la caracterización química del AEAM de éste trabajo y la reportada en la literatura	39

ABREVIATURAS

MEC	Matriz extracelular
COMP	Proteínas de matriz oligomérica de cartílago
TGF-β	Factor de crecimiento β transformante
BMPs	Proteínas morfogenéticas óseas
CDMPs	Proteínas morfogenéticas derivadas de cartílago
IGFs	Factores de crecimiento similar a insulina
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo
HGF	Factor de crecimiento hepatocítico
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
DDR	Discoidina
FAC	Complejo de adhesión focal
OA	Osteoartritis
AVISA	Años de vida saludable
MMPs	Metaloproteasas
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
COX-2	Ciclooxigenasa 2
IMSS	Instituto mexicano del seguro social
PBS	Buffer salino fosfato
DMEM	Dubelco's Modified Eagle Medium
DHL	Deshidrogenasa láctica
AEAM	Aceite esencial de <i>A. mexicana</i>
DMSO	Dimetilsulfoxido
FITC	Isotiocianato de fluoresceína

RESUMEN

Las funciones del cartílago articular se realizan gracias a la homeostasis entre sus componentes: los condrocitos, embebidos en una matriz extracelular (compuesta en su gran mayoría por agua, además de proteoglicanos y colágeno). La pérdida de ésta homeostasis se observa en el cartílago osteoartrítico donde el evento catabólico excede al anabólico culminando con la degeneración y pérdida de la matriz. Por tanto, el citoesqueleto establece una estrecha relación con la matriz extracelular en el que los cambios en la organización de estas proteínas de citoesqueleto están asociados a numerosos estados patológicos como es el caso de la Osteoartritis (OA). Dentro del tratamiento de la OA la medicina tradicional ha tenido efectos benéficos por vía tópica como es el caso de *Arnica mexicana* (Asterácea) que por sus propiedades farmacéuticas atribuidas a sus aceites esenciales y otros componentes, decidimos estudiar el efecto del aceite esencial sobre los patrones de distribución de las proteínas de citoesqueleto en explantes de cartílago. Para poder realizar esto, se inició con la obtención y posterior caracterización estructural del aceite esencial que nos reveló la presencia de monoterpenos, sesquiterpenos e hidrocarburos como componentes mayoritarios. Con esto, iniciamos los ensayos de viabilidad (cytotox 96) los cuales indicaron que a las menores concentraciones (10-50 µg/ml) del aceite esencial utilizadas no tienen efecto citotóxico a las 48 y 96 h sobre los explantes tratados. El análisis inmunohistoquímico demostró que el aceite esencial mantuvo organizadas las proteínas de citoesqueleto y aún en presencia de disgregantes. Interesantemente este efecto se observó muy evidente en vimentina lo que nos llevó a evaluar el efecto del componente mayoritario del aceite esencial sobre vimentina sin mostrar modificaciones sobre ésta. Finalmente, evaluamos la interacción del aceite esencial y acrilamida a diferentes tiempos y en diferente orden, observándose reorganización de los filamentos intermedios de vimentina en condrocitos inicialmente expuestos al aceite esencial y posteriormente a acrilamida. En conclusión, la interacción del aceite esencial y acrilamida al mismo tiempo muestran la reorganización de los filamentos de vimentina.

ABSTRACT

Articular cartilage plays an important role because of their components: chondrocytes embebed in extracellular matrix, the last one composed by water, proteoglycans and collagen. The imbalance of the homeostasis between these compounds have been observed on osteoarthritic cartilage and the catabolic events exceed the anabolic one permitting the matrix degeneration. Therefore, the cytoskeleton establishes a intimate relationship with the extracellular matrix within the alteration of the cytoskeleton proteins are associated a several pathologic conditions as in the case of the osteoarthritis (OA). Among the multitude of AO therapies, traditional medicine have demonstrated beneficial effects topically as in the case of *A. mexicana* that their pharmaceutic essential oils properties and other compounds, we decided to study the effects of essential oils on the cytoskeleton proteins distribution of cartilage explants. To make this possible, we initiated with the essential oil obtaining and characterization that provided us the existence of monoterpenes, sesquiterpenes and hydrocarbon such mayor compounds. Therefore, we continued with viability essays (cytotox 96) which demostrated that the minor essential oils concentrations (10-50 µg/ml) don't have cytotoxic effects at 48 and 96 h on the treated explants. Immunohistochemical analysis demonstrated that the essential oil kept the cytoskeleton proteins organized even with the disgregant. Particulary, this effect was observed on vimentin protein that led us to think to evaluate the mayor component of the essential oil on vimentin without modification on it. Finally, we evaluated the interaction between essential oil and acrylamide on different times and order, showing us the reorganization of vimentin on chondrocytes previously exposed to the essential oil and acrylamide later. In conclusion, the interaction between essential oil and acrylamide shows re-organization of intermediate filaments of vimentin at the same time.

1. INTRODUCCIÓN

El cartílago articular es un tejido conectivo especializado, avascular, aneural y alinfático que recubre las superficies de los huesos en las articulaciones diartrodiales [1]. Estas están constituidas por una cavidad delimitada por la cápsula articular y la membrana sinovial, además del sistema ligamentario, tendones, superficie condral y hueso subcondral (Figura 1).

Las funciones del cartílago articular incluyen la distribución de la carga, la resistencia a las fuerzas de compresión, y la facilidad de movimiento libre de fricción de los huesos. Estas propiedades del cartílago derivan de una estructura cuya base es una matriz extracelular (MEC), y un único tipo de células denominadas condrocitos. Estos son los responsables de la síntesis y degradación de los diferentes componentes de la MEC [2,3]. Ya que el cartílago desarrolla sus funciones en concentraciones bajas de oxígeno (1-7%), los condrocitos se adaptan a las condiciones de hipoxia a través de la glicólisis anaeróbica [4], obteniendo sus nutrientes por difusión a partir del líquido sinovial [5].

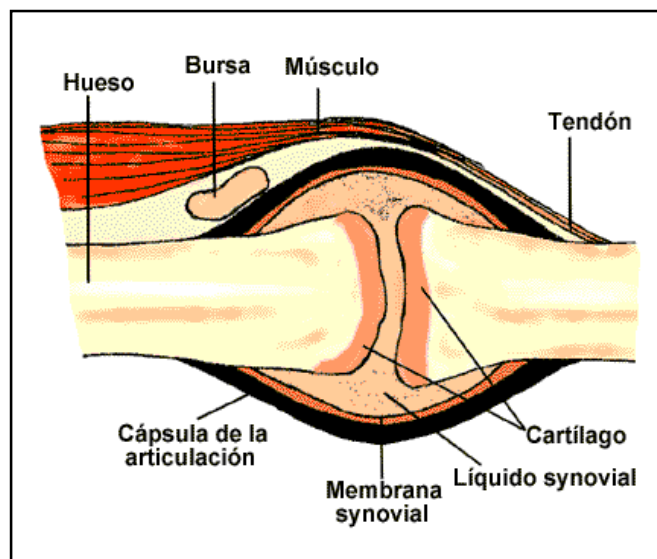


Figura 1. Articulación normal de la rodilla [6].

La MEC está compuesta por una fase líquida y una fase sólida. La fase líquida está conformada de agua (75-80%) en la cual se encuentran disueltos solutos iónicos y no iónicos [6]. La fase sólida está constituida por condrocitos en un 10%,

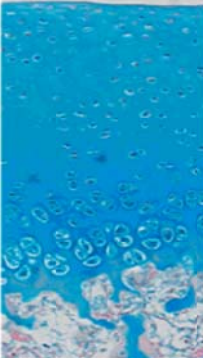
colágena en un 10-30%, proteoglicanos en un 3-10% y en menor cantidad de glucoproteínas adhesivas [7].

El cartílago articular está organizado en 4 zonas (Tabla 1): la zona superficial que consiste en delgadas fibrillas de colágeno tipo I, II y III orientadas tangencialmente, con bajo contenido de proteoglicanos y condrocitos de forma elipsoidal alineados con la superficie. Esta capa se encuentra en contacto con el líquido sinovial y es responsable de las propiedades de tensión del cartílago.

La zona transicional tiene una estructura menos densa e hidratada que la zona superficial, está formada por una mayor cantidad de proteoglicanos, fibrillas más gruesas de colágeno tipo II, IX y XI organizadas radialmente y condrocitos de forma redondeada.

La zona profunda contiene fibrillas de colágeno II, IX y XI alargadas y dispuestas radialmente. El contenido de los proteoglicanos es mucho mayor que en las zonas anteriores y los condrocitos son redondeados y están alineados perpendicularmente a la superficie [8].

La zona calcificada está en contacto con el hueso subcondral, contiene un número limitado de condrocitos hipertróficos que sintetizan colágeno tipo X, con el mayor contenido de proteoglicanos [4].





	Tipos de colágeno	Contenido de proteoglicanos	Contenido de agua	Densidad y forma celular	Orientación de fibras de colágeno
Zona superficial	I, II, III			+ Elipsoidal	Paralelo a la superficie de unión
Zona transicional	II, IX, XI			++ Circular	Disposición radial
Zona profunda	II, IX, XI			+ Columnas	Disposición radial
Zona calcificada	X			+ Hipertrófica	En redes
Hueso subcondral	I y III				

Tabla 1. Organización estructural del cartílago articular [4].

1.1 COMPONENTES DEL CARTILAGO ARTICULAR

1.1.1 MATRIZ EXTRACELULAR

1.1.1.1 Agua

El agua ocupa del 65 al 80 % del peso total del cartílago, contribuye al mantenimiento de la elasticidad, la lubricación y el transporte de nutrientes desde el líquido sinovial. La mayor cantidad de agua (80%) se encuentra en la zona superficial y disminuye hasta un 65% en la zona profunda [8].

1.1.1.2 Proteoglicanos

Los proteoglicanos están constituidos por glucosaminoglicanos de largas cadenas de polisacáridos no ramificados que consisten en unidades repetidas de disacáridos y un grupo sulfato (SO_4^{2-}). La presencia de disacáridos sulfatados junto a grupos iónicos de COO^- (alejados de 1-1.5 nm) proporcionan una carga negativa a los glucosaminoglicanos y favorecen la hidratación del cartílago [9]. Glucosaminoglicanos como el condroitin sulfato (100 cadenas) y el queratán sulfato (60 cadenas) unidos a una proteína central constituyen el agregano, el cual a su vez se une al ácido hialurónico a través de una proteína de unión (Figura 2). El agregano es el principal proteoglicano del cartílago articular. La carga negativa de los agreganos atrae cationes de la fase líquida dando como resultado una diferencia en la concentración de iones, incremento en la presión osmótica e hidratación de la matriz [9]. Otros proteoglicanos presentes en la MEC comprenden la decorina, biglicano y fibromodulina.

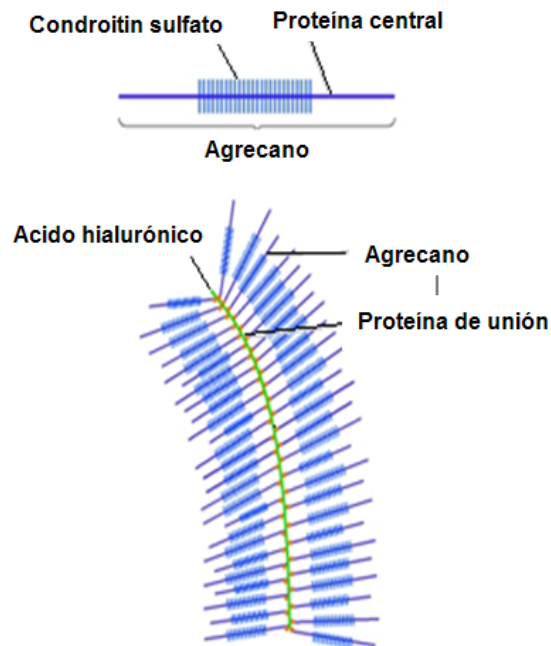


Figura 2. Estructura del agregano [9].

1.1.1.3 Colágena

La colágena representa el 50-60% del peso seco del cartílago, el tipo II es la más abundante (90-98%) y en menor proporción se encuentran colágena tipo VI, IX, X y XI [8]. Las colágenas se subdividen en fibrilares (tipo II y XI) y no fibrilares (tipos VI, IX y X).

Las fibras de colágeno tipo II contribuyen en la fuerza tensil del cartílago [10]. El grosor de éstas es influenciado por otros tipos de colágeno y varían de acuerdo a la profundidad del cartílago [9]. Estas fibras de tipo II se asocian con fibras de tipo XI, las cuales controlan el diámetro fibrilar, para formar una red. Las fibras de colágeno tipo VI son microfibrillas que forman fibras elásticas localizadas en la región pericelular de los condrocitos [11]. Las fibras de colágeno tipo IX son clasificadas como fibrillas asociadas a colágeno con triples hélices interrumpidas, y que actúan como un puente entre las fibrillas y los agreganos [12, 13]. Las fibras del tipo X son clasificadas como una red formadora de colágeno y su función aún

no se conoce [9]. Las fibras de colágeno son estabilizadas por proteínas de matriz ácida oligomérica (COMP) presentes en cartílago y tendones [14].

1.1.2 CONDROCITOS

Los condrocitos son células de alrededor de 5 a 15 μm de diámetro [15], con una elevada actividad biosintética [16], provenientes de células mesenquimales (condroblastos) y usualmente dispuestas en grupos dentro de las denominadas lagunas. Estas células sintetizan factores catabólicos y anabólicos, los cuales actúan de manera autocrina-paracrina para mantener el equilibrio entre la degradación y síntesis de los componentes de la MEC. Entre los factores anabólicos se encuentran: factor de crecimiento transformante β (TGF- β), proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), proteínas morfogenéticas derivadas de cartílago (CDMPs), factores de crecimiento similar a insulina (IGFs), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), factor de crecimiento hepatocítico (HGF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Los factores catabólicos incluyen proteasas (metaloproteasas, serin proteasas y tiol proteasas), fibronectina, neuromediadores (leptina y neuropéptidos), factores inflamatorios (citocinas proinflamatorias, óxido nítrico, eicosanoides y receptores activados de proteasas [8].

El citoesqueleto de los condrocitos es una red tridimensional en el citoplasma que actúa como una interfase física con la MEC, censando los estímulos mecánicos y el inicio de las respuestas biosintéticas [8]. La función principal del citoesqueleto es condicionar el movimiento de los organelos y proporciona un andamiaje para los procesos metabólicos. Los tres sistemas primarios de proteínas que componen el citoesqueleto de los condrocitos son: microfilamentos de actina, microtúbulos de tubulina y filamentos intermedios de vimentina [16] (Figura 3).

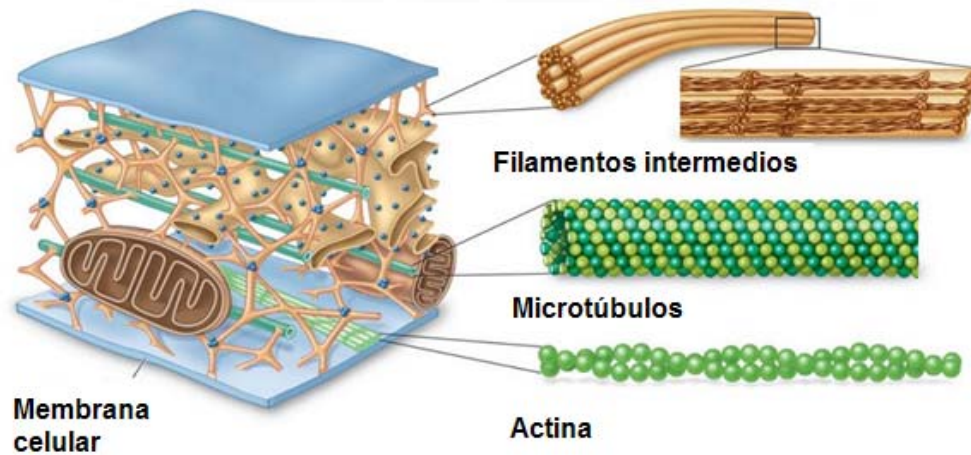


Figura 3. Proteínas del citoesqueleto en condrocitos.

<http://saharaair.blogspot.com/2011/06/organelles-cytoskeleton.html>

1.1.2.1 ACTINA

Los microfilamentos de actina tienen un espesor de 6 nm, una longitud variable y están involucrados en el fenotipo celular [17], movimiento de organelos [18], migración celular [19], endocitosis [20], secreción [21, 22] y ensamblaje de la MEC [23]. Estos filamentos de 43 kDa comprenden 3 diferentes monómeros (α , β y γ), los cuales conforman dos cadenas de subunidades globulares, actina G -que se polimeriza para formar una proteína filamentosa-, y actina F, que da origen a una espiral doble, soporte del filamento de actina. Los filamentos de actina se localizan en el citoplasma, son corticales y predominantemente distribuidos en la periferia del condrocito [24-27] (Figura 4a).

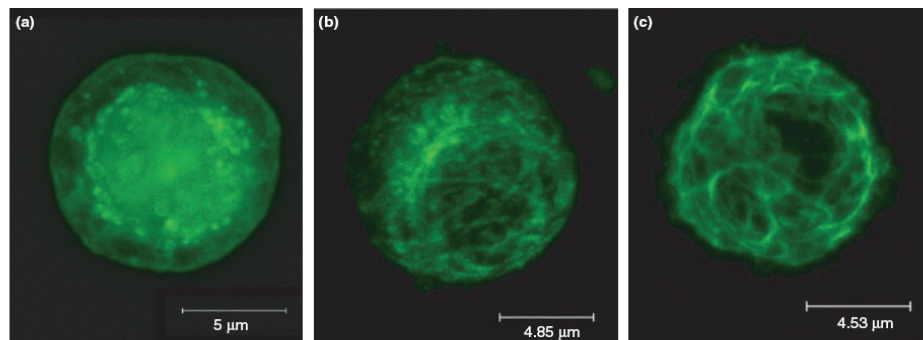


Figura 4. Citoesqueleto de condrocitos bovinos primarios visualizados por microscopía láser confocal: (a) microfilamentos F-actina, (b) microtúbulos de tubulina y (c) filamentos intermedios de vimentina [27].

1.1.2.2 TUBULINA

Los microtúbulos de tubulina participan en motilidad y división celular, transporte de organelos, morfogénesis celular, y ensamblaje de estructuras esenciales como el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi; forman una red laxa parecida a un cesto, distribuida en todo el citoplasma del condrocito [25, 28] (Figura 4b). La pared del microtúbulo se compone de 13 fibras lineales denominadas protofilamentos formadas por tubulina. Esta proteína está constituida por 2 polipéptidos, la α - tubulina y la β - tubulina, que se unen para formar heterodímeros y en presencia de GTP se polimerizan formando los protofilamentos [16].

1.1.2.3 VIMENTINA

Los filamentos intermedios de vimentina tienen un diámetro de 10-12 nm, son el componente más estable del citoesqueleto y su función principal es conferir fuerza mecánica. Se encuentran distribuidos en todo el citoplasma desde la periferia de la célula hasta la membrana nuclear [29]. (Figura 4c). La vimentina consta de 2 polipéptidos que conforman una hélice alfa y se enroscan entre sí (“coiled coil”). Dos dímeros forman un tetrámero que se polimeriza extremo a

extremo dando lugar a un protofilamento. Ocho de éstos se unen lado a lado y se enrollan para formar una estructura cilíndrica que da origen al filamento intermedio. Existen 5 clases de filamentos, de los cuales solo se han demostrado los de clase III en condrocitos [16].

1.1.3 INTERACCION CITOESQUELETO-MEC

Los condrocitos son expuestos a una variedad de fuerzas mecánicas incluyendo extensión, tensión o compresión *in vivo*. Para reconocer algunas de estas formas de estimulación mecánica los condrocitos deben expresar mecanorreceptores membranales que traduzcan los estímulos mecánicos en señales bioquímicas intracelulares (Figura 5); entre los cuales se encuentran los canales iónicos, discoidina (DDR), anexina V, receptor CD44, ancorina II (receptor de colágeno tipo II) y receptores de integrinas [30]. Las integrinas son las encargadas de modular la señalización que regula el crecimiento, diferenciación y mantenimiento de la homeostasis del cartílago [31].

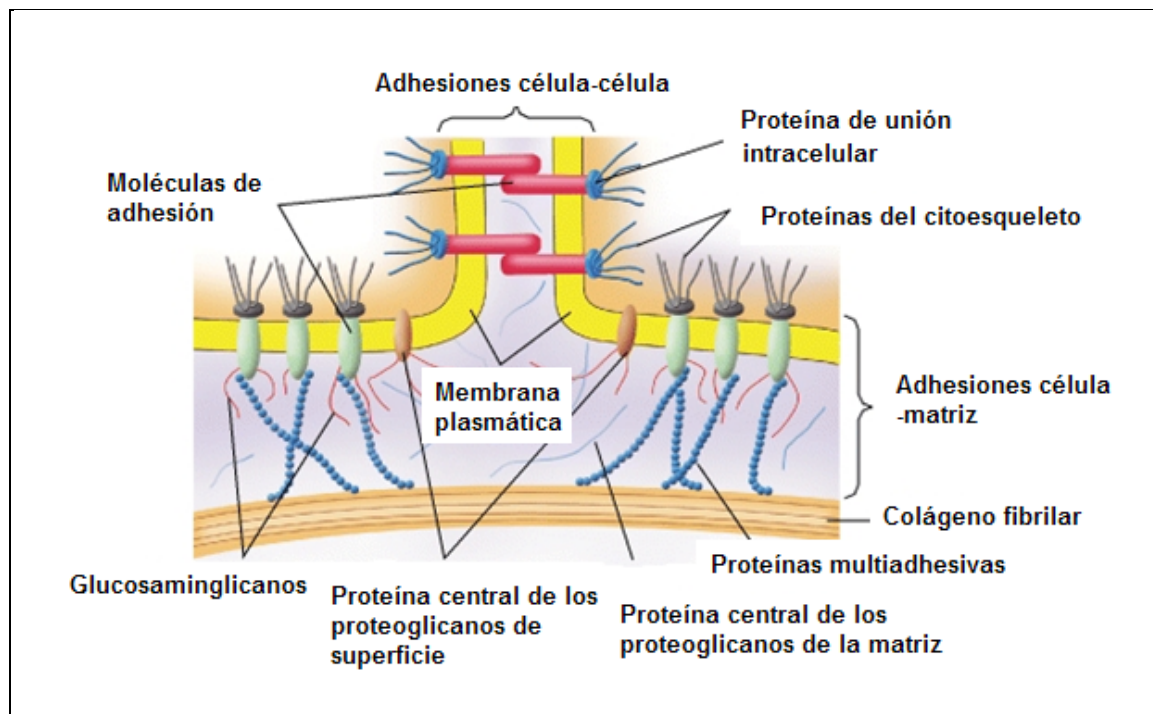


Figura 5. Interacción citoesqueleto-MEC en condrocitos.

Las integrinas son glucoproteínas transmembranales que comprenden 16 subunidades α y 8 subunidades β , que al combinarse forman más de 20 variedades, como son: fibronectina ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha n\beta 3$, $\alpha n\beta 5$), laminina ($\alpha 6\beta 1$), colágena ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$) [32-34] y los ligandos específicos de cada receptor. El dominio citoplásmico de las integrinas interactúa con la actina del citoesqueleto del condrocito, permitiendo la transducción de señales mecánicas secundarias a respuestas bioquímicas [35]. Paxilina, talina y α -actina son proteínas adaptadoras que permiten la interacción de la integrina con la actina del citoesqueleto, formando un complejo (complejo de adhesión focal) de unión con cinasas, fosfatasa y otras moléculas de señal [36, 37]. Este complejo permite a los condrocitos sensor y responder a los estímulos mecánicos [34].

Otros receptores en los condrocitos son los de dominio discoidina (DDR) que pertenecen a la subfamilia de los receptores tirosin cinasa con ligandos para colágena [38, 39].

La anexina V es también un receptor de colágena [40] específicamente con colágena tipo II y está involucrado en la regulación de apoptosis y mineralización de la placa de crecimiento [41]. Por último, CD44 es una glicoproteína de superficie que actúa como un receptor para colágena y hialuronato, la cual establece y organiza la matriz pericelular en los condrocitos y su disrupción puede alterar la sobrevivencia del condrocito [42].

1.1.4 OSTEOARTRITIS

La osteoartritis (OA) es una enfermedad articular progresiva y degenerativa, caracterizada por degradación y pérdida del cartílago articular, remodelación del hueso subcondral e inflamación de la membrana sinovial. La etiología se desconoce pero existen factores de riesgo intrínsecos como la edad, polimorfismos genéticos, el sexo y el estado hormonal; y factores de riesgo extrínsecos como defectos cartilaginosos, obesidad, traumatismos, pérdida de la alineación articular, hiperlaxitud ligamentaria y tabaquismo. La OA se presenta con

mayor frecuencia en personas mayores de 40 años, con una distribución del 18% en mujeres y 9.6% en varones, y en el 80% de los casos cursa con limitaciones del movimiento [43].

Las articulaciones más afectadas son las interfalángicas distales, seguidas de las proximales, rodilla y cadera [44]. La prevalencia de OA sintomática en rodilla y manos es de aproximadamente 30% en sujetos mayores de 65 años [45]. En México, de acuerdo al método AVISA (años de vida saludable) con registro en el año 2000, la OA se ubica en el segundo lugar de la consulta externa en el IMSS [46].

Las alteraciones del cartílago osteoartrítico incluyen pérdida de la homeostasis donde el evento catabólico excede al anabólico culminando con la degeneración y pérdida de la matriz. Los condrocitos disminuyen la expresión de genes anabólicos específicos como agreganos y colágeno de tipo II, y sobreexpresan colágeno tipo I, III y V [47]. Citocinas inflamatorias como IL-1, TNF- α , IL-17 e IL-18 actúan incrementando la síntesis de metaloproteasas (MMP-1, MMP-3, MMP-13), disminuyendo enzimas inhibitoras de MMPs y así la degradación de la MEC. Las citocinas anabólicas IGF-I, TGF- β 1, 2 y 3, los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) 2, 4 y 8, y las proteínas morfogénicas del hueso (BMPs) actúan estimulando la síntesis de los componentes de la MEC (Figura 6).

Los mecanismos fisiopatogénicos de la OA pueden resumirse en: 1) proliferación y muerte celular, 2) cambios en la actividad de síntesis y degradación de componentes de la MEC, 3) modulación fenotípica del condrocito, y 4) formación de osteofitos [47].

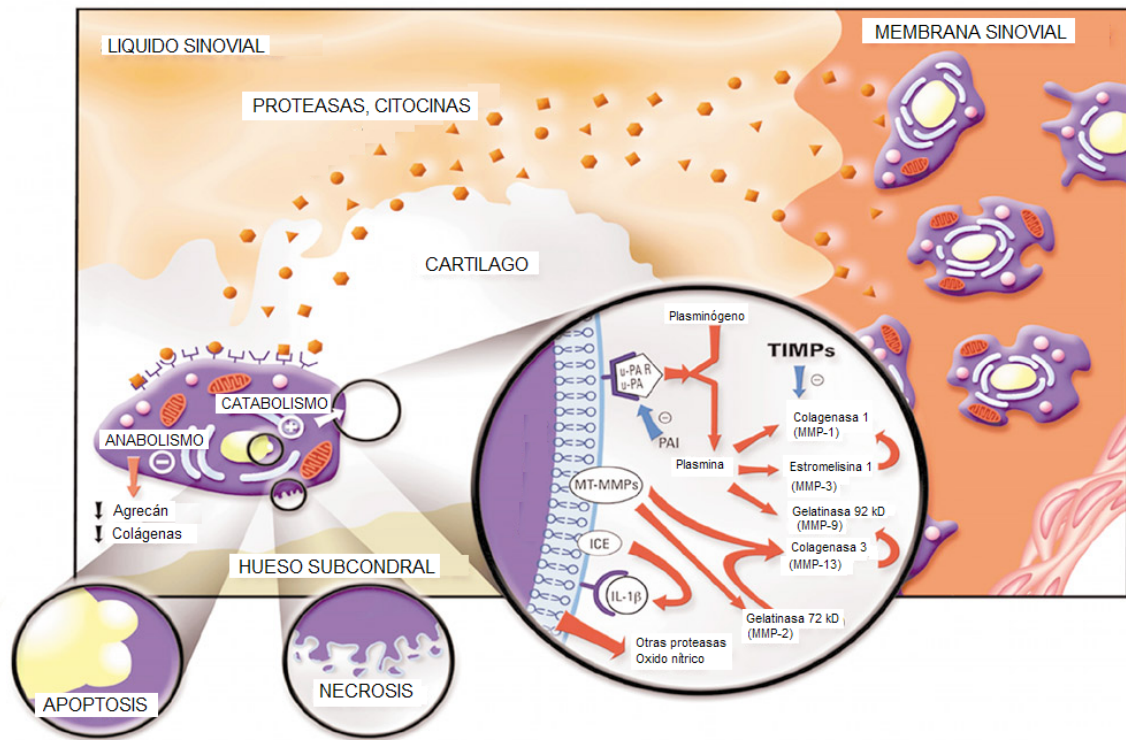


Figura 6. Desequilibrio de los procesos catabólicos y anabólicos del cartílago articular en OA [8b].

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 Cambios del citoesqueleto en OA

La organización y características del citoesqueleto en condrocitos normales han sido ampliamente estudiadas [25], sin embargo, los cambios que suceden en procesos de OA, se siguen investigando.

Estudios comparativos de cartílago humano normal y cartílago osteoarthritico, han evidenciado una elongación de la distribución de vimentina por microscopia confocal (Figura 7) [48] y una ruptura de 56 kDa a 46 kDa mediante Western-Blot y proteómica [49, 50].

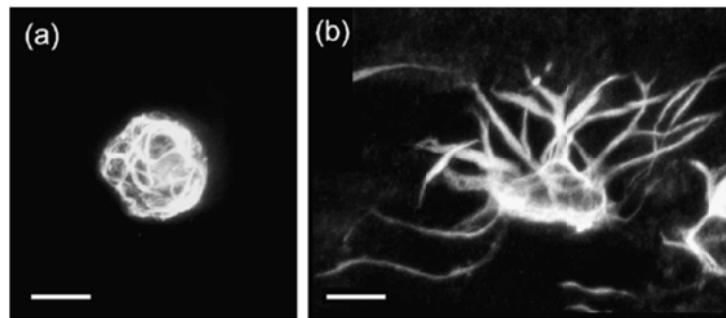


Figura 7. Inmunomarcaje de vimentina en condrocitos normales (a) y osteoarthríticos (b). Las barras blancas indican una escala de 5 μm [49].

Por otro lado, en un modelo de inducción de OA en ratas mediante menisectomía parcial, se describió una disminución en la intensidad de la inmunodetección de vimentina y tubulina, así como también la aparición de fragmentos de menor peso molecular para las mismas proteínas en análisis de Western-Blot [50].

Con respecto a los modelos *in vitro*, se ha descrito que después de la compresión mecánica (200 g por 8 cm de espesor del tejido) del cartílago articular y el posterior cultivo de los condrocitos [51], la pérdida de los componentes de la MEC [52], y la apoptosis [53] aumentaron, además un importante desensamble de la red de vimentina. Estos estudios apoyan la hipótesis de que la pérdida de la integridad de las proteínas del citoesqueleto, puede presentarse durante el impacto mecánico que sufren las articulaciones y que son uno de los factores para el desarrollo de OA [53].

En un estudio reciente, se demostró que los mRNA de tubulina, vimentina y de la proteína LIM-FHL2 (asociada a síntesis de actina) fueron subexpresados en cultivo de condrocitos humanos tratados con IL-1 β (Figura 8), mientras que también se observó la pérdida de la distribución cortical de actina [54].

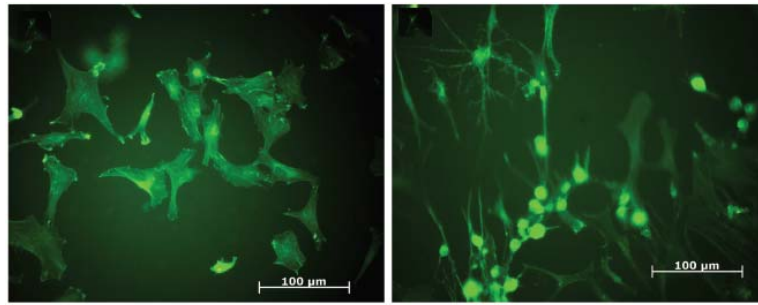


Figure 8. Efecto de la IL-1 β en la distribución de actina en cultivo de condrocitos humanos. Izquierda cultivo sin IL-1 β , derecha con IL-1 β [54].

Por último, se ha confirmado la disrupción de proteínas del citoesqueleto en cultivo de condrocitos por efecto de la adición de agentes disgregantes como la colchicina, la citocalacina D y acrilamida. En particular se reportó que la adición de 5 mM de acrilamida en cultivo de condrocitos articulares bovinos causó el colapso de los filamentos de vimentina a los 7 días de tratamiento, así como también cambios menos evidentes para actina y tubulina (Figura 9) además de disminución en la síntesis de los proteoglicanos de la MEC, característica de la OA [55, 56].

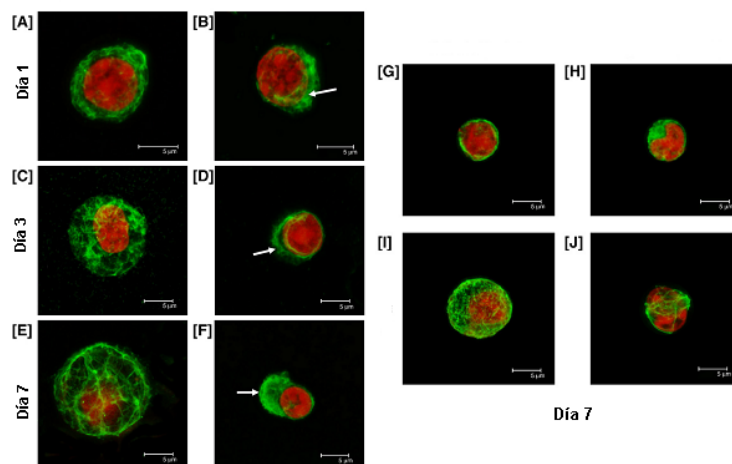


Figura 9. Efecto de acrilamida sobre vimentina, tubulina y actina en condrocitos bovinos. (A, C, E) vimentina normal; (B, D, F) vimentina en presencia de acrilamida; (G, I) actina y tubulina normales; (H, J) actina y vimentina en presencia de acrilamida [55].

1.2.2 Tratamiento de la OA

El manejo habitual de la OA se divide en terapias farmacológicas, no farmacológicas, y tratamientos quirúrgicos (osteotomía, artrodesis y artroplastia). La terapia farmacológica se basa únicamente en el manejo sintomático del dolor y la inflamación, por ejemplo antiinflamatorios no esteroideos (AINES), inhibidores de la ciclooxigenasa 2 (celecoxib), glucocorticoides y opioides [4]. Las terapias no farmacológicas comprenden el uso de glucosamina, condroitin sulfato, S-adenosilmetionina y ácido hialurónico, así como la reducción de peso y el ejercicio.

Dentro de la terapia no farmacológica, la terapia alternativa incluye la acupuntura, la termoterapia, la estimulación nerviosa-eléctrica y el uso de diferentes plantas medicinales como el aguacate, árnica, ciprés, eucalipto, pino, romero, sauce, tomillo, ajo, entre otras.

Particularmente *Arnica montana* (proveniente de Europa) perteneciente al género *Arnica* de la familia Asterácea, tiene una amplia tradición medicinal en forma de linimento en golpes, contusiones, torceduras, esguinces, traumatismos y procesos inflamatorios [57]. Se ha descrito que la helenalina compuesto presente en esta especie es el responsable de la actividad antiinflamatoria en afecciones reumáticas [57]. Adicionalmente, se sabe que el uso de geles de *A. montana* en articulaciones interfalángicas de pacientes con OA disminuye la intensidad del dolor y mejora la funcionalidad de la articulación [58]. *In vitro*, *Arnica montana* en tintura y gel sobre cultivo de condrocitos bovinos y humanos estimulados con 20 ng/ml de IL 1 β suprime la expresión del mRNA de MMP1 y MMP13, principales proteasas de la MEC en OA [59].

La especie de *Arnica mexicana* (*Heterotheca inuloides*), originaria de México, perteneciente al género *Heterotheca* igualmente de la familia Asterácea, es una especie que también se utiliza en infusiones aplicadas por vía tópica en traumatismos y problemas artríticos sugiriendo que las sustancias volátiles apolares y de bajo peso molecular (aceites esenciales) presentes en la planta, podrían atravesar fácilmente el estrato corneo de la piel.

Los aceites esenciales tienen propiedades de ser líquidos a temperatura ambiente, volátiles, incoloros, con una densidad inferior a la del agua, poseen un índice de refracción elevado, la mayoría desvían la luz polarizada, son liposolubles y solubles en los disolventes orgánicos habituales.

Aunque existen algunos reportes de la toxicidad de *A. mexicana* para sus componentes polares [60], la actividad biológica de los componentes apolares en procesos artríticos no ha sido estudiada hasta el momento.

2. JUSTIFICACION

La OA es la enfermedad articular crónico degenerativa más frecuente a nivel mundial y es el principal problema de discapacidad. Debido a que el tratamiento de la OA está limitado al alivio de los síntomas, la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas es necesaria. Dentro de la medicina tradicional mexicana, el uso de *A. mexicana* en el manejo de la OA ha proporcionado resultados sintomáticos satisfactorios, sin embargo, se desconocen los mecanismos de acción. Por otro lado, se sabe que la organización del citoesqueleto en condrocitos está asociada a modificaciones en la mecanotransducción, y las fuerzas de alto impacto sobre las articulaciones, (factor para el desarrollo de OA), alteran las proteínas del citoesqueleto. Por lo anterior, resulta de interés evaluar el efecto de *A. mexicana* sobre la organización de las proteínas de citoesqueleto en condrocitos, como parte de la investigación de los mecanismos moleculares de acción de esta especie en OA.

3. HIPÓTESIS

El aceite esencial de *Arnica mexicana* tiene efecto sobre los patrones de distribución de las proteínas del citoesqueleto en explantes de cartílago articular.

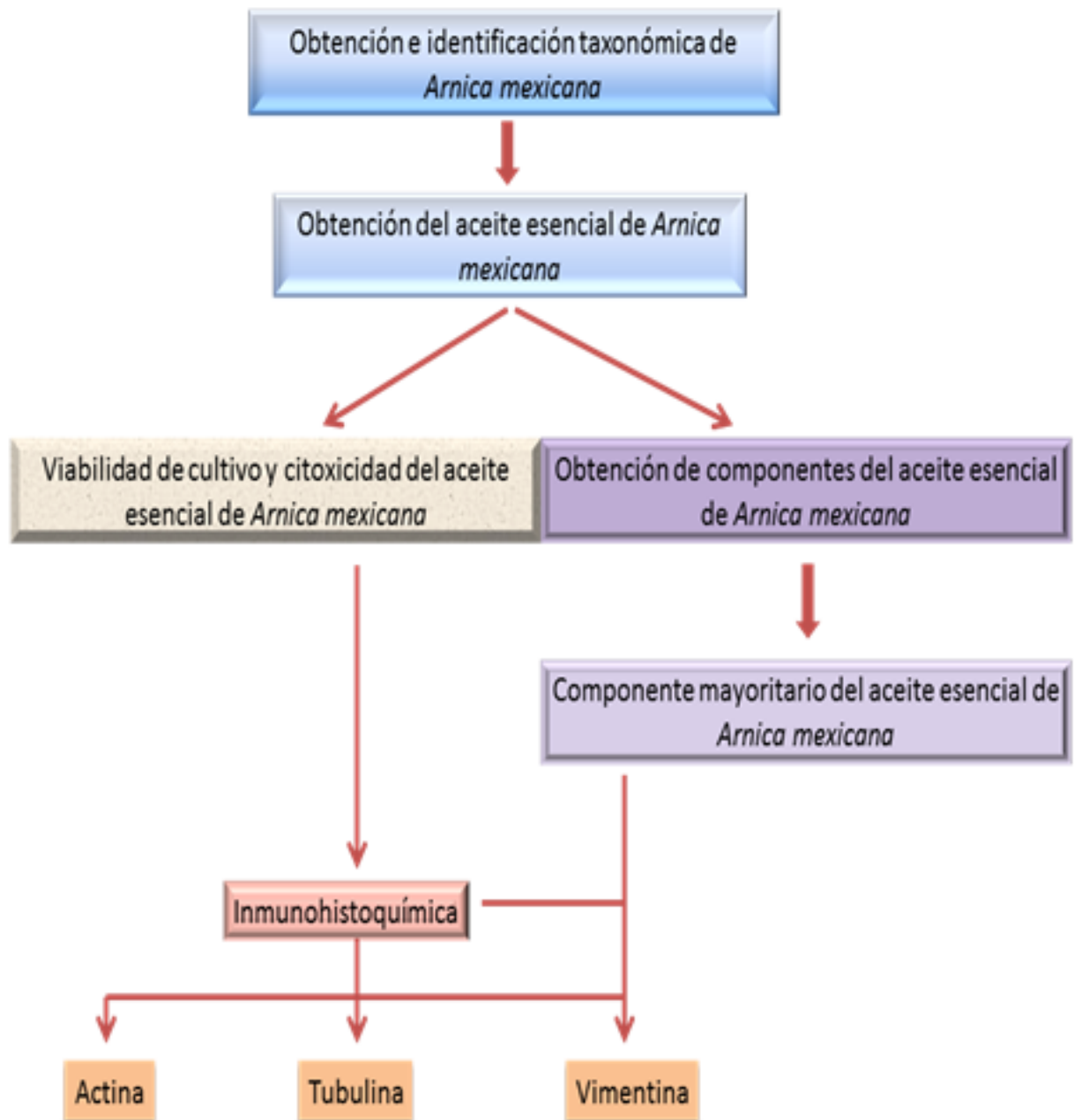
4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del aceite esencial de *Arnica mexicana* sobre los patrones de distribución de las proteínas del citoesqueleto en condrocitos.

4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Obtener y caracterizar químicamente el aceite esencial de *Arnica mexicana*.
2. Evaluar el efecto del aceite esencial de *Arnica mexicana* sobre la inmunoreactividad de proteínas del citoesqueleto (actina, tubulina y vimentina) en explantes de cartílago articular mediante microscopia láser confocal.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6. MATERIAL Y METODOS

6.1 Material vegetal

A. mexicana se adquirió en la central de abastos de la Ciudad de México, en los meses de Junio- Julio del 2010. Después de la limpieza se seleccionó la parte aérea (flores y hojas) para obtener 7 Kg del material vegetal. Para la identificación taxonómica se tomaron cuatro ejemplares limpios, secos y prensados en papel, que se depositaron en el Herbario Medicinal del IMSS-Centro Médico Nacional Siglo XXI, con número de registro: 15791

6.2 Obtención del aceite esencial de *A. mexicana*

Siete kilogramos de la parte aérea de *A. mexicana* se molieron y se mezclaron con agua. Mediante hidrodestilación al vacío se obtuvieron 1.2 mL de aceite esencial con una densidad de 0.9 g/mL. El aceite esencial se almacenó a -20°C para los posteriores ensayos.

6.3 Caracterización química del aceite esencial de *A. mexicana*.

La identificación de los principales componentes del aceite esencial de *A. mexicana* (AEAM) se realizó en un Cromatógrafo de Gases Hewlett Packard HP (Palo Alto, California, E.U.) serie II, 5890 acoplado a un Espectrómetro de Masas de flujo de electrones Hewlett Packard modelo 5972. Se utilizó 1 µL del aceite esencial diluido en 49 µl de diclorometano para su posterior inyección en el cromatógrafo, se utilizó una columna capilar HP- FFAP (Free Fatty Acids Phase) # 19091F-112 de 25 m de longitud y espesor de película de 0.52 mm, apolar y con intervalo de temperatura de 60-240 °C, el radio de la columna fue de 150:0.32 mm.

6.4 Obtención del cartílago articular

Los explantes de cartílago articular se obtuvieron de acuerdo a los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-069-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Se utilizaron ratas Wistar machos adultos con peso de 130-150 g, se sacrificaron en

cámara de CO₂ y previa asepsia y antisepsia de la región, se disecaron las articulaciones de rodilla y cadera. Posteriormente, en condiciones de esterilidad se obtuvo el cartílago articular de la cabeza, cóndilos femorales, y platillos tibiales, cuidando de no lesionar vasos sanguíneos y evitar contaminación. Una vez removidas las muestras, se lavaron en PBS estéril y se estabilizaron en medio de cultivo completo (DMEM [Dubelco's Modified Eagle Medium, Gibco] + F12 [Nutrient mixture]), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Invitrogen) y 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco) y se mantuvieron en incubación durante 48 h, a temperatura de 37°C, en condiciones de humedad constante (CO₂/95%). Entonces, los explantes se colocaron en medio basal (DMEM + F12 suplementado con 1% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina/estreptomicina), y se iniciaron los tratamientos correspondientes.

6.5 Ensayos de viabilidad

La viabilidad de los condrocitos de los explantes (previa a los tratamientos con AEAM y posterior a cada uno de los mismos) se evaluó mediante el kit Cyto Tox96® (Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega), que consiste en una técnica colorimétrica no radioactiva que mide cuantitativamente la liberación de la enzima citosólica deshidrogenasa láctica (DHL), la cual es liberada al medio de cultivo en condiciones de lisis celular. La liberación de DHL convierte las sales de tetrazolio en rojo formazan, cuya absorbancia es analizada a una longitud de onda de 490 nm.

La proporción de células viables se determinó cuantificando la liberación de DHL en el medio de cultivo de los explantes de cartílago incubados por 48 y 96 h en placas de 96 pozos, utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ citotoxicidad} = \frac{\text{Liberación de DHL problema} - \text{Liberación de DHL medio de cultivo}}{\text{Liberación de DHL máxima} - \text{Liberación de DHL medio de cultivo}} \times 100$$

6.6 Tratamiento de los explantes de cartílago articular con AEAM

Previa estabilización y con una viabilidad mínima de 90%, se colocaron 30 mg de explantes de cartílago articular por pozo en medio basal, y se dividieron de acuerdo a los siguientes grupos:

- | | | |
|------------------|---|---|
| Problemas | } | 1. AEAM a concentraciones de 10, 20, 30 $\mu\text{g/mL}$ |
| | | 2. Alcanfor <i>S</i> y <i>R</i> (Sigma-Aldrich) a concentraciones de 2.8 y 8.4 $\mu\text{g/mL}$ en DMSO al 0.1% |
| | | 3. Acrilamida 40 mM |
| | | 4. Celecoxib (principal AINE utilizado en el tratamiento de la OA) 30 $\mu\text{g/mL}$ en DMSO al 0.1% |
| Controles | } | 5. AEAM (10, 20 y 30 $\mu\text{g/mL}$) / Acrilamida (40 mM) |
| | | 6. Alcanfor (<i>R</i>) (2.8 y 8.4 $\mu\text{g/mL}$) / Acrilamida (40 mM) |
| | | 7. Alcanfor (<i>S</i>) (2.8 y 8.4 $\mu\text{g/mL}$) / Acrilamida (40 mM) |
| | | 8. Celecoxib (30 $\mu\text{g/mL}$) / Acrilamida (40 mM) |

Los explantes en cada uno de los ensayos se incubaron durante 144 h con recambios de medio basal cada 48 h y se realizaron por triplicado.

Con la finalidad de descartar una posible interacción entre el AEAM y la acrilamida, se realizaron dos ensayos en los cuales 30 mg de explante se incubaron a diferentes tiempo de exposición con AEAM y a las 48 h se adicionó acrilamida 40mM y viceversa.

6.7 Ensayos de inmunohistofluorescencia

Las alteraciones en los patrones de distribución de las proteínas del citoesqueleto se evaluaron mediante ensayos de inmunohistofluorescencia, los cuales se basan en la unión específica de los antígenos a anticuerpos acoplados a un fluoróforo y fueron visualizados mediante análisis de microscopía láser confocal.

Los explantes de cartílago articular tratados se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% PBS y se mantuvieron a 4°C hasta ser utilizados. Previa inmersión en sacarosa al 10% durante toda la noche (como crioprotección), se realizaron cortes de 5 µm de espesor (SM2000 R Sliding Microtome, Leica, Heidelberg, Germany), se colocaron en portaobjetos previamente gelatinizados y se almacenaron a -20°C.

Previo a los ensayos de inmunohistofluorescencia, los explantes se trataron con cloruro de amonio (50 mM) por 10 minutos y ácido clorhídrico (1M) por 2 horas con la finalidad de eliminar el RNA citoplasmático.

Posteriormente, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta, para los cuales los cortes se hidrataron en PBS, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.2%, y se incubaron con albumina bovina libre de IgG (A2058, Sigma-Aldrich) durante 20 minutos para bloquear el marcaje inespecífico. Entonces, se incubaron con anticuerpos primarios específicos para vimentina (sc-7558, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) y β-tubulina (sc-9935, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) en forma independiente, por 1 h a temperatura ambiente y a una dilución de 1:50. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario (305-095-003, Jackson ImmunoResearch) acoplado a FITC (isotiocianato de fluoresceína) por 2 h, protegidos de la luz y en cámara húmeda.

Otros ensayos incluyeron inmunofluorescencia directa, en los cuales, las criosecciones se incubaron con faloidina (sc-202763, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) durante 40 min a una dilución de 1:150.

Los núcleos en todas las muestras se contratiñeron con ioduro de propidio (25535-16-4, Sigma-Aldrich) a una dilución de 1:500 por 5 min, se cubrieron con medio de montaje Vectashield (H-1000, Vector-laboratories) y se sellaron con barniz de uñas para su posterior análisis microscópico. Como controles positivos y negativos se utilizaron cortes de hígado, con omisión del anticuerpo primario e incubación con el anticuerpo secundario a las mismas diluciones.

6.8 Microscopía láser confocal

Las muestras se analizaron en un microscopio láser confocal (Confocal Laser Scanning Microscopy, LSM 710, Carl Zeiss, Germany) que se encuentra en el Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías del Instituto Politécnico Nacional. Las condiciones para la obtención de las imágenes fueron: Modo Best Signal, Modo de escaneo Plane (2D), objetivo Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27, Pinhole de 48 μm , láser Track 1, 488 nm al 3% de poder y Track 2, 514 nm al 2% de poder, filtros 493-523 nm.

6.9 Métodos estadísticos

Para los ensayos de viabilidad los datos fueron expresados como la media \pm el error estándar. La verificación de las diferencias significativas entre las concentraciones se determinó utilizando el análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba de Tukey ($P < 0.05$). La verificación de las diferencias entre los tratamientos con respecto al tiempo, se determinó utilizando el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías y la prueba de Bonferroni ($P < 0.05$).

7. RESULTADOS

7.1 Identificación y caracterización química del aceite esencial de *A. mexicana*

Después de la identificación taxonómica de *A. mexicana* como *Heterotheca inuloides*, se depositaron dos ejemplares en el Herbario Medicinal del IMSS- Siglo XXI con el número de registro 15791. La identificación taxonómica fue realizada por la Maestra en Ciencias Abigail Aguilar Contreras.

Siete kilogramos de la parte aérea de *A. mexicana* se sometieron a hidrodestilación al vacío dando como resultado 1.2 ml de aceite esencial. La densidad del AEAM se determinó con el método del picnómetro y fue de 0.9 g/ml. El aceite se almacenó a -20°C para los posteriores ensayos. En la Figura 10 se muestran el cromatograma obtenido para el AEAM y en la Tabla 2, la identificación de los compuestos correspondientes a cada pico del cromatograma.

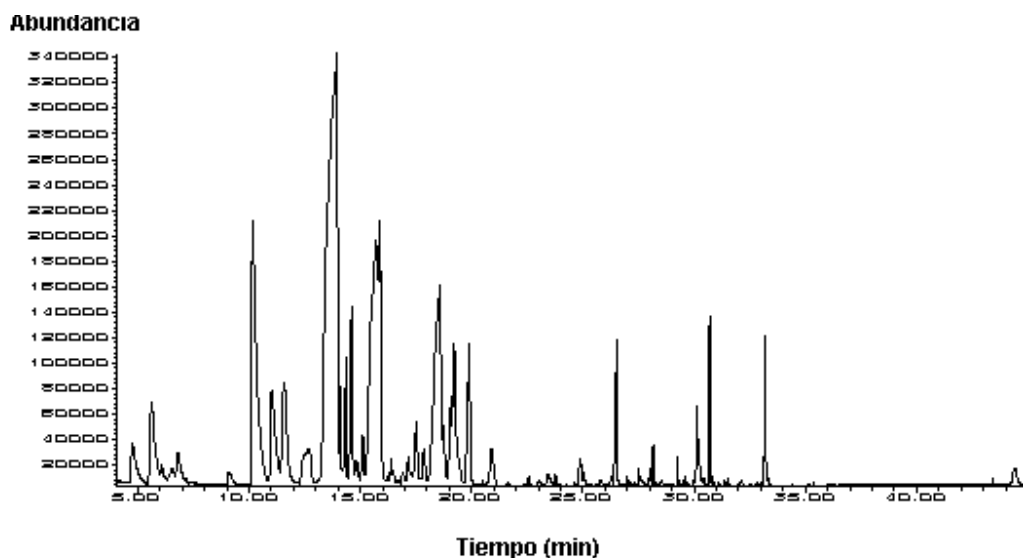


Figura 10. Cromatograma para el aceite esencial de *A. mexicana*.

Tabla 2. Composición química del aceite esencial de *A. mexicana*.

Compuesto	Tiempo de retención	Abundancia* (%)	PM
β-Mirceno	4.77	1.27	136
Eucaliptol	5.64	2.45	154
1-Hexanol	10.17	8.31	102
3-Hexen-1-ol	11.03	2.91	100
Tujona	11.6	3.31	152
Terpineol	12.7	1.91	154
Alcanfor	13.94	27.73	152
Compuesto no identificado	14.35	1.32	?
Terpineol	14.61	2.41	154
4-Terpineol	15.71	11.45	154
Cariofileno	15.88	4.39	204
1-Metoxi-4-(2-propenil),benzeno	17.52	1.18	148
Germacreno	18.57	8.09	204
α-Cariofileno	19.08	1.28	204
α-Farneseno	19.21	3.1	204
Naftaleno	19.89	2.5	204
Óxido de cariofileno	26.52	1.7	220
Cadalina	30.7	1.26	198
Compuesto no identificado	33.19	1.22	?
Total Hidrocarburos	de	11.22	
Total Monoterpenos oxigenados	de	54.92	
Total Sesquiterpenos hidrocarbonados	de	9.32	
Total Sesquiterpenos oxigenados	de	6.06	
Compuestos Aromáticos		3.65	
Total		85.2	

*Compuestos con abundancia mayor al 1%

El AEAM contiene por lo menos 62 compuestos, de los cuales 19 tienen una abundancia mayor al 1% y suman el 85.2% del total. De estos 19 compuestos, los monoterpenos oxigenados son el grupo más abundante sumando un 54.9 % del total. En proporción decreciente se encontraron los hidrocarburos tipo alcohol con una contribución del 11.2%, los sesquiterpenos no oxigenados con un 9.3%, los sesquiterpenos oxigenados con un 6% y por último los compuestos aromáticos con una contribución del 3.7%. Los cuatro compuestos mayoritarios en el AEAM en orden decreciente son: el alcanfor en un 27.7 %, el 4-terpineol en un 11.4 %, el 1-Hexanol en un 8.3% y el germacreno en un 8 % (Figura 11), los cuales suman el 55.4% de la composición total.

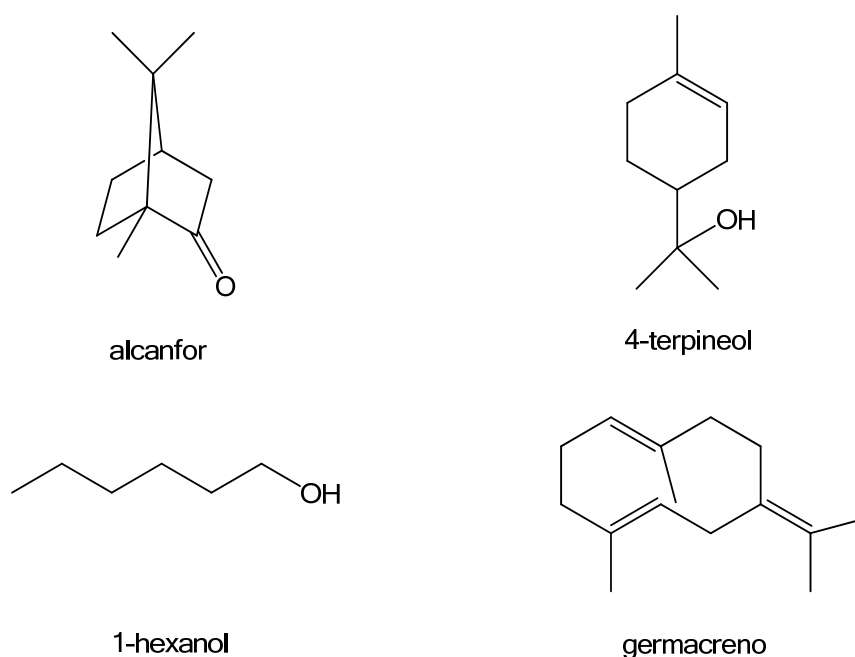


Figura 11. Representaciones moleculares de los cinco compuestos más abundantes en el AEAM.

7.2 Efecto del AEAM sobre la viabilidad en condrocitos

Los efectos del AEAM sobre la viabilidad de los condrocitos en cultivos de explantes de cartílago articular fue evaluada por la actividad de la LDH en el medio de cultivo. Los condrocitos estimulados con AEAM a concentraciones de 10, 20, 30, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en base al análisis de ANOVA una vía/Tuckey ($P < 0.05$) sólo muestran diferencia significativa entre el control normal y la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para los tiempos analizados. Por otro lado no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos por 48 y 96 h según la prueba estadística ANOVA dos vías/Bonferroni ($P < 0.05$) (Figura 12).

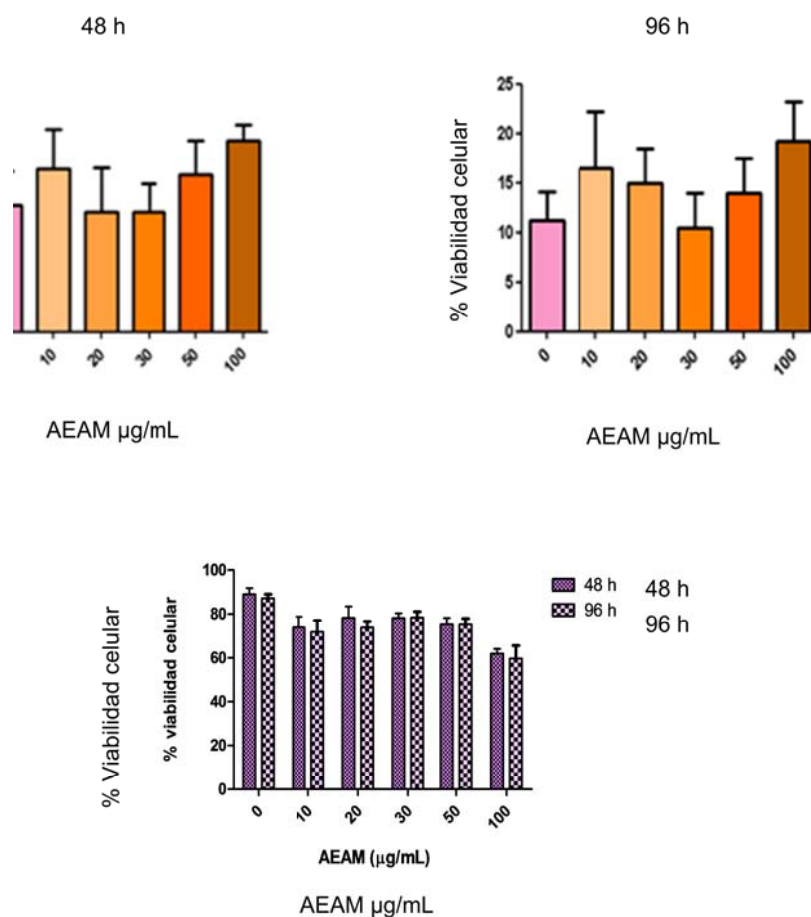


Figura 12. Porcentaje de viabilidad celular del AEAM a concentraciones de 10-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre condrocitos comparado con control normal a las 48 y 96 h de exposición.

7.3 Efecto del AEAM sobre proteínas del citoesqueleto

El efecto del AEAM sobre los patrones de distribución de las proteínas del citoesqueleto en condrocitos se evaluó mediante inmunofluorescencia y microscopia láser confocal en criosecciones de explantes de cartílago.

La organización de los filamentos de actina en condrocitos de explantes de cartílago normal se distribuyó predominantemente en la porción cortical delimitando el borde celular (Figura 13 C-E). La exposición de los explantes a acrilamida modificó la organización de la actina, mostrando condensación de la marca e inmunolocalización paranuclear (Figura 13 F-H). Comparativamente, en las muestras tratadas con AEAM y acrilamida simultáneamente, no se observaron cambios en el patrón de distribución de la actina, conservando una disposición similar a la referida en condrocitos normales (Figura 13 I-N). Por otra parte, la apariencia de la actina en muestras de cartílago control tratadas únicamente con AEAM (10, 20 y 30 $\mu\text{g/ml}$) no se modificó (Figura 13 O-T). Como control, los cortes de parénquima hepático mostraron inmunomarcaje de actina en un patrón difuso en todo el citoplasma de los hepatocitos (Figura 13 A-B).

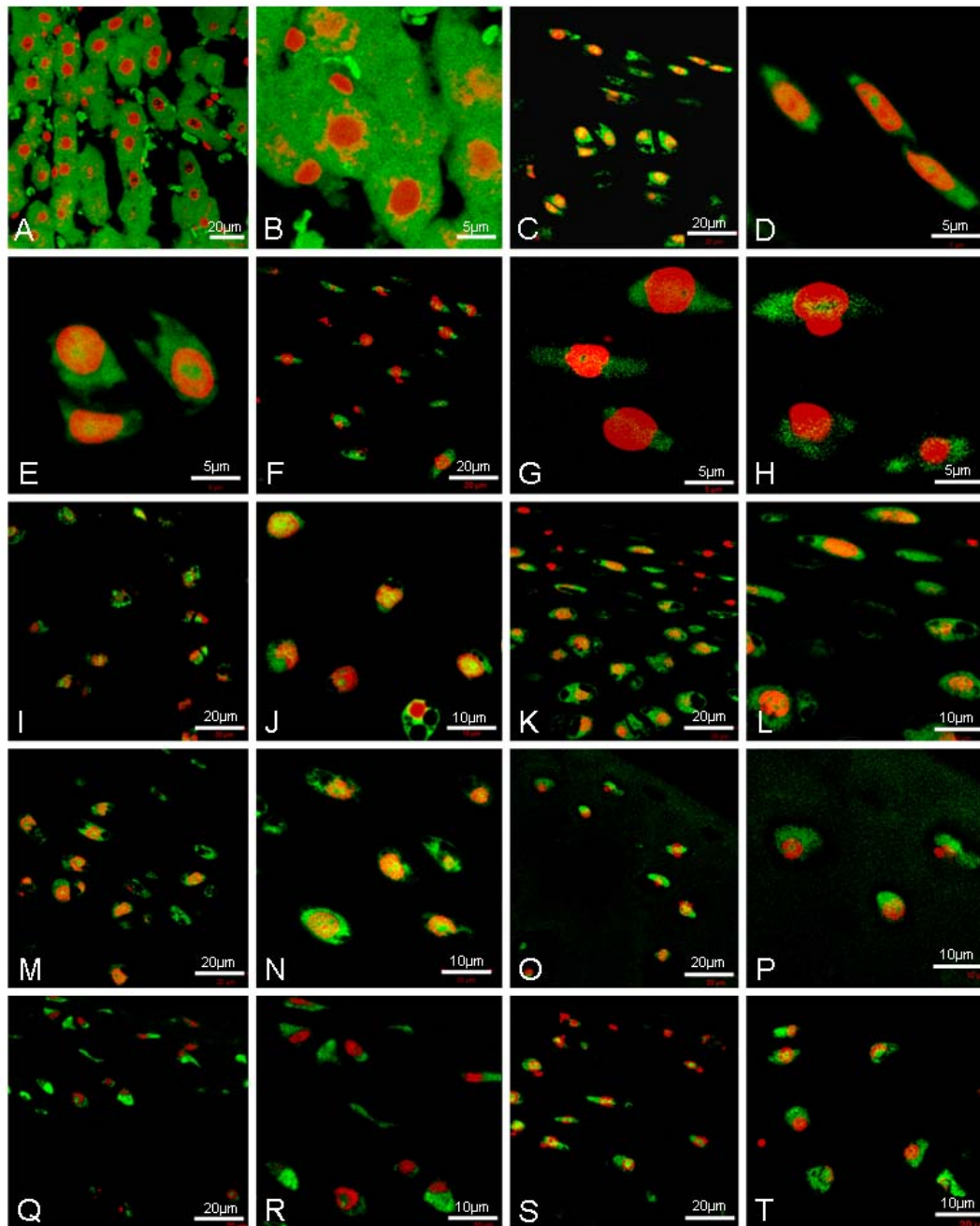


Figura 13. INMUNOREACTIVIDAD DE MICROFILAMENTOS DE ACTINA. A-B Control positivo (hígado); C-E cartílago articular normal; F-H acrilamida (40 Mm); I-J AEAM (10 µg/mL); K-L AEAM (20 µg/mL); M-N AEAM (30 µg/mL); O-P AEAM (10 µg/mL) y acrilamida (40 mM); Q-R AEAM (20 µg/mL) y acrilamida (40 mM); S-T AEAM (30 µg/mL) y acrilamida (40 mM).

La inmunoreactividad de los microtúbulos en condrocitos de cartílago articular normal se observó con un patrón punteado distribuido en todo el citoplasma y formando compartimientos (Figura 14 C-E). En contraste, los microtúbulos de explantes tratados con acrilamida mostraron condensación y pérdida de la compartimentalización, con un patrón granular, fino y difuso (Figura 14 F-H). Mientras que los microtúbulos en explantes expuestos a la combinación de AEAM (10, 20 y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y acrilamida (40mM) muestran una apariencia similar a las células normales con un patrón punteado difuso (Figura 14 I-N). Como controles, la inmunodetección de los microtúbulos en explantes tratados con el AEAM sin acrilamida no mostró cambios en la distribución normal de la proteína (Figura 14 O-T). La inmunoreactividad de los microtúbulos en hepatocitos control se observó difusamente en todo el citoplasma (Figura 14 A-B).

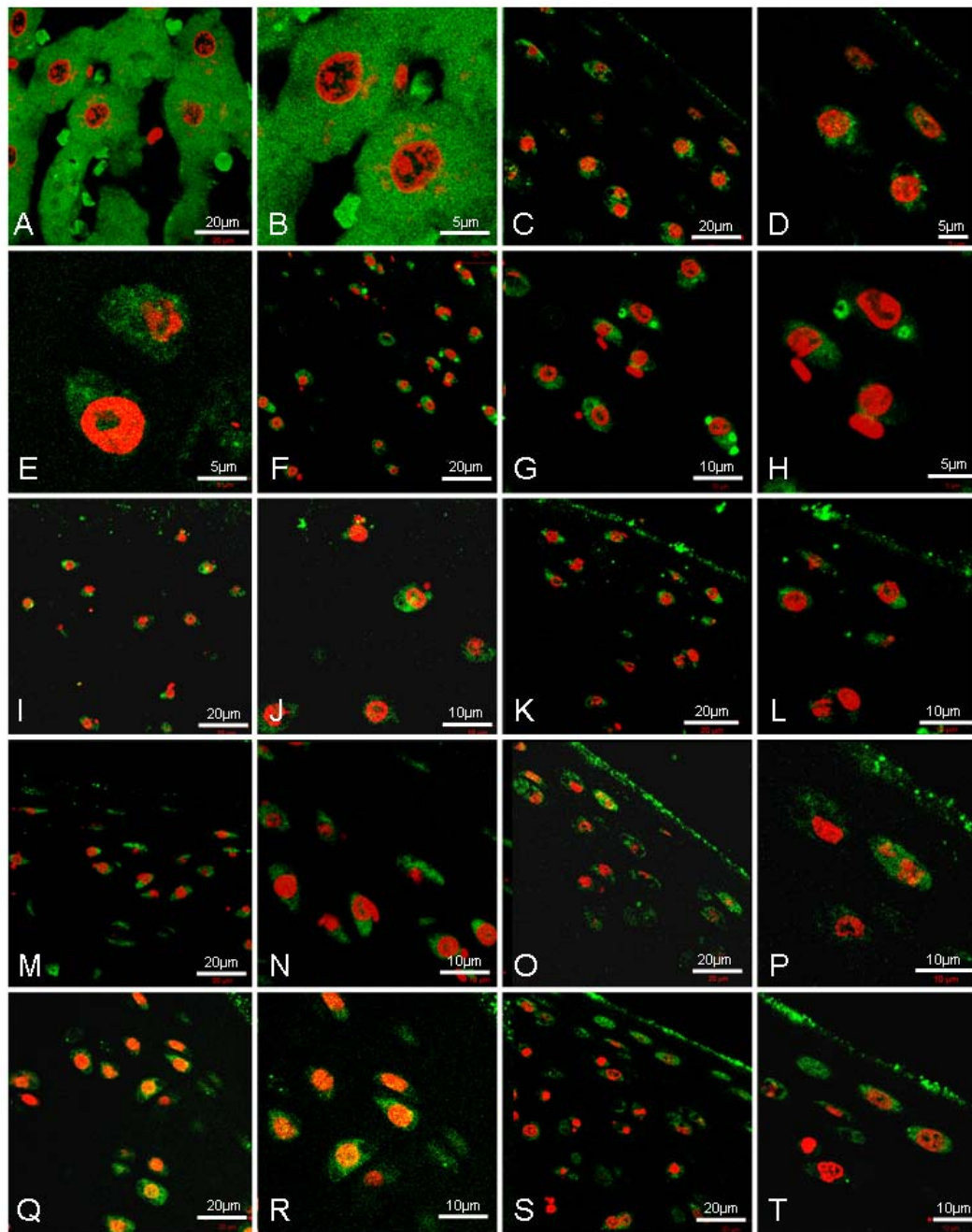


Figura 14. INMUNOREATIVIDAD DE MICROTUBULOS DE TUBULINA. A-B control positivo (hígado); **C-E** cartílago articular normal; **F-H** acrilamida (40 mM); **I-J** AEAM (10 µg/mL) y acrilamida (40 mM); **K-L** AEAM (20 µg/mL) y acrilamida (40 mM); **M-N** AEAM (30 µg/mL) y acrilamida (40 mM); **O-P** AEAM (10 µg/mL); **Q-R** AEAM (20 µg/mL); **S-T** AEAM (30 µg/mL).

Los filamentos intermedios de vimentina en las secciones de cartílago normal se confinaron a la región paranuclear con un patrón moteado (Figura 15 C-E). El cartílago tratado con 40 mM de acrilamida, mostró desensamble de los filamentos de vimentina, colapso y redistribución desde la periferia celular al núcleo (Figura 15 F-H). En contraste, el tratamiento con AEAM y acrilamida no afectó la organización de la red de filamentos, la cual mostró una disposición similar a la observada en el cartílago no tratado (Figura 15 I-N). Análogamente, los cortes de cartílago control tratados con AEAM únicamente conservaron la inmunolocalización de la proteína (Figura 15 O-T). Secciones de parénquima hepático como control mostraron inmunoreactividad para vimentina difusa y ampliamente distribuida en el citoplasma de los hepatocitos (Figura 15 A-B).

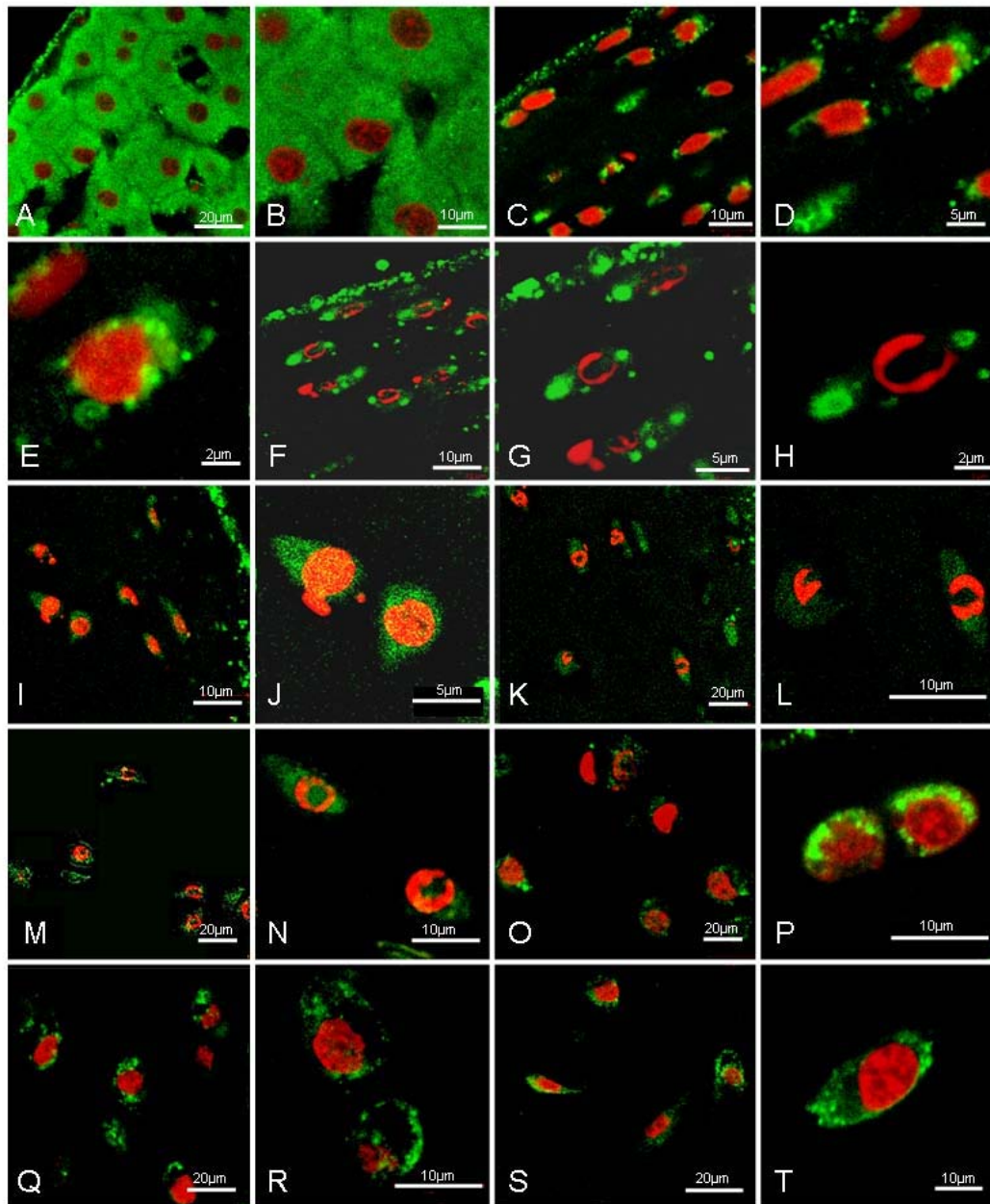


Figura 15. INMUNOREACTIVIDAD DE FILAMENTOS INTERMEDIOS DE VIMENTINA. A-B control positivo (hígado); C-E cartílago articular normal; F-H acrilamida (40 mM); I-J AEAM (10 µg/mL) y acrilamida (40 mM); K-L AEAM (20 µg/mL) y acrilamida (40 mM); M-N AEAM (30 µg/mL) y acrilamida (40 mM); O-P AEAM (10 µg/mL); Q-R AEAM (20 µg/mL); S-T AEAM (30 µg/mL).

7.4 Efecto de los monoterpenos sobre filamentos intermedios de vimentina de condrocitos.

Dado que el alcanfor fue el compuesto mayoritario obtenido de la caracterización del extracto de AM, decidimos evaluar el efecto de los enantiómeros S y R de alcanfor sobre los filamentos intermedios de vimentina en los explantes de cartílago. Interesantemente, los condrocitos de las muestras tratadas con los enantiómeros S o R y acrilamida, no mostraron modificaciones en la organización de la red de filamentos de vimentina, y las células conservaron el patrón de inmunomarcaje de la proteína similar a los condrocitos normales (Figura 16 A-C y G-I). Asimismo, el uso de cualquiera de los enantiómeros sin combinación con la acrilamida, no indujo cambios en la disposición ni la organización de la vimentina (Figura 16 D-F y J-L). Como control, utilizamos el compuesto celecoxib (ampliamente usado en el manejo de la OA) en combinación con acrilamida, observándose mantenimiento del fenotipo de los filamentos intermedios de vimentina (Figura 16 M-O).

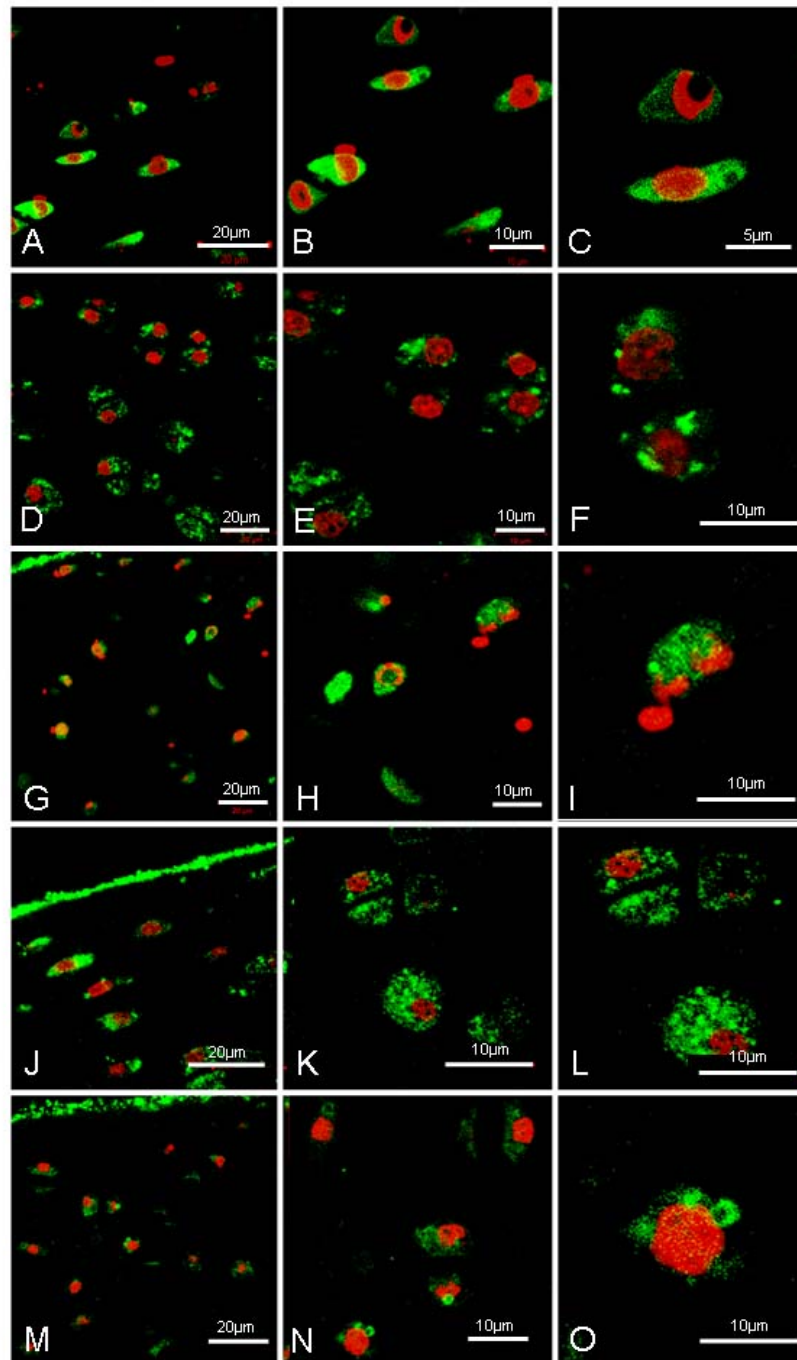


Figura 16. Efecto del alcanfor y celecoxib en los filamentos intermedios de vimentina en condrocitos. A-C Alcanfor (S) (30 µg/mL) y acrilamida (40mM); D-F Alcanfor (S) (30 µg/mL); G-I Alcanfor (R) (30 µg/ml) y acrilamida (40Mm); J-L Alcanfor (R) (30 µg/ml); M-O celecoxib (30 µg/mL) y acrilamida (40mM).

7.5 Interacción de AEAM y acrilamida

Finalmente, los explantes de cartílago expuestos inicialmente a acrilamida durante 48 h, y posteriormente a AEAM por 72 h no mostraron cambios fenotípicos del patrón de inmunoreactividad de la vimentina (Figura 17 G-I). Este resultado fue similar a lo observado en explantes tratados con acrilamida sin aceite esencial durante 48 h y sin exposición al compuesto por las siguientes 48 h (Figura 17 A-C). Contrariamente, los condrocitos expuestos inicialmente a AEAM por 48 h y posteriormente a acrilamida mostraron reorganización de los filamentos intermedios de vimentina y condensación de la marca (Figura 17 D-F).

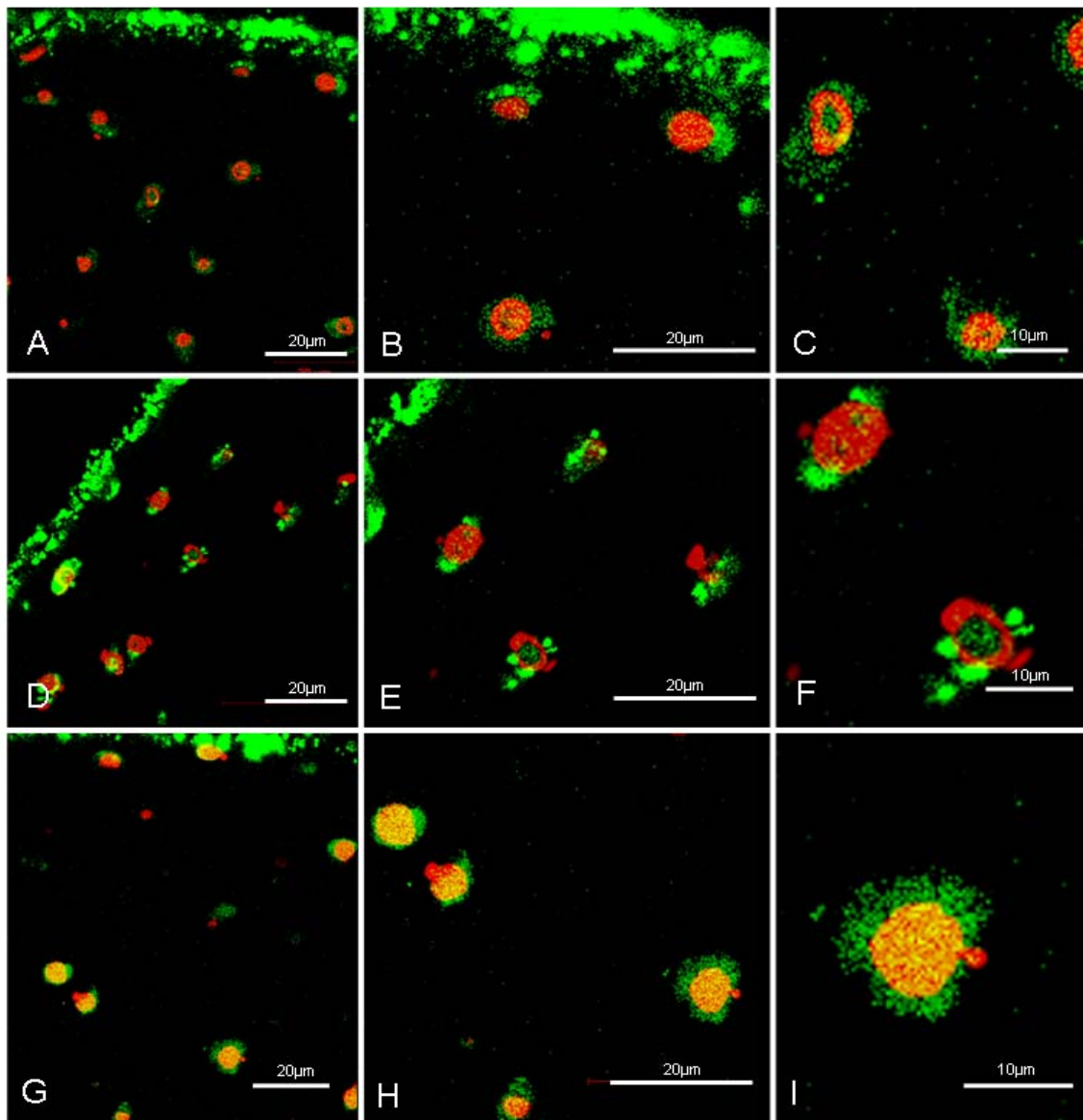


Figura 17. Interacción de acrilamida y AEAM sobre los filamentos intermedios de vimentina. A-C Acrilamida (40mM); **D-F** AEAM (30 µg/ml) por 48 h más acrilamida (40 mM) por 48 h más. **G-I** Acrilamida (40 mM) por 48 h y AEAM (30 µg/ml) por 72 h más.

8. DISCUSION

La parte aérea (hojas y flores) de *A. mexicana* (*Heterotheca inuloides*) ha sido ampliamente utilizada en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y afecciones reumáticas debido a sus propiedades anti-inflamatorias y analgésicas [61-63]. A pesar de su uso popular, hasta el momento, no hay evidencia científica sobre los mecanismos de acción de *A. mexicana* en afecciones reumáticas inflamatorias, lo que hace de este tema, un área de interés. Aunque la OA no es una artropatía inflamatoria clásica, frecuentemente está asociada con dolor en articulaciones, inflamación, rigidez e incapacidad de movimientos [64]. Este trastorno se caracteriza por la degeneración progresiva del cartilago articular, sinovitis limitada, cambios en el tejido periarticular y la exposición del hueso subcondral [65]. En OA se describe un desequilibrio entre los eventos catabólicos y anabólicos que culminan en pérdida de la MEC. Se sabe además que el metabolismo del condrocito (único componente celular del cartilago articular) está influido por la morfología y la organización del citoesqueleto [66]. Así, como parte de la investigación completa de los mecanismos de acción de *A. mexicana* en OA, en este trabajo se evaluó el efecto del AEAM sobre la organización del citoesqueleto en condrocitos.

Debido a que en la medicina tradicional, *A. mexicana* ha sido utilizada tópicamente en el dolor articular con resultados de mejoría sintomática, se sugiere que las propiedades farmacéuticas de esta especie pueden atribuirse a sus compuestos volátiles (aceite esencial) que por ser apolares y de bajo peso molecular puedan permear con facilidad a través de la piel [60]. Los aceites esenciales son mezclas de compuestos biosintetizados por las plantas que dan el aroma característico a las especies vegetales y a ciertos extractos de origen animal. Estos compuestos se caracterizan por ser volátiles, apolares y de bajo peso molecular. Los compuestos que forman la parte principal de los aceites esenciales son específicamente de tipo terpeno, formados por unidades de isopreno unidas en estructuras de 10 carbonos (monoterpenos) y 15 carbonos (sesquiterpenos) (Figura 18). En menor cantidad se encuentran compuestos de bajo peso molecular

como hidrocarburos con funcionalidad tipo cetona, aldehído, alcohol, etc. y compuestos aromáticos.

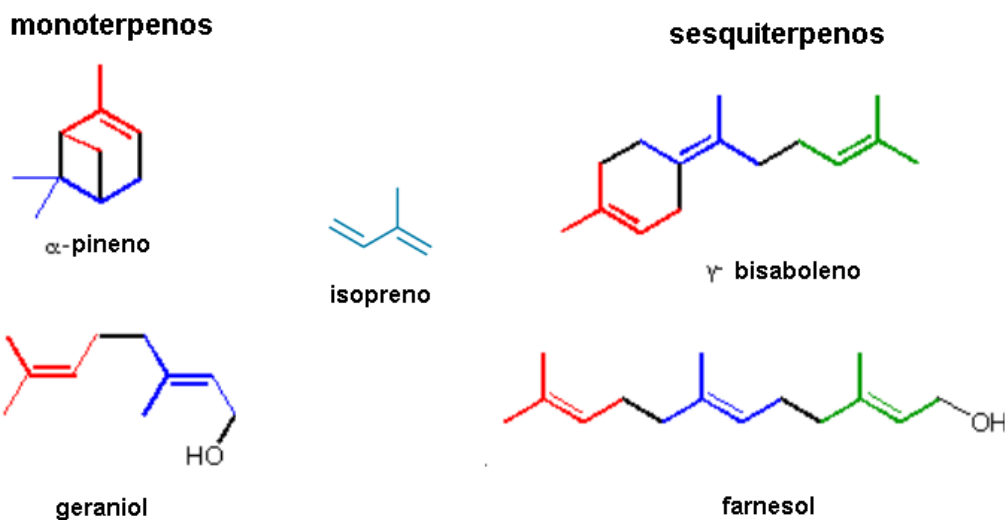


Figura 18. Estructuras químicas de terpenos. En color se marcan las unidades de isopreno.

Un total de 62 compuestos fueron observados en el AEAM, sin embargo para la discusión sólo se tomaron en cuenta aquellos que presentaron una abundancia mayor del 1%, éstos suman el 85.2 % del total.

La caracterización química del AEAM fue comparada con una identificación realizada previamente para el aceite esencial de las hojas de *A. mexicana* [70], de dicha comparación puede resaltarse dos puntos principales: La naturaleza química de la mayoría de los compuestos es similar, sin embargo existen diferencias entre sus abundancias y el alcanfor fue el compuesto mayoritario en este estudio, siendo este uno de los cinco compuestos más abundantes previamente identificados. Con el objetivo de dar una idea de los compuestos identificados en estudios previos, en la Tabla 3 se muestra una comparación de los cinco compuestos más abundantes en ambas caracterizaciones.

La variabilidad en la abundancia de los compuestos químicos entre ambos estudios, puede explicarse en términos de que la composición química de un aceite esencial puede variar de acuerdo al clima, composición de la tierra, órgano de la planta, edad y ciclo vegetativo [67-69].

Tabla 3. Comparación de la caracterización química del AEAM de este trabajo y la reportada en la literatura [70].

Compuesto	Abundancia (%)	
	En este trabajo	Descrita
Alcanfor	27.73	5.58
4-Terpineol	11.45	1.60
1-Hexanol	8.31	-
Germacreno	8.09	4.10
Cariofileno	4.39	3.10
A-cubebeno	<1	22.50
Borneol	<1	8.80
Epoxido de cariofileno	1.70	6.58
Mirceno	1.27	6.61
Alcanfor	27.73	5.58

8.1 Efecto del AEAM sobre la viabilidad en condrocitos

El ensayo de viabilidad empleando la evaluación de la enzima LDH en el medio de cultivo, demostró mediante análisis estadístico que el AEAM a concentraciones de 10-50 µg/ml no es citotóxico para las condrocitos a los tiempos de 48 y 96 h. De estos resultados se decidió utilizar las tres primeras concentraciones no citotóxicas para los ensayos posteriores.

8.2 Efecto del AEAM sobre el citoesqueleto

El citoesqueleto de los condrocitos comprende una red de microfilamentos de actina, microtúbulos de tubulina y filamentos intermedios de vimentina [50]. Cada componente tiene una distribución y una participación específica dentro del condrocito, además de interactuar con elementos de la MEC en respuesta a procesos de mecanotransducción y mantenimiento de la homeostasis.

La acrilamida es un compuesto ampliamente utilizado para inducir el desensamble de los filamentos intermedios de vimentina; en condrocitos articulares, está descrito que provoca disrupción y pérdida de la organización de la red de los filamentos. Los cambios de reorganización de la vimentina generalmente son observados en condrocitos después de las 24h de exposición, con un pico entre los 3 y 7 días [27].

Aun cuando está reportado que la acrilamida no induce cambios sobre actina y tubulina en condrocitos [26], nuestros resultados mostraron cambios en el patrón de inmunolocalización de las proteínas actina, tubulina y vimentina bajo el efecto de este compuesto. El efecto de la acrilamida mostró condensación de la actina, contracción y pérdida de la compartimentalización de la tubulina, colapso y redistribución de los filamentos intermedios de vimentina.

Interesantemente, el tratamiento simultáneo de AEAM y acrilamida no indujo modificaciones en la distribución de la vimentina, y el patrón de inmunolocalización de la proteína en los condrocitos fue similar al de las células no tratadas. De acuerdo a estos resultados, se plantearon dos posibilidades:

1. El AEAM podría tener un papel condroprotector que proteja la organización de la red de filamentos intermedios de vimentina, o bien
2. La interacción entre el AEAM y la acrilamida podrían bloquear la disrupción de la red de filamentos de vimentina.

Al respecto, los explantes expuestos inicialmente a AEAM y posteriormente a acrilamida, mostraron colapso y redistribución de los filamentos de vimentina, con

un patrón de inmunoreactividad similar al observado con el uso de acrilamida solamente. Lo cual, sugirió que el AEAM no tuvo efecto condroprotector preventivo y por lo tanto la acrilamida indujo el desensamblaje de la vimentina después de las 24 h de exposición. Por el contrario, los explantes tratados inicialmente con acrilamida durante 48 h y posteriormente con AEAM mostraron una distribución del inmunomarcado de la proteína similar al observado en condrocitos no tratados. De acuerdo a estos resultados, es posible que el efecto del AEAM sobre el citoesqueleto de vimentina promueva la reorganización de vimentina posterior al desensamblaje provocado por la acrilamida y que no se deba a la interacción con este compuesto.

Por otra parte, los resultados de la caracterización del AEAM mostraron que el componente mayoritario fue el alcanfor; por lo tanto, es probable que el efecto observado en los ensayos de inmunohistofluorescencia, pudiera deberse a este compuesto. Es bien conocido que el alcanfor consta de dos enantiómeros (S y R), surge por lo tanto el planteamiento de que el efecto del compuesto pudiera deberse a uno u otro isómero.

La inmunodetección independiente con cada uno de estos enantiómeros en explantes de cartílago no mostró diferencias sobre la apariencia de la vimentina, sin embargo, en ambos casos el patrón de inmunomarcado fue similar al observado con el tratamiento de AEAM.

Aun cuando son necesarios otros estudios que permitan comprobar estos resultados, estas aseveraciones plantean diversas perspectivas que podrían dilucidar los posibles efectos del AEAM como tratamiento en la OA.

9 CONCLUSIONES

- El alcanfor es el compuesto mayoritario encontrado en el AEAM.
- Las concentraciones de 10-30 $\mu\text{g/ml}$ de AEAM no son citotóxicas a las 48 y 96 h en cultivos primarios de condrocitos.
- La acrilamida induce cambios en los patrones de inmunoreactividad de las proteínas del citoesqueleto (actina, tubulina y vimentina) en condrocitos de explantes de cartílago articular.
- El AEAM no tiene efecto protector sobre la organización de las proteínas del citoesqueleto en condrocitos cuando se induce disgregación con acrilamida.
- El AEAM promueve posiblemente la reorganización de los filamentos intermedios de vimentina en condrocitos expuestos a acrilamida.
- El efecto del AEAM sobre el citoesqueleto en explantes de cartílago articular podría atribuirse al alcanfor.

10 PERSPECTIVAS

- Confirmar por la técnica de tinción negativa por microscopía electrónica, la actividad observada en este trabajo del el aceite esencial de *A. mexicana* sobre los filamentos intermedios de vimentina en condrocitos.
- Determinar mediante ensayos de Western Blot, la actividad observada en este trabajo del aceite esencial de *A. mexicana* sobre los filamentos intermedios de vimentina, en condrocitos.
- Evaluar el efecto de *A. mexicana* sobre los patrones de distribución de proteínas de citoesqueleto en condrocitos en el modelo de osteoartritis inducida en rata.

11. BIBLIOGRAFIA

1. Huber M, Trattng S, Lintner F. 2000. Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage. *Invest Radiol*; 35(10): 573-580.
2. Muir H. 1995. The chondrocyte, architect of cartilage. *Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. Bioessays*; 17(12): 1039-1048.
3. Archer CW, Francis-West P. 2003. The chondrocyte. *Int J Biochem Cell Biol*; 35(4): 401-404.
4. Clouet Johann, Vinatier Claire, Merceron Christophe, Pot-vaucel Marianne, Maugars Yves, Weiss Pierre, Grimandi Gael y Guicheux Jerome. 2009. From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage. *Drugs Discovery Today*: 14; 913-24.
5. Honner R, Thompson RC. 1971. The nutritional pathways of articular cartilage. An autoradiographic study in rabbits using ³⁵S injected intravenously. *J Bone Joint Surg [Am]* 53:742–748.
6. Maroudas A. 1979. Physicochemical properties of articular cartilage. In: Freeman MAR, ed: *Adult Articular Cartilage*, 2nd ed. Pitman Medical, Kent, UK. pp 215–290.
7. Muir IHM. 1979. Biochemistry. In: Freeman MAR, ed: *Adult Articular Cartilage*, 2nd ed. Pitman Medical, Kent, UK, 1979: 145–214.
8. a) Pelletier J., Boileau C., Pelletier J., Roughley P. 2008. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology*; 22: 351- 84. b) Pelletier J. *Arthritis Res* 2002 4:13-19.
9. Jerry C. Y. Hu, Kyriacos A. Athanasiou. 2003. Structure and Function of Articular Cartilage. *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. pp 73-83.
10. Kempson GE, Tuke MA, Dingle JT, et al. 1976. The effects of proteolytic enzymes on the mechanical properties of adult human articular cartilage. *Biochim Biophys Acta* 428:741–760.
11. Ayad S, Evans H, Weiss JB, et al. 1984. Type VI collagen but not type V collagen is present in cartilage [letter]. *Coll Relat Res* 4:165–168.

12. Smith GN Jr, Brandt KD. 1992. Hypothesis: can type IX collagen “glue” together intersecting type II fibers in articular cartilage matrix? A proposed mechanism. *J Rheumatol* 19:14–17.
13. Vaughan L, Mendler M, Huber S, et al. 1988. D-periodic distribution of collagen type IX along cartilage fibrils. *J Cell Biol* 106:991–997.
14. Hedbom E, Antonsson P, Hjerpe A, et al. 1992. Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. *J Biol Chem* 267:6132–6136.
15. Errington RJ, Fricker MD, Wood JL, Hall AC, White NS. 1997. Four-dimensional imaging of living chondrocytes in cartilage using confocal microscopy: a pragmatic approach. *Am J Physiol*; 272(3 Pt 1): C1040–C1051.
16. Márquez S, Valenzuela L, D. I, Pinto M. 2008. Citoesqueleto. *Histología Texto y Atlas*. Gartner 1: 114-18.
17. Sims J.R., Karp S., Ingber D.E. 1992. Altering the cellular mechanical force balance results in integrated changes in cell, cytoskeletal and nuclear shape. *J. Cell Sci.* 103, 1215–1222.
18. Simon V.R. & Pon L.A. 1996. Actin-based organelle movement. *Experientia* 52, 1117–1122.
19. Heath J.P. & Holifield B.F. 1991. Cell locomotion: new research tests old ideas on membrane and cytoskeletal flow. *Cell Motil. Cytoskeleton* 18, 245–257.
20. Riezman H., Munn A., Geli M.I., Hicke L. 1996. Actin-, myosin- and ubiquitin-dependent endocytosis. *Experientia* 52, 1033–1041.
21. Sontag J.M., Aunis D., Bader M.F. 1988. Peripheral actin filaments control calcium-mediated catecholamine release from streptolysin-O-permeabilized chromaffin cells. *Eur. J. Cell Biol.* 46, 316–326.
22. Koukouritaki S.B., Theodoropoulos P.A., Margioris A.N., Gravanis A., Stournaras C. 1996. Dexamethasone alters rapidly actin polymerization dynamics in human endometrial cells: evidence for nongenomic actions involving cAMP turnover. *J. Cell. Biochem.* 62, 251–261.

23. Hayes A.J., Benjamin M., Ralphs J.R. 1999. Role of actin stress fibres in the development of the intervertebral disc: cytoskeletal control of extracellular matrix assembly. *Dev. Dyn.* 215, 179–189.
24. Idowu B.D, Knight M. M., Lee D.A., Bader D.L. 2001. Temporal changes in cytoskeletal organisation within isolated chondrocytes quantified using a novel image analysis technique. *Med. Biol. Eng. Comput.* 39: 397-404.
25. Langelier Eve, Suetterlin Rosmarie, Hoemann Caroline D., Aebi Ueli, and Buschmann Michael D. 2000. The Chondrocyte Cytoskeleton in Mature Articular Cartilage: Structure and Distribution of Actin, Tubulin, and Vimentin Filaments. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*; 48:1307–1320.
26. Trickey WR, Vail TP, Guilak F. 2004. The role of the cytoskeleton in the viscoelastic properties of human articular chondrocytes. *J Orthop Res.*; 22: 131-9.
27. Blain Emma J., Gilbert Sophie J., Hayes Anthony J., Duance Victor C. 2006. Disassembly of the vimentin cytoskeleton disrupts articular cartilage chondrocyte homeostasis. *Matrix Biology* 25: 398–408.
28. Rogalski A.A. & Singer S.J. 1984. Associations of elements of the Golgi apparatus with microtubules. *J. Cell Biol.* 99, 1092–1100.
29. Schweizer J., Bowden P.E., Coulombe P.A. et al. 2006. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J. Cell Biol.* 174, 169–174.
30. Loeser, R. F. 2000. Chondrocyte integrin expression and function. *Biorheology* 37:109–116.
31. Shakibaei M, Zimmermann B y Merker HJ. 1995. Changes in integrin expression during chondrogenesis in vitro: an immunomorphological study. *Journal of Histochemistry & Cytoschemistry*; 43: 1061-69.
32. Loeser, R.F., 2002. Integrins and cell signaling in chondrocytes. *Biorheology*; 39:119–124.
33. Egerbacher M, Haeusler G. 2003. Integrins in growth plate cartilage. *Pediatr Endocrinol Rev.* ;1:2-8.

34. Millward-Sadler and Salter D. M. 2004. Integrin-dependent signal cascades in chondrocyte mechanotransduction. *Annals of biomedical engineering*; 32, no. 3: 435–446.
35. Shyy, J.Y.-J., and S. Chien. 1997. Role of integrins in cellular responses to mechanical stress and adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:707–713.
36. Giancotti, F. G., and E. Ruoslahti. 1999. Integrin signaling. *Science* 285:1028–1032.
37. Knight, M. M., J. M. Ross, A. F. Sherwin, D. A. Lee, D. L. Bader, and C. A. Poole. 2001. Chondrocyte deformation within mechanically and enzymatically extracted chondrons compressed in agarose. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1526:141–146.
38. Shrivastava A., Radziejewski C., Campbell E., Kovac L., McGlynn M., Ryan T., Davis S., Goldfarb M., Glass D., Lemke G. y Yancopoulos G. 1997. An Orphan Receptor Tyrosine Kinase Family Whose Members Serve as Nonintegrin Collagen Receptors. *Molecular Cell*; 1: 25-34.
39. Vogel W., Aszódi A., Alves F. y Pawson T. 2001. Discoidin Domain Receptor 1 Tyrosine Kinase Has an Essential Role in Mammary Gland Development. *Molecular and Cellular Biology*; 21: 2906-2917.
40. Mollenhauer J, Mok M., King K., Gupta M., Chubinskaya S., Koepf H. y Cole A. 1999. Expression of Anchorin CII (Cartilage Annexin V) in Human Young, Normal Adult, and Osteoarthritic Cartilage. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, Vol. 47, 209-220.
41. Wang W. y Kirsch T. 2006. Retinoic acid stimulates annexin-mediated growth plate chondrocyte mineralization. *JCB*. Vol. 157:1061-1070
42. Knudson CB. 2003. Hyaluronan and CD44: strategic players for cell-matrix interactions during chondrogenesis and matrix assembly. *Birth Defects Res Part C Embryo Today* 69:174–196.
43. WHO. 2009. Rheumatic topics.
44. National institute of arthritis and musculoskeletal and skin diseases (niams) www.niams.nih.gov/health_info/osteoarthritis/default.asp

45. Alvarez- nemegyei J., Esperón R., Herrea G., Nuño B. 2006. Prevalencia e impacto funcional de las artropatías en adultos mayores. *Rev med inst mex seguro soc*; 44: 403-407
46. Rodríguez J., Ruiz F., Peñaloza R. 2009. Carga de la enfermedad en afiliados al instituto mexicano del seguro social (imss): asociación con indicadores socioeconómicos. México 2000. *Rev. Gerenc. Polit. Salud, Bogotá (Colombia)*, 8: 123-139.
47. Sandell L. y Aigner T. 2001. Articular cartilage and changes in Arthritis: Cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res*; **3**:107-113.
48. Holloway I, Kayser M, Lee DA, et al. 2004. Increased presence of cells with multiple elongated processes in osteoarthritic femoral head cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 12(1):17–24.
49. Lambrecht S, Verbruggen G, Verdonk PC, et al. 2008. Differential proteome analysis of normal and osteoarthritic chondrocytes reveals distortion of vimentin network in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2:163–173.
50. Capin-Gutierrez N, Talamas-Rohana P, Gonzalez-Robles A, et al. 2004. Cytoskeleton disruption in chondrocytes from a rat osteoarthrosic (OA)-induced model: its potential role in OA pathogenesis. *Histol Histopathol* 19(4):1125–1132.
51. Jeffrey JE, Gregory DW, Aspden RM. 1995. Matrix damage and chondrocyte viability following a single impact load on articular cartilage. *Arch Biochem Biophys*. 322:87-96. Jeffrey JE, Thomson LA, Aspden RM. 1997: Matrix loss and synthesis following a single impact load on articular cartilage in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 1334:223-232.
52. Borrelli JJ, Tinsley K, M RW, M B, E KI, Hotchkiss R. 2003. Induction of chondrocyte apoptosis following impact load. *Journal of Orthopaedic Trauma*. 17:635-641.
53. Henson FM, Vincent TA. 2008. Alterations in the vimentin cytoskeleton in response to single impact load in an in vitro model of cartilage damage in the rat. *BMC Musculoskelet Disord* 9:94.

54. Helga Joos, Wolfgang Albrecht, Stefan Laufer, et al. 2008. *Mol Med* 14 (3-4)150-159
55. Blain Emma J., Gilbert Sophie J., Hayes Anthony J., Duance Victor C. 2006. Disassembly of the vimentin cytoskeleton disrupts articular cartilage chondrocyte homeostasis. *Matrix Biology* 25: 398–408.
56. Dominik R. Haudenschild, Jianfen Chen, Nina Pang, Nikolai Steklov, Shawn P. Grogan, Martin K. Lotz, Darryl D. D’Lima. 2009. Characterization of the Chondrocyte Actin Cytoskeleton in Living Three-Dimensional Culture: Response to Anabolic and Catabolic Stimuli. *Mol. Cell. Biomech*; 6 (3): 135-144.
57. Volag J. y Stodola J. 1995. Algunas notas sobre la planta medicinal Arnica montana L. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social (Mex)*; 33: 306-326.
58. Wright, M. O., P. Jobanputra, C. Bavington, D. M. Salter, and G. Nuki. 1996. The effects of intermittent pressurisation on the electrophysiology of cultured human articular chondrocytes: Evidence for the presence of stretch-activated membrane ion channels. *Clin. Sci.* 90:61–71.
59. Jäger C., Hrenn A., Zwingmann J., Suter A., Merfort I. 2009. Phytomedicines prepared from Arnica flowers inhibit the transcription factors AP-1 and NF- κ B and modulate the activity of MMP1 and MMP13 in human and bovine chondrocytes. *Planta Med* 2009; 75: 1319-1325.
60. Edris A.E. 2007. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. *Phytother. Res.* 21(4):308-23
61. Willuhn, G.; Ro’ttger, P. M. *Dtsch. Apoth. Zeit.* 1980, 120, 1039-1042.
62. Bye, R.; Linares, E.; Estrada, E. 1995. *Rec. Adv. Phytol.*, 29, 65-82.
63. Linares, M. E., Bye, R.; Flores, B. 1990. *Tes Curativos de México*, 2nd ed.; Cuadernos del Instituto de Biología 7, Universidad Nacional Autónoma de México.
64. Felson D.T. 2006. Glucosamine and chondroitin sulfate in knee osteoarthritis: where now?. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006 Jul;2(7):356-7.

65. Goldring, MB, Goldring SR. 2010. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. Ann N Y Acad Sci. 1192:230-7.
66. Ingber D.E., Dike L., Hansen L. et al. 1994. Cellular tensegrity: exploring how mechanical changes in the cytoskeleton regulate cell growth, migration, and tissue pattern during morphogenesis. *Int. Rev. Cytol.* 150, 173–224.
67. Masotti, V., Juteau, F., Bessière, J.M., Viano, J., 2003. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7115–7121.
68. Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P., 2006. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4364–4370.
69. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem. Toxicol.* 46(2):446-75.
70. Sagrero-Nieves, Lorenzo; Bartley, John P. 1996. Volatile components from the leaves of *Heterotheca inuloides* Cass. Instituto de Ciencias Basicas, Universidad Veracruzana, Veracruz, Mex. *Flavour and Fragrance Journal.* 11(1): 49-51.