



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**“FAGOCITOSIS DE CONDROCITOS APOPTÓTICOS Y DE  
DETRITOS DE CARTÍLAGO ARTICULAR DE RATA, *IN VITRO*”**

T E S I S

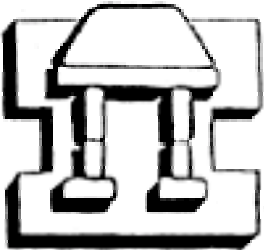
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A

**GONZÁLEZ CASTILLO ELENA CRISTINA**

ASESOR

Dr. Juan Bautista Kourí Flores





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**




**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



EL PRESENTE TRABAJO, FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE OSTEOARTROSIS DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA EXPERIMENTAL DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL; BAJO LA ASESORÍA DEL DR. JUAN BAUTISTA KOURI FLORES.

# DEDICATORIAS

---

---

## DEDICATORIAS

---

A mis padres Cristina y Emigdio: A ti mamá que me has apoyado en todas mis decisiones y aconsejado a tomar las correctas, por que a ti te debo lo que soy, por tu enseñanzas, por tu amor, por tus desvelos, por tu comprensión, aguantando siempre mis desesperos y locura, por ser como eres. Te adoro. A ti papá<sup>†</sup>, por que gracias a ti existo y por concederme a esta madre y hermanos tan maravillosos.

A mis hermanos: Lourdes, Emigdio, Raúl e Isaac; quienes me han cuidado y apoyado en todo, sin olvidar a mis hermanitos postizos Félix, Mario y Carlos.

A mis sobrinos: Ricardo, Angélica, Deyna y Christian. Por ser unos niños fabulosos y una nueva generación en esta familia tan grande y unida.

A mis abuelos: María Elena y Hermenegildo<sup>†</sup>, por brindarme su casa, su amor y apoyo durante todo este tiempo.

A mis tíos y primos: Martha y Emilio, Rita y Antonio, Jesús y Amelia, Hilda, Eduardo y Cristina, Lourdes, Maremi, Claudia, Fabiola, Pepe, Laura y, Pau, Airam, Jessica, Eleazar, Eduardo, Alberto y Mariana. Por esa unión que siempre hemos mantenido y por el apoyo brindado

A Rodrigo, quien en estos últimos años me ha apoyado y soportado en mis muchos ratos de locura, comprendido y empujado a seguir adelante.....y por supuesto a su familia.

A Rosalba, amiga incondicional quien a pesar de la distancia siempre está presente.

A Karla, Elizabeth (Tocho), Irán, Jonathan y Jeffrey: amigos con quienes pase unos momentos maravillosos y con quienes aún comparto metas.

A Juan Carlos, a quien le debo haber conocido esta maravillosa carrera y retarme a conocerla aún más, ofreciéndome su apoyo.

A mis grandes amigos biólogos y “Doctores”: Alberto, Kika, Alya, Gerardo, Hugo, Mata, Sandy y Myrna, quienes me permitieron entrar en su selecto grupo, apoyándome en los estudios y brindándome su maravillosa amistad en esos últimos años de carrera, en los desvelos, preocupaciones, prácticas y reventones.

A Toño (De lo Peor): Por enseñarme tantas cosas y brindarme su valiosa amistad; por tener siempre palabras de aliento.

A los profesores Alberto Arriaga (Método I), Edith (Diversidad Vegetal II) y Martha Salcedo, por tenderme siempre su apoyo.

A Madaí y Aurora, por apoyarme a lo largo de la realización de este proyecto, ayudándome con sus conocimientos, amistad y risas.

A la auxiliar: Magdalena Miranda, por su apoyo en el trabajo del laboratorio; y a los técnicos David Pérez, José Luis Fernández, Víctor Rosales, Miguel Preciado y Benjamín Ortíz por su apoyo técnico y tiempo.

A mi asesor, por brindarme la oportunidad de ser parte de su tripulación.

# INDICE

---

---

# INDICE

---

## INTRODUCCION

## CAPITULO I: CARTILAGO ARTICULAR

### 1. Articulaciones

#### 1.1 Cartilago

1.1.1 Cartilago articular

1.1.2 Colagena

1.1.3 Proteoglicanos

1.1.4 Organizacion

1.1.5 Condrocitos

1.1.6 Nutricion del cartilago

1.1.7 Factores que ocasionan cambios en el cartilago articular

## CAPITULO II: OSTEOARTROSIS

### 2. Osteoartrosis

2.1 Degradacion enzimatica del cartilago articular osteoartrosico

2.2 Signos y sintomas

2.3 Incidencia y factores de riesgo

2.4 Diagnostico clinico

2.5 Tratamiento

## CAPITULO III: APOPTOSIS

### 3. Apoptosis

3.1 Apoptosis y Necrosis

3.2 Mecanismo Molecular de la Apoptosis

3.2.1 Estimulos inductores



- 3.2.2 Etapa de Iniciacion
  - 3.2.2.1 Via receptores de muerte
  - 3.2.2.2 Via mitocondrial
- 3.2.3 Etapa de ejecucion
- 3.2.4 Remocion de celulas
- 3.3 Proteinas Inhibidoras de Apoptosis (AIP)
- 3.4 Importancia de la Investigacion de la muerte celular

## CAPITULO IV: FAGOCITOSIS

- 4. La Membrana Celular en el Transporte Molecular
  - 4.1 Origen de la Teoria de la Fagocitosis
  - 4.2 Fagocitosis de cuerpos apoptoticos
    - 4.2.1 Reconocimiento de celulas apoptoticas

ANTECEDENTES

OBJETIVOS

METODOLOGIA

RESULTADOS

DISCUSION

CONCLUSIONES

REFERENCIAS

APENDICE I

## **INDICE: FIGURAS Y TABLAS**

---

### **FIGURAS; REF.**

Fig. 1. Articulaciones: Sinartrosis y diartrosis; 134

Fig. 2. Articulacion de rodilla; 1,27

Fig. 3. Tipos de cartílago; 7

Fig. 4. Crecimiento del cartilago; 24

Fig. 5. Estructura quimica de los glucosaminoglicanos; 1

Fig. 6. Agregado de agrecan; 31

Fig. 7. Zonas del cartilago articular maduro; 3

Fig. 8. Tipos de matriz extracelular; 31

Fig. 9. Cartilago maduro; 28

Fig. 10. Diferencias entre Osteoartrosis y Artritis; 134

Fig. 11. Equilibrio: destruccion-sintesis; 23

Fig. 12. Radiografia (osteofitos); 47

Fig. 13. Areas anatomicas de la OA; 26

Fig. 14. Factores de riesgo de OA; 26

Fig. 15. Radiografia de rodilla y cadera OA; 53,47

Fig. 16. Fragmentacion del ADN; 79

- Fig. 17. Fenomenos fisiologicos en que interviene la apoptosis; 64
- Fig. 18. Fragmentacion internucleosomal del ADN; 38
- Fig. 19. Apoptosis vs. Necrosis; 135
- Fig. 20. Apoptosis en *C. elegans*; 76
- Fig. 21. Homologia de genes: mamiferos/*C. elegans*; 77
- Fig. 22. Vias de VP-16; 43
- Fig. 23. Via receptores de muerte; 79
- Fig. 24. Formacion del apoptosoma; 77
- Fig. 25. Inductores de caspasas a traves de la mitocondria; 81
- Fig. 26. Familia Bcl-2; 77
- Fig. 27. Homodimeros y heterodimeros de la fam. Bcl-2; 77
- Fig. 28 Modelo de Activacion de apoptosis por la fam Bcl-2; 86
- Fig. 29. Proteinas de la fam Bcl-2 y su relacion con la mitocondria; 79
- Fig. 30. Caspasas inductoras y ejecutoras; 92
- Fig. 31. Partes constitutivas de las procaspasas y caspasas; 93,94
- Fig. 32. Familia de caspasas en mamiferos; 80
- Fig. 33. Familia de proteinas inhibidoras de apoptosis; 97
- Fig. 34. Bomba sodio-potasio; 102
- Fig. 35. Pinocitosis; 106

- Fig. 36. Fagocitosis; 100, 108
- Fig. 37. Cambios ultraestructurales de cels apoptoticas; 67
- Fig. 38. Genes apoptoticos; 21
- Fig. 39. Condrocitos apoptoticos (M.Optica); 80
- Fig. 40. Condrocitos apoptoticos (MET); 81
- Fig. 41. Fagocitosis de latex (Citometria de flujo); 83
- Fig. 42. Fagocitosis de latex (M. Confocal); 84
- Fig. 43. Fagocitosis de latex (MET); 85
- Fig. 44. Fagocitosis de detritos de CA (MET); 86
- Fig. 45. Fagocitosis condrocitos apoptoticos (M.Optica); 87
- Fig. 46. Fagocitosis condrocitos apoptoticos (MET); 88

**TABLAS; REF.**

- Tabla 1. Tipos de colagena; 4
- Tabla 2. Enzimas del CA; 4
- Tabla 3. Signos y sintomas de la OA; 26
- Tabla 4. Receptores de cels fagociticas; 67

# INTRODUCCIÓN

---

---

## INTRODUCCIÓN

---

El cartílago es un tipo de tejido conectivo, del cual existen tres tipos: cartílago hialino, cartílago elástico y cartílago fibroso. El cartílago articular es de tipo hialino, el cual es un tejido liso y brillante constituido por una población celular heterogénea denominada condrocitos y una matriz extracelular, a su vez constituida por líquido tisular, proteoglicanos, colágena (principalmente de tipo II), lípidos, glicoproteínas, enzimas, y por las proteínas: condronectina, fibromodelina y fibronectina<sup>1,2,3,4</sup>.

La principal función del cartílago articular hialino (CA) es la de otorgar soporte, rigidez, lubricación y movimiento a las articulaciones diartroideas o móviles, para lo que es necesario que exista un balance adecuado de sus componentes<sup>1,5,6</sup>.

El condrocito, es el único tipo celular presente en el cartílago y se encuentra dentro de los espacios de la matriz (lagunas). Es el responsable de la producción, organización y mantenimiento de la matriz extracelular mediante la síntesis de enzimas y macromoléculas: proteoglicanos y colágena principalmente<sup>7</sup>; de tal manera que cuando el condrocito sufre una lesión por traumatismo o alguna otra causa, su microambiente comienza a degenerarse<sup>8</sup>, dañándose el cartílago y causando enfermedad. Debido a que éste es un tejido aneural y avascular, su alteración no puede ser percibida tempranamente<sup>5</sup>.

Una de las enfermedades del cartílago, es la osteoartritis, artropatía crónica degenerativa de alta incidencia y prevalencia que afecta sustancialmente la calidad de vida de las personas que la padecen, en la que el cartílago se va destruyendo debido a la erosión de la matriz extracelular (pérdida de colágena y proteoglicanos) que se lleva a cabo por la digestión enzimática<sup>5,2,9,10</sup>. Debido que la población mundial envejece y la población de “adultos en plenitud” aumentará significativamente en los próximos 50

años, la Organización Mundial de la Salud ha declarado este decenio el de las ENFERMEDADES OSTEOARTICULARES<sup>11</sup>.

Dos de los procesos de interés en la osteoartrosis son: la formación de osteofitos y el incremento de apoptosis de los condrocitos articulares<sup>12,13,14,15</sup>. El principal papel de la apoptosis en la patogenia de la enfermedad ha sido asociado en la degradación de la matriz extracelular así como con la calcificación anormal del cartílago<sup>16,17,18,19</sup>. Estas dos suposiciones señalan la posible importancia de la apoptosis en la patogenia de la enfermedad, lo cual determina la necesidad de profundizar sobre los mecanismos de este proceso<sup>20,18</sup>.

Desde la descripción inicial de la muerte por apoptosis ha sido claro que la fase final de este programa de eliminación celular in vivo es la fagocitosis rápida y segura de células no deseadas intactas. Evidencia reciente, indica que la fagocitosis para la limpieza de células muertas por apoptosis es mucho más que una simple eliminación, ya que en este proceso intervienen una serie de señales que determinan que haya la fagocitosis de dichas células<sup>21</sup>.

Hay muchos aspectos en la biología celular y en patología de la muerte celular programada (PCD) de los condrocitos que aún están pobremente entendidos entre ellos lo relacionado con el destino de los restos de los condrocitos después su muerte por apoptosis<sup>22,18</sup>. Es por ello que se han realizado estudios que muestran que los condrocitos de la placa de crecimiento que mueren por apoptosis son fagocitados<sup>1</sup> por los osteoclastos<sup>23</sup>, sin embargo, aunque no se ha reportado que es lo que sucede con los pertenecientes al cartílago articular, en el año 2002, Kouri y colaboradores, sugieren la posibilidad de que los condrocitos puedan fagocitar detritos celulares<sup>18</sup>; debido a esto en el presente trabajo se realizaron cultivos de condrocitos articulares para poder determinar si los residuos o detritos de condrocitos destruidos mecánicamente o por inducción de apoptosis, pueden ser fagocitados por células sanas o intactas.

# **CAPÍTULO I**

---

---

## **CARTÍLAGO ARTICULAR**



# CAPÍTULO I: CARTÍLAGO ARTICULAR

---

## 1. ARTICULACIONES

Las articulaciones son las zonas de unión entre los huesos del esqueleto, cuya función es la de brindar movilidad y estabilidad a los segmentos óseos que se relacionan en ellas. Según la amplitud de movimiento se pueden clasificar en: sinartrosis, que son articulaciones rígidas, como las que unen los huesos del cráneo; anfiartrosis, que presentan movilidad escasa como la unión de ambos pubis; y diartrosis, articulaciones móviles como las que unen los huesos de las extremidades con el tronco (rodilla, cadera, hombro), grupo al que pertenecen la mayor parte de la articulaciones de las extremidades<sup>1,24,4</sup> (Fig. 1).

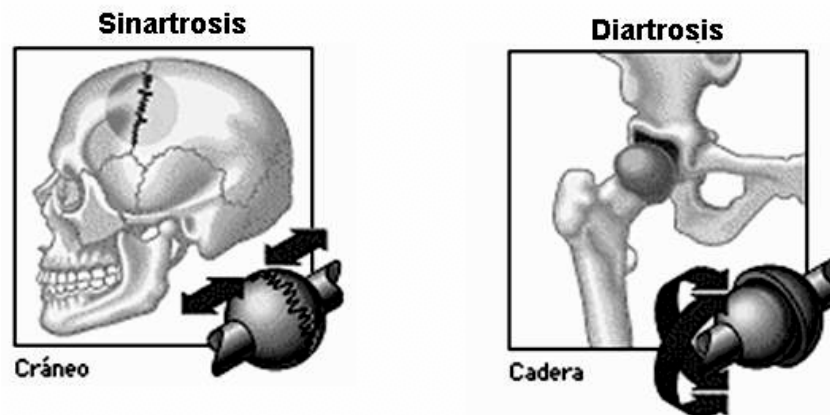


Fig. 1. Forma que presenta una articulación inmóvil o sinartrosis (cráneo) y móvil o diartrosis (cadera) con los movimiento que admiten (flechas negras)

Para facilitar los movimientos y favorecer el deslizamiento sin desgaste significativo, las superficies de los huesos no pueden ponerse en contacto de manera directa una con la otra, pues la fricción y la transmisión de la presión lesionarían estas estructuras. Cada extremo óseo está cubierto con una variedad especial de cartílago, conocido como cartílago articular, quien amortigua la transmisión de las fuerzas al hueso garantizando la estabilidad, el movimiento y la resistencia de la estructura

articular. Los segmentos articulares deben encajar de una manera más o menos precisa el uno con el otro, ya sea porque ambos presenten una superficie lisa y lineal o porque mientras que uno presenta una cavidad o arco, el otro aporta una terminación en forma de esfera o cabeza. La mayoría de las articulaciones poseen un diseño intermedio entre estos extremos<sup>25,26</sup>.

Los cartílagos tampoco se relacionan entre sí de manera directa. Alrededor de la articulación y conectando los dos huesos existe una capa más gruesa de tejidos muy resistentes que forman la cápsula articular y mantienen en su sitio todas las estructuras de la articulación. Las cápsulas más voluminosas, son las de las rodillas (Fig. 2). La capa externa de la cápsula articular, es la membrana fibrosa cuya función es mantener fuertemente unidos a los huesos, justo al límite de la articulación. La capa interna, o membrana sinovial, es más delgada y elástica y está unida por sus extremos; su principal función es elaborar y secretar hacia la cavidad articular el líquido sinovial, líquido claro y viscoso, producido por los sinoviocitos. El líquido sinovial, aporta lubricación a las superficies articulares, previene su contacto, provee de nutrientes a las células del cartílago articular (condrocitos) y elimina productos de desecho<sup>1,25,26,27</sup>.

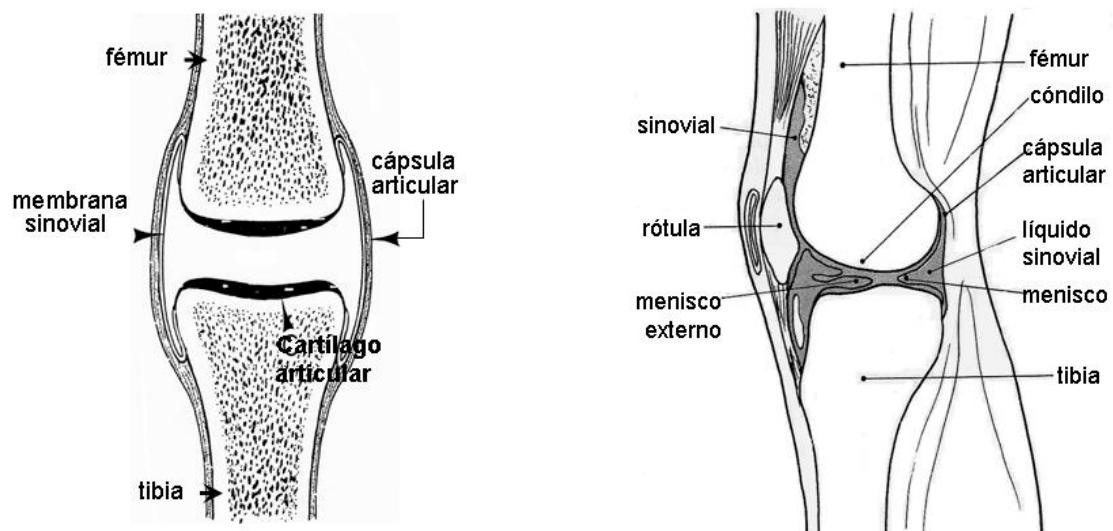


Fig. 2 Articulación de la Rodilla

Finalmente, la amplitud del movimiento de una articulación está determinada por un conjunto de estructuras que mantienen unidas a las articulaciones. Las sinartrosis se mantienen unidas por el crecimiento del hueso, o por un cartílago fibroso resistente; las anfiartrosis por un cartílago elástico, y las diartrosis por una capa externa de cartílago fibroso y ligamentos resistentes que conectan a la cápsula de la articulación con los músculos y tendones vecinos<sup>25</sup>.

### 1.1 CARTÍLAGO

El cartílago, es un tipo de tejido conectivo que se caracteriza por su gran resistencia a la compresión. Existen tres tipos de cartílago, los cuales se diferencian principalmente por la naturaleza de sus fibras y son: Cartílago Elástico, Cartílago Hialino y Cartílago Fibroso<sup>28,29,30</sup> (Fig. 3).

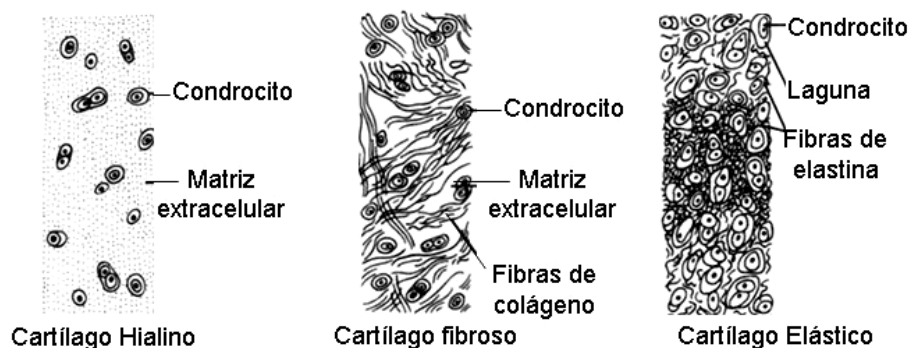


Fig. 3. Tipos de Cartílago

El origen embrionario de las células de estos tejidos es mesenquimatoso, las cuales se diferencian a condroblastos y posteriormente a condrocitos. Gran parte del cartílago hialino embrionario es sustituido durante el desarrollo por hueso (placa de crecimiento) Fig. 4. Sin embargo, existen dos tipos que perduran durante la vida postnatal, uno de los cuales permanece en estructuras extraesqueléticas como los anillos en forma de herradura en la pared de la tráquea, placas de cartílago en la laringe, nariz, etc. y el otro que proporciona una cubierta y lubricación a las

articulaciones de los huesos largos (cartílago articular) y se convierte en un tejido maduro al mes de nacimiento<sup>24,28</sup>.

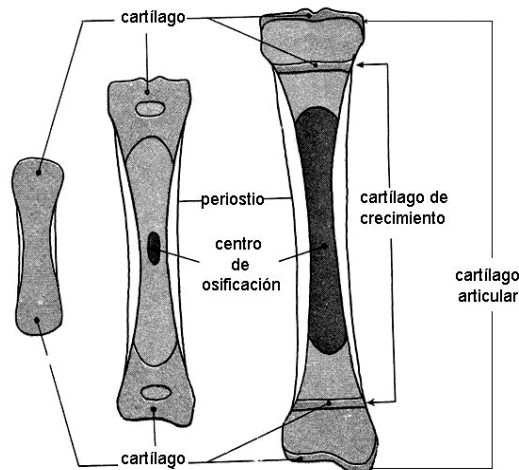


Fig.4. Las células cartilaginosas proliferan activamente y se disponen en franjas longitudinales, dando origen al hueso

### 1.1.1 CARTÍLAGO ARTICULAR

El cartílago articular es el único material biológico que forma la superficie de las articulaciones diartroideas revistiendo los extremos óseos que se encuentran dentro de estas, es de grosor variable, siendo los cartílagos articulares más voluminosos los de las rodillas y caderas, dado que deben soportar una mayor fuerza de gravedad por lo que su espesor es de 4-7mm<sup>1,27</sup>.

Su función es evitar el desgaste y la fricción de los extremos óseos, permitir que éstos encajen mejor, amortiguar, transmitir y distribuir las fuerzas de gravedad y de tracción muscular que convergen en las articulaciones. Su propiedad más importante es la elasticidad, es decir, la capacidad de volver a su situación inicial tras ser sometido a una fuerte presión. Esta elasticidad se debe a que, el CA, al ser presionado expulsa agua de su propio tejido hacia la cavidad articular y cuando dicha presión cesa absorbe el agua nuevamente<sup>30,27,4</sup>.

Está constituido por una matriz extracelular (ME) hidratada y por una población celular especializada, los condrocitos, localizados dentro de lagunas en la ME, ocupando en el humano adulto menos del 5% del volumen total. La mayor proporción de esta matriz es *agua*, la cual comprende aproximadamente del 65% al 80% del volumen del cartílago<sup>29,30</sup>. La tercera parte del agua que se encuentra en el cartílago es intracelular y lo demás se encuentra rodeando las proteínas de la ME. Las dos otras dos terceras partes están constituida principalmente por *colágena* y *proteoglicanos* cuyas interrelaciones son críticas para la habilidad de responder a las fuerzas de compresión, tensiles y de cizallamiento que son inherentes a este tipo de articulaciones, otorgándoles rigidez y resistencia. Durante la carga, las fuerzas de compresión fuerzan la fase líquida a fluir a través de la parte sólida. La fuerza hidráulica se incrementa conforme aumentan las fuerzas de compresión; la deformación del cartílago continúa hasta que se equilibren ambas fuerzas. Para contribuir a este equilibrio se incrementa la carga negativa en la ME con lo que el agua se extruye de ésta. Después de acabar la compresión, agua y nutrientes vuelven a entrar, permitiendo a los proteoglicanos dilatarse otra vez y al cartílago volver a tener la conformación anterior<sup>30,3,4</sup>.

Además de estos dos componentes, se han identificado otras proteínas en menor cantidad, estas son: *Lubricin*, glicoproteína lubricante de la superficie articular del cartílago que contribuye a que haya baja fricción y a la lubricación de los límites del cartílago; *Decorina*, proteoglicano que constituye a la ME y que probablemente contribuye a la organización de la colágena, se encuentra en altas concentraciones en la zona superficial del cartílago y contiene al glicosaminoglicano dermatán sulfato; *Ancorin CII*, se encuentra asociado a la membrana celular de los condrocitos y a las fibras de colágena extracelulares, se cree que actúa como mecanoreceptor de señales de transmisión de los condrocitos; *Fibromodulin*, proteína aniónica que cubre a la colágena y que puede estar relacionada con la formación de la red de fibras de colágena; y *Condocalcin* quien tiene afinidad por la hidroxiapatita y puede estar relacionada con la calcificación de la matriz del cartílago<sup>4</sup>.

### 1.1.2 COLÁGENA

La colágena es el componente primario del CA (10-40% del peso seco)<sup>1,29,30</sup> y el principal determinante de su fuerza ténsil. El CA contiene varios tipos de colágena (Tabla 1) que se distinguen por la composición de las cadenas porque forman una triple hélice de cadenas hidrofílicas<sup>4,31,32</sup>.

CLASE	TIPO	DISTRIBUCIÓN EN EL TEJIDO
Fibrilar	I	Células del mesénquima y del hueso
	II	Condroprogenitores y cartílago
	III	Vasos sanguíneos, cartílago y hueso.
	V/XI	Cartílago-fibras heterotípicas de V con I y XI con II, aunque las moléculas mezcladas de V y XI con I y II es posible
Microfibrilar	VI	Condrocitos Pericelular
Asociado a fibrillas	IX	Forma larga en cartílago
	XII	Desconocido
Cadena corta	X	Cartílago hipertrófico

Tabla 1. Tipos de colágena en el desarrollo del esqueleto

La colágena Tipo II constituye el principal componente estructural<sup>19,3,4</sup>, su peso molecular es de 300,000 y representa aproximadamente el 90%. Los Tipos VI, IX, X y XI constituyen el resto. El tipo VI se encuentra rodeando a los condrocitos en el área pericelular. La colágena Tipo IX, contribuye a la estabilidad por la unión cruzada de la hidroxipiridinium junto con la colágena Tipo II, mientras que la tipo IX, puede contribuir a la formación de fibras de esta última. La colágena tipo XI constituye el 3% de la colágena en el cartílago y se localiza entre las fibras de colágena tipo II, lo que determina el espesor de las fibras de colágena. Los tipos II, IX, y XI se combinan en el cartílago para formar una red fibrilar que provee el armazón de la matriz en una forma heterogénea; por último, la colágena tipo X se asocia con la calcificación de esta región dado que deja huellas en la zona calcificada del cartílago<sup>33,4</sup>.

La síntesis de colágena consta de varios pasos. El paso inicial ocurre dentro del condrocito, y el ensamblaje final de las fibras de colágena en la ME del cartílago<sup>1,33</sup>. El porcentaje de síntesis de colágena es mínima una vez que el esqueleto deja de crecer. La vida media de la colágena en el adulto se estima en varios meses a años, lo cual puede alterarse en condiciones de artritis o después de alguna lesión<sup>4</sup>.

### 1.1.3 PROTEOGLICANOS

Una apreciación de la estructura de los proteoglicanos (PG's) es fundamental para entender la función de estas moléculas en el cartílago articular. Los PG's están compuestos por numerosas cadenas de glicosaminoglicanos que están unidas de manera covalente a una proteína central<sup>1,4</sup>.

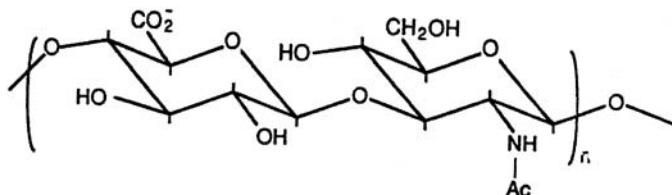
Los glicosaminoglicanos (GAG's) son unidades de disacáridos unidos en los que uno de los azúcares se une a un azúcar aminosulfatado. El condroitin 4-sulfato, condroitin 6-sulfato, heparán sulfato, dermatán sulfato y keratán sulfato son los principales en el cartílago articular siendo los isómeros de condroitin sulfato los más prevalentes<sup>29,4</sup>. El condroitin 4-sulfato predomina en el CA inmaduro mientras que el condroitin 6-sulfato se encuentra en altas concentraciones en el cartílago maduro. La concentración de condroitin sulfato es mayor en las zonas profundas que en las superficiales<sup>4</sup>.

La distinción entre los GAG's son los restos de azúcares, el tipo de unión entre estos restos, y el número y localización de los grupos sulfato (Fig. 5). El *Hyaluronan* es un disacárido de glucoronato y N-acetyl glucosamina y es el único que no es sulfatado. El *Condroitín sulfato* es un disacárido de glucoronato de N-acetyl galactosamina mientras que el *Dermatan sulfato* se deriva del Condroitín sulfato por la epimerización del glucoronato en ioduronato. El *Keratán sulfato* es un disacárido de galactosa y N-aceylil glucosamina, mientras que el *heparán sulfato* contiene ioduronato y N-aceylil glucosamina. La mayoría son covalentes y van unidos a una

proteína central para producir proteoglicanos. El Hyaluronan es una excepción en que no está unida a una proteína central<sup>1,29,3,4</sup>.

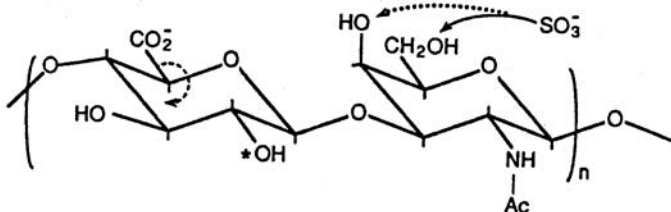
**A. Hyaluronic Acid**

-1,4-glcUA- $\beta$ -1,3-glcNAc- $\beta$ -



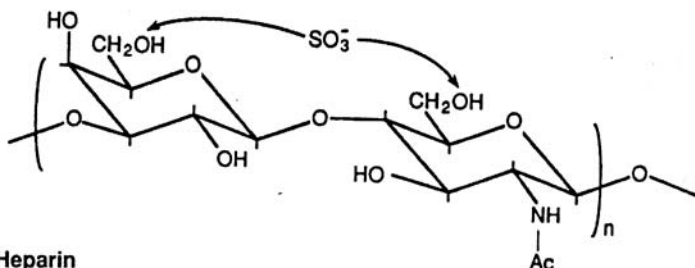
**B. Chondroitin/Dermatan Sulfate**

-1,4-glcUA- $\beta$ -  
-1,4-idoUA- $\alpha$ -1,3-galNAc- $\beta$ -



**C. Keratan Sulfate**

-1,3-gal- $\beta$ -1,4-glcNAc- $\beta$ -



**D. Heparan Sulfate/Heparin**

-1,4-glcUA- $\beta$ -  
-1,4-idoUA- $\alpha$ -1,4-glcNAc- $\alpha$ -

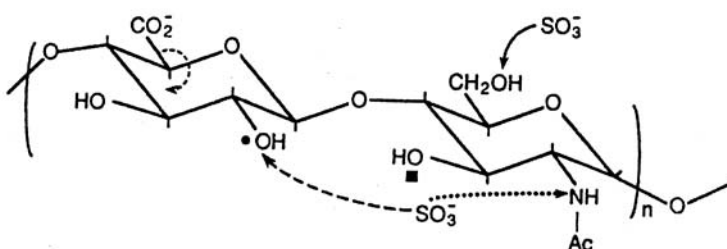


Fig. 5. Estructura química de las cadenas de los Glicosaminoglicanos de los proteoglicanos del cartílago.



El Agrecan es el más común y mejor definido proteoglicano del cartílago articular. Este gran proteoglicano (225-250 kDa) está compuesto de una proteína central que tiene más de 100 cadenas de glicosaminoglicanos unidas; la unión es una fijación residual que se estabiliza por un tetrasacárido. La mayoría de los GAG's en agrecan son Condroitín sulfato (más de 100 cadenas) y Keratán sulfato (20-50), los cuales están cargados negativamente por lo que se encargan de la hidratación y del soporte en el aumento de presión del tejido junto con el ácido hialurónico (hialuronato o hialuronano), el cual, es un GAG no sulfatado formado por una secuencia de 25.000 unidades sucesivas de ácido D-glucourónico- N-acetilglucosamina. Este agregado de Agrecán, esta constituido por más 200 moléculas covalentemente unidas a una molécula simple de ac. hialurónico mediante una pequeña glicoproteína. Las proteínas de unión han sido descritas en una variedad de tejidos cartilagosos de una gran variedad de especies y tienen un peso molecular entre 40.000 y 50.000KDa (Fig.6)<sup>31,29,3,4</sup>.

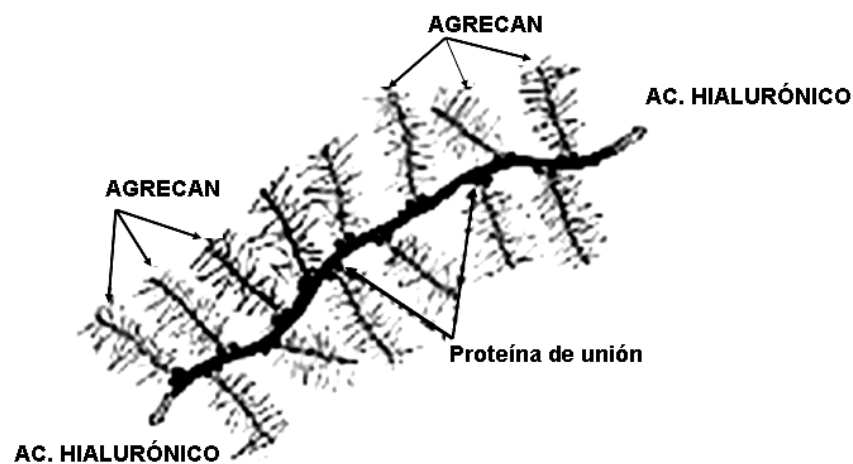


Fig. 6. Agregado de Agrecán.

El agregado, está embebido en una red tridimensional de fibras de colágena y contribuye a la capacidad articular de revertir la deformación que sufre el CA. Al estar cargado negativamente, atrae cationes como el  $\text{Na}^+$  que a su vez, al ser osmóticamente activos, atraen grandes cantidades de agua (mas de 50 veces del

peso) disponiéndose cada molécula del ac. hialurónico como un ovillo laxamente plegado y altamente hidratado, que ocupa un volumen importante del espacio intercelular<sup>1,4</sup>.

Los PG's, representan aproximadamente la mitad del peso seco de la ME y se distribuyen a través del CA de manera no azarosa, ya que su concentración es inversamente proporcional a la concentración de colágena; por tanto, en la zona superficial en donde la concentración de colágena es alta la de los PG's es baja, organización que sirve para proveer al cartilago la habilidad de resistir a la compresión y distribuir el peso<sup>4</sup>.

#### **1.1.4 ORGANIZACIÓN**

De acuerdo a la deposición de fibras, el CA puede ser subdividido en 4 zonas desde el hueso subcondral hasta la superficie de la articulación. La más profunda, la *zona 4*, es la zona calcificada del cartilago que se une a la zona subcondral por medio de fibras de colágena que corren perpendicularmente a la cavidad de la articulación. Es la responsable principal de la resistencia, en donde la concentración de agua es baja; su apariencia histológica se deriva de los cristales de Hidroxiapatita embebidos entre las fibras de colágena. La *zona 3* es referida como la zona profunda o radial debido a la orientación radial de las fibras de colágena. Una delgada línea delimita a la zona radial de la calcificada. La *zona 2* es la zona transicional o media, las fibras de colágena en esta zona son de dos distintos tamaños: las fibras pequeñas van de 4 a 10nm y las largas de 10 a 80nm, estas ultimas se encuentran orientadas de forma oblicua a través de la articulación y las primeras distribuidas azarosamente, pueden proveer soporte a las fibras de colágena largas. La zona más superficial del CA, la *zona 1*, es la zona tangencial. Su espesor promedio va desde los 200 a los 600µm. Aquí se encuentra la más alta concentración de fibras de colágena, las cuales se encuentran orientadas paralelamente a la superficie articular y perpendicularmente

entre ellas. Existen otras clasificaciones que tienen en consideración las características de los condrocitos (Fig. 7)<sup>3</sup>.

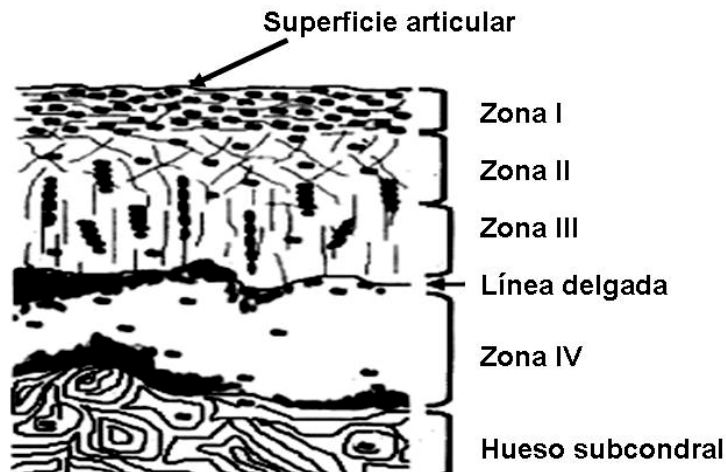


Fig. 7. CARTÍLAGO ARTICULAR MADURO. Zona I, contiene condrocitos elongados y aplanados y fibras de colágeno paralelas a la superficie articular. En la Zona II, los condrocitos son redondos, distribuidos azarosamente, contienen gran número mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi. Las fibras de colágeno en esta zona son más oblicuas y aparecen menos organizadas. En la Zona III, los condrocitos son células redondas grandes, almacenadas en columnas perpendiculares a la superficie articular. En la zona IV, células son más pequeñas, tienen menos desarrollados los organelos y algunas son hipertróficas. Debajo de esta encontramos al hueso subcondral.

### 1.1.5 CONDROCITOS

Los condrocitos son un grupo celular heterogéneo responsable de la producción y el mantenimiento de la ME del cartílago<sup>3</sup>. Se encuentran localizados en lagunas a través de la matriz del cartílago (Fig 8). Las lagunas están rodeadas por a fibras de colágeno y por una matriz rica en PG's y agua<sup>29</sup>. Los condrocitos sobreviven en condiciones de relativa hipoxia, contienen altas concentraciones de depósitos de glicógeno como fuente de energía; utilizan principalmente la glicólisis anaerobia en la generación de fosfatos, aunque son capaces de metabolizar de manera aeróbica<sup>1,4</sup>

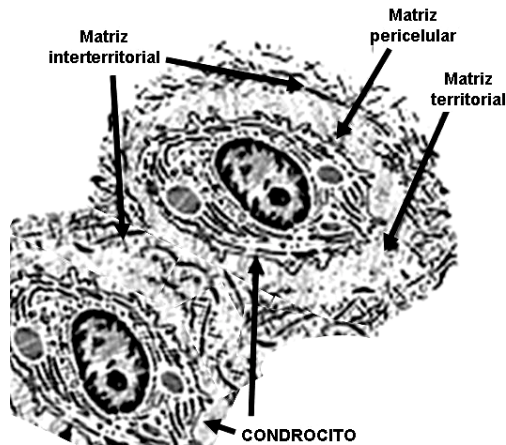


Fig. 8. Condrocito rodeado de matriz extracelular (pericelular, territorial e interterritorial).

Alteran su actividad metabólica en respuesta a las demandas locales, señales químicas y de presión mecánica, pueden resultar en el incremento de la producción de matriz extracelular. Debido a que son relativamente pocos los condrocitos en el cartílago, comparado con el volumen de la ME, cada célula debe presentar un metabolismo alto para poder mantener su ambiente, dado que cada una es capaz de sintetizar y degradar los diferentes componentes, respondiendo diferencialmente a señales intra- y extracelulares<sup>1,4</sup>.

En el CA inmaduro, los condroblastos, son el tipo celular dominante, distribuidos uniformemente a través del cartílago a diferencia de los condrocitos quienes en el cartílago maduro se distribuyen dentro de las lagunas (Fig. 9)<sup>35,34,28</sup>. Los condroblastos sintetizan activamente ME, tienen un núcleo grande y un sistema altamente desarrollado de organelos necesarios para la síntesis de los componentes de la matriz. La síntesis de los PG's ocurre en los ribosomas y en el aparato de Golgi, mientras que el ensamblaje de las moléculas de colágena ocurren principalmente en el retículo endoplásmico rugoso. La actividad mitótica se da frecuentemente en los condroblastos y la mayor concentración de células mitóticas las encontramos bajo la superficie articular. Sin embargo, una vez que el crecimiento cesa, los condrocitos dejan de dividirse bajo condiciones normales<sup>30,4</sup>.

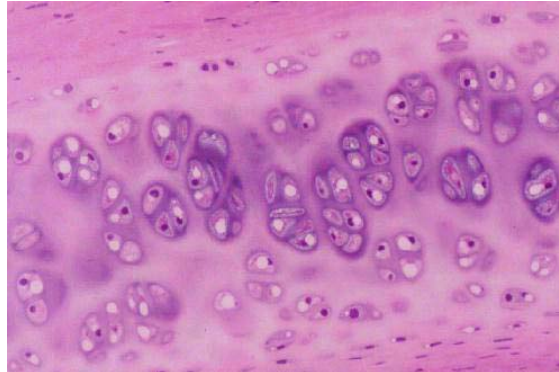


Fig. 9. Cartílago maduro. Células dentro de lagunas.

### **1.1.6 NUTRICIÓN DEL CARTÍLAGO**

En el CA maduro, los vasos sanguíneos no penetran a la matriz cartilaginosa y los condrocitos se nutren con material que difunde desde los capilares sanguíneos del tejido conjuntivo subyacente a través del líquido sinovial<sup>1</sup>. El efecto compresivo en la articulación en movimiento facilita la difusión de solutos, como electrolitos y glucosa, a través de la membrana sinovial y la ME del cartílago<sup>4</sup>.

En el CA inmaduro la nutrición se da por medio de dos formas: Directamente por los vasos sanguíneos que penetran al hueso subcondral e indirectamente por la difusión a través del líquido sinovial. Los pequeños vasos sanguíneos penetran la parte epifisial del plato subcondral nutriendo únicamente a la capa profunda antes de que esta se cierre y se forme la zona calcificada del cartílago, misma que ya no se nutre a través de los vasos de la zona subcondral<sup>4</sup>.

### **1.1.7 FACTORES QUE OCASIONAN CAMBIOS EN EL CARTÍLAGO ARTICULAR**

#### **-ENVEJECIMIENTO**

El envejecimiento normal tiene varios efectos en el CA. Conforme avanza la edad, hay una disminución gradual en el número de condrocitos, mismo que se estabiliza aproximadamente a los 30 años de edad y desciende después de estos. En el intento de mantener a la ME, los condrocitos restantes comienzan a ser más

metabolitamente activos e incrementan la tasa de síntesis de colágena y proteoglicanos. Como resultado los condrocitos se ven hipertróficos, y sus organelos incrementan su metabolismo con el fin de cubrir las altas demandas<sup>29,4</sup>.

La matriz extracelular también sufre diversos cambios con la edad, ya que la proporción de colágena y proteoglicanos se reduce, lo que hace que las propiedades elásticas del cartílago disminuyan y por tanto que el cartílago se vuelva quebradizo. Hay cambios en el número, tamaño y composición de las moléculas del agregado de agregán y PG's debido al incremento en la acción enzimática<sup>29,4</sup>.

#### **-LESIONES EN EL CARTÍLAGO ARTICULAR**

Los cambios articulares provocados por lesiones del cartílago articular se hallan caracterizados por el grado de afectación de la composición de la matriz extracelular y esto provoca un daño en los condrocitos<sup>3,36</sup>.

Las tres lesiones típicas del cartílago articular son<sup>3</sup>:

1. Daño microscópico o "blunt trauma": El cual puede ser causado por un impacto simple o repetitivo. Se caracteriza por la pérdida de los componentes de la matriz, principalmente PG's sin que haya daño en los condrocitos; si el daño es de corta duración, los condrocitos pueden ser capaces de reparar el cartílago restaurando los componentes de la matriz, no así, en un daño consecutivo a una lesión repetitiva ya que puede ser irreversible.
2. Fracturas de cartílago: Las fracturas de cartílago resultan de la penetración traumática que altera la superficie articular por lesión de la placa subcondral.
3. Fracturas osteocondrales: El tercer tipo de lesión se describe como defecto de todo grosor o fractura osteocondral. Estas lesiones se caracterizan por una alteración que cruza la línea en el hueso basal, apareciendo daño en condrocitos y afectación

de células de la médula. Las lesiones de todo grosor provocan una respuesta inflamatoria ya que las estructuras vasculares son afectadas. Después de estas lesiones, los fibroblastos, células que segregan colágeno para el desarrollo del tejido fibroso, inician la reparación del tejido, produciéndose cartílago articular anormal (fibrocartilaginoso); después de diversas fases de remodelación, el tejido de reparación tiene un menor contenido en PG's y una sustancia fundamental de colágena tipo I más que de tipo II, por lo que resulta de subóptima calidad que resulta en una función articular comprometida.

#### **-ENFERMEDADES DEL CARTÍLAGO ARTICULAR**

Entre las enfermedades del cartílago, las más comunes son la artritis reumatoide y la osteoartritis. La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune, por lo que ocurren fenómenos inflamatorios en la articulación que acaban produciendo una lesión o daño en las estructuras articulares; en la osteoartritis, en cambio, se produce primero una degeneración por desgaste (lesiones, sobrepeso, etc.) o envejecimiento de las estructuras articulares y sólo más tarde se producen fenómenos inflamatorios leves que intentan reparar las lesiones<sup>37,38,39,40</sup>.

El resultado en ambas es erosión del cartílago, dolor por la fricción de los huesos y por tanto dificultad para el movimiento normal (Fig. 10)<sup>40</sup>

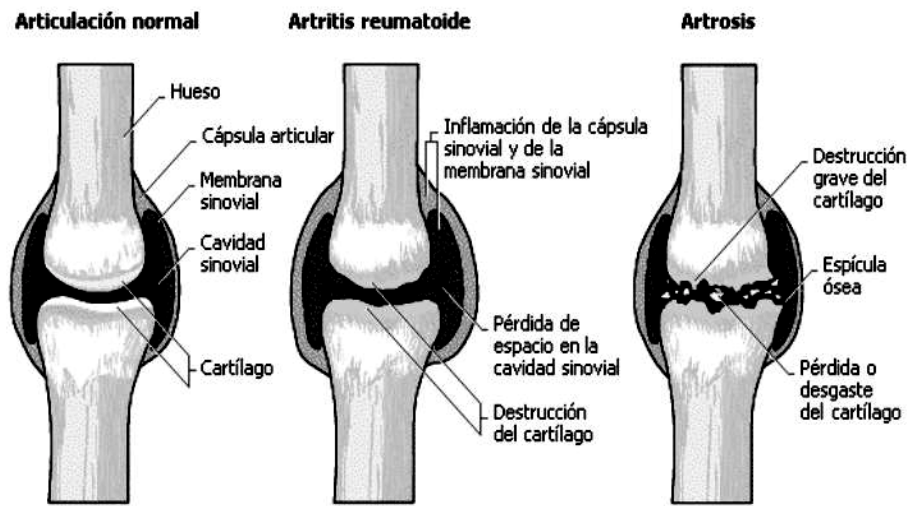


Fig. 10. Diferencias entre dos enfermedades en la que el cartílago se va destruyendo, siendo la Osteoartrosis o artrosis, la artropatía más frecuente.



## **CAPÍTULO II**

---

---

# **OSTEOARTROSIS**

## CAPÍTULO II: OSTEOARTROSIS

---

### 2 OSTEOARTROSIS

De todas las muchas variedades de artritis, la Osteoartritis u Osteoartrosis (OA) es la más común<sup>41,34</sup>; se define como una enfermedad articular crónico-degenerativa inicialmente no inflamatoria caracterizada por degeneración del cartílago articular, hipertrofia del hueso en sus márgenes y cambios en la membrana sinovial<sup>42</sup>. Ocurre cuando el cartílago, que normalmente cubre y acolcha las terminaciones de los huesos, se erosiona dejando expuestas las superficies óseas por lo que comienzan a rozar directamente unas con otras provocando que se formen aposiciones óseas secundarias (osteofitos) y que la articulación pierda su forma y alineación, resultando una articulación hinchada, rígida y dolorosa. Además, pedazos de hueso y cartílago pueden romperse y flotar dentro del espacio de la articulación causando más dolor y daño<sup>8,32,39,42</sup>.

Normalmente, la producción de la matriz extracelular es relativamente baja y los condrocitos son capaces de sintetizar proteoglicanos, colágena, fibronectinas y otros componentes necesarios para mantener la homeostasis e integridad articular (Fig. 11), sin embargo, cuando un traumatismo crónico o una enfermedad alteran su homeostasis, el cartílago articular puede tener una progresiva degeneración resultando en una osteoartrosis, en la cual se inician alteraciones de la superficie, y se incrementa la liberación de enzimas por condrocitos provocando que el contenido de proteasas e hidrolasas aumente junto con los procesos reparativos al intentar disminuir el daño. Cuando la actividad de síntesis no se mantiene en equilibrio con los procesos degradativos, sobreviene entonces una pérdida neta y progresiva de cartílago, no se logra establecer la arquitectura original de las fibras de colágena y se depositan colágena tipo III y tipo I en lugar de tipo II, lo que provoca la formación de fibrocartílago

como sustituto ineficaz del CA hialino. El fibrocartilago llega a desprenderse permitiendo que el líquido sinovial penetre hacia los espacios medulares formando quistes óseos subcondrales y exponiendo hueso sobre la superficie articular. Al mismo tiempo continúa la esclerosis del hueso subcondral, desarrollándose los sobrecrecimientos del hueso marginal u osteofitos<sup>4,43</sup>.

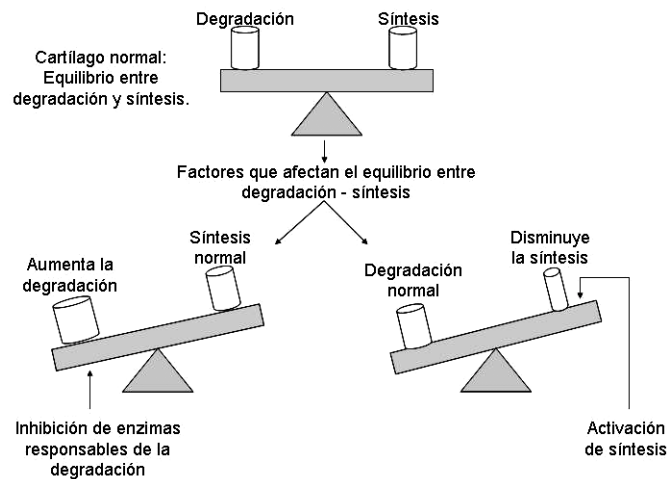


Fig. 11. Forma en que se mantiene el equilibrio entre destrucción o síntesis de los componentes de la matriz, aunque no siempre puede reestablecerse.

Además, el contenido de agua aumenta, ocasionando pérdida de resistencia del cartilago, esta hidratación aparece como el resultado de la división de colágena tipo II por la colagenasa, al romperse la colágena funcional los proteoglicanos obtienen cantidades incrementadas de agua, ocasionando pérdida de resistencia del cartilago. Por otro lado, las moléculas de PG's que se sintetizan tienen una composición anormal, dado que la concentración de keratán sulfato está disminuida, la longitud de la cadena del condroitín sulfato se halla reducida y las subunidades de proteoglicanos recién sintetizadas no demuestran agregación normal de ácido hialurónico. Este fallo en proteoglicanos y colágena se debe a un incremento en las metaloproteinasas (MMP), proteínas séricas, enzimas lisosomales y otras proteínas en la superficie articular en el período reciente de la degeneración. Aunque esta actividad enzimática, se regula por la presencia en el tejido de inhibidores de las metaloproteinasas (TIMPs), en la

enfermedad osteoartrósica este mecanismo se ve sobrepasado. Como resultado, los condrocitos son sometidos a traumatismos y estrés mecánico, lo que acelera el proceso osteoartrósico<sup>1,4</sup>.

## **2.1 DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR OSTEOARTRÓSICO**

El condrocito produce citoquinas, tales como: Interleucina-1 (IL-1) y factor necrosante tisular- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) en condiciones de estrés, las cuales, estimulan a los condrocitos para sintetizar metaloproteinasas y proteínas séricas, así como para frenar su biosíntesis proteica. La IL-1, a su vez, induce la formación de óxido nítrico (ON) quien se difunde rápidamente y estimula la actividad de MMP<sup>4,32</sup>. Fragmentos de fibronectina y otras moléculas presentes en el tejido dañado, pueden promover la producción e incrementar la liberación de proteasas, así como aumentar la actividad catabólica y los niveles de citoquinas<sup>4</sup>.

En la OA, la expresión y el contenido de metaloproteinasas (Tabla 2) aumenta la desnaturalización de la colágena tipo II por las colagenasas observándose en primer instancia alrededor de los condrocitos y extendiéndose a la matriz territorial e intrateritorial con el desarrollo de la lesión, por lo que sólo se ve en la zona profunda, junto al hueso subcondral, cuando la enfermedad está muy avanzada. Por otro lado la proteína principal del agregan es degradada por diferentes proteinasas en regiones ricas en condroitín sulfato, lo que provoca la reducción en el tamaño de la molécula de agregan acumulándose únicamente fragmentos<sup>4,32</sup>. Es por ello que las enzimas que degradan las moléculas de la matriz (MMP) del CA tienen un papel crucial en la degeneración progresiva de la articulación al destruir al agregan y a la colágena. La pérdida de la matriz del cartílago va acompañada por el incremento en el porcentaje de muerte celular programada o apoptosis de los condrocitos en las áreas de degeneración del CA<sup>4</sup>.

Estromelisinina 1	(MMP-3)
Gelatinasa A	(MMP-2)
Gelatinasa B	(MMP-9)
Colagenasa 1	(MMP-1)
Colagenasa 2	(MMP-8)
Colagenasa 3	(MMP-13)
Matrilisina	
Catepsina B	
Catepsina D	
Activador de plasminogeno	

Tabla 2. Enzimas presentes en el CA, cuyo efecto se ve incrementado en la OA

## 2.2 SIGNOS Y SÍNTOMAS

Las molestias pueden ser leves o verdaderamente incapacitantes, principalmente ocurre dolor de las articulaciones que se caracteriza por aumentar después de la inmovilización prolongada y de la actividad física, también, pueden ser provocados o aumentar por los cambios de temperatura al frío como al calor excesivo. Pocas veces se asocia a inflamación, ya que, contrario a lo que sucede en la artritis reumatoidea, ésta es consecuencia de la destrucción de los tejidos y no su causa. También puede haber sensación de rigidez en las articulaciones al empezar a movilizarlas y crepitación (tronido) articular. Puede ocurrir deformación discreta de ciertas articulaciones, como por ejemplo en las últimas falanges de los dedos o aumento de volumen en las rodillas<sup>9,11,25,39</sup> (Fig. 12, Tabla 3).



Fig. 12. Radiografía que muestra presencia de osteofitos (flechas) provocando deformidad

SÍNTOMAS	SIGNOS
Dolor: pobremente localizado, con el uso y con el descanso	Ensanchamiento del hueso de la articulación
Rigidez: corta duración y limitado a ciertas articulaciones	Rayos X: Osteofitos, reducción de espacios articulares
Crepitación	Limitación del movimiento
Debilidad	Deformación de algunas articulaciones

Tabla. 3. Signos y síntomas característicos en la Osteoartrosis

### 2.3 INCIDENCIA Y FACTORES DE RIESGO

Esta enfermedad sobreviene con el envejecimiento ya que el 85% de personas mayores de 70 años presentan signos radiológicos de osteoartrosis, sin embargo es frecuente que estos cambios radiológicos no tengan manifestaciones clínicas<sup>43</sup>, debido a que su desarrollo es lento. Puede afectar sólo las articulaciones de un lado del cuerpo y tiene predilección por las interfalángicas distales (IFD), que desarrollan los llamados nódulos de Heberden; las interfalángicas proximales (IFP), con los nódulos de Bouchard; las primeras carpometacarpianas, y las articulaciones de caderas, rodillas, columna lumbar y cervical<sup>45,46,47,48</sup> (Fig. 13). En general las articulaciones no se inflaman ni enrojecen, y no afecta la salud en general como ocurre en la artritis, aunque sí afectan considerablemente la calidad de vida de las personas por la pérdida de movimiento y el dolor<sup>11</sup>.

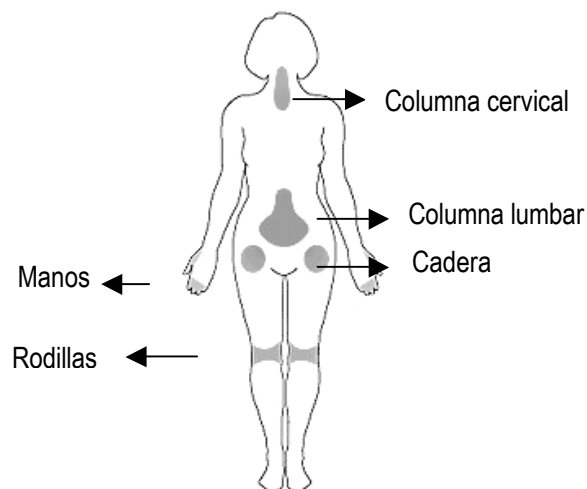


Fig. 13. Áreas anatómicas donde las lesiones de OA son frecuentes: columna cervical y lumbar, cadera, rodillas y manos. En ésta última, se afectan las IFD, IFP y las primeras carpometacarpianas

En los últimos años su incidencia ha aumentado en jóvenes deportistas que realizan ejercicios fuertes que sobrecargan sus articulaciones<sup>35</sup>. En consecuencia, la OA, se ha clasificado en dos tipos: primaria (degenerativa) y secundaria (traumática). La primaria es más común en mujeres mayores de 60 años y se manifiesta en las articulaciones que soportan peso como las rodillas, columna lumbar, cadera y en menor medida en pies, manos y rodillas. La osteoartrosis secundaria es más frecuente en hombres menores de 50 y generalmente es causada por factores externos como fracturas, lesiones o traumas, también puede presentarse en niños por estas mismas causas o por alteraciones congénitas<sup>41,46,9,11</sup> (Fig. 14).

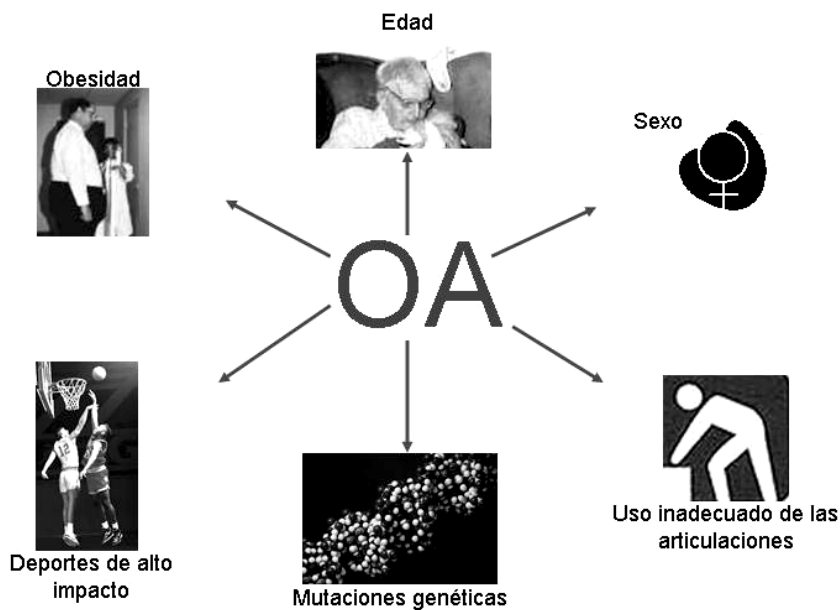


Fig. 14. Factores de riesgo para el desarrollo de Osteoartrosis

Aunque, el movimiento y la actividad son esenciales para tener cartílagos, articulaciones e intercambio de líquido sinovial sanos<sup>49</sup>; como ya vimos, los accidentes, lesiones, enfermedades o el envejecimiento normal pueden causar problemas en las articulaciones, afectando al hueso, cartílago articular o tejidos blandos (ligamentos, tendones y membrana sinovial) que rodean las articulaciones. Es por ello que es de suma importancia considerar que aunque el diseño de la articulación permite soportar un trabajo de gran intensidad, es necesario acostumbrar al organismo antes de

someterlo a un esfuerzo fuera de lo normal, ya que de no ser así, la estructura articular, puede perder su capacidad para amortiguar el peso y la relación con los demás componentes. Aunado a esto, la membrana sinovial que se encargaba de la lubricación del espacio articular se irá destruyendo y con ella, más adelante, el mismo hueso que constituye la articulación a la que debían proteger<sup>49,25,50</sup>.

## **2.4 DIAGNÓSTICO CLÍNICO**

A partir de 1950 se han diseñado diversos criterios para la clasificación y el diagnóstico de la osteoartrosis; éstos pueden dividirse en radiológicos, clínicos y artroscópicos, que generalmente hacen referencia a cada una de las regiones anatómicas relevantes (manos, rodillas, caderas y esqueleto axial). Así mismo, existen diferentes instrumentos para evaluar el estado funcional y la discapacidad en esta enfermedad. Entre los más empleados se encuentra el llamado WOMAC (índice de osteoartrosis de la Western Ontario y de la MacMaster University) mediante el cual se califica al dolor, la rigidez y el funcionamiento físico<sup>51</sup>.

- Radiológicos: Los Rayos X, son sumamente informativos, ya que generalmente muestran una reducción en los espacios de las articulaciones (Fig. 15), REF. 9 esclerosis del hueso subcondral, formación de osteofitos en los márgenes articulares pequeñas áreas pseudoquísticas con paredes escleróticas. Además de que nos permite distinguir a la OA de otros tipos de artritis<sup>40,47,45</sup>.
- Clínicos: No existe una prueba de laboratorio específica para el diagnóstico de osteoartrosis. En la mayor parte de las ocasiones los análisis clínicos son normales o negativos; su utilidad radica en que algunos exámenes podrían ser importantes en la investigación de posibles causas de osteoartrosis secundaria. Para descartar de la artritis reumatoide, una prueba de velocidad de sedimentación globular (VSG) ayuda, ya que es elevada en estos pacientes y normal en OA<sup>52,45</sup>.



- Artroscópicos: Mediante artrocentesis<sup>47,52,51</sup> puede obtenerse un líquido sinovial “no inflamatorio”, con discreto aumento en su celularidad y predominio de células mononucleares. El valor fundamental del análisis del líquido sinovial es descartar otras posibilidades diagnósticas, especialmente la seudogota por pirofosfato cálcico<sup>51</sup>.

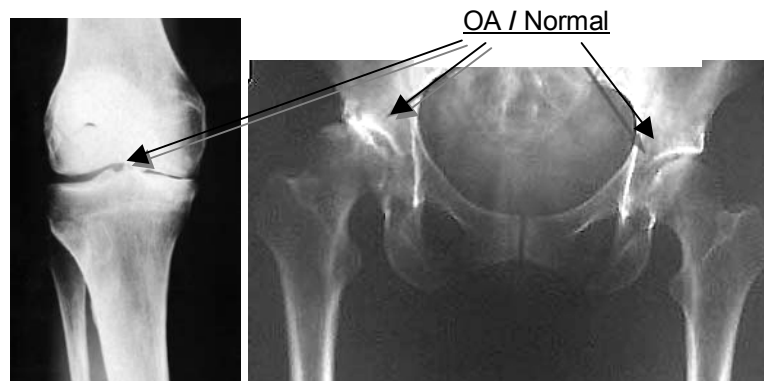


Fig. 15 Radiografía que muestra como se observa una cadera y rodilla osteoartrosicas y una cadera normal

## 2.5 TRATAMIENTO

Desafortunadamente, no existe una cura para la OA; sin embargo, existen tratamientos cuyo objetivo es la de ayudar a aliviar el dolor, disminuir la inflamación y evitar al máximo la incapacidad funcional, centrándose en el manejo de sus manifestaciones clínicas, y en menor grado en su prevención, por lo que debe individualizarse para cada paciente<sup>54</sup>, por lo que deberá tenerse en cuenta: la articulación afectada, edad del paciente, severidad de los síntomas y del desgaste y condiciones asociadas<sup>11,45,53</sup>.

- TRATAMIENTO NO FARMACOLÓGICO: Los programas de educación para el uso adecuado de las articulaciones, son parte primordial de la rehabilitación (higiene articular). Del mismo modo, la fisioterapia juega un papel muy importante para mantener la fuerza muscular y movilidad articular<sup>32,54</sup> debido a que si no se realizan ejercicios, los músculos comienzan a debilitarse, incapacitándose para sostener a las articulaciones incrementando el daño articular, además de que se ha comprobado que es más probable que el hueso se desintegre y que pierda su

estructura cuando existe inmovilidad que cuando se le mantiene en ejercicio moderado<sup>25</sup>, es por ello, que se deben planificar programas de ejercicios para cada enfermo, complementando en los casos necesarios con electroterapia (onda corta) y termoterapia (calor local). Los aparatos ortopédicos, como los bastones y muletas pueden ser útiles en determinados momentos de la evolución de la enfermedad para permitir cierto reposo articular y evitar daños mayores como desviaciones, bloqueos o caídas<sup>45,54,55</sup>.

- TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO: Puesto que en la articulación no existe ningún tratamiento que pueda modificar la evolución de la enfermedad, los medicamentos empleados serán aquellos para controlar el dolor e inflamación que produce la enfermedad<sup>2,39,54</sup>.

Actualmente, se usan con mayor frecuencia, los inhibidores COX-2 (ciclooxigenasa-2), enzima que estimula la respuesta inflamatoria, que además de ser anti-inflamatorios no lesionan la mucosa gástrica y por consiguiente no provocan la formación de úlceras. Las formas disponibles de este tipo de fármaco son Celebrex (celecoxib), Bextra y Vioxx (rofecoxib), las cuales pertenecen al grupo de drogas anti-inflamatorias no esteroideas (AINES)<sup>10,32,39,56</sup>.

Otros AINES (en inglés NSAID's)<sup>57</sup>, son: ibuprofen, aspirina, naproxeno y acetaminofén, cuyo mecanismo de acción se da a través de la inhibición de la biosíntesis de prostaglandinas (sustancias que contribuyen al dolor e inflamación) a partir del ácido araquidónico. También protegen el revestimiento del estómago y ayudan a mantener el funcionamiento renal. Por tanto, al disminuir los efectos inflamatorios, también se disminuyen sus beneficios protectores ocasionando irritación estomacal, como úlceras o hemorragia gastrointestinal y a largo plazo alteraciones renales. El efecto biológico, al suplir los mediadores de la inflamación, humorales y celulares, además de modificar el metabolismo del tejido conjuntivo, se traduce en menor activación y agregación de neutrófilos, liberación de enzimas

lisosomales y radicales superóxido. Dichos efectos sobre plaquetas, linfocitos, macrófagos, sinoviocitos, fibroblastos, condrocitos y otras células reducen la destrucción sobre cartílago y hueso<sup>2,10,39,42</sup>.

El sulfato de glucosamina y el condroitín sulfato se usan como condroprotectores, estimulan la síntesis de matriz extracelular de cartílago y parece que ejercen un control moderado sobre el dolor articular, si bien los estudios realizados no muestran resultados totalmente definitivos. Los corticoides intra-articulares pueden ser eficaces en casos puntuales<sup>4,54</sup>.

También pueden emplearse esteroides que se inyectan directamente en la articulación para reducir la inflamación y el dolor<sup>32,39</sup>.

Recientemente se ha utilizado un nuevo tratamiento, que consiste en inyectar en las articulaciones de la rodilla sustitutos de ácido hialurónico (Hyalgan) y el hilán G-F 20 (Synvisc), lo que permite un alivio temporal de algunos meses<sup>10,32,45</sup>. Esta terapia ha mostrado ser la más efectiva para aquellos pacientes que padecen de osteoartritis leve a moderada. No son comunes los efectos colaterales, pero estos podrían incluir dolor, hinchazón y enrojecimiento del lugar de la inyección<sup>10</sup>.

- CIRUGÍA: Indicada en las fases tardías de la enfermedad cuando existe dolor refractario o importante trastorno funcional. Existen cuatro procedimientos quirúrgicos:
  - *Osteotomía*: Sección quirúrgica del hueso para cambiar la dirección del mismo y corregir la distribución de cargas, aliviando la tensión sobre el hueso o la articulación<sup>44,58</sup>
  - *Artroscopía*: Técnica quirúrgica que permite examinar el interior de una articulación, identificar cambios patológicos y realizar intervenciones por visualización directa; para ello, se utiliza una lente o visor de pequeño tamaño

conectado a una cámara de vídeo y por otra parte un instrumental adecuado y variado para realizar las distintas intervenciones a través de pequeñas incisiones o portales de aproximadamente 5mm de longitud. El artroscopista trabaja observando una pantalla de TV, mientras sus manos manejan los pequeños instrumentos<sup>52,60,10,59</sup>.

- *Artrodesis* (o fusión articular, útil en columna y pequeñas articulaciones): Operación quirúrgica para conseguir la anquilosis (abolición completa o parcial de los movimientos de una articulación móvil) de la articulación. Se la denomina también anquilosis artificial. Usualmente se realiza en la columna vertebral<sup>1,32,44</sup>.

- *Artroplastia o reemplazo articular*: Es la intervención mediante la cual se retira la superficie articular gastada con el hueso adyacente y se coloca en su lugar un componente protésico de metal o polietileno. Se realiza con anestesia general o regional y requiere un período de hospitalización de unos tres a cinco días. Su realización, debe considerarse cuando se ha producido un desgaste tal de la articulación que no permite al paciente realizar sus actividades básicas cotidianas por la intensidad y persistencia del dolor, que en casos extremos puede incluso alterar el sueño normal y limitar la marcha a tan sólo unas pocas cuerdas o, incluso, impedirle salir a la calle. Este procedimiento se realiza en las articulaciones de cadera y rodilla, principalmente<sup>1,9,11,53</sup>.

- *Lavado articular*. Tiene como objeto drenar el contenido articular para dar salida a productos de reacción articular y detritos, disminuir la presión de la articulación y así aliviar el dolor. Consistente en la introducción de suero fisiológico frío, con una determinada presión y ritmo, a través de un sistema de entrada y salida de la articulación, lo que permite la eliminación de los "detritos" intra-articulares que perpetúan la degradación del cartílago, lo que asociado a las nuevas terapias de viscosuplementación con ácido hialurónico evita en gran medida la progresión y la sintomatología asociada. Estos lavados se hacen cada doce horas los dos

primeros días, del tercero al séptimo cada veinticuatro horas y posteriormente en días alternos, dependiendo de la evolución<sup>45,61</sup>.

Las investigaciones actuales están orientadas a desarrollar fármacos modificadores de la enfermedad, que detengan o al menos limiten los daños a nivel del tejido cartilaginoso y del hueso subcondral. Entre estos están algunas tetraciclinas modificadas químicamente, inhibidores de metaloproteinasas y antagonistas de los receptores para IL-1. Así mismo, los trasplantes autólogos de cartílago ofrecen alternativas para aquellos pacientes en estadios iniciales de la enfermedad o en quienes tienen defectos locales de la matriz cartilaginosa. Entre tanto, la educación y el control de los factores de riesgo desencadenantes de la enfermedad continúa siendo la mejor de las estrategias<sup>32</sup>.

## **CAPÍTULO III**

---

---

## **APOPTOSIS**

## CAPÍTULO III: APOPTOSIS

---

### 3. APOPTOSIS

En la primera mitad del siglo XX, se determinó que la muerte celular resulta imprescindible en el desarrollo embrionario. En los años cincuenta se demostró que ciertos organismos pluricelulares alcanzan su morfología final eliminando determinadas células seleccionadas<sup>62</sup>.

Dado que el desarrollo embrionario de muchos tejidos exige una proporción considerable de muerte celular<sup>63,64</sup>, más del 80% de todas las células nacidas en el sistema inmune mueren, y más del 50% de todas las células nerviosas se autodestruyen en el curso del desarrollo del sistema nervioso central (SNC). En el SNC las células nerviosas tienen que construir una compleja red de conexiones sinápticas para formar el cerebro, dichas conexiones son establecidas al parecer por la competencia entre células, sobreviviendo las que lo consiguen y muriendo las que no lo logran<sup>62,65</sup>.

Por otro lado, durante el desarrollo de los vertebrados, excepto palmípedos, las células situadas entre los dedos de la mano y el pie mueren para así formar los dedos<sup>3,4</sup>. Otro ejemplo de muerte celular ocurre con las células del sistema inmune que reaccionan potencialmente contra el organismo hospedero mediante dos posibles mecanismos: el primero implica la pérdida de factores de supervivencia o factores tróficos como la IL-2 (Linfocitos T) y el segundo depende de la molécula de Fas (proteína que se sitúa en la membrana celular). Las células T latentes producen pequeñas cantidades de Fas y cuando se encuentran con un antígeno se activan produciendo más Fas y ligando de Fas (FasL); el FasL presente en las células activadas, se une al Fas de las células en el sitio desencadenante de la infección; esa unión es la señal para que las células portadoras de Fas sufran apoptosis<sup>62,66</sup>.

Estos tipos de muerte son considerados como muerte celular programada (MCP) o apoptosis, término griego que en el año de 1972 introdujeron Kerr, Wyllie y Currie para definir las características morfológicas particulares de un tipo de muerte celular fisiológica que no sólo es importante durante el desarrollo embrionario sino también en el adulto, diferenciándola de la necrosis, muerte accidental que no forma parte del desarrollo normal dado que resulta de la pérdida de sincronización funcional entre los procesos bioquímicos y las estructuras macromoleculares que constituyen a la célula<sup>67</sup>.

El nombre de apoptosis proviene del griego apo=de, desde y ptosis=caída, que describe la caída de las hojas de los árboles o de los pétalos de una flor<sup>7</sup>. Apoptosis, entonces, se define como un programa de “suicidio” estrictamente regulado por genes que lleva a la célula a darse muerte<sup>67,68,69</sup> como respuesta a un conjunto de señales diversas, como lesiones físicas y genéticas, condiciones de presión, presencia o ausencia de hormonas o drogas, ATP, bajos niveles de presión hidrodinámica, dilatación del retículo endoplásmico, privación de oxígeno o nutrientes, pérdida de contacto con las células vecinas o infecciones por virus. Estas señales pueden actuar sobre receptores de superficie y causar la activación en cascada de proteínas citoplasmáticas, ocasionando con ello la activación de un programa genético que conduce, generalmente, a la nucleólisis por la acción de las endonucleasas<sup>70</sup> (Fig.16).



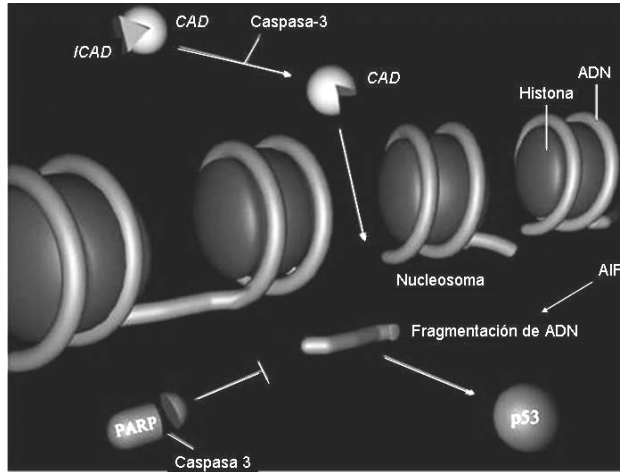


Fig. 16. La fragmentación del ADN en unidades nucleosomales es dependiente de la DNasa CAD (DNasa activada por caspasas), que es separada de su inhibidor ICAD (inhibidor de CAD), al ser secuestrado por la caspasa-3. La fragmentación del ADN, también es inducida por AIF (factor inductor de apoptosis) que es liberado por la mitocondria y no requiere de la intervención de caspasas<sup>70,71,72</sup>.

Este mecanismo de muerte celular se produce continuamente en muchos tejidos del organismo, constituyendo un aspecto esencial en el mantenimiento de importantes fenómenos fisiológicos como son: embriogénesis, homeostasis, renovación tisular y desarrollo, así como el funcionamiento del sistema inmune (Fig. 17) por medio de la eliminación de células: 1) dañadas o inservibles, 2) que han completado su ciclo de vida y/o 3) que representan un daño potencial a causa de mutaciones. Es por ello que la desregulación de los genes que codifican las proteínas relacionadas con la apoptosis, pueden ser causa del desarrollo de diversas patologías<sup>62,63,64</sup>.

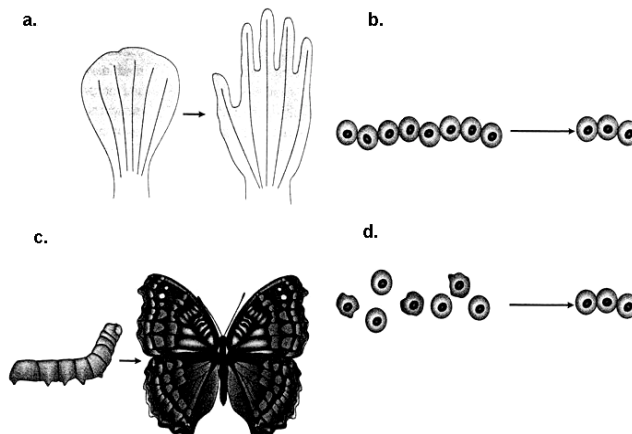


Fig. 17. La apoptosis, esta involucrada en la formación de estructuras durante el desarrollo embrionario (a), controla el número celular (b) elimina estructuras (c) y células anormales o que ya han cumplido con su ciclo de vida (d).

### 3.1 APOPTOSIS Y NECROSIS.

Durante la APOPTOSIS, las células pierden contacto con las células vecinas, disminuyen su tamaño (se contraen), adquiriendo en la membrana celular un aspecto burbujeante característico ("blebbing"), presentan empaquetamiento de cromatina en forma homogénea hacia la envoltura nuclear, el ADN celular presenta fragmentación internucleosomal con segmentos múltiples de 180-200 pb (fraccionamiento del ADN por el extremo 3' en forma de "escalera" en gel de agarosa) Fig.18, toda la célula se fragmenta en vesículas membranales con contenido intracelular, llamados cuerpos apoptóticos que son rápidamente fagocitados por las células vecinas o macrófagos<sup>62,68</sup>, proceso en el que se requiere de niveles intracelulares de ATP y señales de reconocimiento como la externalización de la fosfatidilserina<sup>68,70</sup>.

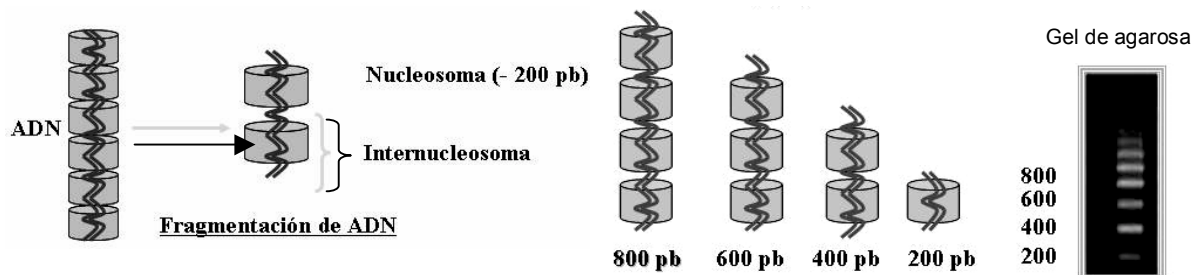


Fig. 18. Fragmentación del ADN (internucleosomal) que da como resultado segmentos múltiples de 180-200 pb, mismos que se observan en un gel de agarosa en forma de "escalera".

Por otro lado, en la muerte celular por NECROSIS, la célula al igual que sus organelos internos se hincha o mantiene su tamaño, el agua y las partículas cargadas principalmente de iones de sodio y calcio entran, la cromatina se torna muy densa dando un núcleo picnótico y generalizado, hay fusión y pérdida de la integridad de la membrana celular y por tanto liberación de citoplasma y contenido de los organelos al medio intersticial. Las células del sistema inmune son atraídas al área y producen citocinas que generan una respuesta inflamatoria. A diferencia de la apoptosis ninguno de estos cambios está determinado genéticamente<sup>62,68</sup> (Fig. 19).

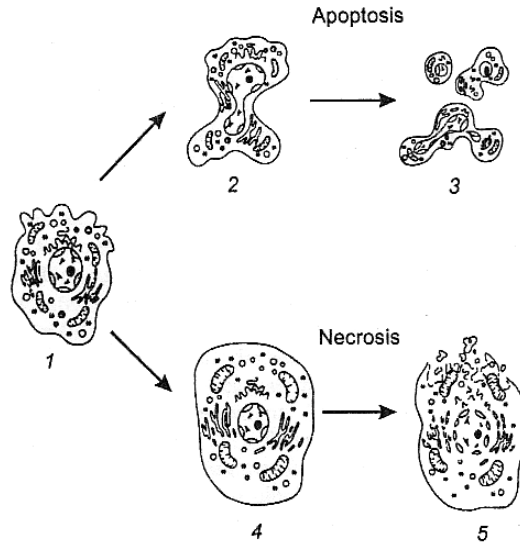


Fig. 19. Cambios ultraestructurales que resultan de la necrosis y apoptosis: 1. Células normales; 2. Célula apoptótica con aspecto burbujeante (“blebbing”) y disminución de tamaño; 3. Formación de cuerpos apoptóticos; 4. Célula hinchada; 5. Desintegración de la célula y liberación de citoplasma al medio intersticial.

Recientemente, se ha observado un tipo de muerte celular que comparte características morfológicas y moleculares con ambos tipos de muerte: apoptosis y necrosis. Por lo que se le dio el nombre quimérico de *aponecrosis*.<sup>73,74,75</sup> Formigli L y co. observaron que la inhibición de la caspasa-3 causa un claro cambio de aponecrosis a necrosis *in vitro*, lo que sugiere que este tipo de muerte resulta de la incompleta ejecución de la apoptosis seguida de la degeneración en necrosis dependiendo del grado de daño presentado, siendo entonces, la apoptosis y la necrosis los extremos de una forma de muerte celular<sup>73</sup>. Este tipo de muerte ha sido observada en estudios *in vivo*, en células tumorales de cáncer de mama<sup>74</sup> y en células hepáticas<sup>75</sup>, lo que confirma que la aponecrosis puede ser el resultado de la ejecución incompleta del programa de apoptosis, que List y Jäättelä definen como “necrosis like”<sup>71</sup>.

Estos dos últimos autores, definen como “apoptosis like” a todos los tipos de muerte celular independiente de caspasas (como AIF) que sufren cambios similares a la apoptosis, (externalización de fosfatidilserina, condensación de cromatina), así como la muerte de células oscuras que se caracterizan por no sufrir fragmentación nuclear, como sucede en neuronas y en algunos casos en condrocitos<sup>71</sup>.

Por lo anterior, en un futuro próximo, la clasificación deberá de ser determinada por las vías moleculares que activan la muerte celular y no por morfología, lo que va a requerir del desarrollo de tecnologías más sofisticadas para las proteínas apoptóticas<sup>70</sup>.

### 3.2 MECANISMO MOLECULAR DE LA APOPTOSIS

El mecanismo molecular en que se basa la apoptosis se ha conservado muy bien a lo largo de toda la evolución, y buena parte del conocimiento que se tiene de su naturaleza procede del estudio del nematodo *Caenorhabditis elegans*. La sencillez del gusano permite detectar con relativa facilidad las formas mutantes en las que muere un número excesivo o insuficiente de células; esto ha llevado a identificar los tres principales genes reguladores de la muerte celular del nematodo. Dos de estos genes, llamados ced-3 (ICE-enzima convertidora de IL1  $\beta$ ) y ced-4, inducen la muerte celular, así como egl-1, mientras que ced-9 antagoniza la acción de estos genes facilitando la supervivencia celular<sup>68,76,63,64</sup> (Fig.20).

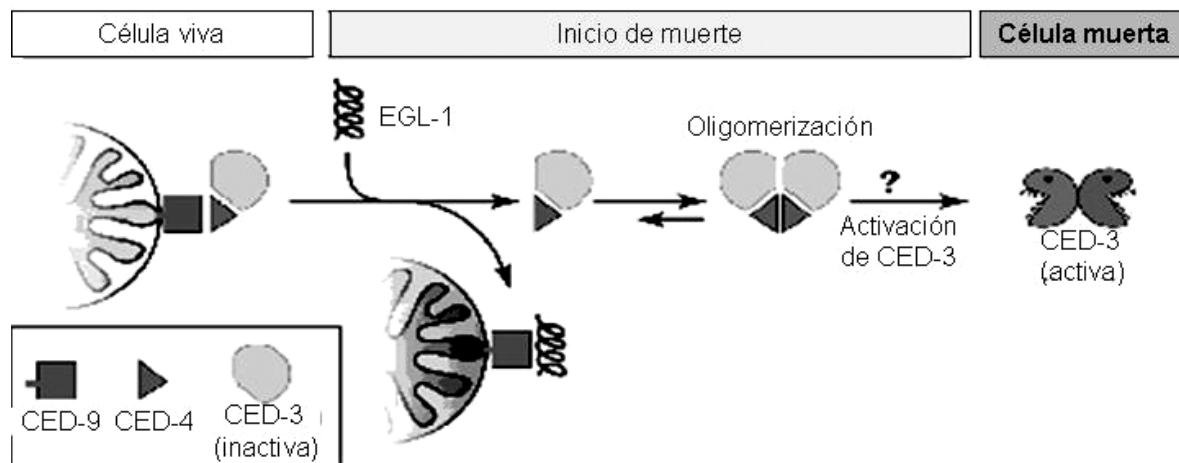


Fig. 20. ced-9 es una proteína que cubre la membrana externa de la mitocondria, a ced-4 y a ced-3. Esto mantiene inactiva a ced-3 y por lo tanto a la célula viva. Sin embargo, cuando egl-1 desplaza al complejo ced-3/ced-4 de ced-9, éste complejo, una vez libre, oligomeriza volviéndose un complejo activo que induce la apoptosis en la célula.

En el hombre se han encontrado equivalentes de estos cuatro genes. El gen ced-3, está emparentado con una familia de genes humanos que codifican las enzimas proteicas caspasas (proteasas cisteina con especificidad por el aspartato), que

actúan principalmente en el núcleo y en el citoplasma, y que escinden otras proteínas. Así mismo, el gen *ced-4* se encuentra relacionado con la proteína Apaf-1; *ced-9* con las proteínas de la familia de genes humanos Bcl-2 anti-apoptóticos y *egl-1* con las proteínas Bcl-2 pro-apoptóticas<sup>62,68,76,77</sup> (Fig. 21).

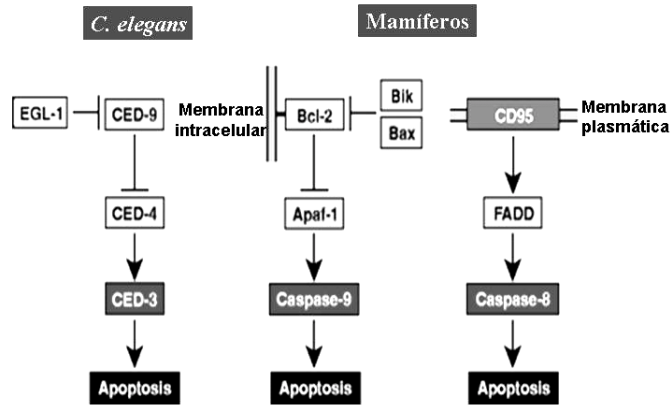


Fig.21. Homología de genes de los mamíferos con el nematodo *C. elegans*.

El proceso de apoptosis está constituido por 4 etapas: Señales de muerte o estímulos inductores, etapa de iniciación; etapa de ejecución y remoción por fagocitosis<sup>78</sup>.

### 3.2.1 Estímulos inductores:

Los estímulos inductores o señales de muerte, pueden ser de dos tipos<sup>70</sup>:

- INTERNOS: Tiroxina-cinasa, ceramidas, receptor de esteroides, fosfato de inositol y receptor de citocinas
- EXTERNOS: Radiaciones, agentes quimioterapéuticos (glucocorticoides), citocinas, disminución de suero y productos de genes.

El **Etoposido o VP-16**, es un anticancerígeno que actúa como inductor externo, afectando de diversas maneras a la célula.

Puede inhibir a la topoisomerasa II, lo que provoca que quede unida covalentemente al extremo 5' de la molécula de ADN evitando que finalice la replicación<sup>122,123,124,125</sup>. De la misma manera, puede activar directamente a endonucleasas<sup>127,132</sup> como la DNAS1L3 provocando la fragmentación internucleosomal<sup>126</sup>. Estos cambios u alteraciones que sufre el DNA causan que p53 se active, favoreciendo la expresión de Bax<sup>86</sup>, quien se trasloca a la mitocondria, en donde homodimeriza, alterando los cambios de potencial transmembranal mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ), permitiendo la formación de poros transmembranales que facilitan la salida del citocromo c<sup>68,78,81,83</sup> que junto con el ATP se une al factor activador de apoptosis (Apaf-1), para que finalmente a través, de su dominio reclutador de caspasas (CARD) se una a la procaspasa-9 (constituida por un prodominio, subunidad larga y subunidad corta)<sup>93,94,70</sup> formándose el apoptosoma<sup>78,81</sup>. Una vez formado el apoptosoma, la procaspasa-9 pierde su prodominio, quedando como caspasa-9 activa quien a su vez activa a la caspasa-3 provocando una disrupción en las proteínas del citoesqueleto y la activación de la DNasa activada por caspasa (CAD) por medio de su unión al inhibidor de DNAsas activadas por caspasas (ICAD)<sup>70,71,72</sup>, llevando a la célula a morir por apoptosis. Al mismo tiempo que el citocromo c, es liberado también se libera: Smac (segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria) / DIABLO (proteína con bajo Ip que bloquea directamente a las proteínas inhibidoras de apoptosis –IAP-) bloqueando a las proteínas inhibidoras de apoptosis como son las X (XIAP's), quienes se encontraban inhibiendo a la caspasa-9 y caspasa-3. Otra proteína (liberada por las mitocondrias) es el factor inductor de apoptosis (AIF), quien induce la formación de fragmentos de cromatina por medio de la activación de DNAsas (Fig. 22). Por otro lado, se ha observado que las mitocondrias, contienen procaspasa-3 y procaspasa-9, que son liberadas al citoplasma en donde son activadas<sup>81,70,82,89</sup>.

Este antineoplásico puede inducir la forma activa de las caspasas-3, caspasa-9 y caspasas-8<sup>124,127,130,131</sup> e incluso inducir la liberación de cit c<sup>123,127,131</sup> de manera directa, a través de p53<sup>124</sup> o inhibiendo Bcl-2<sup>128,131</sup>. Así como fragmentar a la polimerasa poli (ADP-ribosa), inactivándola<sup>127,129</sup>.

Todas estas vías, culminan en la muerte de la célula por apoptosis. La vía por la que muera la célula va a depender del tipo celular, de la dosis y del tiempo de exposición; por lo que puede variar la morfología entre un tipo celular y otro e incluso de una célula a otra, aún del mismo tipo.

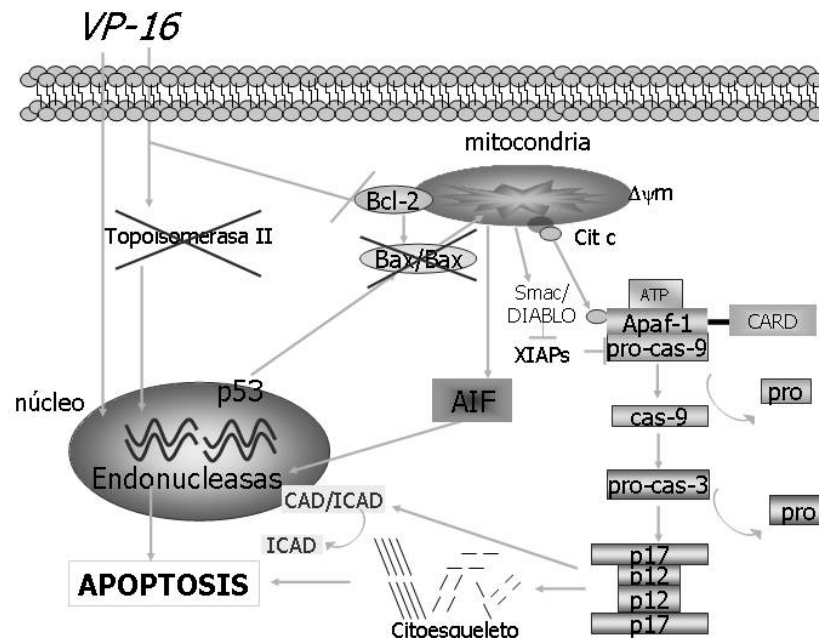


Fig. 22. Posibles vías de activación de apoptosis mediante el inductor antineoplásico VP-16

### 3.2.2 Etapa de iniciación:

#### 3.2.2.1 Vía receptores de muerte

- INTERACCIÓN RECEPTOR-LIGANDO: Existen receptores de membrana que transmiten señales iniciadoras de apoptosis al estar en contacto con sus ligandos específicos. Los receptores mejor caracterizados son: TNFR1 (receptor del factor de necrosis tumoral 1), DR4/DR5 y Fas o CD95, los cuales son factores ricos en cisteína con un dominio membranal, activados por TNF (factor de necrosis tumoral) o p55, TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF) y ligando de Fas o CD95 (FasL o CD95L), respectivamente. Una vez activado el receptor traduce la señal apoptótica vía el dominio de muerte en el C-terminal en un mecanismo basado en la interacción proteína-proteína<sup>79,80</sup>.

- SEÑALIZACIÓN INTERMEDIARIA: Se da por medio de proteínas que interactúan en dominios citoplasmáticos específicos denominados dominios de muerte (DD). Estos dominios citoplasmáticos de aproximadamente 80 aminoácidos fueron identificados en la apoptosis mediada por receptores TNFR1 y Fas; región que fue identificada como necesaria para la traducción de la señal apoptótica, lo que les atribuyó su nombre. Existen proteínas que contienen el dominio de muerte como son: FADD (dominio de muerte asociado a Fas) o MORT-1 y TRADD (dominio de muerte asociado a TNFR1)<sup>79,80</sup>.

Esta interacción receptor ligando y señalización intermedia actúan de la siguiente forma: El ligando de Fas, es un trímero que al asociarse con su receptor promueve su trimerización y su adaptación con sus DD. Esto permite que la proteína FADD se una con el dominio intracitoplasmático del receptor a través de sus dominios de muerte. FADD, a su vez, contiene un dominio efector de muerte (DED) que permite su unión a la procaspasa-8 quien tiene su propio DED, lo que permite su activación. A todo este proceso, se le conoce como DISC (Complejo de señalización inductora de muerte)<sup>66,79</sup> Fig. 23A. La unión de TNF con su receptor TNFR1 resulta en su trimerización y unión a sus DD intracelulares, permitiendo su unión a la molécula TRADD por medio de la interacción de los DD. TRADD, tiene la habilidad de reclutar a RIP (Proteína que interacciona con el receptor) y TRAF2 (factor 2 asociado a TNF) permitiendo la activación de la vía NF- $\kappa$ B (factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B) y de JNK/Ap-1 (Jun amino terminal cinasa/Ap-1), también puede asociarse con FADD quien permite la activación de la procaspasa-8 (Fig. 23B). TRAIL se une a sus receptores DR4 o DR5 activando caspasas, iniciando la apoptosis de manera rápida, debido a que DR4 y DR5 contienen DD en su dominio intracelular sin ninguna molécula adaptativa como TRADD o FADD que se asocia a sus DD. Se ha sugerido que los receptores DcR1 y DcR2 compiten con DR4 y DR5 evitando que se inicie la apoptosis, dado que DcR1 no posee dominios citoplasmáticos y DcR2 tiene truncado su DD por la falta de 4 o 6 aminoácidos esenciales para el reclutamiento de proteínas adaptadoras<sup>79</sup> (Fig. 23C).



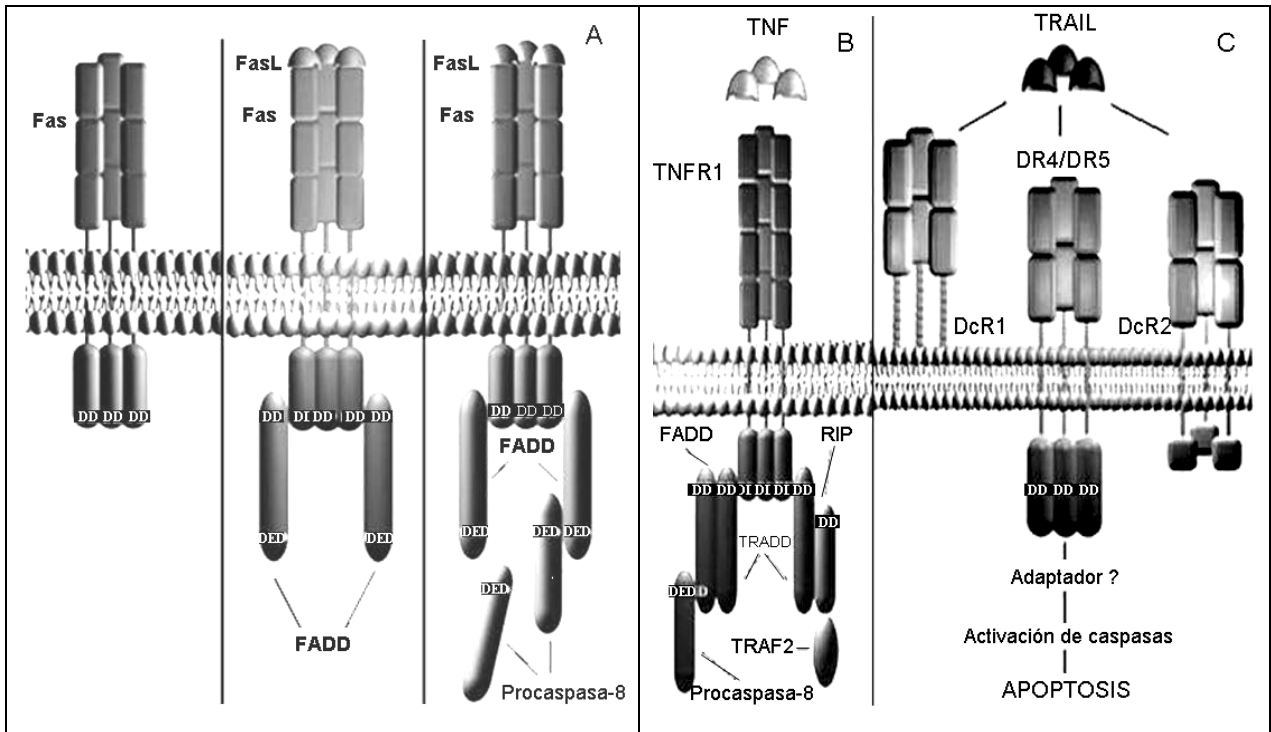


Fig. 23. **A.** El ligando de Fas, se asocia con su receptor adaptándose con sus DD. FADD se une con el receptor a través de sus dominios de muerte y a la procaspasa-8 quedando activa. **B.** TNF se une a TNFR1 y este a TRADD quien recluta a RIP y TRAF2, también puede asociarse con FADD quien permite la activación de la procaspasa 8. **C.** TRAIL se une a sus receptores DR4 o DR5 activando caspasas. Los receptores DcR1 y DcR2 compiten con DR4 y DR5 evitando que se inicie la apoptosis.

### 3.2.2.2 Vía mitocondrial

Uno de los organelos más importantes para la apoptosis es la mitocondria, la cual interviene en varias de las vías de señalización, como son: producción del ATP; pérdida del potencial transmembranal mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ); alteraciones en el proceso de óxido-reducción de la célula, liberación de activadores de caspasas como citocromo c (cit c) al citosol y participación de la familia de las proteínas pro- y anti-apoptóticas Bcl-2<sup>69,81</sup>.

El cit c citosólico, forma una parte esencial del apoptosoma de vertebrados, el cual está formado por cito c, ATP, Apaf-1 (factor activador de procaspasas 1) y procaspasa-9; lo que permite la activación de dicha procaspasa, quien a su vez, activa a otras procaspasas para orquestar la ejecución bioquímica de las células<sup>78,81</sup> (Fig.24).

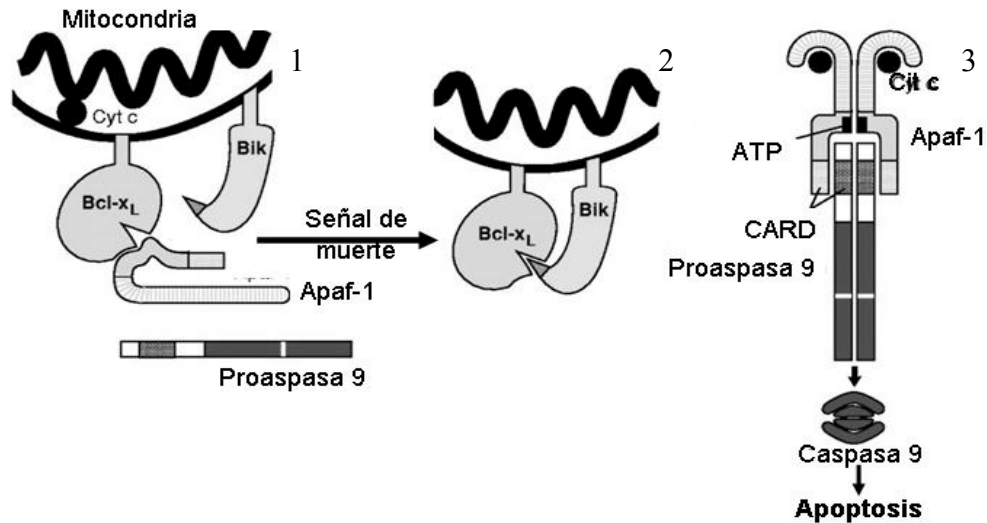


Fig. 24. (1) La proteína anti-apoptótica Bcl-x<sub>L</sub> mantiene bloqueado a Apaf-1 e impide la liberación del citocromo c de la mitocondria. (2) Sin embargo, cuando este es bloqueado por alguna proteína pro-apoptótica como Bik, (3) se libera a la proteína Apaf-1, la cual, requiere de dos factores para activarse, el ATP y el citocromo C (cit c) liberado por la mitocondria, formándose de esta manera el apoptosoma al unirse a la procaspasa-9 a través del CARD (dominio reclutador de caspasas).

Una vez que el cit c es liberado, éste predispone a la célula a morir tanto por apoptosis (apoptosoma) como por necrosis, el cual ocurre debido al colapso en el transporte de electrones que resulta en la generación de radicales de oxígeno libres y la disminución de la producción de ATP<sup>81</sup> (Fig. 25).

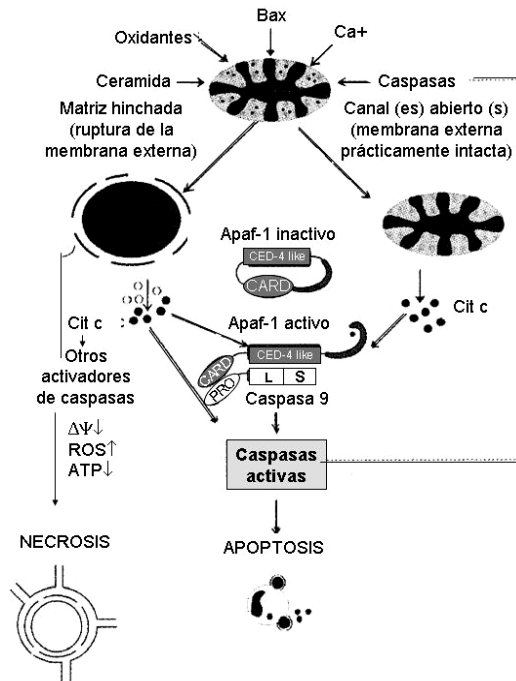


Fig. 25. Inductores de caspasas a través de la mitocondria

Otros mediadores de apoptosis relacionados con las mitocondrias, además del cit c son: Smac (segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria) / DIABLO (proteína con bajo Ip que bloquea directamente a las proteínas inhibidoras de apoptosis –IAP-) que al igual que el cit c permite la activación de la caspasa-3 quien se une a ICAD, lo que resulta en la degradación del citoesqueleto y en fragmentación del ADN. Otra proteína (liberada por las mitocondrias) que fragmenta el ADN es el factor inductor de apoptosis (AIF), quien induce la formación de fragmentos de cromatina por medio de la activación de DNAsas. Por otro lado, se ha observado que las mitocondrias, contienen procaspasa-3 y procaspasa-9, que son liberadas al citoplasma en donde son activadas.<sup>81,70,82,89</sup>

- GENES DE LA FAMILIA *BCL-2*

El gen *bcl-2* (B cell leukemia/lymphoma 2 genes) fue identificado por primera vez en un linfoma de células B-2, motivo al que debe su denominación. Este gen presenta una expresión anormal en el 85% de los linfomas foliculares de células B y en un 20% de los linfomas difusos. Durante la maduración de las células B, puede ocurrir una translocación cromosómica t(14:18) en el gen *bcl-2*, lo que sitúa a *bcl-2* en la misma orientación de transcripción que el *locus* de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (Ig), provocando la desregulación de *bcl-2*<sup>4,85,71</sup>.

A diferencia de la mayoría de los oncogenes previamente descritos, *bcl-2* se caracteriza funcionalmente por inhibir la muerte celular programada y no por estimular la proliferación celular. Es capaz de inhibir la apoptosis inducida por glucocorticoides, irradiación y, deprivación de factores de crecimiento o la muerte asociada a procesos de diferenciación celular. Sin embargo, no puede afirmarse que este efecto sea generalizado, dado que *bcl-2* no inhibe la muerte de ciertas líneas celulares tras deprivación de determinados factores de crecimiento o mediante su activación a través de ciertos receptores<sup>85</sup>.

Se han aislado múltiples genes relacionados estructural y/o funcionalmente con *Bcl-2*. Al menos 15 miembros de esta familia han sido descritos en mamíferos en donde existen genes anti-apoptóticos (***bcl-2***, ***bcl-w***, ***mcl-1***, ***A1*** y ***bcl-x<sub>L</sub>***) y genes

pro-apoptóticos (**bcl-xs**, **bax**, **bak**, **bik**, **blk**, **bok** (**mdt**), **bad**, **bim** y **bid**)<sup>23</sup>. La clasificación de los diferentes miembros de la familia Bcl-2 está dada por sus dominios estructurales. Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> tienen 4 dominios: BH1, BH2, BH3, y BH4; Bax solo tiene BH1, BH2 y BH3, mientras que Bad y Bid forman parte de la subfamilia BH3 por lo que sólo contienen ese dominio<sup>77,80</sup> (Fig.26).

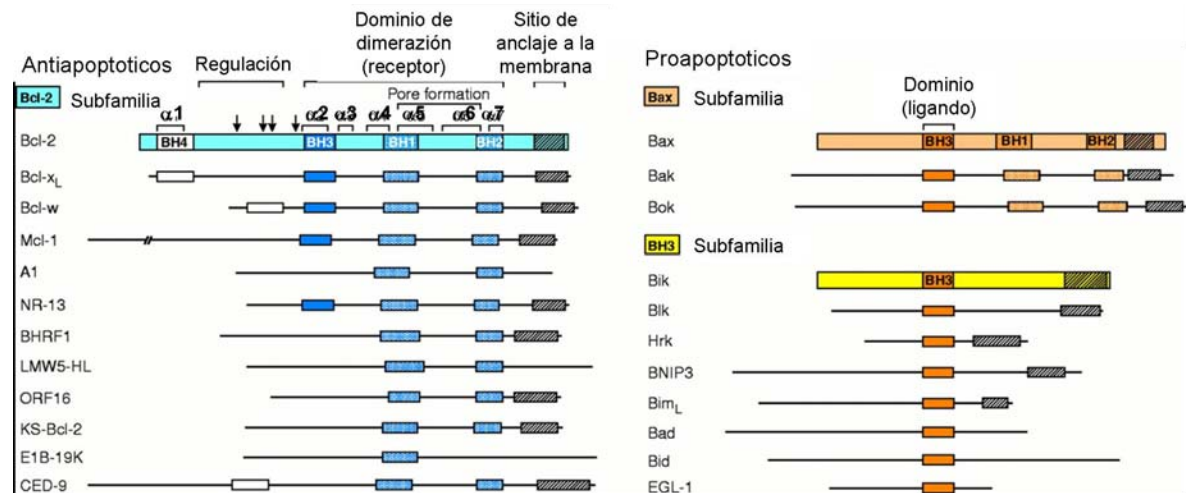


Fig. 26. Clasificación de los diferentes miembros de la familia Bcl-2 por sus dominios estructurales. En azul, se muestra a la subfamilia Bcl-2, en naranja a la subfamilia Bax y en amarillo a la BH3. También, se muestran los diferentes sitios de fosforilación (sitios de regulación negativa que se muestran con flechas en negro), dominios de dimerización, y el poro formador del dominio.

La mitocondria, tiene una relación estrecha con las proteínas de esta familia de genes. La proteína Bcl-2 es una molécula integral de membrana, que además de localizarse en la membrana externa de la mitocondria, también ha sido localizada en el retículo endoplásmico liso y en la envoltura perinuclear; su distribución tisular es amplia, ya que mediante técnicas inmunohistoquímicas, se ha detectado su expresión en órganos linfoides y hemopoyéticos, tiroides, próstata, intestino delgado, páncreas, sistema nervioso y riñón. En los embriones se ha observado que la distribución de Bcl-2 es más amplia que en los adultos, lo que le confiere un papel no sólo en la homeostasis tisular sino también en los procesos de morfogénesis<sup>85</sup>.

Las proteínas anti-apoptóticas de esta familia como Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub>, residen principalmente (no exclusivamente) en la membrana mitocondrial externa, ancladas por un ensanchamiento de aminoácidos hidrofóbicos localizados en el C-terminal, con las proteínas orientadas hacia el citosol. Las proteínas pro-

apoptóticas como Bax, pueden traslocarse a la mitocondria mientras sufren un cambio conformacional (en N-terminal) para oligomerizar en la membrana mitocondrial y facilitar la permeabilidad de la membrana, lo cual es estimulado por el miembro de la subfamilia BH3, Bid. Bak, el homólogo de Bax, reside constitutivamente en la membrana externa mitocondrial y también es estimulado por Bid para su oligomerización en la membrana mitocondrial<sup>70,82,83</sup>.

Estudios de mutagénesis dirigida en el gen *bcl-2* indican su función inhibitoria de apoptosis, así como su capacidad de interactuar con otras proteínas, localizada principalmente en los dominios BH1 y BH2, los cuales son dominios altamente conservados que definen a toda una familia de genes relacionados con *bcl-2*<sup>77,80</sup> (Fig. 27).

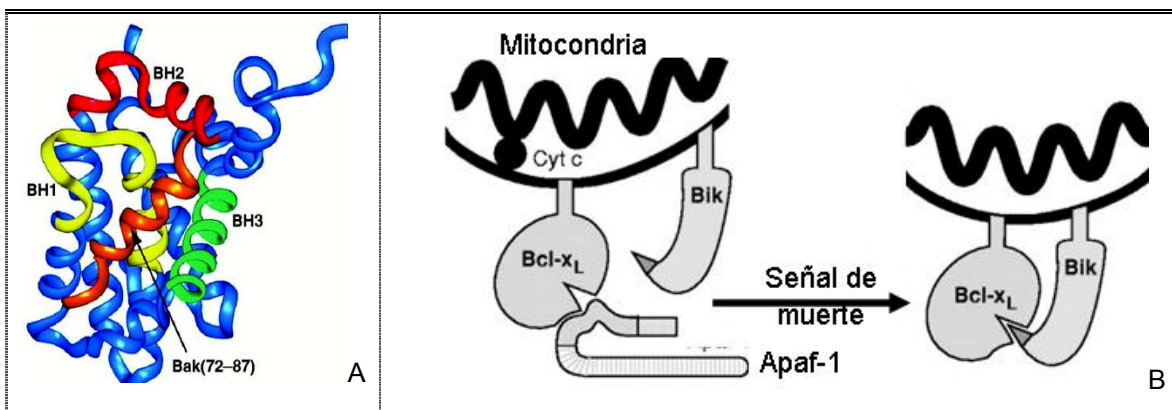


Fig.27. En la esta figura, se muestra como los dominios BH1, BH2, y BH3 forman una especie de “bolsa” que cubre al dominio BH3 de Bak –cristalografía- (A). Lo que nos da la idea de cómo las proteínas pro-apoptóticas como Bik pueden bloquear a las proteínas anti-apoptóticas como Bcl-X<sub>L</sub>, formando heterodímeros y homodímeros (B).

Las proteínas pro-apoptóticas de la familia *Bcl-2* forman poros en la membrana externa de la mitocondria permitiendo la salida de *cyt c* hacia el citoplasma, esto se da porque estas pueden anclarse a la membrana través del C-terminal, las proteínas anti-apoptóticas deben evitar que estas formen poros para lo que es necesario que homodimericen o heterodimericen, lo cual depende del balance que exista entre unos miembros y otros, para lo que se han propuesto varios modelos<sup>84,86,83</sup> (Fig. 28).

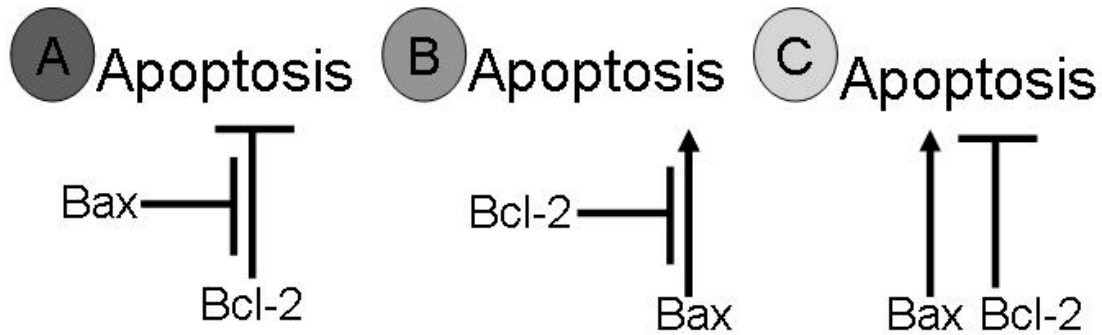


Fig. 28. Un modelo dice que Bcl-2 inhibe apoptosis y que Bax remueve esa inhibición e inicia apoptosis (A). Otro modelo sugiere que Bax induce apoptosis y que Bcl-2 inhibe la inducción (B) y otro, que de manera independiente, Bax induce apoptosis y Bcl-2 la inhibe (C). Sin embargo, el modelo mas acertado es la combinación de los tres, es decir, Bcl-2 inhibe apoptosis de manera independiente a Bax e inhibe su inducción, de la misma manera en que Bax induce apoptosis de manera independiente a Bcl-2 y remueve su inhibición.

Para mantener todo este balance entre unas proteínas y otras existen dos tipos de regulación: transcripcional y post-translocacional<sup>86</sup>

Un ejemplo del tipo transcripcional se da mediante la intervención de p53, gen supresor de tumor que controla el ciclo celular cuando hay daño del ADN a través del arresto celular (G1) o la *apoptosis* (induce genes pro-apoptóticos). Cuando p53 es activado induce la expresión de Bax. Al haber exceso de Bax en la mitocondria se favorece la formación de más homodímeros Bax-Bax permitiendo la liberación del cit c<sup>86</sup>.

En el tipo post-translocacional, un ejemplo es Bad. Bad puede heterodimerizar con Bcl-2 (Bad-Bcl-2) mediante su dominio BH3 (Fig. 27) evitando de esta forma que Bcl-2 se una a Bax permitiendo así que Bax forme homodímeros (Bax-Bax). Es por esto que para regular a Bad, es necesario seguir la vía post-translocacional: *la fosforilación*. Cuando Bad es fosforilada el producto resultante es secuestrado en el citoplasma por la proteína llamada 14-3-3 incapacitándola para unirse a Bcl-2. Calcineurin, un calcio dependiente de la fosfatasa, puede de-fosforilar a Bad causando su disociación con 14-3-3, y unirse a Bcl-2 y así inducir la apoptosis<sup>86,82</sup>.

Sin embargo, en recientes estudios, se observó que la proteína pro-apoptótica de la subfamilia BH3, Bim, no requiere existir en una concentración mayor a Bcl-2 para inducir apoptosis, debido a que esta podría ser capaz de causar un cambio

conformacional en las proteínas pro-apoptóticas y estas a su vez causar el cambio en las vecinas y así iniciarse la apoptosis. Este modelo aún es especulativo pero abre una nueva hipótesis acerca del *modus operandi* de estas proteínas<sup>80,88,87</sup>.

- PORO PT

La manera en que actúa Bax en la liberación del cit c, aún es controversial, ya que existen dos teorías: una indica que Bax tiene la capacidad de hacer perforaciones en la membrana mitocondrial externa (MME) de manera directa y la otra, que actúa de manera indirecta cooperando con otros componentes que actúan formando un poro conocido como poro PT (poro de permeabilidad transicional) Fig. 29, constituido por VDCA (canal de voltaje dependiente de aniones), la proteína de la membrana interna ANT (translocadora del nucleótido adenina) y la ciclofilina D (blanco de la ciclosporina A, quien inhibe el PT)<sup>78,81,83</sup>.

VDCA, es una proteína abundante de la membrana externa, que forma un gran poro de voltaje en la bicapa lipídica, creando un canal a través del cual pasan moléculas de más de 1.5 kD (cit c-14.5kD, AIF-57kD, caspasas mitocondriales-50kD). La apertura de este canal no selectivo resulta en una desregulación del volumen de las mitocondrias debida a la hiperosmolaridad de la matriz, lo que causa la expansión del espacio de esta<sup>76</sup>. Debido a que la membrana interna con sus pliegues posee mayor área que la externa, esta expansión del volumen puede ocasionar la ruptura de la membrana externa<sup>75</sup>, liberando las proteínas activadoras (cit c) y coactivadoras de caspasas (Smac/ DIABLO) localizadas en el espacio intermembranal hacia el citosol, incluyendo ciertas procaspasas (procaspasa-3 y -9)<sup>81,70,89</sup>.

Sin embargo, en una publicación reciente se mostró que al interaccionar Bax con cardiopolin (presente en la membrana) puede formar aberturas supramoleculares en la MME que pueden ser directamente inhibidas por Bcl-x<sub>L</sub><sup>90</sup>.

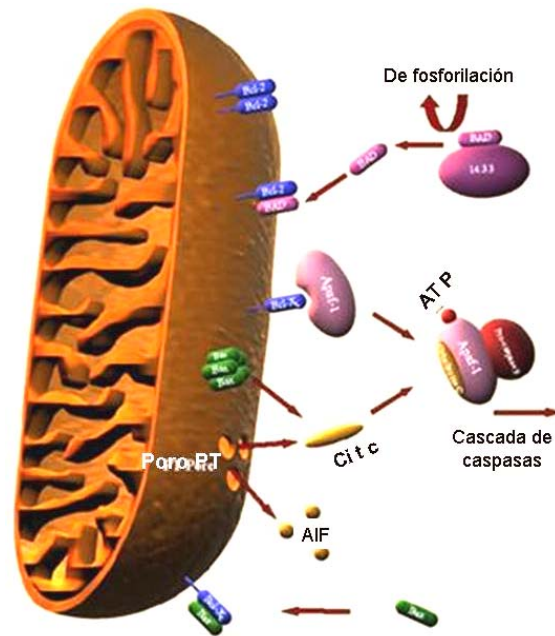


Fig. 29. Tras la de-fosforilación de Bad (rosa), este es capaz de heterodimerizar con Bcl-2 (azul) facilitando la homodimerización de Bax (verde) y por tanto la formación del poro PT en la membrana mitocondrial externa, permitiendo la pérdida del potencial de membrana y la salida del cit c (amarillo) junto con AIF (círculos amarillos). Apaf-1(rosa), es liberado de Bcl-x<sub>L</sub> (azul) y este es bloqueado por Bax. Una vez liberados Apaf-1 y el cit c se unen al ATP y a la procaspasa-9 (rojo), formando el apoptosoma e iniciando la cascada de caspasas.

### 3.2.3 Ejecución

#### ○ CASPASAS

Como ya vimos, ambas vías (receptores de muerte y mitocondrial), activan a las caspasas, también llamadas proteasas “de tipo ICE” (enzima convertidora de interlucina β), las cuales actúan en forma de cascada, cortando a sus substratos después de los residuos de aspartato. Los substratos sobre los que actúan dichas caspasas, pueden ser: No vitales (abundantes y necesarios para que la célula viva) o vitales (escasos cuya ruptura causa muerte celular)<sup>78,70</sup>.

Se han identificado al menos 14 caspasas en mamíferos, las cuales han sido divididas en dos clases principales: caspasas iniciadoras (caspasa-2, -9, -8 y -10) y efectoras (caspasa-3, -6, -7). Las caspasas iniciadoras son las activadoras de las caspasas efectoras. Las caspasas efectoras son las ejecutoras en la célula, ya que se unen a otras caspasas u otras proteínas que inducen apoptosis (Fig. 30)



como: CAD-ICAD<sup>91</sup>. Esta unión permite los cambios morfológicos que sufre la célula durante este proceso hasta la formación de los cuerpos apoptóticos<sup>68,92,80,64</sup>.

Para que las caspasas iniciadoras puedan unirse al DISC, estas tienen dominios específicos como son DED (cas-8 y -10) y CARD (dominio reclutador de caspasas: cas-2 y -9)<sup>92,70</sup>.

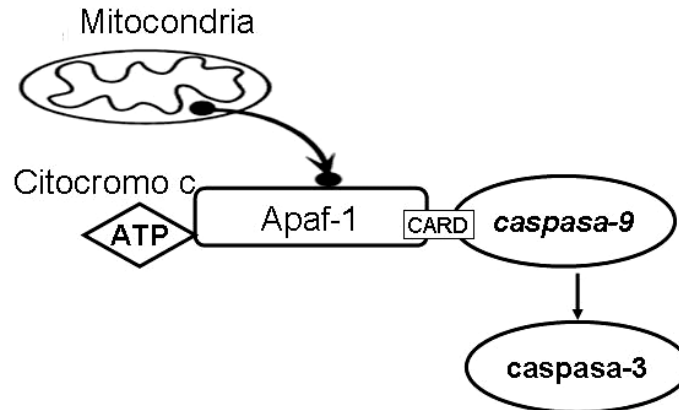


Fig.30. Al liberarse el cit c se une a Apaf-1 quien se une al ATP. Una vez que Apaf-1 se activa se une a la cas-9 (inductora) por medio de CARD, quien activa a la procaspasas-3 (efectora).

Debido a que estas proteínas no se regulan a nivel transcripcional sino a nivel post-transcripcional se encuentran de manera inactiva en el citoplasma, es decir, como procaspasas, las cuales constan de tres dominios básicos: el prodominio, la subunidad larga y la subunidad corta. Las caspasas iniciadoras, tienen un prodominio largo y las caspasas efectoras, un predominio corto. Es por ello, que el prodominio es importante para la interacción proteína-proteína y por tanto se pierde al activarse las caspasas formándose un tetramero al homodimerizar las dos subunidades cortas (parte interna) con la las dos largas (en los extremos) por medio de sus sitios activos<sup>93,94,70</sup> (Fig.31).

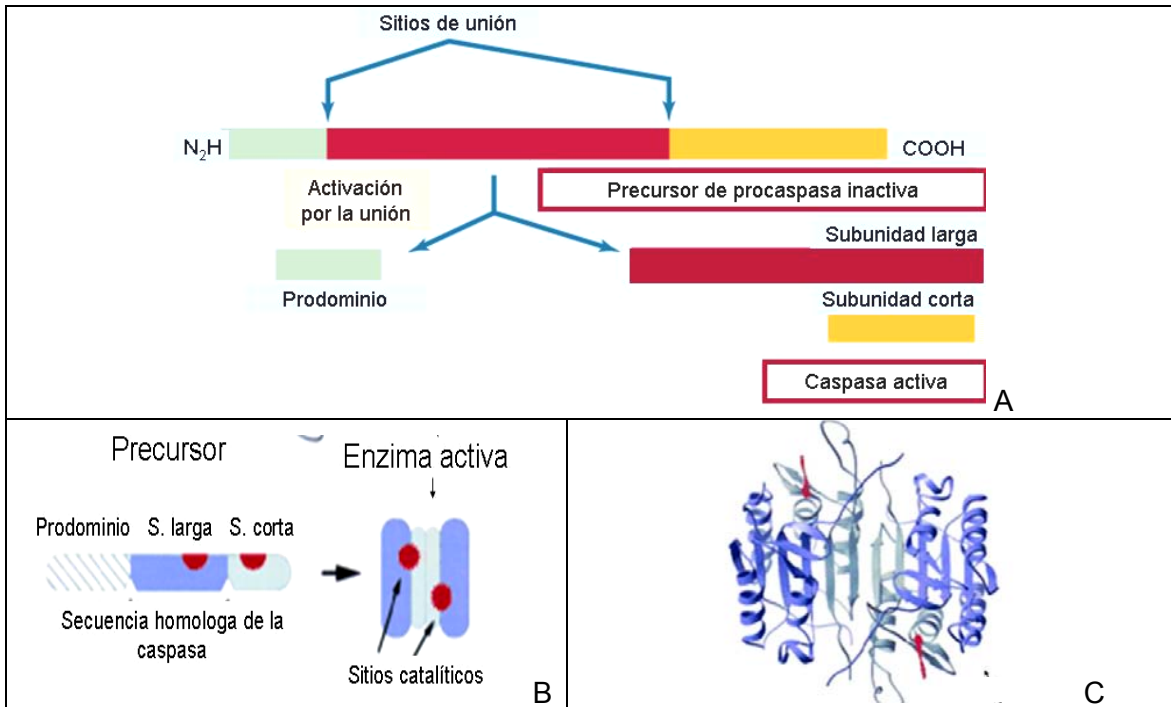


Fig. 31. En el recuadro **A**, se muestran las partes constitutivas de las procaspasas y de las caspasas al perder el prodominio, al igual que en el **B** en donde también se observa la forma en que queda activa la caspasa, por último en **C** se observa la cristalografía de la cas-3 con los sitios activos señalados en rojo.

Por otra parte, en términos de homología estructural (Fig. 32), las caspasas han sido clasificadas en subfamilias: caspasa-1 (caspasa-1, -4, -5 y -11), caspasa-2 (caspasa-2 y -9) y caspasa-3 (caspasa-3, -6, -7, -8 y -10)<sup>80</sup>.

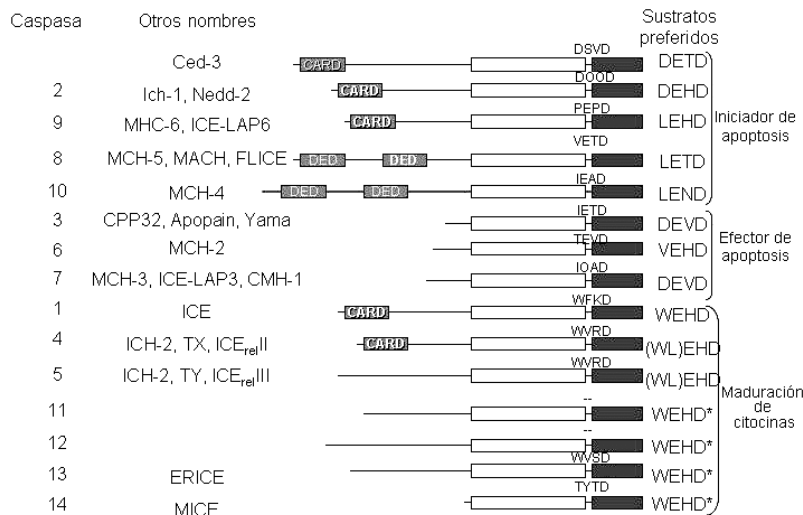


Fig. 32. Familia de caspasas de mamíferos. Comparación estructural de las procaspasas y su especificidad de sustratos. Los sitios de unión del aspartato entre la subunidad larga (barra blanca) y la subunidad corta (barra gris) se muestran, al igual que el DED y CARD. Las procaspasas-1 a -10 son humanas, de la 11 a la 14 de ratón y ced-3 de *C. elegans*.

### 3.2.4 Remoción de células

Los fragmentos celulares que resultan de este tipo de muerte despliegan señales como la externalización de la fosfatidilserina<sup>95</sup>, que son reconocidas por las células fagocíticas. Los cuerpos apoptóticos son en consecuencia englobados y digeridos por estas células profesionales (macrófagos) o semi-profesionales (células vecinas) evitando de esta manera una respuesta inflamatoria<sup>96,21</sup>.

### 3.3 PROTEÍNAS INHIBIDORAS DE APOPTOSIS (IAP)

Estas proteínas fueron identificadas en 1993 por Millar en el genoma de baculovirus. Constan de 2 sitios motivo: repetido IAP de baculovirus (BIR) y el dominio "RING"<sup>97</sup>.

BIR, es esencial en las IAP's, pues es quien le otorga las propiedades anti-apoptóticas. El dominio "RING", se encuentra en el extremo carboxilo-terminal y se encuentra presente en cinco de las ocho IAP's identificadas en humanos<sup>97</sup> (Fig. 33).

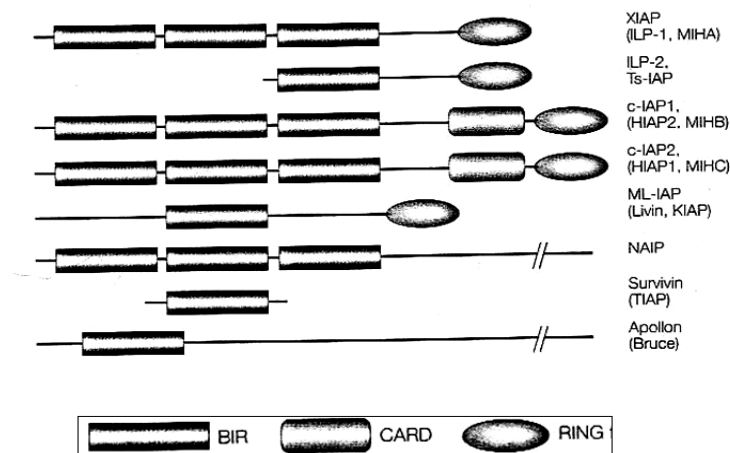


Fig. 33. Familia de proteínas inhibidoras de apoptosis identificadas en humanos

La IAP mejor caracterizada es la X-ligada a IAP (XIAP), también conocida como MIHA y hILP, es un supresor de apoptosis extremadamente potente, cuyos efectos son mediados por su habilidad de inhibir caspasas (cas-3, cas-9 y cas-7) de manera directa, al menos en parte, ya que se ha observado que al igual que otras

IAP's puede tener efecto en la regulación del ciclo celular, degradación proteica y señales de traducción de cascadas independiente de caspasas<sup>97</sup>.

Esta proteína, es inhibida por la proteína Smac en humanos y DIABLO en ratón. Smac/DIABLO, es liberada del espacio intermembranal mitocondrial al citoplasma, uniéndose a la XIAP desplazándola de la caspasa iniciándose la apoptosis<sup>70,97</sup>.

### **3.4 IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN SOBRE LA MUERTE CELULAR**

Aunque la apoptosis se caracterizó por vez primera en 1972<sup>67</sup>, su importancia en la biología y la enfermedad no se aceptó de forma generalizada hasta hace poco tiempo. Ello se debió en parte a la extrañeza que causa la idea de que la muerte celular pueda ser una fuerza creativa que contribuye a la construcción y el mantenimiento de los tejidos.

Se cuenta con evidencias que sugieren que variaciones en la apoptosis pueden estar implicadas en diferentes patologías<sup>98</sup>. Así, muchas enfermedades degenerativas que afectan a los sistemas inmune<sup>5</sup>, nervioso<sup>4</sup> y cardiovascular, como el SIDA, el mal de Alzheimer<sup>62,65</sup>, Parkinson<sup>62,65</sup>, cáncer<sup>62,66</sup>, enfermedades crónico-degenerativas como la osteoartritis<sup>16,18,70</sup> y enfermedades autoinmunes<sup>66</sup>, infecciosas<sup>62</sup> e inflamatorias, tienen en común la activación inadecuada de la apoptosis y la muerte de células vitales en tejidos importantes.

En más de la mitad de todos los tumores sólidos, incluidos los de pulmón, colon y mama, falta o no es funcional la proteína p53<sup>89,99</sup>, por lo que las células no sufren arresto celular ni apoptosis. En determinados linfomas, se impide la muerte celular mediante una síntesis desmesurada de Bcl-2, la proteína inhibidora del suicidio. Mientras que algunos podrían oponerse a que Fas envíe señales a la maquinaria letal, o no produciendo el FasL para evitar la apoptosis mediada por el sistema inmune<sup>62,98</sup>.

La regulación aberrante de la proliferación celular, por la actividad del gen supresor de tumor y por la acción de la dominancia de oncogenes, es ahora reconocida para ser el sello de la mayoría, si no es que de todas las malignidades.

Es por esto que ahora se hacen investigaciones sobre la modulación de la apoptosis con fines terapéuticos<sup>98</sup>.

## **CAPÍTULO IV**

---

---

# **FAGOCITOSIS**

# CAPÍTULO IV: FAGOCITOSIS

---

## 4 LA MEMBRANA CELULAR EN EL TRANSPORTE MOLECULAR

La membrana celular, es una estructura constituida por fosfolípidos, en la cual se encuentran embebidas otras numerosas moléculas, principalmente proteínas, que tienen diferentes actividades<sup>100</sup>.

Las células mantienen en su citoplasma una composición y concentración de sustancias disueltas notablemente distintas del medio que las rodea. Esto se debe a que la membrana de la célula impide la salida o la entrada de las moléculas de gran tamaño, como proteínas, ácidos nucleicos o polisacáridos; al igual que moléculas polares o cargadas que deben mantenerse de un lado o del otro de la membrana. Para esto, la célula requiere de mecanismos especiales que muevan sustancias de un lado al otro y que al mismo tiempo puedan distinguir entre unas y otras. A este fenómeno se les conoce como transporte<sup>100,101</sup>.

Para atravesar la doble capa de fosfolípidos que constituye la base estructural de la membrana y la separación entre ambos lados, una molécula o ion requieren de la presencia de un *sistema de transporte o acarreador* o de un poro específico capaz de permitirle el paso de un lado a otro de la membrana, para lo que deben reconocerla entre lo que puede ser un sinnúmero de otras moléculas que se encuentran en el exterior de las células<sup>100,102,103</sup>.

El transporte puede tener dos variantes (pasivo y activo). Cuando se trata de una sustancia que tiene que pasar de una mayor concentración a una menor, es decir, favor de su gradiente de concentración se le denomina *transporte pasivo por difusión simple*. Estas moléculas son seleccionadas por una proteína acarreadora. Independientemente de la posibilidad de reconocer y transportar sustancias en un sentido y en otro, previo reconocimiento de las mismas, las membranas tienen también la posibilidad de reconocer otras sustancias con fines definidos, para

establecer contacto con el exterior. El reconocimiento más claro y conocido de este tipo es el de las hormonas; numerosas células pueden reconocer estímulos o señales del exterior y como consecuencia de la interacción con ellas producir respuestas, que pueden ser cambios fisiológicos o metabólicos. Un ejemplo de éstos es el de la insulina, hormona producida por el páncreas, que aumenta la velocidad con que la glucosa entra a las células, principalmente las musculares y las adiposas, con la participación de receptores específicos en la membrana celular. Siendo éste un mecanismo normal para modular el comportamiento metabólico de las células, cuando falta en forma total o disminuye la producción de la hormona aparecen los trastornos, que se traducen en un padecimiento. A este tipo de transporte se le conoce como *Transporte pasivo por difusión facilitada*<sup>101,102,103,104</sup>.

El otro tipo de transporte, el *transporte activo*, es aquel en el cual se captura una sustancia que se encuentra en el medio a una concentración relativamente baja, y se le introduce a la célula, en donde la concentración es mucho mayor, como es el caso del transporte de sodio hacia fuera de la célula mediante la llamada bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Fig. 34) quien controla el volumen celular (la expulsión de sodio es necesaria para mantener el balance osmótico), permite que las células nerviosas y musculares sean eléctricamente excitables e impulsa el transporte activo de glucosa y aminoácidos hacia dentro de las células. En este caso, en que el transporte se realiza en contra del gradiente de concentración, los componentes de la membrana deben invertir energía para llevarlo a cabo. En numerosas ocasiones, el sistema de transporte mismo es capaz de utilizar directamente la energía de la hidrólisis del ATP (adenosín trifosfato)<sup>IDEM</sup>.



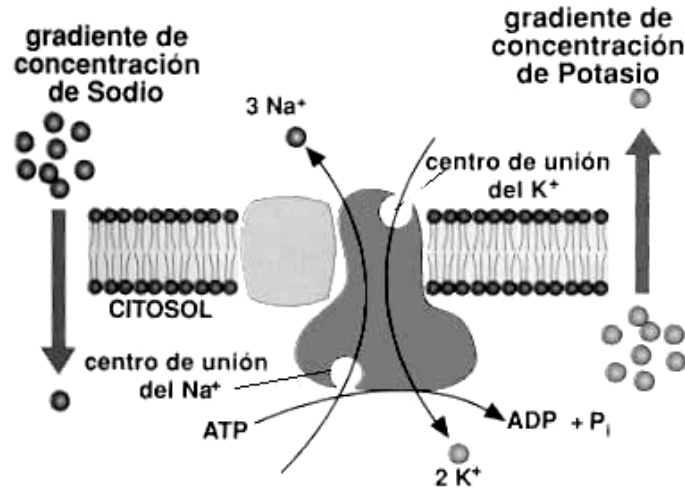


Fig. 34. Las células tienen altas concentraciones de potasio y bajas de sodio respecto a su medio externo; el movimiento de ambos iones se produce simultáneamente, de manera que se bombean 3 Na<sup>+</sup> hacia el exterior y dos K<sup>+</sup> hacia el interior, con la hidrólisis de ATP.

La membrana, también elimina al exterior o toma de él sustancias, mediante la formación de vesículas que se producen al englobarlas por medio de la exocitosis y la endocitosis<sup>30,101,103</sup>.

- **Exocitosis:** Las macromoléculas deben ser empaquetadas en vesículas para separarlas del resto de la célula. Estas vesículas se fusionan con una estructura específica de la membrana en donde liberan su contenido incorporándose a la membrana celular<sup>IDEM</sup>.

Las proteínas por ejemplo, que son secretadas de las células se forman en el retículo endoplásmico (RE), después son transportadas al aparato de Golgi quien empaqueta a las proteínas en vesículas que se separan para eventualmente fusionarse con la membrana celular<sup>30,101,103,104</sup>.

Algunas moléculas son secretadas continuamente de la célula, pero otras son selectivamente secretadas, por lo que son guardadas en vesículas de secreción y liberadas únicamente cuando son activadas por señales extracelulares; estas señales pueden ser las hormonas que se unen a un receptor específico de superficie, para que finalmente se dispare la exocitosis<sup>IDEM</sup>.

- **Endocitosis:** Las células eucariontes continuamente ingieren fluidos y moléculas, mientras lo hacen, también ingieren su propia membrana celular. Los macrófagos (células importantes en el sistema inmune, sucesoras de los monocitos que se encuentran en sangre) por ejemplo ingieren el 3% de su propia membrana celular cada minuto o 100% cada media hora. Obviamente la membrana ha sido agregada por medio de la exocitosis alrededor del mismo porcentaje en que es removido por endocitosis<sup>101,104</sup>.

La mayoría de las moléculas que son ingeridas (rodeadas por pequeñas vesículas) se fusionan con lisosomas en donde son digeridas por las enzimas, para posteriormente ser depositadas en el citosol en donde las células las usan reintegrándose la mayoría de las vesículas en la membrana celular<sup>104,106</sup>.

Hay dos tipos de endocitosis: pinocitosis y fagocitosis.

- o La PINOCITOSIS tiene lugar en zonas especializadas de la membrana plasmática denominadas depresiones revestidas, recubiertas en su cara citoplasmática por una proteína llamada clatrina. Esta clatrina se organiza formando como un cesto responsable de la invaginación de la membrana, formándose pequeñas vacuolas (vesículas líquidas de unos 150nm de diámetro)<sup>105,106</sup>. Fig. 35.



Fig. 35. En la pinocitosis, la membrana se repliega creando una vesícula pinocítica. Una vez que el contenido de la vesícula ha sido procesado, la membrana de la vesícula vuelve a la superficie de la célula.

- o La FAGOCITOSIS, es la ingestión de moléculas grandes, como microorganismos o detritos celulares a través del uso de vesículas o vacuolas (endosomas de más de 250nm de diámetro). Se inicia por la unión de ligandos de la partícula con receptores de la superficie celular, lo que conlleva a diversas señales que promueven un re-arreglo en las proteínas del citoesqueleto controlado por GTPasas. Finalmente, la célula emite pseudópodos<sup>105,107</sup> por medio de la fosfatidilinositol cinasa-3 (PI3K) que es reclutada en la membrana plasmática

(MP) para englobar a la partícula por medio del fagosoma, el cual se forma por la asociación directa entre el RE y la MP<sup>107</sup>.

Las células blancas o glóbulos blancos, utilizan la fagocitosis para remover partículas extrañas en la sangre, incluso cuando son del mismo tamaño que ellas. Hay dos tipos de células blancas que actúan como fagocitos: monocitos/macrófagos y neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares o granulocitos). Para que las partículas sean fagocitadas se requieren de los siguientes pasos<sup>105,108</sup> (Fig. 36).

1. Reconocimiento y Adhesión – Identificación y unión con el microorganismo, partícula o detritos celulares por un profesional (macrófago/neutrófilo) o fagocitos no profesionales (como células epiteliales).
2. Endocitosis – Entra el microorganismo, partícula o detritos celulares (m, p o dc) dentro de la célula fagocítica, generándose el fagosoma
3. Fusión Fagosoma-Lisosoma – Generación de fagolisosoma
4. Degranulación y Muerte – Liberación del contenido lisosomal o granular en aposición directa al m, p o dc, junto con el fagolisosoma (utilizando mecanismos dependientes e independientes de oxígeno)

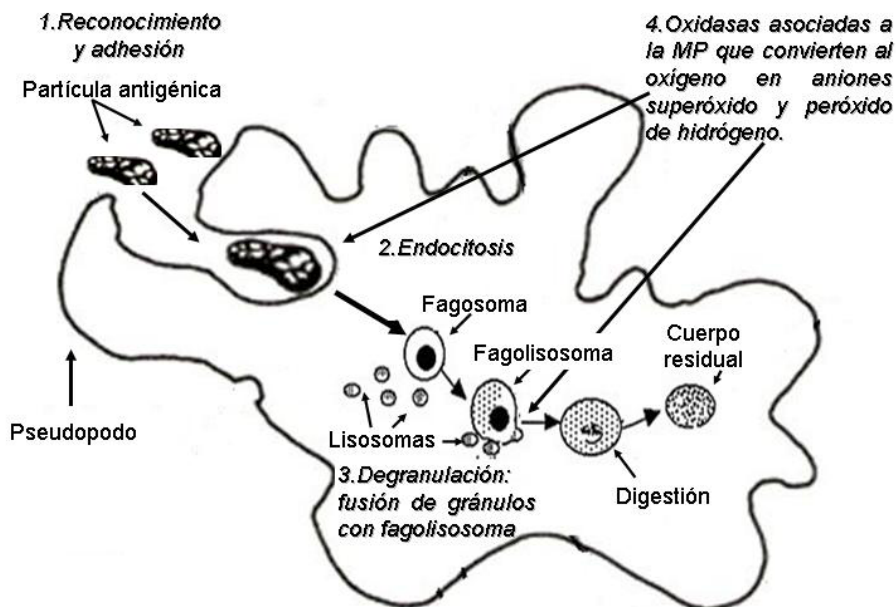


Fig. 36. En el proceso de fagocitosis, la célula crea proyecciones llamadas seudópodos que rodean la partícula antigénica (extraña). Una vez rodeada, los seudópodos se fusionan formando una vesícula alrededor de la partícula llamada vesícula fagocítica, vacuola digestiva o fagosoma. El material sólido dentro de la vesícula es digerido por enzimas liberadas por los lisosomas.

#### 4.1 ORIGEN DE LA TEORÍA DE LA FAGOCITOSIS

Una de las grandes figuras en Biología del siglo XIX, fue Mechnikov (1845-1916), biólogo Ruso que vivió en París y realizó su trabajo en el Instituto Pasteur en donde, en el año de 1884, formuló la teoría básica en la cual se fundó la ciencia de la Inmunología: el cuerpo es protegido de la infección por los leucocitos que engullen bacterias y otros organismos que la invaden; introduciendo así, el término de "Fagocitosis" del griego *phagein*=comer *kytos*=célula<sup>109,110</sup>.

En 1885 la "teoría del germen" del origen de las enfermedades fue aceptada en la profesión médica dado a las muchas muertes innecesarias, principalmente en nacimientos y amputaciones en los cuales instrumentos no estériles eran frecuentemente utilizados por cirujanos que se rehusaban a aceptarla. Aún después de que el concepto de infección por los gérmenes había sido aceptado como verdadero, el argumento de que ciertas células jugaban un papel activo en la defensa era difícil de aceptar, por lo que Mechnikov fue tomado como lunático. Sin embargo en el año de 1908 obtuvo el premio Nobel en Fisiología y Medicina,

mismo que compartió con el bacteriólogo alemán Paul Ehrlich, al demostrar que la fagocitosis ocurre en células especializadas en ciertas locaciones celulares<sup>109</sup>.

A través de los años la fagocitosis, ha adquirido gran importancia, debido a que gracias a este fenómeno nuestro organismo es capaz de eliminar sustancias o invasores perjudiciales, conocidos como antígenos (Ag), con el fin de defender al organismo. Sin embargo, se ha observado que este mecanismo no solo permite la eliminación de Ag, sino que también, permite la eliminación de los cuerpos apoptóticos (CAp), ya sea en la enfermedad o en condiciones normales.

#### **4.2 FAGOCITOSIS DE CUERPOS APOPTÓTICOS**

Los mecanismos que regulan y determinan la apoptosis, han recibido mucha atención en los últimos años. Sin embargo, se ha mostrado poco interés a los mecanismos empleados en el destino de las células que mueren por apoptosis, en los que intervienen el reconocimiento y la ingestión de células intactas por células fagocíticas antes de su destrucción final por las enzimas lisosomales de los fagocitos, sin causar daño a las células vecinas y evitando una respuesta inflamatoria<sup>95,96</sup>.

Los macrófagos, son los “fagocitos profesionales” que se encargan, en la mayoría del organismo, de la remoción de los CAp, aunque existen otros tipos celulares que pueden hacerlo como son las células epiteliales, que fagocitan las células vecinas apoptóticas<sup>67,95,111</sup> (Fig. 37). Estos mecanismos de eliminación son tan eficientes que las células apoptóticas, son eliminadas sin que se perciba, protegiendo al organismo del contenido dañino de la célula que muere. Esto convierte a este proceso de “fagocitosis” en uno de los más importantes en el mantenimiento del organismo, ya que cualquier defecto en la eliminación de dichas células podría interferir en su reconocimiento y provocar una enfermedad. Dado que si estos no son fagocitados eventualmente pueden sufrir necrosis secundaria. También se ha demostrado que cuando el porcentaje de células apoptóticas es mayor al de fagocíticas, las primeras finalizan en necrosis, provocando inflamación y muerte de células vecinas<sup>95,112</sup>.

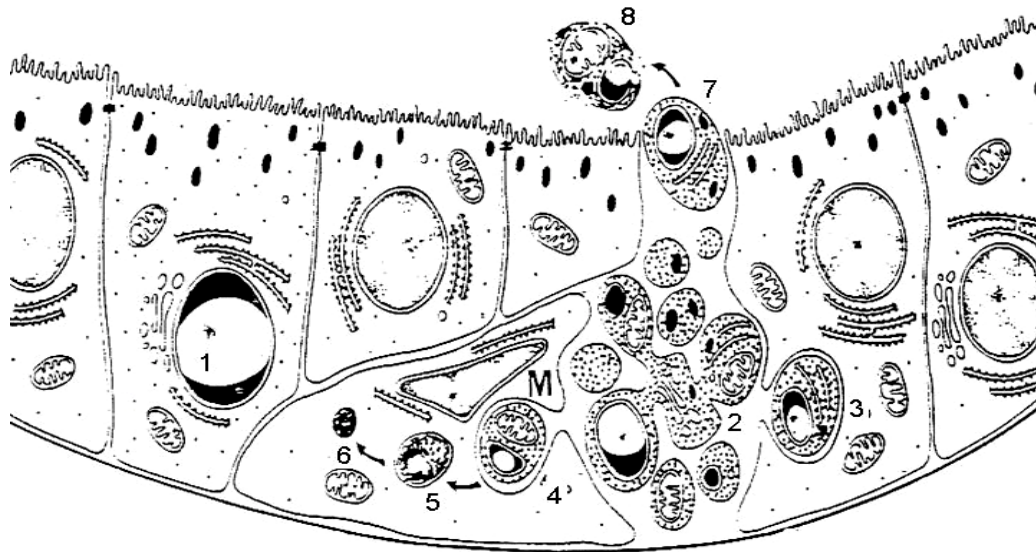


Fig. 37. Secuencia de cambios ultraestructurales de células epiteliales apoptóticas: condensación de cromatina (1); formación de cuerpos apoptóticos (2); fagocitosis por célula epitelial vecina (3) y macrófagos -M- (4); degradación lisosomal (5); partículas pequeñas resultantes de la digestión (6); cuerpo apoptótico no fagocitado (7) y necrosis (8).

Sin embargo, recientemente se describió un mecanismo en que las células apoptóticas evitan la inflamación después de una necrosis secundaria por medio de la retención de la proteína pro-inflamatoria llamada proteína del grupo-1 de alta movilidad (HMGB1), debido al cambio conformacional que sufre la cromatina. Se sabe que esta proteína, participa en el complejo de nucleoproteínas de ensamblaje y que actúa como mediador de la inflamación cuando es secretado por monocitos y macrófagos activos, además de células necróticas y dañadas<sup>113</sup>.

Como ya se mencionó, la fagocitosis de los CAp no conlleva inflamación<sup>16</sup>, esto se debe a que al ser reconocidos por los macrófagos, estos no secretan citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ . De la misma manera, se ha observado que los macrófagos al ingerir CAp liberan al factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), citosina inmunosupresiva anti-inflamatoria. Todos estos procesos, sin embargo, aún están pobremente entendidos<sup>21,115</sup>.

#### 4.2.1 RECONOCIMIENTO DE CÉLULAS APOPTÓTICAS

Las células al morir por apoptosis son capaces de desplegar diversas señales que son reconocidas por receptores presentes en la célula fagocítica<sup>112,115-117</sup> (Tabla 4).

Una de las señales mejor caracterizada es el aminofosfolípido, fosfatidilserina, el cual se encuentra localizado en el interior de la membrana y es expuesto en la superficie de las células apoptóticas, alterando la hidrofobicidad de la superficie celular, para ser reconocida por el factor-8 EGF globular de la grasa de la leche (MFG-E8), que es secretado por el fagocito; cuando MFG-E8 se une a la fosfatidilserina vía RGD (arginina-glicina-aspartato) y es reconocido por las integrinas  $\alpha_v\beta_3$  llevándose a cabo la fagocitosis<sup>95,96</sup>.

SEÑAL	RECEPTOR
Azúcares	Lectinas
Fosfatidilserina (FS)	Integrina $\alpha_v\beta_3$
Desconocida en cuerpos apoptóticos, Lipopolisacáridos (LPS) de bacterias	CD14
Trombospodin	CD36, Integrina $\alpha_v\beta_3$
Tirosina cinasa	Mer
Lipoproteínas de baja densidad (LDL)	CD68
ICAM-3 (molécula de adhesión intracelular-3)	CD44
iC3b (proteína de cascada de complemento)	$\beta_2$ Integrinas

Tabla 4. Algunos receptores presentes en las células fagocíticas que reconocen señales específicas de las células apoptóticas

A pesar de que se tiene clara la existencia de receptores capaces de mediar la fagocitosis, aún no se conoce la contribución que tiene cada molécula para que se lleve a cabo dicha eliminación<sup>21,117</sup>.

Es probable que una célula fagocítica exprese diferentes receptores, que aseguren el reconocimiento de diferentes etapas de la apoptosis. En este sentido, un mecanismo de reconocimiento puede actuar en caso de que uno previo falle, asegurando de esta forma que la célula apoptótica no escape de ser eliminada. Sin embargo aún se desconoce cuáles son los mecanismos que utilizan determinadas células, que pueden ser tan variables como la muerte celular programada<sup>117</sup>.

En el nematodo *C. elegans*, se han encontrado al menos 6 genes (ced-1, -2, -5, -6, -7 y -10) que al parecer son necesarios para la eliminación efectiva de los CAp por los fagocitos. Las proteínas codificadas por los genes ced-1, ced-2, ced-5, ced-6, ced-7 y ced-10 son similares a las proteínas humanas: CD91, Crk11, DOCK180

(proteína de unión a Crk), GULP, transportadores ABC y Rac1, respectivamente<sup>21,112</sup> (Fig. 38).

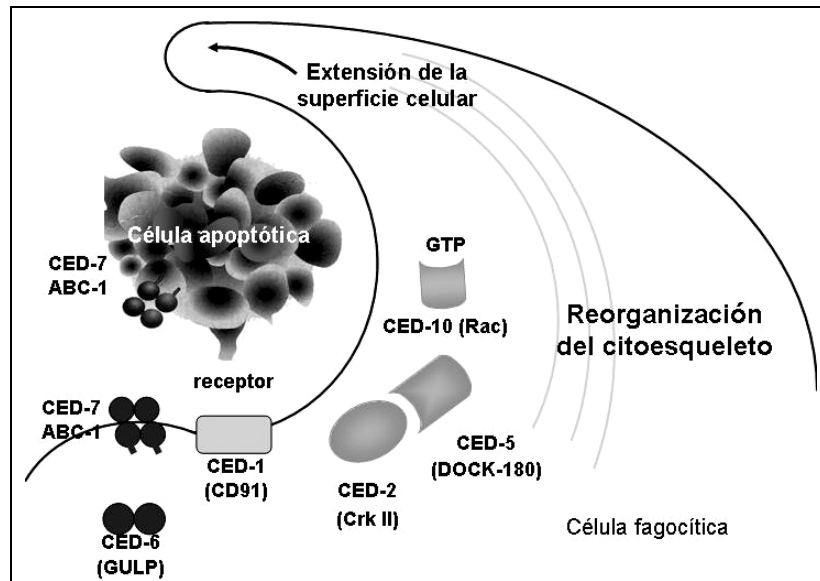


Fig.38. Genes involucrados en la fagocitosis de *C. elegans* con sus homólogos humanos.

Por todo lo anterior, podemos determinar que el conocimiento que se tiene sobre el mecanismo molecular que media la eliminación de células apoptóticas esta pobremente entendido, por lo que se hace necesaria la realización de estudios *in vivo* en mamíferos<sup>112</sup>.



# **ANTECEDENTES**



## ANTECEDENTES

---

Hay muchos aspectos en la biología celular y en patología de la muerte celular programada de los condrocitos que aún están pobremente entendidos entre ellos lo relacionado con el destino de los restos de los condrocitos después su muerte por apoptosis<sup>22,16</sup>. Es por ello que se han realizado estudios que indican que: los condrocitos son capaces de endocitar, ya que en el año 1983, Cheung, Halverson y McCarty observaron que la hidroxiapatita (HA) y los microcristales de pirofosfato de calcio dihidratado (CPPD) son fagocitados por condrocitos de cartílago articular de conejo en cultivo primario<sup>22</sup>. En 1992, Hausser y col., demostraron que los condrocitos median, vía receptores, la endocitosis del proteoglicano I (biglicano) y del proteoglicano II (decorin)<sup>118</sup>. Hua, Knudson C y Knudson W, en 1993, mostraron evidencias de que el hialuronato es endocitado por condrocitos articulares de bovino<sup>119</sup> y en 1999 Aguiar y col. indicaron que el receptor CD44 es internalizado por los condrocitos y que su producción es modulada por su interacción con el hialorunato<sup>120</sup>; en el mismo año, Sakuma, Wada, Wang Maruyama y Matsumi, reportaron que los condrocitos, al igual que las células sinoviales y del tendón, poseen la habilidad de fagocitar materiales extraños, como las partículas de látex (inyectadas intra-articularmente a ratas Wistar)<sup>121</sup> y finalmente, en el 2000, Bronkers y colaboradores, demostraron que los osteoclastos de la placa de crecimiento fagocitan preferentemente condrocitos hipertróficos que están muriendo por muerte celular programada<sup>23</sup>. Sin embargo, aunque no se ha reportado que es lo que sucede con los correspondientes al cartílago articular, en el año 2002, Kourí y colaboradores, sugieren la posibilidad de que los condrocitos puedan fagocitar detritos celulares y cuerpos apoptóticos<sup>18</sup>. Debido a esto en el presente trabajo se realizaron cultivos de condrocitos articulares para poder determinar si los residuos o detritos de cartílago articular destruido mecánicamente o los de condrocitos a los que se les indujo apoptosis, pueden ser fagocitados por células sanas o intactas.

## **OBJETIVOS**

---

---

# OBJETIVOS

---

## OBJETIVO GENERAL

- Determinar si los condrocitos son capaces de fagocitar, en cultivo, condrocitos apoptóticos y detritos de cartílago articular.

## OBJETIVOS PARTICULARES

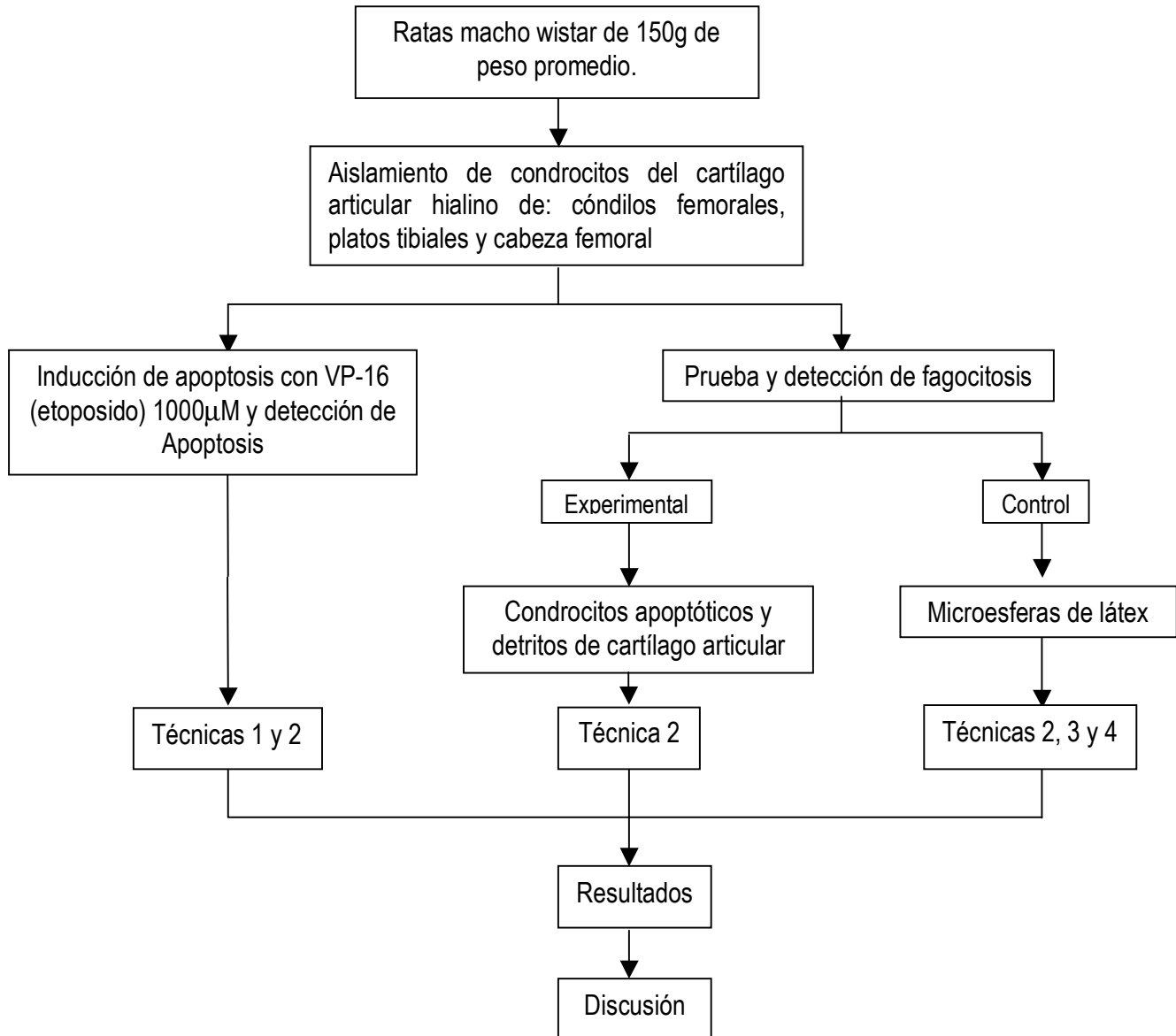
- Inducir apoptosis, *in vitro*, a condrocitos articulares de ratas y evaluarla por morfología.
- Determinar si los condrocitos fagocitan microesferas de látex fluorescentes, detritos de cartílago articular y condrocitos apoptóticos.

# **METODOLOGÍA**

---

---

## METODOLOGÍA (ESTRATEGIA EXPERIMENTAL)



Técnica 1: Microscopia Óptica  
Técnica 2: Microscopia Electrónica  
Técnica 3: Citometría de Flujo  
Técnica 4: Microscopia Confocal

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

Se utilizaron ratas macho *Rattus norvegicus* cepa Wistar de 150g de peso promedio, a las cuales se les extrajo el cartílago articular de cóndilos femorales, platos tibiales y cabeza femoral para el aislamiento de condrocitos en cultivo primario. Una vez obtenido el cultivo celular se realizó la prueba de fagocitosis con microesferas de látex de 1 $\mu$ m de diámetro (Microscopia Electrónica, Microscopia Confocal y Citometría de Flujo), condrocitos apoptóticos (Microscopia Electrónica) y detritos de CA, (Microscopia Electrónica) en un tiempo de interacción de 12h. La apoptosis fue inducida por la exposición de las células al antineoplásico Etoposido (VP-16) durante 12h a una concentración de 1mM, mismos que posteriormente fueron lavados para su posterior interacción con condrocitos normales para finalmente realizar la prueba de fagocitosis con un tercer cultivo.

### CULTIVO CELULAR

Las ratas fueron sacrificadas en una cámara de CO<sub>2</sub> y rasuradas desde la parte inferior de las patas posteriores hasta la mitad del abdomen. Los animales fueron lavados con una solución detergente, cloro y agua y se preparó en la zona quirúrgica con benzal y yodo.

La disección de las patas posteriores se realizó dentro del radio de un mechero Bunsen (30cm). Las piezas extraídas fueron sumergidas en un frasco con Solución A estéril\*.

En la campana de flujo laminar, el cartílago articular de los platos tibiales y cóndilos femorales fueron obtenidos con la ayuda de una aguja de disección y pinzas de diente de ratón en un microscopio estereoscópico, mientras que la cabeza del fémur fue inmediatamente separada con la ayuda de unas tijeras. El cartílago obtenido fue

sumergido en Solución A estéril adicionada con gentamicina al 1%. Una vez obtenido todo el tejido se puso a incubar a 37°C en una atmósfera de 5%, de CO<sub>2</sub> en medio de cultivo DMEM/F12\* complementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% inactivado\*.

La digestión del cartílago fue realizada con Tripsina al 0.2% (Research Organics, Cleveland EE.UU.) en solución A por 10 min. y con colagenasa tipo II al 0.2% (Worthington Biochemical Corporation, Nueva Jersey EE.UU.) en solución A por 2 horas. Posteriormente, el tejido se pasó a través de una malla fina de nylon u organza con perforaciones de 50µm de diámetro para obtener únicamente las células; se tomó una alícuota para determinar el número de células por mL y la viabilidad por tinción vital azul tripano al 0.4% en PBS\*. Las células fueron lavadas 2 veces con Solución salina-EGTA\*, para eliminar la colagenasa y evitar que se agregaran las células. Finalmente se pusieron a incubar a 37°C en una atm de 5% de CO<sub>2</sub> en medio de cultivo DMEM/F12-EGTA.

### INDUCCIÓN DE APOPTOSIS

Las células fueron expuestas durante 12h al anticancerígeno etoposido (VP-16) 1mM y lavadas con medio de cultivo DMEM/F12, en el que se dejaron durante 12h más junto con otras células (normales), para eliminar la mayor cantidad posible del anticancerígeno y posteriormente para su interacción con otras células (normales) para la fagocitosis. La apoptosis se evaluó con azul tripano, en microscopía de luz.

### OBTENCIÓN DE DETRITOS.

Una vez obtenido el tejido, se le agregó 1ml de medio DMEM/F12, para ser fragmentado con un homogenizador de células Dounce hasta obtener un líquido color plata (100-200 golpes).



## PRUEBA DE FAGOCITOSIS

Los condrocitos fueron colocados en medio DMEM/F12 suplementado con SFB al 10% en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. A estas células se les agregaron microesferas de látex fluorescente de 1µm, detritos de cartílago articular o condrocitos apoptóticos (Todo esto bajo condiciones de esterilidad en la campana de flujo laminar). A las 12h de interacción las células fueron fijadas para las diferentes técnicas.

## MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Las células fueron fijadas 1h en glutardialdehído al 2.5% en buffer de cacodilato al 0.2M, pH 7.2 y posfijadas 1h en tetraóxido de osmio (OsO<sub>4</sub>) al 1% en buffer de cacodilatos al 0.2M. Los lavados posteriores a cada fijación fueron realizadas en buffer de cacodilatos 0.1M y la deshidratación en concentraciones crecientes de alcohol etílico (50-absoluto). La infiltración de Resina Spurr se hizo con una mezcla de Spurr/alcohol (1:1 y 3:1) y 3 cambios en resina Spurr pura, cada cambio con un mínimo de 2h, finalmente las células quedaron embebidas en un último cambio de resina pura para su polimerización a 60°C durante 48h.

Las secciones ultrafinas se obtuvieron con un ultramicrotomo (MT-Ultramicrotomo Sorval) y fueron montadas en rejillas de 200 mesh, teñidas 20min con acetato de uranio y 1min con citrato plomo y examinadas en el Microscopio electrónico de transmisión (Jeol 2000EX).

## CITOMETRÍA DE FLUJO.

Las células fueron fijadas en alcohol al 80% en PBS\* a -20°C durante 15min a 4°C y rehidratadas por el mismo tiempo con PBS a temperatura ambiente; finalmente se realizaron dos lavados con PBS y se resuspendieron en 200µl de la misma solución.

Las células fueron guardadas a 4°C hasta llevar al citómetro de flujo (Facs calibur becton dikins), para lo que deben fueron filtradas en una malla fina de nylon u organza con perforaciones de 50µm de diámetro para disgregarlas y pasarlas a tubos Facs para su inmediata lectura.

### MICROSCOPIA CONFOCAL

Las células fueron fijadas 30 min. en paraformaldehído al 4% en PBS y lavadas 3 veces con PBS. Posterior a la fijación, se realizó una tinción con 300µl de Ioduro de Propidio ([IP]. SIGMA. San Luis. EE.UU.) a una concentración de 500nM en PBS durante 5min y lavadas 3 veces con PBS, se centrifugó y decantó el sobrenadante, finalmente, las células fueron resuspendidas en 10µl de medio de montaje para fluorescencia Vectashield (Vector. Burlingame, CA) y colocadas sobre un portaobjetos que se selló con barniz.

Los portaobjetos fueron guardados a 4°C protegidos de la luz hasta observar en el microscopio confocal (MC). Las muestras fueron observadas con el objetivo 60X (N.A. 1.4) de un microscopio Nikon, vinculado con un sistema de láser confocal MRC 600 (Bio-Rad, Watford, UK). Se observaron de 5-7 células, cada una con un promedio de 20 series de cortes ópticos en la sección z (0.5µm de grosor). Los filtros de excitación utilizados, fueron el verde (514nm) para la excitación del IP (canal de rodamina) y el azul (418nm) para el canal verde. Las digitalización de las imágenes se guardaron en un disco Jazz regrabable.

---

\* Ver apéndice 1 de soluciones

## **RESULTADOS**

---

---

## RESULTADOS

---

### - APOPTOSIS

#### MICROSCOPIA ÓPTICA

Al exponer a los condrocitos con VP-16 a una dosis de 10 $\mu$ M, estos no presentaron ningún cambio morfológico significativo o muerte generalizada en las primeras 12h de exposición. No así en las dosis de 0.2, 0.3, 0.5, 0.7 (no se muestra) y 1mM en donde a pesar de mostrar una morfología variada, fue posible observar en algunas ocasiones “blebbing” y fragmentación del citoplasma, finalizando siempre sin la aparente fragmentación nuclear.

La dosis empleada para el experimento de fagocitosis fue la de 1mM, debido a que con esta dosis es posible observar a la mayoría de las células como núcleos desnudos, lo cual ocurría en un intervalo de 5 a las 12h de exposición (Fig.39).

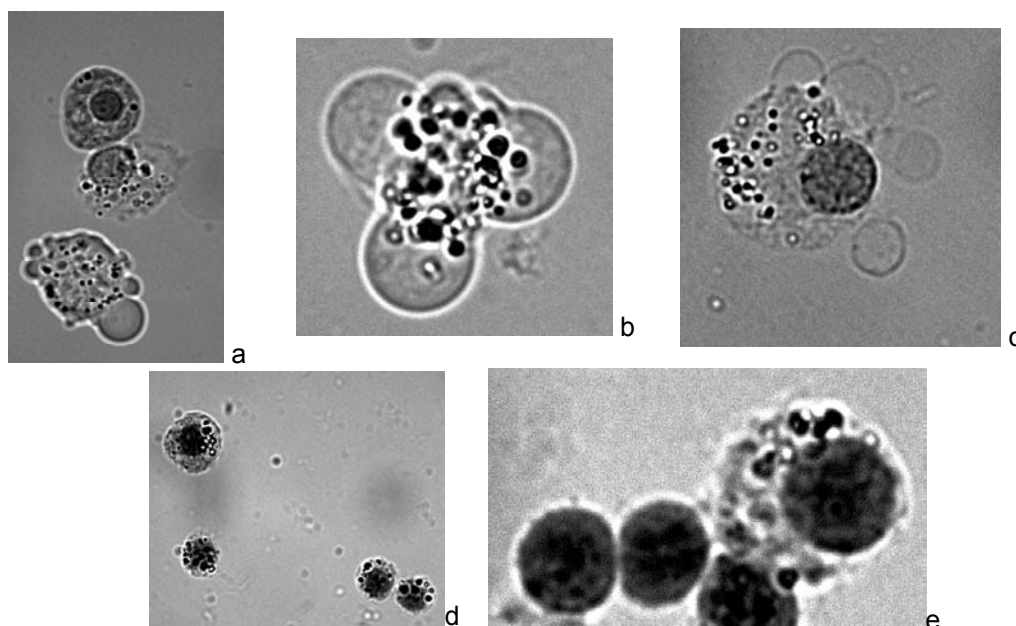


Fig. 39. (a y b).Se observa el “blebbing” característico de apoptosis, (c) la fragmentación de las células, (d y e) núcleos aparentemente desnudos. (63X)

## MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Tras la exposición a VP-16, las células responden de distinta manera y asincrónicamente, por lo que podemos encontrar que los condrocitos muestran morfología variada y distintos tipos de muerte celular: 1. apoptosis, células con características clásicas: condensación celular, empaquetamiento de cromatina en forma de parches o media luna y desarrollo de RER. Los cuerpos apoptóticos presentan citoplasma, algunos organelos y/o restos de cromatina rodeados de membrana plasmática; 2. necrosis, células con gran infiltración edematosa con pérdida de la membrana plasmática y destrucción general y 3. aponecrosis, condrocito que presenta como su nombre lo indica características tanto apoptóticas (condensación de cromatina en forma de media luna) como necróticas (infiltrado edematoso y pérdida de la membrana plasmática). Fig. 40

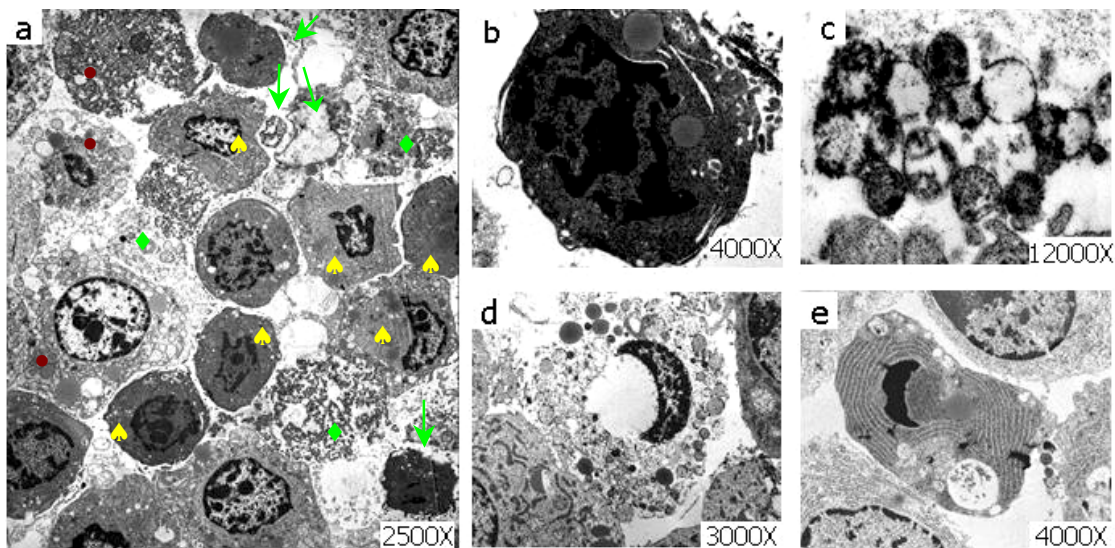


Fig. 40. a) Condrocitos apoptóticos (▲), algunos cuerpos apoptóticos (↑), células necróticas (●) y detritos celulares (◆). b) condrocito apoptótico sumamente condensado con empaquetamiento de la cromatina en forma de parches; c) cuerpos apoptóticos nucleares y citoplásmicos claramente rodeados por una membrana; d) condrocito aponecrótico, célula que presenta empaquetamiento de cromatina en forma de media luna, infiltrado edematoso y pérdida de la membrana celular y e) condrocito apoptótico con empaquetamiento de cromatina en forma de media luna, citoplasma condensado con desarrollo de retículo endoplásmico y delimitado por la membrana plasmática.

## **-FAGOCITOSIS**

### CITOMETRÍA DE FLUJO

En cada una de las gráficas, el eje de las “abscisas” muestra el tamaño de la partícula y/o célula y el eje de las “ordenadas” la complejidad de éstas; mientras que en los histogramas, el eje de las “abscisas” representa la fluorescencia y el eje de las “ordenadas” el número de eventos.

En las gráficas, podemos diferenciar a los condrocitos de las partículas de látex, observando que se ubican en distintas regiones de las gráficas por sus diferencias (tamaño, complejidad, fluorescencia). También, es posible observar a los condrocitos interactuando con las partículas de látex, para lo que fue necesario hacer un análisis por separado para poder saber cuales eran las partículas de látex y cuales los condrocitos observándose que la región de los condrocitos (región en rojo), solo el 8.58% de los condrocitos se mantiene en la región normal, es decir no presentan fluorescencia, mientras que el 91.42% presenta fluorescencia ( $10^1$  a  $10^4$ ) lo que nos sugiere que las partículas de látex fueron fagocitadas por los condrocitos. Al analizar únicamente al látex (región verde) observamos que el 99.91% del látex se encuentra en la región original (máxima fluorescencia) que corresponde al pico observado en el control (Fig. 41).

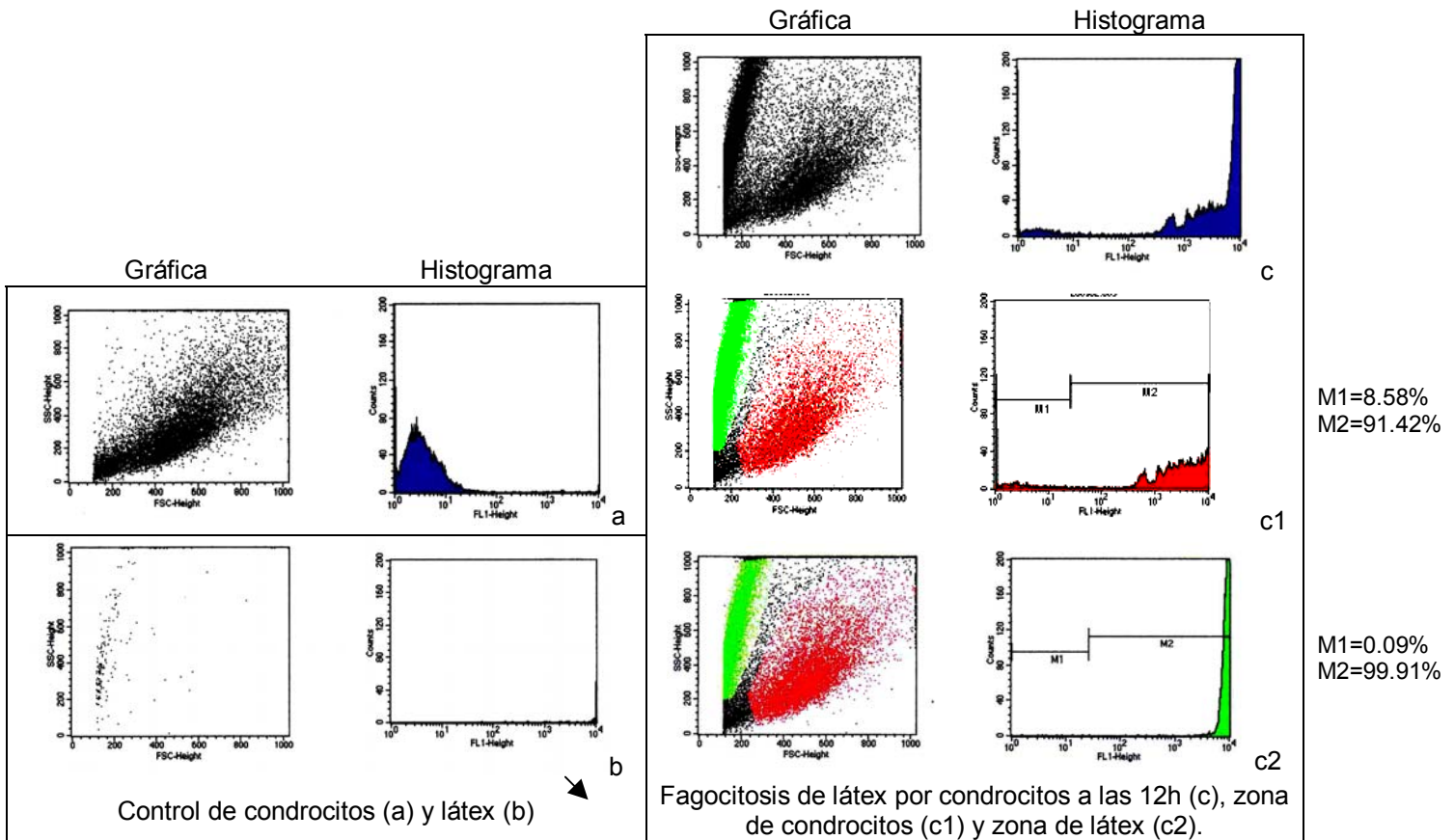


Fig. 41. (a) Los histogramas, nos muestran que los condrocitos prácticamente no presentan fluorescencia, (b) mientras que el látex tiene una fluorescencia máxima (flecha). Al interactuar condrocitos y látex (c) se observa que los condrocitos presentan fluorescencia (c1), mientras que el látex (c2) muestra un nivel constante de fluorescencia

## MICROSCOPIA CONFOCAL

Por medio del microscopio confocal se pudo observar que los condrocitos son capaces de fagocitar partículas de látex. A través de 20 cortes en promedio, de  $0.5\mu\text{m}$  de espesor en la sección z, es posible observar como las partículas de látex van apareciendo conforme se van haciendo los cortes de la célula al confocal, que al ir profundizando desaparecen, indicándonos si las partículas de látex observadas en las proyecciones fueron o no fagocitadas. Los condrocitos se observan con tinción completa (núcleo y citoplasma), debido a que no fueron sometidos a ningún tratamiento de eliminación de RNA (Fig. 42).

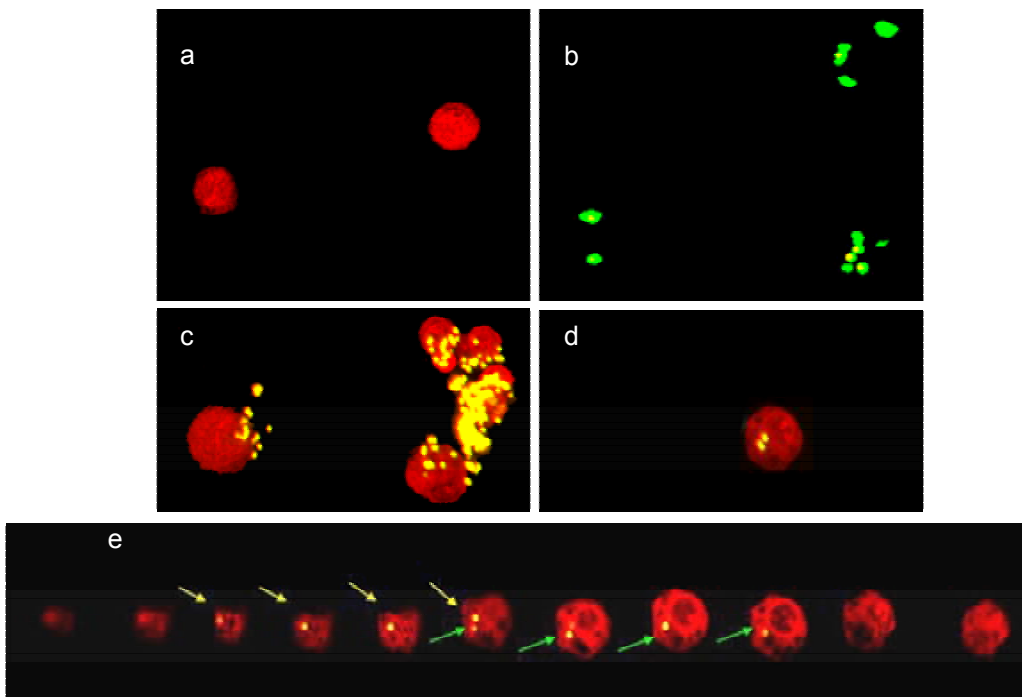


Fig. 42. (a) Condrocitos teñidos con IP, (b) Microesferas de látex fluorescente, (c) Proyección de varios cortes realizados a condrocitos con partículas de látex dentro y fuera de ellos, (d) Proyección de un condrocito con dos partículas de látex fagocitadas; (e) Cortes ópticos de  $0.5\mu$  en la serie z de un condrocito que presenta 2 microesferas de látex fluorescente (flechas amarillas y verdes) que van apareciendo conforme se analiza a la célula [cortes que corresponden a (d)]. 60X



## MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Los condrocitos al interactuar con las partículas de látex, son capaces de fagocitarlas, observándose claramente partículas en el interior del condrocito, que corresponden tanto a las observadas en la periferia como a las del grupo control (Fig.43). Lo cual confirma a los resultados anteriores.

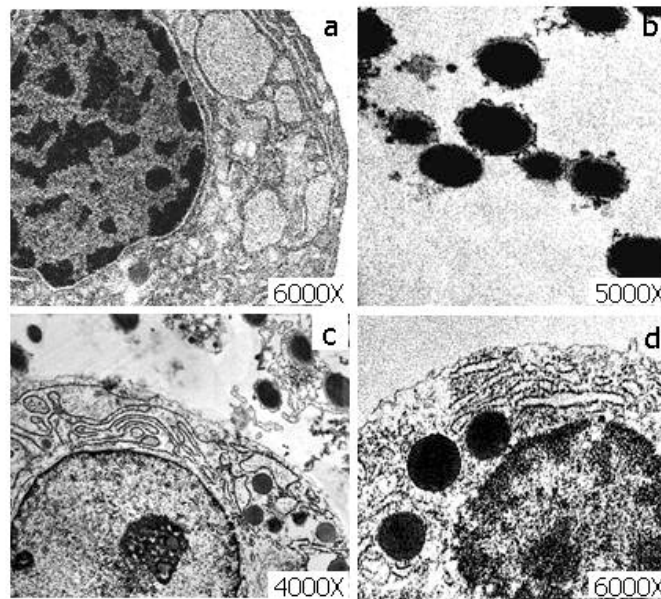


Fig. 43. (a)Condrocito normal, (b)Microesferas de látex (c y d )Condrocitos con microesferas de látex fagocitadas que corresponden a las observadas en la periferia de c.

Se puede observar un condrocito normal, sumamente reticulado lo que indica que está en actividad de síntesis y detritos de cartílago control. Así mismo, en el grupo experimental de fagocitosis de detritos de CA, se observan dichos detritos en la periferia de los condrocitos, que intentan ser internalizados por los condrocitos a través de la emisión de pseudópodos, o que ya han sido fagocitados, observándose claramente dentro de fagosomas. Clara evidencia de que los condrocitos pueden fagocitar detritos de CA (Fig. 44).

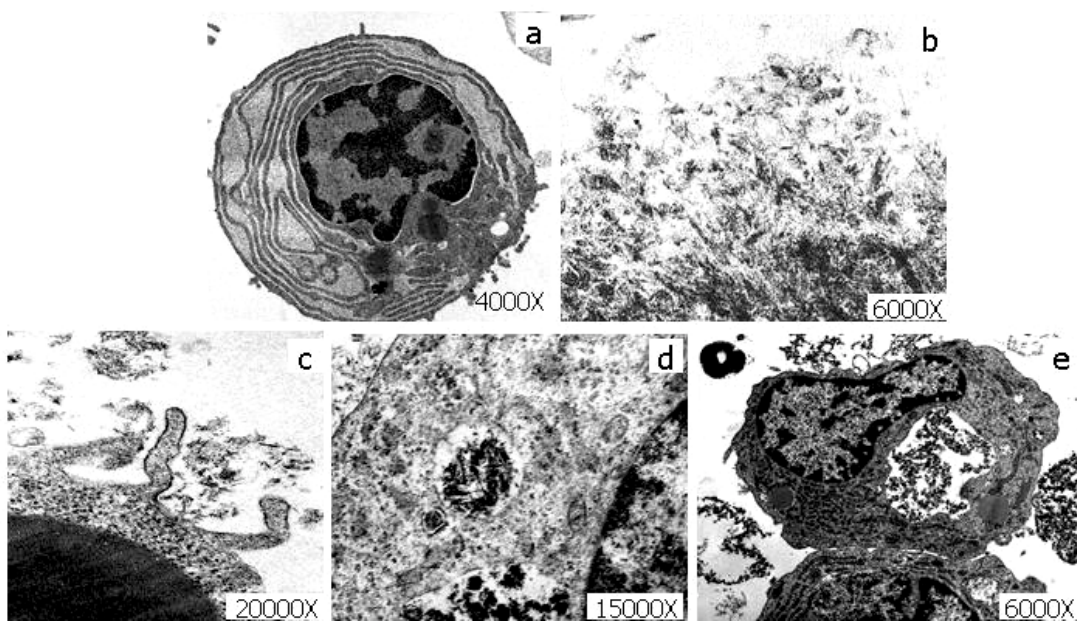


Fig. 44. (a) Condrocito normal. (b) Detritos de cartílago articular (c). Condrocito emitiendo un pseudópodo para la fagocitosis de detritos de cartílago articular ubicados en la periferia (flecha); en el que también se aprecia una inclusión lipídica (L). (d y e) Condrocitos con fagosomas de detritos (cabezas de flecha).

## MICROSCOPIA ÓPTICA

Los cortes semifinos muestran un condrocito que posiblemente este invaginando un cuerpo apoptótico, así como a condrocitos que aparentemente han fagocitado “condrocitos apoptóticos” dentro de posibles fagosomas. Esto se confirma por microscopía electrónica de transmisión (Fig. 45).



Fig. 45. Cortes semifinos de condrocitos con posibles cuerpos apoptóticos fagocitados a las 12h de interacción (63X). a) Posible fagocitosis de un cuerpo apoptótico por invaginación. b y c) Cuerpos apoptóticos dentro de posible fagosoma.

## MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

En el grupo experimental de fagocitosis de células apoptóticas, se observó la fagocitosis de posibles cuerpos apoptóticos y de detritos celulares y/o células necróticas (células edematizadas con citoplasma sumamente alterado). Algunas células presentaron fagocitosis por invaginación y otras por emisión de pseudópodos (Fig. 46).

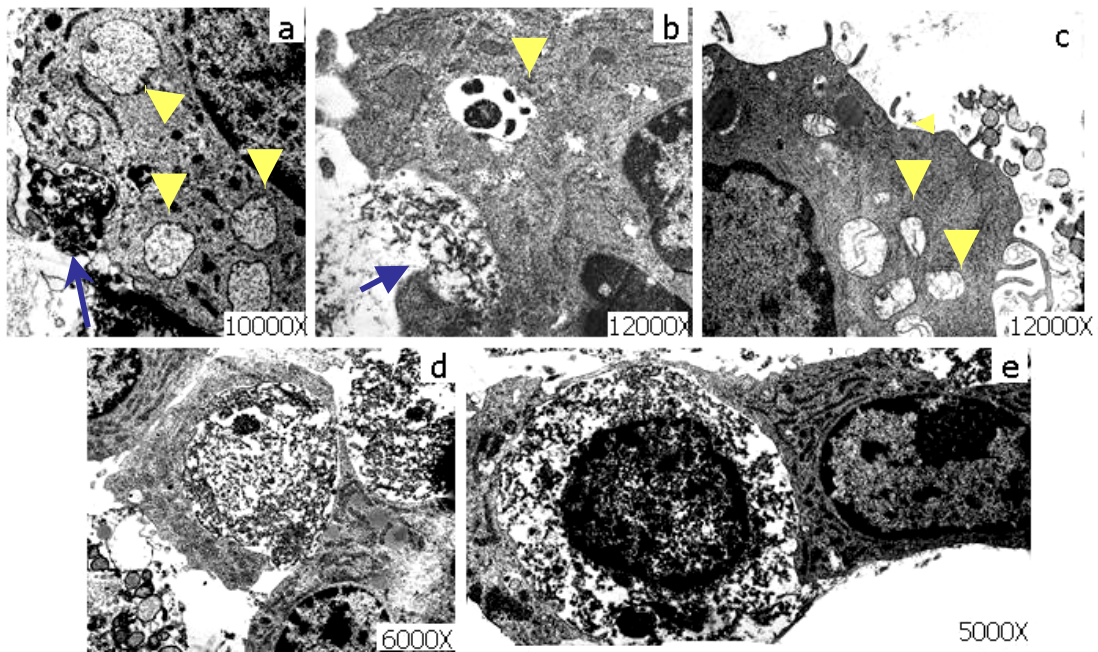


Fig. 46. (a) Condrocito fagocitando por invaginación (flecha) un aparente cuerpo apoptótico (ACAp), formación de vacuolas fagocíticas (cabeza de flecha). (b) Condrocito con ACAp fagocitados dentro del fagosoma (cabeza de flecha) e invaginando detritos celulares (flecha). (c) Condrocito emitiendo pseudópodos para la fagocitosis de ACAp que presenta mitocondrias edematizadas (cabeza de flecha). (d y e) Condrocitos fagocitando una gran cantidad de detritos y una célula necrótica por emisión de pseudópodos.

## **DISCUSIÓN**

---

---

## DISCUSIÓN

---

A través de los años, la fagocitosis, ha adquirido gran importancia debido a que gracias a este fenómeno el organismo es capaz de eliminar sustancias o invasores perjudiciales, conocidos como antígenos (Ag), con el fin de defender al organismo. Sin embargo, este mecanismo no solo permite la eliminación de Ag, sino también, de cuerpos apoptóticos<sup>67,95,111</sup>, ya sea en enfermedad o en condiciones normales; convirtiéndose este proceso en uno de los más importantes en la homeostasis del organismo. En la mayoría de los tejidos, este proceso es llevado a cabo por células fagocíticas especializadas como los macrófagos y neutrófilos sin causar ningún tipo de daño o inflamación<sup>21,95,112</sup>. Sin embargo, en el cartílago articular, que es avascular y alinfático<sup>4</sup> estas células “profesionales” no han sido observadas dentro de este tejido y por tanto se presume que no sean éstas las encargadas de eliminar los residuos apoptóticos<sup>5,16,18</sup> que resultan del proceso degenerativo de la osteoartritis en donde la apoptosis se ve notablemente incrementada<sup>12-14,20</sup>.

Se ha sugerido que vesículas desprendidas de condrocito están involucradas en la mineralización del cartílago osteoartrosico<sup>14,16,18</sup>, mientras que otros tipos de residuos apoptóticos sean eliminados por condrocitos vecinos<sup>18</sup>. Por otra parte, en algunos estudios, se ha demostrado que los condrocitos son capaces de endocitar cristales de pirofosfato de calcio dihidratado<sup>22</sup> e hidroxipatita<sup>22</sup>, lo que resulta en la liberación de enzimas y prostaglandinas y por tanto en la degradación del cartílago. Además se ha reportado que los condrocitos endocitan hialuronato<sup>119,120</sup> y proteoglicanos (biglicano, decorin)<sup>118</sup>, en este caso con la finalidad de regular su concentración. También se ha descrito la fagocitosis de materiales extraños como partículas de látex<sup>121</sup>; fibras, pequeñas partículas y cuerpos apoptóticos<sup>18</sup>. Sin embargo, en el presente trabajo, es la primera vez que se demuestra que los condrocitos, no solo son capaces de fagocitar material inerte y extraño, si no también material propio como detritos de cartílago articular y condrocitos apoptóticos inducidos con VP-16, *in vitro*. Esto apoya a lo sugerido por Kourí y col. en el 2002<sup>18</sup>, es decir, que los

condrocitos podrían ser los encargados de eliminar a las células dañadas del cartílago articular, principalmente en la Osteoartrosis en donde la muerte celular programada se ve notoriamente incrementada y no existen procesos inflamatorios<sup>14-16,20</sup>. Por tanto nuestros resultados sugieren fuertemente que la fagocitosis por los condrocitos podría ser muy importante en la patogénesis de la enfermedad como último paso del proceso apoptótico.

Para la inducción de apoptosis con VP-16, fue necesario estandarizar la dosis, el tiempo y las condiciones necesarias para la obtención de condrocitos apoptóticos, dado que se sabe, por medio de los diversos trabajos<sup>122-131</sup> que no es posible generalizar los efectos moleculares y cambios morfológicos en las distintas estirpes celulares, ya que incluso podrían variar de acuerdo al estudio realizado (*in vitro* [explante, cultivo] o *in vivo*).

Por todo lo anterior, en estudios prospectivos, se requerirá que se busque la presencia de receptores específicos necesarios para que se lleve a cabo la fagocitosis en los condrocitos.

También, será necesario correlacionar las distintas vías de la apoptosis por microarreglos e inmunohistoquímica y determinar a que corresponden los distintos tipos morfológicos en la OA, las vías que se han seguido y su importancia en la patología. Todo esto con la finalidad de conocer mejor los mecanismos celulares y moleculares de esta enfermedad, lo que pudiera ser importante en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas.

## **CONCLUSIONES**

---

---



## CONCLUSIONES

---

- Los condrocitos, *in vitro*, son capaces de funcionar como células fagocíticas no profesionales (detritos de cartílago articular y condrocitos apoptóticos)
- La fagocitosis de los condrocitos se realiza por emisión de pseudópodos o por invaginación.
- Los condrocitos presentan morfología variada y distintos tipos de muerte ante el mismo estímulo apoptótico (VP-16 1mM)

### CONCLUSIÓN GENERAL.

- Los condrocitos fagocitan, *in vitro*, detritos de cartílago articular y residuos apoptóticos, lo que nos sugiere que podrían funcionar como células fagocíticas no profesionales en el estadio final de este tipo de muerte celular programada en la Osteoartritis.

## REFERENCIAS

---

---

## REFERENCIAS

---

1. Resnick y Niwayama. (1981). Diagnosis of bone and joint disorders. Saunders company. Estados Unidos. Págs. 31-42,176-192,746-754,802-845.
2. Huerta GM. (2000). Cultivo primario tridimensional de condrocitos de rata Wistar como modelo en el estudio de la osteoartrosis experimental. Tesis de Titulación. FES Cuautitlán. UNAM.
3. Román S. (2000). El cartílago articular. Iams Nutrition symposium, Chicago.
4. Moskowitz RW, Howell DS, Altman RD, Buckwalter JA y Goldberg VM. (2001). Osteoarthritis: Diagnosis and medical/surgical management. W.B. Saunders Company. 3a ed. Estados Unidos. 10-17, 31-39, 49-51, 56-61, 231-282.
5. Krane SM, Neer RM. (1990). Tejido conectivo. En Smith LH, Thier SO. Fisiopatología: principios biológicos de la enfermedad. Médica Panamericana. 2ª ed. Argentina, 564-600.
6. Bolaños L. (1997). Estudio morfológico del cartílago articular normal y la condición de osteoartrosis en rata. Tesis de Maestría. CINVESTAV-IPN.
7. Poole, (1997). Articular cartilage chondrons: form, function and failure. Journal of Anatomy, 191, 47-55.
8. Howell DS, (1988). Degeneración del cartílago en modelos animales y en humano con osteoartrosis. En: Howell D, Felder M, Cabral CA, et al. El cartílago y la osteoartritis: Simposio Internacional. México: Centro de Comunicación Médica Ciba-Geigy.
9. [www.saludhoy.com/htm/mujer/articulo/osteoar1.html](http://www.saludhoy.com/htm/mujer/articulo/osteoar1.html)

10. [www.arthritis.org/AFStore/Osteoarthritis/osteoarthritis6.asp](http://www.arthritis.org/AFStore/Osteoarthritis/osteoarthritis6.asp)
11. [www.revistacambio.com/web/interior.php?idp=15&ids=6](http://www.revistacambio.com/web/interior.php?idp=15&ids=6)
12. Kourí JB, Rosales-Encina JI, Chaudhuri PP, Luna J, Mena R. (1997). Apoptosis in human osteoarthritic cartilage. A microscopy report. *Medical Science Research* 25, 245-8.
13. Blanco FJ, Guitian R, Vázquez-Martul E, de Toro FJ, Galdo F. (1998). Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheumatology* 41(2), 284-9.
14. Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, Lotz M. (1998). Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheumatology* 41 (9), 1632-8.
15. Maličev E, Woyniac G, Knežević M, Radosavljević D, Jeras M. (2000). Vitamin C induced apoptosis in articular chondrocytes. *Pflügers Arch – European Journal Physiology* 440 [Suppl], R46-R48.
16. Hashimoto S, Ochs RL, Rosen F. (1998). Chondrocytes-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage. *Proceeding National Academy of Science of the United States of America* 95, 3094-99.
17. Kourí JB, Aguilera JM, Reyes J, Abbud K, González S. (2000). Apoptotic Chondrocytes from Osteoarthrotic Human Articular Cartilage and Abnormal Calcification of Subchondral Bone. *Journal Rheumatology* 27, 1005-19.
18. Kourí JB, Abbud KA, Rojas L. (2002). Kinetics of the Ultrastructural Changes in Apoptotic Chondrocytes from an Osteoarthrotic Rat Model: A Window of Comparison to Apoptotic Mechanism in Humans Chondrocytes. *Ultrastructural Pathology* 26, 33-40.
19. Moti L, Tikku, Shah R y Allison GT. (2000). Evidence linking chondrocyte lipid peroxidation to cartilage matrix protein degradation: Possible role in

- cartilage aging and the pathogenesis of osteoarthritis. *Journal of Biology Chemistry* 275 (26), 20069-76.
20. Lotz M, Hashimoto S, Kuhn K. (1999). Mechanism of chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage* 7(4), 389-91.
21. Savill J, Fadok Va. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784-8.
22. Cheung HS, Halverson PB, McCarty DJ. (1983). Phagocytosis of Hydroxiapatite or Calcium Pyrophosphate Dyhidrate Crystals by Rabbit Articular Chondrocytes Stimulates Release of Collagenase, Neutral Protease, and prostaglandins PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2α</sub>. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medical* 173, 181-9.
23. Bronckers AL, Goei W, van Heerde WL, Dumont EA, Reutelingperger SM y van den Eijnde, SM. (2000). Phagocytosis of dying chondrocytes by osteoclast in the mouse growth plate as demonstrated by annexin-V labeling. *Cell Tissue Research*. 301, 267-72.
24. Rodríguez M. (1993). Anatomía fisiología e higiene. Progreso, 9a ed. México, D. F. Págs. 47-52.
25. [www.encolombia.com/artritis-se-parecen-osteoartrosis.htm](http://www.encolombia.com/artritis-se-parecen-osteoartrosis.htm)
26. [biologicalmango.metropoliglobal.com/Articulaciones/](http://biologicalmango.metropoliglobal.com/Articulaciones/)
27. [www.fhemofilia.org.ar/contenid1.htm](http://www.fhemofilia.org.ar/contenid1.htm)
28. [education.vetmed.vt.edu/Curriculum/VM8054/Labs/Lab7/Lab7.htm](http://education.vetmed.vt.edu/Curriculum/VM8054/Labs/Lab7/Lab7.htm)
29. Genser F. (1990). Histología. Editorial Médica Panamericana, 2ª ed. México. Págs. 142-152,200-206.
30. Fawcett DW. (1995). Tratado de histología. Interamericana Mc Graw-Hill, 12ª ed. México. Págs. 52-58,203-215.

31. [.escuela.med.puc.cl/paginas/Cursos/segundo/histologia/HistologiaWeb/paginas/co24259.html](http://escuela.med.puc.cl/paginas/Cursos/segundo/histologia/HistologiaWeb/paginas/co24259.html)
32. [www.adam.com](http://www.adam.com)
33. Woolley DE y Evanson JM. (1998). Collagenase in normal and pathological connective tissues. John Wiley & Sons. Estados Unidos. Págs., 2-10
34. Kouri JB, Argüello C, Luna J y Mena R. (1998). Use of Microscopical Techniques in the study of human chondrocytes from osteoarthritic cartilage: An overview. *Microscopy Research and Technique* 40, 22-36.
35. Kouri JB, Argüello C, Quintero M, Chico A y Ramos MA. (1996). Variability in the cell phenotype of aggregates or “clones” of human Osteoarthritic cartilage. A case report. *Biocell* 20(3), 191-200.
36. [www.sdoro.com/dr.gustavodelamora/sino.htm](http://www.sdoro.com/dr.gustavodelamora/sino.htm)
37. [www.explored.com.ec/guia/fas856.htm](http://www.explored.com.ec/guia/fas856.htm)
38. [www.ecuador.com/forums/showthread.php3?threadid=1050](http://www.ecuador.com/forums/showthread.php3?threadid=1050)
39. [www.niams.nih.gov/hi/topics/arthritis/osteoarthritis\\_spanish.htm](http://www.niams.nih.gov/hi/topics/arthritis/osteoarthritis_spanish.htm)
40. Forrester DM, Brown JC. (1990). Radiología de las enfermedades articulares. Salvat editor. España. Págs. 105-115,254-259.
41. Barceló P, Nadal A. (1997). Referencia rápida en reumatología. Harcourt Brace. España. Págs. 80-83.
42. [www.contusalud.com/website/folder/](http://www.contusalud.com/website/folder/)
43. [salud.consalud.com/demujer/enfermedades/n\\_historia.asp?newsid=209](http://salud.consalud.com/demujer/enfermedades/n_historia.asp?newsid=209)
44. [www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000423.htm](http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000423.htm)
45. [www.arthritiscentral.com/html/spmapostea.htm#clinical](http://www.arthritiscentral.com/html/spmapostea.htm#clinical)

46. [www.iladiba.com.co/revista/1997/11/medfa1.asp](http://www.iladiba.com.co/revista/1997/11/medfa1.asp)
47. Brower AC. (1994). Radiología articular. Editorial Morban, edición española. España. Págs. 213-230.
48. Reyes PA. (1996). Manual de Reumatología. Méndez editores. México. Págs. 41-51.
49. Kouri JB, Rojas L, Luna J, Abbud K y Mena R. Chondrocytes apoptosis in osteoarthrosic human cartilage: involvement in matrix degradation. Enviado a publicar a Journal of Rheumatology.
50. [www.tusalud.com.mx/120301.htm](http://www.tusalud.com.mx/120301.htm)
51. [www.drscope.com/pac/mg-2/6/mg2t6\\_p19.htm](http://www.drscope.com/pac/mg-2/6/mg2t6_p19.htm)
52. Sanmartí R, Collado A, Muñoz J. (1995). Procedimientos diagnósticos en reumatología. Mosby. España. Págs. 77-90.
53. [www.uccpa.net/osteoartrosis\\_rodilla.htm](http://www.uccpa.net/osteoartrosis_rodilla.htm)
54. [www.viatusalud.com/documento.asp?ID=101&G=117](http://www.viatusalud.com/documento.asp?ID=101&G=117)
55. [familydoctor.org/spanish/e115.html](http://familydoctor.org/spanish/e115.html)
56. [www.entornomedico.org/salud/saludyenfermedades/alfa-omega/osteoartrosis.html](http://www.entornomedico.org/salud/saludyenfermedades/alfa-omega/osteoartrosis.html)
57. [www.ti.ubc.ca/pages/letter4.html](http://www.ti.ubc.ca/pages/letter4.html)
58. [pcs.adam.com/ency/article/000423trt.htm](http://pcs.adam.com/ency/article/000423trt.htm)
59. [orthoinfo.aaos.org/brochure/thr\\_report.cfm?Thread\\_ID=40&topcategory=Spanish](http://orthoinfo.aaos.org/brochure/thr_report.cfm?Thread_ID=40&topcategory=Spanish)

60. Miller MD, Osborne JR, Warnr JJP y Fu FH. (1998). Resonancia magnética y artroscopia. Correlación en la patología articular. Harcourt Brace. España. Págs. 13-17.
61. [www.cemtro.es/aguillen/artritis/diagnost.htm](http://www.cemtro.es/aguillen/artritis/diagnost.htm)
62. Duke RC, Ojcius DM y Young JD. (1997). Suicidio celular en la salud y en la enfermedad. *Investigación y Ciencia*, 44-52.
63. Meier P y Finch A. (2000). Apoptosis in development. *Nature* 407, 796-801.
64. Baehrecke EH. (2002). How death shapes life during development. *Nature reviews* 3, 779-87.
65. Yuan J y Yankner BA. (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407, 802-9.
66. Krammer P. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-95.
67. Kerr JFR, Wyllie y Currie AR. (1972). Apoptosis: A basic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26, 239-57.
68. González EO y Zentella A. (1998). Apoptosis y muerte celular programada. *BEB* 17 (3), 109-14.
69. Miller LJ y Marx J. (1998). Apoptosis. *Science* 281, 1301-26.
70. Hengartner MO. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-6.
71. Leist M y Jäätelä M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspasas to alternative mechanisms. *Nature* 2, 1-10.



72. Kovacsovics M, Martinon F, Micheau O, Bodmer JL, Hofmann K y Tschopp J. (2002). Overexpression of helicard, a CARD containing helicase cleaved during apoptosis, accelerates DNA degradation. *Current Biology* 12, 838-43.
73. Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ. (2000). Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *Journal Cell Physiology* 182 (1), 41-49.
74. Formigli L, Zecchi OS, Capaccioli S, Poupon MF, Bani D. (2002). Energy-dependent types of cell death in MCF-7 breast cancer cell tumors implanted into nude mice. *Cells Tissues and Organs* 170(2-3), 99-110.
75. Cheng W, Zheng X, Quimby FQ, Roneker CA y Lei X. (2002). Low levels of glutathione peroxidase-1 activity in selenium-deficient mouse liver affect JNK activation and p53 phosphorylation on Ser-15 in the pro-oxidant-induced aponecrosis. *Biochemistry J.* [epub ahead of print].
76. Hengartner M. (1998). Death by crowd control. *Science* 281, 1298-355.
77. Adams J y Cory S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-6.
78. Green D y Kroemer G. (1998). The central executioners of apoptosis: caspasas or mitochondria? *Cell Biology* 8, 267-71.
79. [www.sghms.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/signaling.html](http://www.sghms.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/signaling.html)
80. Strasser A, O'Connor L y Dixit VM. (2000). Apoptosis signaling. *Annals Review of Biochemistry* 69, 217-45.
81. Douglas R, Green y Reed JC. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-12.

82. Desagher S y Martinou J. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Cell Biology* 10, 369-77.
83. Antonson B. (2001). Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family “killer-proteins” and their victim the mitochondrion. *Cell Tissue Research* 306(3), 347-61.
84. Dietrich JB. (1997). Apoptose et gènes anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. *Achieve Physiology and Biochemistry* 105 (2), 125-35.
85. López-Hoyos M, Carrió R, Merino J y Merino R. (1998). Regulación de la apoptosis en linfocitos B y T por los genes Bcl-2 y Bcl-x. *Revista Española de Reumatología* 25, 63-73.
86. Chau DT y Korsmeyer SJ. (1998). *Annual Review in Immunology* 16, 395-419
87. Cory S, Adams JM. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Review of Cancer* 2(9), 647-56.
88. Strasser A, Puthalakath H, Bouillet P, Huang DC, O'Connor L, O'Reilly LA, Cullen L, Cory S y Adams JM. (2000). The role of bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family in cell-death control. *Annals of New York Academic of Science* 917, 541-8.
89. Brenner C y Kroemer G. (2000). Mitochondria-the death signal integrators. *Science* 289, 1150-1.
90. Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich, Schneiter R, Green DR y Newmeyer DD. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111, 331-42.

91. Chau BN, Borges H, Chen T, Masselli A, Hunton IC y Wang YJ. (2002). Signal-dependent protection from apoptosis in mice expressing caspase-resistant Rb. *Nature Cell Biology* 4, 757-65.
92. Slee (1999) *Journal of Cell Biology* 144: 281-291.
93. Raff, M. (1998). Cell suicide for beginners. *Nature* 396: 119.
94. Thornberry, N.A. & Lazebnik, Y. (1998) *Science* 281: 1312-1316.
95. Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A y Nagata S. (2002). Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 417, 182-187
96. Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. (1993) Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunology Today* 14, 131-136.
97. Salvensen GS, Duckett CS. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Molecular Cell Biology* 3, 401-10
98. Nicholson DW. (2000). From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 407, 810-6
99. Mitchell A (2002). The p53 mafia. *Nature Reviews* 3, 309
100. [http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/122/htm/sec\\_7.htm](http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/122/htm/sec_7.htm)
101. Kart G. (1996). *Cell and molecular biology. Concepts and experiments.* John Wiley & Sons. Estados Unidos. Págs. 147-160,250-254, 321-327
102. [http://library.thinkquest.org/C004535/molecule\\_transport.html](http://library.thinkquest.org/C004535/molecule_transport.html)
103. Tropp BE. (1997). *Biochemistry. Concepts and applications.* Brooks/cole publishing company. Estados Unidos. Págs. 37-38,46-48
104. [http://www.wantwit.com/Biol/espanol/mosaic\\_3.htm](http://www.wantwit.com/Biol/espanol/mosaic_3.htm)

105. [http://mx.geocities.com/avolaje/Lacelula\\_b1/cubiertascelulares\\_b1.html](http://mx.geocities.com/avolaje/Lacelula_b1/cubiertascelulares_b1.html)
106. <http://www.cnice.mecd.es/mem2001/biologia/ayuda/thesaurus.htm>
107. Gagnon E, Duclos S, Rondeau C, Chevet E, Cameron PH, Steele-Mortimer O, Paiement J, Bergeron JJM y Desjardins M. (2002). Endoplasmic Reticulum-Mediated Phagocytosis Is a Mechanism of Entry into Macrophages. *Cell* 110, 119-131.
108. [http://www.cvm.uiuc.edu/courses/vp331/Intracell\\_Bacteria/](http://www.cvm.uiuc.edu/courses/vp331/Intracell_Bacteria/)
109. <http://www.canalsalud.com/massalud/miscelanea/compartido.htm>.
110. <http://education.vetmed.vt.edu/Curriculum/VM8054/Labs/Lab20/Notes/kupfer.htm>
111. Savill J. (1998). Phagocytic docking without shocking. *Nature* 392, 442-443.
112. Vivers S, Dransfield I y Hart SP. (2002). Role of macrophage CD44 in the disposal of inflammatory cell corpses. *Clinical Science* 103, 441-449.
113. Scaffidi P, Misteli T y Bianchi ME. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418, 191-195.
114. Savill J. (1997). Apoptosis in resolution of inflammation. *Journal Leukocyte of Biology* 61(4), 375-80.
115. Devitt A, Moffatt OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL y Gregory CD. (1998). Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392, 505-509.
116. Scott RS, McMahon EJ, Pop SM, Reap EA, Caricchio R, Cohen PL, Earp HS y Matsushima GK. (2001). Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* 411, 207-211.

117. Savill J. (1997). Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *British Medicine Bulletin* 53(3), 491-508.
118. Hausser H, Ober B, Quentin-Hoffmann E, Shmidt B y Kresse H. (1992). Endocytosis of different members of the small chondroitin/dermatan sulfate proteoglycan family. *Journal of Biology Chemistry* 267(16), 11559-64.
119. Hua, Knudson C y Knudson W (1993). Internalization of hyaluronan by chondrocytes occurs via receptor-mediated endocytosis. *Journal of Cell Science* 106, 365-75
120. Aguiar DJ, knudson W y Knudson CB. (1999). Internalization of hyaluronan receptor CD44 by chondrocytes. *Experimental Cell Research* 252(2), 292-302.
121. Sakuma E, Wada I, Wang HJ, Maruyama H y Matsumi N (1999). Ultrastructural study of cells at the sinovium-cartilage junction: response of synovial cells of the rat knee joint to INTA-articular injected latex particles. *Kaibogaku Zasshi* 74(5), 525-35 [abstract].
122. Bonelli G, Sacchi MC, Barbiero G, Duranti G, Goglio G, Verdun di Cantogno L, Amenta JS, Piacentini M Tacchetti C y Baccino FM. (1996). Apoptosis of L929 cells by etoposide: A quantitative and kinetic approach. *Experimental Cell Research* 288, 292-305.
123. Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky y Orrenius S. (2000). Distinct pathways for stimulation of cytochrome c release by etoposide. *Journal of Biology Chemistry* 275,32438-43.
124. Sleiman RJ y Stewart BW. (2000). Early caspase activation in leukemic cells subject to etoposide-induced G<sub>2</sub>-M arrest: Evidence of commitment to apoptosis rather than mitotic cell death. *Clinical Cancer Research* 6, 3356-65.

125. Mizumoto K, Rothman RJ y Farber JL. (1994). Programmed cell death (apoptosis) of mouse fibroblast is induced by the topoisomerasa II inhibitor etoposide. *Molecular Pharmacology* 46, 890-95.
126. Boulares AH, Zoltoski AJ, Contreras FJ, Yakovlev AG, Yoshihara K, Smulson ME. (2002). Regulation of DNAS1L3 endonuclease activity by poly(ADP-ribosyl)ation during etoposide-induced apoptosis. Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage in endonuclease activation. *Journal of Biology Chemistry* 4; 277(1), 372-8.
127. Helmbach H, Kern MA, Rossmann E, Renz K, Kissel C, Gschwendt B, Schadendorf D. (200). Drug resistance towards etoposide and cisplatin in human melanoma cells is associated with drug-dependent apoptosis deficiency. *Journal Investigation of Dermatology* 118(6), 923-32.
128. Mailloux A, Grenet K, Bruneel A, Beneteau-Burnat B, Vaubourdolle M, Baudin B. (2001). Anticancer drugs induce necrosis of human endothelial cells involving both oncosis and apoptosis. *European Journal of Cell Biology* 80(6), 442-9.
129. Soldani C, Bottone MG, Pellicciari C, Scovassi AI. (2001). Two-color fluorescence detection of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) cleavage and DNA strand breaks in etoposide-induced apoptotic cells. *European Journal of Histochemistry* 45(4), 389-92.
130. Martinsson P, Liminga G, Nygren P y Larson R. (2001). Characteristics of etoposide-induced apoptotic cell death in U-937 human lymphoma cell line. *Anticancer Drugs* 12(8), 699-705.
131. Sawada M, Nakashima S, Banno Y, Yamakawa H, Hayashi K, Takenaka K, Nishimura Y, Sakai N, Nozawa Y. (2000). Ordering of ceramide formation, caspase activation, and Bax/Bcl-2 expression during etoposide-induced apoptosis in C6 glioma cells. *Cell Death Differ* 7(9), 761-72.

132. Shrivastava P, Sodhi A, Ranjan P. (2000). Anticancer drug-induced apoptosis in human monocytic leukemic cell line U937 requires activation of endonuclease(s). *Anticancer Drugs* 11(1), 39-48.
133. Fujita N, Tsuruo T. (1998). Involvement of Bcl-2 cleavage in the acceleration of VP-16-induced U937 cell apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 246, 484-88.
134. Enciclopedia Microsoft. Encarta 2002.
135. Samuilov VD, Oleskin AV, Lagunova EM. 2000. Programmed cell death. *Biochemistry (Moscow)* 65 (8), 873-887. Traducido por *Biokhimiya* 65 (8), 1029-1046.

# APÉNDICE I





# APÉNDICE I

---

## SOLUCIONES

-Solución A: Glucosa 9.99mM, KCl 2.95mM, NaCl 130mM y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5.25mM, en agua bidestilada y desionizada. Ajustar el pH de 7.2-7.4. Esterilizar por filtración

-Medio DMEMF/12: 1 sobre de medio DMEMF/12 (GIBCO, Nueva York. EE.UU.), 50mg de ácido ascórbico y 5.96 g de HEPES. Aforar a 1L de agua bidestilada y desionizada, ajustar el pH a 7.2-7.4, esterilizar por filtración y adicionar 1ml de gentamicina (In Vitro, Carlsbad California. 50mg/ml) y 10ml de anfotericina B (In Vitro, Carlsbad California. 250µg/ml).

-Suero Fetal de Bovino (SFB): El SFB (In Vitro, Carlsbad California. 500ml) debe ser inactivado en baño maría. Para volúmenes pequeños calentar a 63°C 3 min. Y para volúmenes grandes (50-100) a 56°C 30 min.

-Solución Salina-EGTA: NaCl al 0.9% y EGTA (etilen-glicol-bis (β-eter aminoetilico)-N,N,N',N'-ácido tetracético) 1mM en agua MiliQ. Ajustar pH a 7.2-7.4 y esterilizar por filtración. Preparar al momento de su utilización.

-Solución de buffer de fosfatos salina (PBS) 0.15M: 8g de NaCl, 1.15g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2g de KCl y 0.2g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Aforar a 1L con agua bidestilada y ajustar pH a 7.2-7.4.