



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS**

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS FACTORES DE  
CRECIMIENTO WNT EN UN MODELO EXPERIMENTAL  
DE OSTEOARTRITIS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS  
(BIOLOGÍA)**

**PRESENTA**

**M en C. MARÍA CRISTINA VELASQUILLO MARTÍNEZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. JESÚS CHIMAL MONROY**

**MEXICO , D.F.**

**MARZO,2010.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**POSGRADO EN CIENCIAS**

**BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS FACTORES DE  
CRECIMIENTO WNT EN UN MODELO EXPERIMENTAL  
DE OSTEOARTRITIS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS  
(BIOLOGÍA)**

**PRESENTA**

**M en C.MARÍA CRISTINA VELASQUILLO MARTÍNEZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. JESÚS CHIMAL MONROY**

**MEXICO , D.F.**

**MARZO,2010.**

**El presente trabajo se llevo a cabo en el laboratorio de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, en el laboratorio de Patología Osteoarticular del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del IPN y en la Unidad de Ingeniería de Tejidos Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación, bajo la Dirección del Dr. Jesús Chimal Monroy.**

## **AGRADECIMIENTOS:**

**A mi jurado: Dr. Horacio Merchant Larios**

**Dra. Patricia Rivas Manzano**

**Dr. Alejandro Zentella Dehesa**

**Dr. Jesús Chimal Monroy**

**Dra. Rebecca Elizabeth Franco y Bourland**

**Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete**

**Dr. Juan Kouri Flores**

**Por su cuidadosa revisión del trabajo y sus sugerencias para mejorarlo.**

**El presente trabajo se realizó con el financiamiento de los proyectos, 53484,42568-Q y Salud-C0198 auspiciados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, así como con el apoyo de los proyectos, IN220808, IN200205 de la DGAPA, UNAM.**

**Agradezco al Dr. Juan Kouri, al Dr. David Garcíadiego, a la M en C. Maylin Lamonte Becerril, por su ayuda durante la realización de este trabajo.**

**También agradezco a la Biol. María Magdalena Miranda Sánchez y a la M en C. Marcia Bustamante Zepeda por su ayuda técnica en la realización del trabajo experimental.**

**A mis colegas, estudiantes y amigos del laboratorio: Val, Magda, Carmina, Xochitl, July, Lety, Bertha, Hugo.**

**Al Dr. León por sus sabios consejos.**

**A Mariana con todo mi amor y por todas las horas que me regalo para la elaboración de este trabajo, muchas gracias!!!.**

**A Héctor por tu apoyo.**

**A mis padres: Luz y Clemente fuente de inspiración y superación. Por su puesto a mis hermanos: Arturo, Luis, Ricardo, a mis cuñadas Hilda, Claudia, Betsa, a mis sobrinas, Zoé, Alín, Lucecita y a mi sobrino Luisito, gracias.**

**A Maricela, gracias por todo, igual que a Gadi, Bety, Adri, porque con un poco de ayuda y decisión si se puede!!**

**A mis amigos y amigas en especial a Paty y Rochayito.**

<b>CONTENIDO.....</b>	<b>7</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>4</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>12</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>14</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>16</b>
<b>Homeostasis de las articulaciones.....</b>	<b>16</b>
<b>Osteoartritis.....</b>	<b>17</b>
<b>Articulaciones más frecuentemente afectadas por la OA.....</b>	<b>17</b>
<b>Desarrollo del esqueleto apendicular.....</b>	<b>18</b>
<b>Condrogénesis.....</b>	<b>19</b>
<b>Desarrollo de la articulación.....</b>	<b>21</b>
<b>Osificación endocondral.....</b>	<b>24</b>
<b>Hipertrofia condral.....</b>	<b>25</b>
<b>Familia de proteínas Wnt.....</b>	<b>28</b>
<b>Señalización de las proteínas Wnt.....</b>	<b>29</b>
<b>Vía canónica.....</b>	<b>29</b>
<b>Papel de la <math>\beta</math>-catenina en la esquetogénesis.....</b>	<b>31</b>
<b>Participación de los Wnt en la esquetogénesis.....</b>	<b>35</b>
<b>Cartílago articular.....</b>	<b>33</b>
<b>Características del cartílago articular hialino.....</b>	<b>35</b>
<b>Organización del cartílago articular.....</b>	<b>36</b>
<b>Factores locales de riesgo para la OA.....</b>	<b>38</b>
<b>Etiopatogénesis de la OA.....</b>	<b>39</b>
<b>Tipos de daño.....</b>	<b>39</b>
<b>Respuesta celular a la OA.....</b>	<b>42</b>
<b>Citocinas proinflamatorias.....</b>	<b>45</b>
<b><i>Mig6</i>.....</b>	<b>47</b>
<b>Proteínas Wnt y enfermedades articulares.....</b>	<b>48</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>50</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>50</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>51</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>52</b>
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>53</b>
<b>Diseño del estudio.....</b>	<b>53</b>
<b>Métodos quirúrgicos.....</b>	<b>53</b>
<b>Ejercicios para acelerar el daño al cartílago articular.....</b>	<b>54</b>
<b>Procesamiento de lo tejidos.....</b>	<b>55</b>
<b>Deshidratación e inclusión en parafina.....</b>	<b>56</b>
<b>Tinciones histológicas.....</b>	<b>57</b>
<b>Procesamiento de muestras para hibridación <i>in situ</i>.....</b>	<b>57</b>



Preparación de las sondas.....	57
Sonda para <i>Mig-6</i> .....	58
Preparación de la ribosonda.....	58
Preparación de los cortes.....	59
Prehibridación.....	59
Revelado.....	60
Lavado y montado.....	60
Muerte Celular (TUNEL).....	60
Inmunohistoquímica.....	61
<b>RESULTADOS</b>	
Fenotipo condral y expresión de <i>Sox 9</i> , Colágena tipo II y de Agrecano.....	63
Expresión de <i>Colágena X</i> y maduración del cartílago articular.....	65
Expresión de los reguladores negativos del ciclo celular p107 y p57Kip2.....	67
Expresión de <i>Wnt-5a</i> , <i>Wnt-5b</i> , <i>Wnt-16</i> y <i>Wnt-4</i> .....	69
Disminución en la expresión de <i>Wnt-7b</i> y <i>Wnt-9a</i> en el cartílago articular osteoarttrítico.....	69
Expresión de la $\beta$ -catenina en la osteoartritis experimental.....	71
Expresión proteínica de citocinas pro-inflamatorias y apoptosis.....	73
Disminución en la expresión del ARNm de <i>Mig-6</i> ....	74
<b>DISCUSIÓN</b>	
La disminución en la expresión de <i>Sox 9</i> , Colágena tipo II y de Agrecano está asociada a la pérdida del fenotipo condral.....	77
El incremento en la expresión de <i>Colágena X</i> está asociado a la maduración del cartílago articular.....	78
El incremento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias correlaciona con la apoptosis asociado al daño articular.....	78
La disminución en la expresión de <i>Wnt-5a</i> , <i>Wnt-5b</i> y el incremento en la de <i>Wnt-4</i> , semeja los procesos de maduración condral observados en la osificación endocondral.....	80
La hipertrofia del cartílago articular evidenciada por el incremento en la expresión de <i>Col X</i> coinciden con la disminución en la expresión de la p107 y la p57Kip2 y semeja los procesos de	.

maduración que ocurren en la osificación endocondral .....	81
La disminución en la expresión de <i>Wnt-7b</i> y <i>Wnt-9a</i> en el cartílago articular osteoartrítico esta relacionada con los procesos de maduración del cartílago articular .....	81
Incremento en la expresión de la $\beta$ -catenina en la osteoartritis relacionado con la osificación endocondral.....	82
La disminución en la expresión de <i>Mig-6</i> está asociada al daño articular en la OA.....	83
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>85</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>95</b>

## RESUMEN

En la osteoartritis (OA) el cartílago articular degenera y es reemplazado por hueso a través de mecanismos celulares semejantes a los que se presentan durante la osificación endocondral. Aunque poco se sabe de los mecanismos moleculares de inicio de la destrucción del cartílago en la OA se especula que pueden estar involucrados genes aún desconocidos. Con la idea de caracterizar los mecanismos tempranos que llevan al desarrollo de la OA, en este trabajo se ha evaluado la expresión de *Mig-6* con la de algunos marcadores específicos del cartílago (*Sox-9*, *Agrecano* y *Colágena II*) para determinar el estado de diferenciación del cartílago en los diferentes tiempos de evolución de la enfermedad. Con la finalidad de estudiar la expresión de diferentes marcadores involucrados en la osificación involucrados con la OA, en un modelo animal se estudió la expresión *Wnt-4*, *Wnt-5a*, *Wnt5-b*, *Wnt- 7b*, *Wnt-9* y *Wnt-16* y de  $\beta$ -catenina e igualmente se realizó un correlación con la expresión de  $p57^{Kip2}$ ,  $p107$  y de marcadores del cartílago articular (*Sox-9*, *Agrecano*, *Colágena II*, *Colágena X*); los resultados se correlacionaron con la expresión de citocinas proinflamatorias y apoptosis en distintos tiempos de evolución de la OA.

Para inducir la OA experimental se realizaron menisectomías parciales a ratas. El grupo control se mantuvo sin ejercicios y sin menisectomía. Se obtuvo el cóndilo femoral medial a los 5, 10 y 20 días posteriores a la cirugía. Las muestras se analizaron mediante histoquímica Safranina O, hibridación *in situ*, inmunohistoquímica y TUNEL.

El grupo lesionado mostró daño articular semejante al descrito para la OA. El análisis molecular mostró que durante los primeros 5 días ocurre una serie de procesos que están asociados a la pérdida de marcadores moleculares del cartílago diferenciado, es decir, ocurre una disminución de la expresión de *Sox-9* así como de *colágena II* y *agrecano*. También se observó: un incremento inicial de la expresión de inhibidores del ciclo celular como el  $p57^{Kip2}$  y el  $p107$ , asociado a proliferación celular uno de los cambios descritos para el daño temprano de la OA y un aumento en la muerte celular por apoptosis relacionado con el daño al cartílago articular. También se encontró un incremento en la  $\beta$ -catenina no activa y una sobre-expresión de *Wnt-4* que coincide con una disminución de *Wnt-5a* y *Wnt-5b*, lo que indica un aumento en la maduración del cartílago, hecho que se comprobó con la sobre-expresión de *Colágena X* (marcador del cartílago hipertrófico) y que coincidió con la disminución en la expresión de *Mig-6*, de *Wnt-7b* (regulador de la osteogénesis) y *Wnt-16*. Todos los cambios descritos se hicieron más evidentes conforme se observó un mayor daño articular. Los cambios tempranos precedieron al incremento observado de las citocinas IL-1 beta, TNF alfa e IFN gamma.

Los resultados sugieren que durante la generación de la OA, ocurre una serie de cambios moleculares que preceden a los cambios histológicos o anatómicos que se desarrollan en los

cóndilos mediales con OA y que la señalización Wnt tiene un papel fundamental en los cambios observados en la maduración del cartílago articular que recuerdan aquellos ocurridos durante la osificación endocondral y que tal vez pudieran tener influencia en el desarrollo de esta patología.

## ABSTRACT

In osteoarthritis (OA) the articular cartilage degenerates and is replaced by bone, resembling endochondral ossification. The molecular mechanisms for initiation of cartilage destruction in OA are unknown but may involve as yet unidentified cartilage genes. On this basis, in a rat model of OA we made a correlation of expression of several Wnt family members involved in cartilage differentiation and also were correlated the expression of *Mig-6* and cartilage markers (*Sox-9*, *Aggrecan* and *Collagen II*) to determine the stage of cartilage differentiation in which the changes observed during this disease are evident. In order to investigate the expression of molecular markers involved in endochondral ossification during osteoarthritis (OA) in an animal model we studied the expression of *Wnt-4*, *Wnt-5a* and *Wnt-5b*, *Wnt-9*, *Wnt-16* and  $\beta$ -catenin also they were correlated with the expression of  $p57^{\text{kip2}}$ , p107 and cartilage markers (*Sox9*, *Aggrecan* and *Collagen II*, *Collagen X*); data were also correlated with the expression of proinflammatory cytokines and apoptosis at different stages of OA. Methods: Wistar male rats were sacrificed at 5, 10 and 20 days following a partial meniscectomy in order to induce experimental OA. As normal control we used knees from animals without exercise and surgery. Histological, immunohistochemistry and in situ hybridization analyses were performed for: IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ,  $\beta$ -catenina, p107,  $p57^{\text{kip2}}$ , *Aggrecan*, *Sox9*, *Collagen type II*, *Collagen type X*, *Wnt-4*, *Wnt-5a* and *Wnt-5b*, *Wnt-7b*, *Wnt-9* and *Wnt-16*. A TUNEL test was used to assess programmed cell death.

Results: During OA the first molecular changes were observed as soon as 5 days after surgery, even though no macroscopically changes were observed. The expression of *Sox9*, *Aggrecan* and *Collagen type II* was down-regulated indicating loss of articular chondrocyte phenotype. These results coincided with up-regulation of  $p57^{\text{kip2}}$  and p107, an increase of cellular death and expression of collagen type X, indicative of hypertrophy of articular cartilage as occurs during endochondral ossification. Also TNF- $\alpha$ , which is an important catabolic cytokine involved in the initiation and progression of articular cartilage destruction, was up-regulated at 5 days post-surgery, while IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were up-regulated at 10 days post-surgery in cartilage damaged, as compared with the controls. All these molecular changes are associated with molecular changes of key regulators of endochondral ossification, belonging to Wnt family. The promoter of hypertrophy of cartilage *Wnt-4* was up-regulated coinciding with the onset of expression of *collagen type X*, whereas *Wnt-5a*, *Wnt-5b* that delay hypertrophy of cartilage were down-regulated coinciding with down-regulation of *Sox-9*, *Collagen II*, and *Aggrecan*. Finally, increased levels of  $\beta$ -catenin non active have been observed in degenerative cartilage. Our data suggest that Wnt/beta-catenin signaling involved in endochondral ossification may be important for the onset and progression of OA. Also these molecular changes involved in endochondral ossification

coincided with molecular changes of IL1 $\beta$ , IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ , known to be part of mechanisms leading to excessive remodeling and degradation of cartilage matrix in OA.

## ABREVIATURAS

<b>ADAMTS</b>	Proteinasas con un dominio de desintegrina y metaloproteinasa con secuencias de trombospondina.
<b>APC</b>	Proteína asociada a pólipos adenomatosos de colón
<b>AR</b>	Artritis reumatoide
<b>BMP</b>	Proteína morfogenética de hueso
<b>BMPR</b>	Receptor de la BMP
<b>Col I</b>	Cólagena I
<b>Col II</b>	Cólagena II
<b>Col X</b>	Colágena X
<b>En-1</b>	Engrailed-1
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos
<b>FGFR</b>	Receptor de FGF
<b>Fz</b>	Frizzled
<b>GAG</b>	Glucosaminoglicanos
<b>Gdf-5</b>	Factor de crecimiento y diferenciación 5
<b>Gdf-6</b>	Factor de crecimiento y diferenciación 6
<b>Gsk3<math>\beta</math></b>	Cinasa de la Glucógeno sintasa 3 $\beta$
<b>HA</b>	Ácido hialurónico
<b>HIF1<math>\alpha</math></b>	Factor 1 $\alpha$ inductor de hipoxia
<b>Ihh</b>	Indian hedgehog
<b>LRP</b>	Proteína relacionada con las proteínas lipídicas de baja densidad
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>N-CAM</b>	Molécula de adhesión celular-neuronal
<b>OA</b>	Osteoartritis
<b>Osx</b>	Osterix
<b>PGs</b>	Proteoglicanos
<b>Ppr</b>	Receptor de PTHrP

<b>Ptc-1</b>	Patched-1
<b>PTHrP</b>	Péptido relacionado a la hormona paratiroide
<b>Runx2/Cbfa1</b>	Factor de transcripción de la familia Runt/factor central de unión alfa 1 (core binding factor alpha1)
<b>SHH</b>	Sonic hedgehog
<b>Smo</b>	Smoothened
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular
<b>Wnt</b>	Proteína relacionada a Wingless-int
<b>OPG</b>	Osteoprotegerina
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOC-12</b>	N-etil-2-(1-etil-2-hidroxi-2-nitrosohidrazino) etanamina
<b>HH</b>	Hamburger y Hamilton (1951)

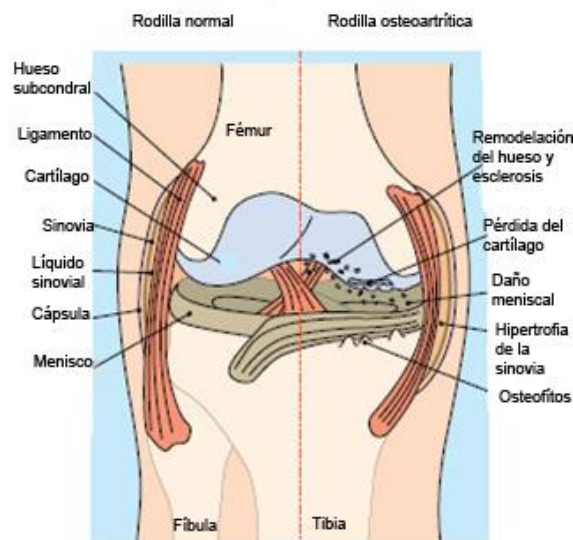


# INTRODUCCIÓN

## Homeostasis de las articulaciones.

El impacto físico, así como los procesos fisiológicos y patológicos que se presentan en las articulaciones y en el hueso están determinados por las señalizaciones moleculares que regulan tanto la homeostasis, como la reparación de los tejidos. La homeostasis asegura la integridad de los tejidos y la funcionalidad de los mismos, de tal manera que cuando ésta falla, las articulaciones sufren lesiones que en el mejor de los casos se pueden reparar, pero durante este proceso se puede formar un tejido con características histológicas y bioquímicas diferentes al cartílago y por ende la función de la articulación se ve afectada.

La pérdida de la homeostasis de los condrocitos del cartílago articular que recubre las articulaciones sinoviales o diartroideas (Figura 1), surge al parecer cuando se presenta un desequilibrio entre el anabolismo y el catabolismo de la matriz extracelular (MEC), lo que puede dar como resultado el desarrollo de un padecimiento conocido como osteoartritis (OA). Los mecanismos moleculares que dan inicio a esta patología no se conocen todavía.



**Figura. 1. Articulación sinovial o diartroidea (Rodilla).** Características anatómicas de la rodilla normal (izquierda) y osteoarthrítica (derecha). Los tejidos que se distinguen en la articulación son: cartílago articular, hueso, ligamentos, menisco, sinovia o membrana sinovial y la cápsula fibrosa (1). El cartílago recubre los extremos del fémur así como los de la tibia (2). Modificado de Hunter 2006 (3).

## **Osteoartritis.**

La OA es una enfermedad que fue definida en 1986 por el Colegio Americano como un grupo heterogéneo de condiciones en el cual se presentan síntomas y signos tempranos y graduales en las articulaciones, asociados más tarde al daño en la superficie articular. Esta patología se caracteriza por la pérdida del cartílago articular y la alteración de los márgenes de la articulación (4). Clínicamente, los pacientes presentan dolor articular y eventualmente llegan a la discapacidad de la extremidad involucrada.

La OA constituye en la actualidad un grave problema de salud pública en todo mundo, con un costo económico y social elevado por lo que es considerada como una de las principales causas de invalidez en las personas de edad avanzada (5). En Estados Unidos es considerada la segunda causa de discapacidad.

En México no existen datos epidemiológicos actualizados y publicados sobre la incidencia e impacto económico y social de esta enfermedad. No obstante, se considera que todos los adultos mayores de 50 años son sujetos de riesgo a padecer algún tipo de enfermedad articular degenerativa (6).

La OA afecta cualquier articulación sinovial. Frecuentemente afecta las manos, la columna vertebral, las rodillas, la cadera y los codos, siendo los hombros los menos afectados. En algunos casos solamente está afectada una de las articulaciones, aunque la OA poliarticular es la más frecuente (1).

### **Articulaciones más frecuentemente afectadas por la OA.**

En un reporte de la Universidad de IOWA, E.U., se encontró que de 607 pacientes estudiados el 85% presentaban OA en la rodilla (7). La rodilla y el tobillo son escogidos en la mayoría de los estudios no solamente por la prevalencia y la degeneración de esas articulaciones, sino también por la disponibilidad de los órganos para su estudio.

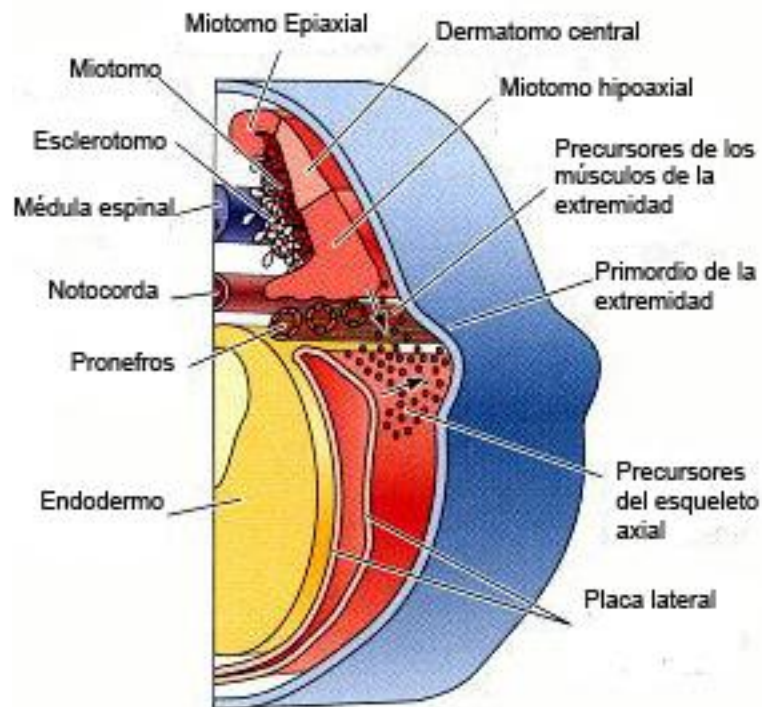
En los miembros inferiores, los factores de riesgo para el desarrollo de la OA incluyen: traumatismos, obesidad, predisposición genética y densidad mineral ósea aumentada, entre otros.

La OA de rodilla es más común en mujeres que en hombres y está asociada a la ocupación, en la cual hay un impacto físico repetitivo sobre la articulación que lleva a una degeneración progresiva del cartílago articular. La OA también se asocia a otras alteraciones como la menisectomía o al daño del ligamento cruzado anterior (8).

Las diferencias biomecánicas y anatómicas por sí solas no explican porque la rodilla es más susceptible a la enfermedad. Por lo que para el diseño de mejores estrategias terapéuticas, se necesita entender no solamente el desarrollo de las articulaciones, sino también qué determina la diferenciación así como el mantenimiento del fenotipo del cartílago articular. Aunque se conoce la anatomía de la articulación y su composición bioquímica. Hasta la fecha no se han establecido todas las vías de señalización que controlan el desarrollo del esqueleto apendicular, la morfogénesis del cartílago articular, ni los factores que influyen en la homeostasis de la matriz extracelular (MEC).

## Desarrollo del esqueleto apendicular.

El esqueleto de los mamíferos tiene tres orígenes diferentes (Figura 2).

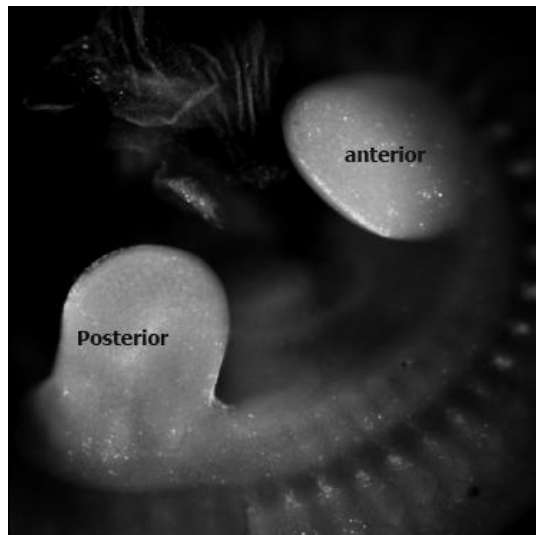


**Figura 2. Origen embrionario de las extremidades.** Esquema mostrando las estructuras involucradas en el desarrollo del esqueleto apendicular. Las células provenientes de la placa lateral del mesoderma darán origen a los elementos esqueléticos de la extremidad. Cortesía de J. Streicher and G. Müller..

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=dbio&part=A3928&rendertype=figure&id=A3932>.

El mesoderma paraxial da origen al esqueleto axial. El ectoderma forma la cresta neural de la cual se desarrollan los huesos faciales y de la placa lateral (Figura 2) del mesoderma las extremidades (9).

En lo que se refiere a las extremidades, éstas se forman en puntos específicos del eje antero-posterior del cuerpo (Figura 3), a estos sitios se les conoce como campos de la extremidad y la posición de ellas está determinada por los niveles de la expresión de los genes Hox.

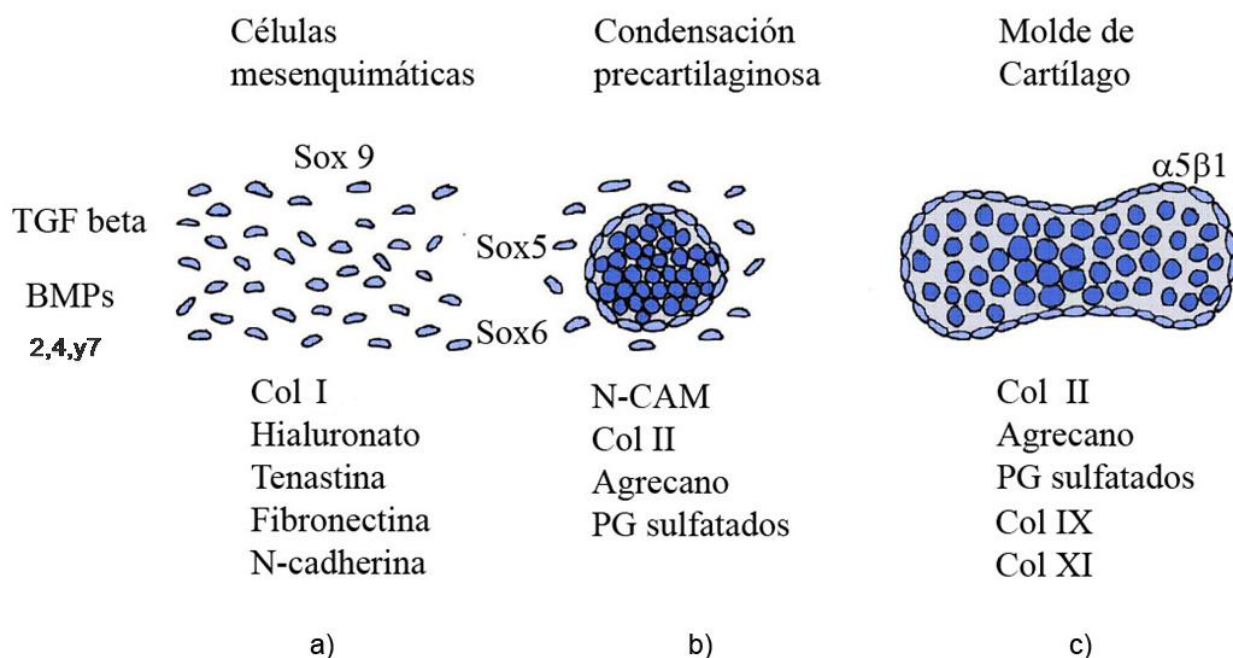


**Figura 3. Primordios de las extremidades.** Micrografía estereoscópica de un embrión de pollo, que muestra las áreas específicas del eje antero-posterior del cuerpo de las cuales se desarrollan las extremidades. A estos sitios se les conoce como primordios de la extremidad. Cortesía de R. Cuervo y J Chimal-Monroy, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

En cuanto a las extremidades y en especial en lo referente el desarrollo de los huesos largos, este resulta de una cascada de eventos que incluye: la condensación de las células mesenquimáticas, la diferenciación del cartílago y el reemplazo del mismo por hueso durante la osificación endocondral.

## **Condrogénesis.**

Durante el crecimiento proximal-distal, cada elemento esquelético se forma a partir de la agregación de células mesenquimáticas (Figura 4a) en respuesta a factores condrogénicos como el TGFβ y las BMPs entre otros para conformar las condensaciones precartilaginosas o blastema (Figura 4b), que prefigurarán los elementos esqueléticos (Figura 4c), estos elementos inicialmente cartilagosos están formados por condrocitos en proliferación (10, 11).



**Figura 4. Condrogénesis.** a) el esqueleto de cartílago se forma a partir de las células mesenquimáticas que forman el b) blastema o condensación precartilaginosa y posteriormente c) el molde de cartílago (12, 13).

Las señales condroinductoras tempranas para el inicio de la condensación las provee entre otras moléculas el factor de crecimiento transformante beta (TGFβ) (Figura 4a). El TGFβ 1 promueve la síntesis de proteoglicanos (PGs) (14) y en células mesenquimáticas cultivadas en micromasas y bajo el estímulo de TGFβ 1, TGFβ 2 y TGFβ 3 se induce la síntesis de colágena tipo II (Col II), (15).

Uno de los factores de transcripción que se expresan desde un inicio en algunas de las células del mesénquima del primordio es Sox-9 (Figura 4a). Una vez que se expresa, se desencadena una cascada de señales en las cuales el receptor tipo 1B de las proteínas morfogénicas de hueso (*Bmpr1b*), los Sox-5 y Sox-6 se expresan llevando a la formación del molde cartilaginoso (16). Cuando se consolida la condensación, estas células se diferencian en condrocitos y producen una matriz rica en col II (17) y se inicia también la síntesis de otras

proteínas de la MEC típicas del cartílago articular como son: el agregano y los proteoglicanos sulfatados, así mismo, disminuye la síntesis de la colágena tipo I (Col I), (Figura 4b).

En humanos la deficiencia de Sox-9 conduce a displasia campomélica, y a la malformación congénita letal (17, 18). En un modelo experimental la supresión de Sox-9 en los primordios antes de la condensación mesenquimática se induce la ausencia tanto de cartílago como de hueso y en embriones de ratones en que fue eliminado el Sox-9 después de formada la condensación mesenquimática, se encontró una severa condrodisplasia (18).

Una vez que se forma el molde cartilaginoso éste sufre algunos cambios que pueden dar lugar a la formación de una articulación o del elemento cartilaginoso.

### **Desarrollo de la articulación.**

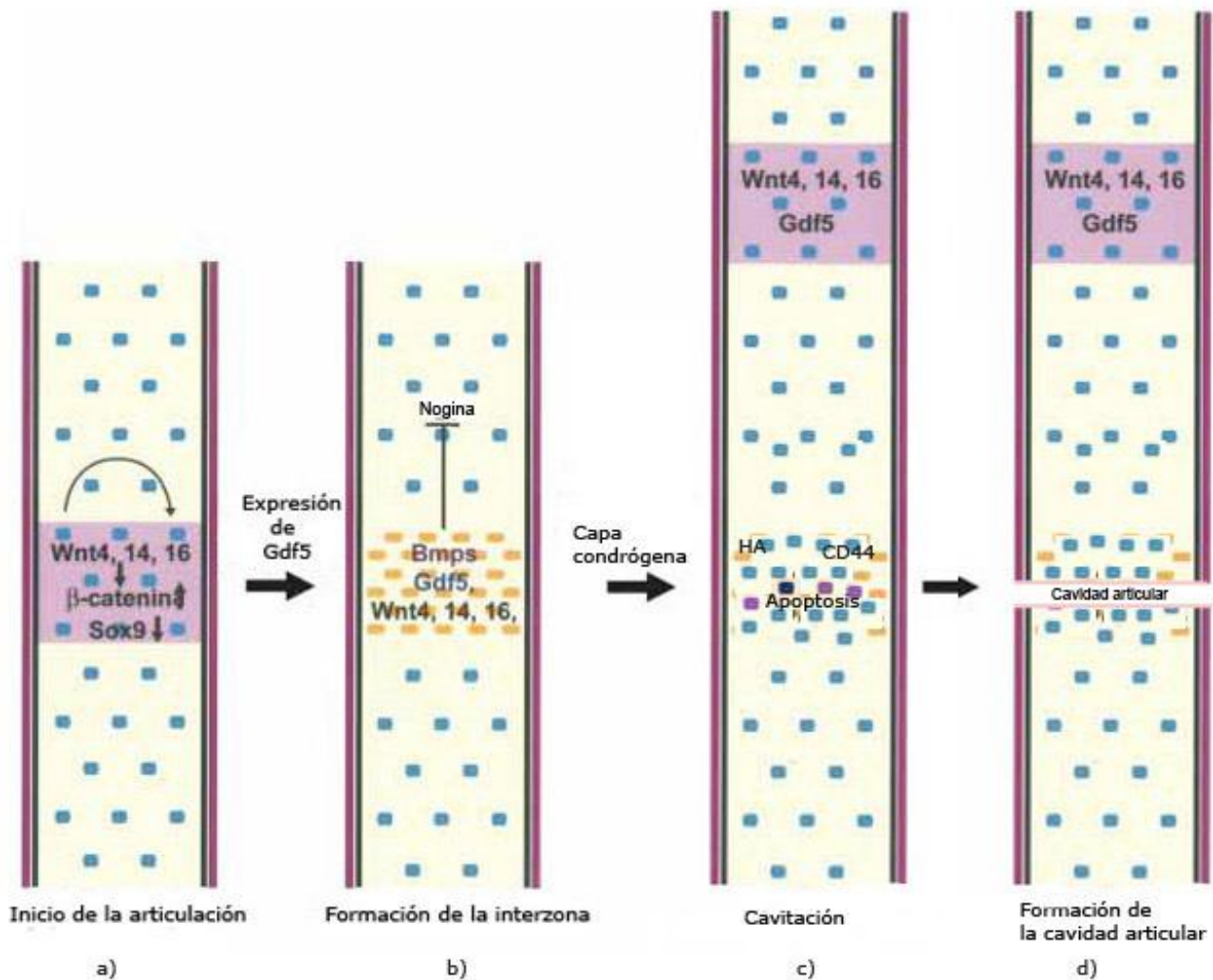
La formación de las articulaciones constituye un proceso dividido en dos eventos morfológicos: 1) la formación del cartílago que modela los elementos esqueléticos y 2) la subsiguiente formación de la cavidad articular. Los procesos que determinan la formación de las articulaciones no se conocen completamente, de hecho varias preguntas se han planteado al respecto, una de ellas es: ¿Cómo se determina el sitio dónde se va a formar la articulación en la condensación cartilaginosa? y otra: ¿Cuáles son los mecanismos involucrados en la formación de los diversos tejidos que componen la articulación? Sin embargo, hasta el momento estas interrogantes no han sido contestadas en su totalidad.

Se ha postulado que las articulaciones se forman de regiones específicas de las condensaciones precartilaginosas por un proceso complejo que involucra la pérdida de diversos marcadores condrogénicos.

La primera evidencia morfológica del desarrollo de la articulación es la formación de la “interzona” caracterizada por la presencia de condrocitos aplanados semejantes a fibroblastos, de hecho son células que sintetizan colágena tipo I y III que forman tres capas celulares, una capa intermedia central con baja densidad celular y dos de mayor densidad celular rodeando a la central (19).

En la “interzona” las células están más empaquetadas y aplanadas que en otras regiones, las dos áreas de alta densidad celular formarán los cartílagos articulares. Entre

estas dos zonas hay una región de baja densidad celular donde las células mueren por apoptosis dando lugar a la cavidad articular que será ocupada por la sinovia, el líquido sinovial y los meniscos.



**Figura 5. Modelo de la formación de la articulación por el señalamiento de Wnt.** Expresión de *Wnt-4*, *Wnt-9a* y *16* en el desarrollo de la articulación. a) interzona (zona rosa) en la región donde se va a formar la articulación parece ser el primer paso para el inicio de la formación de la articulación. Las Wnt parece que inducen la regulación positiva de  $\beta$  catenina y la supresión de Sox-9, la expresión de Gdf-5 y la formación de la interzona b) la señalización Wnt suprime Nogina mientras que Gdf-5 y las BMPs la antagonizan, c) apoptosis y formación de la d) cavidad articular. Modificado de Pacific

Durante el proceso de la formación de las articulaciones están involucrados diversos factores de crecimiento y factores de transcripción, entre ellos el TGF- $\beta$ , las BPMs, el factor de crecimiento y diferenciación 5 y 6 (Gdf-5 y Gdf-6), así como algunos miembros de la



familia Wnt, los antagonistas de las BMPs, nogina y cordina, miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), los factores de transcripción Cux-1 y ERG entre otros (20).

Se conoce que entre las moléculas que se expresan tempranamente en la “interzona” están *Gdf-5* y *Wnt-9a* (Figura 5 b). El Gdf-5 o proteína 1 morfogénica derivada de cartílago (CDMP1) fue considerada como una de las moléculas directrices del desarrollo de la articulación. Las mutaciones nulas en el gen *Gdf-5* provocan diferentes tipos de condrodisplasias (21). En el ratón con braquipodismo la mutación nula en *Gdf-5* induce fusión de falanges (22) mientras que la sobreexpresión de *Gdf-5* lleva al sobre crecimiento del cartílago y a la fusión de la articulación (23, 24) y los efectos de *Gdf-5* puede ser antagonizados por nogina, ya que se ha observado que los ratones deficientes de nogina no desarrollan articulaciones.

Otros factores que juegan un papel integral en la formación de las articulaciones son los miembros de la familia Wnt y que además están involucrados en el mantenimiento de la extremidad (25).

Así entonces, se ha visto que el *Wnt-9a* se expresa en la “interzona” (Figura 5a) y que está implicado en la etapa temprana del desarrollo de la articulación (26). En el miembro ya desarrollado, *Wnt-9a* se continúa expresando en la membrana sinovial y en el tejido conjuntivo.

Se ha reportado que la sobreexpresión de *Wnt-9a* en el cartílago promueve la cascada molecular involucrada con la formación de las articulaciones y de los elementos cartilaginosos anormales o puede resultar en la ausencia de cartílago. Esto sugiere que *Wnt-9a* puede instruir a las células pre-condrogénicas a diferenciarse y que podría actuar como un regulador río arriba de Gdf-5 y mantener a las células mesenquimáticas como tales en la “interzona” para prevenir la condrogénesis (27, 28). Además, *Wnt-9a* puede inducir desdiferenciación de condrocitos en cultivos de micromasas, un proceso que ocurre durante el desarrollo normal de la articulación (26).

La producción continua de Wnt-9a por los sinoviocitos y la cápsula de las articulaciones sugiere que la señalización de Wnt está involucrada en el mantenimiento de las articulaciones sinoviales en el adulto (29).

Ahora bien, *Wnt-16* también se expresa en las articulaciones en desarrollo y se ha encontrado en un inicio como una banda que marca el área donde se formará la futura área



metatarsofalangea así como en el área interdigital proximal, analizando la expresión dinámica de *Wnt-4*, *Wnt-9a* y *Wnt-16* en el desarrollo de las articulaciones al parecer comparten actividades y se complementan (28).

La separación total de los elementos esqueléticos y la formación de los elementos adicionales a la articulación sinovial se llevan a cabo durante la cavitación.

Ahora bien, cuando se forma el elemento cartilaginoso, éste puede ser reemplazado por hueso en un proceso conocido como osificación endocondral.

### **Osificación endocondral.**

Cuando las condensaciones cartilaginosas alcanzan cierto tamaño, los condrocitos del centro de la condensación al disminuir la proliferación secretan una MEC característica del cartílago maduro, en la cual se encuentran principalmente las colágenas II, IX y XI, y el agregano. En los condrocitos en proliferación se mantiene la expresión de *Sox-5* y *Sox-6* para mantenerse en su ciclo celular. En esta fase de diferenciación, las células tienen una forma ovalada.

Durante la osificación endocondral, en la frontera del molde cartilaginoso las células mesenquimáticas indiferenciadas, permanecen produciendo una MEC, rica en Col I y forman el pericondrio (30).

Cuando el elemento esquelético alcanza cierto tamaño los condrocitos del centro disminuyen su proliferación. En esta fase de diferenciación los condrocitos tienen una forma ovalada característica de los condrocitos prehipertróficos (30) y se activa la expresión de *Runx2/ Cbfa1* (factor de transcripción de la familia Runt), del receptor del péptido relacionado con la hormona paratiroidea (*Ppr*) y de *indian hedgehog (Ihh)*.

Así también se ha visto que el péptido relacionado con la hormona paratiroidea (*PTHrP*), la cual en condiciones normales es secretada por las células del pericondrio y por los condrocitos de la fase temprana de proliferación (31, 32) es un regulador positivo para la proliferación de los condrocitos durante su desarrollo y que en los embriones de ratón en los que falta *PTHrP*, los condrocitos dejan de proliferar y se acelera su maduración.

La hipertrofia es la siguiente fase de la osificación y en la cual los condrocitos maduran. Durante ésta los condrocitos dejan de dividirse y aumentan de volumen. También recambian la MEC abundante en Col II por Col X.

Durante el ciclo celular, en general las células pasan del estado G0 a la fase G1 luego a S y finalmente a G2/M. En el cartílago, las diferencias en la duración de la fase G1 correlaciona muy bien con las diferentes tasas de crecimiento de las placas de crecimiento. Las ciclinas D1, D2 y D3 son miembros de la familia de proteínas reguladoras y cuyas actividades controlan la progresión hacia la fase S del ciclo celular, los ratones deficientes de ciclina D1 muestran retraso en el crecimiento postnatal sugiriendo que la placa de crecimiento está alterada en estos ratones (33).

El paso de las fases del ciclo celular está regulado por cinasas dependientes de ciclinas (CdKs). Los complejos de ciclinas y de inhibidores de las cinasas de las ciclinas (CdKi) promueven la fosforilación de un grupo de proteínas entre las cuales se encuentra Rb, p107 y p130. La fosforilación de esas proteínas libera a los miembros de la familia E2F que se requieren para entrar a la fase S (34).

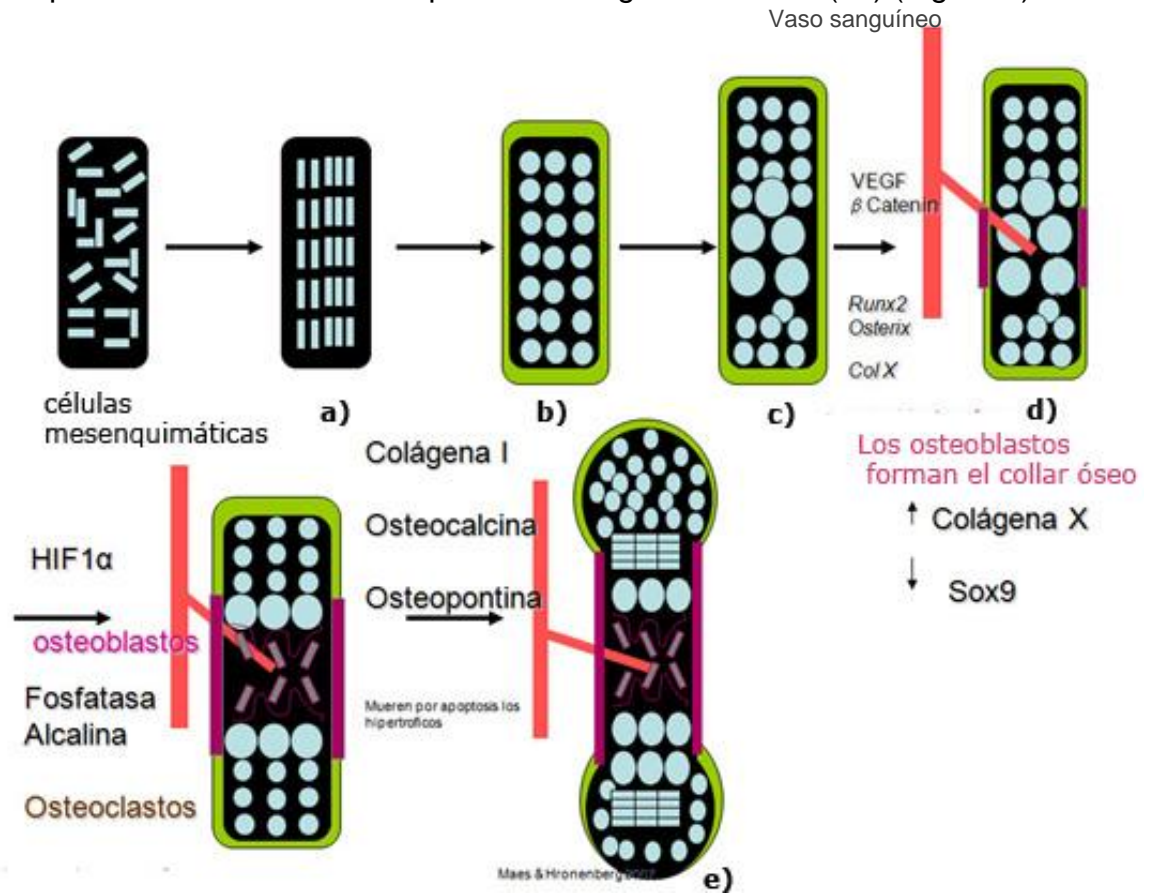
Los complejos CdK son inhibidos por dos familias de proteínas de nominadas INK y CIP. La p1/INK4 inactiva a Cdk4 y Cdk6 interfiriendo así con el paso de G0 a G1 (33) Los miembros de la familia CIP/Kip, que incluye a p21<sup>cip1</sup>, p27<sup>kip1</sup> y a p57<sup>Kip2</sup>, inhiben los complejos ciclina-CdK y promueven el paso de G1a fase S.

Hasta 1999 se habían reportado cuatro diferentes inhibidores de los complejos ciclina/CDK en los condrocitos: p21<sup>WAF1/Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup>, p16<sup>Ink4a</sup>, y p57<sup>Kip2</sup>. Los huesos de los ratones mutantes para p57<sup>Kip2</sup> muestran retardo en la osificación (35). En ratones mutados tanto para p107 como p130 se observa acortamiento de las extremidades y muerte poco tiempo después del nacimiento. El defecto en el desarrollo de los huesos está asociado a un exceso en la proliferación y en donde se sugiere una sobreposición de funciones entre p107 y p130 (36) y adicionalmente se ha sugerido que Cbfa1/Rux2 se une a p107 (37).

### **Hipertrofia condral.**

Al inhibirse la proliferación se inicia un proceso de diferenciación, los condrocitos entran en una fase de hipertrofia y adquieren un mayor volumen celular y producen una MEC específica rica en Col X (38). La hipertrofia de los condrocitos es seguida por apoptosis, de la

invasión de vasos sanguíneos, osteoblastos y osteoclastos con la subsecuente producción de la matriz de hueso. Esto ocurre al empezar a expresarse los genes que codifican para la Col X, el factor de crecimiento vascular (VEGF), la fosfatasa alcalina y el factor  $1\alpha$  inductor de hipoxia (HIF $\alpha$ ), el cual se ha visto que se acumula en condiciones de hipoxia y cuyo blanco en la placa de crecimiento es el promotor del gen del VEGF (39) (Figura 6).

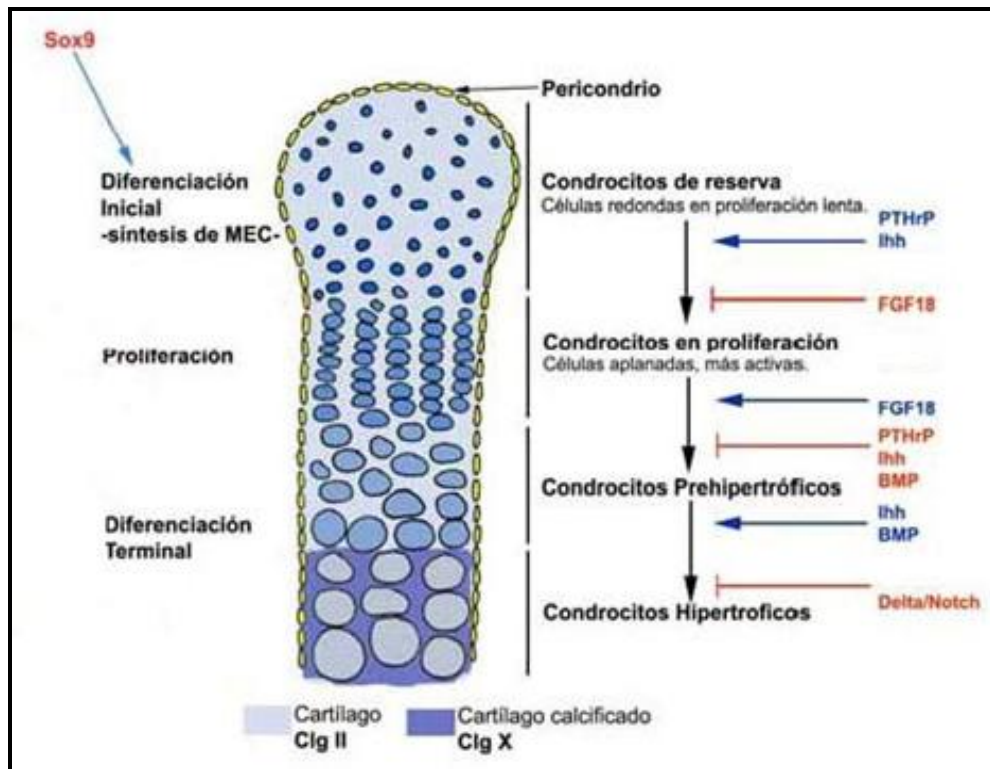


**Figura.6. Osificación endocondral.** Cada elemento esquelético se forma a partir de la a) agregación de células mesenquimáticas para conformar las condensaciones b) precartilaginosas o blastema que prefigurarán el molde cartilaginoso. Estos elementos cartilaginosos están formados por condrocitos en proliferación. Las células del elemento esquelético se diferencian a condrocitos, los cuales gradualmente se c) hipertrofian, d) hay invasión vascular, e) se mineraliza la MEC y posteriormente se presenta diferenciación de osteoblastos del pericondrio y los osteoclastos remodelan el hueso. Cortesía y modificada de Kronenberg 2007.

El tamaño y forma de los huesos largos y de las articulaciones depende de la regulación coordinada de la proliferación, maduración e hipertrofia de los condrocitos, la cual es regulada por múltiples señales; una de ellas dada por Ihh (Figura 7) que coordina la proliferación y diferenciación de los mismos. La hipertrofia de los condrocitos se requiere debido a que secretan Ihh y VEGF, necesarios para la diferenciación de los osteoblastos (40) y por ende la formación del hueso.

Ihh es producida por los condrocitos prehipertróficos e induce la expresión de PTHrP (Figura 7) en el pericondrio (31), el cual regula la tasa a la que los condrocitos salen del ciclo celular y entran a la hipertrofia (31, 32). Cuando los condrocitos prehipertróficos dejan de expresar Ihh continúan su maduración hacia la hipertrofia y se activa la expresión de Runx2 y Runx3 (41). Por el contrario, el FGF18 a través de su receptor FGFR3, que se expresa en los condrocitos en proliferación, regula negativamente la proliferación celular y promueve la hipertrofia de los condrocitos (42) y eventualmente lleva a la muerte de los condrocitos por apoptosis (43).

Los osteoblastos derivados del pericondrio/periostio localizado alrededor de la parte central del elemento esquelético forman el “collar óseo”, considerado un área estratégica para la invasión vascular, secretan el VEGF (Figura 6 d) y probablemente junto con otros factores angiogénicos secretados por los condrocitos hipertróficos (40) inducen la formación de vasos sanguíneos. Esta invasión vascular permite la llegada de osteoclastos derivados de precursores de la médula ósea, para que degraden la mayor parte de la matriz cartilaginosa hipertrófica y que estos restos sirvan como molde para el depósito de osteocalcina, sialoproteína, osteopontina y Col I sintetizadas por los osteoblastos maduros u osteocitos, e inducido por Runx2, y Osx (44).



**Figura 7. Señalización durante la proliferación y diferenciación celular en la placa de crecimiento del cartílago.** La señalización PTHrP/Ihh activa la proliferación e inhibe la hipertrofia de los condrocitos. Por el contrario, los FGFs inhiben la proliferación y promueven la hipertrofia. Ihh tiene una segunda función cuando sale de la influencia de PTHrP, de manera que activa Rux2 y éste promueve la hipertrofia de los condrocitos. Modificado de (13).

Como se ha mencionado, algunas proteínas Wnt están relacionadas con una amplia variedad de procesos biológicos, algunos involucrados en el desarrollo del esqueleto (45).

## Familia de proteínas Wnt.

El miembro fundador de esta familia es el gen de polaridad wingless (Wg) descrito en *Drosophila melanogaster* y necesario para el desarrollo de las alas.

Por su homología con los Wg, el gen *int* fue descubierto en 1982 como un proto-oncogene (46). La familia de las proteínas Wnt ha sido dividida en dos subgrupos: la clase Wnt-1 que comprende a los Wnt-1, -3a y -8, que pueden inducir el eje secundario en *Xenopus* y la clase Wnt-5a que incluye a Wnt-4, -5a y -11.

Junto con otras familias de factores como el FGF, el TGF beta y las proteínas hedgehog, las proteínas Wnt están relacionadas con el desarrollo de la articulación, la

osificación endocondral y la homeostasis del esqueleto. Aunque cada gen *Wnt* tiene un patrón de expresión diferente, múltiples genes muestran sobreposición en los patrones de expresión y redundancia en la función, sugiriendo que algunos de estos genes pueden activar un mismo camino de señalización intracelular.

Se han descubierto más de 20 genes *Wnt* en diferentes especies que incluyen el *Xenopus laevis*, la *Drosophila melanogaster*, el *Caenorhabditis elegans*, el *Danio rerio*, *Mus musculus* y el *Homo sapiens* (47-50). Estos genes codifican para glicoproteínas de aproximadamente 350-400 aminoácidos y parece ser que presentan N-glicosilación (48).

Bajo condiciones normales, las proteínas Wnt no son detectadas en los medios de cultivo por métodos inmunológicos, ni por ensayos biológicos, debido a que están ancladas a la superficie celular y a la matriz extracelular (51). Se ha reportado su presencia en sobrenadantes solubilizando la MEC o creciendo las células en presencia de heparina soluble (52, 53). Se sabe por resultados con ensayos cromatográficos que las Wnt son secretadas como un multímero pero todavía queda la duda si en general pueden ser secretadas como monómeros o como parte de un complejo multiproteínico (50).

La señalización a través de la vía Wnt-frizzled- $\beta$  catenina juega un papel muy importante tanto en la embriogénesis de la articulación como en la homeostasis del esqueleto en el adulto y representa un mecanismo autónomo para inducir la osteoblastogénesis y suprimir la diferenciación en la etapa temprana de las células osteocondroprogenitoras, así como también, participa en la diferenciación de los osteoblastos por la estimulación en la secreción de osteoprotegerina (OPG), un inhibidor de la formación de osteoclastos.

## **Señalización de las proteínas Wnt.**

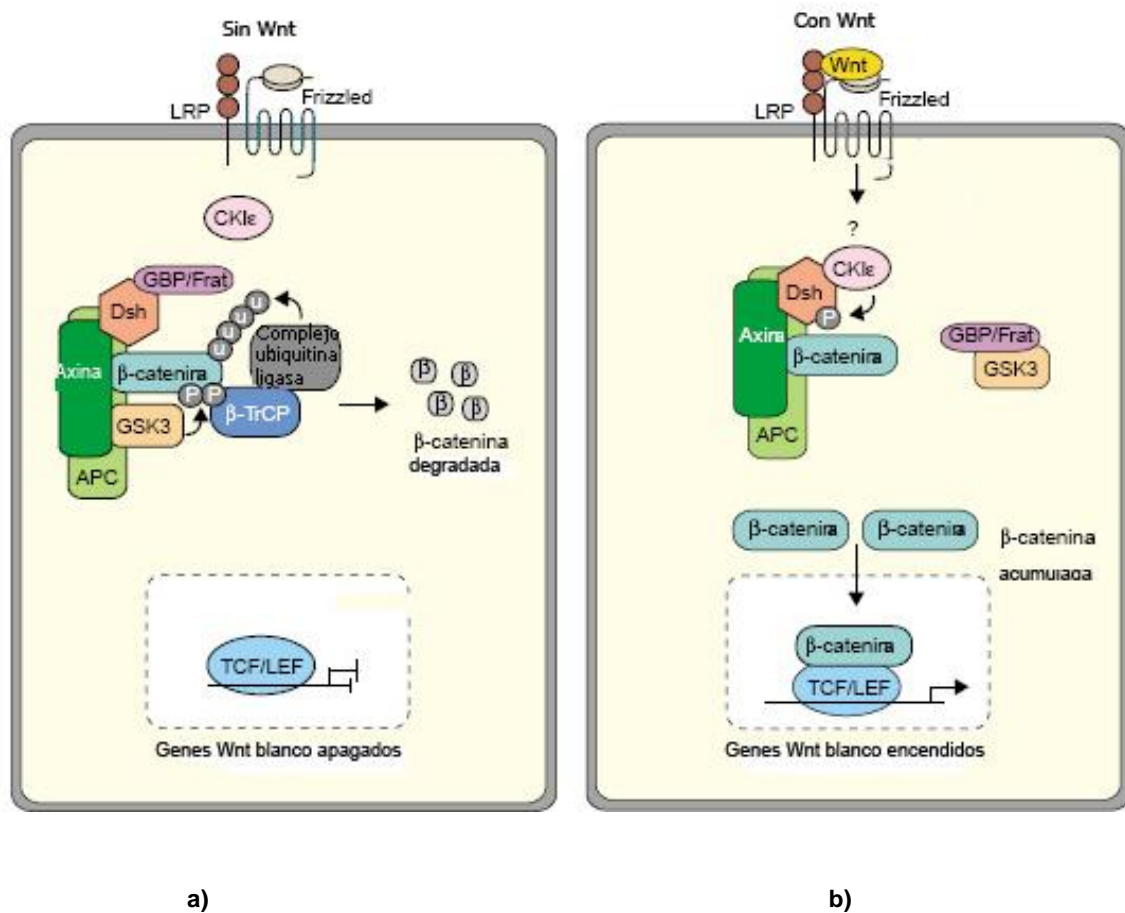
La recepción y la transducción de la señalización Wnt involucran su unión a los miembros de dos familias distintas de receptores, los miembros de los “frizzled” (Fzd) (Figura 8) y los de las proteínas relacionadas con los receptores de las lipoproteínas de baja afinidad (LRP) LRP5/6 y que actúan como segundos receptores de las Wnt.

*Vía canónica.*

La cascada de la señalización Wnt inicia a nivel de la membrana celular cuando las proteínas Wnt interactúan con su receptor (53). Estos receptores (Figura 8) transducen la señal a varias proteínas intracelulares entre las que se incluye la “dishevelled” (Dsh), la cinasa glucógeno sintetasa 3  $\beta$  (GSK-3), la axina, a la proteína asociada a pólipos adenomatosos de colón (APC) y la  $\beta$ -catenina.

Los niveles citoplásmicos de la  $\beta$ -catenina libre, generalmente se mantienen bajos debido a su continua degradación por un proteosoma, el cual es controlado por un complejo que incluye a GSK-3/ APC/ axina. Cuando las células reciben una señal a través de las Wnt, la degradación es inhibida y en consecuencia la  $\beta$ -catenina se acumula en el citoplasma y el núcleo.

En presencia de Wnt, Dsh es activada e interviene con el complejo que activa a la  $\beta$ -catenina (Figura 8). La actividad de GSK-3 $\beta$  es inhibida y la fosforilación de la  $\beta$ -catenina es bloqueada. La actividad del complejo destructor de la  $\beta$ -catenina parece estar regulado por su desfosforilación, entonces la  $\beta$ -catenina no fosforilada ya no es degradada y se acumula en el núcleo (Figura 8) (27, 54). La  $\beta$ -catenina nuclear interactúa con varios factores de transcripción como el factor específico para células T (TCF/LEF) y entonces el complejo TCF/ $\beta$ -catenina se une a los elementos de respuesta ubicados en los promotores de los genes blanco activando su transcripción como *C-myc* o *ciclina D* (54, 55).



**Figura 8. Vía Canónica de Señalización.** a) Si la célula no está expuesta a la señalización por las Wnt, la  $\beta$ -catenina es degradada por su interacción con axina, APC y GSK-3. b) Cuando las proteínas Wnt se unen a los receptores Frizzled/LRP estos receptores transducen la señal a Dsh y a la axina. Como consecuencia la degradación de la  $\beta$ -catenina es inhibida, ésta se acumula en el citoplasma y en el núcleo donde interactúa con el TCF para el control de la transcripción. Modificado (56).

La señalización de las Wnt está mediada por varias familias de reguladores negativos, entre éstas las de la familia dickkopf (DKK), proteínas ricas en cisteína y que incluye a la DKK-1, DKK-2 DKK-3, y a la DKK-4. La mejor estudiada es DKK-1 ya que cuando se une a el receptor LPR5/6 y a su correceptor kremen 1-2, este promueve la internalización del complejo y bloquea la señalización Wnt.

Algunos estudios han reportado también la participación de la señalización Wnt en la osteoblastogénesis.



## ***Papel de la $\beta$ -catenina en la esquelotogénesis.***

Ya que los condrocitos y los osteoblastos comparten una célula progenitora en común, ¿cuáles serían las señales que controlan la diferenciación de ambos linajes?

El gen *Lrp5* codifica para un correceptor de la vía de señalización canónica, su inhibición resulta en una disminución en la densidad ósea asociada con defectos en la diferenciación y proliferación de osteoblastos, mientras que los ensayos de ganancia de la función muestran que las mutaciones están asociadas al incremento de la masa ósea (57). Logan et al. (58), reportaron que la pérdida de  $\beta$ -catenina resulta en el arresto de la diferenciación de los osteoblastos, no hay desarrollo del collar óseo, ni osteoblastos maduros en los huesos que sufren osificación endocondral (59). Hill reporta mediante inmunohistoquímica altos niveles de  $\beta$ -catenina en las células de la región de la articulación y en el núcleo de los condrocitos en proliferación y en los prehipertróficos, así como en el periostio en embriones de ratones E13.5 (59).

Para demostrar la participación de la señalización Wnt/  $\beta$ -catenina en la esquelotogénesis, se ha inducido la expresión de la forma constitutiva de la  $\beta$ -catenina (CA-LEF) en ratones transgénicos en los que reportó muerte al nacimiento por falla respiratoria además de que muestran un fenotipo semejante al enanismo (60).

## **Participación de los *Wnt* en la esquelotogénesis.**

Los patrones de expresión, las funciones de los diferentes *Wnts* y algunos de los componentes de la señalización han sido descritos en el desarrollo del esqueleto.

En ratones transgénicos que expresan ectópicamente *Wnt-1*, se ha visto que causa truncamiento distal de los miembros durante su desarrollo, fusiones esqueléticas así como fusión del inter-dígito (61). También se ha reportado que *Wnt-1* y *-7a*, bloquean la condrogénesis *in vitro* y/o *in vivo*, cuando se sobre-expresan de cultivos en micromasas (45, 62).

Ahora bien, *Wnt-3a* inhibe la condrogénesis de células mesenquimatosas y también induce desdiferenciación de condrocitos articulares por estimulación del complejo de la  $\beta$ -catenina/ TCF/ LEF. En condrocitos que expresan *Wnt-3a* se induce la expresión de c-Jun y su fosforilación por la cinasa terminal de c-Jun (JNK), lo que resulta en activación de AP-1.

La activación de AP-1 suprime la expresión de Sox-9 (63). Por otro lado, la sobreexpresión de *Wnt-3a* promueve la condrogénesis mediada por BMP2 (64).

Durante el desarrollo embrionario de las extremidades en pollos *Wnt-4* se expresa en la región central del codo, en las regiones donde se va a formar la muñeca y en los estadios tardíos la expresión se observa en las zonas donde se formarán las articulaciones (65).

Se ha reportado que *Wnt-4* se expresa en las articulaciones durante su desarrollo. La expresión de *Wnt-4* fue reportada por primera vez en pollos en estadio 27 según Hamburger y Hamilton, (HH); en la región de la articulación del codo y desde el estadio 30 en adelante en las regiones de los dígitos (26), aunque se ha visto expresado en el estadio 26 en la región de la interzona (65) y se ha observado que acelera la hipertrofia, mientras que *Wnt-5a* que se expresa en el pericondrio la retrasa (26, 66).

Hartmann y Tabin reportaron que la sobreexpresión de *Wnt-4* induce la formación de una zona más expandida de condrocitos hipertróficos. Además que el collar óseo es más grueso comparado con la extremidad contra-lateral por lo que concluyeron que la función de *Wnt-4* es acelerar la maduración condral (26).

*Wnt-4* se ha identificado en algunos condrocitos hipertróficos (27). Para conocer la acción de *Wnt-4* se han generado ratones transgénicos en los cuales se ha bloqueado o sobre-expresado el gen de *Wnt-4* y lo que se ha reportado es que los ratones presentan enanismo, traducido como anomalías craneo-faciales, retardo en la osificación de las vertebrae lumbares y en los huesos pélvicos (67).

Por otro lado *Wnt-5a*, se expresa en el mesénquima durante las etapas tempranas del desarrollo de la articulación (66, 68). Mientras que *Wnt-5b* se observa en la región de la cresta apical del ectodermo y después en el mesénquima ventral y dorsal que rodea a los elementos cartilaginosos de la extremidad. En el estadio 29 HH de pollos *Wnt-5b* se observa mejor definido en la capa externa del pericondrio y en los condrocitos de la diáfisis. La transfección de células con *Wnt-5a* promueve la condensación del precartilago y la condrogénesis en cultivos de micromasas (69).

*Wnt-5a* y *Wnt-11* se expresan en los condrocitos hipertróficos (27). *Wnt-5a*, también se expresa en el pericondrio y la sobreexpresión provoca un retraso en la transición de condrocitos prehipertróficos a hipertróficos lo que resulta en un retraso moderado de la osificación (70). Durante el desarrollo del hueso largo se ha reportado que *Wnt-5a* es requerido para el crecimiento longitudinal y que tanto *Wnt-5a* y *Wnt-5b* regulan la transición

entre las diferentes zonas de cartílago, al parecer Wnt-5a es necesaria para la regulación de la proliferación y diferenciación tanto de la zona I que corresponde a la epífisis, como de la II que corresponde a condrocitos en proliferación localizados en la placa de crecimiento que saldrán del ciclo celular y se irán a la hipertrofia. La señalización de Wnt-5a inhibe la transición de la zona I a la zona II, además de que Wnt-5b promueve la proliferación y formación de la zona II (71).

La sobre-expresión de *Wnt-7a* induce la inhibición de la condrogénesis *in vitro* y se cree que puede ser debido a una alteración en la actividad de la N-cadherina (45, 72). Se ha encontrado además que *Wnt-7a*, induce la desdiferenciación e inhibe la apoptosis inducida por óxido nítrico (NO) en condrocitos articulares cultivados *in vitro* (73).

Mientras que la sobreexpresión de *Wnt-9a* resulta en la formación de elementos cartilagosos anormales o en la ausencia de cartílago (27, 28).

Una vez que han concluido los procesos de osificación endocondral en los huesos largos la epífisis queda recubierta con cartílago articular permanente y cuyas características se analizarán a continuación.

## **Cartílago articular.**

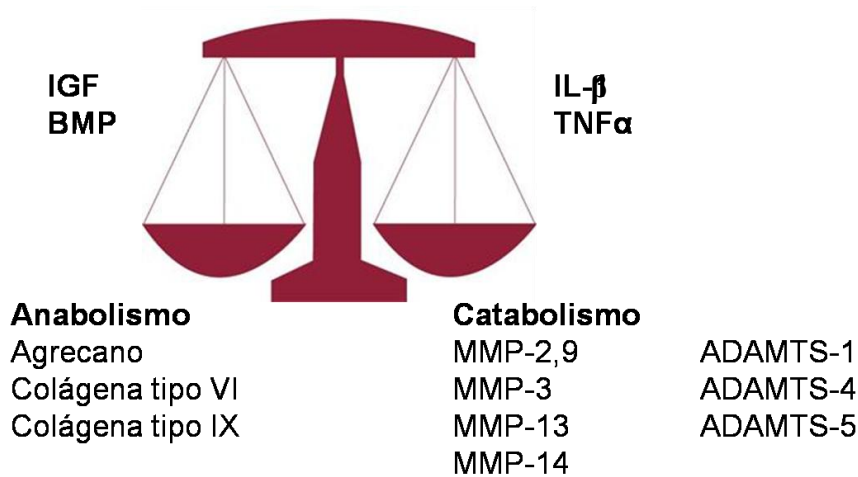
El cartílago articular tiene características únicas entre las que destaca que las células sobreviven por largos periodos de tiempo. En general, la función del cartílago es mecánica (74) y es capaz de soportar una elevada presión hidrostática y de transferir enormes fuerzas desde una placa subcondral hasta otra.

Debido a su estructura química, el cartílago articular de la rodilla distribuye el peso corporal, minimiza el estrés que recae sobre el hueso subcondral y provee de una superficie de baja fricción en un área de carga. El cartílago articular puede deformarse y regresar a su forma original, porque es notablemente elástico. En comparación con otros tejidos, el cartílago articular tiene una actividad metabólica muy baja y la falta de vasos sanguíneos, vasos linfáticos y de inervaciones lo hace ser un tejido relativamente aislado de su entorno con una tasa de reparación muy lenta.

En los tejidos conjuntivos de las articulaciones móviles (diartrodiales) la función del cartílago depende principalmente de su MEC. La MEC, tiene efectos biológicos en la migración, proliferación y la organización celular. Todas estas funciones la ubican como un

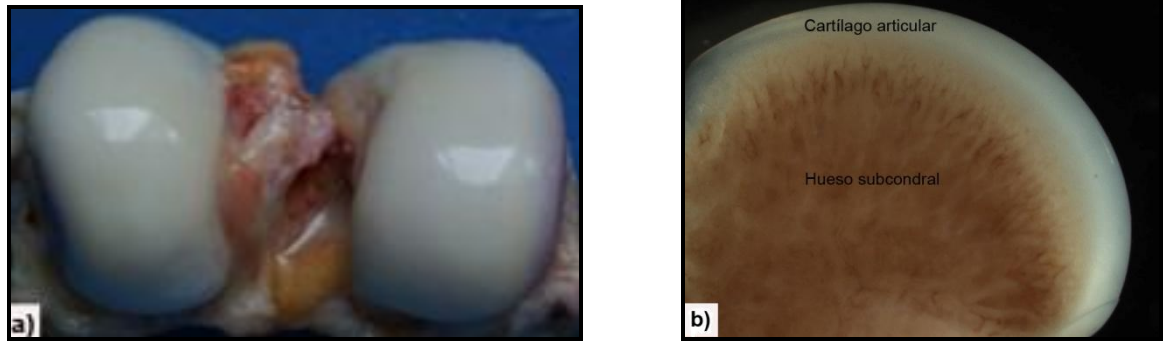
modulador de la diferenciación celular de los condrocitos (75), así como en el mantenimiento de su fenotipo, de ahí su importancia en la regulación de la diferenciación condral, por lo que la homeostasis de la MEC es fundamental para la función adecuada del cartílago y en consecuencia de la articulación.

En el cartílago, la función mecánica es llevada a cabo más por la MEC que por los mismos condrocitos (76, 77). El 90% del volumen seco lo ocupa la MEC, por lo que la homeostasis de la MEC del cartílago articular normal y en condiciones patológicas se considera dependiente de las respuestas de los condrocitos a factores anabólicos y catabólicos. Esto implica que una apropiada actividad anabólica de los condrocitos permitirá un balance en el recambio de la MEC necesario para mantener la integridad fisiológica del cartílago articular (Figura 9).



**Figura 9. La integridad funcional del cartílago articular** depende principalmente de la integridad de su MEC y del balance entre las actividades anabólicas y catabólicas de los condrocitos. Modificado de Aigner, 2000 (78).

Macroscópicamente el cartílago articular se caracteriza por ser una superficie lisa, blanca y brillante (Figura 10), que permite el deslizamiento de la articulación diartroidea.

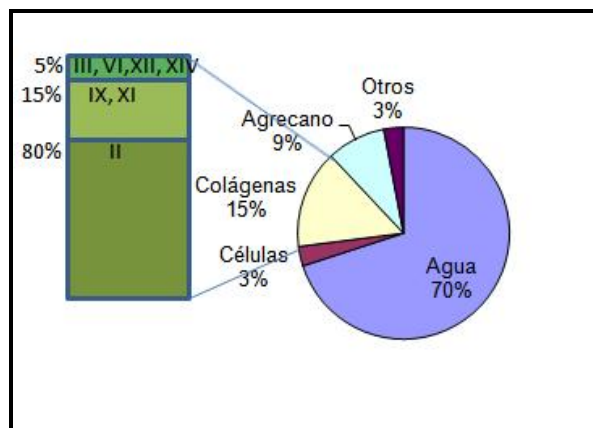


**Figura 10. Cartilago articular normal de una articulación sinovial. a)** Tiene un aspecto blanco perlado, vidrioso (hyalos: vidrio) y traslúcido. Cóndilo articular humano. **b)** Al corte medial de un cóndilo de rata normal, se distingue la superficie articular y el hueso subcondral. Velasquillo.

### ***Características del cartilago articular hialino.***

El cartilago articular tiene una combinación única de propiedades viscosas y elásticas que le permiten llevar a cabo sus funciones de soporte y carga.

Los principales constituyentes de la MEC en el cartilago maduro (Figura 11) son: agua o líquido tisular y colágenas, siendo la más abundante la Col II (79). La Col II constituye más del 75% del contenido total de colágena. Las fibras de colágena crean una malla que atrapa al Agrecano y provee la fuerza tensil del cartilago. Los proteoglicanos (PGs) son macromoléculas altamente cargadas e inmóviles, que regulan el grado de hidratación del tejido y el transporte de fluidos por lo que ayudan al deslizamiento y relajación de la tensión en el cartilago articular.



**Figura 11. Representación esquemática de la composición del cartilago articular.** Siendo el agua la de mayor proporción, seguido de las colágenas (el tipo II la más abundante), y seguido por el agrecano. Modificado de (77).

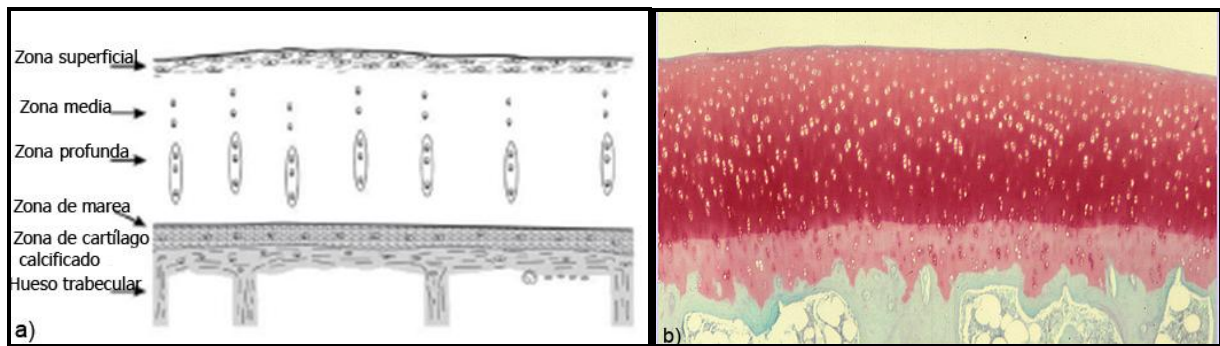
También se encuentran otro tipo de colágenas en la MEC, como la tipo V, VI, IX y XI (Figura 11).

La triple hélice de la Col II está compuesta de tres cadenas  $\alpha 1(II)$ . Las fibras de colágena además de la Col II contienen también Col XI y Col IX. La Col II presenta un alto contenido de hidroxilisina, así como de residuos de glucosa y galactosa los cuales median la interacción con los proteoglucanos. Se ha encontrado que un “splicing” alternativo del ARNm de la Col II da como resultado dos tipos de cadenas  $\alpha 1(II)$ ; una de las variantes es la Col IIB, que es la forma dominante de la colágena en el cartílago maduro, en donde el segundo exón que codifica para el dominio rico en cisteína en el extremo N-terminal en el propéptido es excluido, mientras que éste se mantiene en la variante Col IIA, que se conoce como la variante embrionaria y se encuentra en el mesénquima precondrocítico, en los osteofitos, en el pericondrio y en los tumores condrales (80).

Los proteoglucanos (PGs) contienen cadenas de glucosaminoglucanos (GAGs) todos sulfatados: condroitín sulfato, queratán sulfato, dermatán sulfato y heparán sulfato, menos hialuronato. Los componentes no fibrilares incluyen principalmente monómeros de Agrecano altamente sulfatados, los cuales están unidos al hialuronato. En términos de propiedades físicas las fuerzas tensiles de la matriz cartilaginosa las confiere la red de colágena, lo que dificulta la expansión de los componentes viscoelásticos como el Agrecano y entonces le provee de cierta rigidez al tejidos (77).

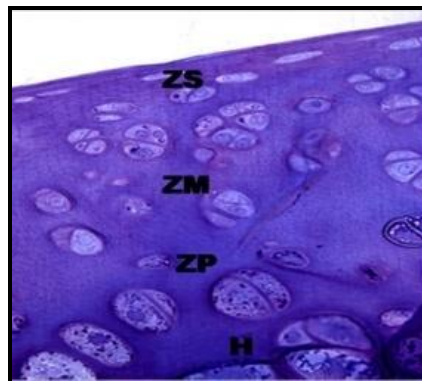
### ***Organización del cartílago articular.***

En el cartílago articular maduro se pueden distinguir cuatro zonas, desde la superficie hasta la profundidad basándose en el arreglo y morfología de las células y las fibras de la matriz (Figura 12 a y b): 1) zona superficial, 2) zona media o transitoria, 3) zona profunda o radial y 4) el cartílago calcificado. Cada una de estas zonas tiene una orientación específica de los condrocitos y una respuesta fisiológica diferente a la fuerza mecánica. La composición de la matriz del cartílago y su orientación estructural permite al cartílago articular convertir las fuerzas de compresión en fuerzas tensiles hacia la superficie ósea.



**Figura 12. Cartílago articular.** a) Esquema de las zonas de la superficie articular b) Corte representativo de cartílago articular normal humano (Velasquillo). Tinción de safranina O, 10X. Modificado de (81).

En la **zona superficial** (Figura 12 y 13), tangencial o de deslizamiento se distinguen condrocitos pequeños y de forma aplanada. Fibras de Col II muy finas arregladas en forma paralela a la superficie. La alta capacidad tensil del cartílago articular es gracias al arreglo de las fibras de colágena llamada *lamina splendens*. La hidratación es alta y el contenido de proteoglicanos es menor que en otras zonas.



**Figura 13. Cartílago normal de rata.** Corte semifino (60  $\mu$ m). Se distinguen las 3 zonas del cartílago articular. ZS, zona superficial; ZM, zona media; ZP, zona profunda y la de Hipertrofia, H. Azul de toluidina, 63X. Cortesía de Almonte y Kouri, CINVESTAV.

La **zona media** (Figura 12 y 13), o transicional, representa entre el 40-60% del grosor del tejido; los condrocitos son más grandes y esféricos, aparecen de forma aleatoria tanto individuales como formando grupos. La concentración de proteoglicanos es la mayor y hay una disminución en la hidratación de esta zona. Por otra parte, las fibras de colágena se disponen de forma oblicua a través de la MEC y son más gruesas.

En la **zona profunda** (Figura 12 y 13), o radial, los condrocitos son elípticos y más grandes, se disponen en grupo de 2 a 6 células y se encuentran orientadas de forma perpendicular a la superficie articular, las fibras de colágena van a seguir la orientación de las

columnas de condrocitos, son de mayor diámetro. Se encuentran abundantes los PGs y existe menor proporción de agua.

En la **zona de hipertrofia o zona de calcificación** (Figura 12 y 13), los condrocitos son menos numerosos y aparecen esparcidos y aunque hay algunos condrocitos necróticos, en general son viables (82, 83); la matriz tiene sales de hidroxapatita. Esta zona y la anterior están delimitadas por el frente de calcificación o “tidemark” o “marca o zona de marea” o “marca de agua”, y se cree que ésta actúa como una barrera a la penetración vascular.

En el cartílago articular adulto el recambio en la MEC es lento. Se calcula que la vida media de los proteoglucanos varía de días a meses (84), mientras que la de la Col II se ha estimado en años (77).

Los condrocitos del cartílago articular permanente que se originan de la interzona son muy parecidos a los condrocitos de la placa de crecimiento. En ambos tejidos observamos las distintas etapas de diferenciación del cartílago como los condrocitos de reserva, en proliferación, prehipertróficos e hipertróficos. Sin embargo, ambos cartílagos tienen importantes diferencias, la más evidente es que los condrocitos articulares disminuyen considerablemente su maduración hacia la hipertrofia, sintetizan una MEC abundante en Col II y proteoglucanos y sólo presentan una reducida zona de calcificación mientras que en la placa de crecimiento se observa una amplia región de condrocitos hipertróficos (Figura 13) que eventualmente son reemplazados por osteocitos durante la osificación endocondral. Los condrocitos hipertróficos tienen un mayor volumen celular y producen una MEC rica en Col X (38).

El cartílago articular adulto tiene una capacidad muy limitada de reparación espontánea (74), por lo que si las lesiones traumáticas persisten, con el tiempo las reacciones de reparación son insuficientes y el cartílago articular se pierde, dando lugar a la exposición del hueso subcondral y evolucionando hasta llegar a la incapacidad articular como en la OA.

### **Factores locales de riesgo para la OA.**

Debido a que las lesiones están frecuentemente localizadas en la zona de carga, los daños mecánicos repetitivos se han propuesto como una de las señales desencadenantes del inicio y evolución de la osteoartritis (85).



### ***Etiopatogénesis de la OA.***

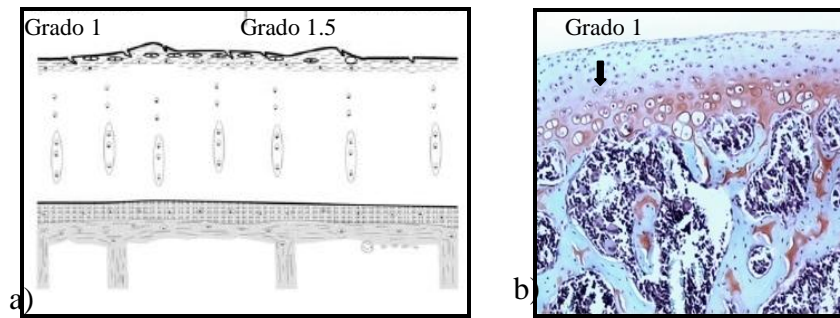
La OA es una enfermedad degenerativa que involucra no solamente al cartílago articular sino a toda la articulación por lo tanto implica también a la sinovia o membrana sinovial, a los ligamentos, a los músculos periarticulares, a la cápsula articular y al hueso subcondral. La OA se caracteriza por presentar dos fases: una **biosintética**, durante la cual los condrocitos tratan de reparar el daño de la MEC y una fase **degradativa**, en la cual la actividad enzimática producida por los condrocitos y por células de la sinovia (sinoviocitos) ocasionan mayor daño proteolítico a la MEC, además de que la síntesis de las proteínas de la MEC se ve inhibida y por lo tanto se acelera la erosión del cartílago (86).

La OA se considera como una condición proliferativa caracterizada por la producción de tejido fibrocartilaginoso *de novo* por lo tanto, bajo estas circunstancias es inapropiado llamarla proceso degenerativo (87), aunque también se incluye la muerte celular.

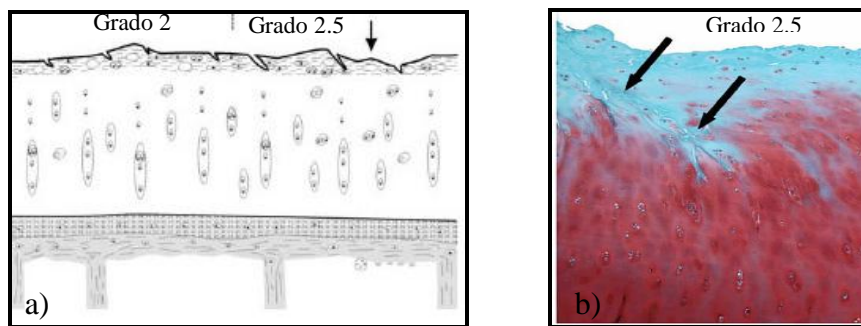
Las características patológicas generales de la OA son: pérdida del cartílago articular, con cambios en el hueso como esclerosis, colapso del hueso subcondral, quistes y la formación de osteofitos (2). La pérdida del cartílago articular puede iniciar como una lesión focal y progresivamente se extiende hasta involucrar los otros compartimientos de la articulación, lo que induce mayores alteraciones en la superficie articular, llevando a la pérdida progresiva del cartílago y finalmente al reemplazo articular. Como es un padecimiento silencioso, lento y progresivo se distinguen diferentes grados de daño articular.

### ***Tipos de daño.***

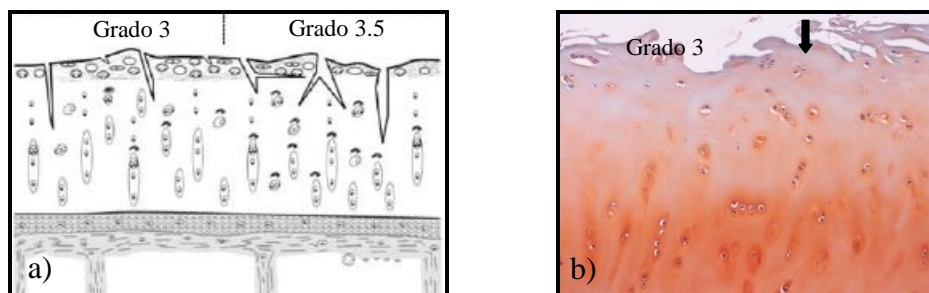
Los grados más comunes de daño o lesión del cartílago han sido reportados por Pritzker y colaboradores (81) y se ilustran en la Figura 14.1-14.5.



**Figura 14.1 Lesiones limitadas a la zona superficial y media.** a) Esquema del grado de lesión 1 y 1.5. Superficie intacta, edema, células muertas, proliferación (“clusters”). b) La lesión es más superficial, se observa pérdida de PGs representado por la ausencia de la tinción de safranina O (flecha) en el cartílago articular de rata osteoatrítica. a) Modificado de (81) b) Velasquillo.

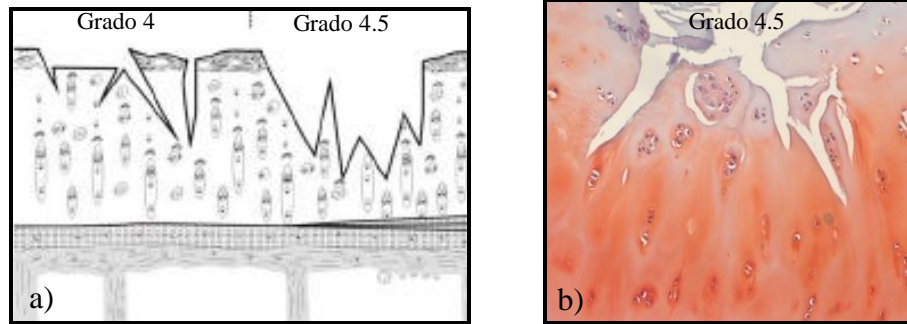


**Figura 14.2 Discontinuidad de la superficie** a) Esquema de grado de lesión 2 y 2.5. Semejante a las lesiones grado uno, b) Se observa fibrilación (flechas) desorientación de las columnas condrales, muerte celular, hipertrofia y “clusters”. Modificado de (81).

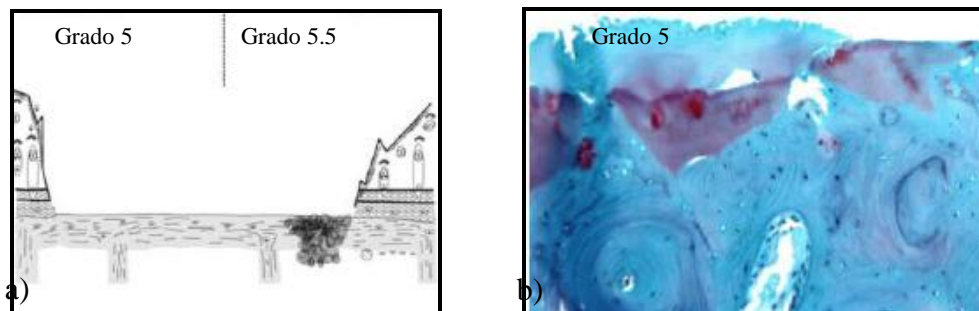


**Figura 14.3 Fisuras verticales.** a) Esquema del grado de lesión 3 y 3.5. Las fisuras verticales llegan hasta la zona media, hay síntesis de colágena *de novo*, b) Superficie articular de cartílago humano, se distinguen las fisuras (flecha) hay pérdida en la tinción de safranina O, lo que se traduce en la pérdida de PG.40X. a) Modificado de (81) b) Velasquillo y García.

La fibrilación superficial (Figura 14.2) se asocia con la pérdida de pequeños proteoglucanos, decorina y biglicano y la pérdida de estas moléculas con un incremento en la ruptura de la Col tipo II (88) y del Agrecano (89).



**Figura 14.4 Erosión.** a) Esquema del grado de lesión 4 y 4.5. Hay pérdida de la MEC desde la superficial hasta la media, delaminación de la zona superficial, fisuras y formación de quistes, b) Superficie articular de cartílago humano, se distinguen fisuras (flecha), nidos celulares y pérdida de la MEC. a) Modificado de (81) b) Velasquillo Gacia.



**Figura 14.5 Denudación.** a) Esquema del grado de lesión 5 y 5.5. Completa erosión del cartílago hialino, comúnmente la presencia de fibrocartilago, b) Exposición del hueso subcondral. Modificado de (81).

En la OA la degradación de la MEC (Figs. 14.4 y 14.5) es mayor que su síntesis llegando inclusive a la erosión del hueso. La principal causa de este proceso se piensa que puede ser un incremento en la capacidad enzimática proteolítica. Las metaloproteinasas (MMP) se han asociado en este proceso. La expresión de varias agreganasas, como la MMP3 o estromelina, MMP13 y la MMP14., las cuales degradan el Agrecano se ha reportado que está elevada en el cartílago de los pacientes con OA. Tres miembros de la familia de las proteinasas con un dominio de desintegrina y metaloproteinasas con secuencias de trombospondina (ADAMTS), la -1, -4 y -5 también se han identificado como agreganasas (81).

Las citocinas producidas por la sinovia y los condrocitos son principalmente la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). Junto con las prostaglandinas estas dos citocinas juegan un papel muy importante en la degradación del cartílago como se detallará más adelante (90, 91).

## ***Respuesta celular a la OA.***

Se han identificado cinco categorías de respuesta celular: 1) proliferación y 2) muerte celular (apoptosis), 3) cambios en la actividad sintética (anabolismo) y en la tasa de degradación (catabolismo), 4) desdiferenciación de los condrocitos articulares, y 5) formación de osteofitos.

### 1) Proliferación.

Se piensa que la actividad proliferativa en los condrocitos osteoartrotríticos puede ser ocasionada por tener un mejor acceso a los factores de crecimiento presentes en el líquido sinovial debido al daño y al rompimiento o pérdida de la matriz de colágena. En consecuencia las células están más cerca de la cavidad articular y expuestas a los diversos factores de crecimiento que estimulan su proliferación.

### 2) Muerte celular (apoptosis).

La muerte celular puede ser dividida en general en dos tipos, por apoptosis o por necrosis.

Sandell 2001 (86) comenta que aunque hay varios autores que han sugerido que la muerte celular es un evento importante durante la degeneración del cartílago articular, ella reporta que han confirmado la apoptosis en el cartílago osteoartrotrítico pero en una tasa relativamente baja 0.1% y en un tiempo determinado, lo que indica que la muerte celular tiene un impacto en la patología de la OA. La zona en donde si se encuentran lagunas vacías como indicadores de muerte celular ha sido reportado por varios autores y se localiza en la zona de calcificación (92).

El oxido nítrico (NO) ha sido implicado como un mediador biológico de la OA y ha sido reportado como un inductor de apoptosis (93). Se ha sugerido que tanto el NO endógeno como el exógeno pueden inducir apoptosis a través de una acción directa sobre las membranas mitocondriales. Al elevarse las especies reactivas de oxígeno, así como el citocromo C, se activa la caspasa 3 y se fragmenta el ADN (94, 95).

Los radicales libres de NO también pueden inhibir la síntesis de PG *in vitro* (96).

### 3) Cambios en la actividad de sintética (anabolismo).

En estudios bioquímicos se ha demostrado que en el cartílago osteoartrítico hay un incremento en la síntesis de los componentes de la MEC. Este aumento en el anabolismo se piensa que es resultado de la actividad de los condrocitos por reparar la matriz dañada. A pesar de esto, se ha encontrado una pérdida neta del contenido de proteoglicanos, siendo éste uno de los cambios más frecuentes observado en la degeneración del cartílago osteoartrítico. Los análisis *in situ* muestran que la pérdida de glucosaminoglicanos ocurre en la zona superficial del cartílago articular osteoartrítico, en donde las células disminuyen la regulación de la expresión de los componentes de la matriz, mientras que la actividad de las células en la zona media se mantiene activa.

Cambios en la tasa de degradación (catabolismo).

El proceso de degradación parece ser más prominente en la superficie articular y alrededor de los condrocitos (86). Los condrocitos del cartílago articular sintetizan MMPS 1, 2, 3, 7, 8, 13 y 14, así como una variedad de serina-proteinasas.

Se han reportado niveles elevados de MMPs, incluyendo MMP7, MMP8 (97), ADAMTS 4 y agrecanasa 2 (ADAMS-5) (98). Poole ha reportado que la MMP13 es la responsable de la mayor parte de la degradación de la Col II (74).

La pérdida de Agrecano es un rasgo característico de las etapas tempranas de la OA. Conforme avanza la enfermedad la concentración de PGs disminuye y en etapas muy avanzadas las cadenas de GAGs se hacen más pequeñas, mientras que los cambios en la colágena están presentes a todo lo largo de la enfermedad (99). No se sabe todavía qué ocurre primero, si la pérdida de PGs o la de colágena. Sin embargo, Maroudas demostró que la pérdida de colágena lleva a la pérdida de PG y que ésta lleva a una sobre carga y a mayor pérdida de colágena, lo que induce hiper-hidratación de la superficie articular y a que macroscópicamente se observe el tejido suave e hinchado (84), clínicamente conocido como condromalacia.

En el cartílago osteoartrítico se ha reportado la aparición de moléculas como la tenascina (100) Col IIA (101) y III (102). Las fibras de Col tipo II son más pequeñas que las normales. Estas alteraciones moleculares ha sido asociadas con la distorsión de la capa media (103).

Las matrilinas son proteínas oligoméricas que se localizan en la MEC. La matrilina 3 es la más abundante en el cartílago y se piensa que forman puentes con otras proteínas de

la MEC. La matrilina 1 interactúa con la Col II y el Agrecano. Las matrilineas -1,-3 y -4 se han asociado a la Col VI y establecen puentes con la Col tipo II y el Agrecano y su ausencia se ha asociado al desarrollo de la OA (104).

#### 4) Desdiferenciación de los condrocitos.

Los fenotipos del condrocito son categorizados por el tipo de colágena que sintetizan. Las células condroprogenitoras son caracterizadas por la expresión de Col II y procolágena tipo IIA (COL2A). Mientras que los condrocitos maduros expresan la Col II (COL2B), IX y XI así como Agrecano y proteína de unión y los condrocitos hipertróficos expresan la Col X. Ahora bien los cambios ultraestructurales de los condrocitos en el modelo experimental usado en esta tesis fueron descritos por Kouri y colaboradores en 2006 (105).

En el cartílago osteoartrítico los condrocitos disminuyen la expresión de Agrecano y Col II aunque todavía son células activas y expresan nuevas colágenas como la I y III.

Algunos factores como el ácido retinoico y la IL-1 entre otros, inducen desdiferenciación condral o cambios hacia un fenotipo fibroblástico. Los condrocitos dejan de sintetizar Col II, aunque están muy activos y sintetizan Col I, II y V (106).

Se ha demostrado que en la OA la expresión de Sox-9 está inhibida. Esto se relaciona con el cambio en la síntesis de la Col II asociada a un fenotipo inmaduro.

Se ha sugerido que las alteraciones fenotípicas son inicialmente observadas en la zona superficial en las etapas tempranas de la OA, donde los condrocitos expresan genes para la producción de enzimas, citocinas y factores de crecimiento relacionados con el catabolismo. Las alteraciones fenotípicas de los condrocitos, la desactivación y la disminución en la síntesis de proteínas de la MEC parecen tener un papel importante en el desarrollo de la OA.

#### 5) Formación de osteofitos

Una de las características más destacadas y consistente en las articulaciones afectadas por la OA es el desarrollo de prominentes nódulos osteocondrales conocidos como osteofitos (osteocondrofitos o condro-osteofitos). Su presencia es uno de los rasgos más característicos de la osteoartritis, ya que esto la distingue de otras artritis. En ocasiones el desarrollo *de novo* de este hueso llega a ocasionar la inmovilidad de la articulación (86, 107).

La formación de tejido fibroso es una respuesta de cicatrización inmediata ante un daño traumático, en muchas ocasiones promovida por el TGF- $\beta$ ; el cual a su vez podría inducir la formación de osteofitos que se ha propuesto recapitulan la condrogénesis y la osificación endocondral en el cartílago articular adulto.

Por otro lado, también se ha relacionado a la osteoartritis con el aumento de la expresión de Runx2 y con vías de señalización que regulan la hipertrofia del cartílago como las BMP y las Wnt. Cuando se inactiva el receptor Bmpr1a en ratón se generan fenotipos similares a la osteoartritis humana (108) y cuando se activa la vía de Wnt al bloquear a su antagonista Dkk, se revierten los procesos de destrucción del cartílago articular y la osificación endocondral (109), esto sugiere que estas vías permiten el mantenimiento del cartílago articular adulto (110).

### ***Citocinas proinflamatorias.***

En la OA también hay una etapa de activación del tejido sinovial, de modo que los fibroblastos y macrófagos presentes en este tejido sintetizan cantidades importantes de citocinas proinflamatorias.

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular que actúan como mediadores solubles y se ha demostrado que algunas pueden ser sintetizadas por los condrocitos.

Con respecto a la regulación en la función de los condrocitos las citocinas proinflamatorias (Tabla 2) se clasifican en: catabólicas, moduladoras, anti-catabólicas y anabólicas. Las citocinas que regulan la remodelación del cartílago articular son las catabólicas y su función principal es la de inducir la síntesis de productos que promueven la degradación de la MEC, entre ellas encontramos a la interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) y al factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) entre otras (111, 112).

Las citocinas anabólicas actúan en el crecimiento y diferenciación condral. Además de encontrar aquellas que se han denominado moduladoras clasificación basada en su capacidad para modular la actividad de citocinas (111) (ver tabla 2).

En cuanto a las citocinas catabólicas la IL-1 $\beta$  es considerada la citocina pro-inflamatoria típica implicada en la degradación de la MEC del cartílago en la OA.

El primer reporte en el cual se atribuyó a la IL-1 $\beta$  su capacidad reguladora condrocítica fue el de Fell et al., en 1977 (113) en el cual utilizaron tejido sinovial sano de cerdo para cultivar fragmentos de cartílago.

<b>Catabólicas</b>	<b>Moduladoras</b>	<b>Anti-catabólicas</b>	<b>Anabólicas</b>
IL-1 $\beta$	IL-6	IL-4	IGF-1
TNF $\alpha$ ,	LIF	IL-10	TGF- $\beta$ 1,2,3
IL-17	IL-11	IL-13	BMP-2,4,6,7,9,13
IL-18		IL-1ra	
		IFN $\gamma$	

**Tabla 2. Clasificación de las citocinas.** Modificado de (111).

Posteriormente otros grupos demostraron (114) que la IL-1  $\beta$  era responsable de la degradación de la MEC (PGs) (8) al inducir la síntesis de metaloproteinasas (MMPs, -1,-2,-3,-8,-13) (115, 116). Estas proteínas son responsables de la degradación de la MEC.

Hasta hace algunos años se pensaba que la IL-1 $\beta$  provenía del líquido sinovial, pero también se ha encontrado que los mismos condrocitos la sintetizan (85) y se ha demostrado la expresión de IL-1 $\beta$  en la tibia de un modelo de ratones con OA (117). Se ha reportado también que la IL-1 $\beta$  activa genes tempranos de la familia de los factores de transcripción AP-1 activadores de los genes de la MMP-1 y MMP14 (116) y del factor de transcripción nuclear kB (NFkB); también se ha reportado un incremento en la expresión de los genes c-Jun y JunB. (116)

El TNF $\alpha$  promueve la síntesis de MMPs (1 y 3) además de suprimir la síntesis de Col II e incrementar la de Col II (118). Se ha reportado utilizando condrocitos de pacientes con OA y tratados con IL-1 $\beta$  y con TNF $\alpha$  que se induce la síntesis de prostaglandina E2 (PGE $_2$ ) por estimulación de la actividad de COX2 y de la sintetasa para PGE $_2$  y de ácido nítrico (119, 120). En explantes de cartílago estimulados con IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  se ha reportado un incremento en la transcripción de MMP3, MMP13, ADAMTS4 y ADAMTS5 (72), además de que junto con el factor de transcripción nuclear kB (NF-KB) suprimen la expresión de Sox-9 (121).



La IL-1 $\beta$  y el TNF $\alpha$  promueven la expresión génica de las caspasas (122) así como, la producción de agreganastas en un estudio de expresión génica utilizando condrocitos articulares osteoártricos y encontrando además un incremento en la actividad de la proteína cinasa C (PKC) zeta implicada en la señalización de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  (123). El TNF $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  regulan la función mitocondrial de los condrocitos al inhibir el complejo respiratorio I y esto podría tener relación con el daño inducido por estas citocinas ya que ambas promueven la síntesis de PGE<sub>2</sub> (85)

Con respecto a las citocinas anti-catabólicas se ha propuesto que el IFN $\gamma$  inhibe la síntesis de Agregano, biglican y reduce la proliferación condral (124), que suprime la expresión de MMP13 (125) y estimula la producción de NO, PGE<sub>2</sub>, ILRa y que inhibe la síntesis de los PG (126). Por otro lado se ha encontrado que el IFN $\gamma$  producido por las células T inducen osteoclastogénesis por monocitos mediante la expresión de RANKL, sugiriendo que las células Th1 juegan un papel importante en la reabsorción de hueso.

El componente genético también tiene influencia en la aparición de la OA, aunque desde una perspectiva clínica se ha asumido que los factores ambientales predominan en el desarrollo de la OA. Entre los genes más estudiados se encuentran los de la colágena II (*COL 2A1*) (127, 128), sin embargo, algunos otros genes han sido estudiados entre ellos el gen 6 inductor de mitosis (*Mig-6*) (129).

### ***Mig-6.***

*Mig-6* es también conocido RALT “receptor-associated late transducer”. Es una proteína de 53kDa localizada en el citoplasma de varias células. El gen *Mig-6* está localizado en el cromosoma 36 1p. En la rata su ARNm de 2970 pb está constituido de 4 exones y codifica para un polipéptido de 50kDa (130).

*Mig-6* fue identificado como un gen que es rápidamente inducido por estimulación mitógena en fibroblastos. En contraste con otros genes la expresión del RNAm de *Mig-6* está también regulada durante el ciclo normal. Mostrando un pico a la mitad de G1 y expresándose en células normales en proliferación (131).

El primer reporte asociando al *Mig-6* con la OA fue hecha en el 2005, en OA de cadera en perros en donde encontraron un incremento de 4 veces los transcritos de RNAm de *Mig-6* en las cadera OA, mientras que no lo encontraron en cartílago sano (129). Mientras que en el

mismo año Zhang (130) utilizando ratones transgénicos demostró que la ausencia de *Mig-6* lleva a la aparición de una enfermedad que morfológicamente es idéntica a la OA y caracterizada entre otros aspectos por la degeneración del cartílago articular y la aparición de osteofitos semejante a la OA articular (130). La ausencia de *Mig-6* relacionada con OA, fue comprobada en este trabajo de tesis, en donde se reportó la disminución en la expresión del RNAm de *Mig-6* conforme se incrementaba el daño en la superficie articular del cartílago de la rodilla de ratas osteoarthriticas (132).

Ahora bien, se ha mostrado como algunos factores de crecimiento, de transcripción, así como las citocinas intervienen en la patogénesis de la OA, en seguida se mencionaran algunos estudios relacionando las proteínas Wnt con las enfermedades articulares.

### **Proteínas Wnt y enfermedades articulares.**

En uno de los primeros estudios que relaciona a los genes Wnt con la artritis reumatoide (AR) se muestra que en la membrana sinovial de estos pacientes se expresan Wnt-1, 5a y 13 en tres de cinco pacientes, mientras que en la sinovia de pacientes con OA éstos se expresan débilmente y de todos ellos es Wnt-5a el que solamente se encuentra sobrepresado en la AR (133).

Nakamura et al. reportan en el 2005 la expresión de genes Wnt en pacientes con OA, AR y lo comparan con muestras normales. Los *Wnt* del estudio por PCR fueron *Wnt-3, -3a, -4, -5a, -5b, -7b, -8b, -10a, -11, -13, -14, -15*, y por hibridación *in situ* *Wnt-7b* y *-10a*. Lo que encontraron fue que en todos los pacientes con AR y OA se detectaron los Wnts por PCR, sin observar una diferencia en la expresión entre pacientes y controles, excepto por *Wnt-7b* que estuvo 7 veces incrementado en la sinovia y el *Wnt-10a* tres veces en el cartílago en pacientes con AR. Por otro lado, los pacientes con OA mostraron un incremento de 6 veces en la expresión de *Wnt-7b* en el cartílago, mientras que *Wnt-3, -5b, y -15*, estaban disminuidos en la sinovia. En los ensayos de hibridación *in situ* de tres pacientes se muestra que en los pacientes con AR, *Wnt-7b* se expresa en las células semejantes a macrófagos, en los fibroblastos y en los vasos sanguíneos de la sinovia, principalmente en las zonas de inflamación.

En los pacientes con OA, *Wnt-7b* se expresó fuertemente en los condrocitos, en las células semejantes a osteoclastos, en los osteofitos y en el cartílago articular, en los macrófagos, en los fibroblastos y en las paredes de los vasos sanguíneos de la sinovia (134).

En resumen, en la OA se encuentra un recambio acelerado de los componentes de la MEC, con una reducción notable de los PG y la pérdida de la estructura de la red de colágena, al mismo tiempo que el programa anabólico del condrocito favorece la proliferación celular y la maduración del cartílago articular, lo que recuerda los eventos que ocurren durante la osificación endocondral y que se muestran evidenciados al observar la expresión de moléculas Wnt involucradas en el mantenimiento y maduración del cartílago.

Se ha reportado que la pérdida de un alelo de DKK-1 induce el incremento en la masa ósea de ratones. Además se ha encontrado que en enfermedades inflamatorias y degenerativas de las articulaciones puede inhibir la formación del hueso, o causar un desequilibrio en la resorción ósea. Diarra en 2007, (109) reportó en un modelo transgénico de artritis reumatoide (AR) que el tratamiento con dosis incrementadas de anti-DKK elimina las erosiones del hueso y concluye que es debido a la disminución en la formación de osteoclastos así como también observó la formación de osteofitos. Estos procesos recuerdan el desarrollo de los huesos largos mediante osificación endocondral y sugieren que al eliminar el proceso inflamatorio en la AR se convierte en un proceso degenerativo semejante a la OA. También encontró que la expresión de Wnt-4 ocurre en los sinoviocitos y de Wnt5-a en la sinovia dentro de las erosiones óseas (109).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Se ha demostrado que algunas moléculas de la familia Wnt regulan diferentes procesos del desarrollo y que su falta de expresión o la sobreexpresión génica de algunos de estos factores ha sido implicada en varios procesos patológicos como el cáncer, aunque se sabe poco del papel de estas glicoproteínas en el mantenimiento del fenotipo del cartílago articular en el estado adulto, así como su participación en la patogénesis de enfermedades degenerativas como la OA.

Ha sido reportado que Wnt-1,-5a, -7a, y -9a inhiben la diferenciación de células mesenquimatosas hacia condrocitos, que Wnt-9a está involucrado en los procesos tempranos del desarrollo de la articulación; y que además Wnt-1, -3a,-4,-7a y -7b inhiben la diferenciación de los condrocitos durante el desarrollo de las extremidades de los pollos. En pacientes con OA se ha reportado que la sobre-expresión de Wnt-7b está relacionada con la secreción de citocinas asociadas a los procesos inflamatorios en esta enfermedad (134).

Debido a los cambios que se presentan en el cartílago articular en la OA que involucran la desdiferenciación de los condrocitos, maduración condral y de generación de hueso *de novo*, fenómenos que también se observan durante el desarrollo normal de las extremidades, se planea estudiar la expresión de los genes Wnt-4, 5a,-5b, -7, y -16 en el cartílago articular en un modelo animal que semeja la osteoartritis en humanos, y establecer su relación con los factores de diferenciación y maduración condral así como establecer la relación entre los marcadores de diferenciación condral con la expresión del RNAm de *Mig-6*.

## **HIPÓTESIS.**

La osteoartritis experimental recapitula algunos procesos de maduración y muerte celular del cartílago articular, que ocurren durante la osificación endocondral normal.

## **OBJETIVO GENERAL.**

Establecer el patrón de expresión de los genes *Wnt-4*, *-5a*, *-5b*, *-7b* y *-16*, en el cartílago articular normal y en el osteoartrítico en un modelo animal así como, correlacionarlo con los factores de diferenciación (Col II y Agrecano) y maduración condral (Col X), así como con la expresión del gen *Mig-6*. También se pretende asociar la muerte celular programada (apoptosis) con la presencia de citocinas proinflamatorias en el cartílago articular osteoartrítico.

## **OBJETIVOS PARTICULARES.**

1. Realizar la inducción de la osteoartritis experimental en ratas macho Wistar y establecer los patrones de expresión de los marcadores de diferenciación condral como Sox-9, Col II y de desdiferenciación como Col I y de maduración como la Col X, a los 5, 10 y 20 días de la evolución de la enfermedad para determinar si existe alguna relación con los procesos de osificación endocondral.
2. Correlacionar la expresión de los diferentes marcadores de diferenciación y maduración condral y de algunos genes Wnt, con la expresión del gen *Mig6*.
3. Determinar cuáles son los genes Wnt que están asociados con la expresión de los factores de maduración del cartílago (como la Col X) y correlacionar su expresión con los marcadores de diferenciación del cartílago como Col II, Sox-9 y Agrecano mediante su expresión por hibridación *in situ* a diferentes tiempos de evolución de la OA y determinar si los cambios en la expresión de los Wnt están asociados a los procesos celulares y moleculares involucrados en la OA.
4. Estudiar la expresión de marcadores de inflamación como la IL1- $\beta$ , TNF $\alpha$ , e IFN- $\gamma$  y correlacionar con los procesos de muerte celular mediante la técnica de TUNEL así como establecer su relación con la expresión de Wnt en los diferentes tiempos de la inducción de la OA.

5. Analizar la expresión de la  $\beta$ -catenina fosforilada y no fosforilada a los diferentes tiempos de daño condral y establecer su relación con Wnt-4, Wnt-5a, Wnt-5b y los marcadores de diferenciación y maduración condral.
  
6. Analizar la expresión proteica de los reguladores negativos del ciclo celular, p107 y p57<sup>kip2</sup> y los marcadores de diferenciación como Sox-9, Col II, agregano y de maduración condral como la Col X.
  
7. Establecer mediante los patrones de expresión de los genes Wnt y de maduración condral, si éstos semejan los que ocurren durante la osificación endocondral.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

### *Diseño del estudio. Inducción de la OA.*

Se realizó por menisectomía parcial de la pata trasera derecha de ratas de la cepa Wistar. Posterior a la cirugía, las ratas se sometieron a ejercicio de alto impacto, a diferentes tiempos de inducción según protocolo establecido por Lozoya y Kouri, 2000 (135).

Los animales se mantuvieron en el bioterio del CINVESTAV siguiendo los lineamientos de manejo de animales de experimentación. Se alimentaron *ad libitum*.

Se emplearon 60 ratas macho de 5 a 6 semanas de edad con un peso promedio de 150-160 gramos. Se agruparon en series para cada grupo de 5 días, 10 días y 20 días posterior a la inducción de la OA.

**Grupo control:** cartílago articular de rodilla normal de rata. Se utilizaron 24 ratas. Los animales se mantuvieron en jaulas y sin ningún ejercicio según los tiempos establecidos para cada experimento.

**Grupo osteoartítico:** lesionado o experimental, con cartílago articular lesionado de rodilla en rata menisectomizada parcialmente y ejercitada. A un grupo de 40 ratas se les indujo OA mediante menisectomía parcial que fueron evaluadas posteriormente.

Los animales fueron anestesiados intra-peritonealmente con Xilazina (Pisa; Hidalgo, México) y ketamina (Virbac; Hidalgo, México) 0.02mL y 0.09mL por cada 140g de peso corporal respectivamente y administrados intraperitonealmente. Previo a la menisectomía, las extremidades posteriores fueron lavadas con jabón y posteriormente con yodo para ser rasuradas y disecadas (Figura 16).

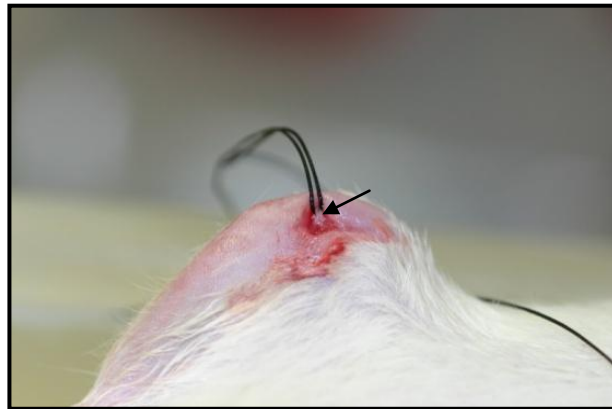
### *Métodos quirúrgicos.*

La técnica quirúrgica consistió en disecar la masa muscular que se encuentra paralela al plano del hueso, hasta encontrar el ligamento interno (Figura 15).



**Figura 16. Corte de la piel y tejido subcutáneo para localizar el ligamento lateral.**

El ligamento se escindió transversalmente, se disecó la zona de interacción del menisco con el plato tibial y el cóndilo femoral y se separa el menisco con ayuda de una hoja de bisturí curva. Posteriormente el menisco se ensartó con una aguja curva de punta roma para fijarlo con pinzas y cortarlo con una hoja de bisturí, se traccionó ligeramente (Figura 17) y se obtuvo un tercio del menisco, por último se limpia la zona y se procedió a cerrar la piel con dos o tres puntos de sutura.



**Figura 17. Localización y disección del menisco.** En blanco se distingue el menisco (flecha) ensartado con la sutura de color negro.

### ***Ejercicio para acelerar el daño al cartílago articular.***

Después del primer día posquirúrgico a las ratas se les empezó a ejercitar según (135). Los primeros 5 días de 2-3 minutos. Después de 3 días los animales pueden utilizar ambas extremidades por lo que se procedió a ejercitarlas de la siguiente manera.



Las ratas se colocaron en una caja rectangular de cartón, de aproximadamente 70 cm de largo por 40 cm de ancho, con una cama de aserrín. La caja se movía aproximadamente a un ángulo de 45° por 5 min (Figura 18 a), posteriormente se hicieron saltar moviendo la caja de arriba hacia abajo aproximadamente 10 cm, por 5 min y finalmente, se hizo soltar a las ratas dentro de la caja de aproximadamente 80 cm de altura (Figura 18 b), todos los ejercicios se realizaron todos los días en los animales lesionados.



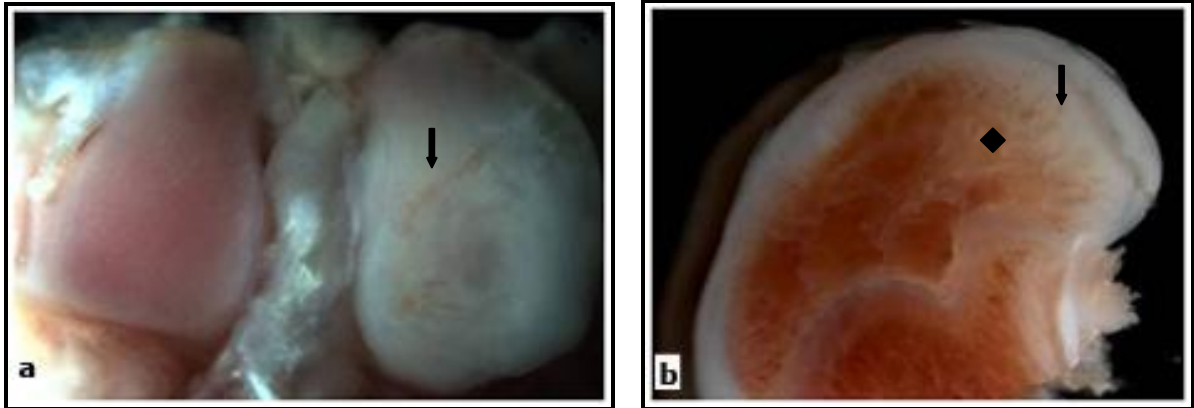
**Figura 18. Ejercicio de las ratas experimentales.** a) Se inducía a los animales a mantener el equilibrio dentro de una caja de cartón que se movía 45° con respecto al piso, b) Los animales se soltaban de una altura de 80 cm aproximadamente.

### ***Procesamiento de los tejidos.***

El sacrificio de los animales control y osteoarthríticos se llevó a cabo a los 5, 10, y 20 días post-menisectomía y ejercicio. Los animales control se mantuvieron en sus cajas sin ejercicio por el mismo tiempo que los lesionados. Inmediatamente transcurrido el tiempo de inducción programado, las ratas fueron sacrificadas por sobredosis de CO<sub>2</sub>.

Las extremidades posteriores derechas se lavaron y desinfectaron con benzal y se rasuraron. En adelante todo el material usado fue previamente desinfectado y esterilizado.

A las extremidades se les retiró la mayor cantidad de músculo. Se abrió la cavidad articular sumergidas las extremidades en PBS frío y después de fijadas las muestras, se separó la tibia del fémur, se eliminó el tejido adiposo, los ligamentos y se colocaron los cóndilos con aproximadamente 1 cm de fémur cortados con una hoja de bisturí, en un tubo cónico con PFA 4% frío. Después de 24 hrs, los especímenes se transfirieron a PFA/EDTA y se mantuvieron a 4° C en agitación constante en el cuarto frío y cambiando la solución de PFA/EDTA cada tercer día hasta que las piezas estuvieron lo suficientemente descalcificadas para cortar los cóndilos con bisturí.



**Figura 19. Vista macroscópica de los cóndilos femorales.** a) Cóndilos de la extremidad derecha de una rata con OA de 10 días. Se distingue el cóndilo medial con daño en la superficie articular, caracterizado por la rugosidad, el color amarillento y la superficie fibrilada (flecha). b) Corte lateral del cóndilo medial en donde se distingue la separación del cartílago articular del hueso subcondral (flecha) y cambios escleróticos (rombo) en el hueso subcondral 1.5X.

Se realizó la disección del cartílago articular del cóndilo femoral medial bajo el microscopio estereoscópico (Zeiss) y se tomaron fotos de los cóndilos con los objetivos de 1 y 1.5X (Figura 19 a). Se separó la tibia del fémur y en una serie de animales se realizaron cortes mediales de la tibia y el fémur para analizar la articulación por completo (Figura 19 b). Después de descalcificadas las muestras, se deshidrataron con alcoholes graduales, se pasaron por xilol, y se incluyeron en parafina (paraplast, Sigma).

### ***Deshidratación e inclusión en parafina.***

Después de fijados los cóndilos articulares se descalcificaron a 4°C en PFA 4%/PBS/EDTA 200mM de 2 a 4 semanas aproximadamente, o hasta que estuvieron lo suficientemente suaves para cortar con una hoja de bisturí. Los cóndilos se deshidrataron con alcoholes de concentraciones crecientes, iniciando con alcohol etílico al 50 % y llegando al absoluto, se pasaron por dos cambios de xilol y se incluyeron en parafina (Paraplast, Sigma) dejando la parte medial del cóndilo hacia la cara del corte. Se hicieron cortes en el microtomo de 5 y 7  $\mu\text{m}$  de grosor. Los cortes se estiraron en un baño a 37°C sin gelatina y se colocaron en laminillas cubiertas con TESPA (“3 aminopropyltriethoxysilane”, Sigma) al 4%.

Se colocaron sobre una plancha de calentamiento para terminar de estirar el tejido a 37°C. Posteriormente se dejaron en la misma plancha de calentamiento por 2 h más a 42°C. En seguida, se bajo la temperatura a 37°C y se dejaron toda la noche sobre la plancha a esa misma temperatura. Se colocaron las laminillas en una canastilla de soporte y se dejaron 18 h al vacío para permitir una mejor adherencia del tejido al portaobjeto.

### ***Tinciones histológicas.***

Para identificar la presencia de PG se realizó la técnica de safranina O y verde rápido. Las laminillas se desparafinaron por 1 h a 56 °C, se rehidrataron por 10 min en cada cambio en alcoholes de absoluto a 50% y se tiñeron en hematoxilina de Weigert por 7 min., después de lavarlas en agua destilada, las laminillas se tiñeron con verde rápido al 0.2% por 5 min y se enjuagaron rápidamente en ácido acético al 1%, dos veces. Posteriormente las laminillas se tiñeron en safranina O durante 10 min y por último se deshidrataron con alcoholes de concentraciones crecientes iniciando con alcohol etílico al 96% y llegando al absoluto, se pasaron por dos cambios de xilol y se montaron con resina.

### **Hibridación in situ.**

#### ***Preparación de las sondas.***

Para las hibridaciones *in situ* se utilizaron las siguientes sondas de ADNc de ratón: *agrecano* (12), *colágena II* (136), *Wnt-4* (Yamaguchi), *Wnt-5a* (137), *Wnt-5b* (137), *Mig-6* (132), *Wnt-7b* (110) *Wnt-14* (12) y *Wnt-16*, [www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html](http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html). Las cadenas sencillas de ADNc se sintetizaron con el kit "first-strand cDNA" (Roche Applied Science) y 1µg de ARN total de embriones de ratón E12. Las PCR se desarrollaron en un termociclador marca eppendorf utilizando un volumen total de 20µl y usando la Taq DNA polimerasa (Roche Applied Science). La reacción sin la polimerasa se incubó durante 5min a 96°C, en ese momento se le agregó la Taq ADN polimerasa, las condiciones de los ciclos fueron 1 min a 96°C para desnaturalizar, 1 min a 57°C para alinear, 1 min a 72°C para la polimerizar, estas mismas condiciones se repitieron por 35 ciclos y finalmente se incubó la reacción por 30 min a 72°C.

### ***Sonda para Mig-6***

El fragmento para *Mig-6* (número de acceso PubMed: BC057646.1), se obtuvo por RT-PCR. El ADNc fue sintetizado utilizando el Kit “first-strand cDNA” y 1µg of RNA de ratón recién nacido. Los primers 5´ a 3´ que se utilizaron fueron: *Mig-6* primer 5´, 5´-gcattacacctcactt-3´ y *Mig-6* primer 3´, 5´-cttctgctgaccaccgtct-3´ (correspondientes a la región 639-1182). La PCR se llevó a cabo utilizando un volumen total of 25 µl usando la Taq DNA polimerasa (Invitrogen).

Las condiciones para la desnaturalización fueron de 15 seg a 94°C, y de 30 seg a 58.9°C para alinear, 1 minuto a 72°C para polimerizar, y de 30 minutos a 72°C después del último de los 35 ciclos. Los productos de PCR fueron clonados con vector del kit TOPO (Invitrogen). Los fragmentos fueron verificados secuenciándolos en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

### ***Preparación de la ribosonda.***

Los plásmidos con los ADNc de cada gen se linearizaron por digestión con enzimas de restricción durante 2 h a 37°C; se precipitaron con etanol absoluto durante 2 h a -20°C. Se centrifugaron a 14000 rpm, se eliminó el sobrenadante, los precipitados se secaron al aire y finalmente se resuspendieron en agua estéril. La linearización se confirmó por electroforesis y se procedió a transcribir la sonda.

La transcripción se realizó con el plásmido linearizado en una mezcla de ribonucleótidos y digoxigenina 11´UTP (nucleótido marcado) (Roche, Applied Science), inhibidor de ARNsa y ARN polimerasa. La reacción se incubó por 2h a 37°C, la ribosonda se precipitó, se dejó secar y resuspendió en agua tratada con DEPC inactivado.

Para comprobar la incorporación de la marca en la ribosonda se realizó un “dot plot” (DIG Quantification Test Strips, Roche Applied Science) utilizando 1µL de la muestra. Se bloqueo 2 min con solución bloqueadora (TBST+levamisole+10 % de suero de chivo) por 3 minutos, se eliminó y se agregaron 150 µL de antidigoxigenina (1:1000 en solución bloqueadora) se incubaron por 3 min, se lavaron con TBST-levamisol, se agregaron 150 µL de amortiguador de reacción y se dejó incubar por 1 min. Posteriormente se agregaron 150

$\mu$ L del revelador “BM purple” (Roche Applied Science) por 20 min incubando en la obscuridad, lavando finalmente con TBST. Se secaron las tiras y se compararon con el control.

### ***Preparación de los cortes***

Los cortes se desparafinaron en plancha de calentamiento por 1 h a 56 °C, se pasaron a xilol 2 veces por 10 min cada vez, se deshidrataron con metanol a concentraciones graduales del 100% a 25% en amortiguador de fosfatos con tritón (PBT), para el ultimo lavado se utilizó PBT. Se fijaron las laminillas con PFA frío al 4% por 15 min, se lavaron con PBT tres veces por un minuto cada uno de ellos, se trataron con proteinasa K (5  $\mu$ g/ml) (Sigma) por 15 min. Se incubaron las laminillas con glicina (2mg/mL PBT), se lavaron con PBT, se fijaron con PFA 4% frío por 20 min, y posteriormente se incubaron por 10 min en acético anhidro 0.25%/TEA (Sigma) en agitación suave; finalmente se lavaron con PBT dos veces por 1 min.

### ***Prehibridación.***

Se incubaron las laminillas por 15 min a 55°C con amortiguador de hibridación). Para hibridar, se desnaturalizó la sonda (1:100) incubándola a 95 °C por 2min y se transfirió inmediatamente a 4°C en hielo. Se extrajo el amortiguador y se agregaron 100  $\mu$ L de la sonda para cada uno de los genes a estudiar por laminilla, se cubrieron con Parafilm® y se incubaron toda la noche a 55°C en una cámara húmeda cubierta con papel aluminio en el horno de hibridación.

Lavados de hibridación inespecífica e inmunodetección. Al siguiente día se lavaron tres veces con una solución I (ver anexo 1) precalentada, se incubaron por 15 min cada vez a 55°C, en seguida se incubaron con solución III (ver anexo 1) precalentada 3 veces por 15 min a 55°C. Posteriormente se lavaron 3 veces con TBST/levamisol por 10 min a temperatura ambiente, se agregó la solución de bloqueo (suero de chivo al 10% en TBDST/levamisol). Se eliminó el exceso y se incubaron toda la noche con el anticuerpo para digoxigenina-AP (Roche) diluido 1:500 en el mismo amortiguador, a 4°C. Se cubrieron las laminillas nuevamente con un Parafilm® y se dejaron protegidas de la luz en una cámara húmeda.

### ***Revelado.***

Las laminillas se lavaron con amortiguador TBST+ levamisol dos veces por 5 min, posteriormente con TBST + levamisol dos veces por 10 min. En seguida se lavaron dos veces con TBST por 10 min y con NTMT+levamisol 2 veces por 10 min: Finalmente se agregaron 200µl del revelador BM-Purple (Roche), se cubrieron los cortes con Parafilm® y se dejaron a 4°C en cámara húmeda cubiertos de la luz hasta que se revelaron (24-72 h).

### ***Lavado y montado.***

Cuando la reacción se completó se lavaron con NTMT una vez por 10min, una segunda en agitación muy suave por 15min, finalmente se lavaron tres veces con PBS y se montaron con cristal mount (Sigma).

### ***Muerte Celular (TUNEL).***

La muerte celular se determinó mediante la prueba del TUNEL en cortes de parafina. La técnica empleada fue según las instrucciones del fabricante del kit de detección de muerte celular *in situ* (Promega Science), el cual consiste básicamente en detectar por fluorescencia los fragmentos de ADN generados durante la muerte celular. La técnica consiste en: desparafinar con dos cambios de xilol por 5 min, deshidratar los cortes con alcohol absoluto por 5 min, y re-hidratar con alcoholes de concentraciones graduales por 3min por cambio, lavar con solución salina por 5 min e hidratación de los cortes con PBS 10 min, se eliminar el PBS y fijar en formaldehído al 4% libre de metanol en PBS por 15 min, lavar dos veces con PBS por 5 min. Luego se incubaron las muestras con proteinasa K por 10 min en cámara húmeda y se lavaron con PBS por 5 min. Se fijaron en metanol al 4% en PBS por 5 min.

Las laminillas del control positivo, control negativo y osteoartrítico se colocaron en cajas de petri por separado.

Control positivo. Se le colocó amortiguador de ADNasa pH 7.9 por 5 min, pasado el tiempo de incubación, se agregó la enzima ADNasa libre de ARNasa en buffer de DNasa 5 min, y se hicieron 4 lavados con PBS en un vaso Koplín.

Pasado el tiempo de lavado, al control positivo junto con resto de las laminillas se les agregó amortiguador de equilibrio durante 10 min cubiertos de la luz. Posteriormente se les agregó lo siguiente a cada laminilla:

Control positivo: una combinación de 45µL de amortiguador de equilibrio, 5 µL de nucleótidos y 1 µL de TdT (provenientes del kit).

Control negativo: 45 µL de amortiguador de equilibrio, 5 µL de nucleótidos y 1 µL de agua bidestilada.

Muestras experimentales (OA). Cortes de los cóndilos de ratas controles 5, 10 y 20 días y de ratas OA de 5, 10 y 20 días después de la inducción. Se les colocó 51 µL de la mezcla de 360 µL de amortiguador de equilibrio, 40 µL de nucleótidos y 8 µL de TdT.

A partir de este paso todas las laminillas fueron cubiertas de la luz, se incubaron durante 1hr a 37°C. Pasado el tiempo de incubación fueron colocadas durante 15 min en la solución 20x SSC al 4% en agua bidestilada (proveniente del kit). Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS por 5 min y se tiñeron los núcleos con Ioduro de Propidio (IP, 1µg/ml en PBS) 15 min, se lavaron 3 veces con agua (5 min cada lavado), posteriormente se secó el líquido cercano a los cortes, se agregó 10 µL de Vectashield y se montaron, sellándolos con barniz y se guardaron las laminillas cubiertas de la luz y en congelación hasta su análisis por fluorescencia con el microscopio Imager A1 Eclipse E600 (Nikon, Inc.).

## **Inmunohistoquímica.**

Para detectar la presencia del Agrecano se utilizó la clona (MCA1451) de Serotec (Kidlington, Oxford, GB) y de la Col II (Clona: CIIIC1) del Hybridoma Bank. Los cortes se desparafinaron por 1 h a 56°C, se pasaron por dos cambios de xilol, se rehidrataron con alcoholes graduales con dos cambios de 5 min cada uno y se dejaron 5 min en PBS. Se bloqueó la peroxidasa endógena con dos cambios de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol por 10 min cada uno, cubiertas las laminillas de la luz. Se lavaron con dos cambios de PBS y se bloquearon con una solución de albúmina al 1% en PBS por 20 min y después con esta misma solución se diluyó el anticuerpo 1:50 y se incubaron las laminillas por toda la noche a 4° C.

Al día siguiente se lavaron las laminillas con PBS/Tritón 0.1% y se incubaron por 2 h con el anticuerpo anti-IgG biotinilado (diluido 100 veces en la solución de bloqueo) a 37°C.

Transcurrido el tiempo las laminillas se lavaron tres veces con la solución de PBS/Tritón y se revelaron con el sistema de revelado de diaminobencidina de Dako (Noth America Inc.). Finalmente los núcleos se contratiñeron con hematoxilina de Harris, se deshidrataron y se montaron en resina para ser analizadas y fotografiadas en un microscopio de campo claro (Zeiss, Imager A1, Gottingen, Germany).

Los anticuerpos anti-rata IL-1 $\beta$  (H-153), anti-rata IFN- $\gamma$  (D17) y anti-rata TNF  $\alpha$  (H-156), el p57 (M-20) y el p107 (C18) fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) y se siguió el procedimiento anteriormente descrito para las inmunohistoquímicas. Las laminillas se incubaron toda la noche con los anticuerpos diluidos 1:50 a 4°C.

Para la  $\beta$ -catenina activa se utilizó un anticuerpo monoclonal (Cell Signaling, clona 8E7) y para la  $\beta$ -catenina fosforilada un anticuerpo policlonal (Cell Signaling). Las laminillas se incubaron toda la noche con los anticuerpos diluidos 1:50 a 4°C. Al día siguiente las laminillas fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente (Vector Laboratories, Burlingame, CA) por dos horas a 37°C, posteriormente las laminillas fueron incubadas con el kit Vectastain ABC, (Vector Laboratories, Burlingame, CA), contrastando con hematoxilina, deshidratando con alcoholes etílicos graduales, montando en resina sintética y analizadas bajo el microscopio Zeiss Microscope, Imager A1.



## RESULTADOS

### Fenotipo condral y expresión de Sox-9, Colágena tipo II y de Agrecano.

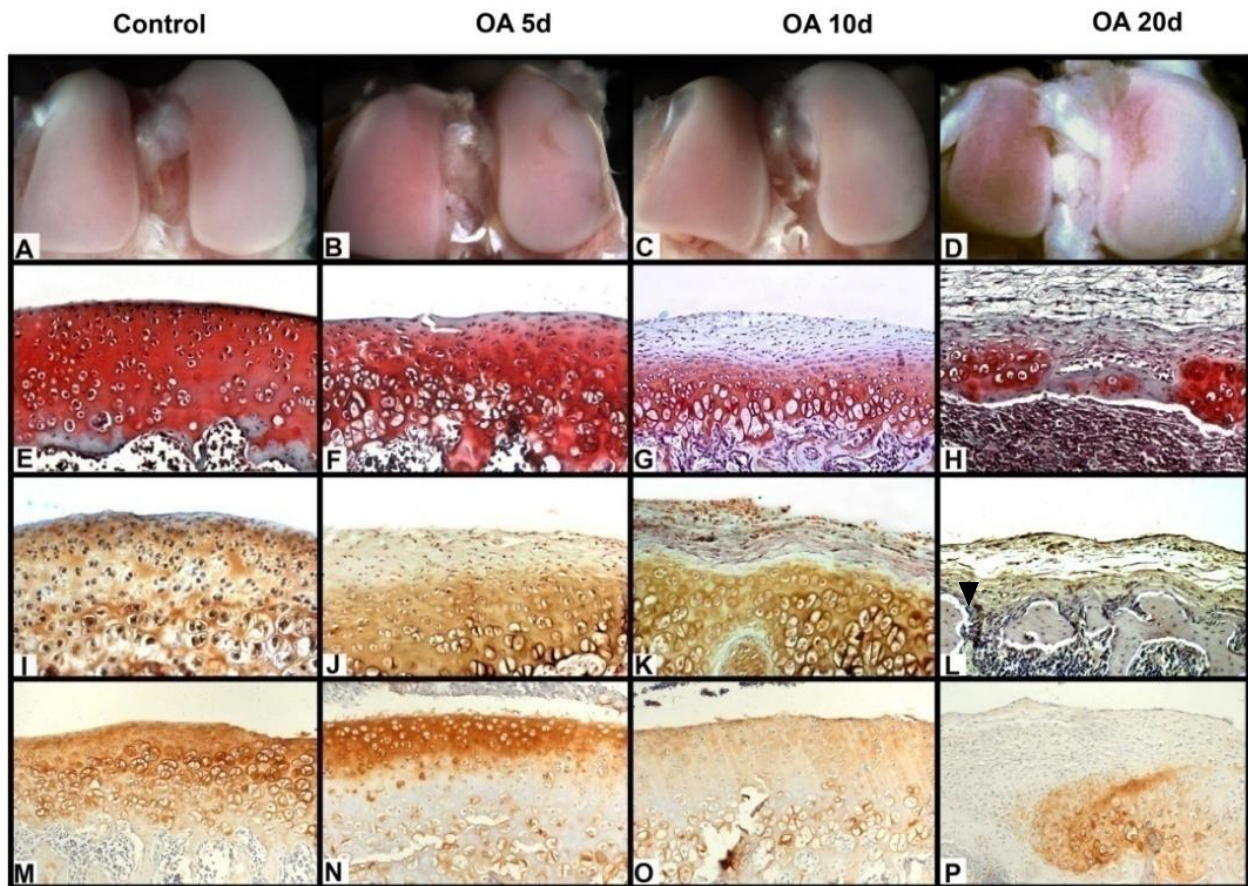
Con la finalidad de analizar el fenotipo celular en el cartílago articular en la evolución de la OA experimental, se realizaron ensayos histoquímicos e inmunohistoquímicos con el fin de establecer una correlación entre la morfología macroscópica y los cambios histológicos observados en la estructura celular y de la MEC.

El cartílago de los cóndilos femorales del grupo control y el del lesionado a los 5 días se observó macroscópicamente blanco, liso y brillante (Figura 19 A y B).

En el cartílago articular del grupo control microscópicamente se observaron las tres zonas típicas del cartílago articular (Figura 19 E), una zona **superficial** con condrocitos aplanados, una de condrocitos más redondos formando nidos condrales indicativos de la zona de **proliferación** o transicional, y una zona **profunda** de prehipertrofia e hipertrófica.

A los 10 y 20 días post-menisectomía (Figura 19 C y D), el cartílago articular era opaco, amarillento y rugoso.

Macroscópicamente no se observaron cambios en la superficie articular a los 5 (Figura 19 B) y 10 días después de inducida la OA (Figura 19 C). Se observó una disminución en la expresión del Agrecano en la zona superficial y en la media (Figura 19 F y J), que correlacionan con el tiempo de evolución de la OA, evidenciado por la pérdida del contenido de proteoglicanos, corroborada por la disminución en la tinción de Safranina O. Se detectó una disminución en la expresión del Agrecano, una de las moléculas más abundantes de la MEC del cartílago tanto a nivel de la proteína (Figura 19 I-L) como a nivel del ARNm (Figura 20 A-D) y que coincide con el incremento en el daño en el cartílago articular caracterizado por la pérdida de la organización de las diferentes zonas que constituyen este tejido articular.



**Figura 19. Pérdida del fenotipo condrocítico asociado a cambios moleculares tempranos en la MEC durante al osteoartritis experimental.** Vista macroscópica de los cóndilos femorales (A-D), tinción de Safranina O (E-H) y expresión proteínica de Agrecano (I-L) y Col II (M-P) en el cartílago normal y el osteoartrítico. El cartílago control del cóndilo medial se observó blanco liso y brillante (A), no se observaron cambios macroscópicos a los 5 días post cirugía (B). A los 10 (C) y 20 días (D) post-menisectomía la superficie del cartílago se observó opaca y rugosa además de mayor grosor. Histológicamente el cartílago hialino mostró pérdida de los proteoglicanos de la matriz extracelular evaluada por la tinción de Safranina O, desde los 5 días post-cirugía (F) y continuó a los 10 (G) y 20 días (H) comparado con el control (E). Los cambios correlacionaron con la disminución en la expresión proteica del Agrecano analizada por inmunohistoquímica (I-L). La Col II se encontró disminuida desde los 5 días post cirugía (N), siendo este decremento en su expresión progresivo y solamente se distinguieron algunas áreas positivas a los 20 días post cirugía (P, señalado con la cabeza de flecha).

Macroscópicamente no se observaron cambios en la superficie articular a los 5 (Figura 19 B) y 10 días después de inducida la OA (Figura 19 C). Histológicamente se observó una disminución en la expresión del Agrecano en la zona superficial y en la media (Figura 19 F y J), que correlacionan con el tiempo de evolución de la OA, evidenciado por la pérdida del contenido de proteoglicanos, corroborada por la disminución en la tinción de Safranina O (Figura 19 F-G). Se detectó una disminución en la expresión del Agrecano, una de las moléculas más abundantes de la MEC del cartílago tanto a nivel de la proteína (Figura 19 I-L) como a nivel del ARNm (Figura 20 A-D) y que coincide con el incremento en el daño en el

cartílago articular caracterizado por la pérdida de la organización de las diferentes zonas que constituyen este tejido articular.

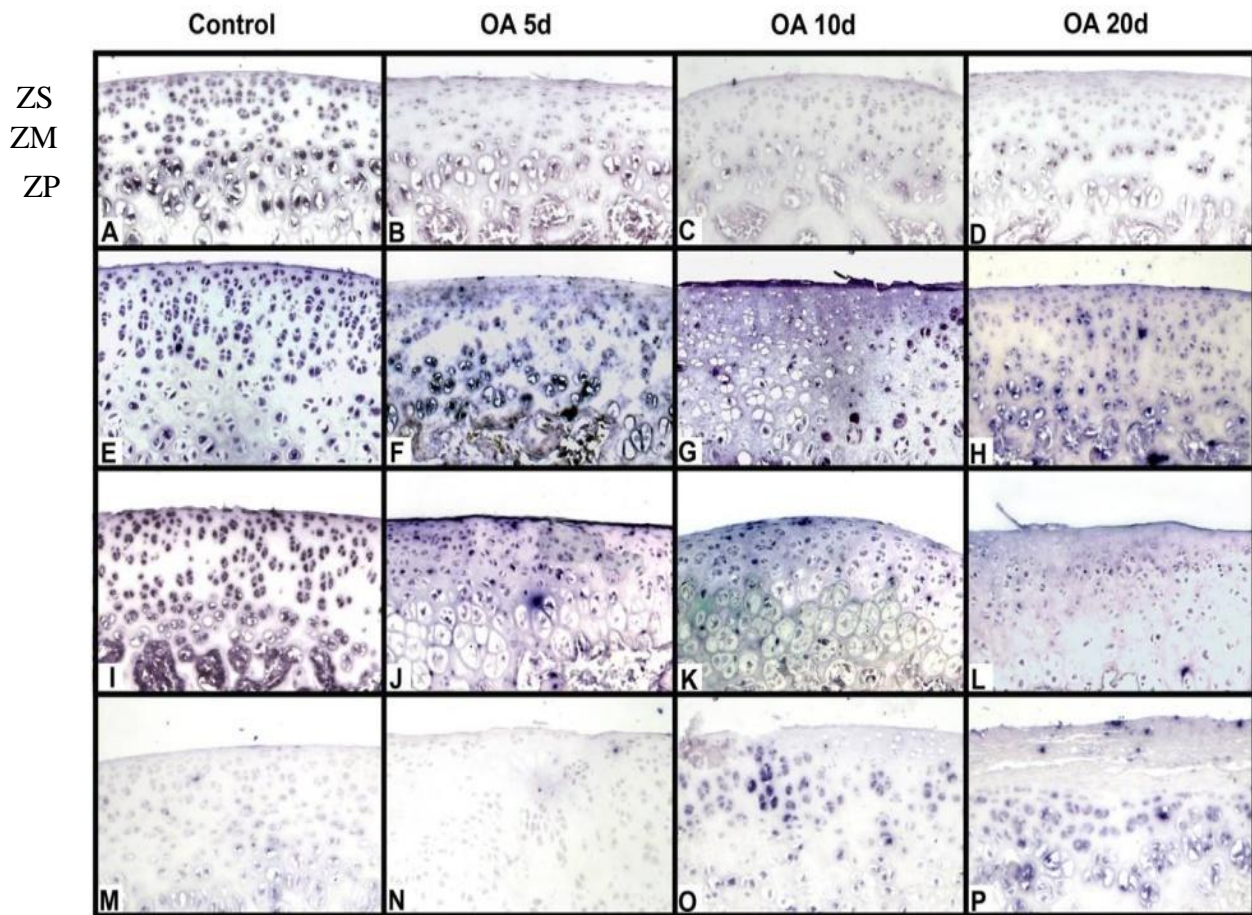
La pérdida del fenotipo cartilaginoso coincidió no solo con la disminución en la expresión del Agrecano (Figura 20 A-D), sino además con la disminución en la expresión de la Col II, tanto a nivel de proteína (Figura 19 M-P) como a nivel del ARNm (Figura 20 E-H) lo que resulta en daño severo en la MEC (Figura 19 y 20) que correlacionó la presencia de tejido fibroso que sustituyó el tejido cartilaginoso y posiblemente en consecuencia un incremento en la síntesis de colágena tipo I. Histológicamente a los 5 días pos-inducción de la OA, se observó desorganización de los condrocitos de la zona superficial y media evidenciada por la presencia de nidos o grupos isogénicos (Figura 19 F). Al avanzar el tiempo de evolución de la lesión, los condrocitos de la capa superficial y media fueron sustituidos por tejido fibroso; a los 20 días pos-lesión, la zona de fibrosis presentó desfibrilación del tejido fibroso, se identificaron todavía algunas áreas con condrocitos, ausencia de PGs y no se distinguieron las zonas características del cartílago articular (Figura 19 G).

El análisis molecular mostró que desde los primeros 5 días posteriores a la inducción de la OA, ocurren una serie de procesos que se ha sugerido están asociados a la desdiferenciación celular del cartílago. Se encontró una disminución de genes regulados por *Sox-9* (16), por lo que se decidió evaluar la expresión de este gen y su relación con el de la *col II* y *col X*.

Los resultados mostraron una disminución en la expresión de *Sox-9* (Figura 20 I-L) desde etapas muy tempranas (5 días) de lesión en el cartílago articular y cuya expresión fue disminuyendo conforme avanzó la lesión siendo evidente su ausencia y asociación con la de Col II en los cóndilos de las ratas osteoarthriticas principalmente en las de 20 días (Figura 19 M-P) osteoarthriticas.

### **Expresión de *colágena X* y maduración del cartílago articular.**

Los resultados mostraron que la expresión de la *colágena X* es mayor en las zonas donde disminuye la expresión génica de *Sox-9*, *col II* y *agrecano*.



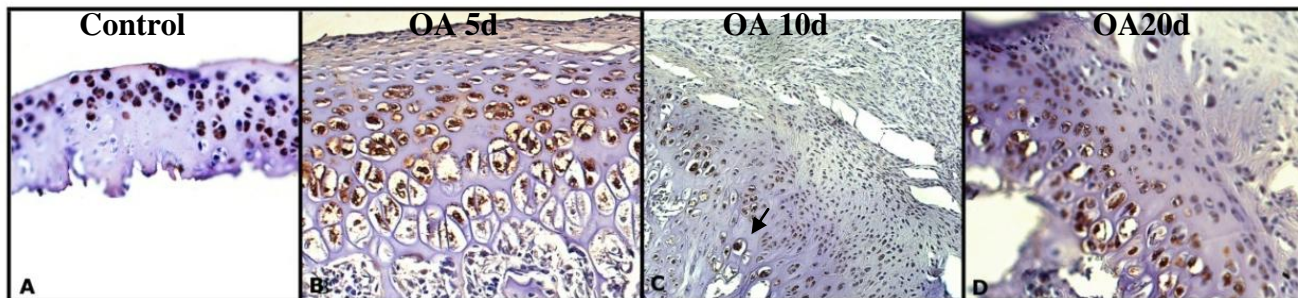
**Figura 20. Maduración condral y su asociación con moléculas características del cartílago articular.** Expresión del ARNm de *agrecano* (A-D), *col II* (E-H), *Sox-9* (I-L), y *col X* (M-P), evaluada por hibridación *in situ*. En el cartílago normal (A, E, I) la expresión del ARNm del *agrecano*, la *col II* y de *Sox 9*, se observa bien definida en la zona superficial (ZS) y la media (ZM). Mientras que la de la *colágena X* presenta un patrón complementario a la de *Sox-9* y *col II*, es decir solo se expresa en la zona de hipertrofia (ZP) y se observa más intensa su expresión en los condilos lesionados a los 10 días post cirugía (O), no solo en la ZP, sino en la ZM a los 20 días post cirugía, lo que podría indicar su presencia temprana en los condrocitos hipertróficos.

La expresión de la *col X* se encontró prácticamente ausente en toda la superficie del cartílago articular y solo fue evidente en la zona de hipertrofia del cartílago normal (Figura 20 M), no se encontró más allá de esta zona a los 5 días pos-inducción de la OA (Figura 20 N), sin embargo a los 10 días (Figura 20 O) y los 20 días (Figura 20 P), posterior a la inducción de la OA, la expresión de esta molécula se detectó más cerca de la cavidad articular, es decir en la zona superficial y en la media (Figura 20 O-P) encontrando una correlación con la pérdida gradual de la expresión de *agrecano* (Figura 20 B-D) *col II* (Figura 20 F-H) y *Sox-9* (Figura 20 J-L) en las ratas osteoartíticas.



## Expresión de los reguladores negativos del ciclo celular p107 y p57<sup>Kip2</sup>.

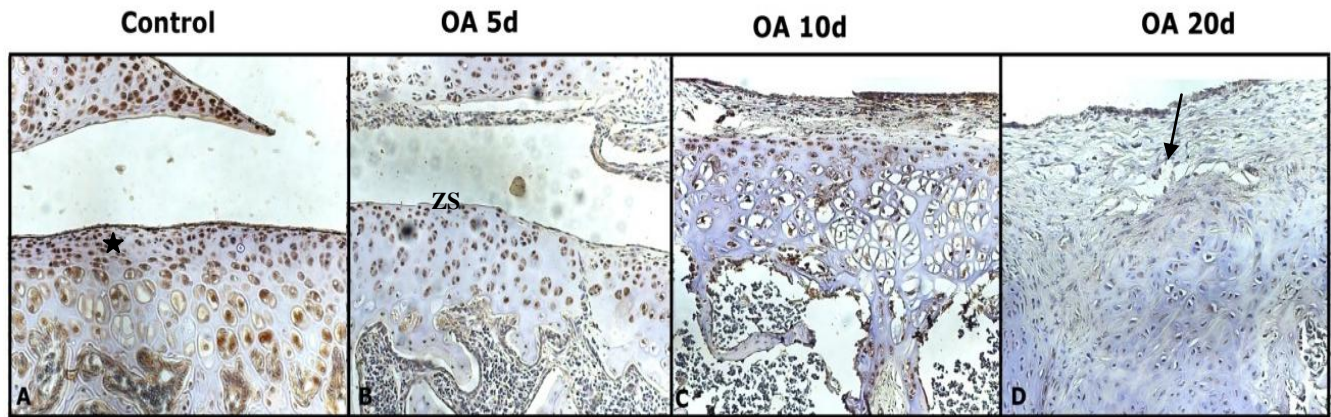
En el cartílago de los cóndilos normales (Figura 20 A) la p107 se encontró expresada intensamente en la zona superficial y en la media, mientras que en los



**Figura 21** La disminución en la expresión de p107 en el cartílago articular osteoartrotico asociada la maduración del cartílago. Expresión evidente en el control (A, 10X) por inmunohistoquímica, conforme se incrementa el daño articular (B-D) observamos más la expresión en la zona media y de pre hipertrofia (B, 20X). Mientras que a los 10 d (C, 10X) en la zona de fibrosis no se observa (flecha).Nota. Se presenta la zona superficial y parte de la media debido a problemas técnicos.

cóndilos osteoartroticos la expresión de p107 se observó disminuida en la zona superficial a los 5 días de inducida la OA pero presente en la zona media y en la de pre-hipertrofia (Figura 21 B). Al avanzar el daño articular en el cartílago hialino disminuyó la expresión de p107 inicialmente en la capa superficial (Figura 21 B), ausente en aquellas muestras en las que se encontró principalmente tejido fibroso de reparación (Figura 21 C, flecha), es decir en las ratas osteoartroticas de 10 y 20 días se observó solo en la zona de hipertrofia, lo que podría sugerir su participación en los procesos de maduración del cartílago articular semejante a los que ocurren durante la osificación endocondral en etapas embrionarias.

Los resultados para p57<sup>kip2</sup> mostraron un incremento en su expresión proteínica a los 5 días posterior a la inducción de la OA desde la zona superficial hasta la profunda analizada por inmunohistoquímica (Figura 22 B). Posteriormente se encontró una disminución en la expresión y que fue directamente proporcional al daño del cartílago articular.



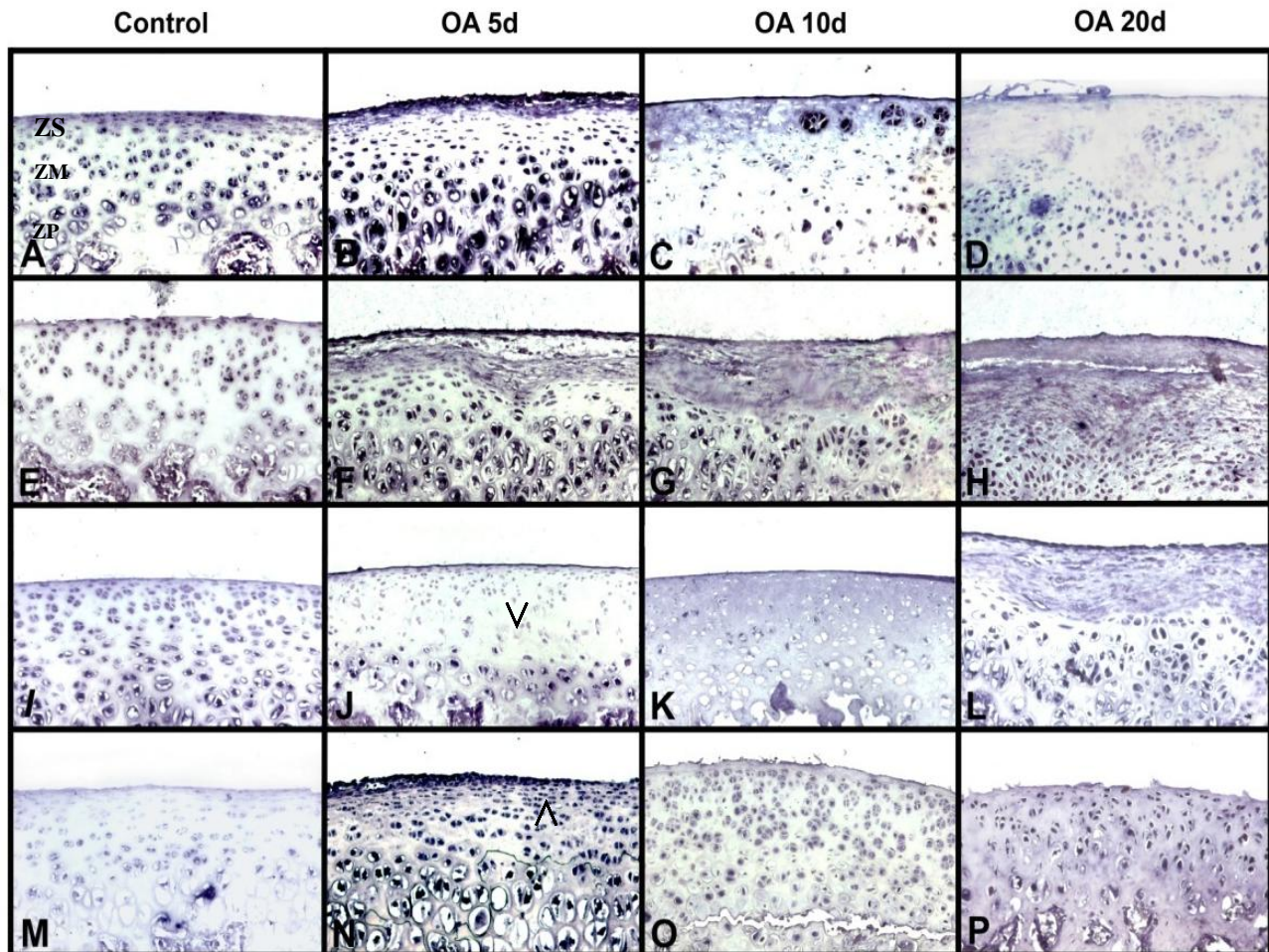
**Figura 22. Disminución en la expresión de p57<sup>kip2</sup> en el cartílago osteoartítico asociada al maduración del cartílago articular.** Mediante el análisis de inmunohistoquímica se encontró expresada p57<sup>kip2</sup> en las tres capas de la superficie articular en el cartílago normal o control, se muestran células positivas (A, ). A los 5 días posterior a la inducción de la osteoartritis solamente se aprecia una mayor intensidad en la expresión proteica en la zona superficial (ZS), (B), la intensidad es menor y mucho más dispersa la distribución entre la zona superficial, media profunda pero no en la de hipertrofia (C). A los 10d, se distinguen células positivas en la zona de hipertrofia, mientras que a los 20 días (D) no hay positividad para p57<sup>kip2</sup> en el tejido de reparación.

En el grupo control se encontraron células positivas principalmente en la zona superficial, aunque también se observó una intensidad cualitativamente menor en la de pre-hipertrofia (Figura 22 A). Esta expresión disminuyó en los cóndilos de las ratas osteoartíticas de 5 días (Figura 22 B), en las de 10 días pos-inducción de la OA (Figura 22 C) y se encontró que p57<sup>kip2</sup> estuvo completamente ausente en el tejido fibroso (Figura 22 D, flecha) que sustituyó al cartílago articular.



## Expresión de *Wnt-5a*, *Wnt-5b*, *Wnt-16* y *Wnt-4*.

Los resultados mostraron expresión del ARNm para *Wnt-5a* en toda la superficie articular en el grupo control (Figura 23 A), una disminución en la expresión de *Wnt-5a* (Figura 23 B-D) relacionada con el tiempo de evolución de la OA.



**Figura 23.** La disminución en la expresión de *Wnt-5a* (A-D), *Wnt-5b* (E-H), *Wnt-16* (I-L) y la sobreexpresión de *Wnt-4* (M-P) en la osteoartritis experimental. En el cartilago osteoarthritico se observó una disminución en la expresión de *Wnt-5a* (B-D) y *Wnt-5b* (F-H) a los 5, y 10 días en el cartilago dañado (C y G) y en los de 20 días post-inducción de la OA, cuando se comparó con los controles (A y E). La expresión de *Wnt-16* (I-L) también se encontró disminuida ( V ) al haber un mayor daño en la superficie articular estando completamente ausente a los 20 d OA (L). Hubo un incremento ( A ) en la expresión de *Wnt-4* (N-O), siendo más evidente a los 5 días post inducción de la OA (N) encontrándose la expresión de este factor de crecimiento en todo el espesor articular a los diferentes tiempos de evolución del daño articular comparado con el control (M).

A los 5 días posteriores a la inducción de la OA se observó una disminución en la expresión de *Wnt-5a* en la zona superficial (Figura 23 B) y solamente se encontró expresada

en algunos grupos isogénicos en las ratas osteoarthríticas de 10d (Figura 23 C), mientras que en las de 20 días se observó su expresión solamente en los remanentes de tejido cartilaginoso y estuvo ausente en la zona de fibrosis (Figura 23 D).

La expresión del *Wnt-5b* en el grupo control se encontró principalmente en la zona media y en la superficial (Figura 23 E), cuando se observó daño articular con fibrosis superficial en las ratas osteoarthríticas de 5 días (Figura 23 F), la expresión se localizó principalmente en la zona media y en la de hipertrofia, mientras que a los 10 días (Figura 23 G) solo se encontró en la zona de prehipertrofia e hipertrofia, patrón semejante al encontrado a los 20 días (Figura 23 H) posterior a la inducción de la OA.

El patrón de expresión de *Wnt-16* se observó en el grupo control desde la capa superficial hasta la profunda (Figura 23 I) y fue disminuyendo su expresión de manera directamente proporcional conforme se presentaba el daño en el cartílago articular de los cóndilos osteoarthríticos (Figura 23 J-L). Los cartílagos de las ratas osteoarthríticas de 5 días expresaron *Wnt-16* en la zona de prehipertrofia e hipertrofia (Figura 23 J), mientras que estuvo prácticamente ausente en el cartílago a los 10 días (Figura 23 K), y a los 20 días (Figura 23 L) se observó principalmente en la zona profunda del cartílago articular.

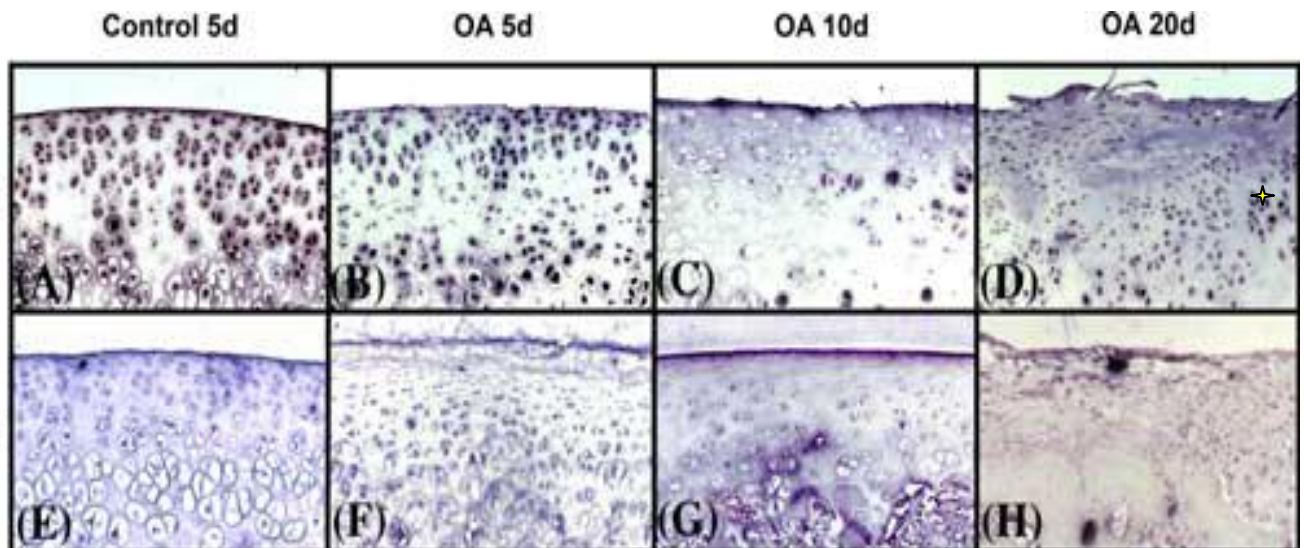
Se encontró un incremento en la expresión de *Wnt-4* en las tres zonas del cartílago articular de las rodillas osteoarthríticas (Figura 23 N-P) comparada con el control (Figura 23 M), no se observó la expresión de este factor de crecimiento tanto que en la zona superficial como en la media. Sin embargo, cuando se observó mayor daño en el cartílago articular, representado por la pérdida de la estructura propia del cartílago y directamente relacionado con el tiempo de evolución de la lesión, se observó un incremento en la expresión de *Wnt-4*, siendo la máxima expresión observada a los 5 días después de la inducción de la OA (Figura 23 N), se presentó con menor intensidad a los 10 días (Figura 23 O) y todavía se observó expresión del *Wnt-4* a los 20 días (Figura 23 P) del desarrollo de la OA.

### **Disminución en la expresión de *Wnt-7b* y *Wnt-9a* en el cartílago articular osteoarthrítico.**

Se evaluó la expresión de *Wnt-7b* y *Wnt-9a* desde los 5 hasta los 20 días post-inducción de la OA y se encontró que la expresión de *Wnt-7b* disminuyó desde los 5 días post cirugía (Figura 24 B) siendo menor a los 10 días (Figura 24 C) y casi ausente a los 20



días post-inducción (Figura 24 D), encontrándose en este tiempo solamente expresado en aquellas células que podrían corresponder a osteoblastos.



**Figura 24. Cambios en la expresión de *Wnt-7b* (A-D) y *Wnt-9a* (E-H) en el cartílago articular de rata con en la osteoartritis experimental.** Los cortes histológicos analizados por hibridación *in situ* muestran la expresión de *Wnt-7-b* y *Wnt-9a* en el cartílago normal (A) se distingue la expresión tanto en la capa superficial como en la media y la profunda de la superficie articular de *Wnt7-b* mientras que de *Wnt-9a*, (E) solo se distinguen algunas células positivas. Las figuras B y C, muestran una disminución en la expresión de *Wnt7-b* a los 5 y 10 días después de la inducción de la OA y a los 20 días se observó nuevamente expresión del ARN mensajero en las células semejantes a los osteoblastos (D). Se encontró una disminución en la expresión de *Wnt-9a* a los 5 días (F), 10 días (G) y 20 días (H), post inducción de la OA en todas las zonas del cartílago articular.

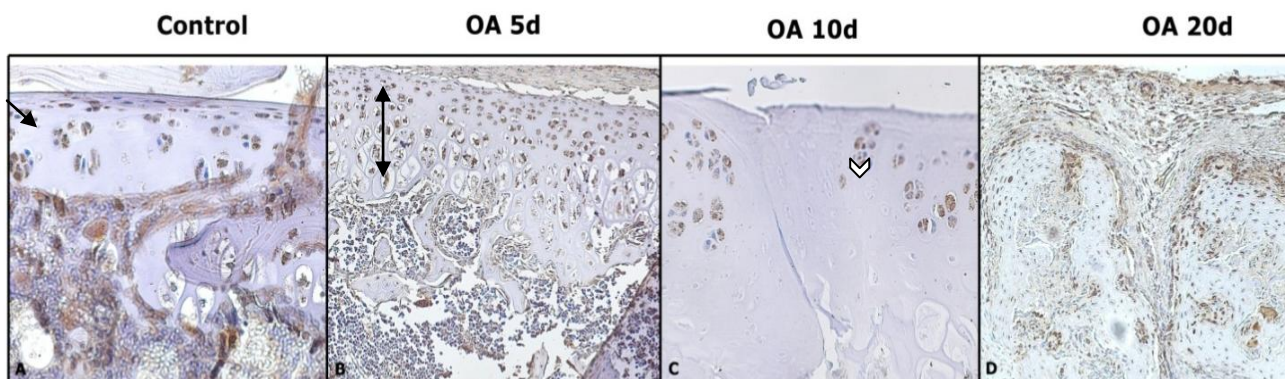
En lo que se refiere al *Wnt-9a*, también se observó una disminución en su expresión en toda la superficie del cartílago articular, desde el día 5 (Figura 24 F) hasta el 20 (Figura 24 H) cuando se comparó con cartílagos controles (Figura 24 E-H).

### **Expresión de la $\beta$ catenina en la osteoartritis experimental.**

Se sabe que la señalización Wnt/ $\beta$  catenina es crítica para la inducción, del cartílago, así como para el mantenimiento de las estructuras esqueléticas y que las mutaciones en la señalización Wnt por la vía la  $\beta$ -catenina lleva a un incremento en la osificación endocondral. Por tales razones se analizó la expresión de la  $\beta$ -catenina no activa (fosforilada) así como activa (no fosforilada) mediante inmunohistoquímica.

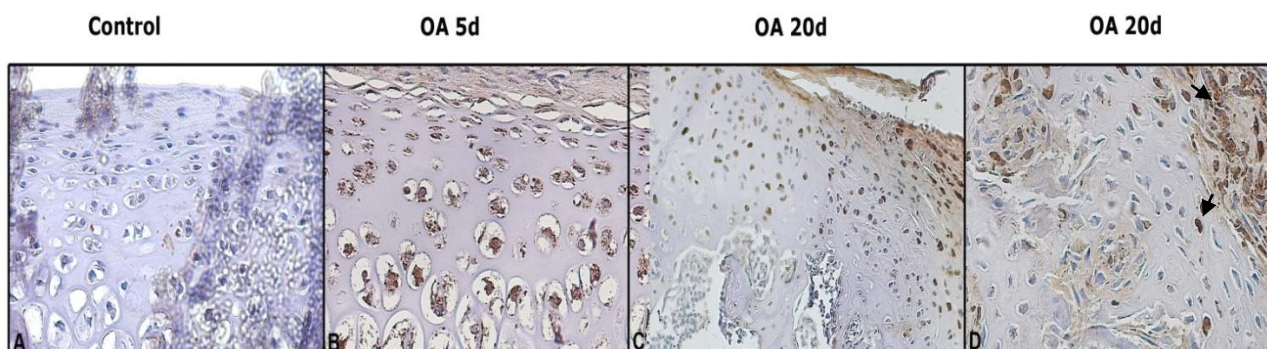
Los resultados mostraron un incremento de la  $\beta$ -catenina no activa a los 5 días post inducción de la OA en la zona superficial, media y profunda del cartílago articular lesionado

(Figura 25 B), se encontraron células positivas hasta los 10 días en la zona superficial solamente en los condrocitos remanentes (Figura 25 C), y a los 20 días (Figura 25 D) solo se observan algunas células positivas dentro del tejido fibroso de reparación en la zona de mayor lesión (Figura 25 D).



**Figura 25. Incremento en la expresión de  $\beta$ -Catenina no activa.** A) Se distingue la expresión en el cartilago control principalmente en la zona superficial ( ). B) expresión de la beta catenina desde la zona superficial ( ) hasta la hipertrófica a los 5 días de lesión. C) en los cartilagos de las ratas osteoartríticas de 10 días se observan escasos condrocitos positivos ( ) y D) solamente en las células remanentes entre la fibrosis en el cartilago a los 20 días post-inducción.

En cuanto a la  $\beta$ -catenina activa en el cartilago sano está ausente (Figura 26 A), cuando se observó daño en la superficie articular indicado por la fibrosis, hubo un incremento de esta molécula en la zona superficial media y que llego hasta los condrocitos hipertróficos (Figura 26 B). Solo quedando algunos sitios positivos a los 10 días (no mostrados) cuya expresión es complementaria a la beta catenina fosforilada, mientras que a los 20 días se observan escasas áreas positivas y que a mayor aumento (Figura 26 D) parecen corresponder a los condrocitos remanentes (flechas) atrapados entre el tejido fibroso.



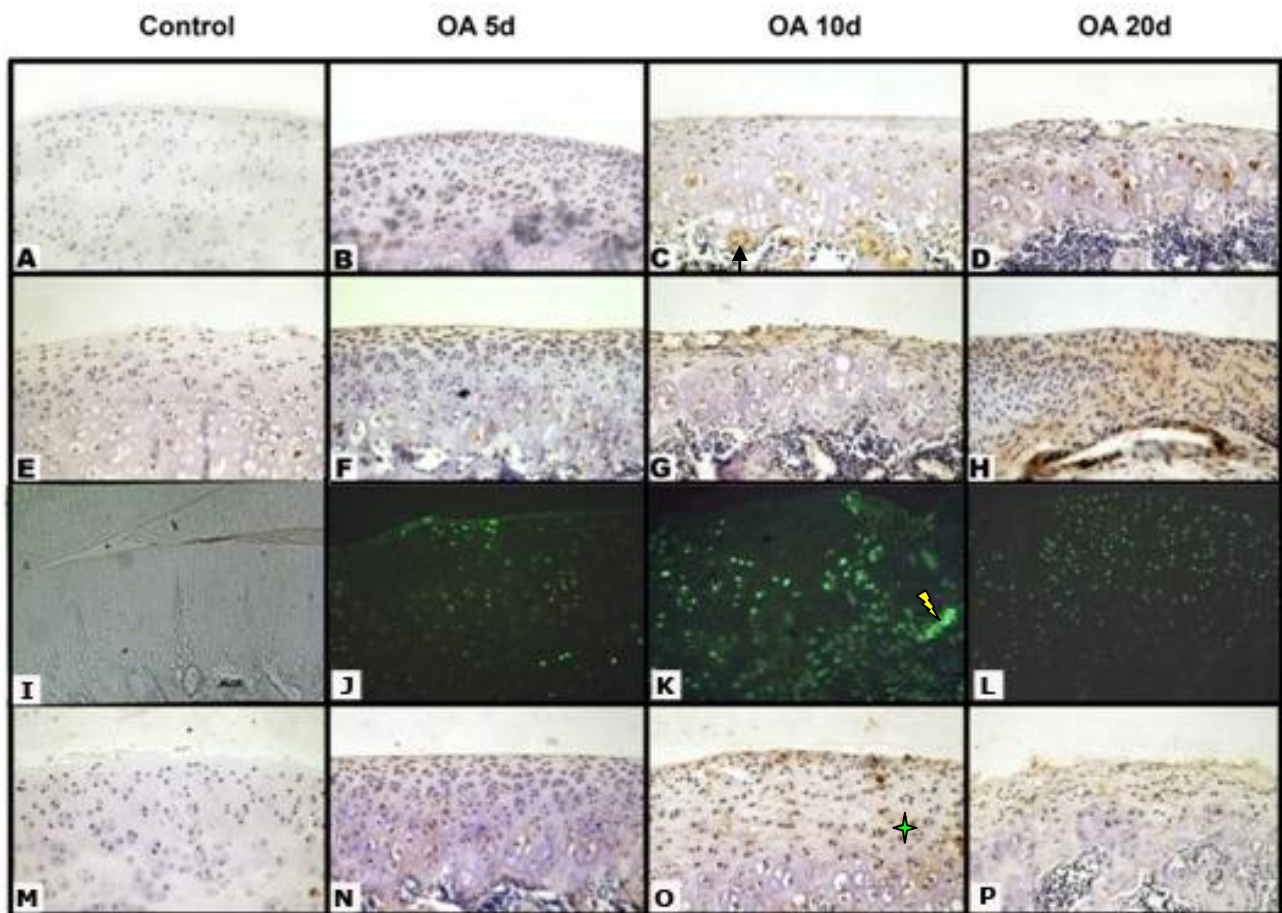
**Figura 26. Expresión de Beta catenina activa en la osteoartritis asociada a la maduración condral.** Los resultados mostraron A) ausencia la expresión de  $\beta$  catenina activa en el grupo control; B) un incremento a los 5 días después de la inducción de la OA, quedando solo nidos celulares positivos a los 10 (no mostrados) y 20 días, C) y que a mayor aumento D) se pueden distinguir algunos núcleos positivos( ).



## Expresión proteínica de citocinas pro-inflamatorias y apoptosis.

Debido a que las citocinas pro-inflamatorias tienen participación en la síntesis de moléculas relacionadas con la degradación de la matriz así como en la apoptosis, se analizó la expresión proteica de la IL-1 $\beta$ , el TNF $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  a los diferentes tiempos de daño articular mediante inmunohistoquímica para las citocinas y por TUNEL para la apoptosis

Se observó en el cartílago dañado una expresión mayor de IL-1 $\beta$  desde los 5 días (Figura 27 B) posteriores a la inducción de la OA cuando se comparó con el control (Figura 27 A) y que fue más evidente a partir de los 10 días post-cirugía, (Figura 27 C) y estuvo presente de manera intensa pero solo en algunas zonas en el cartílago de los cóndilos de las ratas osteoarthríticas de 20 días.



**Figura 27. El incremento en la expresión proteica de IL-1 $\beta$  (A-D), TNF- $\alpha$  (E-H), e IFN- $\gamma$  (M-P) y muerte celular TUNEL (I-L) en el modelo de osteoartritis experimental progresiva.** Se observa incremento ( ) en la expresión de IL-1 $\beta$  (B-D), mediante inmunohistoquímica cuando se compara con los controles (A), TNF- $\alpha$  (F-G) se encontró expresado desde los 5 días post-cirugía (F). Esos cambios coinciden con el incremento en el número de células apoptóticas conforme se observa mayor daño articular ( J-L), así como también con el incremento en la expresión de IFN- $\gamma$  en los 5 y 10 días ( ) post inducción de la OA.

El TNF- $\alpha$  mostró una menor expresión a los 5 días post-inducción de la OA (Figura 27 F) mayor en las de 10 días (Figura 27 G) y células positivas en la zona de hipertrofia en las ratas osteoarthríticas de 20 días (Figura 27 H).

Al ser la IL-1 $\beta$  y el TNF $\alpha$  citocinas proinflamatorias inductoras de moléculas que provocan daño en la MEC y muerte celular se evaluó la muerte celular, por apoptosis mediante la técnica de TUNEL. En el cartílago articular sano, no se observaron células muertas (Figura 27 I) mientras que se encontraron células apoptóticas desde los 5 días post-inducción de la OA principalmente en la zona superficial que correspondió al área de mayor daño articular (Figura 27 J), incrementándose a los 10 días en donde se observaron células muertas en la zona superficial, la media y la profunda (Figura 27 K), mientras que el mayor número de células apoptóticas se observó a los 20 días post-inducción de la OA (Figura 27 L), en todas las zonas del cartílago articular.

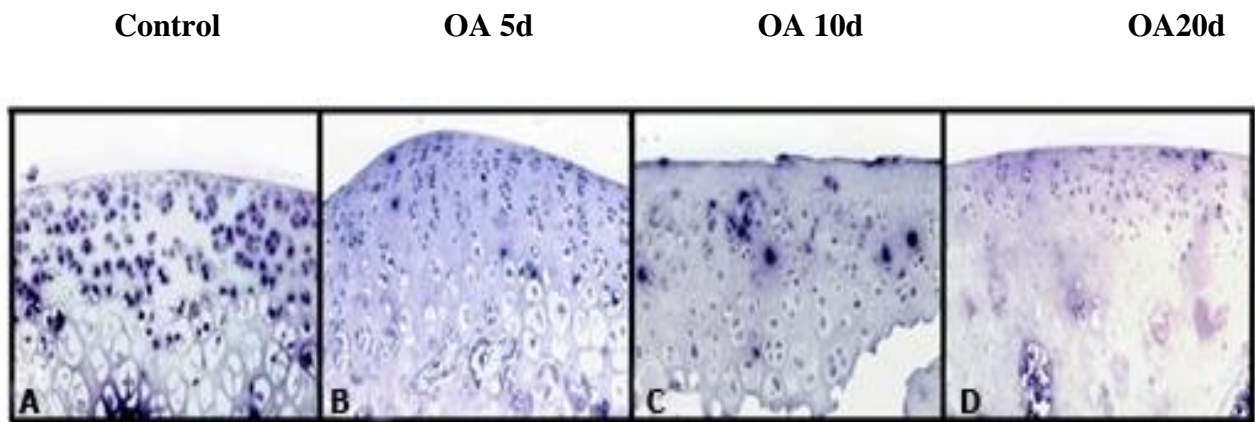
Debido a que el INF- $\gamma$  se ha reportado como un regulador de las citocinas proinflamatorias se evaluó su expresión mediante inmunohistoquímica y lo que se observó fue que su expresión se inició a los 5 días de inducción de la OA (Figura 27 N), por parte de los condrocitos de la zona superficial hasta la profunda (Figura 27 N-O), observándose mayor expresión proteica en la zona media a los 10 días post-cirugía (Figura 27 O) y decayendo a los 20 días post inducción de la OA (Figura 27 P), mientras que en el cartílago normal estuvo ausente (Figura 27 M).

### **Disminución en la expresión del ARNm de *Mig-6*.**

Debido a que diferentes genes han sido implicados en el desarrollo de la OA y que un reporte en la literatura mostró que la ausencia en la expresión de este gen resulta en el desarrollo de una patología semejante a la OA (130), se propuso analizar en este trabajo la expresión del *Mig-6* en los diferentes estadios de la enfermedad en este modelo animal, analizando su expresión mediante hibridación *in situ*.

En esta tesis se demostró la expresión de *Mig-6* en las tres zonas características de la superficie articular (Figura 28 A) en los animales controles y que la expresión en los animales osteoarthríticos (Figura 28 B-D) disminuyó conforme se incrementó el daño articular, siendo gradual su desaparición a los 5 días (Figura 28 B) con menor expresión a los 10 días

(Figura 28 C) y casi ausente a los 20 días post-menisectomía (Figura 28 D) a todo lo ancho de la superficie articular.



**Figura 28. Disminución en la expresión del ARNm de *Mig-6*.** Por hibridación *in situ* se demuestra la expresión del mensajero en el cartílago articular normal A) y se distingue su disminución progresiva conforme se incrementa el daño en la superficie articular, desde los 5 días post menisectomía B), disminuyendo progresivamente a los 10 días C) y se observó una expresión mínima a los 20 días D) en el remante de cartílago.

## **Discusión.**

Los modelos animales se han utilizado para ayudar a entender la patogénesis de diferentes enfermedades, entre ellas la osteoartritis. Los cambios bioquímicos observados en la OA de rodilla en humanos, tales como la pérdida de PG por proteinasas, los cambios en el fenotipo de los condrocitos y la formación de osteofitos, pueden también ser observados en algunos modelos murinos.

En esta tesis se demostró la participación de moléculas Wnt relacionadas con la osificación endocondral en un modelo experimental de osteoartritis y se estableció su correlación con los marcadores relacionados con los procesos de diferenciación y maduración condral.

Aunque se han propuesto diferentes teorías para establecer la patogénesis de la OA, existe una amplia controversia por determinar cuáles son los eventos que desencadenan el proceso de degeneración articular. Algunos estudios en modelos animales sugieren que los cambios en el cartílago son los que inician el proceso degenerativo, mientras que otros sugieren que los que se presentan en el hueso subcondral son los iniciadores (138).

Entre los cambios más importantes encontrados en el cartílago articular osteoartítico se reportan, en las etapas tempranas de la enfermedad, un incremento en la proliferación celular así como en la muerte celular por apoptosis; cambios en la actividad sintética y en la tasa degradación de la MEC, lo que se traduce como un incremento en la síntesis de la Col IIA y del agrecano (89), aunque paradójicamente también se pierde agrecano como un rasgo característico de la OA temprana en humanos, mientras que la degradación de la colágena se presenta durante toda la enfermedad (99).

### **La disminución en la expresión de Sox 9, Col II y de Agrecano está asociada a la pérdida del fenotipo condral.**

Se encontró desde etapas muy tempranas de lesión articular, una disminución en la expresión génica y proteínica de la colágena II y del agrecano, y aunque estos cambios coinciden con los reportes de la literatura, debido a que esta tesis se realizó a tiempos tempranos de la lesión articular, no se observaron cambios en el cartílago articular que reflejará un incremento o pérdida del volumen de la superficie articular indicativo de destrucción de la matriz extracelular tal como se observó en este trabajo. De manera

interesante se observó una disminución en la expresión del ARNm del Sox-9, que se interpretó como un cambio molecular asociado a la desdiferenciación celular y no con los procesos inflamatorios. Lo anterior se basa en el hecho de que estudios bioquímicos han demostrado que Sox-9 regula directamente la expresión de la *col II* y *agrecano* y Sox-9 juega un papel muy importante durante la condrogénesis (17). En el 2000 Akiyama reportó que la inactivación de Sox-9 después de la formación de las condensaciones mesenquimáticas, da como resultado la inhibición de la transición de los condrocitos en proliferación a condrocitos hipertróficos en la placa de crecimiento. Así como también ha sido estudiado que condrocitos articulares transfectados con un adenoviral que induce la expresión de este factor de transcripción en cultivos celulares de condrocitos osteoartíticos, logran que las células aumenten la expresión de Col II (139)

**El incremento en la expresión de *col X* está asociado a la maduración del cartílago articular.**

La expresión de la Col X es considerada como un marcador específico del proceso de hipertrofia del cartílago hipertrófico (140). En el cartílago articular normal la tasa de maduración es muy baja, por lo que la expresión de *col X* también lo es. En contraste en el presente estudio se observó un mayor número de células positivas al ARNm para la *col X* conforme se incrementó el daño en la MEC en el cartílago osteoartítico, sugiriendo que durante la pérdida del fenotipo condral se disparan una serie de señalizaciones que promueven la maduración del cartílago.

**El incremento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias correlaciona con la apoptosis asociado al daño articular.**

El daño a la MEC, es decir la pérdida de la Col II y del Agrecano entre otras moléculas en la OA, se ha postulado que es provocado por la acción tanto de las agrecanasas (ADAMTS), como de las metaloproteinasas (MMPs, -1,-2,-3,-8,-13,) (115, 116) así como por su interacción con las citocinas proinflamatorias, sugiriendo un componente inflamatorio en la inducción de la OA.

En esta tesis se encontró que los eventos relacionados con la acción de las citocinas proinflamatorias ocurren hasta los 10 días después de iniciada la inducción de la enfermedad, lo que sugiere que esta enfermedad, no inicia como un proceso inflamatorio,



sino como un evento relacionado con la de maduración del cartílago, que nos recuerdan lo ocurrido durante la osificación endocondral, donde las Wnt y la  $\beta$ -catenina son reguladores importantes de este proceso (ver más adelante).

Entre las citocinas proinflamatorias más estudiadas en la OA se encuentran la IL-1 $\beta$ , el TNF $\alpha$  y el IFN $\gamma$  (111, 112). Se sabe que la IL-1 $\beta$  activa los genes de las MMPs (116) y que junto con el TNF- $\alpha$  promueven el incremento en la síntesis de las MMPs, este último además suprime la síntesis de la Col II e incrementa la de Col I (118), lo que explicaría la presencia de tejido fibroso en las etapas tardías de lesión en este modelo de OA, ya que la expresión de esta citocina se observó hasta que ya había lesión aparente en la superficie articular y posterior a los cambios moleculares involucrados en la osificación endocondral

El daño a la MEC se ha propuesto que está asociado a la acción de diferentes enzimas inducidas por las citocinas proinflamatorias, (112) y no es sino hasta recientemente que la señalización por la vía de la  $\beta$  catenina también se ha considerado en este proceso y que se discutirá más adelante.

En esta tesis se observó apoptosis desde los 5 días después de inducida la OA en los condrocitos de la capa superficial. Este proceso lo asociamos a la presencia inicial de TNF- $\alpha$  y no de la IL-1 $\beta$  que se observa hasta los 10 días, aunque no se descarta que la IL-1 $\beta$  proveniente de la sinovia tenga un efecto sobre el cartílago superficial para inducir apoptosis.

Como se señaló anteriormente, además de los procesos de daño en la superficie articular, también se ha reportado daño en el hueso subcondral. En esta tesis se estudió la expresión proteínica de IFN- $\gamma$  y lo que se encontró fue la presencia de esta proteína desde los 5 días y con mayor intensidad a los 10 días de inducida la OA. En la literatura se sugiere que esta citocina promueve la osteoclastogénesis mediante la expresión de RANKL. También se ha reportado que el IFN- $\gamma$  y la IL-1 $\beta$  estimulan la producción de NO, PGE2, ILRa y al igual que el IFN- $\gamma$  y el TNF $\alpha$  inhiben la síntesis de PG (126).

**La disminución en la expresión de *Wnt-5a*, *Wnt-5b* y el incremento en la de *Wnt-4*, semeja los procesos de maduración condral observados en la osificación endocondral.**

Si bien la osificación endocondral es un proceso en el cual todavía no están bien establecidos todos los factores que intervienen en ella, si se conocen varios de los involucrados en el desarrollo del hueso. Se sabe que en la osificación endocondral se forma un molde cartilaginoso en donde se encuentran los condrocitos en proliferación y que algunos finalmente se hipertrofian, mueren, y son reemplazados por osteoblastos provenientes del pericondrio. Durante este proceso se expresan proteínas típicas de la hipertrofia activándose genes como los Wnt que marcan el proceso de maduración condral (141).

En esta tesis se analizó la expresión de los genes *Wnt-4*, *el Wnt-5a* y *Wnt- 5b* en un modelo progresivo de OA. Se sabe por la literatura que estos genes están involucrados en los procesos de maduración del cartílago en la placa de crecimiento durante la esqueletogénesis. El análisis de estas moléculas en este modelo de OA, sugieren que estos genes Wnt están asociados a la maduración del cartílago de una manera que nos recuerda su participación en la osificación endocondral.

La disminución en la expresión del ARNm de *Wnt-5a*, *Wnt-5b* que se observó en el cartílago osteoartrítico de las ratas analizadas en esta tesis podría explicar la maduración del cartílago articular de una manera semejante al que se observa en la placa de crecimiento durante la osificación endocondral. Se ha reportado que *Wnt-5a*, se expresa en pericondrio y que la sobreexpresión provoca un retraso en la transición de condrocitos pre-hipertróficos a hipertróficos lo que resulta en un retraso moderado de la osificación. Por otro lado, su ausencia lleva a la hipertrofia del cartílago (26, 70).

Además, resultados similares se observan cuando *Wnt-4* se incrementa durante la osificación endocondral. En lo que se refiere a la expresión elevada de *Wnt-4* y la disminución de *Wnt-5a* y *Wnt-5b* en el modelo de OA estudiado en el presente trabajo estos resultados nos permiten proponer que los cambios iniciales en la expresión de *Sox-9*, *col II*,

*agrecano* y *col X* están asociados a la maduración del cartílago, tal vez inducidos por cambios en la expresión de los Wnt mencionados anteriormente.

**La hipertrofia del cartílago articular evidenciada por el incremento en la expresión de Col X, coinciden con la disminución en la expresión de la p107 y la p57Kip<sup>2</sup> y semeja los procesos de maduración que ocurren en la osificación endocondral.**

Hasta el momento no se ha reportado la expresión proteínica de estos inhibidores del ciclo celular en la OA.

En la osteoartritis se presenta una fase de proliferación y desdiferenciación celular, por lo que con la idea de estudiar estos procesos regulados por inhibidores de las ciclinas y relacionados con la osificación endocondral se estudió la expresión proteínica de la p107 y la p57<sup>Kip2</sup> mediante inmunohistoquímica.

Otro evento importante asociado con la maduración del cartílago es que, para que los condrocitos en proliferación pasen a la hipertrofia deben de activarse algunos genes. Se sabe que p107 y el p57<sup>kip2</sup> son reguladores importantes de este proceso. Se ha reportado que en ausencia de ellos la hipertrofia se retrasa de manera importante (37). En el presente estudio observamos un incremento en la expresión de p107 y p57<sup>kip2</sup> lo que nos permite proponer que este aumento conduce a la hipertrofia en este modelo experimental de OA. Estos resultados refuerzan la idea de que la OA recapitula algunos de los eventos que se presentan en la osificación endocondral. Lo anterior reforzado por el hecho de que Runx2 es el único factor de transcripción necesario para la hipertrofia de los condrocitos y es regulado por p107 y p130 quienes coordinan el arresto celular en los condrocitos (37).

**La disminución en la expresión de *Wnt-7b* y *Wnt-9a* en el cartílago articular osteoartrítico estar relacionada con los procesos de maduración del cartílago articular.**

Debido a la participación de *Wnt-7b* en la diferenciación de los osteoblastos y de *Wnt-9a* en el desarrollo de la articulación embrionaria se analizó su expresión mediante hibridación *in situ* en este modelo experimental.

Se ha reportado que para que el cartílago articular se mantenga como tal, es necesaria la participación de algunos factores entre los cuales se encuentra *Wnt-9a*. Se ha observado que los ratones *Wnt-9a*<sup>-/-</sup> muestran acortamiento de las extremidades, sugiriendo

que *Wnt-9a* probablemente regula la maduración del cartílago a través de *Ihh*. También se ha propuesto que tanto *Wnt-9a* como *Wnt-4* son reguladores de la maduración del cartílago (142) ya que los dobles mutantes muestran un retardo en la maduración de los condrocitos. Por lo que en esta tesis se evaluó su expresión. Lo que se encontró fue una disminución progresiva de la expresión de *Wnt-9a* dependiente de la lesión, lo que nos permite plantear que en la OA, tanto *Wnt-9a* como *Wnt-4* son reguladores positivos de la maduración del cartílago.

Se han reportado también cambios en el hueso subcondral durante la OA, por lo que en esta tesis se analizó la expresión de *Wnt-7b* relacionada con el daño articular, como un marcador de osteoblastos. Lo que se apreció fue que a los 5 y 10 días después de inducida la OA su expresión disminuyó mientras que a los 20 días cuando ya no se observa cartílago articular, se volvió a observar su expresión pero en células que nos podrían sugerir un fenotipo osteoblástico, dándonos la pauta para proponer que en la OA, los cambios ocurren primero en el cartílago y posteriormente en el hueso y que varios de los procesos de formación de hueso *de novo* están asociados a los procesos de maduración presentes en la osificación endocondral.

### **Incremento en la expresión de la $\beta$ -catenina en la osteoartritis relacionado con la osificación endocondral.**

Se sabe que la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina es crítica para la inducción, del cartílago así como para el mantenimiento de las estructuras esqueléticas y que las mutaciones en la señalización Wnt vía la  $\beta$ -catenina llevan a un incremento en la osificación endocondral. Por ello es que se analizó la expresión de la  $\beta$ -catenina no activa (fosforilada) así como activa (no fosforilada) mediante inmunohistoquímica.

La señalización Wnt en la maduración del cartílago ocurre por dos vías: la canónica y la no canónica. En este estudio se evaluó la expresión de la  $\beta$ -catenina en su forma activa e inactiva y se observó que la vía canónica está involucrada en la patología de la OA. Se sabe que la  $\beta$ -catenina interactúa directamente con Sox-9, inhibiendo su función y entonces favorece la hipertrofia o la inhibición de la diferenciación del cartílago, situación que depende de la etapa de diferenciación del cartílago (143). En este estudio de acuerdo al patrón de expresión de la  $\beta$ -catenina no fosforilada que refleja a la  $\beta$ -catenina activada por los ligandos de Wnt, sugerimos que los efectos en la maduración del cartílago, probablemente inducidos

por *Wnt-4*, sean dependientes de la  $\beta$ -catenina. Por otro lado, la  $\beta$ -catenina fosforilada que refleja la ausencia de señalización Wnt está más asociada con la formación de osteofitos y fibrosis.

Por otro lado, también se ha reportado que la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina promueve el catabolismo de la MEC (144). En el modelo de OA de esta tesis se observó que la disminución en la expresión de las proteínas de la MEC correlaciona con los patrones de expresión de la  $\beta$ -catenina activa por lo que se sugiere que la señalización Wnt pueda ser un mecanismo tal que los condrocitos respondan activando las MMPs y ADAMTs de manera semejante a como lo hacen las citocinas inflamatorias (147).

### **La disminución en la expresión de *Mig-6* está asociada al daño articular en la OA.**

Se sabe que la OA es un padecimiento multifactorial, en donde como se ha mostrado, participan tanto los procesos de desdiferenciación como los inflamatorios y de maduración de los condrocitos. También se ha propuesto la participación de varios genes en la patogénesis de esta enfermedad.

Debido a que diferentes genes han sido implicados en el desarrollo de la OA y que un reporte en la literatura mostró que la supresión de la expresión de *Mig-6* en ratones knock-out lleva al desarrollo de una enfermedad semejante a la OA (130), se propuso analizar en este trabajo la expresión del *Mig-6* en los diferentes estadios de la enfermedad mediante hibridación *in situ* con la idea de proponer una cascada molecular que trate de explicar la patogénesis de la OA.

Hasta el momento éste es el primer trabajo en el cual se describe la disminución en la expresión de *Mig-6* en el cartílago articular osteoartítico y que además coincide con la disminución en la expresión génica y proteínica del agregano (132). En este estudio se demuestra que el *Mig-6* es esencial para el mantenimiento del cartílago articular normal, ya que su expresión en el cartílago lesionado disminuyó progresivamente y fue evidente su casi ausencia en las ratas osteoartíticas de 20 días. Los resultados encontrados nos permiten proponer que la degradación del agregano ocurre antes que la desregulación de *Mig-6* y que la ausencia de este gen conlleva al desarrollo de la OA. Aunque si bien Mateescu en el 2005 (129) reporta un incremento en la expresión del ARNm de *Mig-6* en el cartílago osteoartítico de la cadera de tres perros y analizan el cartílago en la zona de lesión. Se sugiere que se

debería de incrementar la muestra para confirmar que esto ocurre en los procesos osteoartríticos de cualquier articulación, además de que la raza labrador “retriever” que utilizan son susceptibles a displasia de la cadera.

Lo que seguiría en esta investigación es determinar si los mismos hallazgos que se observaron en este modelo experimental los encontramos en pacientes con OA y si identificamos algunos de los marcadores moleculares se propone que en un futuro pudiesen servir como un método de diagnóstico temprano de la enfermedad o de terapia génica.

## Conclusiones.

Los resultados muestran que los cambios moleculares observados en el cartílago osteoartrítico asociados a la diferenciación y a la maduración del cartílago articular son semejantes a los que se presentan en la osificación endocondral y además que preceden a los cambios morfológicos observados comúnmente en la OA.

El modelo experimental de OA utilizado en esta tesis nos permite proponer que la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina juega un papel muy importante en la patogénesis de la OA y con base en los resultados obtenidos, se plantea que en el desarrollo de la enfermedad se recapitulan algunos de los procesos de maduración del cartílago y muerte celular que se presentan en la osificación endocondral.

Se muestra en esta tesis que la expresión del Agrecano y de la Col II ocurren de manera paralela en el tiempo. Algunos autores han sugerido que en el inicio de la OA ocurre degradación de estos componentes cuando aparecen las proteinasas del tipo MMPs y las agrecanasas. El presente estudio no descarta la participación de estas moléculas en el proceso degradativo de la MEC, sin embargo, se propone que los cambios en el fenotipo celular y que repercuten en la síntesis de las proteínas típicas de la MEC, podrían deberse a la salida de los condrocitos de un estado de “reposo” para seguir un proceso de maduración del cartílago articular.

El cambio en el fenotipo del cartílago articular se corroboró por la disminución en la expresión de Sox-9 desde etapas muy tempranas de la lesión articular, lo que se reflejó en la disminución en la expresión protéica y del ARN m de la colágena y del agrecano. Ahora bien, se sabe que p107 y p57<sup>Kip2</sup> coordinan el arresto celular, por lo tanto al incrementarse su expresión en las etapas tempranas de la OA, se promueve la salida de los condrocitos de ese estado de reposo y siguen el proceso de maduración que se presenta de manera natural en la osificación endocondral en la placa de crecimiento.

La maduración del cartílago se comprueba en este estudio con el incremento en la expresión de la *col X* como marcador específico de maduración del cartílago. La disminución en la expresión de *Wnt-9a*, el incremento de *Wnt-4* que induce la hipertrofia en el cartílago y la disminución en la expresión de *Wnt-5a* y *Wnt-5b* cuya función es retrasar el proceso de maduración, todo lo anterior nos da la pauta para proponer que los procesos de maduración

del cartílago ocurren en este modelo experimental de OA son semejantes a los que ocurren en la osificación endocondral en la placa de crecimiento.

Otro evento que se presenta en la osificación endocondral y que también se observa en la OA, es la muerte celular por apoptosis. Se encontró en esta tesis que existe coincidencia de un exceso de la  $\beta$ -catenina con cambios en la homeostasis de los condrocitos articulares al promover la maduración y la apoptosis, ambos procesos también observados en la osificación endocondral.

Con base en lo reportado en este trabajo sugerimos que si bien la inflamación es un evento importante que corrobora lo reportado en la literatura como un proceso secundario, ya que no se observó la expresión de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en las fases tempranas de daño articular.



## REFERENCIAS

1. Archer CW, Dowthwaite GP, Francis-West P. Development of synovial joints. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2003;69(2):144-55.
2. Lories RJ, Luyten FP. Bone morphogenetic protein signaling in joint homeostasis and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16(3):287-98.
3. Hunter DJ, Felson DT. Osteoarthritis. *Bmj* 2006;332(7542):639-42.
4. Garstang SV, Stitik TP. Osteoarthritis: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. *Am J Phys Med Rehabil* 2006;85(11 Suppl):S2-11; quiz S12-4.
5. Arden N, Nevitt MC. Osteoarthritis: epidemiology. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006;20(1):3-25.
6. Pech Moguel G CZR, Diez Garcia MP, Leon Hernandez AR, Chávez Arias DD. Functional assessment in patients with knee osteoarthritis treated with glucosamine and rehabilitation program. *Acta Ortopedica Mexica* 2004;18(1):S29-S33.
7. Buckwalter JA, Martin JA. Osteoarthritis. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58(2):150-67.
8. Kuettner KE, Cole AA. Cartilage degeneration in different human joints. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13(2):93-103.
9. Chung UI. Essential role of hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development. *Endocr J* 2004;51(1):19-24.
10. Kavanagh E, Abiri M, Bland YS, Ashhurst DE. Division and death of cells in developing synovial joints and long bones. *Cell Biol Int* 2002;26(8):679-88.
11. Chimal-Monroy J, Garciadiego-Cazares David, Abarca-Buis Rene Fernando and Rios-Flores Alberto Jesus. Coordination of joint formation and cartilage differentiation in the appendicular skeleton. *Trends Develop Biol* 2005;1:47-53.
12. Garciadiego-Cazares D, Rosales C, Katoh M, Chimal-Monroy J. Coordination of chondrocyte differentiation and joint formation by alpha5beta1 integrin in the developing appendicular skeleton. *Development* 2004;131(19):4735-42.
13. Velasquillo Cristina GD, Ibarra Clemente Diferenciación del cartílago articular y osteoartritis. *Rev. Reumatología Clínica*. 2007;3:S2-5.
14. Chimal-Monroy J, Diaz de Leon L. Differential effects of transforming growth factors beta 1, beta 2, beta 3 and beta 5 on chondrogenesis in mouse limb bud mesenchymal cells. *Int J Dev Biol* 1997;41(1):91-102.
15. Chimal-Monroy J, Diaz de Leon L. Expression of N-cadherin, N-CAM, fibronectin and tenascin is stimulated by TGF-beta1, beta2, beta3 and beta5 during the formation of precartilaginous condensations. *Int J Dev Biol* 1999;43(1):59-67.
16. Chimal-Monroy J, Rodriguez-Leon J, Montero JA, Ganan Y, Macias D, Merino R, et al. Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev Biol* 2003;257(2):292-301.
17. Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 1999;22(1):85-9.
18. Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 2002;16(21):2813-28.
19. Mitrovic DR. Development of the metatarsophalangeal joint of the chick embryo: morphological, ultrastructural and histochemical studies. *Am J Anat* 1977;150(2):333-47.

20. Pacifici M, Koyama E, Iwamoto M. Mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation: recent advances, but many lingering mysteries. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2005;75(3):237-48.
21. Thomas JT, Lin K, Nandedkar M, Camargo M, Cervenka J, Luyten FP. A human chondrodysplasia due to a mutation in a TGF-beta superfamily member. *Nat Genet* 1996;12(3):315-7.
22. Storm EE, Huynh TV, Copeland NG, Jenkins NA, Kingsley DM, Lee SJ. Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF beta-superfamily. *Nature* 1994;368(6472):639-43.
23. Merino R, Macias D, Ganan Y, Economides AN, Wang X, Wu Q, et al. Expression and function of Gdf-5 during digit skeletogenesis in the embryonic chick leg bud. *Dev Biol* 1999;206(1):33-45.
24. Coleman CM, Tuan RS. Growth/differentiation factor 5 enhances chondrocyte maturation. *Dev Dyn* 2003;228(2):208-16.
25. DeLise AM, Fischer L, Tuan RS. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage* 2000;8(5):309-34.
26. Hartmann C, Tabin CJ. Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb. *Development* 2000;127(14):3141-59.
27. Church V, Nohno T, Linker C, Marcelle C, Francis-West P. Wnt regulation of chondrocyte differentiation. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 24):4809-18.
28. Guo X, Day TF, Jiang X, Garrett-Beal L, Topol L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation. *Genes Dev* 2004;18(19):2404-17.
29. Spitz F, Duboule D. *Development. The art of making a joint.* *Science* 2001;291(5509):1713-4.
30. Horton W. *Morphology of connective tissue: Cartilage.* 1993.
31. Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 1996;273(5275):613-22.
32. Lanske B, Karaplis AC, Lee K, Luz A, Vortkamp A, Pirro A, et al. PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* 1996;273(5275):663-6.
33. Beier F, Leask TA, Haque S, Chow C, Taylor AC, Lee RJ, et al. Cell cycle genes in chondrocyte proliferation and differentiation. *Matrix Biol* 1999;18(2):109-20.
34. MacLean HE, Guo J, Knight MC, Zhang P, Cobrinik D, Kronenberg HM. The cyclin-dependent kinase inhibitor p57(Kip2) mediates proliferative actions of PTHrP in chondrocytes. *J Clin Invest* 2004;113(9):1334-43.
35. Zhang P, Liegeois NJ, Wong C, Finegold M, Hou H, Thompson JC, et al. Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* 1997;387(6629):151-8.
36. Classon M, Dyson N. p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets. *Exp Cell Res* 2001;264(1):135-47.
37. Rossi F, MacLean HE, Yuan W, Francis RO, Semenova E, Lin CS, et al. p107 and p130 Coordinately regulate proliferation, Cbfa1 expression, and hypertrophic differentiation during endochondral bone development. *Dev Biol* 2002;247(2):271-85.
38. Harrington EK, Lunsford LE, Svoboda KK. Chondrocyte terminal differentiation, apoptosis, and type X collagen expression are downregulated by parathyroid hormone. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004;281(2):1286-95.
39. Provot S, Schipani E. Fetal growth plate: a developmental model of cellular adaptation to hypoxia. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1117:26-39.

40. Mak KK, Chen MH, Day TF, Chuang PT, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling interacts differentially with Ihh signaling in controlling endochondral bone and synovial joint formation. *Development* 2006;133(18):3695-707.
41. Yoshida CA, Yamamoto H, Fujita T, Furuichi T, Ito K, Inoue K, et al. Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev* 2004;18(8):952-63.
42. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 2003;423(6937):332-6.
43. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 2006;97(1):33-44.
44. Ducy P. Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn* 2000;219(4):461-71.
45. Daumer KM, Tufan AC, Tuan RS. Long-term in vitro analysis of limb cartilage development: involvement of Wnt signaling. *J Cell Biochem* 2004;93(3):526-41.
46. Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 1982;31(1):99-109.
47. Tian Q, Jin H, Cui Y, Guo C, Lu X. Regulation of Wnt gene expression. *Dev Growth Differ* 2005;47(5):273-81.
48. Nusse R, Varmus HE. Wnt genes. *Cell* 1992;69(7):1073-87.
49. Nusse R. Developmental biology. Making head or tail of Dickkopf. *Nature* 2001;411(6835):255-6.
50. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 1997;11(24):3286-305.
51. Reichsman F, Smith L, Cumberledge S. Glycosaminoglycans can modulate extracellular localization of the wingless protein and promote signal transduction. *J Cell Biol* 1996;135(3):819-27.
52. Korinek V, Barker N, Willert K, Molenaar M, Roose J, Wagenaar G, et al. Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Mol Cell Biol* 1998;18(3):1248-56.
53. Willert K, Nusse R. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev* 1998;8(1):95-102.
54. Nusse R. Cell biology: relays at the membrane. *Nature* 2005;438(7069):747-9.
55. Seidensticker MJ, Behrens J. Biochemical interactions in the wnt pathway. *Biochim Biophys Acta* 2000;1495(2):168-82.
56. Povelones M, Nusse R. Wnt signalling sees spots. *Nat Cell Biol* 2002;4(11):E249-50.
57. Hartmann C. A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends Cell Biol* 2006;16(3):151-8.
58. Logan M, Martin JF, Nagy A, Lobe C, Olson EN, Tabin CJ. Expression of Cre Recombinase in the developing mouse limb bud driven by a Prxl enhancer. *Genesis* 2002;33(2):77-80.
59. Hill TP, Spater D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C. Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell* 2005;8(5):727-38.
60. Tamamura Y, Otani T, Kanatani N, Koyama E, Kitagaki J, Komori T, et al. Developmental regulation of Wnt/beta-catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification. *J Biol Chem* 2005;280(19):19185-95.
61. Zakany J, Duboule D. Correlation of expression of Wnt-1 in developing limbs with abnormalities in growth and skeletal patterning. *Nature* 1993;362(6420):546-9.
62. Rudnicki JA, Brown AM. Inhibition of chondrogenesis by Wnt gene expression in vivo and in vitro. *Dev Biol* 1997;185(1):104-18.
63. Hwang SG, Yu SS, Lee SW, Chun JS. Wnt-3a regulates chondrocyte differentiation via c-Jun/AP-1 pathway. *FEBS Lett* 2005;579(21):4837-42.

64. Tuan RS. Cellular signaling in developmental chondrogenesis: N-cadherin, Wnts, and BMP-2. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A Suppl 2:137-41.
65. Loganathan PG, Nimmagadda S, Huang R, Scaal M, Christ B. Comparative analysis of the expression patterns of Wnts during chick limb development. *Histochem Cell Biol* 2005;123(2):195-201.
66. Kawakami Y, Wada N, Nishimatsu SI, Ishikawa T, Noji S, Nohno T. Involvement of Wnt-5a in chondrogenic pattern formation in the chick limb bud. *Dev Growth Differ* 1999;41(1):29-40.
67. Lee HH, Behringer RR. Conditional expression of Wnt4 during chondrogenesis leads to dwarfism in mice. *PLoS ONE* 2007;2(5):e450.
68. Chimal-Monroy J, Montero JA, Ganan Y, Macias D, Garcia-Porrero JA, Hurle JM. Comparative analysis of the expression and regulation of Wnt5a, Fz4, and Frzb1 during digit formation and in micromass cultures. *Dev Dyn* 2002;224(3):314-20.
69. Jin EJ, Park JH, Lee SY, Chun JS, Bang OS, Kang SS. Wnt-5a is involved in TGF-beta3-stimulated chondrogenic differentiation of chick wing bud mesenchymal cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38(2):183-95.
70. Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell* 2002;2(4):389-406.
71. Yang Y, Topol L, Lee H, Wu J. Wnt5a and Wnt5b exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* 2003;130(5):1003-15.
72. Tufan AC, Tuan RS. Wnt regulation of limb mesenchymal chondrogenesis is accompanied by altered N-cadherin-related functions. *Faseb J* 2001;15(8):1436-8.
73. Hwang SG, Ryu JH, Kim IC, Jho EH, Jung HC, Kim K, et al. Wnt-7a causes loss of differentiated phenotype and inhibits apoptosis of articular chondrocytes via different mechanisms. *J Biol Chem* 2004;279(25):26597-604.
74. Poole CA. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat* 1997;191 ( Pt 1):1-13.
75. Blair HC, Zaidi M, Schlesinger PH. Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation. *Biochem J* 2002;364(Pt 2):329-41.
76. Aigner T, Sachse A, Gebhard PM, Roach HI. Osteoarthritis: pathobiology-targets and ways for therapeutic intervention. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58(2):128-49.
77. Aigner T, Stove J. Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55(12):1569-93.
78. Aigner T, McKenna L. Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell Mol Life Sci* 2002;59(1):5-18.
79. Eyre DR, Weis MA, Wu JJ. Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework? *Eur Cell Mater* 2006;12:57-63.
80. Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55(12):1531-46.
81. Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14(1):13-29.
82. Roughley PJ. The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur Cell Mater* 2006;12:92-101.
83. Pearle AD, Warren RF, Rodeo SA. Basic science of articular cartilage and osteoarthritis. *Clin Sports Med* 2005;24(1):1-12.

84. Maroudas A, Bayliss MT, Uchitel-Kaushansky N, Schneiderman R, Gilav E. Aggrecan turnover in human articular cartilage: use of aspartic acid racemization as a marker of molecular age. *Arch Biochem Biophys* 1998;350(1):61-71.
85. Goldring MB, Goldring SR. Osteoarthritis. *J Cell Physiol* 2007;213(3):626-34.
86. Sandell LJ, Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* 2001;3(2):107-13.
87. Radin EL. Who gets osteoarthritis and why? *J Rheumatol Suppl* 2004;70:10-5.
88. Young AA, Smith MM, Smith SM, Cake MA, Ghosh P, Read RA, et al. Regional assessment of articular cartilage gene expression and small proteoglycan metabolism in an animal model of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7(4):R852-61.
89. Sun BH, Wu CW, Kalunian KC. New developments in osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2007;33(1):135-48.
90. Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43(9):1916-26.
91. Sarzi-Puttini P, Cimmino MA, Scarpa R, Caporali R, Parazzini F, Zaninelli A, et al. Osteoarthritis: an overview of the disease and its treatment strategies. *Semin Arthritis Rheum* 2005;35(1 Suppl 1):1-10.
92. Lee DA, Bentley G, Archer CW. The control of cell division in articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 1993;1(2):137-46.
93. Abramson SB. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2008;10 Suppl 2:S2.
94. Maneiro E, Lopez-Armada MJ, de Andres MC, Carames B, Martin MA, Bonilla A, et al. Effect of nitric oxide on mitochondrial respiratory activity of human articular chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 2005;64(3):388-95.
95. Abramson SB. Osteoarthritis and nitric oxide. *Osteoarthritis Cartilage* 2008;16 Suppl 2:S15-20.
96. Studer RK, Levicoff E, Georgescu H, Miller L, Jaffurs D, Evans CH. Nitric oxide inhibits chondrocyte response to IGF-I: inhibition of IGF-IRbeta tyrosine phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279(4):C961-9.
97. Shlopov BV, Lie WR, Mainardi CL, Cole AA, Chubinskaya S, Hasty KA. Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. *Arthritis Rheum* 1997;40(11):2065-74.
98. Nagase H, Kashiwagi M. Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res Ther* 2003;5(2):94-103.
99. Mankin HJ, Lippiello L. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. *J Bone Joint Surg Am* 1970;52(3):424-34.
100. Nakoshi Y, Hasegawa M, Sudo A, Yoshida T, Uchida A. Regulation of tenascin-C expression by tumor necrosis factor-alpha in cultured human osteoarthritis chondrocytes. *J Rheumatol* 2008;35(1):147-52.
101. Bay-Jensen AC, Andersen TL, Charni-Ben Tabassi N, Kristensen PW, Kjaersgaard-Andersen P, Sandell L, et al. Biochemical markers of type II collagen breakdown and synthesis are positioned at specific sites in human osteoarthritic knee cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2007.
102. Mazieres B, Garnero P, Gueguen A, Abbal M, Berdah L, Lequesne M, et al. Molecular markers of cartilage breakdown and synovitis at baseline as predictors of structural progression of hip osteoarthritis. The ECHODIAH Cohort. *Ann Rheum Dis* 2006;65(3):354-9.
103. Stitik TP, Altschuler E, Foye PM. Pharmacotherapy of osteoarthritis. *Am J Phys Med Rehabil* 2006;85(11 Suppl):S15-28; quiz S29-31.

104. van der Weyden L, Wei L, Luo J, Yang X, Birk DE, Adams DJ, et al. Functional knockout of the matrilin-3 gene causes premature chondrocyte maturation to hypertrophy and increases bone mineral density and osteoarthritis. *Am J Pathol* 2006;169(2):515-27.
105. Kouri JB, Lavallo C. Do chondrocytes undergo "activation" and "transdifferentiation" during the pathogenesis of osteoarthritis? A review of the ultrastructural and immunohistochemical evidence. *Histol Histopathol* 2006;21(7):793-802.
106. Benya PD, Padilla SR, Nimni ME. The progeny of rabbit articular chondrocytes synthesize collagen types I and III and type I trimer, but not type II. Verifications by cyanogen bromide peptide analysis. *Biochemistry* 1977;16(5):865-72.
107. Kouri JB, Aguilera JM, Reyes J, Lozoya KA, Gonzalez S. Apoptotic chondrocytes from osteoarthrotic human articular cartilage and abnormal calcification of subchondral bone. *J Rheumatol* 2000;27(4):1005-19.
108. Rountree RB, Schoor M, Chen H, Marks ME, Harley V, Mishina Y, et al. BMP receptor signaling is required for postnatal maintenance of articular cartilage. *PLoS Biol* 2004;2(11):e355.
109. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med* 2007;13(2):156-63.
110. VelasquilloCristina GD, IbarraClemente Diferenciación del cartílago articular y osteoarthritis. *Rev. Reumatología Clínica*. 2007;3:S2-5.
111. Goldring SR, Goldring MB. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res* 2004(427 Suppl):S27-36.
112. Goldring MB, Berenbaum F. The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric oxide. *Clin Orthop Relat Res* 2004(427 Suppl):S37-46.
113. Fell HB, Jubb RW. The effect of synovial tissue on the breakdown of articular cartilage in organ culture. *Arthritis Rheum* 1977;20(7):1359-71.
114. van de Loo AA, van den Berg WB. Effects of murine recombinant interleukin 1 on synovial joints in mice: measurement of patellar cartilage metabolism and joint inflammation. *Ann Rheum Dis* 1990;49(4):238-45.
115. Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum* 2001;44(3):585-94.
116. Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Early response genes induced in chondrocytes stimulated with the inflammatory cytokine interleukin-1beta. *Arthritis Res* 2001;3(6):381-8.
117. Chambers MG, Bayliss MT, Mason RM. Chondrocyte cytokine and growth factor expression in murine osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1997;5(5):301-8.
118. Goldring MB, Birkhead J, Sandell LJ, Kimura T, Krane SM. Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes. *J Clin Invest* 1988;82(6):2026-37.
119. Melchiorri C, Meliconi R, Frizziero L, Silvestri T, Pulsatelli L, Mazzetti I, et al. Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41(12):2165-74.
120. Stevens AL WC, Tannenbaum SR, Grodzinsky AJ., , . Nitric oxide enhances aggrecan degradation by aggrecanase in response to TNF-alpha but not IL-1beta treatment at a post-transcriptional level in bovine cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage* 2007 Oct 9.
121. Murakami S, Lefebvre V, de Crombrughe B. Potent inhibition of the master chondrogenic factor Sox9 gene by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 2000;275(5):3687-92.

122. Lopez-Armada MJ, Carames B, Cillero-Pastor B, Lires-Dean M, Maneiro E, Fuentes I, et al. Phosphatase-1 and -2A inhibition modulates apoptosis in human osteoarthritis chondrocytes independently of nitric oxide production. *Ann Rheum Dis* 2005;64(7):1079-82.
123. LaVallie ER, Chockalingam PS, Collins-Racie LA, Freeman BA, Keohan CC, Leitges M, et al. Protein kinase Czeta is up-regulated in osteoarthritic cartilage and is required for activation of NF-kappaB by tumor necrosis factor and interleukin-1 in articular chondrocytes. *J Biol Chem* 2006;281(34):24124-37.
124. Dodge GR, Diaz A, Sanz-Rodriguez C, Reginato AM, Jimenez SA. Effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor alpha on the expression of the genes encoding aggrecan, biglycan, and decorin core proteins in cultured human chondrocytes. *Arthritis Rheum* 1998;41(2):274-83.
125. Ahmad R, Qureshi HY, El Mabrouk M, Sylvester J, Ahmad M, Zafarullah M. Inhibition of interleukin 1-induced matrix metalloproteinase 13 expression in human chondrocytes by interferon gamma. *Ann Rheum Dis* 2007;66(6):782-9.
126. Henrotin YE, Zheng SX, Labasse AH, Deby GP, Crielaard JM, Reginster JY. Modulation of human chondrocyte metabolism by recombinant human interferon. *Osteoarthritis Cartilage* 2000;8(6):474-82.
127. Mier RJ, Holderbaum D, Ferguson R, Moskowitz R. Osteoarthritis in children associated with a mutation in the type II procollagen gene (COL2A1). *Mol Genet Metab* 2001;74(3):338-41.
128. Moskowitz RW. Specific gene defects leading to osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl* 2004;70:16-21.
129. Mateescu RG, Todhunter RJ, Lust G, Burton-Wurster N. Increased MIG-6 mRNA transcripts in osteoarthritic cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;332(2):482-6.
130. Zhang YW, Su Y, Lanning N, Swiatek PJ, Bronson RT, Sigler R, et al. Targeted disruption of Mig-6 in the mouse genome leads to early onset degenerative joint disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(33):11740-5.
131. Wick M, Burger C, Funk M, Muller R. Identification of a novel mitogen-inducible gene (mig-6): regulation during G1 progression and differentiation. *Exp Cell Res* 1995;219(2):527-35.
132. Velasquillo C, Garcadiago-Cazares D, Almonte M, Bustamante M, Ibarra C, Kouri JB, et al. Expression of MIG-6, WNT-9A, and WNT-7B during osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1117:175-80.
133. Sen M, Lauterbach K, El-Gabalawy H, Firestein GS, Corr M, Carson DA. Expression and function of wingless and frizzled homologs in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(6):2791-6.
134. Nakamura Y, Nawata M, Wakitani S. Expression profiles and functional analyses of Wnt-related genes in human joint disorders. *Am J Pathol* 2005;167(1):97-105.
135. Lozoya KA, Flores JB. A novel rat osteoarthrosis model to assess apoptosis and matrix degradation. *Pathol Res Pract* 2000;196(11):729-45.
136. Wai AW, Ng LJ, Watanabe H, Yamada Y, Tam PP, Cheah KS. Disrupted expression of matrix genes in the growth plate of the mouse cartilage matrix deficiency (cmd) mutant. *Dev Genet* 1998;22(4):349-58.
137. Stump RJ, Ang S, Chen Y, von Bahr T, Lovicu FJ, Pinson K, et al. A role for Wnt/beta-catenin signaling in lens epithelial differentiation. *Dev Biol* 2003;259(1):48-61.
138. Hopwood B, Tsykin A, Findlay DM, Fazzalari NL. Microarray gene expression profiling of osteoarthritic bone suggests altered bone remodelling, WNT and transforming growth factor-beta/bone morphogenic protein signalling. *Arthritis Res Ther* 2007;9(5):R100.

139. Tew SR, Li Y, Pothacharoen P, Tweats LM, Hawkins RE, Hardingham TE. Retroviral transduction with SOX9 enhances re-expression of the chondrocyte phenotype in passaged osteoarthritic human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13(1):80-9.
140. Boos N, Nerlich AG, Wiest I, von der Mark K, Ganz R, Aebi M. Immunohistochemical analysis of type-X-collagen expression in osteoarthritis of the hip joint. *J Orthop Res* 1999;17(4):495-502.
141. Yates KE, Shortkroff S, Reish RG. Wnt influence on chondrocyte differentiation and cartilage function. *DNA Cell Biol* 2005;24(7):446-57.
142. Spater D, Hill TP, O'Sullivan R J, Gruber M, Conner DA, Hartmann C. Wnt9a signaling is required for joint integrity and regulation of *Ihh* during chondrogenesis. *Development* 2006;133(15):3039-49.
143. Akiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y, Yang X, Zhang R, Zhang Z, et al. Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev* 2004;18(9):1072-87.
144. Yuasa T, Otani T, Koike T, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M. Wnt/beta-catenin signaling stimulates matrix catabolic genes and activity in articular chondrocytes: its possible role in joint degeneration. *Lab Invest* 2008;88(3):264-74.



## Anexo 1.

## SOLUCIONES

### PBT:

0.1% de Tween en PBS

### Buffer de hibridación:

50% Formamida	5 ml (100% stock)
5XSSC	2.5 ml (20x stock)
SDS 1%	1 ml (10% stock)
50 µg/ml tRNA	50 µl (10 mg/ml stock)
50 µg/ml heparina (pH 4.5)	10 µl (50 mg/ml stock)

### Solución I:

Formamida	20 ml
SSC 20X pH 4.5	8 ml
SDS 10%	4 ml
H <sub>2</sub> O	8 ml
Total	40 ml

### Solución II:

NaCl 5M	10 ml
Tris 1M pH 7.5	1 ml
Tween-20 (al 10%)	100 µl
H <sub>2</sub> O	89 ml
Total	100 ml

### Solución III:

Formamida	20 ml
SSC 20x pH 4.5	4 ml
H <sub>2</sub> O	16 ml
Total	40 ml

**Suero 10%**

Suero de chivo	1 ml
TBST + 2mM levamisol	9 ml
Total	10 ml

**TBST:**

	<b>STOCK</b>	<b>100 ml</b>
50 mM TrisHCl pH 7.5	1 M	5 mL
150 mM NaCl	5 M	3 mL
Tween-20	10 %	1 mL
KCl	1 M	0.25 mL
Agua Mili-Q		90.75 mL
Levamisol	200 mM	0.5 mL