



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS
INTEGRINAS $\alpha 5$ Y αV POR GDF5 Y BMP7
DURANTE EL DESARROLLO DE LAS
ARTICULACIONES Y EN LA OSTEOARTRITIS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE:**

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Hilda Isabel Aguirre Sánchez



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. David Garcíadiego Cázares
2011**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno
Aguirre

Sánchez

Hilda Isabel

55738034

Universidad Nacional

Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Carrera: Biología

301332422

2. Datos del tutor

Doctor

David

Garciadiego

Cázares

3. Datos del sinodal 1

Doctor

Saúl

Cano

Colín

4. Datos del sinodal 2

Doctor

Luis Felipe

Jiménez

García

5. Datos del sinodal 3

Doctor

David

Garciadiego

Cázares

6. Datos del sinodal 4

Doctor

Fernando Edgar

Kröttsch

Gómez

6. Datos del sinodal 5

Biólogo

René Fernando

Abarca

Buis.

7. Datos del trabajo escrito

Regulación de la expresión
de las integrinas $\alpha 5$ y αV por

GDF5 y BMP7 durante el
desarrollo de las

articulaciones y en la
Osteoartritis.

80p.

2011.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al financiamiento por el proyecto CB-84683-2007 de CONACYT, México, otorgado al Dr. David Garciadiego Cázares.

Agradezco la beca No.14689 de CONACYT que me fue otorgada para la realización de este trabajo.

Gracias a la MVZ Georgina Díaz Herrera por el cuidado de los animales en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.

Gracias a la MVZ María Elena por el apoyo del cuidado y mantenimiento de los ratones en el bioterio del Instituto Nacional de Rehabilitación.

Gracias a mi tutor y sinodal Dr. David Garciadiego Cázares por el gran apoyo en la realización de esta trabajo, en la enseñanza, a mis sinodales; Dr. Saúl Cano Colín, Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dr. Fernando Edgar Krötzsch Gómez y Dr. René Abarca Buis a quien también agradezco su enseñanza, paciencia y amistad.

Gracias a la Doctora Cristina Velasquillo por permitirme el uso de los equipos y material del laboratorio de Ingeniería de tejidos del Instituto Nacional de Rehabilitación, a su cargo. Gracias a todo el grupo de trabajo del laboratorio del 5° piso a Carlitos, Valentín, Ricardo, Mónica y muy especialmente a Erika, Xóchitl y Julieta por las orientaciones técnicas en el laboratorio y su amistad. Yulia gracias por tu hermosa amistad.

Esta tesis esta especialmente dedicada a Addil por su invaluable apoyo y por ser la persona con quien mas he comprendido la vida. También la dedico a mi familia y amigos a quienes quiero mucho y espero sigan acompañándome en la vida con el amor de siempre

Gladys SS, Daniel AL ,Sabina LA, Marlene AA, Jessica ES, Emilliano E, Lucero MS, Hazel SM, Dolores ES, Adilene SE, Leonardo E, Wendy SS, Pedro ES, Aries E, Jorge MS, Scarlett M, Arturo MS, María, Miguel MS, Valeria, Nayely, Rogelio AL q.e.d.p, Ruth AL q.e.d.p., Lilia SF q.e.p.d.,Miquelón FS, Felipa LC, Teresa AL, Alfonso A, Ruth A, Nohemí AL, Juana AL, Guillermo BA. Pedro AL, David AL, Irene H y Fernando L. Rodrigo LH , Mago LH. Dalia G, Isaac O, Carlos, Gabael, Arturo, Gaby, Miguel, Julio E, Ximena O, Samadhi H, Lorena M, Adriana G, Alejandro Z, Sergio Z, Oscar G, Oscar G, Julius, Ricardo S, Oscar M, Esthelita, Karlita, Dianis, Adrián, Alejandro, Araid, Larisa, Alfredo, Gilgamesh, Teuhtli, Rafa S, Arturo, Alma P, Héctor GS, Shizuru...

a todos Oda a la vida...

Oda a la vida

*La noche entera
con un hacha
me ha golpeado el dolor,
pero el sueño
pasó lavando como un agua oscura
piedras ensangrentadas.
Hoy de nuevo estoy vivo.
De nuevo
te levanto,
vida,
sobre mis hombros.*

*Oh vida, copa clara,
de pronto
te llenas
de agua sucia,
de vino muerto,
de agonía, de pérdidas,
de sobrecogedoras telarañas,
y muchos creen
que ese color de infierno
guardarás para siempre.*

No es cierto.

*Pasa una noche lenta,
pasa un solo minuto
y todo cambia.
Se llena
de transparencia
la copa de la vida.
El trabajo espacioso
nos espera.
De un solo golpe nacen las palomas.
Se establece la luz sobre la tierra.*

*Vida, los pobres
poetas
te creyeron amarga,
no salieron contigo
de la cama
con el viento del mundo.*

*Recibieron los golpes
sin buscarte,
se barrenaron
un agujero negro
y fueron sumergiéndose
en el luto
de un pozo solitario.*

No es verdad, vida,

*eres
bella
como la que yo amo
y entre los senos tienes
olor a menta.*

*Vida,
eres
una máquina plena,
felicidad, sonido
de tormenta, ternura
de aceite delicado.*

*Vida,
eres como una viña:
atesoras la luz y la repartes
transformada en racimo.*

*el que de ti reniega
que espere
un minuto, una noche,
un año corto o largo,
que salga
de su soledad mentirosa,
que indague y luche, junte
sus manos a otras manos,
que no adopte ni halague
a la desdicha,
que la rechace dándole
forma de muro,
como a la piedra los picapedreros,
que corte la desdicha
y se haga con ella
pantalones.
La vida nos espera
a todos
los que amamos
el salvaje
olor a mar y menta
que tiene entre los senos.*

Pablo Neruda.

CONTENIDO

Lista de abreviaturas	8
Resumen	9
Introducción	11
La extremidad como modelo de esquetogénesis	12
• Condrogénesis: formación del molde de cartílago	12
• Crecimiento del molde de cartílago y diferenciación celular	14
• Placa de crecimiento	15
• Indian hedgehog regula la hipertrofia de los condrocitos en la placa de crecimiento	17
• Centro de osificación primario	18
• Centro de osificación secundario	20
Articulación	20
• Cartílago articular	22
• Condrocitos del cartílago articular	25
Proteínas de la matriz extracelular de cartílago articular	26
Integrinas	31
Proteínas morfogenéticas de hueso	35
Osteoartritis	38
Antecedentes	43
Planteamiento del problema	45
Hipótesis	45
Objetivos	46
Material y métodos	47

Material biológico para el seguimiento del desarrollo articular	47
Reactivos	47
Preparación de los tejidos e histología	48
Inmunofluorescencia de doble marcaje en extremidades en desarrollo de ratón	49
Modelo de osteoartritis por menisectomía y respuesta mecánica en rata	50
Tinción Safranina O en cartílago sano articular y osteoartrítico	51
Ensayos de inmunohistoquímica en rodillas sanas y osteoartríticas	51
Hibridación <i>in situ</i> de la <i>bmp7</i> e <i>ihh</i> en cartílago sano articular y osteoartrítico	52
Inmunofluorescencia de Gdf5 en cartílago articular sano y osteoartrítico	54
Cultivo de micromasas: modelo de condrogénesis	54
Tinción con Azul de Alciano	55
Cultivos de micromasas con proteínas morfogenéticas del hueso	55
Cultivos de rodillas de ratón con ciclopamina	55
Tinción de Herovici en cartílago articular tratado con ciclopamina	56
Cultivo de micromasas con anticuerpos neutralizantes	56
Modelo comparativo entre placa de crecimiento y cartílago articular	57
Resultados	58
Discusión	68
Conclusiones	74
Referencias	75

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag: Agrecano

BMP: Proteína morfogenética del Hueso

CA: Cartílago Articular

CD44: grupo de Diferenciación 44 receptor clásico del hialuronato

Col : Colágena

DAPI:4',6-diamidino-2- fenilindol

DDR: Familia de Receptores con Dominio Discoidina (CD167a)

FGF18: Factor de Crecimiento Fibroblástico 18

FICT: Isotiocianato de Fluoresceína

Fn: Fibronectina

GAG: Glicosaminoglicano

GDF5: Factor de Crecimiento y Diferenciación 5

IF: Inmunofluorescencia

IGF: Factor de Crecimiento semejante a Insulina

Ihh: Indian Hedgehog

IHQ: Inmunohistoquímica

MAPK: Proteína Cinasa activada por mitógenos

MEC: Matriz Extracelular

MMP-13: Metaloproteasa 13

mRNA: Ácido Ribonucleico mensajero

N-CAM: Molécula de Adhesión Celular Neural (CD56)

OA: Osteoartritis

PBS: Solución amortiguadora salina de fosfatos

PC: Placa de crecimiento

PG: Proteoglicanos

PKC: Proteína Cinasa C

PTHrP: Proteína relacionada con la hormona Paratiroidea

Pyk2: Tirosina cinasa rica en prolina (CAK β)

RGD: péptido Arginina-Glicina-Aspártico

RUNX: Relacionado con el Factor de Transcripción- Enano

SOX: Grupo de factores de transcripción relacionados con Sry y la caja HMG

TESPA: 3-Aminopropiltietoxisilano

TGF- β 1: Factor de Crecimiento Transformante β 1

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante β

VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular.

RESUMEN

La mayoría de las interacciones entre la matriz extracelular (MEC) y las células están reguladas por receptores de membrana celular, como las integrinas, las cuales se encuentran involucradas en la proliferación, migración, diferenciación y apoptosis. En el desarrollo del cartílago articular (CA), las integrinas de la familia $\beta 1$ juegan un papel importante y junto con algunos miembros de la superfamilia de los TGF- β regulan la diferenciación del condrocito y el desarrollo del esqueleto. En este trabajo analizamos la relación entre dos integrinas $\alpha 5$ y αV con dos miembros los TGF- β , el factor de crecimiento y diferenciación 5 (Gdf5) y la proteína morfogenética de hueso (Bmp7). En un modelo murino se determinó mediante Inmunofluorescencia (IF) el patrón de expresión de las subunidades de integrinas $\alpha 5$ y αV en la placa de crecimiento (PC) en extremidades en desarrollo. También se determinó el patrón de expresión de estas integrinas en el cartílago articular de ratas sanas y con Osteoartritis (OA), ambos por Inmunohistoquímica (IHQ). Identificamos que la subunidad $\alpha 5$ se localiza en la zona superficial del CA y en la PC se expresa en los condrocitos en reposo y proliferación, mientras que la subunidad αV se observó en la zona media y profunda del CA y en la zona profunda de la PC correspondiente a los condrocitos prehipertróficos e hipertróficos. En el modelo de OA en rata se observó la pérdida de la expresión de la subunidad $\alpha 5$ en la zona superficial, mientras que la expresión de la subunidad αV amplió su área de expresión de la zona profunda a la superficie articular. Mediante tinción de Safranina O determinamos la calidad del tejido del CA sano y del CA osteoartítico.

Por medio de IF localizamos la expresión de Gdf5 y *bmp7* en CA sano y osteoartítico, observamos que el Gdf5 disminuye su expresión en la superficie articular con OA, por el contrario la *bmp7* se distribuyó ampliamente en esta zona. El cultivo de micromasas de células mesenquimales de ratón se observó que Gdf5 y Bmp7 indujeron la

expresión de las integrinas $\alpha 5$ y αV respectivamente, y se observó que bajo el tratamiento con Gdf5: agregano, fibronectina y colágena II (Col II) se expresan con mayor intensidad que con Bmp7.

En trabajos previos se ha observado que los condrocitos articulares se hipertrofian en la OA (Martin et al., 2006), se sabe además que en el desarrollo del esqueleto y en la PC Indian hedgehog (Ihh) regula la hipertrofia de los condrocitos de modo que este gen controla la formación de los huesos y el funcionamiento del CA (Minina *et al.*, 2001). Por medio de IF en los cultivos de micromasas tratados con anticuerpos bloqueadores para la integrina $\alpha 5$ se observó que disminuye la expresión del gen Sonic hedgehog (Shh) homólogo a Ihh; en correspondencia a esto cuando se bloqueó la actividad hedgehog mediante un anticuerpo bloqueador de shh, la expresión de la subunidad $\alpha 5$ tampoco se expresa. La señalización hedgehog se inhibió con ciclopamina en cultivo de rodillas de ratón y se observó daño masivo fibrótico en el cartílago por medio de tinción Herovici.

Las observaciones de este trabajo indican que Gdf5 es un factor importante en el mantenimiento del CA, ya que induce la expresión de componentes importantes de la MEC articular y la expresión de la integrina $\alpha 5$. La coexpresión de la integrina $\alpha 5$ y Shh sugiere que este par de moléculas son importantes para el mantenimiento del CA ya que si se inhibe la señalización hedgehog se produce un daño similar a la OA. Por lo cual sugerimos que es necesaria la presencia de Gdf5 para que se exprese la integrina $\alpha 5$ y facilite la señalización hedgehog. Por el contrario Bmp7 induce la expresión de la integrina αV y ambos mantienen su expresión en etapas avanzadas de la OA, similarmente como ocurre en la hipertrofia del cartílago y la formación de hueso. Sugerimos entonces que la Bmp7 está involucrada con el proceso del daño artrítico en el CA.

INTRODUCCIÓN

Los vertebrados constituyen el *subphylum* más grande de los cordados contando con unas 40,000 especies las cuales podemos encontrar fácilmente en tierra, agua y aire. Sus características fenotípicas indican presencia de riñones un órgano excretor y cefalización dentro de un cráneo (Saldaña, 2007), pero sin duda su característica fenotípica más evidente es la presencia de endoesqueleto, que es un sistema orgánico que sirve de soporte y protección a los órganos, además tiene articulaciones que le confieren al organismo la capacidad de moverse en diversos medios. El esqueleto humano posee alrededor de 200 partes óseas de distintos tamaños y formas, esta cantidad de piezas varía según la especie; sin embargo, en todas las especies se encuentran los tres diferentes tipos celulares que conforman al sistema esquelético: los condrocitos en el cartílago y los osteoblastos y osteoclastos en el hueso. (Karsenty, 2008).

La esquetogénesis ocurre a través de dos mecanismos diferentes durante el desarrollo embrionario, dependiendo de la especie y del tipo de hueso. La formación del hueso sucede por osificación intramembranosa y/o por osificación endocondral (Gilbert, 2000). El primer tipo de osificación ocurre en la minoría de los elementos esqueléticos como la clavícula y el cráneo, donde las células mesenquimales se diferencian directamente en osteoblastos y forman el hueso; el segundo tipo, que es en el cual profundizaremos, las células mesenquimales primero se diferencian en condrocitos y continúan un proceso de diferenciación gradual hasta formar hueso (Karsenty *et al.*, 2009).

La extremidad como modelo de esqueletogénesis

Condrogénesis: formación del molde de cartílago

La extremidad se forma a partir del linaje celular de las somitas de la placa lateral del mesodermo, y el esqueleto de la extremidad se genera a partir de condensaciones de células mesenquimales que en primer instancia forman cartílago. La osificación endocondral involucra la formación de tejido cartilaginoso que posteriormente será reemplazado en gran parte por tejido óseo. La primera fase de este proceso requiere de células mesenquimales comprometidas a formar cartílago. Este compromiso es ocasionado por Sonic hedgehog (Shh) el cual induce a células cercanas al esclerótomo a expresar el factor de transcripción Pax1, el cual inicia una cascada de señalización que depende de factores paracrinos externos y factores de transcripción internos (Gilbert, 2006). Estas células mesenquimales comprometidas se condensan y forman nódulos compactos (Figura 1 A), los cuales inician su diferenciación hacia condrocitos. La matriz de dichos nódulos se caracteriza por ser rica en colágena tipo I (Horton, 1993).

Durante el proceso de compactación y condensación de las células mesenquimales, las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP) juegan un papel importante, ya que al suprimir la expresión de *Bmp2* o *Bmp4* se anula la condensación precartilaginosa (Bandyopadhyay *et al.*, 2006). Además, las BMP inducen la expresión de moléculas de adhesión como N-Caderina y la N-CAM, la primera es esencial para el inicio de las condensaciones ya que activa las interacciones intercelulares (Oberlander y Tuan, 1994), y la segunda se encarga de mantener las interacciones celulares de las condensaciones (Fang y Hall, 1995). Durante estas condensaciones mesenquimales también se expresan tenascina, trombospondina-4, versicano y fibronectina (Mackie *et al.*, 2008; Lefebvre y Smits, 2005). En estudios *in vitro* Buxton y cols. (2001) demostraron que el GDF5 en etapas iniciales de la condrogénesis aumenta la adhesión

celular por lo cual su presencia es importante para la formación de los moldes de cartílago.

La presencia del factor de transcripción Sox9 es fundamental debido a que permite la diferenciación de las células mesenquimales hacia el linaje condrogénico activando otros factores de transcripción, así como la expresión de *Agrecano* y *Col II* (Akiyama *et al.*, 2002; Bi *et al.*, 2001), moléculas características de la MEC del cartílago. En condiciones normales del desarrollo de la extremidad de ratón, Sox9 esta presente en diferentes linajes celulares; en células mesenquimales, condrocitos en reposo y proliferación (Zhao *et al.*, 1997) y puede estar participando en conjunto con Sox5 y Sox6 en el control de la expresión del gen *Col II α 1*, ello es el indicio de que comienza a producirse una matriz rica en colágena tipo II y agrecano en el centro de las condensaciones mesenquimales (Lefebvre *et al.*, 2005).

Las condensaciones mesenquimales establecen la forma de los elementos esqueléticos y a este aspecto del desarrollo del esqueleto se le conoce como patrón esquelético. (Gilbert, 2000). Stott en 1999 propuso que Wnt7a y BMP2 pueden estar implicados en el establecimiento de dicho patrón esquelético, mientras Wnt-7a suprime la diferenciación condrogénica en cultivos de micromasas de células mesenquimales de pollo, BMP2 la aumenta; se considera que la presencia de ambas podría regular la forma de las condensaciones mesenquimales, dependiendo de la concentración de ambas moléculas.(Stott *et al.*, 1999).

Una vez que se forma el molde de cartílago, este es circundado por células mesenquimales no diferenciadas con forma aplanada que inicialmente expresan colágena I; las cuales forman una estructura llamada pericondrio (Figura 1B), un tejido conectivo denso el cual se encarga de separar al molde de otros tejidos, con una matriz rica en colágena tipo II (Caplan, 1987; Kronenberg, 2003).

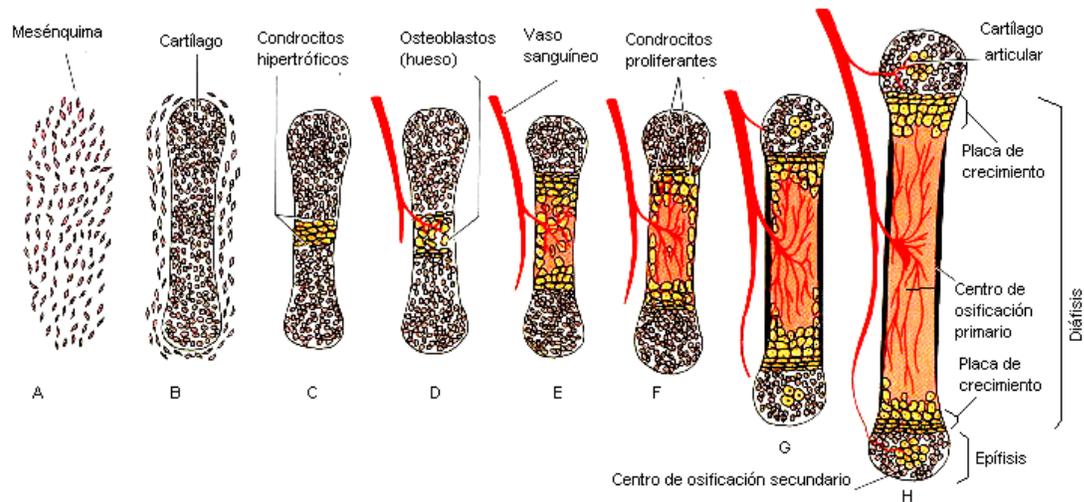


Figura 1. Osificación endocondral. El molde de cartilago se forma a partir de células mesenquimales, los condrocitos proliferan y se diferencian, finalmente la parte media del molde es invadida por vasos sanguíneos y se forma hueso, esto mismo ocurre en la parte superior de los moldes. (Gilbert, 2000; Aguirre, 2011).

Crecimiento del molde de cartilago y diferenciación celular

En la siguiente fase los condrocitos proliferan rápidamente provocando el crecimiento de las extremidades (Figura 1 C-1 H). En el centro de cada elemento, los condrocitos dejan de dividirse, iniciando el proceso de diferenciación hacia la hipertrofia (Zuscik,2008), estas células aun conservan una matriz rica en colágena II, aumentan su volumen considerablemente y poco a poco comienzan a detener el ciclo celular, convirtiéndose en condrocitos prehipertróficos los cuales se caracterizan por expresar el gen Indian hedgehog (*Ihh*) (Figura 3). Los condrocitos prehipertróficos continúan aumentando su volumen celular llegando así a la hipertrofia, estos condrocitos grandes alteran la matriz produciendo

colágena X y más fibronectina (Poole *et al.*, 1991; Lefebvre y Patrick, 2005; Bengtsson *et al.*, 2005), finalmente mueren por apoptosis y dejando espacios y una MEC adecuada para la invasión de células de hueso.

Así los elementos esqueléticos crecen longitudinalmente durante el desarrollo de un modo sincronizado con la formación de hueso que reemplazara gran parte del molde de cartílago, esto depende de la diferenciación celular de los condrocitos de la placa de crecimiento (PC), depende de esta estructura el largo de los huesos en los vertebrados neonatos hasta la etapa juvenil temprana cuando dejan de crecer.

Placa de crecimiento

La PC es una estructura especializada responsable del crecimiento lineal de los huesos. En los huesos largos maduros se localiza entre la diáfisis y el centro de osificación secundario (COS). Está organizada en cuatro estratos o zonas que presentan distintos grados de diferenciación celular de condrocitos, estos se organizan en columnas. La zona más cercana al COS se compone de células con poca actividad proliferativa conocidos como condrocitos en reposo; inmediatamente bajo esta zona se encuentran los condrocitos en proliferación que generalmente se encuentran en grupos de varias células apiladas llamados condrones; la tercera zona son los condrocitos prehipertróficos con mayor volumen celular; y finalmente la cuarta zona, la mas cercana a la diáfisis contiene a los condrocitos hipertróficos (Bengtsson *et al.*, 2005) (Figura 2).

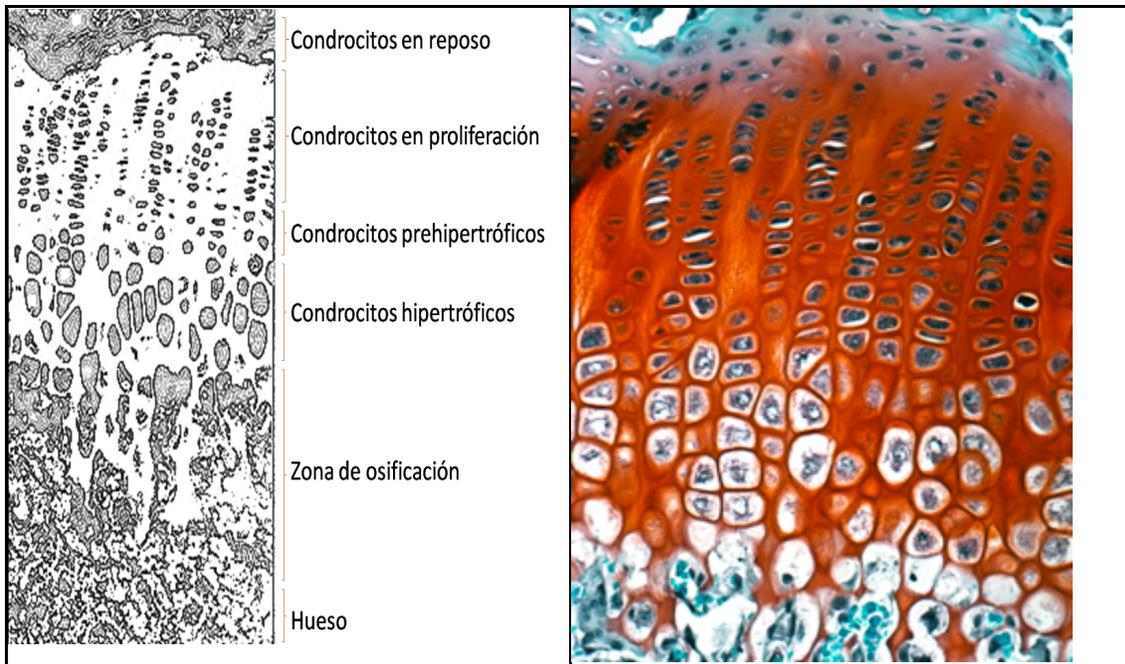


Figura 2. La placa de crecimiento tiene condrocitos organizados en diferentes estados de diferenciación celular: reposo, proliferación, prehipertróficos, hipertróficos. Bajo la zona de los condrocitos hipertróficos se encuentra la zona de osificación o collar óseo. En la imagen de la derecha una PC donde se observan proteoglicanos teñidos con Safranina O (Garcíadiago, 2010).

La proliferación, diferenciación y la hipertrofia de los condrocitos está regulada por diversos factores de crecimiento y transcripción que regulan la expresión de genes cuyos productos estimulan el desarrollo de la PC y la formación de hueso. Los condrocitos hipertróficos de la PC al morir por apoptosis mediante señales de su medio extracelular son removidos de la diáfisis (Ducy *et al.*, 1977) (Figura 1C).

Indian hedgehog regula la hipertrofia de los condrocitos en la placa de crecimiento

Los mamíferos presentan tres genes de la familia Hedgehog que reciben el nombre de: *Sonic hedgehog (Shh)*, *Indian hedgehog (Ihh)* y *Desert hedgehog (Dhh)* y son homólogos del gen *Hedgehog (Hh)* de *Drosophila*. Durante el desarrollo de las extremidades el papel de Ihh es muy importante ya que coordina la proliferación y la diferenciación de los condrocitos de la placa de crecimiento, y también incrementa la proliferación de los condrocitos en la zona periarticular, este gen induce la expresión de la hormona paratiroides proteína relacionada (PTHrP) que se expresa en el pericondrio mientras su receptor PPR se expresa en la zona alta de los condrocitos en proliferación. PTHrP regula la tasa a la que los condrocitos salen del ciclo celular y siguen a la hipertrofia, (Schipani *et al.*,1995). A medida que la placa crece la distancia debilita el efecto de Ihh sobre PTHrP (Vortkamp *et al.*,1996). Al unirse Ihh con su receptor Patched-1 (ptch-1) proteína integral de membrana, permiten que Smoothened (Smo) proteína con siete dominios transmembrana (emparentada con la familia de los receptores Frizzled de Wnt) se desplace (a partir de vesículas intracelulares) y acumule en la superficie celular, donde se transloca a los cilios e inicia una cascada de transducción de la señal que culmina con la modulación de la actividad de los factores de transcripción Gli. En ausencia de Ihh, Patch-1 reprime la actividad de Smo lo que se traduce en la fosforilación de Gli y su subsecuente procesamiento proteolítico originando que se transloque al núcleo donde reprime la transcripción de los genes diana de Ihh. (van Donkelaar y Huiskes, 2007; Kobayashi *et al.*, 2005). Se ha sugerido que la PTHrP regula los efectos de Ihh a través de la formación de un bucle de retroalimentación negativa (Figura 3). Si los condrocitos dejan de expresar Ihh continúan su maduración hacia la hipertrofia y se activa la

expresión de *Runx2* y *Runx3* en el pericondrio que inducen su diferenciación a osteoblastos (Yoshida *et al.*, 2004).

Minina y *cols.* demostraron que la regulación de la proliferación en la placa de crecimiento requiere de las señales generadas por Ihh y BMP ya que ambas actúan en paralelo, el papel de BMP es retrasar el proceso de diferenciación hipertrófico por una vía independiente de la señalización Ihh/PTHrP (Minina *et al.*, 2010)

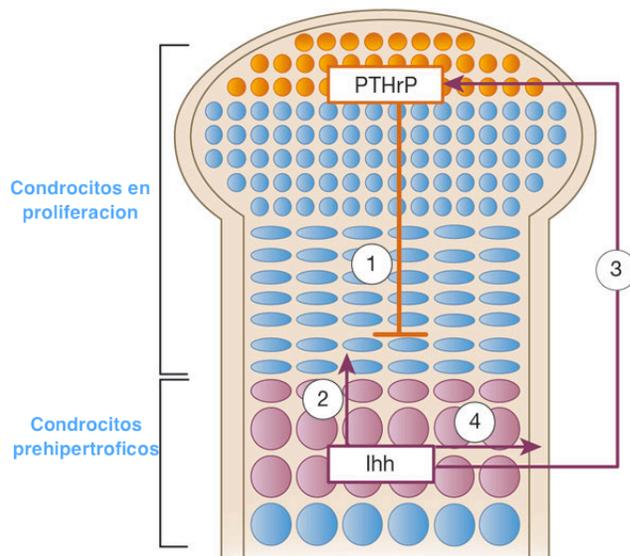


Figura 3. Las células del pericondrio y los condrocitos de los extremos de los huesos largos secretan PTHrP (1). PTHrP actúa sobre los receptores de la proliferación de condrocitos y, por lo tanto, retrasa la producción de Ihh. Cuando la fuente de la producción de PTHrP es lo suficientemente distante, los condrocitos que disminuyen su actividad proliferativa empiezan a producir Ihh. Ihh aumenta la tasa de proliferación (2) a través de un mecanismo induce la producción de PTHrP en los extremos de los huesos en desarrollo (3). Ihh también actúa sobre las células pericondrial para convertir estas células en osteoblastos de la clavícula (4). (Kronenberg, 2003; Aguirre, 2011).

La molécula ciclopamina es capaz de inhibir la señalización de hedgehog al unirse a Smo evitando la traducción de señal.

Centro de osificación primario

El espacio que dejan en el centro del elemento esquelético los condrocitos que mueren por apoptosis, se convertirá en el espacio de la médula ósea también conocida como centro de osificación primario (COP). Esta zona es invadida por osteoclastos y osteoblastos y al mismo tiempo por vasos sanguíneos circundantes (Figura 1 D- 1 H) (Zuscik et al., 2008). La invasión de vasos sanguíneos es promovida por el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), proteína que estimula la formación de vasos sanguíneos, siendo éste el último aspecto de la esqueletogénesis. (Gerber et al., 1999). La matriz residual sirve de andamio para la deposición de minerales. El pericondrio que se encuentra comprometido con la diferenciación celular de los condrocitos, presenta características diferentes, si, está adyacente al hueso formado, al que entonces se le llama periostio el cual expresa *Runx2*, que es un marcador molecular de la diferenciación osteoblástica, *Runx2* también se expresa en los condrocitos hipertróficos y promueve la maduración de los condrocitos, conduciéndolos a la hipertrofia (Hinoi et al., 2006).

La zona cercana a los condrocitos hipertróficos es llamada collar óseo (Figura 2). Finalmente, todo el cartílago central es sustituido por hueso (Figura 1D-H). Haaijman y *cols.* (1999) aseguran que la BMP7 modula la diferenciación terminal de los condrocitos y la mineralización del hueso a través de una vía desconocida, producida en la región periarticular. Las BMP7 y BMP2 inducen al crecimiento radial del cartílago, antes de la diferenciación hipertrófica (Macias et al., 1997). Esta estructura mineralizada y alargada se denomina diáfisis y los extremos de cada extremidad se encuentra la epífisis donde también se encuentran en la superficie solo condrocitos articulares, antes de un segundo evento de osificación.

Centro de osificación secundario

La zona central de la epífisis es invadida por vasos sanguíneos, esto activa la maduración de cartílago y se forma hueso de crecimiento circunferencial (Figura 1 H). Este proceso comienza con la formación de canales de cartílago, lo cual responde a una invaginación del pericondrio. En la zona central se expresa VEGF (Blumer *et al.*, 2008; Morini *et al.*, 2004), los nutrientes y vasos sanguíneos se transportan por los canales de cartílago, lo cual promueve la hipertrofia de los condrocitos. Es importante la presencia de la Metaloproteasa-9 (MMP-9) la cual se encarga de degradar la matriz y la expresión de *Runx2* activa la diferenciación de los condrocitos y la formación de hueso (Alvarez *et al.*, 2005).

Articulación

Durante el desarrollo del esqueleto apendicular y axial se forman las articulaciones, una vez establecido el molde de cartílago continuo constituido por condensaciones precartilaginosas (Pitsillides y Ashhurst, 2008) (Figura 4 A), estos elementos esqueléticos crecen longitudinalmente, y en el caso de la extremidad se ramifican y forman una “Y”, a cual conforman la región del estilópodo (húmero / fémur) y el zeugópodo (radio y ulna / tibia y peroné), posteriormente se forman los rayos digitales en la región del autópedo (Hamrick, 2001). La siguiente fase es la separación o segmentación del elemento cartilaginoso continuo para que se forme la cavidad de la articulación con sus elementos correspondientes; el cartílago articular, la sinovia, los tendones, ligamentos, etc. Esto ocurre mediante un proceso complejo que implica la pérdida del fenotipo condrogénico y sus marcadores moleculares como *Sox9*, ocurre también muerte celular programada en la zona o región donde se segmentara o

separa el molde continuo de cartílago (Pitsillides y Ashhurst., 2008), a esta región, determinada para formar la articulación se le conoce como interzona.

La interzona es la primera evidencia de la articulación, se caracteriza por ser una región de células mesenquimales estrechamente unidas y aplanadas, apiladas en tres capas de células (Holder, 1977; Mitrovic,1978) (Figura 4 B), que producen colágena tipo I y III (Ito y Kida, 2000). La capa central conocida como lámina central es menos densa que las dos capas contiguas, y desarrolla muerte celular programada (Figura C) y en su lugar deja una cavidad, que se transformará en la cavidad sinovial (Haines, 1947; Archer et al., 1994) (Figura 4 D), las dos capas contiguas precondrogénicas producirán el cartílago hialino articular. Durante la formación de la articulación disminuye la cantidad de MEC, lo cual modifica las interacciones entre las células y promueve la muerte celular. Durante el proceso de cavitación se promueve la síntesis de hialuronato y su receptor (CD44) (Archer et al, 2003; Edwards et al, 1994).

El mecanismo molecular por el cual se forman las articulaciones incluye principalmente al gen *Wnt9a* (antes *Wnt14*), la sobreexpresión de *Wnt9a* induce la formación de la articulación, y lo hace bloqueando la condrogénesis, ya que es capaz de inhibir la expresión de *Sox9*, e inducir la expresión de marcadores de la articulación como GDF5, autotaxina y CD44 (Hartmann y Tabin, 2001). *Gdf5* es una molécula clave en la proliferación y maduración del cartílago, por lo que también es importante en el desarrollo de la articulación, al bloquear su expresión se inhibe la formación de la articulación en los dígitos de ratón, pero paradójicamente la sobreexpresión de *Gdf5* también inhibe la formación de articulaciones (Merino et al, 1999); la explicación a este problema podría deberse a que las células de la interzona responden a un gradiente de *Gdf5*. En el mismo sentido, también se ha observado que en la presencia de antagonistas de BMP (*Gdf5* pertenece a este grupo de moléculas), como nogina y cordina

se inhibe la formación de las articulaciones (Koyama et al., 2007; Francis-West et al., 1999).

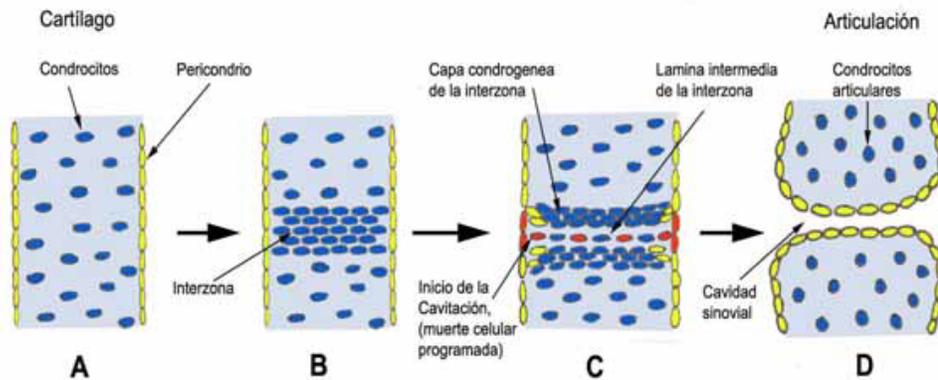


Figura 4. Formación de la articulación: en el molde de cartilago se forma una estructura de células aplanadas denominada interzona, la capa intermedia de estas células muere por apoptosis, finalmente se forma la cavidad sinovial. (Garcíadiago, 2005).

Cartílago articular

El cartílago articular (CA) es una delgada de tejido que rodea al centro de osificación secundario, es decir que cubre los extremos de los huesos largos de la articulación sinovial, este tejido conectivo se compone de abundante matriz extracelular y poblaciones de condrocitos poco densas, los cuales modulan su propia matriz para mantener la homeostasia del tejido (Michael *et al.*, 2008). Es un material biológico viscoelástico de color blanco-azulado translúcido en el que predomina una matriz hidrofílica, debido a la gran cantidad de glicosaminoglicanos. A pesar de tener un grosor de escasos milímetros (2-4 mm), tiene una función importante en el esqueleto (Karamboulas, 2010). Su función principal es amortiguar las cargas de compresión entre las superficies óseas de la

articulación, así como participar, primordialmente, en el sistema de lubricación de la membrana sinovial durante el movimiento (McDevitt, 1973) y con ello evita el dolor articular y la deformación de la articulación (Dy *et al.*, 2010).

Un CA sano está compuesto de glicosaminoglicanos y colágena tipo II, agua en un 75 % y condrocitos, los cuales son solo un 10% en volumen de este tejido. El CA no contiene membranas basales, nervios, vasos linfáticos o vasos sanguíneos (McDevitt, 1973). El acceso a los nutrimentos y la eliminación de los residuos del recambio metabólico se produce por difusión a través de la matriz extracelular y son conducidos hacia la cavidad sinovial hasta la circulación sanguínea. Por la baja concentración de oxígeno en el ambiente en el que se encuentran los condrocitos, su metabolismo es fundamentalmente anaerobio. Estas células sintetizan todas las macromoléculas como las fibras de colágena, otras glicoproteínas y proteoglicanos como el agregano, además de las enzimas que participan en la síntesis y degradación de la MEC. Por estas funciones es evidente que tienen un papel importante en la remodelación y reparación del cartílago articular cuando se daña. En el CA se expresa *TGFβ1* factor importante para mantener la homeostasis del cartílago, ya que induce la síntesis de GAG y de colágena tipo II entre otros elementos de la MEC (Morales y Roberts, 1988).

Sopena y *cols.* (2000) describen cuatro zonas en el CA: la capa superficial o de deslizamiento (40 μm), esta capa presenta escasa actividad metabólica, pocos proteoglicanos (PG) y una elevada concentración de fibras de colágena distribuidas perpendicularmente entre sí y paralelas a la superficie; además, soporta las fuerzas de presión mecánica externa y los condrocitos presentes son de forma aplanada y paralelos a la superficie. La capa intermedia o de transición (500 μm), presenta elevada actividad metabólica, mayor presencia de PG y menos fibras de colágena y arreglada oblicuamente y al azar, soporta fuerzas de

compresión y los condrocitos presentes son más redondos. La capa profunda o radial (100µm), es rica en PG y fibras de colágena que se distribuye radialmente formando arcos, las células son redondas y forman columnas, esta zona soporta fuerzas de compresión. Finalmente, la capa calcificada (300 µm) no presenta PG, las fibras de colágena están dispuesta radialmente, presenta cristales de hidroxapatita y está adyacente al hueso subcondral, es la capa de anclaje del cartílago al hueso, tiene poca celularidad y está separada de la capa anterior por la “Marca de Agua” (tidemark) con 5 µm de grosor, la cual es una barrera ondulada con disposición tangencial de sus fibras y que permite soportar fuerzas de cizallamiento (Sopena *et al.*, 2000) (Figura 5).

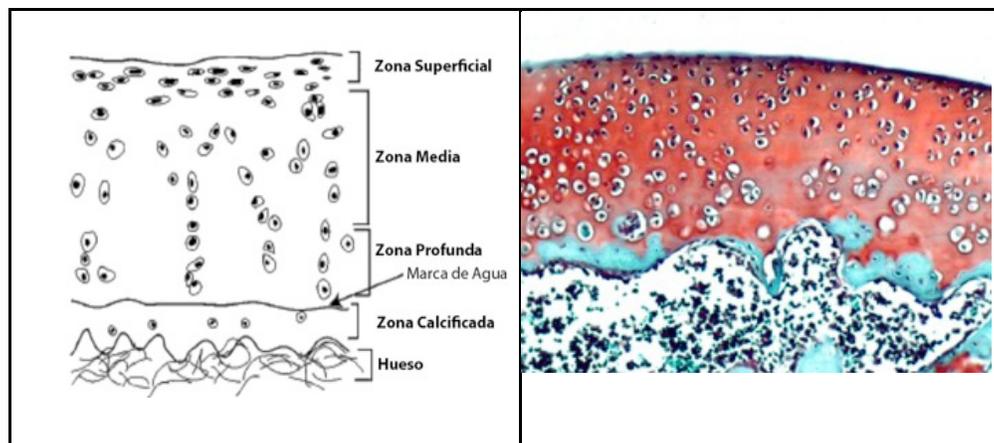


Figura. 5. Derecha. Esquema de capas de cartílago articular donde se encuentran estados diferenciados de condrocitos. Izquierda cartílago articular con tinción Safranina O que indica presencia de proteoglicanos (GarciaDiego, 2010).

Debido a que el cartílago es avascular y posee baja densidad celular, tiene poca capacidad de reparación, por lo que muchos investigadores han investigado acerca de cómo reparar este tejido, algunos como Waldman y *co/s.* (2009) aceleraron la acumulación de matriz en CA dañado mediante estimulación mecánica y así incrementaron la síntesis de colágena, pero ello no ha sido suficiente ya que mantener la homeostasia de este tejido implica el buen funcionamiento de una compleja red de interacciones entre proteínas, factores de crecimiento, expresión de genes, cascadas de señalización etc., que son llevadas a cabo dentro y fuera de los condrocitos.

Condrocitos del cartílago articular

Los condrocitos articulares se encargan de mantener la función de la articulación, así que conservan un fenotipo estable capaz de producir todos los componentes macromoleculares necesarios (Pacifci *et al.*, 2006). Estos presentan bajos índices de proliferación, se encuentran aislados o en conglomerados de pocas células. En el área pericelular de los condrocitos se encuentra una estructura llamada laguna, rica en proteoglicanos y ácido hialurónico (HA), también se encuentra una matriz o cápsula de colágena tipo II que rodea o encapsula a los condrocitos solitarios o en grupo (condrón) (Roy y Meachim, 1968; Rothwell y Bentley, 1973; Oegema y Thompson, 1981). En condiciones normales los condrocitos embebidos en la MEC del CA tienen mayor adherencia a colágena II, que a colágena I, X y XI. Se ha determinado que a medida que los condrocitos se diferencian al estado hipertrófico, la colágena II es reemplazada por colágena tipo I (Darling *et al.*, 2009).

La hipertrofia de los condrocitos puede acelerarse en presencia de Wnt4 y/o Wnt8 (Hartmann y Tabin, 2000). La β -catenina transduce la señalización wnt y actúa como inhibidor en la proliferación de los condrocitos (Day *et al.*, 2005), y por otro lado Runx2 induce la secreción de Fgf18 el cual inhibe la proliferación de los condrocitos y la hipertrofia. HIF-1 α tiene el mismo efecto sobre los condrocitos (Schipani *et al.*, 2001), mientras que el FGFR3 el cual es receptor de Fgf18 controla la hipertrofia de los condrocitos. (Murakami *et al.* 2004).

Como ya se ha mencionado antes los condrocitos articulares se encargan de secretar una compleja red de macromoléculas denominada matriz extracelular (MEC), con la cual tienen interacciones muy importantes para mantener el funcionamiento normal del cartílago, por ello es importante revisar las funciones de los componentes principales de la MEC del cartílago articular.

Proteínas de la matriz extracelular del cartílago articular

A lo largo de la vida, el tejido se somete a la remodelación interna continua, las células reemplazan a macromoléculas que la matriz pierde por la degradación. La capacidad de recambio de la matriz depende de que las células detecten las alteraciones y su capacidad de responder a la síntesis de tipos apropiados y cantidades de nuevas moléculas (Buckwalter y Mankin, 1998). La matriz extracelular (MEC) tiene funciones muy diversas, en el cartílago es el soporte fundamental que le confiere resistencia mecánica al tejido (Baynes *et al.*, 2005) y contribuye en gran medida a su manutención. Los componentes de la MEC forman un lecho gelatinoso tridimensional en el cual las células que les secretan se encuentran “inmersas”. Las proteínas de la MEC pueden interaccionar con

las células a través de receptores de la superficie celular como las integrinas, capaces de transmitir señales mecánicas de compresión y tensión celular y señales químicas (Figura 6). Los cambios en la composición y recambio se asocian a enfermedades crónicas como la artritis y fibrosis. (Baynes *et al.*, 2005).

En la red macromolecular de la MEC del cartílago articular se encuentran colágenas, fibronectina, agrecano, ácido hialurónico y otros componentes; sin embargo, para el presente trabajo nos enfocaremos solo en los antes mencionados.

Las colágenas son una familia de proteínas que resulta ser la más abundante en los metazoarios. Actualmente se conocen 27 tipos de colágenas (Fitzpatrick, 2009), se encuentra en la piel, tendones, córnea, dientes, hueso y cartílago. En el cartílago articular ocupa aproximadamente dos terceras partes del peso seco de los componentes tisulares, la principal función de las fibras colágenas del cartílago es formar una red estable para contrarrestar la presión, por el aumento de volumen generada por los agregados de proteoglicanos altamente hidratados.

La mayor parte de la colágena presente en el cartílago articular es la colágena tipo II, aunque también hay cantidades pequeñas de colágena tipo IX, X y XI (Weckman y Cabral, 1996; Eyre, 2001). Las colágenas pueden formar fibras, fibrillas, redes y bandas; sus principales características físicas son resistencia a la tracción y flexibilidad (Koolman *et al.*, 2005). Las colágenas fibrilares se forman por el plegamiento de tres cadenas polipeptídicas en conformación α -hélice, debido a la secuencia repetitiva de los aminoácidos Gli-X-Y única de la colágena; el aminoácido X generalmente es prolina y el Y lisina. Esta estructura helicoidal se distingue como cadena α , las tres cadenas α se superenrollan mutuamente para formar la varilla o cable estabilizado por puentes de hidrógeno intercadena (Baynes *et al.*, 2005; Berg *et al.*, 2008). Las fibrillas de colágena tipos I, II, III, V y XI se forman a partir de dos tipos de

cadena α distintas (Baynes *et al.*, 2005). Actualmente, se conocen tres tipos de receptores para la colágena: 1) los receptores de tirosina cinasas DDR1 y DDR2 (receptores con dominio de discoidina), 2) algunas integrinas de la familia $\beta 1$: $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$ y $\alpha 11\beta 1$ y 3) la glicoproteína VI (Vogel, 2001).

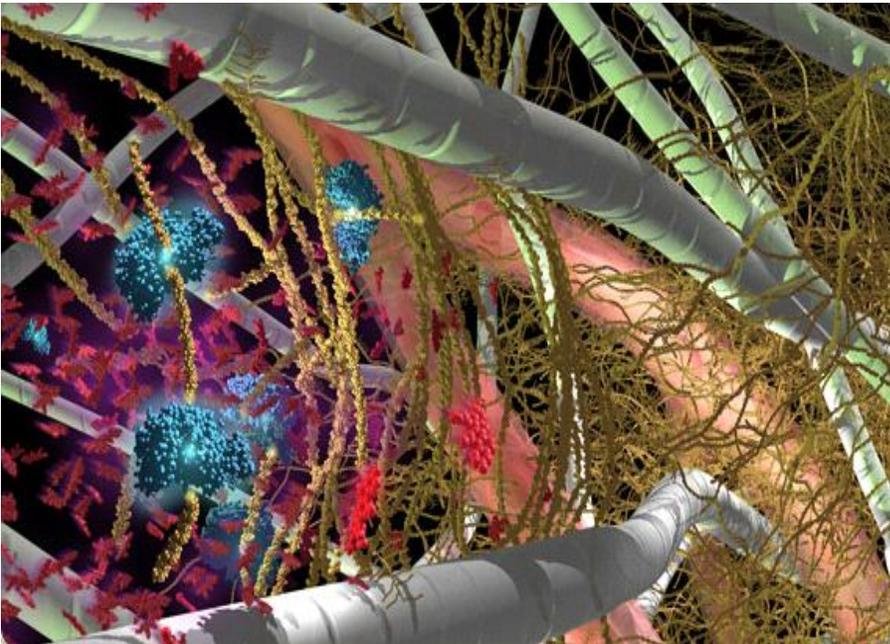


Figura 6. La matriz extracelular de cartilago articular es un soporte que le confiere resistencia al tejido, sus componentes Interactúan con los condrocitos a través de las integrinas (Osteoarthritis Research Society international, 2010).

Las colágenas tienen un papel fundamental en la regulación de la diferenciación celular y la formación del patrón de desarrollo del esqueleto durante la embriogénesis y el desarrollo postnatal. La perturbación en el metabolismo de las colágenas fibrilares esta correlacionado con enfermedades como la fibrosis hepática, glomerulonefritis, enfermedades

vasculares, angiogénesis tumoral y Osteoartritis (Millyharju, 2001). En el CA la colágena conforma una malla fibrilar que le proporciona rigidez y resistencia a la fuerza de tracción en la articulación (Buckwalter y Mankin, 1998).

La fibronectina es un dímero filamentoso formado por dos cadenas polipeptídicas emparentadas, unidas por puentes disulfuro. Esta glicoproteína multifuncional tiene un papel importante en diversas funciones como la adhesión, migración y diferenciación celular, así como en la organización del citoesqueleto. Es una proteína con multidominios clásicos; cada uno de los dominios I, II y III, tienen unidades o módulos homólogos repetidos. Mediante sus dominios puede interactuar con colágenas, proteoglicanos y receptores de la superficie celular como las integrinas (Baynes *et al.*, 2005; Koolman *et al.*, 2005). La fibronectina presenta en su estructura algunas secuencias peptídicas RGD (Arginina-Glicina-Acido Aspártico) de reconocimiento con sus receptores, las cuales contribuyen a mantener la interacción entre los componentes de la MEC y la superficie celular.

En el CA normal se presenta en poca cantidad y en CA osteoartítico es mayor debido a un aumento de síntesis por los condrocitos y acumulación en la MEC. Aun no está claro si el aumento de la síntesis de la fibronectina en la OA actúa como una respuesta de los condrocitos para la reparación del cartílago, o si actúa como un desencadenante efecto perjudicial, ya que este aumento puede alterar el fenotipo de los condrocitos, la síntesis de colágena e inducir la actividad de metaloproteasas (Chevalier, 1993).

Los proteoglicanos (PG) son complejos macromoleculares formados por la asociación covalente entre una cadena polipeptídica llamada proteína núcleo o proteína central y varias cadenas de glicosaminoglicanos (GAG). Los GAG son polímeros de unidades repetitivas de disacáridos, formados por hexosamina y ácido hexaúronico que presentan diferentes niveles de sulfatación. Los principales GAG son

condroitín sulfato, queratán sulfato, heparina, heparán sulfato y dermatán sulfato (Baynes *et al.* , 2005). El número de cadenas de GAG de un PG varía de 1 a 100. El tamaño del PG depende del tamaño de la proteína núcleo (Silvera y Barrios, 2002). Los proteoglicanos del cartílago almacenan grandes cantidades de agua llenando el espacio entre los componentes de la MEC. Forman un gel en la MEC a partir de complejos moleculares sumamente grandes, compuestos por un 95% de hidratos de carbono y 5 % de proteínas.

En el cartílago un proteoglicano esencial e importante en la caracterización de este tejido es el agregano, el cual amortigua las fuerzas de compresión debido a que el agua que absorbe le capacita para recuperar su estructura después de ser deformado. Esta molécula está formada por 2397 residuos de aminoácidos, con tres dominios globulares, el sitio de inserción de los glicosaminoglicanos se extiende entre el dominio 2 y 3 que sirve como sitio de unión para el queratán sulfato y condroitín sulfato y en el dominio globular 1 puede unirse a hialuronato (Berg *et al.*, 2008). El agregano tiene una estructura en forma de cepillo y se une a un eje de hialuronato al cual se le unen gran cantidad de proteínas que a su vez llevan unidas cadenas largas de polisacáridos pertenecientes al grupo de los glicosaminoglicanos (Koolman *et al.*, 2005).

El ácido hialurónico es el único GAG que no se une a la cadena peptídica; tiene un papel muy importante en la migración celular. Facilita la hidratación de los tejidos, debido a la gran cantidad de radicales libres, que se ligan a las moléculas de agua. Así que la hidratación del CA depende de la concentración y el estado fisiológico del ácido hialurónico (Silvera y Barrios, 2002). La porción proteica de los proteoglicanos es degradada por proteasas lisosomales y las cadenas de los GAG por hidrolasas ácidas lisosomales (Baynes *et al.*, 2005).

La MEC actúa como un transductor de señales de las células. La carga de los tejidos debido al uso de la articulación crea señales mecánicas, eléctricas y químicas que ayudan a dirigir la actividad de

síntesis y degradación de la misma, llevado a cabo por los condrocitos. (Buckwalter y Mankin, 1998). Es importante revisar el papel de las integrinas en la conducción de señales entre ésta y los condrocitos.

Integrinas

Durante el desarrollo embrionario y la organogénesis, las células y tejidos muestran diferentes tipos de comportamiento biológico, dependiendo de las señales extracelulares; ya sea por la afinidad en la adhesión a sustratos extracelulares, por la dirección en la migración y por su tasa de proliferación. Muchas de esas funciones están vinculadas a la función de las integrinas (Yamada y Miyamoto, 1995), por un tipo de señalización desde el interior de la célula hacia el exterior o viceversa (Hughes *et al.*, 1996).

Las integrinas son una familia de receptores de superficie celular (Humphries, 2000), son proteínas heterodiméricas compuestas por una subunidad alfa y una beta, las cuales están asociadas mediante enlaces no covalentes. Pertenecen a las glicoproteínas transmembranales de tipo I (Bokel y Brown, 2002). Cada subunidad tiene en su dominio extracelular de 700 a 1100 residuos de aminoácidos, mientras que en su dominio intracelular poseen de 30 a 50 residuos (Humphries, 2000).

Se sabe que intervienen en múltiples procesos celulares como en la diferenciación, proliferación, supervivencia, migración y apoptosis. La unión del sustrato a las integrinas estimula en la célula una cascada de señalización hacia dentro y hacia afuera de la misma, que afecta la expresión genética (Wang *et al.*, 2011). Tales interacciones regulan la transducción de señales de componentes involucrados en procesos de

señalización como la MAPK y CDK (Bokel *et al.*, 2002), pero hasta la fecha se desconocen todos estos procesos a profundidad.

En los mamíferos se han identificado 18 subunidades α y 8 β , con estas moléculas se pueden formar 24 combinaciones α - β las cuales han sido identificadas a nivel de proteína. La familia β 1 de las integrinas en su dominio extracelular reconoce moléculas como fibronectina, laminina, colágena, vitronectina, etc., mientras que su región interna se une al citoesqueleto (Millward-Sadler *et al.*, 2000) por medio de proteínas como talina o α -actina (Wiesner *et al.*, 2005). El reconocimiento de cada integrina con su ligando es específico, y a su vez, varios tipos de integrinas se pueden unir a un mismo tipo de ligando; por ejemplo dentro de la familia β 1: α 1 β 1, α 2 β 1, α 10 β 1 se unen a colágenas; α 4 β 1, α 5 β 1, α 8 β 1 y α V β 1 se unen a fibronectina; así como α 1 β 1, α 2 β 1 se pueden unir a laminina y a α 3 β 1, α 6 β 1 y α 7 β 1 (Humphries, 2000). La secuencia RGD puede ser reconocida por cinco tipos de integrinas: α 5 β 1, α 8 β 1, α V β 3, α V β 5, α V β 6 (Humphries *et al.*, 2006).

Las integrinas no están activas todo el tiempo, en ocasiones se encuentran en un estado inactivo, durante el cual no se unen a los ligandos; eso impide por ejemplo, en las plaquetas, que α IIb β 3 se unan permanentemente al fibrinógeno y se ocasione una trombosis (Shattil y Newman, 2004; Arias-Salgado *et al.*, 2005). Diversos estudios han demostrado que la integrina inactiva tiene la región extracelular doblada, presentando una forma lineal cuando se encuentra activa. Dicha activación puede ser por la unión al ligando o por algún estímulo del dominio citoplasmático (Luo y Springer, 2006) (Figura 2).

La importancia de las integrinas de la familia β 1 se ha observado en el desarrollo del ratón, al bloquear su expresión ocurre deterioro de la masa celular interna y la no formación de al menos 12 receptores que se forman con este dímero. La fertilización de ovocitos β 1 nulos puede ocurrir, debido quizá a la presencia de mRNA maternos de integrina β 1. Si

se pierde la expresión de la familia $\beta 1$ resulta en un acomodo anormal de la membrana basal de ratón (Bouvard *et al.*, 2001).

La señalización de la MEC vía la subunidad $\beta 1$ tiene un papel importante durante la condrogénesis. En cultivos de condrocitos de pollo se ha encontrado evidencia de apoptosis celular en presencia de anticuerpos neutralizantes para la subunidad $\beta 1$, y también se ha demostrado que las señales de supervivencia de los condrocitos se transmiten vía $\alpha 5\beta 1$ que interacciona con fibronectina como su ligando (Pulai *et al.*, 2000). La falta de $\beta 1$ en el desarrollo embrionario de ratón genera en la rodilla condrodisplasia, un retardo o irregularidad en la formación del cartílago, aumentando las posibilidades de muerte al nacer (Aszodi *et al.*, 2003). Radunu y cols. (2009) observaron en un modelo murino que la supresión del gen de la subunidad de integrina $\beta 1$ genera anomalías en el CA y en la cavidad sinovial pero no afecta la degradación del mismo.

Cuando ocurre la unión al ligando las cadenas citoplasmáticas se separan, lo que permite la interacción de la cadena β con las moléculas intracelulares de transducción de señales como talina, Rho, FAK (cinasa de adhesión focal), ILK (cinasa ligada a integrina) generando cascadas de señalización dentro de la célula como: aumento en la dinámica del citoesqueleto, movilidad celular, supervivencia celular y proliferación (Martínez y Steward, 2002; Tadokoro *et al.*, 2003), recíprocamente, la separación de la talina y o de otros activadores de los dominios citoplasmáticos pudiera activar al sitio de unión extracelular, es decir la señalización de adentro hacia fuera (Petrich, 2009). Por ejemplo la supresión del gen *talina 1* en megacariocitos de ratón los cuales son precursores plaquetas, inhibió la expresión de $\beta 1$ y $\beta 3$, provocando hemorragias espontáneas y sangrado patológico (Petrich *et al.*, 2007) (Figura 7).

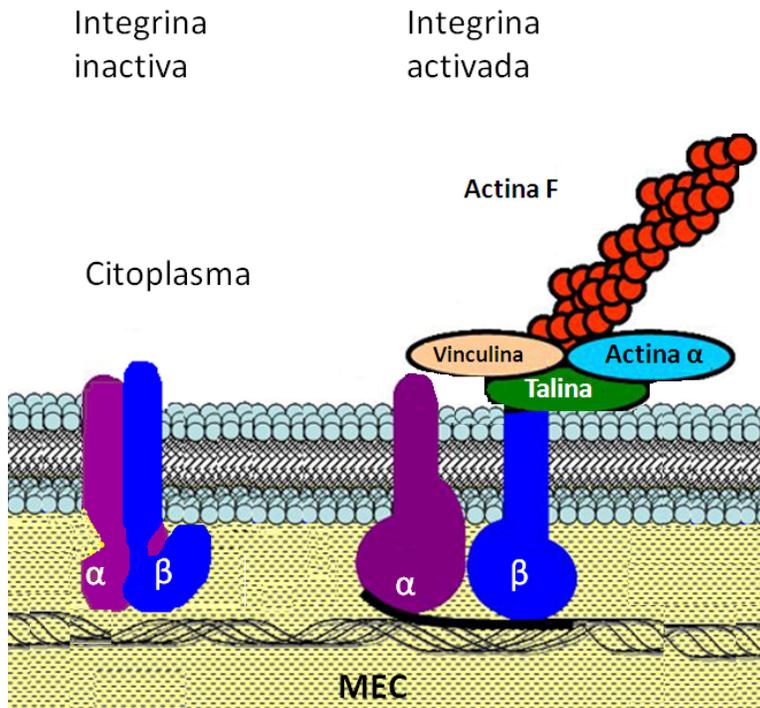


Figura 7. Integrinas en diferentes estados conformacionales. Las integrinas son receptores de la membrana celular, formadas por las subunidades α y β . Se encuentran en estado inactivo cuando no están unidas a su ligando, una vez activas las cadenas internas se separan y la cadena β puede unirse a una molécula intracelular..(Marie-Eve, 2009; Aguirre, 2011).

Recientemente se ha reportado que las integrinas pueden ser inducidas a expresarse o bien estar induciendo la expresión de BMP (Su *et al.*, 2010; Gouttenoire *et al.*, 2010).

Proteínas morfogenéticas del hueso

Las BMP fueron descubiertas en 1965 por Marshall Urist quien encontró actividad colagenolítica en fragmentos descalcificados de la MEC de hueso, al ser injertados intramuscularmente o subcutáneamente en ratones o conejos (Urist, 1965); después, en 1980 Hanamura se encargó de disolver la molécula con actividad y purificarla (Hanamura *et al.*, 1980); para 1988 ya se habían clonado las BMP2 y BMP3 que fueron responsables de la formación de hueso ectópico (Wozney, *et al.*,1988); actualmente se conocen veinte tipos de BMP entre las cuales se encuentran los factores de crecimiento y diferenciación (GDF).

Las BMP pertenecen a la súper familia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Los miembros de la súper familia del TGF- β son reguladores multifuncionales de la proliferación y diferenciación de una amplia variedad de tipos celulares (Cheifetz *et al.*, 1990.) Estas moléculas, también conocidas como citocinas funcionales, participan en muchos procesos de señalización en la organogénesis, diferenciación de tejidos, organización dorso ventral, reparación tisular, respuesta inmune; además de participar en la morfogénesis ósea, la angiogénesis y vasculogénesis. (Lowery y Caestecker, 2010; Miyazono *et al.*, 2010; Friedrichs *et al.*, 2011).

La unión de los TGF- β a sus receptores de membrana, que son del tipo serina/treonina cinasas, provoca dentro de la célula una cascada de fosforilaciones y la activación de moléculas de transducción como las Smad. Cuando la vía se activa, estas proteínas se trasladan al núcleo, activando genes diana, uniéndose al DNA directa o indirectamente mediante proteínas de unión al DNA. Concretamente, las BMP pueden activar a Smad1/5/8 / 4 (Figura 8). Los antagonistas específicos de las BMP, son péptidos extracelulares que compiten con los receptores de las BMP modulando su actividad, se llaman noguina, cordina y miembros de la familia DAN (Miyazono, 1999; Kawabata y Miyazono,2010).

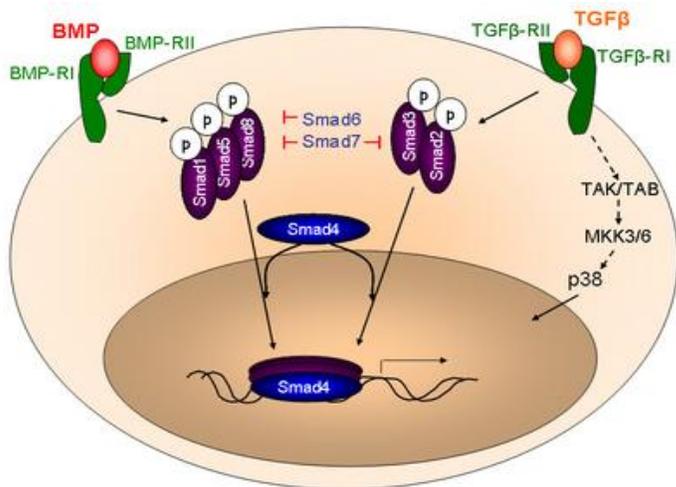


Figura 8. Esquema de la vía de señalización BMP. La BMP se une a su receptor de membrana, activando una cascada de señalización dentro de la célula por medio de proteínas smad que activan genes en el núcleo. (Oslo University Hospital.,2010).

Las BMP tienen un papel importante en el desarrollo del esqueleto, estando involucradas desde la determinación antero-posterior del embrión (Tucker *et al.*,2008), la condrogénesis, la formación de la articulación, hasta la formación del hueso.

Diversos estudios han demostrado que las BMP promueven y mantienen el fenotipo condrogénico, debido a su capacidad de estimular la síntesis de proteoglicanos. BMP3 también conocida como osteogenina induce la expresión de la actividad de fosfatasa alcalina y síntesis de colágena en el periostio en modelo murino, esta proteína también

incrementa la producción de proteoglicanos en condrocitos articulares de conejo (Vukicevic *et al.*,1989). Chen y *cols.* (1991) cultivaron células del mesodermo de extremidad de embrión de pollo y observaron que en presencia de BMP4 (BMP2B) se estimuló la formación de cartílago, evaluando con tinción Azul Alciano y con la positiva incorporación de fósforo radioactivo a proteoglicanos sulfatados de la MEC de condrocitos. Luyten y *cols.* compararon la cantidad de síntesis de proteoglicanos estimulada por BMP3 y BMP4 en condrocitos bovinos y observaron cantidades similares de proteoglicanos (Luyten *et al.*,1992).

Una de las BMP que más ha llamado la atención respecto a la esqueletogénesis y el mantenimiento de las células óseas ha sido BMP7 también conocida como OP-1. Durante el desarrollo de las extremidades de los vertebrados, la BMP7 se expresa fuertemente en el pericondrio, con interrupciones en la zona articular (Macias *et al.*,1997). En el 2000 Nishida y *cols.* aseguraron que la BMP7 en cultivo de condrocitos humanos estimuló la síntesis de ácido hialurónico (HA), CD44 los cuales contribuyen a la retención de la MEC y mRNA de agregano (Nishida *et al.*, 2000). Yu y *cols.* (2010) demostraron que BMP7 es capaz de inducir una regeneración latente de los dígitos amputados de ratón. Gruber y *cols.* (2001) indicaron que BMP7 aumentó la actividad mitótica y metabólica del periostio en un cultivo de células de ternero cultivadas en monocapa, aumentando la expresión del mRNA de osteocalcina y colágena I, los cuales son marcadores óseos, por lo cual sugieren que BMP7 puede regular la formación ósea y la reparación de las fracturas. Lee y *cols.* reportaron (2006) que rhBMP7, un péptido recombinante humano, el cual tiene una actividad biológica similar a BMP7 estimuló la expresión de los marcadores de los osteoblastos como fosfatasa alcalina y osteocalcina. Estos estudios sugirieron que la actividad de BMP7 puede estar actuando principalmente en el mantenimiento del pericondrio .

En contraparte, el factor de crecimiento y diferenciación-5 (GDF-5) que es otro miembro de las BMP, se ha reportado como una proteína que se expresa en la zona articular en desarrollo en el modelo de rata, capaz controlar el proceso de formación de la articulación. En el desarrollo de las extremidades de pollo GDF-5 promueve el desarrollo inicial de la condrogénesis (Francis-West *et al.*, 1999). En cultivo de micromasas de condrocitos aumenta la adhesión y la proliferación celular, puede incrementar el tamaño de los elementos esqueléticos al promover la proliferación del cartílago epifisial en el desarrollo tardío. Se observa aumento en la proliferación de los condrocitos cuando se sobreexpresa GDF5 en el embrión de pollo (Buxton *et al.*, 2001). La presencia de GDF5 es importante durante la formación de la articulación, la anulación de *gdf5* en el ratón *brachiopodism* ocasiona que no se formen las articulaciones, al igual que las mutaciones del gen CDPM1 en el humano , el cual es homólogo al gen *gdf5* (Kavanagh *et al.*, 2006; Polinkovsky *et al.*, 1997).

El funcionamiento del cartílago articular depende de la expresión de genes, la señalización de BMP, integrinas, proteínas de la MEC, etc., y si alguno de estos factores es suprimido se generan cambios importantes en el tejido capaces de ocasionar una de las enfermedades más común de las enfermedades articulares; la Osteoartritis.

Osteoartritis

La Osteoartritis es una patología crónica que afecta a las articulaciones, este padecimiento generalmente ocurre a avanzada edad, pero también pueden padecerla personas después de la mediana edad (Martin y Buckwalter, 2002), también puede ser causada a partir de una lesión

como el caso algunos deportistas, la obesidad es otra de las posibles causas debido a la carga y estrés mecánico al que tienen los condrocitos articulares. Sin embargo, existen casos de personas que padecen OA, que no presentan ninguna de las condicionantes antes mencionadas, esta variante de la OA se le conoce como OA primaria y se ha considerado que puede tener un origen genético (Yagi *et al.*,2005). Los tipos de OA, aunque pueden tener distintas etiologías, presentan características similares; cambios morfológicos, bioquímicos y mecánicos que conducen a la fibrosis del cartílago, pérdida del mismo tejido, osificación del cartílago (Buckwalter y Martin, 2006; Horton *et al.*,2005) y la reducción de la cavidad sinovial, debido a que la sinovia se inflama (Lendingham, 1995) (Figura 9).

Si se daña el cartílago articular a partir de una lesión o una enfermedad, por lo regular se genera un daño que resulta doloroso, generalmente después de inflamación, esto desencadena vascularización y formación de osteofitos, las cuales son características en el desarrollo de la Osteoartritis (OA).

Un daño patógeno o físico en el cartílago articular genera muerte celular y desbalance en la MEC. Inicialmente el cartílago hialino es degradado por la destrucción proteolítica de la matriz como la colágena tipo II y IX y el agregano (Martin y Buckwalter,2006; Mattheus *et al.*,1953; Bollet *et al.*,1963); sin embargo, la cantidad de colágena se mantiene constante, pero ocurre recambio de colágena II y IX por colágenas tipo I, en lo que parece un intento del organismo por reparar el CA, después algunas regiones de la articulación recambian esta colágena tipo I por colágena tipo X, lo que indica el inicio de la formación de osteofitos en la superficie articular (hueso ectópico). También la degradación de la matriz del cartílago libera fragmentos de colágena a la cavidad sinovial ocasionando un proceso inflamatorio. Los condrocitos interactúan con células inflamatorias infiltradas desde la sinovia al cartílago, estas células

inflamatorias secretan citocinas (Sutton *et al.*, 2009) como IL-1 β , IL-17, y IL-18. La producción crónica de citocinas conduce a la síntesis de las colagenasas como las metaloproteasas MMP-1, MMP-8, MMP-9 y MMP-13) y las agrecanasas ADAMTS4 y ADAMTS5, que impulsan la degradación de la matriz y erosión progresiva de la superficie articular (Smith,2006). También se produce una pérdida de proteoglicanos proporcional al tamaño de la lesión (Torres, 2008).

Posteriormente ocurre la fibrosis y erosión de la superficie del cartílago. En el cartílago erosionado disminuye la longitud de cadenas de condroitín sulfato y cambia la composición de varios glicosaminoglicanos. El contenido en queratán sulfato de los proteoglicanos disminuye en proporción al condroitín sulfato, la mayor parte de éste se encuentra en forma de condroitin-4-sulfato, en lugar del condroitín-6-sulfato típico en el cartílago adulto (Bollet *et al.*,1963; Horton, 2006).

La erosión del cartílago está directamente relacionada con la degradación de agrecano, de colágenas tipo II, IX y X; se ha observado que si se inhibe a la enzima ADAMTS-5 la cual degrada al agrecano, se reduce el daño en el CA de ratón (Little *et al.*, 2007). Las colágenas pueden ser degradadas por metaloproteasas (MMP), como la MMP-13 que degrada colágena tipo II (Minond *et al.*, 2006), mientras la deficiencia de la misma inhibe la degradación del cartílago (Little *et al.*, 2009). Si se sobreexpresa *ALK-1* (Activina-Cinasa-1) un receptor de TGF- β se incrementa la expresión de *MMP-13* y la sobreexpresión de *ALK-5* incrementa la expresión de *Agrecano*. Se ha observado en relación a ello que normalmente en ratones viejos disminuye la expresión de *ALK-5* (Blaney *et al.*, 2009), como consecuencia la disminución de agrecano. Por otra parte si se suprime la expresión de *TIMP-3* se incrementa la inflamación articular y en su presencia se reduce la respuesta inflamatoria (Mahmoodi *et al.*, 2005).

La regulación de la señalización de la familia de los TGF- β es importante en el mantenimiento del cartílago articular (Blaney Davidson *et al.*, 2009). TGF- β 3 tiene una alta expresión en el desarrollo de la osteoartritis ya que se encuentra en altas concentraciones en el desarrollo de osteofitos en rodillas de ratón osteoarthrítico (Blaney Davison *et al.*, 2007). Contrario a lo anterior TGF- β induce la expresión de TIMP-3, esta proteína inhibe a la MMP-13, TNF- α y ADAMTS4 el cual degrada agregano. La expresión de *MMP-13* es resultado de la actividad de IL-1 β y fragmentos de fibronectina (FN-f). La integrina α 5 β 1 es un receptor de FN-f y al unirse a dicho ligando es capaz de interactuar con tirosina rica en prolina quinasa (PYK2) y la quinasa de adhesión focal (FAK), para formar un complejo de señalización el cual aumenta la transcripción de Runx2 (Li *et al.*, 2007). En el CA humano osteoarthrítico, la integrina α 5b1, la fibronectina y sus fragmentos pueden unirse a e inducir la producción de las citocinas inflamatorias IL-6, IL8, IL-1B (Attur *et al.*, 2002).

Durante la Osteoartritis la membrana sinovial se inflama (Figura 7), ya que durante la degradación del cartílago articular las células sinoviales fagocitan los productos de degradación y activan la síntesis de proteasas y citocinas inflamatorias. Posteriormente, ocurre la remodelación del hueso subcondral y se forman estructuras óseas en la zona articular, llamados osteofitos. Recientemente Xiu y *co/s.* (2010) han encontrado una relación entre la formación de osteofitos y la presencia de IL-1 β , también se ha encontrado la expresión de TGF- β 1 y FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) en la superficie de osteofitos del fémur osteoarthrítico humano y en cantidades bajas, en la zona del CA (Uchino *et al.*, 2000).

Se ha encontrado que BMP2 se expresa en osteofitos de ratón (Blaney, 2006), esto indica que las BMP pueden estar regulando el proceso osteoarthrítico del CA. Cuanto mayor es la degradación del cartílago, aparece mayor cantidad de osteofitos. (Godefroy *et al.*, 2011). Se piensa que los osteofitos se forman a partir de células provenientes de la sangre como resultado de la invasión de vasos sanguíneos en las

zonas del cartílago degenerado (Trueta, 1968). Durante la OA se activa la proliferación de células endoteliales, resultando en la formación de nuevos vasos (angiogénesis), además hay aumento de la infiltración de macrófagos y de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en la membrana sinovial; de modo que la neovascularización sinovial se debe a la sinovitis (inflamación de la sinovia). Es importante la invasión de vasos sanguíneos para que ocurra la osificación endocondral en la formación de los osteofitos (Haywood *et al.*, 2003).

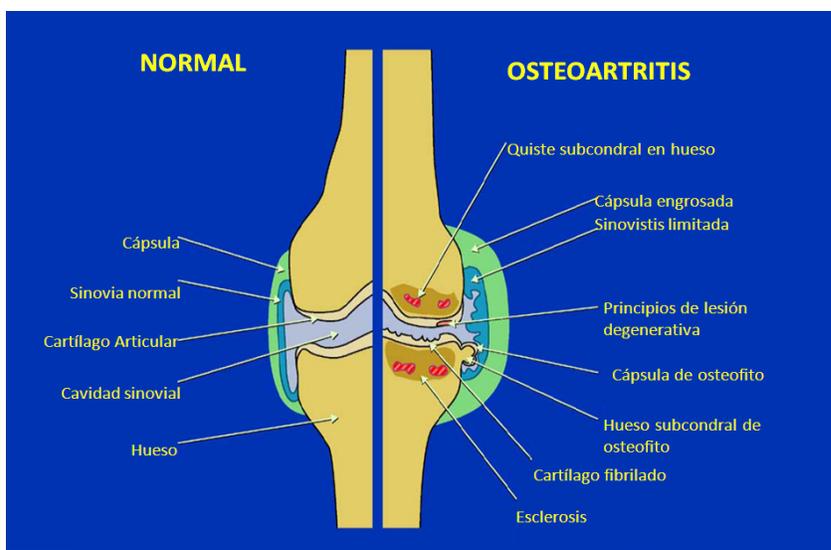


Figura 9. Diagrama donde se representan las características histológicas de una rodilla sana y una rodilla con Osteoartritis. (Sociedad española de Reumatología, 2010; Aguirre, 2011).

El funcionamiento normal del CA está comprometido debido a múltiples factores tanto físicos como químicos que se relacionan, de modo que cuando ocurre una alteración a la homeostasia responden secuencialmente generando daño al CA. En este contexto, las integrinas son reguladores intermediarios entre las células y la MEC del cartílago articular.

ANTECEDENTES

En el cartílago normal por medio de cartometría de flujo se ha encontrado en abundancia a las integrinas $\alpha 5$ y αV . En la superficie del CA ha sido reportada la presencia de la subunidad $\alpha 5$ en un porcentaje mayor que en cualquier otra zona (Dowthwaite *et al.*, 2004). La subunidad αV fue detectada en mayor abundancia en condrocitos superficiales del cartílago articular que en la zona profunda (Osteergar, 1998). Pero no sabemos cómo se distribuyen ambas integrinas durante la OA.

Existen estudios acerca del mantenimiento del CA en los que destacan los papeles de la integrina $\alpha 5$ y GDF5. En presencia de $\alpha 5$ los condrocitos tiene una menor tasa de muerte celular (Pulai *et al.*, 2002), si se bloquea la expresión de esta, la adhesión decrece hasta un 46%, (Kurtis *et al.*, 2003) y la diferenciación de los condrocitos prehipertróficos es inhibida generando dedos ectópicos (Garcíadiego-Cázares *et al.*, 2004). Otros estudios indican que GDF5 es capaz de inducir la condrogénesis y diferenciación de los condrocitos (Merino *et al.*, 1999; Storm y Kingsley, 1999). Así que $\alpha 5$ y GDF5 están involucradas en el desarrollo de las extremidades, pero desconocemos si están correlacionadas entre si en la condrogénesis o en el CA adulto normal o en el CA osteoartrítico.

La integrina αV está relacionada a la vasculogénesis (Sheppard, 2000), esto es importante para la formación de osteofitos este proceso es necesario, pero no sabemos con precisión cuál es el papel de αV durante la OA. Según Gruber y *cols.* BMP7 contribuye a la formación ósea y reparación de fracturas (2001) y durante el desarrollo de las extremidades se expresa fuertemente en el pericondrio, excepto en la zona articular (Macias *et al.*, 1997), pero no sabemos si tiene relación con la expresión de la integrina αV .

Recientemente se ha reportado que la expresión de las integrinas puede estar relacionada con la expresión de algunos TGF- β , por ejemplo Gouttenoire y *cols.* observaron que TGF- $\beta 1$ estimula la expresión de la subunidad

de la integrina $\alpha 11$, mientras BMP-2 la de $\alpha 10$ en condrocitos (Gouttenoire *et al.*, 2010). En otro estudio Su y *cols.* descubrieron que la integrina $\alpha V\beta 3$ pueden estar actuando con BMP-2 mediante la proteína (Cyr61) dando como resultado la proliferación y diferenciación osteoblástica (Su *et al.*, 2010).

Por otro lado durante el desarrollo esquelético la señalización Ihh regula el crecimiento y diferenciación normal de los condrocitos (St-Jaques, 1999), así como la formación de las articulaciones ya que al inhibirse las articulaciones no se forman (Koyama *et al.*, 2007), sin embargo, el papel de la señalización Ihh en los condrocitos en la Osteoartritis es desconocida, así como la relación o no con la integrinas de CA, particularmente con la integrina $\alpha 5$.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La conservación del fenotipo de los condrocitos del CA requiere del funcionamiento de las interacciones entre las proteínas de la MEC y los condrocitos a través de las integrinas. La composición del CA cambia durante la OA, así como el tipo de interacciones, pero no se conoce qué integrinas están involucradas en este proceso.

Se ha observado que la subunidad de integrina $\alpha 5$ contribuye al mantenimiento del fenotipo de los condrocitos, relacionado a ello *Ihh* retrasa la hipertrofia de estos y está involucrado con la formación de la articulación así como el GDF5 que promueve el desarrollo de las estructuras cartilagosas en las articulaciones en desarrollo, pero se desconoce si hay relación en la expresión de estos tres factores durante el desarrollo de las articulaciones y durante la OA.

La subunidad de integrina αV está relacionada a la vasculogénesis y BMP7 a la formación de hueso, pero también desconocemos si hay relación entre ambas durante el desarrollo de las extremidades y la OA.

HIPÓTESIS

La activación de la expresión de las subunidades de integrina $\alpha 5$ y αV por *Gdf5* y *Bmp7* controla el mantenimiento del fenotipo del cartílago articular y la hipertrofia de los condrocitos durante la Osteoartritis, de forma similar a como ocurre durante la esquelotogénesis. Además, *Ihh* en el CA mantiene su fenotipo activando la expresión de la subunidad de integrina $\alpha 5$.

OBJETIVO

- Determinar como Bmp7 y Gdf5 regulan la expresión de las subunidades de integrinas $\alpha 5$ y αV durante la esquelotogénesis y la OA, para determinar el papel de estas integrinas durante la diferenciación de los condrocitos articulares y cómo se modifica este mecanismo durante la OA.

Objetivos Particulares

- Observar el patrón de expresión de las subunidades $\alpha 5$ y αV durante la esquelotogénesis de la articulación en embriones de ratón y en un modelo de OA en rata.
- Determinar el patrón de expresión de *bmp7*, *Gdf5* e *Ihh* en cartílago articular sano y osteoartrítico de rata.
- Analizar el efecto de Bmp7 y Gdf5 sobre la expresión de las integrinas $\alpha 5$ y αV , y su relación con su estado de diferenciación mediante marcadores moleculares del cartílago, en un modelo *in vitro* (micromasas) de la condrogénesis.
- Establecer como se regula la expresión de la integrina $\alpha 5$ en relación con la de Indian hedgehog (Ihh), una molécula clave de la diferenciación del cartílago.
- Conocer que papel juega Ihh en la conservación del fenotipo articular de los condrocitos y en el desarrollo de la OA, utilizando un modelo *in vitro* como el cultivo de órganos de la rodilla de ratón y bloqueando la señalización hedgehog con ciclopamina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico para el seguimiento del desarrollo articular

Se utilizaron embriones de ratón de la cepa CD1 para determinar **el patrón de expresión de las integrinas** durante el desarrollo de la rodilla, ya que la rodilla de este modelo es muy similar a la humana. Para obtener el cartílago embrionario se disecaron embriones a partir de 12.5 días post coito (dpc) hasta 14.5 dpc, se consideraron estas edades en base a la escala Theiler en la cual de la etapa 20 a la 22 se forman y separan las extremidades (Theiler, 1989) y que corresponden a las edades utilizadas. Se tomaron los tejidos embrionarios de la rodilla desde de la tibia media y hasta aproximadamente la mitad del fémur. Las muestras se colocaron a 4° C en paraformaldehído (PFA) al 4% (toda la noche) para fijar los tejidos.

Para el **modelo experimental de OA** se utilizaron 30 ratas Wistar machos de 20 días de edad, a las que se les realizó una menisectomía parcial en la rodilla de la pata derecha y se les ejercito a diferentes tiempos para provocar OA.

Para el **modelo de micromasas** se utilizaron extremidades de embriones de ratón de 11.5dpc.

Reactivos

Todas los reactivos como sales, alcoholes y xileno utilizados fueron de la marca JT Backer (D.F, México). Todos los colorantes para tinciones biológicas se obtuvieron de Sigma (Sigma Chemical Company, St Louis, MO). Se usó el sistema de revelado por peroxidasa Vectastain kit ABC de Vector (Vector laboratories, Burlingame, CA). Se utilizaron los anticuerpos policlonales: anti-integrina $\alpha 5$ (P-19) y anti-integrina αV (P-19) y anti-GDF5 (N-17) preparados en cabra de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology CA, USA), anti-fibronectina (F14420) preparado en ratón, anti-

agrecano (MCA1451) preparado en conejo de AbD Sero Tec (Raleigh, NC), anti-colágena tipo I, (690F) preparado en ratón y anti-colágena tipo II (690F), preparado en cabra de ICN Biomedical Inc. (Aurora, OH, USA). Anticuerpo monoclonal neutralizante para integrina $\alpha 5$ (HM $\alpha 5$, Cat 553350) de Pharmigen (Pharmigen, San Diego, CA) y anticuerpo monoclonal Sonic Hedgehog (5E1) de Hybridoma Bank (Development SHB, Iowa City, USA). BMP7 (120-03) y GDF5(120-01) fueron comprados de PreproTech (New Jersey, USA). Anticuerpo fluorocinado (FITC) preparado en asno anti-cabra, anticuerpo anti-DIG-FICT preparado en ratón y anticuerpos Rojo Texas (RT), preparado en cabra anti-conejo comprados de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology CA, USA), y Rojo Texas (RT) preparado en cabra anti-ratón de Invitrogen (Invitrogen Carlsbad, CA). D-MEM (Medio Esencial Mínimo- Modificado por Dulbeco), medio BGJb, tripsina, colagenasa, anticuerpo Rojo Texas (RT) y Super PapPen, de Invitrogen (Grand Island NY, USA). La ciclopamina fue comprado de SIGMA (Sigma Chemical Company, St Louis, MO) y medio de montaje DAPI comprados de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology CA, USA).

Preparación de los tejidos e histología

Para incluir el tejido, las muestras fueron deshidratadas en etanoles graduales al 50%, 70%, 96% por 20' y en etanol al 100% y xilol, dos veces 20' cada uno. Se hicieron dos cambios de paraplast a 56°C y se incluyen finalmente sobre una plancha de calentamiento a 56°C en "cassettes", moldes especiales de plástico en donde se orientaron los tejidos, y se les vertió parafina hasta cubrir por completo el molde, se dejaron los tejidos, se colocaron los bloques sobre una cama de hielo. Una vez sólido el bloque de parafina se retiró de la cámara de plástico. Esta inclusión resulta en una buena preservación de la morfología del tejido. Se hicieron cortes de 5 micrómetros (μm) un micrófono. Los cortes se colocaron en laminillas previamente tratadas con 3-aminopropiltrietoxisilano (TESPA) para cargarlas positivamente, lo que les confirió una fuerte adherencia los

tejidos. No se colocaron directamente los tejidos en la laminilla, previamente se colocó una gota de etanol al 30% para extender los tejidos. Finalmente las laminillas se colocaron en una cámara de vacío, para lograr mayor adherencia de las muestras y evitar que se levanten.

Las laminillas fueron procesadas de la siguiente manera: se colocaron en una plancha de calentamiento por 30' a 56° C, fueron sumergidas 20 veces en dos periodos en histoleno. Se hidrataron los tejidos con etanol 100%, 96%, 70%, 50% y agua destilada también a 20 sumergidas. Se colocaron en PBS (amortiguador salino de fosfatos, pH 7.4) por 5' y glicina 0.4%/PBS durante 3' cada uno.

Inmunofluorescencia de doble marcaje en extremidades en desarrollo de ratón

Mediante inmunofluorescencia (IF) de doble marcaje se analizó el patrón de expresión de las subunidades $\alpha 5$ y αV de las integrinas en la extremidad embrionaria de ratón, en las edades: 12.5, 13.5 y 14.5 dpc. En donde se utilizó los anticuerpos primarios para la Inmunofluorescencia I: anti-integrina $\alpha 5$ preparado en cabra y anti-integrina αV preparado en cabra y como anticuerpo secundario: anti-cabra FITC y para la inmunofluorescencia II: como anticuerpos primarios anti-fibronectina preparado en ratón y anti-agrecano preparado en conejo y como anticuerpos secundarios anti-ratón RT y anti-conejo RT.

Inmunofluorescencia I: Las laminillas se sumergieron en PBS por 15' a una temperatura de 4° C, en solución de bloqueo por 20' a 4° C y anticuerpo primario a una concentración 1:50 durante toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Antes de depositar los anticuerpos en los tejidos, estos se marcaron alrededor del con PapPen (para tener una barrera alrededor del tejido) y se agregaron 100 μ l de cada disolución de los anticuerpos, suficientes para cubrir el tejido generando tensión superficial y

evitando que se derramara el líquido. Al día siguiente se llevaron a cabo dos lavados con PBS durante 5'. Se agregó el anticuerpo secundario FICT a una concentración de 1:100, se cubrieron las laminillas con papel parafilm para evitar la evaporación del anticuerpo esto se mantuvo durante 1.5 h a 37°C en cámara húmeda. Se hicieron dos lavados con Triton 0.3%/PBS por un periodo de 5' y otros dos lavados con PBS por 5'.

Inmunofluorescencia II: Las laminillas se sumergieron en solución de bloqueo durante 5' a 4° C y posteriormente se agregó el segundo anticuerpo primario en una disolución 1:50 en solución de bloqueo: anti-agrecano o anti-fibronectina; durante toda la noche a 4° C, cubiertas con parafilm y depositadas en cámara húmeda. Al día siguiente se lavaron las laminillas con PBS por dos periodos de 5'. Posteriormente se agregó el siguiente anticuerpo secundario RT disuelto a 1:100, se depositaron en cámara húmeda durante 1.5 h a 37° C. Al día consecuente se lavaron con Tween-20 0.3%/PBS por 5' dos veces y finalmente se lavaron dos ocasiones con PBS durante 5'.

Tinción de núcleos y montaje de la preparación: Se cubrieron las muestras con DAPI, y se colocaron cubreobjetos. Se guardaron en oscuridad para posteriormente observarlas en un microscopio de fluorescencia.

Modelo de Osteoartritis por menisectomía y respuesta mecánica en rata.

Se usó un modelo experimental de OA generada en rata, para lo cual se utilizaron 30 ratas Wistar machos de 20 días de edad, las cuales fueron donadas por el bioterio del CINVESTAV-IPN. Quince ratas se sometieron al tratamiento del modelo de OA, mientras el resto se utilizaron como control. El modelo consistió en hacer una menisectomía parcial en las rodillas derechas; posteriormente, los sujetos fueron sometidos a ejercitación, la cual consistió en hacerles saltar dentro de una caja de plástico, con la

finalidad de acrecentar el daño. Después de 5, 10 o 20 días se tomaron las muestras tanto control, como experimentales, se fijaron en PFA al 4% toda la noche. A estos tejidos se les realizó la tinción de Safranina O y por medio de IHQ se observó el patrón de expresión de las integrinas $\alpha 5$ y αV en tejidos control y osteoartrítico de 5, 10 y 20 días.

A) Tinción Safranina O en cartílago sano articular y osteoartrítico

El colorante Safranina O se une a proteoglicanos de matriz extracelular de cartílago articular y permite mediante la coloración roja obtenida observar la cantidad de estos PG. Las muestras de cartílago sano de rata y las osteoartríticas se incluyeron y deshidrataron previamente, se tiñeron con Hematoxilina de Weigert a 7', se lavaron con agua de la llave por 10', Verde Rápido a 3', ácido acético 1% durante 10' y Safranina O por 7'. Se deshidrataron con etanol (EtOH) 96% y 100% durante 1', 2 veces cada uno. Se Montaron las muestras con resina.

B) Ensayos de inmunohistoquímica en rodillas sanas y osteoartríticas

Las muestras de CA sano y CA osteoartrítico fueron deshidratadas, incluidas, cortadas y rehidratadas bajo el protocolo ya mencionado en la técnica de IF de doble marcaje. Para mejorar el marcaje y evitar que la matriz interfiera entre las células y el anticuerpo se realizó una digestión enzimática con hialuronidasa 3500u/ml en PBS durante 5'a 37° C. Esta enzima hidroliza el ácido hialurónico lo que permite modificar la permeabilidad de los tejidos y mejorar con ello la absorción de los anticuerpos.

Oxidación endógena: Se hicieron dos lavados con PBS durante 5' cada uno. durante 15' se sumergieron en peróxido de hidrogeno al 3%(H₂O₂) / metanol para lograr una oxidación endógena. Después un lavado en PBS por 5' ,se agregó solución de bloqueo (Kit ABC Vectastain) ,

después 50 μ L de PBS 3.5ml/ suero de bloqueo durante 20', este paso permite cubrir el área de la laminilla donde no se encuentre el tejido y así evitar "fondo" o falso positivo en las fotografías.

Inmunoreacción y tinción: se llevó de la siguiente manera: lavado con PBS por 5'. Inmediatamente se cubrieron las laminillas con algún anticuerpo primario (A 1°): anti-Integrina α 5, anti-Integrina α V, anti-agrecano, anti-fibronectina, anti-colágena tipo I, anti-colágena tipo II; se agregaron 2 μ L de PBS 0.1ml/Ac 1° una dilución 1:50 y se dejó toda la noche a 4° C, en cámara húmeda. Al día siguiente se realizaron 4 lavados con una solución PBS/Triton 0.1% por 5' cada uno. Se agregó 1 μ L de anticuerpo secundario biotinilado (Kit ABC Vectastain): a una concentración 1:100; solución de bloqueo/ (Kit ABC Vectastain) 0.1 ml/Ac biotinilado en un periodo de 2 h a una temperatura de 37° C, en cámara húmeda. Una vez concluido el periodo anterior se lavaron las laminillas en PBS/Triton 0.1%. Durante 30' se dejaron en: solución de Streptavidina/HRP(Kit ABC Vectastain), 5 ml de PBS, 50 μ L de Reactivo A y 50 μ L de Reactivo B. Se hicieron lavados de PBS/Triton 0.1% en 4 periodos de 5' cada uno, se añadió 20 μ L de una solución Buffer Sustrato 1ml/ DAB cromógeno (DakoCytomation Kit) por 10' y se lavo con agua bidestilada 2 veces.

Para contrastar núcleos las laminillas se trataron de la siguiente forma: hematoxilina 1'', agua corriente, agua amoniacal dos sumergidas, carbonato de litio saturado 2 sumergidas, agua destilada. Deshidratación y montaje de la preparación: Et-OH 96% por 2', Et-OH 100% por otros 2' y finalmente xileno, durante 2' dos veces. Se cubrieron las muestras con unas gotas de resina y una gota de xileno, se colocó el cubreobjetos.

C) Hibridación *in situ* de la *Bmp7* e *ihh* en cartílago sano articular y osteoartrítico

Se generaron sondas de RNA para hibridarse con el mRNA endógeno tanto para *Bmp7* como para *ihh* (Francis-West,1995). Se utilizaron oligonucleótidos específicos que delimitaran la secuencia de interés

mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se usó una mezcla de DNA complementario (cDNA), nucleótidos trifosfatados y la enzima Taq polimerasa (Francis-West, 1995).

Se realizaron cortes histológicos del modelo de OA y de cartílago sano los cuales se colocaron en laminillas. Los cortes se desparafinaron a 55° C por 30' y se rehidrataron con xileno 5' dos veces, metanol al 100% por 1' dos veces y se sumergieron 1' en metanol al 75%: Met-OH/ PBT 25%, en metanol al 50% por 1': Met-OH 50%/ PBT 50% y en metanol al 25% por 1': Met-OH 25%/ PBT 75% y PBT 5'.

Se permeabilizaron los tejidos 15' con PFA 4% (frío) a temperatura ambiente (TA), PBT por 1' 3 veces, posteriormente se uso proteinasa K (37° C) 15' TA, Glicina 2mg/ml PBT 5', PBT 1' 3 ocasiones, PFA 4 % (frío) 20' TA , ácido acético 0.25%/TEA 10' con agitación y PBT 1' 2 veces. Se hizo una pre-hibridación con buffer de hibridación a 80° C 15' y 15' a 55° C. Para hacer la hibridación se desnaturizo la sonda, diluyendo 1 µg de la sonda de *bmp7* o *ihh* (cDNA) en 100 µl de buffer de hibridación posteriormente la sonda diluida se mantuvo por 2' a 95° C e inmediatamente se coloco en hielo. Se extrajo el buffer de hibridación de las laminillas y se agregó la sonda *bmp7* o *ihh*, y se dejo hibridando en un horno de hibridación por 18 h a 55° C.

Se realizaron lavados de hibridación inespecífica e Inmunodetección con Solución I (formamida 50%, SSC 4X, SDS 1%) precalentada 15' 50° C por 3 veces, con Solución III (formamida 50%, SSC 2X) precalentada 15' a 50° C por 3 veces, con TBST + levamizol 10' por 3 veces. Para *ihh* se utilizó solución de bloqueo anti-DIG-AP 1:500 toda la noche a 4° C (en cámara húmeda con PBS). El revelado se hizo con levamizol 2mM/TBST 5' por 2, TBST 10' 2 veces, levamizol 1mM/NTMT 10' por 2. BM-Purple (sustrato AP) 2 a 3 horas. hasta que la muestra reaccionará adquiriendo una coloración morada y se tapo de la luz. Finalmente se lavo con NTMT 10' por 2 tiempos y PBS 1' por 3 y se monto con Crystal Mount .Para *bmp7* se utilizó solución de bloqueo con anti-DIG-FICT 1:500 toda la noche a 4° C (en cámara húmeda con PBS). Se hicieron dos lavados de 5' con Tween 20 0.03% en PBS y dos lavados de 5' con PBS. Finalmente se montaron las muestras con DAPI.

D) Inmunofluorescencia de Gdf5 en cartílago articular sano y osteoartrítico

Para detectar la expresión de Gdf5 en cortes de rodillas sanas y osteoartríticas se realizó la técnica de Inmunofluorescencia, se usó un anticuerpo anti-gdf5 hecho en cabra y como segundo anticuerpo FITC anti-cabra. Los tejidos histológicos de cartílago articular previamente deshidratados y adheridos a laminillas se trataron con la técnica de Inmunofluorescencia I, arriba mencionada. Después del último lavado con PBS las muestras se fijaron con DAPI.

Cultivo de micromasas: modelo de condrogénesis

El modelo de condrogénesis diseñado por Michael Solursh, 1982 permite recapitular las primeras etapas en la formación de moldes de cartílago donde se puede observar la formación de nódulos de cartílago ya que este modelo implica cultivar células formando un agregado a partir de células mesenquimales.

Las células mesenquimales se obtuvieron de embriones de ratón CD1 de 11.5 días *post coitum* (E11.5 dpc). En un ambiente estéril se aislaron las extremidades anteriores de embrión de ratón de 11.5 dpc, y se trataron como sigue: varios lavados de las extremidades en PBS, se dejaron en D-MEM, hasta terminar la disección. Entonces se retiró el D-MEM y las células se digirieron con 5ml de tripsina al 0.3%: (tripsina 0.25 %, glucosa 1 %, verseno 0.25 %, antibiótico 0.1 % / D-MEM) ,durante 15 minutos y después con 5ml de colagenasa al 0.3%: (colagenasa II 0.25 %, antibiótico 0.1 % / D-MEM), por 20 minutos ambas digestiones a una temperatura de 37°C. Para detener la digestión se agregaron 5 ml de D-MEM/10% suero. La suspensión celular se centrifugó a 500 rpm durante 5', se retiró el sobrenadante y se agregaron 5 ml de D-MEM sin suero. El conteo de células se llevo a cabo en el hemocitómetro, se ajustó la densidad celular a 20×10^6 cel/ml con medio D-MEM sin suero. En placas de 24 pozos se sembraron 20,000 células/pozo, por lo que se depositaron 10 μ L de la suspensión celular, en seguida se encubaron por dos horas para que las

células se adhirieran e inmediatamente después se agregaron 500 μ L de medio D-MEM a cada pozo y se incubaron a 37° C durante 4 días, pasado este periodo se formaron nódulos de cartílago los cuales se pueden observar mediante la tinción de Azul Alciano.

Tinción Azul Alciano en cultivo de micromasas

Esta tinción permite observar nódulos de cartílago formados en cultivos de micromasas ya que tiñe las áreas sulfatadas de los PG del cartílago. Se añadió fijador Khale durante 20', Azul Alciano durante toda la noche, HCl 0.1 N por 5', dos veces, glicerol 50%/PBS por 30', glicerol 75%/PBS durante 30' y glicerol.

Cultivos de micromasas con proteínas morfogenéticas del hueso

En los cultivos experimentales al tercer día de cultivo se añadieron Bmp7 o Gdf5 a una concentración final de 10 nM en cada pozo y se dejaron por otro día en cultivo a 37°C, completando los cuatro días. Posteriormente, mediante IHQ se analizó la expresión de las proteínas de matriz: colágena I, colágena II, agrecano, fibronectina y las subunidades de las integrinas α 5 y α V para ambos tratamientos y controles.

Cultivos de micromasas con anticuerpos neutralizantes

En cultivos experimentales de micromasas se hicieron dos tratamientos a uno se añadió 1 μ g/ml de anticuerpo neutralizante para Shh (5E1) y al otro se añadió anticuerpo neutralizante para la integrina α 5 (HM α 5) al tercer día

de cultivo y se dejaron en cultivo por un día más. Entonces se realizaron Inmunofluorecencias para detectar la expresión de la integrina $\alpha 5$ en el cultivo con anticuerpo neutralizante Shh y para detectar Ihh en el cultivo con anticuerpo neutralizante para integrina $\alpha 5$.

Cultivo de rodillas de ratón con ciclopamina

Se disecaron longitudinalmente rodillas de ratón de 20 días de edad. Posteriormente se colocaron en placas de 6 pozos sobre filtros Millicell de MILLIPORE (Millipore Billerica, MA), ello en presencia de medio de cultivo BGJb, en este tipo de filtros el órgano se encuentra en una interfase liquido-aire, quedando las rodillas en medio BGJb con 0.1% de albúmina de suero bovino. Se inhibió la actividad de hedgehog, agregando al medio ciclopamina a una concentración final de 10 nM. El cultivo de órganos se mantuvo durante 4 días en un incubador a 37° C y 5% de CO₂. Una vez que termino el cultivo de órganos, se procesaron las muestras para realizarles la tinción de Herovici.

Tinción de Herovici en cartílago articular tratado con ciclopamina

Las muestras fueron deshidratadas hasta etanol al 25%, se sumergieron en PBT, se lavo con agua bidestilada(bd) por 5' en tres tiempos. Para teñir primero fueron sumergidas con la solución de Azul Celestino por 5', se hicieron 3 lavados de 5' c/u, hematoxilina de Regaud 5', agua bd 15min, Amarillo Metanilo por 2'. Para diferenciar se sumergieron en acido acético al 0.5% por 2'. Se viro con carbonato de litio 2', agua bd 2', solución Picopolicrómica. Se lavo con ácido acético al 1% por 2' y se deshidrato con etanol por 3' en aumento de concentraciones hasta el 100% y xileno 3' dos veces. Finalmente las laminillas se montaron con resina.

Todas las imágenes fueron observadas bajo un microscopio Zeiss Fluorescente Axio Imager A-1 y fotografiadas con una cámara Zeiss Axio Vision Hcr. (Zeiss, Germany).

Modelo comparativo de placa de crecimiento y cartílago articular

Con la finalidad de analizar y comparar las zonas de distribución de los condrocitos tanto en la PC como en el CA se elaboró una figura comparativa de ambos tejidos (Figura 10). En ella se respeta la diferenciación celular y la ubicación espacial. De modo que la zona de condrocitos en reposo de la PC y la capa superficial del CA se denominan para este trabajo como *zona alta* en ambos tejidos; los condrocitos proliferantes de la PC y la capa de transición se denominan como *zona alta-media*; los condrocitos prehipertróficos de la PC y la capa profunda del CA como *zona media* finalmente los condrocitos hipertróficos de la PC y la capa profunda del CA como *zona profunda*. Es importante señalar que esta clasificación solo se hace con la finalidad de comparar la distribución espacial de la expresión de las subunidades de integrina $\alpha 5$ y αV y no pretende expresar que existe un linaje celular igual entre las zonas comparadas.

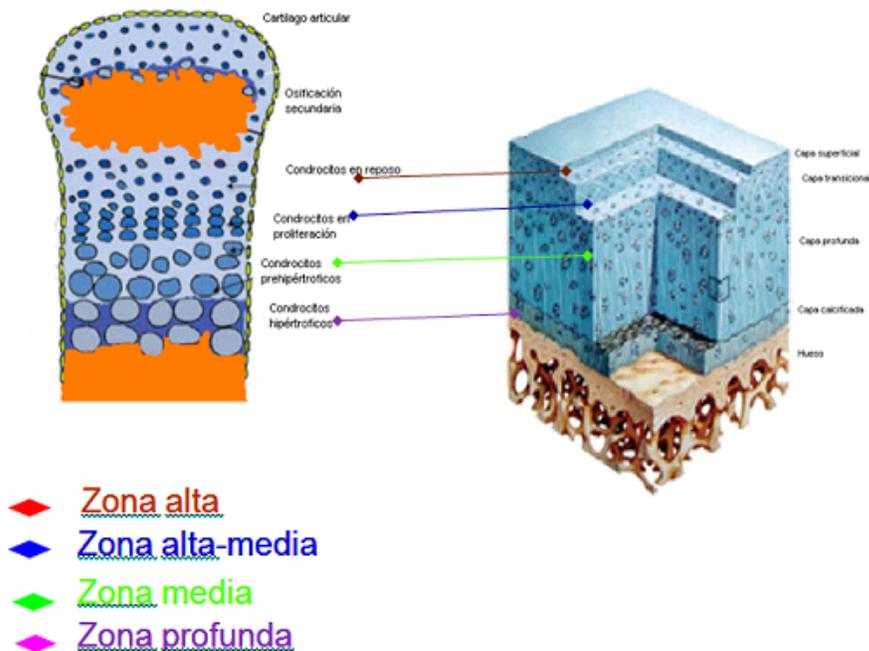


Figura 10. En la Placa de Crecimiento y el Cartílago articular se encuentran zonas celulares de diferentes grados de diferenciación (Garciadiego, 2004; Sopena, 2000; Aguirre, 2011).

RESULTADOS

Distribución de las integrinas $\alpha 5$ y αV en el desarrollo de las extremidades de ratón.

Se observó en las pruebas de Inmunofluorescencia de doble marcaje realizadas en extremidades de ratón, para analizar el patrón de expresión de las integrinas que a los 12.5 dpc la subunidad $\alpha 5$ se expresa en los moldes esqueléticos de cartílago y en el tejido externo a los moldes (Figura 11 A), mientras que a los 13.5 dpc se observa en todo el molde de cartílago, pero levemente en la zona central correspondiente a los condrocitos hipertróficos (Figura 11 B), y a los 14.5 días se expresa desde la *zona alta* de los moldes hasta la *zona media* la cual incluye la ubicación espacial de los condrocitos en reposo, proliferación y prehipertróficos, pero no se expresa en la región de los condrocitos hipertróficos (Figura 11 C).

La integrina αV se expresa en las células mesenquimales que forman la región interdigital, y su expresión excluye los moldes de cartílago de la extremidad de 12.5 dpc (Figura 11 D), en la etapa 13.5 dpc se observa ligeramente en todo el elemento esquelético de cartílago, pero sobresale su expresión a todo lo largo del pericondrio, (Figura 11 E), y a los 14.5 dpc se observa claramente en la *zonas profunda* del cartílago (Figura 9 F), que corresponde a los condrocitos hipertróficos, aunque también se observó una marca más débil en la zona de los condrocitos prehipertróficos.

Uno de los ligandos naturales de estas integrinas es la fibronectina, la cual se detectó en la región del ectodermo en la etapa 12.5 dpc, mientras que en la etapa 13.5 dpc se detectó en el pericondrio y débilmente en los condrocitos prehipertróficos y a los 14.5 dpc se detectó en el pericondrio de la parte central del elemento esquelético que rodea al cartílago prehipertrófico e hipertrófico, pero esta ausente en el pericondrio de la región articular. En cuanto al agregano, que es una molécula típica del cartílago, y en particular del cartílago articular, se expresó en las etapas tempranas (12.5 y 13.5), es notoria su presencia en el cartílago de la región articular y ligeramente en la zona del cartílago prehipertrófico y ausente en el hipertrófico a los 14.5 dpc.

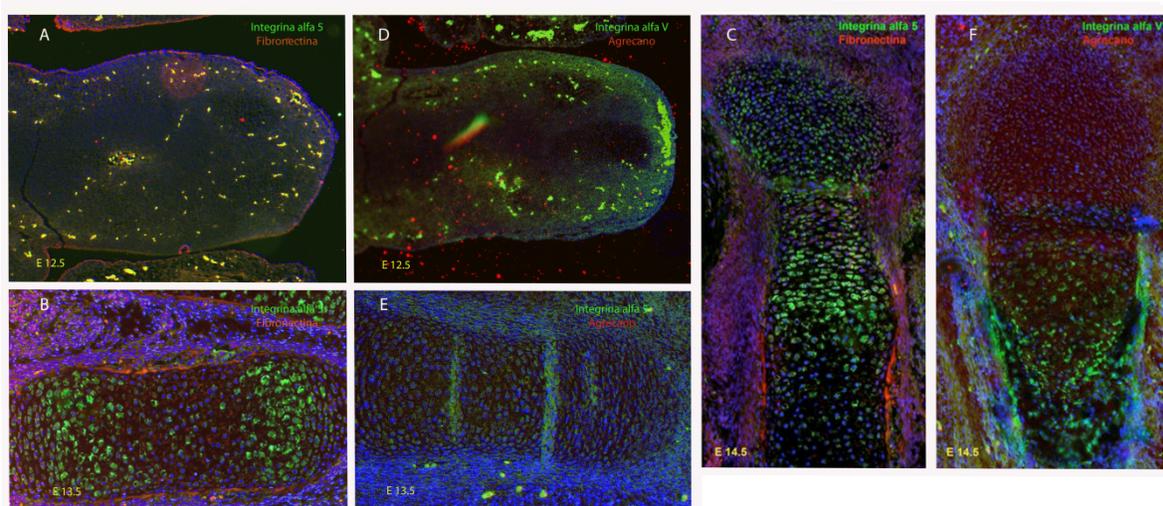


Figura 11. Expresión de subunidades de integrinas $\alpha 5$ y αV en extremidades de ratón en desarrollo detectadas mediante Inmunofluorescencia FITC para integrinas y Rojo Texas para agrecano y fibronectina. La expresión de $\alpha 5$: A) a 12.5 dpc en toda la extremidad, B) a 13.5 dpc con mayor expresión en zona alta media, C) a 14.5 dpc en zona alta y media. La expresión de αV : D) a 12.5 dpc en mesénquima. E) a 13.5 dpc expresión en todo el molde y en el pericondrio. F) Integrina αV a 14.5 dpc en zona media y zona profunda del molde.

Análisis del daño del cartílago articular de rata osteoartrítica mediante la detección histoquímica de proteoglicanos.

En la tinción histoquímica con Safranina O de los cortes histológicos se observó una tinción homogénea de color rojo en el cartílago articular sano, lo que indica la presencia de GAG de los proteoglicanos de la MEC, además se observó una estructura típica del CA intacto. Por otro lado, las muestras de cartílago osteoartrítico presentaron menor intensidad con la tinción Safranina O, ésta tinción disminuyó aún más en función del tiempo del tratamiento para inducir la OA en las ratas, además que las regiones de cartílago detectadas por la tinción se mostraron cada vez más restringidas según avanzó el daño articular. Las muestras de tejido osteoartrítico, revelan un cambio de la tinción roja por una coloración verde que aumentó de acuerdo al daño, esta coloración verde fue más intensa a los 20 días, y lo que indica la presencia de tejido óseo.

Patrones de expresión de las integrinas $\alpha 5$ y αV en el cartílago articular de ratas sanas y osteoartríticas.

Para determinar la relación del patrón de expresión de las integrinas $\alpha 5$ y αV durante la diferenciación del cartílago con el proceso de osificación que ocurre en la Osteoartritis, se determinaron los patrones de expresión de estas integrinas y otros marcadores moleculares de diferenciación del cartílago en el CA sano y con OA. Estos patrones de expresión se determinaron mediante IHQ. En el cartílago articular sano la subunidad $\alpha 5$ de la integrina se expresó en la *zona superficial* del cartílago (Figura 12 E) y la subunidad αV se expresó principalmente en la *zona media y profunda*, que corresponde a los condrocitos prehipertróficos e hipertróficos, aunque con más intensidad en la parte profunda (Figura 12 I).

En el CA con OA la expresión de la integrina $\alpha 5$ disminuyó en la superficie articular desde etapas tempranas de la OA (5 días) (Figura 12 F), a los 10 días casi desaparece su expresión (Figura 12 G) y en etapas avanzadas de la OA (20 días) se localizó en las pocas zonas donde aún se conservaba parte del cartílago (Figura 12 H), que eventualmente formara hueso. Durante la Osteoartritis la expresión de la integrina αV cambió su expresión, desde las *zonas media y zona profunda* hacia la *zona alta* conocida como superficie del cartílago (Figura 12 K), pero cuando la OA avanzó (20 días), su expresión se distribuyó en todo el tejido del CA y en las regiones fibrosas (Figura 12 L).

Estos resultados indican que los patrones de expresión de las subunidades de integrinas $\alpha 5$ y αV son similares con el estado de diferenciación de los condrocitos de las extremidades en desarrollo (Comparar Figura 11 y 12). Así, la integrina $\alpha 5$ se expresa en los condrocitos en proliferación y prehipertróficos mientras que la integrina αV se expresa en los condrocitos hipertróficos es decir en los tejidos que están iniciando un proceso de osificación, este patón es similar en la esqueletogénesis como lo muestra su expresión en la parte central de los elementos esqueléticos en desarrollo muy similar en las zonas superficiales que inician la formación de hueso durante la OA.

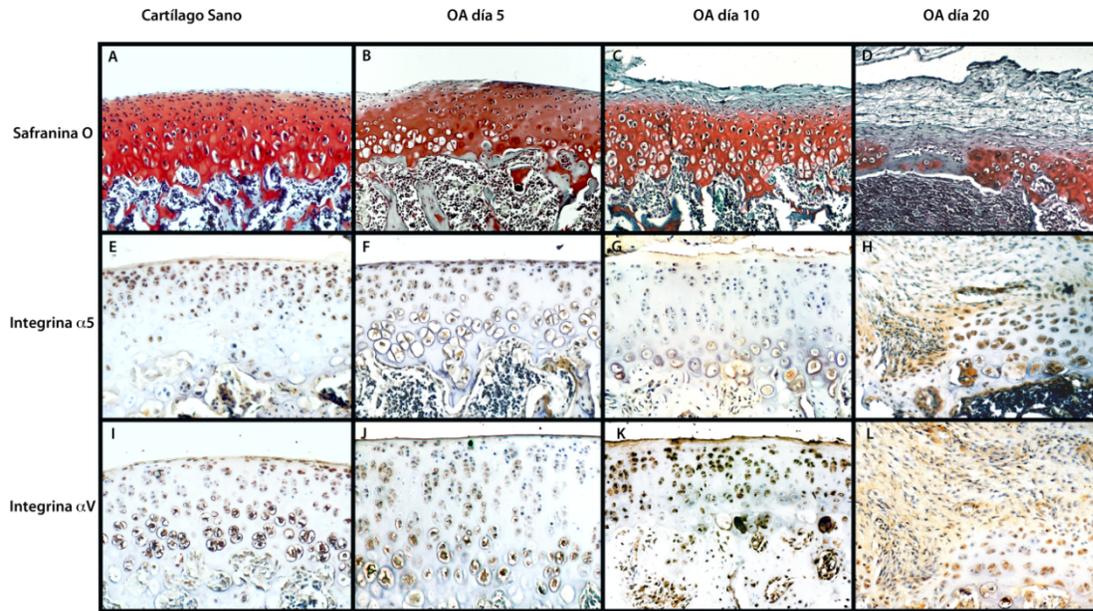


Figura 12. Cartílago articular de rata sana y cartílago articular osteoartrítico de 5, 10 y 20 días de tratamiento.(A-D) Tinción de Safranina O en cartílago articular sano y osteoartrítico que muestra pérdida de proteoglicanos al avance la Osteoartritis inducida. Inmunohistoquímica para evidenciar la expresión de $\alpha 5$ (E-H) en la *zona alta*, la cual disminuye en la Osteoartritis y αV (I-L) que cambia su expresión en la *zona media* a la *zona alta* del cartílago articular y amplia su distribución conforme avanza la Osteoartritis.

Patrones de expresión de Gdf5 y *bmp7* en cartílago sano y osteoartrítico

Durante el desarrollo del esqueleto los factores de crecimiento de la familia de los TGF-beta, como el Gdf5 y la Bmp7 regulan la formación de las articulaciones y la formación de hueso respectivamente. Es decir, Gdf5 se expresa en la interzona durante la formación de las articulaciones, por lo que esta asociado a la formación del cartílago articular mientras que Bmp7 se expresa en el pericondrio de los elementos de cartílago pero no en la región de las articulaciones, por lo que se relaciona con la hipertrofia del cartílago y la formación de hueso. El Gdf5 se detectó mediante inmunofluorescencia y su patrón de expresión se observó claramente en la zona media y profunda del cartílago articular sano (Figuras 13 A), mientras que *bmp7* se detectó

mediante Hibridación *in situ* fluorescente y su expresión resulto negativa en tejido sano (Figura 13 C). En tejido con OA a los 10 días, la expresión de Gdf5 disminuyó en todo el cartílago articular (Figura 13 B); y la expresión de *bmp7* es muy alta y ampliamente distribuida (Figura 13 D) en CA de las ratas osteoarthriticas de 10 días.

Estos resultados muestran que la expresión de la expresión de Gdf5 se ubica cerca de la expresión de la subunidad $\alpha 5$ de las integrinas, que corresponde a los condrocitos que conservan su fenotipo articular, mientras que la expresión de *bmp7* correlaciona con la expresión de la integrina αV , ubicada en las zonas donde los condrocitos son hipertróficos y donde inicia la formación del hueso.

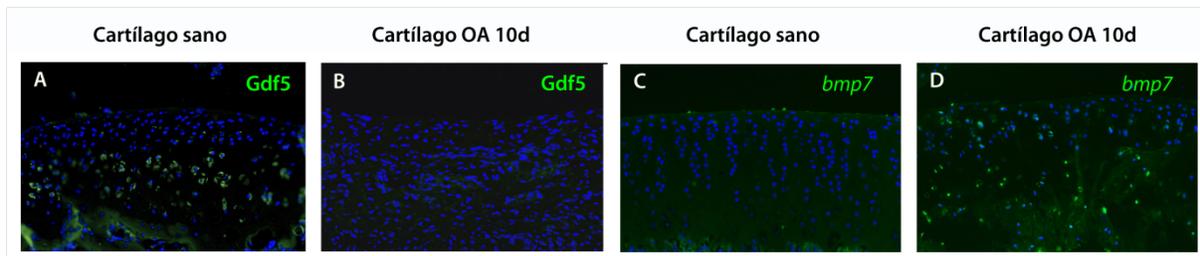


Figura 13. Cartílago articular de rata sano y osteoarthritico. Expresión de Gdf5 detectada mediante Inmunofluorescencia: A) En cartílago sano Gdf5 se expresa en la zona *alta-media* y *zona media*. B) Gdf5 no se expresa en cartílago osteoarthritico de 10d. La expresión de el gen *bmp7* se detectó mediante hibridación *in situ* e IF: C) En cartílago sano no se observa la expresión de *bmp7* . D) El gen *bmp7* en cartílago articular osteoarthritico se distribuye ampliamente en todo el tejido.

Regulación de la expresión de integrinas $\alpha 5$ y αV por los factores de crecimiento Gdf5 y Bmp7 durante la condrogénesis

Debido a que se observó relación en los patrones de expresión de las integrinas $\alpha 5$ y αV con los factores de crecimiento Gdf5 y Bmp7. Se utilizaron cultivos de micromasas para simular un modelo de condrogénesis para determinar mediante IHQ, si estos factores de crecimiento (Gdf5 y Bmp7)

inducen o regulan la expresión de dichas integrinas, además de saber si presentan alguna correlación con el fenotipo diferenciado del cartílago, esto se determinó analizando la expresión de proteínas de MEC del CA como agregano, colágena II, colágena I y fibronectina. Y se analizó si tienen la capacidad de acelerar la formación de cartílago, observado mediante la tinción de Azul Alciano.

En condiciones normales (control) en las micromasas se expresó fuertemente la integrina $\alpha 5$ (Figura 14 F) y en menor intensidad αV (Figura 14 G), también se expresaron colágena II, agregano y fibronectina (Figura 14 C - 14 E). Y los nódulos de cartílago también se tiñeron con Azul Alciano (Figura 14 A).

El tratamiento con Gdf5 indujo mayor expresión de la integrina $\alpha 5$ (Figura 14 M) y proteínas típicas del CA como: agregano, colágena II y fibronectina (Figura 14 K, 14 J y 14 L), los nódulos de cartílago bajo este tratamiento se tiñeron con mayor intensidad (Figura 14 H).

También Bmp7 indujo la expresión de la subunidad $\alpha 5$ pero lo hizo en menor proporción que en presencia de Gdf5, sin embargo la integrina αV en presencia de Bmp7 se expresó fuertemente (Figura 14 S), así como colágena I, una proteína con mayor abundancia en cartílago hipertrófico y en el cartílago articular osteoartrítico (Figura 14 O) mientras que las proteínas características del CA como agregano y colágena II tuvieron menor expresión (Figura 14 Q y 14 P). Los nódulos de cartílago en este tratamiento se tiñeron con menor intensidad (Figura 14 Ñ) comparado con el tratamiento de Gdf5.

Estos resultados indican que Gdf5 induce principalmente la expresión de las integrinas $\alpha 5$ y moléculas que representan un fenotipo del cartílago prehipertrófico de la articulación como colágena tipo II y agregano. Por otro lado Bmp7 indujo la expresión de la integrina αV , así como de proteínas relacionadas al cartílago hipertrófico como la colágena tipo I. Además la formación de los nódulos de cartílago se ve favorecida bajo la presencia de Gdf5 en mayor grado que la presencia de Bmp7.

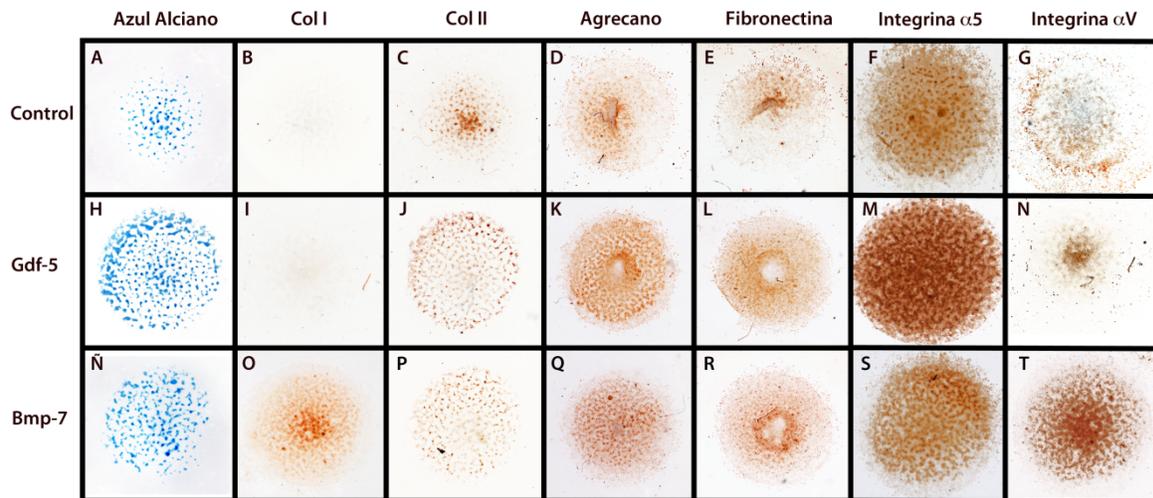


Figura 14. Cultivos de micromasas tratados con Gdf5 y Bmp7 en donde se observa la formación de nódulos de cartílago mediante la tinción Azul Alciano (A,H,Ñ). Por medio de Inmunohistoquímica se observa la expresión de las subunidades de integrinas y proteínas de matriz extracelular. La expresión de $\alpha 5$ es inducida principalmente bajo el tratamiento con Gdf5 (M), así mismo la expresión de αV bajo el tratamiento con Bmp7 es mas intensa (T) y las proteínas de matriz de cartílago articular colágena II, agrecano y fibronectina bajo el tratamiento Gdf5 (J,KL).

La activación de la hipertrofia de los condrocitos durante la OA correlaciona con la disminución de la expresión de Indian hedgehog.

Uno de los reguladores mas importantes en la diferenciación de los condrocitos es *Ihh*, aunque, aún no es claro el papel que juega en la diferenciación del CA y la OA. Se observó mediante hibridación *in situ* que el patrón de expresión de *Ihh*, en CA sano se localizó en la zona superficial del cartílago articular y en la zona media (Figura 14 D). En el CA con OA la expresión de *Ihh* disminuyó conforme avanzó el grado de daño articular a través del tiempo, este patrón es similar al patrón de expresión de la subunidad $\alpha 5$ de la integrina, la cual disminuyó en la superficie y se expresó en la capa media y profunda(Figura 14 E- 14 H) ya conforme avanzó la OA *Ihh* disminuyó considerablemente (Comparar Figuras 12 F- 12 G y Figuras 15 B- 15 D). La expresión de *Ihh* tanto en el CA sano como en el CA con OA también es similar con el patrón de expresión de Gdf5 (Comparar Figuras 13 A-13 B y Figuras

15 A- 15 D). Estos resultados indican que la expresión de *Ihh* pudiera tener relación directa con *Gdf5* y/o la integrina $\alpha 5$

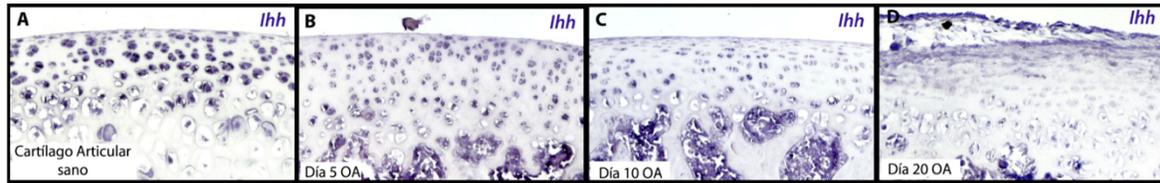


Figura 15. Cartílago articular de rata sano y osteoartrítico, donde se observa mediante hibridación *in situ* la expresión de *Ihh*; A) El gen *Ihh* en cartílago sano se expresa en la zona alta y zona media. B y C) Disminuye la expresión de *Ihh* en la zona alta y zona media. D) Desaparece la expresión de *Ihh* en cartílago osteoartrítico de 20d OA

La expresión de la integrina $\alpha 5$ y hedgehog son dependientes mutuamente para conservar el fenotipo del condrocito.

Debido a que estudios anteriores indican: 1) que el papel de la integrina $\alpha 5$ en el CA en condiciones normales es mantener la adhesión de los condrocitos y la viabilidad de los mismos en cultivo, 2) el papel de *Ihh* en la PC es controlar la hipertrofia de los condrocitos y 3) que en este trabajo encontramos relación en la expresión de esta integrina y este gen en rodillas de rata con OA y sanas. Así, buscamos que relación existe entre *Ihh* y la integrina $\alpha 5$ durante la formación del cartílago. En cultivos de micromasas se bloqueó la señalización hedgehog con un anticuerpo neutralizante anti-*Shh*, y se observó que la integrina $\alpha 5$ no se expresó (Figura 16 B), y al inhibir a la integrina $\alpha 5$ con un anticuerpo neutralizante también se observó que se inhibe la expresión de *Shh* (Figura 16 D).

Estos resultados nos indican que *Ihh* necesita que la integrina $\alpha 5$ este presente y activa para expresarse, mientras la expresión de la integrina $\alpha 5$ en este contexto esta condicionada a la actividad de *Ihh*. Indicando que ambas señales se regulan positivamente.

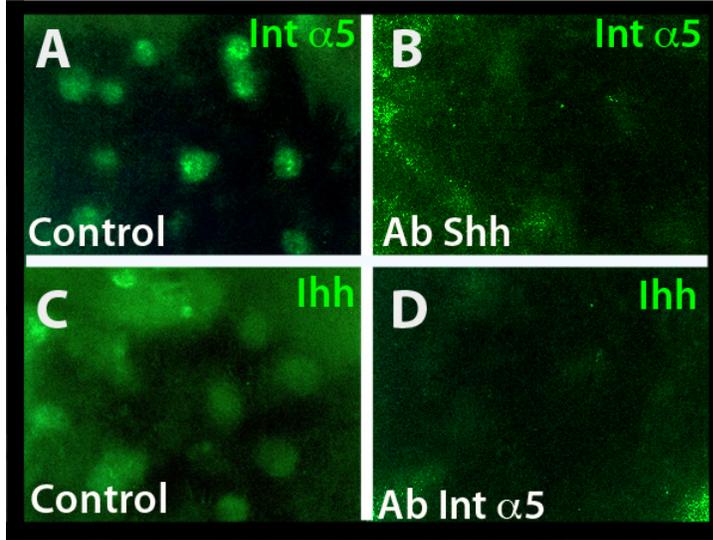


Figura 16. Inmunofluorescencia con FITC en cultivo de micromasas dos distintos tratamientos. A) Expresión de integrina $\alpha 5$ en nódulos de cartílago. B) El bloqueo de Shh con anticuerpo neutralizante evitó la expresión de la integrina $\alpha 5$. C) Expresión de Ihh en cultivo de micromasas. D) El bloqueo de la expresión de la integrina $\alpha 5$ impidió que Ihh se exprese.

El bloqueo de la señalización hedgehog induce la formación de hueso en el cartílago articular.

La expresión de Ihh esta condicionada a la actividad de la integrina $\alpha 5$ y la expresión de ambos es necesaria para mantener el fenotipo de los condrocitos en el modelo *in vitro* de la condrogénesis y en el desarrollo de las extremidades. En base a esto, probamos si la actividad y/o señalización de Ihh altera el fenotipo de los condrocitos articulares, para lo cual utilizamos un modelo de cultivo de órganos de la rodilla de ratón, donde se inhibió la vía de señalización hedgehog con el tratamiento de los cultivos con ciclopamina. Mediante la tinción de Herovici se analizó los cortes histológicos de las rodillas de ratón cultivadas y se observó cambios morfológicos en el ordenamiento de los condrocitos en el CA que normalmente se acomodan longitudinalmente en formas parecidas a vainas denominados condrones (Figura 17 A). La superficie del cartílago de las rodillas sanas con 4 días del

cultivo también sufrió cambios en su estructura apareciendo depresiones leves (Figura 17 B), a los 6 días de tratamiento se observó una superficie mas aplanada (Figura 17 C). Además de la superficie, se observó en todo el tejido del CA cambios morfológicos en los cuales la estructura va desde un acomodo clásico de condrones a un tejido fibroso (Figuras 17 A-17 C). La tinción de Herovici nos presentó cambios en la coloración del tejido: la tinción del cartílago sano mostró coloración roja homogénea lo que significa que la fibras estaban empaquetadas de manera organizada (Figura 17 A), mientras en el tejido tratado con ciclopamina a los 4 días observó coloración roja en la superficie articular y azul en la región de los condrocitos prehipertróficos, lo que significa que la colágena se organizó de manera laxa por que hubo un recambio de la misma; finalmente a los 6 días del tratamiento ya no se observó la coloración azul y la coloración roja muestra fibras muy empaquetadas indicando la presencia de colágena tipo I, ya que la estructura que se observó corresponde a las trabéculas de hueso en la superficie articular, esto representa un cambio similar al que ocurre en una OA severa (Figuras 17 B-17 C).

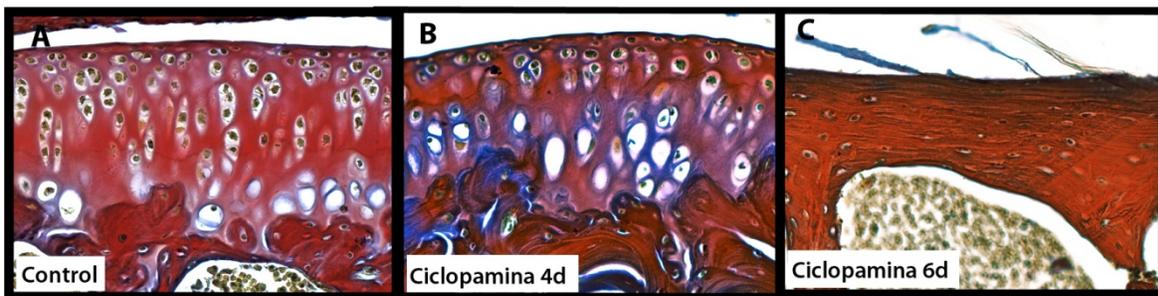


Figura 17. Tinción de Herovici en cultivo de cartílago articular sano y tratado con ciclopamina. A) Cartílago sano donde se observan fibras de colágena empaquetadas y organizadas teñidas de rojo “colágena madura”. B) En el cartílago tratado con ciclopamina a 4d además de observar fibras de colágena teñidas de rojo se observan fibras azules que indican que la matriz esta menos organizada “colágena joven” y también se observa pérdida celular en huecos del tejido . C) A los 6d de cultivo se observa un cartílago fibroso, adelgazado con una reorganización distinta en la estructura del cartílago.

DISCUSIÓN

Como ya se ha mencionado el cartílago articular es una estructura de soporte en las articulaciones sanas, sus células tienen baja tasa de proliferación y sintetizan una matriz rica en colágena tipo II y proteoglicanos; en cambio el cartílago de la placa de crecimiento tiene células que proliferan y se diferencian rápidamente hacia la hipertrofia, paso previo y necesario para la formación de hueso; sin embargo, tanto en la placa de crecimiento como en el cartílago articular se encuentran los condrocitos en estratos que se diferencian por la actividad celular y el tipo de matriz que segregan. La estructura de ambos tejidos es similar, ya que en los dos se encuentran: 1) condrocitos de baja tasa metabólica, 2) condrocitos en proliferación (condición muy reducida o inexistente en el cartílago articular), 3) condrocitos prehipertróficos y 4) condrocitos hipertróficos o calcificados (también muy reducido en el cartílago articular). Nosotros hemos utilizados un modelo del desarrollo del esqueleto que nos permita entender cuales son las diferencias y similitudes entre el cartílago articular y cartílago de la placa de crecimiento, analizando su origen. El patrón de expresión entre las integrinas $\alpha 5$ y αV durante el desarrollo de la extremidad parece ser complementario (comparar 11 B y 11 E; 11 C y 11 F), e inclusive excluyente y en el CA sano con respecto al OA también es diferente el patrón de expresión entre estas integrinas (comparar 12 E y 12 I). Por lo que suponemos que tienen distintos papeles durante la esquetogénesis y durante la OA.

En la PC del ratón se observa la expresión de la integrina $\alpha 5$ en la *zona alta* y en la *zona media* (proliferación y prehipertrófia) (Figura 11 B-11 C), similarmente en el CA sano de rata la expresión de la integrina $\alpha 5$ se observa intensamente en la *zona alta* y en la *media* (Figura 12 E), esto coincide con las observaciones de Dowthwaite y cols. (2004) que reportan a $\alpha 5$ con mayor intensidad en la parte superior del cartílago. Esos resultados nos indican que $\alpha 5$ debe tener un papel importante en la conservación del fenotipo articular.

La integrina αV en la PC se expresa en la zona de los condrocitos prehipertróficos e hipertróficos; es decir, *zona media-profunda* y *zona*

profunda (Figura 11 E-11 F). En el CA sano se observó con mayor expresión en la *zona media-profunda* (Figura 12 I). Esto nos hace pensar que αV se encuentra estrechamente relacionada a la diferenciación de los condrocitos, que da como resultado formación de hueso.

Debido a que en condiciones normales la expresión de cada integrina se puede comparar entre la PC y el CA y que esta expresión es muy similar en ambos tejidos, pensamos que cada integrina esta estrechamente relacionada a linajes celulares específicos donde juegan papeles importantes tanto para la conservación del tejido como para su pérdida.

En condiciones normales, los condrocitos articulares mantienen el equilibrio dinámico entre la síntesis y la degradación de los componentes de la MEC; sin embargo, en estadios degenerativos una perturbación en el metabolismo de la matriz conduce a la pérdida progresiva proteoglicanos (PG). La tinción de Safranina O es un indicador de la presencia de PG en CA y de la calidad del mismo (Yuehwei y Lylie, 2003), el cual durante el proceso osteoarttrítico fue cambiando de una tinción roja y uniforme, en el control, hacia una disminución de ésta acompañada de cambios morfológicos en la estructura del cartílago, lo cual indicó deterioro y pérdida de proteoglicanos (PG). Se puede observar que las muestras se tiñen en color verde, en mayor proporción, al avanzar la OA en el CA (Figura 12 B-12 D), ello nos indica un cambio en los componentes de la MEC y la formación de hueso.

En el modelo de la OA se observó un proceso degenerativo del CA, acompañado de una disminución significativa de la expresión de $\alpha 5$ desde los primeros días de la OA (Figura 12 F). A los 10 días del tratamiento no se expresa $\alpha 5$ en la *zona alta* (Figura 12 G), y finalmente a los 20 días, en el cual se observa mayor daño y pérdida del tejido, la expresión de $\alpha 5$ desaparece (Figuras 12 H). Esto nos hace pensar que la pérdida de la expresión bien se puede deber solo a la pérdida tisular de la zona de expresión ya observada, pero también se puede deber a la pérdida de la expresión de Gdf5 (10d OA) del cual podría depender (comparar 12 F y 13 B).

La expresión de αV en cartílago osteoartrítico femoral reportada previamente indicó que se expresa con mayor intensidad de tinción en la zona superficial (Ostergaard *et al.*, 1998), lo cual coincide con este trabajo, ya que se observó que la integrina αV durante la OA se expresa en el CA en la *zona alta* (Figura 12 K), es decir, que αV modifica su localización espacial en el cartílago, cuando éste está dañado, dicha observación tiene lugar desde los primeros 5 días de la lesión (Figura 12 J). A medida que la enfermedad avanza y el cartílago sufre desgaste, la expresión de αV permanece (Figura 12 L), a diferencia de $\alpha 5$, esta integrina sigue estando activa. Finalmente, en la observación hecha a los 20 días de tratamiento, cuando el daño es más severo se esperaba pérdida de la expresión, pero contrariamente a esto prevaleció su expresión. Pensamos que la integrina αV está involucrada en la hipertrofia de los condrocitos es decir en el proceso degenerativo del cartílago para formar hueso, y por ende, permanece su expresión a pesar de la pérdida del tejido articular (Figura 12 H); es probable que su expresión active el proceso de la vasculogénesis, la formación de tejido óseo; además que podría depender de la expresión de algún otro factor involucrado en el proceso de la osificación como *bmp7* la cual en tejido con OA de 10 días se expresa con amplia distribución en el CA (Figura 13 D), coincidiendo con la expresión de αV bajo las mismas condiciones.

En el cultivo de micromasas, donde se hicieron tratamientos con Gdf5 y Bmp7 con la finalidad de observar una posible inducción de la expresión de las integrinas $\alpha 5$ y αV respectivamente, se observó mediante inmunohistoquímica que en condiciones normales, ambas integrinas se expresan, como se esperaba (Figura 14 F-14 G), la integrina $\alpha 5$ en mayor cantidad que αV , y los marcadores de cartílago agregano, colágena II y fibronectina (Figura 14 C-14 E).

Con la tinción de Azul Alciano observamos que bajo el tratamiento de Gdf5 se generan condiciones más favorables para la formación de nódulos de cartílago que con Bmp7 (comparar Figura 14 H con 14 Ñ), Gdf5 también induce la expresión de la integrina $\alpha 5$, Col II, agregano y fibronectina en mayor abundancia que bajo el tratamiento de Bmp7 (comparar figuras 14 J-14 M con 14 P-14 S). Esto sugiere que Gdf5 mantiene la expresión de una matriz característica de CA sano; con abundancia de agregano, Colágena II

y fibronectina; y a la expresión de la integrina $\alpha 5$ que ha sido considerada por otros autores una integrina que mantiene la homeostasia del cartílago. En otras palabras Gdf5 genera condiciones favorables para el mantenimiento de CA sano.

Con el tratamiento de Bmp7 los niveles de expresión de la integrina αV incrementan con respecto al tratamiento con Gdf5 (Figura 14 T), de modo que la presencia de Gdf5 no es significativa para la activación de esta integrina, pero si la presencia de Bmp7. Además, bajo el tratamiento con Bmp7 se expresó colágena I, la cual normalmente se expresa en OA (Figura 14 O). A pesar de que en este tratamiento se expresan marcadores de matriz como agregano, colágena II y fibronectina, la intensidad de la marca de la tinción es menor que el tratamiento con Gdf5 (Figura 14 P-14 R).

Uno de los posibles ligandos de αV en el CA con OA es $\beta 3$ ya que se ha reportado que la integrina $\alpha V\beta 3$ puede promover la angiogénesis y la neovascularización (Eliceiri y Cheresch, 2000) y esto se puede relacionar a la formación de osteofitos en el CA durante la OA. Además, un ligando de $\alpha V\beta 3$ es osteopontina, la cual es una molécula involucrada en la adhesión y migración para muchos tipos celulares, el cual favorece la formación de un sitio de unión donde se forman los osteoclastos (Chellaiah y Hruska, 2003). Por lo antes mencionado, en este trabajo se considera que, independientemente del ligando al que se esté uniendo αV , está teniendo un papel importante durante la OA, el cual pueda estar involucrado con la formación de osteofitos, debido a que se favorece su expresión sólo en presencia de Bmp7, la cual en estudios previos ha revelado ser una proteína de regeneración y formación ósea.

En búsqueda de la dependencia de la expresión de $\alpha 5$ hacia algún factor genético en el cartílago articular, se inhibió la señalización hedgehog en el sistema de micromasas, dando como resultado que se inhibe la expresión de $\alpha 5$ (Figura 16 B) y significativamente cuando se uso un anticuerpo neutralizante de la integrina $\alpha 5$ (HM $\alpha 5$), la expresión de Ihh (o Shh) se suprimió (Figura 16 D). Estos resultados nos hacen pensar que tanto la expresión de Ihh como la expresión de la integrina $\alpha 5$ son codependientes se la actividad de uno y otro, y por ende, la expresión de ambos factores en

forma conjunta durante la osificación endocondral, el desarrollo y mantenimiento de los órganos óseos es fundamental para mantener la homeostasia fisiológica del CA y la PC. En el cartílago articular, observamos una disminución en la expresión de la integrina $\alpha 5$ en CA con OA y también de *Ihh* (Comparar Figuras 12 G y 15 D), el cual es un regulador en la proliferación y diferenciación celular, entonces al disminuir la expresión de la integrina $\alpha 5$ se infiere que ocurre una alteración en el fenotipo de los condrocitos y un aumento de la diferenciación celular llevando a la hipertrofia, y eventualmente, a la muerte celular y la formación de hueso, que coincide con la disminución de la expresión de *Ihh*. Al ocurrir un daño severo en el CA disminuye la expresión tanto de la integrina $\alpha 5$ como de *Ihh*. De modo que en el cartílago articular con OA a medida que avanza la enfermedad se modifica la expresión de la integrina $\alpha 5$ que pudiera deberse a la diferenciación de las células y no a la erosión del cartílago.

Para corroborar el daño que directamente puede ocurrir al bloquear la señalización de *Ihh* en el cartílago articular, se cultivaron rodillas de ratón, a las cuales se les inyectó ciclopamina, inhibidor conocido de la vía de señalización de *Ihh*, al bloquear la señalización de la proteína Smo. Esta inhibición provocó que el cartílago articular sufriera daños morfológicos en su estructura y cambios en la composición de la matriz, lo antes dicho se observó mediante la tinción de Herovici, tinción que revela el empaquetamiento de las fibras de colágena. El método de Herovici no sólo define la disposición de fibras colágenas sino que las tiñe de diferente color según su fase de maduración: azul, si la colágena se encuentra en una etapa inmadura y roja si se encuentra en su forma madura y bien empaquetada, esto debido a la afinidad que tienen las fibras con el azul de metilo y la fuccina ácida (Dehesa *et al.*, 2008). El control muestra un cartílago articular con empaquetamientos de color rojo predominante, señalándonos abundancia de colágena madura y también se observa un tejido bien estructurado, que corresponde a los parámetros normales del CA (Figura 17 A). Mientras el cartílago tratado con ciclopamina muestra una coloración azul abundante en el cartílago de la zona media de modo que se infiere que hay un cambio en la estructura de la matriz y un recambio en el empaquetamiento de la colágena (Figura 17 B); es decir, esta menos empaquetada, ello parece evidenciar que ocurre una

degradación de las fibras de colágena y posteriormente la síntesis de nuevas fibras de colágena, posiblemente colágena tipo II se degrada y sintetiza colágena tipo I en un intento de reparación del daño en el tejido que termina por cicatrizar. Así que según nuestros resultados, el tratamiento con ciclopamina de las rodillas en cultivo de órganos, provoca un cambio en los componentes de la MEC del CA, ocasionando degradación y reempaquetamiento en las colágenas, proceso similar a la fibrosis que ocurre en las etapas iniciales de la OA y a la formación de hueso cuando se reemplaza el cartílago hipertrófico por hueso. Este resultado nos permite corroborar que *Ihh* es un regulador importante en el mantenimiento del cartílago ya que su inhibición altera el estatus de la homeostasia del mismo, y en el cual está involucrada la expresión de la integrina $\alpha 5$.

En este estudio se observó que las relaciones entre *Gdf5* y la integrina $\alpha 5$, y entre la integrina $\alpha 5$ e *Ihh* son importantes en el mantenimiento del CA. También observamos que *Bmp7* se relaciona con la OA al inducir la expresión de αV durante el daño del CA.

CONCLUSIONES

Tanto $\alpha 5$ como αV tienen un patrón de expresión similar en cartílago articular y placa de crecimiento; $\alpha 5$ en la *zona alta* y *zona media* y αV en *zona media-profunda* y *zona profunda*.

Durante la OA, cambia el patrón de expresión de las integrinas $\alpha 5$ y αV , mientras la expresión de $\alpha 5$ disminuye y finalmente desaparece al avance del daño, la expresión de αV ocurre en la *zona alta* en la etapa avanzada de la OA y permanece, mientras los marcadores moleculares del CA sano desaparecen.

Gdf5 induce la expresión de la integrina $\alpha 5$ y genera condiciones favorables en el mantenimiento del cartílago articular observándose una mayor expresión de proteínas características de este, como agregano y colágena II y fibronectina.

Bmp7 podría estar generando un ambiente adverso al mantenimiento del CA induciendo la expresión de αV que se mantiene durante la OA avanzada, mientras que Gdf5 podría inducir la expresión de la integrina $\alpha 5$ y la señalización de esta inducir la expresión y señalización de Ihh, lo cual mantiene un ciclo benéfico para la conservación del fenotipo de los condrocitos articulares

Ihh y la integrina $\alpha 5$ en el CA coexpresan, y se puede ocasionar una lesión similar a la OA primaria al inhibir la señalización Ihh. De modo que la ausencia de ambos factores reduce el mantenimiento del fenotipo del condrocito articular.

REFERENCIAS

- Abdulhussein, R., McFadden, C., et al. (2004). "Exploring the collagen-binding site of the DDR1 tyrosine kinase receptor." J Biol Chem 279(30):31462-70.
- Akiyama H., Chaboissier M.C., et al. (2002) "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 16:2813-2828.
- Akiyama, H. (2008). "Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9." Mod Rheumatol. 18(3): 213-9.
- Alvarez, J. Costales, L., et al. (2005). "Chondrocytes are released as viable cells during cartilage resorption associated with the formation of intrachondral canals in the rat tibial epiphysis." Cell Tissue Res 320(3): 501-7.
- Archer, C. W., Morrison, H., et al. (1994). "Cellular aspects of the development of diarthrodial joints and articular cartilage." J Anat 184 (Pt 3):447-56.
- Archer, C. W., Dowthwaite, G. P., et al. (2003). "Development of synovial joints." Birth Defects Res C Embryo Today 69(2): 144-55.
- Arias-Salgado, E. G., Haj, F., et al. (2005). "PTP-1B is an essential positive regulator of platelet integrin signaling." J Cell Biology 170(5): 837-45.
- Attur, M.G., Dave, M.n., et al. (2002). "Functional genomic analysis of type II IL-1beta decoy receptor: potential for gene therapy in human arthritis and inflammation." J Immunol 168(4): 2001-10.
- Aszodi, A., Hunziker, E. B., et al (2003). "β1 integrins regulate chondrocyte rotation, G1 progression, and cytokinesis" Gen Dev 17(19):2465-79.
- Bandyopadhyay, A., Tsuji, K., et al. (2006). "Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis." PLoS Genet 2: e216.
- Baynes, J.W., Marek, H., et al. (2005). "Bioquímica médica." Elsevier España
- Bengtsson, T., Aszodi, A., (2005). "Loss of alpha10beta1 integrin expression leads to moderate dysfunction of growth plate chondrocytes." J Cell Sci 118(pt5): 929-36.
- Berg, J.M., Stryer, L., et al. (2008). "Bioquímica." Reverte Pag.3313.
- Bi, W., Wendong, H., et al. (2001). "Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 98:6698-6703.
- Blaney Davidson, E.N., Vitters, E.L., et al. (2006). "Expression of transforming growth factor beta(TGFbeta) and the TGFbeta signalling molecule SMAD-2P in spontaneous and instability induced osteoarthritis: role in cartilage degradation, chondrogenesis and osteophyte formation." Ann Rheum Dis 65(11): 1414-21.
- Blaney Davidson, E. N., van der Kraan, P.M., et al. (2007). "TGF-beta and osteoarthritis." Osteoarthr Cartil 15: 597-604.
- Blaney Davidson, E.N., Remst, D. F., et al. (2009). "Increase in ALK1/ALK5 ratio as a cause for elevated MMP-13 expression in osteoarthritis in humans and mice." J Immunol 182(12):7937-

- Blumer, M. J., Longato, S., et al. (2008). "Structure, formation and role of cartilage canals in the developing bone." Ann Anat 190(4): 305-15.
- Bokel, C. and Brown, N. H. (2002). "Integrins in development: moving on, responding to, and sticking to the extracellular matrix." Dev Cell 3 (3):311-21.
- Bollet, A. J., Handy, J. R., et al (1963). "Chondroitin sulfate concentration and protein-polysaccharide composition of articular cartilage in osteoarthritis." J Clin Invest 42: 853-9.
- Bouvard, D., Brakebusch, C., et al. (2001). "Functional consequences of integrin gene mutations in mice." Circ Res 89: (3). 211-23.
- Buckwalter, J.A. and Mankin, H.J. (1998). "Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions." Instr Course Lect 47: 477-86.
- Buckwalter, J. A. and Mankin, J. A. (2006). "Osteoarthritis." Adv Drug Deliv Rev 58(2): 150-67.
- Buxton, P., Edwards, C., et al. (2001). "Growth/differentiation factor-5 (GDF-5) and skeletal development." J Bone Joint Surg Am 83-A suppl 1(1):23-30.
- Caplan, A. I. (1987). "Bone development and repair." Bioessays 6(4): 171-5.
- Cheifetz, S., Hernandez, H., et al. (1990). "Distinct transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF-beta isoforms." J Biol Chem 265(33):20533-8.
- Chellaiah, M.A., Hruska, K.A. (2003). "The integrin alpha(v)beta(3) and CD44 regulate the actions of osteopontin on osteoclast motility." Calcif Tissue 72(3):197-205.
- Chen, J.K., Taipale, J. (2002). "Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened." Genes Dev 16(21):27438.
- Chen, P., Carrington, J.L., et al. (1991). "Stimulation of chondrogenesis in limb bud mesoderm cells by recombinant human bone morphogenetic protein 2B (BMP-2B) and modulation by transforming growth factor β 1 and β 2." Exp Cell Res 195:509-15.
- Chevalier, X.(1993). "Fibronectin, cartilage, and osteoarthritis" Semin Arthritis Rheum 1993 Apr;22(5):307-18.
- Clarke, B.(2008). "Normal bone anatomy and physiology." Clin J Am Soc Nephrol 3:S131-9.
- Darling, E. M., Pritchett, P. E., et al. (2009). "Mechanical properties and gene expression of chondrocytes on micropatterned substrates following dedifferentiation in monolayer." Cell Mol Bioeng 2(3):395-404.
- Day, T. F., Guo, X., et al. (2005). "Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis." Dev Cell 8(5): 739-50.
- Dowthwaite, G.P., Bishop, J.C., et al. (2004). "The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population." J Cell Sci 117(Pt 6):889-97.
- Ducy, P., Zhang, R., et al (1977) "Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation." Cell 89: 747-54.
- Dy, P., Smots, P., et al. (2010). "Sinovial joint morphogenesis requires the chondrogenic action of

Sox5 and *Sox6* in growth plate of cartilage." Developmental Biology 346-359.

- Edwards, J. C., Wilkison, L. S., et al. (1994). "The formation of human synovial joint cavities: a possible role for hyaluronan and CD44 in altered interzone cohesion." J Anat 185(Pt 2): 355-367.
- Eyre, D. (2002). "Articular cartilage and changes in Arthritis: Collagen of articular cartilage." Arthritis Res 4(1): 30-35.
- Eliceiri, P.B. and Cheresch, D.A. (2000). "Role of alpha v integrins during angiogenesis." Cancer J 3:S245-9.
- Fanf, J. and Hall, B. K. (1995). "Differential expression of neural cell adhesion molecule (NCAM) during osteogenesis and secondary chondrogenesis in the embryonic chick." Int J Dev Biol 39(3): 519-28.
- Torres, S.F. (2008) "Manual de técnicas en histología y anatomía patológica." Ed Ariel Barcelona Pag. 71.
- Francis-West, P. H., Parish, J., et al. (1999). "BMP/GDF-signalling interactions during synovial joint development." Cell Tissue Res 296(1): 111-9.
- Francis-West, P.H., Abdelfattah, A., et al. (1999). "Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development." Development 126(6): 1305-15.
- Friedrichs, M., Wirsdorfer, F., et al. (2011). "Bmp-signaling balances proliferation and differentiation of muscle satellite cell descendants." BMC Cell Biol 12(1):26.
- Garciadiego-Cázares, D., Rosales, C., et al (2004)." Coordination of chondrocyte differentiation and joint formation by alpha5beta1 integrin in the developing appendicular skeleton." Development 131(19):4735-42.
- Gerber, H. P., Vu, T. H., et al. (1999)."VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation." Nat Med 5 (6): 623-8.
- Gilbert, S. F. (2000). "Developmental Biology." Sinauer Associates Chapter 14. Bookshelf ID: NBK9983.
- Gidefroy, D., Rousselin, B., et al. (2011). "Hip degeneration." J Radiol 92(6):581-593.
- Gouttenoire, J., Bougault, C., et al. (2010). "BMP-2 and TGF-beta1 differentially control expression of type II procollagen and alpha 10 and alpha 11 integrins in mouse chondrocytes." Eur J Cell Biol 89(4):307-14.
- Gruber, R., Mayer, C., et al . (2001). "Effects of cartilage-derived morphogenetic proteins and osteogenic protein-1 on osteochondrogenic differentiation of periosteum-derived cells." Endocrinology 142(5):2087-94.
- Haaiman, A., Karperien, M., et al. (1999). "Inhibition of terminal chondrocyte differentiation by bone morphogenetic protein 7 (OP-1) in vitro depends on the periarticular region but is independent of parathyroid hormone-related peptide." Bone 25(4). 397-404.
- Haines, R.W. (1947). "The development of joints." Journal of Anatomy 81:33-55.
- Hamrick, M.W. (2001). "Primate origins: evolutionary change in digital ray patterning and segmentation." J Hum Evol 40:339-351.

- Hanamura, H., Higuchi, Y., et al. (1980). "Solubilized bone morphogenetic protein (BMP) from mouse osteosarcoma and rat demineralized bone matrix." Clin Orthop Relat Res **148**:281-90.
- Hartmann, C. and Tabin, C. J. (2000). "Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb." Development **127**(14): 3141-59.
- Hartmann, C., Tabin, C.J., (2001). "Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint." Cell **104**(3):341-51.
- Haywood, L., McWilliams, D.F., et al. (2003). "Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis." Arthritis Rheum **48**:2173-7.
- Hinoi, E., Bialek, P., et al. (2006). "Runx2 inhibits chondrocyte proliferation and hypertrophy through its expression in the perichondrium." Genes Dev **20**(21): 2937-42.
- Holder, N. (1977). "An experimental investigation into the early development of the chick elbow joint." J. Embryol. Exp. Morphol **39**:115-127.
- Horton, W. A., Machado, M. A., et al. (1993). "An experimental model of human chondrocyte differentiation." Prog Clin Bio Res **383B**: 533-40.
- Horton, W. E. Jr., Yagi, R., et al. (2005) "Overview of studies comparing human normal cartilage with minimal and advanced osteoarthritic cartilage." Clin Exp Rheumatol **23**: 103-12.
- Horton, W. E., Bennion, P., et al. (2006). "Cellular, molecular, and matrix changes in cartilage during aging and osteoarthritis." J Musculoskelet Neuronal Interact **6**(4):379-81.
- Hughes, P. E., Diaz-Gonzalez, F., et al. (1996). "Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling." J Biol Chem **271**(12):6571-4.
- Humphries, M. J. (2000). "Integrin structure." Biochem Soc Trans **28**(4):311-39.
- Humphries, M.J., Travis, M. A., et al. (2004). "Mechanisms of integration of cells and extracellular matrices by integrins." Biochem Soc Trans **32**(pt 5):822-5.
- Humphries, J. D., Byron, A., et al. (2006), "Integrin ligands at a glance." J Cell Sci **119**(19):3901-3.
- Ikeda, T., Kamekura, S., (2004). "The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage." Arthritis Rheum **50**(11): 3561-33.
- Ito, M. M. and Kida, M. J., (2000). "Morphological and biochemical re-evaluation of the process of cavitation in the rat knee joint: cellular and cell strata alterations in the interzone." J Anat **197**pt4: 659-79.
- Iwasaki, M., Nakahara, H., et al. (1994). "Bone morphogenetic protein-2 stimulates osteogenesis, but does not affect chondrogenesis in osteochondrogenic differentiation of periosteum-derived cells." J Bone Miner Res **9**: 1195-204.
- Karp, S. J., Schipani, E., et al. (2000). "Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and -independent pathways." Development **127**(3): 534-8.
- Karsenty, G. and Wagner, E. F. (2002). "Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development." Dev Cell **2**(4): 389-406.
- Karsenty, G. (2008). "Transcriptional control of skeletogenesis." Annu Rev Genomics Hum

Genet **9**: 183-96.

- Karsenty, G., Kronenberg, H. M., et al. (2009). "Genetic control of bone formation" Annu Rev Cell Dev Biol **25**: 629-48.
- Kavanagh, E., Church, V.L., et al. (2006). "Differential regulation of GDF-5 and FGF-2/4 by immobilisation in ovo exposes distinct roles in joint formation." Dev Dyn **235**(3): 826-34.
- Kawabata, M. and Miyazono, K. (1999). "Signal transduction of the TGF-beta superfamily by Smad proteins." J Biochem **125**(1): 9-16.
- Kobayashi, T. and Soegiarto, D. W. (2005). "Indian hedgehog stimulates periarticular chondrocyte differentiation to regulate growth plate length independently of PTHrP." J Clin Invest **115**(7): 1734-42.
- Koolman, J. (2005). "Bioquímica." Médica Panamericana. Pag 346.
- Koyama, E., Ochiai, T., et al. (2007). "Synovial joint formation during mouse limb skeletogenesis: roles of Indian hedgehog signaling." Ann N Y Acad Sci **1116**: 100-12.
- Kronenberg, H. M. (2003). "Developmental regulation of growth plate." Nature **423**(6937): 332-6.
- Kurtis, M.S., Schmidt, T.A., et al. (2003). "Integrin-mediated adhesion of human articular chondrocytes to cartilage." Arthritis Rheum **48**(1):110-8.
- Ledingham, J., Regan, M., et al.(1995). "Factors affecting radiographic progression of knee osteoarthritis." Ann Rheum Dis **54**:53-8.
- Lee, D. H., Park, B. J., et al. (2006). "Chemotactic migration of human mesenchymal stem cells and MC3T3-E1 osteoblast-like cells induced by COS-7 cell line expressing rhBMP-7." Tissue Eng **12**(6): 1577-86.
- Lefebvre, V. and Smits, P. (2005). "Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation." Birth Defects Res C Embryo Today **75**(3): 200-12.
- Lefebvre, V., Huang, W. D., et al. (1997) "SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the proa1(II) collagen gene." Mol Cell Biol **17**:2336-2346.
- Li, Y., Xu, L., and Olsen, B.R. (2007). "Lessons from genetic forms of osteoarthritis for the pathogenesis of the disease." Osteoarthritis Cartilage **15**: 1101-1105.
- Little, C.B., Meeker, C.T., et al. (2007). "Blocking aggrecanase cleavage in the aggrecan interglobular domain abrogates cartilage erosion and promotes cartilage repair." J Clin Invest **117**:1627-36.
- Little, C.B., Barai., et al. (2009). "Matrix Metalloproteinase 13-Deficient Mice Are Resistant to Osteoarthritic Cartilage Erosion but Not Chondrocyte Hypertrophy or Osteophyte Development". Arthritis Rheum **60**(12):3723-33.
- Lowery, J. W. and Caestecker, M. P. (2010). "BMP signaling in vascular development and disease." Cytokine Growth Factor Rev **21**(4):287-98.
- Luo, B. H. and Springer, T. A. (2006). "Integrin structures and conformational signaling." Curr Opin Cell Biol **18**: (5). 579-86.
- Luyten, F.P., Yu, Y.M, et al. (1992). "Natural bovine osteogenin and recombinant human bone morphogenic protein-2B are equipotent in the maintenance of proteoglycans in bovine

articular cartilage explant cultures." J Biol Chem **264**:3691-5.

- MacDevitt, C. A. (1973) "Biochemistry of articular cartilage." Ann rheu Dis. **32**: 364.
- Macias, D., Ganan, Y., et al. (1997). "Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development." Development **124**(6): 1109-17.
- Mackie, E. J., Thesleff, I., et al. (1987). "Tenascin is associated with chondrogenic and osteogenic differentiation in vivo and promotes chondrogenesis in vitro." J Cell Biol **105**(6 Pt 1):2569-79.
- Mahmoodi, M., Sahebjam, S. et al. (2005). "Lack of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 results in an enhanced inflammatory response in antigen-induced arthritis." Am J Pathol **166**:1733-1740.
- Martin, J. A and Buckwalter, J. A. (2002) "Aging, articular cartilage chondrocyte senescence and osteoarthritis." Biogerontology **3**:257-264.
- Martinez, A. A. y Steward, A. (2002). "Molecular Principles of Animal Development." Oxford New York. Pag 1115.
- Martin, J. A. and Buckwalter, J. A. (2006). "Post-traumatic osteoarthritis: the role of stress induced chondrocyte damage." Biorheology **43**(3-4): 517-21.
- Matthews, B. F. (1953). "Composition of articular cartilage in osteoarthritis. Changes in collagen chondroitin-sulphate ratio." Brit Med J **2**:660.
- Merino, R., Macias, D., et al. (1999). "Expression and function of Gdf-5 during digit skeletogenesis in the embryonic chick leg bud." Dev Biol **206**(1):33-45.
- Michael, J. M., Golshain, A., et al. (2008). "Biomemechanics of the ankle joint and clinical outcomes of total ankle replacement." J Mech Behav Biomed Mater **1**(4):276-94.
- Millward-Sadler, S. J., Wrigth, M.O., et al. (2000). "Altered electrophysiological responses to mechanical stimulation and abnormal signalling through alpha5beta1 integrin in chondrocytes from osteoarthritic cartilage." Osteoarthritis Cartilage **8**(4): 272-8.
- Minina, E., Wenzel, H. M., et al (2001). "BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation." Development **128**(22): 4523-34.
- Minond, D., Lauer-Fields, J.L., et al. (2006). "The roles of substrate thermal stability and P2 and P1_ subsite identity on matrix metalloproteinase triple-helical peptidase activity and collagen specificity." J Biol Chem **281**: 38302-13.
- Mitrovic, D. (1978). "Development of the diarthrodial joints in the rat embryo." Am J Anat **151**:475-485.
- Miyazono, K. (1999). "Signal transduction by bone morphogenetic protein receptors: functional roles of Smad proteins." Bone **25**(1): 91-3.
- Miyazono, K., Kamiya, Y., et al. (2010). "Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction." J Biochem **147**(1): 35-51.
- Morales, T. And Roberts, A. B. (1988) "Transforming Growth Factor β Regulates the Metabolism of Proteoglycans in Bovine Cartilage Organ Culture." J Biol Chem **263**(26):12828-31.
- Morini, S., Continenza, M. A., et al. (2004). "Development of the microcirculation of the secondary ossification center in rat humeral head." Anat Rec A Discov mol Cell Evol Biol

278(1). 419-27.

- Murakami, S., Balmes, G., et al. (2004). "Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the Fgfr3-deficient mouse phenotype." Genes Dev **18**(3): 290-305.
- Nishida, Y., Knudson, C. B., et al. (2000). "Osteogenic protein 1 stimulates cell-associated matrix assembly by normal human articular chondrocytes." Osteoarthritis Cartilage **8**(2): 127-36.
- Nishida, Y., Knudson, C. B., et al. (2000). "Osteogenic protein 1 stimulates cells-associated matrix assembly by normal human articular chondrocytes: up-regulation of hyaluronan synthase, CD44, and aggrecan." Arthritis Rheum **43**(1): 206-14.
- Nishihara, A., Fujii, M., et al. (2003). "Bone morphogenetic protein signaling in articular chondrocyte differentiation." Biochem Biophys Res Commun **301** (2): 617-22.
- Oberlender, S. A. and Tuan, R. S. (1994). "Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis." Development **120**(1): 177-87.
- Oegema, T. R., Jr. and Thompson, R. C., Jr. (1981). "Characterization of a hyaluronic acid-dermatan sulfate proteoglycan complex from dedifferentiated human chondrocyte cultures." J Biol Chem. **256**(2): 1015-22.
- Ostergaard, K., Salter, D.M., et al (1998), "Expression of alpha and beta subunits of the integrin superfamily in articular cartilage from macroscopically normal and osteoarthritic human femoral heads." Ann Rheum Dis **57**(5):303-8.
- Pacifici, M., Koyama, E., et al. (2006). "Cellular and molecular mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation." Ann N Y Acad Sci **1068**:74-86.
- Petrich, B.G. (2007). "Talin si requerid for integrin-meditad platelet función in homeostasis hand trombosis." JEM **13**: 3103-11.
- Petrich, B. G. (2009). "Talin-dependent integrin signalling in vivo." Throm Haemost **101**(6):1020-4.
- Pitsillides, A. A. and Ashhurst, D. E. (2008). "A critical evaluation of specific aspects of joint development." Dev Dyn **237**(9): 2284-94.
- Polinkovsky, A., Robin, N.H., et al. (1997). "Mutations in CDMP1 cause autosomal dominant brachydactyly type C". Nat Genet **17** (1): 18-9.
- Poole, C. A., Matsuoka, A., et al. (1991). "Chondrons from articular cartilage. III. Morphologic changes in the cellular microenvironment of chondrons isolated from osteoarthritic cartilage." Arthritis Rheum **34**(1): 22-35.
- Pulai, J.I., Del Carlo, M. Jr., et al. (2002). "The alpha5beta1 integrin provides matrix survival signals for normal and osteoarthritic human articular chondrocytes in vitro." Arthritis Rheum **46**(6):1528-35.
- Reddi, A. H. (1981). "Cell biology and biochemistry of endochondral bone development." Coll Relat Res **1**(2):209-26.
- Rollin, R., Marco, F., et al. (2008). "Early lymphocyte activation in the synovial microenvironment in patients with osteoarthritis: comparison with rheumatoid arthritis

patients and healthy controls." Rheumatol **28**:757-764.

- Rothewell, A.G. and Bentley, G. (1973), "Chondrocyte multiplication in osteoarthritic articular cartilage." J Bone Joint Surg Br **55**(3): 588-94.
- Roy, S. and Meachim, G. (1968). "Chondrocyte ultrastructure in adult human articular cartilage." Ann Rheum Dis **27**(6): 544-58.
- Saldaña, G.P. (2007). "Subphylum vertebrata." en Niveles de organización en animales. Universidad Nacional Autónoma de México. Pag 344.
- Sampath, T.K., Maliakal, J.C., et al. (1992). "Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro". J Biol Chem **267**:20352-62.
- Schipani, E., Ryan, H. E. (2001). "Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival." Genes Dev **15**(21): 2865-76.
- Shakibaei, M., Schulze-Tanzil, G., et al. (2003). "Expression of the VEGF receptor-3 in osteoarthritic chondrocytes: stimulation by interleukin-1b and association with b1-integrins." Histochem Cell Biol **120**:235-241.
- Shattil, S. J. and Newman, P. J. (2004) " Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets." Blood **104**(6):1606-15.
- Sheppard, D. (2000). "In vivo functions of integrins: lessons from null mutations in mice." Matrix Biol **19**(3):203-9.
- Silvera y Barrios. (2002). " La matriz extracelular: el ecosistema de la célula" Salud Uninorte **16**: 9-18.
- Smith, G.N., Jr. (2006). "The role of collagenolytic matrix metalloproteinases in the loss of articular cartilage in osteoarthritis." Front Biosci **11**:3081-3095.
- Sopena-Juncosa, J. J., Carrillo-Poveda, J. M., et al. (2000). "Estructura y función del cartílago articular." Argos 25-26.
- Später, D., Hill, T.P., et al. (2006). "Wnt9a signaling is required for joint integrity and regulation of Ihh during chondrogenesis." Development **133**(15):3039-49.
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M., et al.(1999). "Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation." Genes Dev **13**: 2072-2086.
- Storm, E.E. and Kingsle, D.M. (1999). "GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development." Dev Biol **209**(1):11-27.
- Stott, N. S., Jiang, T. X., et al. (1999). "Successive formative stages of precartilaginous mesenchymal condensations in vitro: modulation of cell adhesion by Wnt-7A and BMP-2." J Cell Physiol **180**(3): 314-24.
- Su, J. L., Chiou, J., et al. (2010). "CYR61 regulates BMP-2-dependent osteoblast differentiation through the $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrin/integrin-linked kinase/ERK pathway." J Biol Chem **285**(41):31325-36.

- Sutton, S., Clutterbuck, A., et al. (2009). "The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis." Vet. J **179**: 10-24.
- Tadokoro, S., Shattil, S. J., et al. (2003). "Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation." Science **302**(5642):103-6.
- Takuwa, Y. C., Ohse, C., et al. (1991). "Bone morphogenetic protein-2 stimulates ALP activity and collagen synthesis in cultured osteoblastic cells, MC3T3-E1." Biochem Bio- phys Res Commun **174**:96-101.
- Theiler, K. (1989). "The House mouse." Springer-Verlag NY. Pags. 87-108.
- Thies, R.S., Bauduy, M., et al. (1992). "Recombinant human bone morphogenetic protein-2 induces osteoblastic differentiation in W-20-17 stromal cells." Endocrinology **130**:1318-24.
- Tucker, J. A., Mintzer, K. A., et al. (2008). "The BMP signaling gradient patterns dorsoventral tissues in a temporally progressive manner along the anteroposterior axis." Dev Cel **14**(1):108-19.
- Tureta, J. (1968). "Anatomy of blood vessels of the femur head and its sensitivity to traumatic damage" Hefte Unfallheilkd. **97**:18-28.
- Tuckwell, D. S., Brass, A., et al. (1992). "Homology modelling of integrin EF-hand. Evidence for widespread use of a conserved cation-binding site." Biochem J **285**(Pt 1): 325-31
- Uchino M, Izumi T, Tominaga T, et al. (2000). "Growth factor expression in the osteophytes of the human femoral head in osteoarthritis." Clin Orthop Rel Res 119-125.
- Urist, M. R. (1965). "Bone: formation by autoinduction." Clin Ortheo Related Res **395**: 4-10.
- van Donkelaar, C. C. and Huiskes, R. (2007). "The PTHrP-Ihh feedback loop in the embryonic growth plate allows PTHrP to control hypertrophy and Ihh to regulate proliferation." Biomech Model Mechanobiol. **6**(1-2): 55-62.
- Vogel, W. F. (2001). "Collagen-receptor signaling in health and disease." Eur J Dermatol **11**(6):506-14.
- Vorkamp, A., Lee, K., et al. (1996). "Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein." Science **273**(5275): 613-22.
- Vukicevic, S., Luyten FP, et al. (1989) "Stimulation of the expression of osteogenic and chondrogenic phenotypes in vitro by osteogenin." Proc Natl Acad Sci U S A **86**:8793-7.
- Waldman, S. D., Spiteri, C. G., et al. (2004). "Long-term intermittent compressive stimulation improves the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage." Tissue Eng **10**(9-10): 1323-31.
- Wang, W., Zhu, J., et al. (2011). "Tests of integrin transmembrane domain homo-oligomerization during integrin ligand binding and signaling." J Biol Chem **286**(3):1860-7.
- Weckman, A. L y Cabral, A.R. (1996) "Conceptos actuales sobre colágenas de cartílago y su asociación con enfermedades." Rev Invest Clin **48**(4): 311-319.
- Wiesner, S., Legate, K. R., et al. (2005). "Integrin-actin interactions." Cell Mol Life Sci **62**(10):1081-99.

- Wozney, J. M., Rosen, V., et al. (1988). "Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities." Science **242**(4885):1528-34.
- Xiu, Z. B., Chen, W. T., et al. (20019). "Study on correlation between the pathological changes under arthroscopy and the cytokine levels in the knee osteoarthritis of the Blood Stasis type." Zhongguo Gu Shang **23**(12):890-3
- Yagi, R., McBurney, D., et al. "Intrajoint comparisons of gene expression patterns in human osteoarthritis suggest a change in chondrocyte phenotype." J Orthop Res **23**:1128-1138.
- Yamada, K. M. and Miyamoto, S. (1995). "Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control." Curr Opin Cell Biol **7**: (5). 681-9.
- Yu, L., Ha, M., (2010). "BMP signaling induces digit regeneration in neonatal mice." Development **137**(4): 551-19.
- Yuehwei H. AN Kylie L. Martin. (2003). "Handbook of histology methods for bone and cartilage". Ed. Humana Press Pag 217, 420, 300.
- Zao, Q., Eberspaecher, H., et al. (1997). "Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis." Dev Dyn **209**(4): 377-86.
- Zemmyo, M. Meharra, E. J., et al. (2003). "Accelerated, aging-dependent development of osteoarthritis in alpha1 integrin-deficient mice." Arthritis Rheum. **48**(10):2873-80.
- Zuscik, M. J., Hilton, M. J., et al. (2008). "Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress." J Clin Invest. **118**(2): 429-38.