

Los condrocitos del cartílago de pacientes con osteoartritis (OA) presentan un incremento en la expresión *in situ* de balsas lipídicas

Raymundo Cruz^a, Magdalena Miranda^a, Juana Calderón-Amador^b, Sandra Carrillo^c, Oscar Raya^c, Leopoldo Flores-Romo^b, Juan Kouri^a

Departamento de ^aInfectómica y Patogénesis Molecular y ^bBiología Celular; Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), y ^cDepartamento Reumatología; Hospital 1 de Octubre; ISSSTE. México. jrcruz@cinvestav.mx

Introducción

Las balsas lipídicas (BL) son microdominios de membrana ricos en colesterol, esfingomielina y proteínas ancladas por glucosilfosfatidilinositol (GPI). Se ha mostrado que las BL se agrupan en respuesta a diferentes estímulos extracelulares para formar plataformas que reclutan o agrupan una gran variedad de moléculas que participan en la transducción de señales (receptores, proteínas G, cinasas de tirosina, fosfatasas etc.) [1]. Aunque el agrupamiento dinámico de las BL se ha documentado ampliamente en la transducción de señales en diferentes células de mamíferos (normales y patológicas), no se conoce su papel durante la progresión de la OA. La OA es una enfermedad crónica degenerativa caracterizada por la pérdida progresiva del cartílago articular. Durante la patogénesis de la OA los condrocitos (único tipo celular presente en el cartílago) responden a los estímulos adversos promoviendo la degradación de la matriz y regulando negativamente los procesos para la reparación. Como consecuencia los condrocitos sufren cambios fenotípicos dramáticos, cambios a los que se les ha denominado como “transdiferenciación” [2]. Este fenómeno de “transdiferenciación” está relacionado con los cambios en la actividad bioquímica y molecular de los condrocitos y que trae como consecuencia su muerte por un tipo de apoptosis denominado condroptosis [2, 3]. Consecuentemente, los condrocitos deben de desplazar toda una maquinaria de transducción capaz de inducir sus propios cambios morfofuncionales. Varios mediadores se sobreexpresan en el líquido sinovial y el cartílago de pacientes con OA tales como la interleucina -1 β (IL-1 β), factor de necrosis tumoral (TNF), FAS, que se han involucrado en los cambios fenotípicos de los condrocitos. Sin embargo, si las señales inducidas por estos ligandos extracelulares para regular la progresión de la OA dependen de la redistribución de los BL no se ha determinado hasta la fecha. Por lo que el objetivo de este trabajo es determinar si el existen cambios en el agrupamiento de BL en los condrocitos de pacientes con OA comparados con cartílago no OA.

Metodos

Las muestras de cartílago normal se tomaron de los cóndilos de cadáveres sin diagnóstico de OA y las muestras de cartílago OA se tomaron de pacientes a los que se les practicó una artroplastia de sustitución. En ambos casos, las muestras se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS y se embebieron en medio de congelación. Se realizaron cortes de 6 μ m en el criostato (Leica CM1100, Leica Microsystems), los cuales luego se incubaron con la subunidad B de la toxina del cólera, acoplada con fluoresceína (CBT-FITC, 0.5 μ g/ml), por 1 hora a temperatura ambiente en PBS que contenía BSA al 1%. Después de 3 lavados con PBS los tejidos se contratiñeron con yoduro de

propidio y se montaron con Vectashield. Como control positivo se utilizaron células de bazo tratadas por 24 horas con TNF- α (10 μ g/ml). Para descartar un pegado inespecífico de la FITC se utilizó FITC (Sigma-Aldrich) a la misma concentración molar que la acoplada a la CBT. Las imágenes se registraron con un microscopio confocal (Leica TSCS-SP5MO, Leica Microsystems). Se contaron las células totales y positivas para CBT-FITC, en nueve campos tomados al azar, tanto de la zona superficial como de la zona media. Las células se contaron en las imágenes del cartílago proveniente de tres donantes normales y de tres donantes con OA. Los resultados se expresaron en porcentaje de células positivas \pm desviación estándar de la media (DE). Los resultados se consideraron significativos con una $p \leq 0.05$.

Resultados

El análisis de las imágenes de las muestras de cartílago marcadas con CBT-FITC reveló diferencias significativas en la presencia de BL entre el cartílago normal y el OA, tanto en las zonas superficial como media (tabla 1 y figura 1). Comparado al cartílago normal, los condrocitos de pacientes con OA positivos para las BL se incrementaron aproximadamente un 35 % en la zona superficial y en un 19% en la zona media (tabla 1). La señal fue específica ya que la FITC libre no marco ninguna célula (no mostrado).

Nuestros resultados muestran que los condrocitos del cartílago normal y OA promueven de manera diferente la formación de BL, lo que sugiere que durante la progresión de la OA los condrocitos son biológicamente activos y promueven la formación de complejos de señalización para producir diferentes respuestas biológicas.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el CINVESTAV. Los autores agradecen la ayuda en el microscopio confocal de Iván J. Galván-Mendoza. Agradecemos a la Dra. Aracelys Chico por las muestras de cartílago de los donantes no OA.

Referencias

1. Simons K y Toomre D. Nat Rev Mol Cell Biol; 2000. 1:31-41.
2. Kouri JB y Lavalle C. Histol Histopathol; 2006. 21:793-802.
3. Roach HI, Aigner T, y Kouri JB. Apoptosis; 2004. 9:265-77.

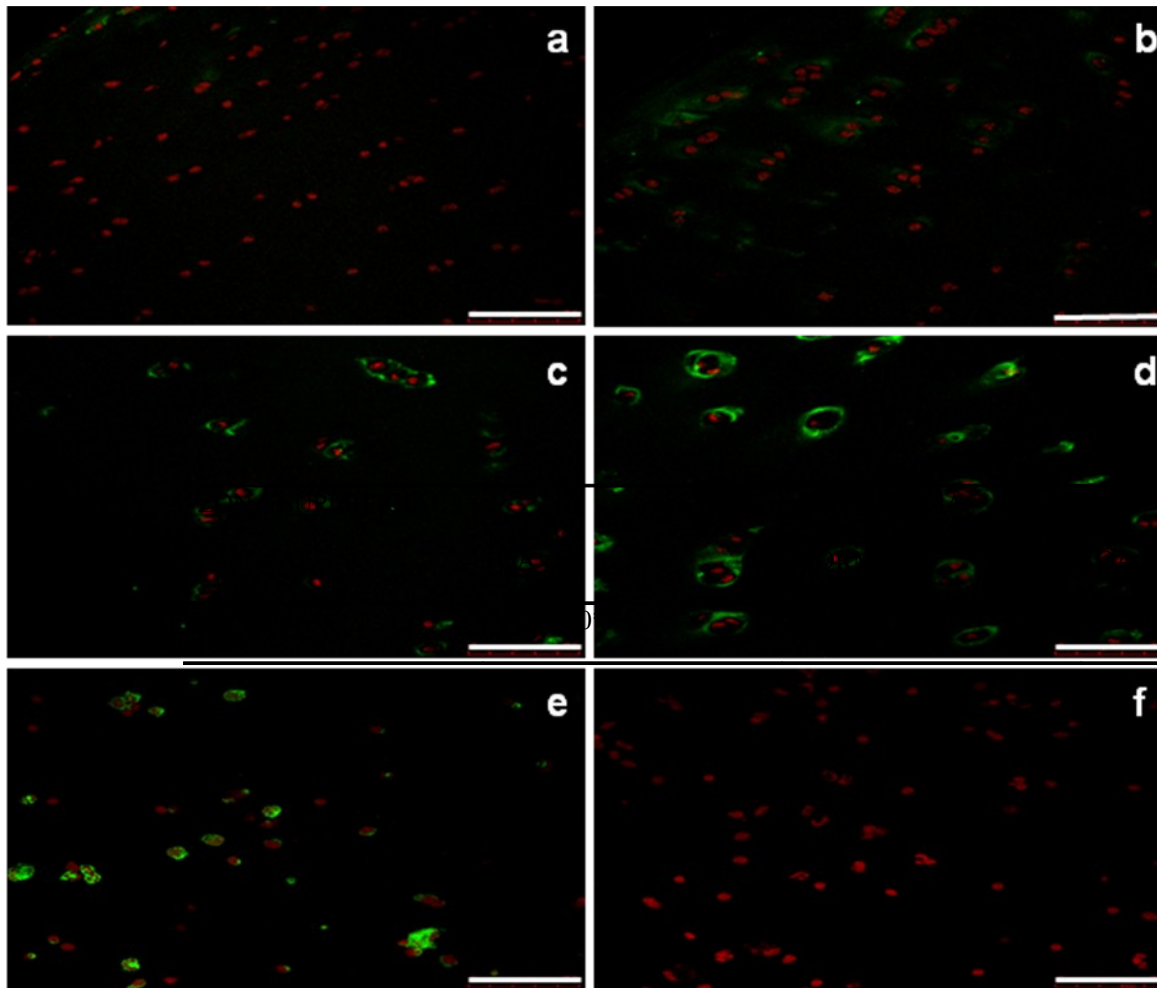


Tabla 1. Porcentaje de células con Balsas Lipídicas en los condrocitos de cartílago humano

*

En cada zona del cartilago se contaron las células totales y las células positivas para la CBT-FITC. Los datos son el promedio \pm DE

(n=3 muestras de cartilago independientes) *: $p \leq 0.05$ con respecto al cartílago normal; **: $p \leq 0.001$ con respecto al cartílago normal. Las células totales por tejido se consideraron el 100%.

Figura 1. Localización de BL en la membrana de los condrocitos de la zona superficial (a, b) y zona media (c, d) de cartílago normal (a, c) y OA (b, d). e) Células de bazo marcadas con CTB-FITC se utilizaron como control positivo, f) Células de bazo marcadas con FITC (sin CBT) se utilizaron como control negativo. Barra de la escala 75 μ m.