



Departamento de Medicina Interna, Psiquiatría y Dermatología
Servicio de Reumatología, Hospital Universitario de Canarias
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Laboratorio de Biología del Desarrollo
Universidad de La Laguna

TRANSPORTADORES DE SODIO DEL CONDROCITO HUMANO Y SUS MODIFICACIONES EN EL CARTÍLAGO ENFERMO

Memoria para optar al grado de
Doctora en Medicina que presenta
D^a Elisa Trujillo Martín

Julio, 1.998

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA



DON PABLO MARTÍN VASALLO, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA, Y DON TOMÁS GONZALEZ GARCÍA, PROFESOR TITULAR DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA.

C E R T I F I C A N: Que D^a ELISA TRUJILLO MARTÍN ha realizado bajo su dirección los trabajos de investigación que se incluyen en la memoria titulada "*TRANSPORTADORES DE SODIO DEL CONDROCITO HUMANO Y SUS MODIFICACIONES EN EL CARTÍLAGO ENFERMO*", y que se presentan para la obtención del título de Doctora en Medicina.

Revisada la presente memoria estimamos que corresponde con los objetivos propuestos y resultados obtenidos y en consecuencia autorizamos su presentación como tesis doctoral para defensa pública ante el tribunal que sea designado al efecto.

Y para que así conste, expiden la presente verificación en La Laguna a veintiuno de mayo de mil novecientos noventa y ocho.

Fdo. Dr. Pablo Martín Vasallo

Fdo. Dr. Tomás González García

*A mis padres.
A Guillermo.*

AGRADECIMIENTOS

Resulta fácil escribir los nombres de aquellas personas que han hecho posible de algún modo la realización de este trabajo, pero es difícil con unas simples líneas expresar lo que han supuesto en mi vida profesional y personal, durante estos años de trabajo que culminan con la presentación de esta memoria. Espero y deseo que ello signifique un punto y seguido en nuestra relación.

Debo agradecer en primer lugar a los doctores Pablo Martín Vasallo y Tomás González García la confianza que han depositado en mí para la realización de este trabajo. El profesor Martín Vasallo me ha enseñado la importancia de la investigación biomédica básica, formándome en ella, además de estructurar de forma decisiva este trabajo. El profesor González García, además de enseñarme sus enormes conocimientos en reumatología, supo animarme a ser un médico que conjugase su práctica clínica con la investigación de aquellas enfermedades que trata. Sin duda los enfermos les estarán tan agradecidos a ambos como yo.

Mi mayor gratitud y cariño a Diego Alvarez de la Rosa, que ha estado a mi lado, ayudándome y animándome constantemente, aportando además ideas esenciales para la realización de este trabajo. Al doctor Julio Ávila Marrero, por sus consejos en momentos críticos y su permanente apoyo. A Irene Cozar que me ha acompañado con su estímulo durante todo el trabajo. A Diego, Julio e Irene debo no solo la realización de esta tesis, sino también el haber disfrutado haciéndola.

Al resto de compañeros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de La Laguna.

A mis compañeros del Servicio de Reumatología del Hospital Universitario de Canarias, así como a los del resto del Departamento de Medicina Interna, donde tengo magníficos amigos.

A los traumatólogos, patólogos y médicos forenses que me ayudaron en la recogida de muestras, imprescindibles para este trabajo.

Al Dr. Ali Mobasheri, por su inestimable colaboración desde la distancia.

A las Dras. Cecilia Canessa y Kathleen Sweadner por habernos cedido algunos de los anticuerpos utilizados en este trabajo.

A Gabriel de la Fuente, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, por su ayuda en la fabricación del Sulfato de níquel hexamonio.

La realización de este trabajo ha sido parcialmente financiada por los proyectos FISS números 93/0831 y 96/0415.

INDICE

• INTRODUCCIÓN	1
Cartílago articular hialino	1
Composición del cartílago	3
Condrocito	3
Matriz extracelular	4
Fracción líquida	5
Macromoléculas estructurales	5
Colágeno	5
Proteoglicanos	6
Glicoproteínas y proteínas no colágenas	7
Estructura del cartilago	9
Metabolismo del cartílago	12
Nutrición	12
Metabolismo celular	13
Desarrollo y envejecimiento	13
Síntesis y degradación	14
Interacción condrocito-matriz	14
Biomecánica del cartílago. Agua, iones, cargas.	16
Cartílago y transporte de iones	18
Transporte de sodio en el cartílago	20
La Na,K-ATPasa	21
La Na,K-ATPasa en el cartílago articular	26
El intercambiador $\text{Na}^+ \times \text{H}^+$	27
El intercambiador $\text{Na}^+ \times \text{H}^+$ en el cartílago articular	29
La H,K-ATPasa	29
El cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$	30
El cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ en el cartílago	31
El canal epitelial de sodio	31
El cartílago en la osteoartritis	33
Características bioquímicas y metabólicas del cartílago osteoartrosico	35
El cartilago en la artritis reumatoide	39

• PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL	42
• MATERIAL Y MÉTODOS	45
Obtención de las secciones de tejido para inmunohistoquímica y actividad p-nitrofenilfosfatasa dependiente de potasio	47
Pacientes y controles	47
Procesamiento y sección de los tejidos	49
Inmunohistoquímica	50
Anticuerpos utilizados	50
Método de avidina-biotina	50
Método de fluorescencia	51
Actividad de p-nitrofenilfosfatasa dependiente de potasio	53
Hibridación “in situ”	53
Obtención de sondas	53
Amplificación de los cDNAs	54
Clonaje	55
Síntesis y marcaje de las sondas	57
Eliminación de contaminación por ribonucleasas exógenas	57
Procesamiento de las muestras	57
Prehibridación	58
Hibridación “in situ”	58
Posthibridación	58
Detección inmunológica	59
• RESULTADOS	60
Inmunolocalización de Na,K-ATPasa en cartílago humano sano y afecto de osteoartritis y artritis reumatoide	61
En cartílago humano fetal	61
En cartílago humano adulto sano y afecto de osteoartritis y artritis reumatoide	66
Inmunolocalización de la isoforma $\beta 3$ de la subunidad β de Na,K-ATPasa en cartílago articular de rata	82
Hibridación “in situ”	84
Actividad p-nitrofenilfosfatasa dependiente de potasio	88

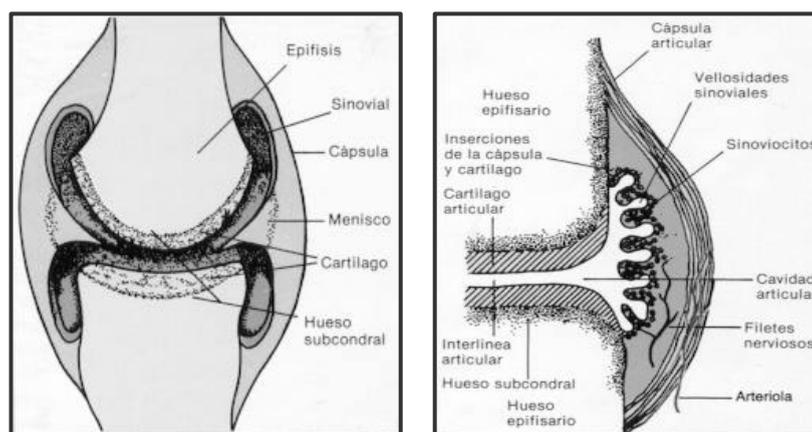
Inmunolocalización del canal epitelial de sodio en cartílago articular humano sano y afecto de osteoartritis y artritis reumatoide	92
Inmunolocalización del intercambiador Na^+xH^+ en cartílago articular humano sano y afecto de osteoartritis y artritis reumatoide	105
Inmunolocalización del cotransportador $\text{Na}/\text{K}/\text{Cl}$ en cartílago articular humano sano y afecto de osteoartritis y artritis reumatoide	112
Inmunolocalización de H,K-ATPasa en cartílago articular humano sano y afecto de osteoartritis y artritis reumatoide	114
• DISCUSIÓN	117
Del material utilizado	119
De los fetos utilizados	119
De los controles adultos utilizados	119
Del grupo de pacientes utilizados	119
De los anticuerpos utilizados	120
De las técnicas utilizadas	120
De la inmunohistoquímica	120
De la hibridación “in situ”	121
De la actividad p-Nitrofenilfosfatasa dependiente de potasio	121
De los resultados obtenidos	122
De la celularidad	122
De Na,K-ATPasa	122
Del canal epitelial de sodio	123
Del intercambiador $\text{Na}^+\text{X H}^+$	126
Del cotransportador $\text{Na}/\text{K}/\text{Cl}$	126
De H,K-ATPasa	127
De los resultados en su conjunto	127
• CONCLUSIONES	134
• BIBLIOGRAFIA	138

INTRODUCCIÓN

El movimiento constituye una de las manifestaciones elementales de la vida. En el mundo animal, el movimiento está estrechamente unido a la búsqueda y adquisición de alimento, a la reproducción y a la defensa frente a los enemigos. Para el hombre el movimiento es además una parte importante de la calidad de vida, en forma de deporte, juego o danza.

Para realizar el movimiento se han desarrollado a lo largo de cientos de millones de años de evolución complejas estructuras en las zonas de unión entre los huesos, las articulaciones, compuestas por múltiples diferentes tejidos. Las articulaciones sinoviales o diartrosis constan de dos extremos óseos confrontados, recubiertos por cartílago hialino, una cápsula articular que los une y de ligamentos que mantienen su contacto (fig.1). Todo lubricado por líquido segregado por la parte interna de la cápsula articular que se llama membrana sinovial. Algunas articulaciones tienen meniscos (cartílago fibroso) para ayudar a mantener la estabilidad articular (Simkin, 1988).

Figura 1: Esquema de articulación sinovial. Elementos articulares.



Los diferentes tejidos que conforman las articulaciones no sólo permiten el deslizamiento de las superficies articulares, proporcionando un movimiento estable con un bajo nivel de fricción, sino que también deben soportar las cargas y amortiguar los choques. El tejido que más contribuye a estas

extraordinarias capacidades funcionales es el cartílago articular hialino (*Buchwalter, 1990*).

El cartílago articular hialino aunque sólo posee unos pocos milímetros de espesor (menos de 5 mm en las articulaciones humanas), tiene una sorprendente resistencia y elasticidad a la compresión y los choques y una excepcional capacidad para distribuir cargas. Pero quizá su característica más importante sea su gran durabilidad, ya que proporciona una función articular normal durante 80 años o más (*Mow, 1995*).

CARTILAGO ARTICULAR HIALINO

Es una forma de tejido conjuntivo y de sostén que se caracteriza por tener unas cualidades bioquímicas y biofísicas altamente especializadas. Microscópicamente aparece como semisólido, de superficie brillante y de color blanco-azulado, si bien se torna amarillento con la edad. Se encuentra firmemente adherido al hueso subcondral y en la periferia se continúa con la sinovial.

El examen histológico y ultraestructural demuestra que el cartílago está formado por una matriz extracelular abundante, en cuyo seno se albergan células de una única estirpe, los condrocitos, en número relativamente escaso (Fig. 16).

Es un tejido que carece de inervación y de vasos sanguíneos y linfáticos por lo que el aporte de sustrato a los condrocitos en el cartílago adulto (después de constituida la barrera calcificada que impide cualquier contacto con el espacio medular ricamente vascularizado) se hace exclusivamente a través de los vasos sanguíneos de la sinovial (*Buckwalter, 1993*).

El cartílago se forma de las células mesequimales indiferenciadas, que se agrupan y comienzan a sintetizar la matriz extracelular. El tejido empieza a ser reconocible como cartílago bajo el microscopio, cuando una acumulación de matriz separa las células y éstas adoptan una forma esférica (*Guerne, 1995*).

COMPOSICIÓN DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

Como otros tejidos conectivos, el cartílago articular está formado por células y una matriz extracelular constituida por una fracción líquida y una fracción sólida de macromoléculas que constituyen el esqueleto del tejido (Tabla I). Esta admirable estructura que es el cartílago articular, capaz de resistir el estrés y las cargas mecánicas, debe estas propiedades a las características físico-químicas y a la organización estructural y molecular de los diversos componentes de la matriz extracelular. La arquitectura en forma de arcadas de la trama fibrilar garantiza la elasticidad y la resistencia a la compresión y el deslizamiento y la resistencia a los choques están aseguradas por una sustancia intercelular con una gran capacidad de retención acuosa.

El condrocito, única célula del cartílago, es la responsable de la síntesis de estos componentes de la matriz extracelular, y debe organizar su propio metabolismo para garantizar la producción, renovación periódica y su organización tridimensional (Buckwalter, 1990).

CONSTITUYENTES DEL CARTÍLAGO

	<i>% del peso total del cartílago</i>
• Células.....	0.4 - 2 %
• Matriz extracelular:	
- Fracción líquida.....	80 %
- Macromoléculas estructurales:.....	20 - 40 %
	<i>% del peso seco del cartílago</i>
- Componente fibrilar (colágeno).....	60 %
- Componente no fibrilar:	
Proteoglicanos.....	25 - 35 %
Glicoproteínas y proteínas no colágenas.....	15 - 20 %

Tabla 1: Constituyentes del cartílago

CONDROCITOS

El cartílago articular está constituido por una sola población celular, el condrocito, que se diferencia durante el desarrollo de la célula progenitora mesenquimatosa.

La población de condrocitos es reducida (100-1000 millones cel/ml), son del 0.4 al 2% del peso total del cartílago, pero altamente especializadas en la biosíntesis y mantenimiento de los componentes de la matriz extracelular (colágeno y proteoglicanos), sintetizando así mismo un sofisticado sistema lítico capaz de asegurar el recambio periódico de los elementos constituyentes de la matriz (*Stockwell, 1967; Muir, 1995*). Para esta intensa actividad de síntesis poseen un núcleo voluminoso y todo tipo de organelas (*Buckwalter, 1997a*).

Los condrocitos están rodeados de su matriz pericelular y no hay contacto célula-célula. Observado al microscopio electrónico presenta una ultraestructura característica. Posee un cuerpo citoplasmático circular u oval con un núcleo excéntrico rodeado por una membrana generalmente lisa. Además, suele poseer un nucleolo. El núcleo está rodeado de haces de microfilamentos dispuestos paralelamente, adheridos a la membrana nuclear. Se trata de proteínas contráctiles cuya función consiste en mantener la integridad estructural de la célula. El citoplasma contiene ribosomas libres dispuestos de forma compacta, un abundante retículo endoplásmico, un importante aparato de Golgi, algunas vesículas lisosómicas y unas mitocondrias pequeñas. La membrana celular de algunos condrocitos posee filopodios cortos a modo de dedo que se extienden hacia la matriz (*Muir, 1995*).

Los condrocitos se dividen hasta el final del crecimiento, aproximadamente sobre los veinte años.

MATRIZ EXTRACELULAR

Esta constituida por una fracción líquida y un armazón sólido de macromoléculas que proporciona al cartílago su forma y estabilidad (*Mow, 1988*).

- **Fracción líquida**

El agua contribuye casi al 80% del peso total del cartílago articular y su interacción con las macromoléculas de la matriz influye substancialmente en las propiedades mecánicas del tejido. Esta fracción líquida contiene gases, pequeñas proteínas y una alta concentración de cationes. El volumen, concentración y conducta del agua en el tejido depende particularmente de su interacción con los largos proteoglicanos agreganos de la matriz (*Mankin, 1978*).

- **Macromoléculas estructurales**

Constituidas por un almacén de fibras colágenas en cuya red se alberga un gel compuesto principalmente por agregados de proteoglicanos, además de glicoproteínas y proteínas no colágenas. Representan el 20-40% del peso total del cartílago (*Buckwalter, 1990*).

COMPONENTE FIBRILAR: Colágeno

La red de fibrillas de colágeno constituyen el endoesqueleto del cartílago y proporcionan un andamiaje para los proteoglicanos y los condrocitos. En el cartílago articular el 90-95% del colágeno es tipo II, con cierta contribución de los tipos IX, XI, VI y X. Las fibrillas de colágeno tipo II se constituyen por subunidades polipeptídicas repetidas, llamadas tropocolagena, con estructura triple helicoidal de cadenas idénticas, unidas por puentes de piridinolina. Son sintetizadas por los condrocitos, que las organiza según un entramado tridimensional a modo de malla, orientado para descargar las fuerzas de tracción y proporcionar así resistencia a la tensión. El colágeno tipo II es el principal componente de este entramado fibrilar, pero los tipo IX y XI se unen covalentemente a él, formando parte de la estructura de ésta malla fibrilar, contribuyendo a darle forma y estabilidad y a conectarlo con los proteoglicanos. El colágeno tipo VI forma parte de la matriz que rodea al condrocito, manteniendo unida la célula a dicha matriz. El colágeno tipo X solo aparece

cerca de las células de la matriz calcificada, lo que sugiere que participe en la mineralización del cartílago (Eyre y cols, 1992; Sandell y cols, 1995).

COMPONENTE NO FIBRILAR. Proteoglicanos y proteínas no colágenas.

PROTEOGLICANOS

Son macromoléculas sintetizadas por los condrocitos, constituidas por un eje central lineal de naturaleza proteica a las que están conectadas mediante enlaces covalentes cadenas de glucosaminoglicanos, polisacáridos representados sobre todo por el condrintin 4 y 6 sulfato, dermatán sulfato y por el queratán sulfato (Fig.2). Cada proteína central soporta de 50 a 100 cadenas de glucosaminoglicanos y el peso molecular de un proteoglicano es de 1 a 3 millones de Da (Rosenberg y cols, 1986).

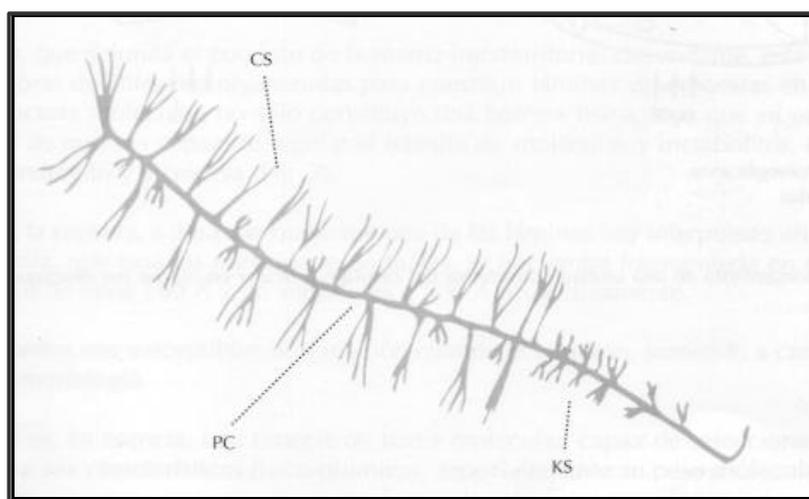


Figura 2: Estructura de un proteoglicano. PC: proteína central. CS: cadenas laterales de condroitinsulfato. KS: cadenas laterales de keratansulfato.

El ácido hialurónico, otro glucosaminoglicano producido por el condrocito, tiene la función de enlazar entre si los diversos proteoglicanos a través de un enlace proteico (proteínas de la unión), formando voluminosos agregados de proteoglicanos con pesos moleculares del orden de 200 millones de Da (Fig. 3). Los agregados de proteoglicanos así formados, van a ocupar los espacios entre las redes de fibrillas colágenas (Hardingham y Muir, 1974).

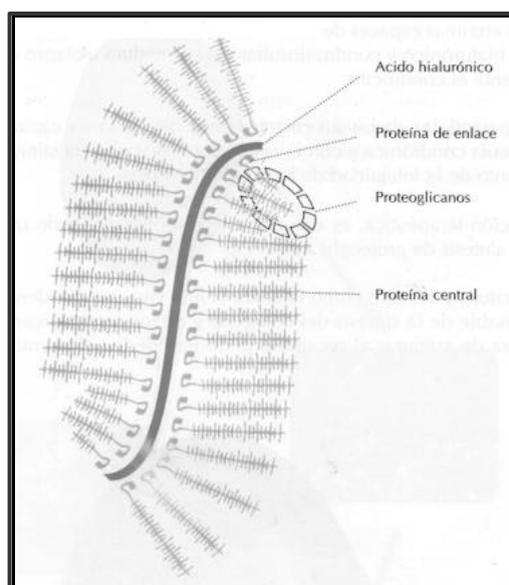


Figura 3: Agregado de proteoglicanos formado por un filamento central de ácido hialurónico al que están unidas las proteínas de enlace y las cadenas de proteoglicanos.

Éstos largos agregados de proteoglicanos ó agrecanos son los más abundantes en el cartílago articular; estando presentes además otros de menor longitud: biglicano, decorina y fibromodulina. El colágeno tipo IX es considerado también un proteoglicano porque tiene glicosaminoglicanos en su composición. También están presentes proteoglicanos no agregados de composición y estructura muy similar a la de los agrecanos, por lo que probablemente se trate de agrecanos degradados (*Hardingham y Fosang, 1992*). Cada disacárido tiene al menos un grupo carboxilo o sulfato cargado negativamente, por lo que los glicosaminoglicanos constituyen largas filas de cargas negativas que repelen otras moléculas cargadas negativamente y atraen cationes (*Lesperance y cols, 1992*).

GLICOPROTEINAS Y PROTEÍNAS NO COLÁGENAS

Hay una amplia variedad de estas moléculas en el cartílago articular, pero sólo un número pequeño de éstas están bien estudiadas (Tabla II). En general, consisten principalmente en proteínas con algunos oligosacáridos y monosacáridos. Al menos algunas de estas moléculas parecen contribuir a

organizar y mantener las macromoléculas estructurales de la matriz. La Ancorina CII, por ejemplo, ayuda a anclar los condrocitos a las fibras de colágeno de la matriz y la proteína oligomérica del cartílago, que está concentrada principalmente en la matriz territorial de los condrocitos, tiene también la capacidad de unirse a condrocitos. Fribronectina y tenascina, proteínas no colágenas encontradas en varios tejidos, también han sido identificadas en el cartílago. Sus funciones en el cartílago permanecen poco conocidas, pero pueden tener papel en la organización de la matriz, la interacción celular y la respuesta del tejido en las artropatías inflamatorias y en la osteoartritis (*Heinegard y Pimentel, 1992*).

Molécula	Características	Localización	Acciones	Referencia
Fibrinonectina	Macromolécula (440 kD) con 2 subunidades	CA fetal, normal y patológico	Interactúa con colágeno y fibromodulina. Adhesión celular	Hayashi y cols., 1996
Condronectina	Proteína de 180 kD con 2 subunidades	Superficie de condrocitos	Adherencia condrocito-colágeno tipo II	Hewitt y cols., 1982
Ancorina	Proteína de 34 kD homóloga a proteínas ligadas a calcio (lipocortin)	Superficie de condrocitos	Interacción con colágeno tipo II. Mecanorreceptor	Pffafle y cols., 1988
Tenascina	Glicoproteína con 6 subunidades radiales	CA normal y artrósico	Migración y adhesión celular	Chevalier y cols., 1996
Trombospondina	Molécula trimétrica de 420 kD	CA	Interacción con macromoléculas	Mosher y cols., 1990
SPARC (osteonectina)	Proteína secretada ácida rica en cisteína	CA de artrosis y artritis reumatoide. No en cartílago normal	Modula proliferación de condrocitos y síntesis de matriz	Nakamura y cols., 1996
Proteína 21 kD	Se sintetiza con colágeno tipo X	CA hipertrófico		Cancedda y cols., 1988
Proteína 36 kD	Alto contenido en ácido aspárico y leucina	Superficie de condrocitos	Interacción condrocito-matriz	Sommarin y cols., 1989
Proteína 55 kD	Se acumula en la matriz senil	CA adulto	Interacciones iónicas con CAG	Melching y cols., 1990
Proteína 58 kD	0.1% matriz	CA	Interacción condrocito-matriz	Heinegard y cols., 1986
Proteína 115 kD	Subunidad con puentes disulfuro	CA	Degradación rápida	Fife y cols., 1985
Proteinade enlace	GAG no sulfatado	CA	Establece la unión AG con ácido hialurónico	Stamenkovic y cols., 1990
Acido hialurónico	GAG no sulfatado 200 kD cartílago inmaduro 300 kD cartílago maduro	CA. Incrementado en el adulto	Unión no covalente a una proteína formando agregados. Liga a CD 44 receptor de linfocitos y fibroblastos	Aruffo y cols., 1990

Tabla II: Moléculas no proteoglicanos ni colágenas de la matriz del cartílago conocidas hasta el momento (Gonzalez, 1997).

Estas moléculas pueden tener valor como marcadores del turnover del cartílago y de la progresión de la degeneración del cartílago en personas que tengan osteoartritis (*Saxne y Heiegard, 1992*).

ESTRUCTURA DEL CARTÍLAGO

La composición, organización y propiedades mecánicas de la matriz extracelular, así como la morfología, tamaño y actividad metabólica celular varía de la superficie a la profundidad distinguiéndose 4 zonas, aunque los límites entre ellas no están perfectamente delimitados (*Aydelotte y cols, 1992; Buckwalter y cols, 1988*):

- **Zona superficial:** Representa aproximadamente el 5-10% del grosor del cartílago. La capa mas superficial denominada “lámina splendens”, que aparece al microscopio de contraste de fase como una banda muy brillante, está constituida por finas fibras colágenas, pequeños polisacáridos y no posee células. Debajo de ésta fina capa acelular las fibras colágenas discurren paralelas a la superficie articular, proporcionando de ésta manera mayor resistencia a la presión, generada durante el uso de la articulación, que las capas más profundas. Las células con forma ovoide o alargada, también están dispuestas horizontalmente. La matriz de ésta zona superficial tiene alta concentración de colágeno y pobre de proteoglicanos, respecto a otras zonas del cartílago. La concentración de fibronectina y agua es también mayor en ésta zona.
- **Zona intermedia o de transición:** Las fibras de colágeno forman una red entrelazada en espiral, no orientada en un sentido determinado donde los condrocitos son esferoidales y están dispersos. Las células tienen una mayor concentración de organelas que las células superficiales y sintetizan una matriz con fibras colágenas de mayor diámetro, mayor concentración de proteoglicanos y menos de agua y colágeno que la matriz superficial.
- **Zona radial o profunda:** Las fibras son mas gruesas y poseen una disposición preferentemente perpendicular (radial) a la superficie articular. Las células esferoidales son de mayor volumen y se disponen en forma de columnas también perpendiculares a la superficie articular, a menudo en grupos de 2 a 8 células. La matriz de ésta zona posee las fibras colágenas de mayor diámetro, la mayor concentración de proteoglicanos y la menor concentración de agua. Los condrocitos de esta zona expresan ya

marcadores bioquímicos normalmente asociados con la mineralización y la calcificación (Fig. 4).

- **Zona de cartílago calcificado:** Esta fina capa de cartílago calcificado separa la zona radial del hueso subcondral. Las células de ésta zona son más escasas y tienen un tamaño más pequeño que el de la zona radial y poseen muy pocas organelas. Las fibras colágenas tienen la misma disposición que en la zona radial, la matriz está calcificada, presentando cristales de hidroxapatita en forma de depósitos globulares entre las fibras colágenas. Con tinción de H-E, la zona calcificada está separada de la zona radial por una línea ondulada, basófila, conocida como “línea de calcificación”, de naturaleza aún poco conocida.



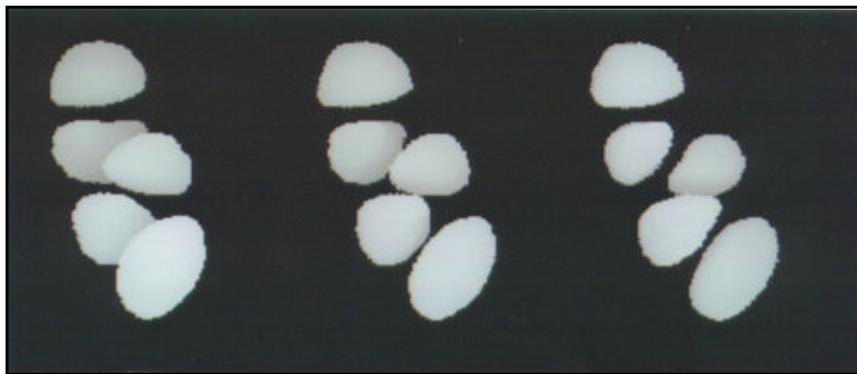
Figura 4: Estructura del cartílago articular. Fotomicrografía de cartílago bovino de articulación metacarpofalángica mostrando la expresión de fosfatasa alcalina en los tres principales estratos: superficial, intermedio y profundo.

La composición, organización y función de la matriz extracelular también varía según la distancia a la célula, pudiendo distinguirse tres regiones: una región pericelular, una región territorial y una región interterritorial. Las regiones pericelular y territorial se encargan de cubrir las necesidades de los condrocitos, rodeando las membranas celulares de macromoléculas y protegiendo las células del daño durante la carga y deformación del tejido. También contribuyen a transmitir señales mecánicas a los condrocitos cuando la matriz se deforma durante la carga articular. La principal función de la matriz territorial es proporcionar al cartílago sus propiedades mecánicas características (Buckwalter y cols, 1990).

- **Matriz pericelular:** Es una fina región de matriz que rodea la superficie celular. Es rica en proteoglicanos y en proteínas no colágenas y colágenas no fibrilares como el colágeno tipo VI. Prácticamente no tiene colágeno fibrilar. El citoplasma de algunos condrocitos proyecta extensiones a través de la matriz pericelular a la matriz territorial.
- **Matriz territorial. Concepto de condrón:** Rodea la matriz pericelular de cada condrocito y en algunas localizaciones a parejas o incluso grupos de condrocitos. Sus finas fibras colágenas parecen adherirse a la matriz pericelular, cruzándose en varios ángulos, formando una especie de cesta fibrilar alrededor de la célula. Ésta cesta de fibras colágenas proporciona protección mecánica a los condrocitos durante la carga y deformación del tejido. Un incremento brusco en el diámetro y un cambio en la orientación de las fibras de colágeno, que se vuelven más paralelas, marcan el límite entre las matrices territorial e interterritorial.
- En 1988 el grupo neozelandés de Anthony Poole, aisló de la matriz del cartílago una estructura que denominaron CONDRÓN (Fig. 5), constituida por el condrocito, su matriz pericelular y una cápsula. La cápsula, matriz territorial, que delimita el condrón de la matriz circundante, está formada por éste entramado de fibras de colágeno organizadas para constituir láminas superpuestas en capas a modo de cesta.. Gracias a su compleja estructura molecular, no solo constituye una barrera física, sino que su organización sugiere que sea capaz de regular el tránsito de moléculas y metabolitos, desde la matriz al condrocito y viceversa. La matriz pericelular rodea completamente al condrocito, separándolo de la cápsula y desarrollando aparte de las demás funciones, la de almohadillado entre las dos estructuras. Es capaz de establecer relaciones funcionales con la cápsula condronica y con la célula condrocitaria (Poole, 1992).
- **Matriz interterritorial:** Constituye la mayor parte del volumen de la matriz del cartílago y contiene las fibras colágenas de mayor diámetro. A diferencia de la matriz territorial, en ésta región las fibras de colágeno no están organizadas alrededor del condrocito y cambian su orientación, respecto a la superficie articular, 90° de la zona superficial a la radial. En la zona

superficial, las fibras tienen un diámetro relativamente pequeño y generalmente discurren paralelas a la superficie articular, en la zona de transición adoptan ángulos más oblicuos respecto a la superficie articular, y en la zona radial, discurren perpendiculares a la misma.

Figura 5: Fotomicrografía confocal de un típico condrón de la zona radial, con cinco



condrocitos dispuestos en columna. Bar: 10µm.

METABOLISMO DEL CARTILAGO.

Las propiedades mecánicas del cartílago, un tejido a la vez flexible y resistente, depende de la composición y estructura de su matriz extracelular, sintetizada por un número sorprendentemente pequeño de células. Los condrocitos, centros metabólicos del cartílago, poseen una gran capacidad secretora y sobre todo una gran capacidad de vivir y de mantener su función con un mínimo aporte nutritivo. El carácter particular del metabolismo proviene de las singularidades del cartílago en relación a los demás tejidos: la ausencia de vascularización y la abundancia de elementos extracelulares.

Nutrición

Como el cartílago es avascular, los elementos extracelulares son sintetizados por los condrocitos a partir de substratos de pequeño peso molecular extravasados de la sangre circulante a los capilares de la membrana sinovial. El trayecto que deben seguir los nutrientes antes de llegar a su último punto de destino, el condrocito, es largo y lleno de dificultades, comportando las etapas

siguientes: 1. los capilares de la sinovial, 2. el tejido sinovial, 3. el líquido sinovial, 4. la matriz extracelular del cartílago (*Fischer y cols, 1995*).

Metabolismo celular

Los condrocitos están bien adaptados al bajo consumo de oxígeno dadas las condiciones del cartílago, donde la presión de oxígeno en las zonas profundas puede ser tan baja como de un 1% comparada con el 24% normal de la atmósfera (*Urban, 1994*). Debido a ello, la energía necesaria para su actividad de síntesis proviene de la metabolización de glucosa por glicolisis anaerobia. A su vez, el lactato, producto final de la glicolisis, hace que la célula sinovial libere glucosa, asegurando de este modo la regulación y el mantenimiento del ciclo nutricional de los condrocitos que viven en un ambiente anaerobio. Cuando este retrocontrol queda desbordado, los condrocitos utilizan la vía oxidativa (aerobia), utilizando la matriz extracelular adyacente para la combustión (*Brighton y Happenstall, 1971*).

Desarrollo y envejecimiento

Durante la formación y crecimiento del cartílago articular, la densidad celular es alta y las células alcanzan su mayor nivel de actividad metabólica, ya que los condrocitos proliferan rápidamente y sintetizan grandes volúmenes de matriz para expandir y remodelar la superficie articular. Con la maduración del esqueleto disminuye la actividad metabólica y la síntesis de matriz y la división celular declina; después del final de la formación del esqueleto las células ya no se dividen más y no cambian substancialmente el volumen del tejido pero continúan sintetizando matriz para reemplazar las macromoléculas degradadas y para remodelar la superficie articular (*Buckwalter y Rosenberg, 1983*).

Con el envejecimiento se producen en el cartílago cambios a nivel estructural, celular y de la matriz extracelular. Desde el punto de vista estructural se produce una fibrilación de la superficie articular del cartílago por un denudamiento parcial de las fibrillas colágenas que destruye la apariencia lisa y continua de la superficie articular, con el tiempo estas fisuras múltiples se hacen más profundas perpendicularmente a la dirección de las fuerzas

tangenciales y a lo largo de las fibrillas colágenas. La densidad celular disminuye así como su actividad sintetizadora. Los cambios más característicos producidos por la edad en la matriz extracelular son la disminución en la concentración de agua, pérdida de proteoglicanos agregados, aumento en la concentración de decorina, acumulación de moléculas degradadas y aumento en el diámetro de las fibras de colágeno (*Martin y Buckwalter, 1996*).

Síntesis y degradación. Interacción condrocito-matriz

Mantener la superficie articular requiere un turnover continuo de las macromoléculas de la matriz, en respuesta al uso de la articulación. El condrocito dispone de todos los enzimas necesarios para el metabolismo energético y la biosíntesis y degradación de éstas moléculas de la matriz, a lo largo de la vida. Para ello debe sentir los cambios en la composición de la matriz producidos por la degradación de macromoléculas así como cambios en la demanda por el uso articular.

El cartílago articular adulto está sujeto a un equilibrio entre los procesos anabólicos (síntesis de matriz extracelular) y catabólicos (degradación y pérdida de matriz), regulado, fundamentalmente, por el condrocito en respuesta a una serie de factores. Los mecanismos que controlan el balance entre ambas actividades, síntesis y degradación, permanecen poco conocidas, pero las citoquinas parecen tener un importante papel. En respuesta a una variedad de estímulos, los condrocitos sintetizan y liberan estas citoquinas a la matriz, donde se unen a receptores de la superficie celular o quedan atrapadas en la propia matriz. La síntesis de colágeno y de proteoglicanos por los condrocitos parece tener mecanismos independientes, ya que el bloqueo de una de ellas no interfiere con la otra. Las citoquinas, como el IGF (factor de crecimiento similar a la insulina), el FGF (factor de crecimiento fibroblástico) o el TGF- β (factor transformador del crecimiento) estimulan la síntesis de estas proteínas por los condrocitos (*Lotz y cols, 1995*).

La degradación de la matriz extracelular está producida por tres familias de proteasas originadas en el propio condrocito: metaloproteasas, serina proteasas y tiol proteasas. Entre las metaloproteasas se encuentran la colagenasa o MMP-1 y la estromelisina o MMP-3 que participan en la degradación del colágeno tipo II y entre las otras dos familias destacan el activador tisular del plasminógeno y las catepsinas que además de tener una acción proteolítica directa sobre los proteoglicanos, tienen un papel en la activación de metaloproteasas en estado latente. Para evitar la destrucción indiscriminada del tejido estas proteasas se hallan sujetas a un mecanismo de control estrecho en el que participan entre otras moléculas reguladoras el inhibidor tisular de metaloproteasas o TIMP y el inhibidor del activador del plasminógeno (*Trippel, 1995*).

La matriz actúa también transmitiendo señales que resultan de fuerzas mecánicas de la superficie articular y los condrocitos responden a estas señales por alteración de la matriz posiblemente a través de la expresión de citoquinas que actúan a través de mecanismos autocrinos y paracrinos. Estudios experimentales han demostrado que la inmovilización de la articulación o una disminución persistente de la carga articular, disminuye la concentración de proteoglicanos en el cartílago y el grado de agregación de los mismos, alterando con ello las propiedades mecánicas del cartílago. La reanudación del uso de la articulación restaura la composición y propiedades mecánicas de la matriz hacia la normalidad. El mantenimiento de la composición normal del cartílago requiere por tanto un nivel mínimo de carga y moción de la articulación. Sin embargo, una carga y moción repetidas de la articulación de un nivel mayor de lo normal, puede aumentar la actividad sistetizadora de los condrocitos pero éstos tienen limitada su capacidad de expandir el volumen tisular en el adulto. Los detalles de cómo los mecanismos de carga de las articulaciones, que deforman la matriz extracelular, influyen en la función de los condrocitos son aún desconocidos pero la deformación de la matriz produce señales mecánicas, eléctricas y fisico-químicas que pueden tener un papel en la estimulación de los condrocitos (*Buckwalter, 1997a*).

BIOMECÁNICA DEL CARTILAGO. Agua, iones, cargas.

La capacidad del cartílago para soportar las grandes presiones generadas durante la carga, reside en las complejas interacciones entre los distintos componentes de su matriz extracelular, sintetizadas por los condrocitos. En concreto depende de la integridad del armazón colágeno, el entramado fibrilar tridimensional, y del mantenimiento de la elevada concentración de proteoglicanos aniónicos que ocupan los espacios comprendidos entre las fibras colágenas (Fig. 6) (Mow y Rosenwasser, 1988).

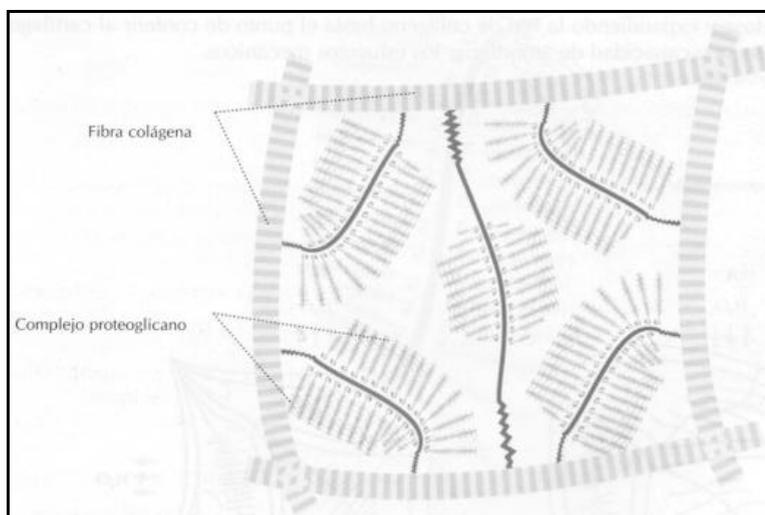


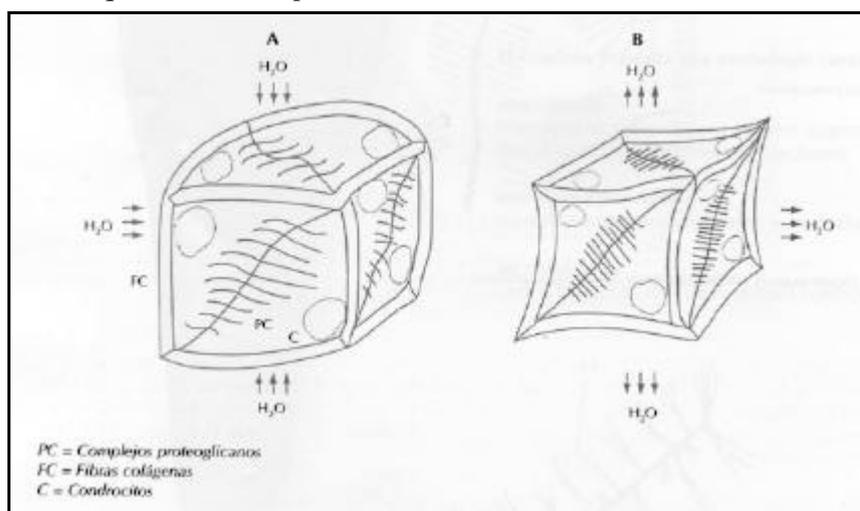
Figura 6: Esquema de la unidad elemental del cartílago articular: agregados de proteoglicanos aniónicos que ocupan el espacio comprendido entre fibras de colágeno.

La presencia de los grupos aniónicos carboxilo y sulfato en los glicosaminoglicanos confiere a la matriz del cartílago una composición iónica y osmótica diferencial (Lesperance y cols, 1992), dado que la alta densidad de cargas negativas en los proteoglicanos atrae cationes (principalmente Na^+ , K^+ y Ca^{2+}) y repele aniones (Cl^- , HCO_2^-) por lo que la concentración de cationes libres en el cartílago es alta (250-400 mM Na^+ , 8-15 mM K^+) y la de aniones es baja (8-100 mM Cl^-), en comparación con los fluidos extracelulares de otros tejidos (Fig. 9) (Maroudas, 1980; Gray y cols, 1988; Urban y Hall, 1992).

El movimiento de cationes a la matriz es seguido por el movimiento obligado de agua, creando el llamado efecto Donnan; los proteoglicanos, que no pueden salir de la red de colágeno, atraen hacia sí moléculas de agua hinchándose y expandiendo la red de colágeno hasta el punto de conferir al cartílago su típica elasticidad, resistencia y capacidad de amortiguar los esfuerzos mecánicos (Maroudas, 1979).

La alta concentración de proteoglicanos, con su enorme capacidad para almacenar moléculas de agua, hace que cuando se ejerce una presión sobre el cartílago, la deformación del mismo ocurra de manera gradual, a medida que las moléculas de agua se desplazan del interior de los proteoglicanos hacia la superficie articular (Fig. 7). Cuando la fuerza cesa, estas moléculas de agua vuelven a su localización inicial, atraídas por la fuerte carga negativa de los proteoglicanos, restableciéndose la estructura del cartílago (Urban, 1994).

Figura 7: Esquema del comportamiento de una unidad constitutiva del cartílago



articular en reposo (A) y en un momento de carga (B).

Esta capacidad de amortiguación ejercida por los proteoglicanos, hace que las fuerzas lleguen parcialmente disipadas y enlentecidas a la red de colágeno, que es la responsable final de la estructura tridimensional del cartílago, en virtud de su enorme resistencia física a la tensión.

CARTILAGO Y TRANSPORTE DE IONES

Las propiedades únicas para sostener cargas del cartílago son atribuibles sobre todo a los proteoglicanos, cargados negativamente debido a la presencia de dos grupos aniónicos por unidad de disacárido (densidad de cargas fijadas, FCD). Las cargas negativas de los proteoglicanos atraen cationes a la matriz extracelular, repeliendo a su vez a los aniones (Maroudas, 1980). El medio extracelular iónico y de pH de los condrocitos es, por lo tanto, inusual comparado con el de otros tejidos, ya que la concentración de cationes es mas alta que en la mayoría de los tejidos lo que disminuye el pH a la vez que aumenta la concentración de H⁺, resultando un medio ácido (el pH extracelular del cartílago es 6.9-7.1) (Mobasheri y cols, 1998; Stockwel, 1991). Además, el metabolismo predominantemente anaerobio de los condrocitos produce gran cantidad de lactato, que aumenta el pH ácido del cartílago. Los condrocitos tienen un pH intracelular de aproximadamente 7.1 mientras que pH fisiológico en la mayoría de las células es de 7.2-7.3 (Wilkins y Hall, 1992).

Los condrocitos son sensibles y responden adaptándose a cambios a corto plazo en su ambiente iónico y osmótico (Buckwalter, 1997b). A corto plazo son capaces de regular la concentración intracelular de iones en un intento de devolver la concentración de iones a sus niveles fisiológicos. A largo plazo, tales cambios pueden afectar al equilibrio entre la síntesis y degradación de la matriz, comprometiendo por tanto las propiedades mecánicas del tejido, lo que puede jugar un importante papel en la patogénesis de los estadios precoces de la patología articular. Se ha comprobado que la síntesis de la matriz extracelular por el condrocito es sensible a la concentración extracelular de Na⁺ (Urban y Bayliss, 1989). También se ha visto que cambios en el pH intracelular modifican la síntesis de macromoléculas en condrocitos bovinos y también que el pH extracelular regula la síntesis de macromoléculas de matriz (Alper, 1994). La regulación del pH intracelular es llevado a cabo en la mayoría de las células por proteínas transportadoras de membrana que expulsan protones o bicarbonato.

Durante la carga articular se producen cambios físico-químicos que alteran la composición iónica de la matriz del cartílago que a su vez alteran la composición intracelular de iones y su pH (Fig. 8).

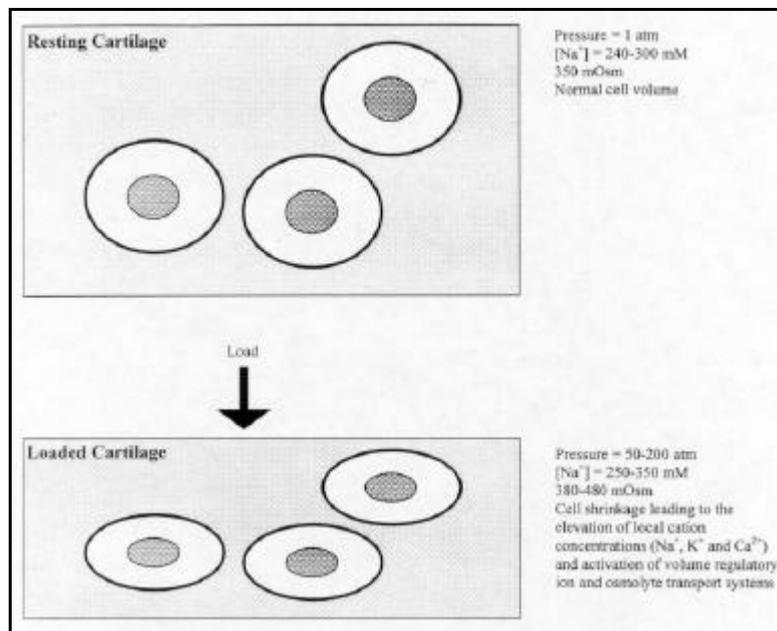


Figura 8: Efecto de la carga en el medio iónico y osmótico de los condrocitos. La fuerza mecánica deforma los condrocitos, elevando la presión hidrostática y aumentando la densidad de cargas fijadas, produciendo así un aumento significativo en la concentración local de cationes y la osmolaridad del tejido.

En respuesta a este ambiente iónico alterado, los condrocitos modulan sus sistemas de transporte iónicos de membrana celular. Teniendo esto en cuenta, es posible que durante los estadios iniciales de la patología del cartílago, los condrocitos puedan ser capaces de responder a los cambios iónicos y osmóticos mediante la adaptación de la densidad y patrón de distribución de las isoformas de los sistemas de transporte iónico de membrana. Sin embargo a largo plazo los cambios mantenidos y progresivos del ambiente iónico de la matriz puede no ser tolerado por los condrocitos, siendo incapaces de iniciar mecanismos reparadores (Maroudas, 1979, 1980).

El conocimiento del transporte de iones y las propiedades bioquímicas y moleculares de las proteínas transportadoras de membrana en los condrocitos es pobre comparado con el de otras células. Además, los únicos estudios sobre

transporte iónico y regulación del pH en cartílago articular se han realizado sobre tejido animal, nunca sobre cartílago humano.

Transporte de Na en el cartílago

El Na^+ es el ion más abundante en el cartílago. Su concentración extracelular es de 250-350 mM y su concentración intracelular es de 40 mM, las cuales son relativamente altas comparadas con las de otros tipos de células, debido a que los proteoglicanos de la matriz atraen cationes (en la mayor parte de las células animales la concentración de Na^+ intracelular es de 15-16 mM y 140 mM la extracelular) (Maroudas, 1980; Urban y Hall, 1992). La diferencia entre la concentración intracelular y extracelular de Na produce un fuerte gradiente hacia el interior celular de este importante catión (Stein, 1990). Esta elevada concentración de Na intracelular afecta a la relación Na:K que necesita ser mantenida en un nivel bajo para el metabolismo celular óptimo.

En los estudios realizados hasta ahora sobre transporte de iones y regulación del pH en el cartilago articular animal, el Na^+ parece tener al menos tres mecanismos de transporte de membrana en los condrocitos; dos mecanismos a favor de gradiente de concentración que no requieren energía directa para su función: el intercambiador $\text{Na}^+ \times \text{H}^+$ y el cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ y un mecanismo contra gradiente de concentración que requiere energía de la hidrólisis del ATP para su función, la bomba Na,K-ATPasa (Fig. 9). Hasta esta tesis no existían estudios del canal epitelial de Na en cartílago articular.

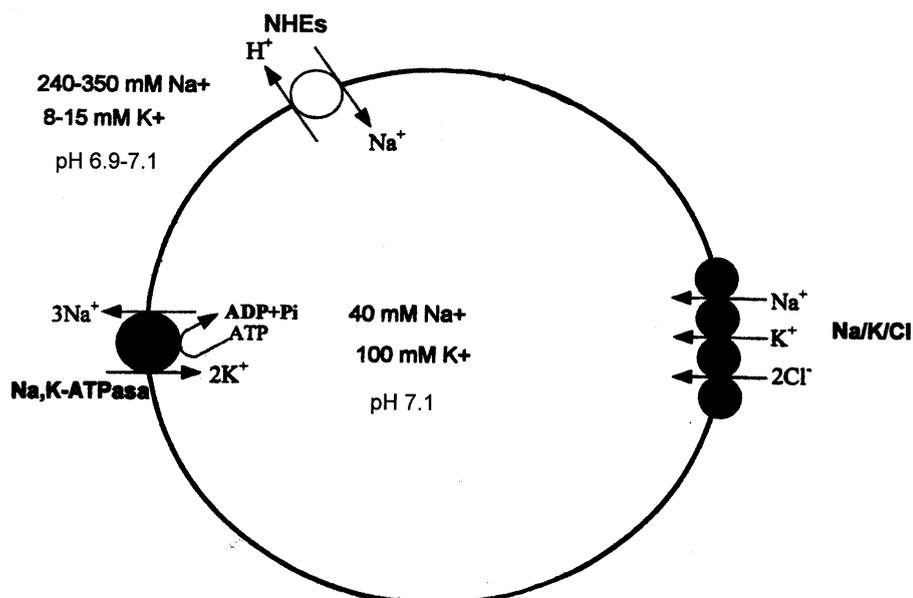


Figura 9: Mecanismos de membrana implicados en el transporte de Na⁺ en condrocitos (estudio realizado en cartílago animal). Concentraciones de iones Na⁺ y K⁺ intra y extracelulares y pH, en el cartílago.

LA Na,K-ATPasa

La Na,K-ATPasa funciona en la mayoría de las células animales como el principal regulador de las concentraciones de Na y K intracelular, usando la hidrólisis del ATP como energía. Es la enzima de membrana plasmática celular que transporta, contra gradiente de concentración, dos iones K hacia el interior y tres iones Na⁺ hacia el exterior de la célula por cada molécula de ATP consumida (Sweadner, 1989, 1995). De esta manera mantiene una baja relación Na:K intracelular, esencial para el funcionamiento de muchos sistemas enzimáticos (Kernan, 1980). Este mecanismo de transporte produce un gradiente tanto químico como eléctrico a través de la membrana celular, esencial para el mantenimiento del potencial de reposo celular y para la capacidad excitadora de los tejidos muscular y nervioso así como para la regulación del pH y captación de nutrientes. Na,K-ATPasa es el receptor de glicósidos cardiotónicos.

La Na,K-ATPasa trabaja mediante un ciclo de fosforilación-defosforilación en el cual el enzima alterna entre dos estados conformacionales diferentes. El ciclo lo podemos ver representado en el esquema de Post-Albers (Fig.10), donde E1 y E2 son las conformaciones del enzima cuyos sitios de unión están hacia el citoplasma y el medio extracelular respectivamente. En los estados ocluidos P-E1(Na₃⁺), E2(K₂⁺) y E2.ATP(K⁺) los iones unidos son incapaces de intercambiarse con la fase acuosa. Los guiones indican uniones covalentes, mientras que los puntos uniones no covalentes. La ouabaína se une preferentemente a la forma fosforilada del enzima, estimulando y estabilizando la formación de un fósfo-intermediario de P_i.

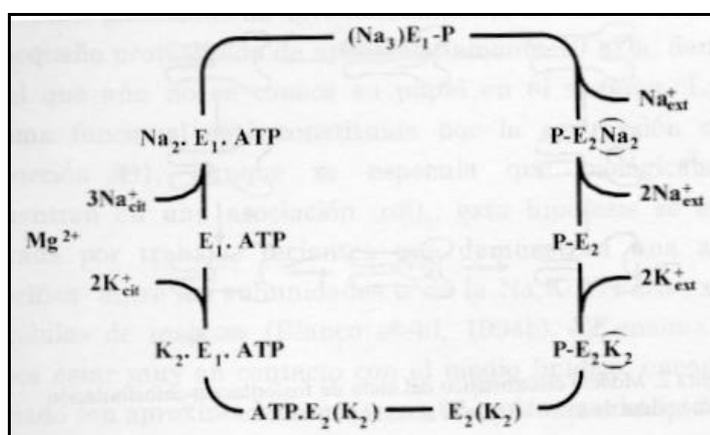


Figura 10: Esquema de Post-Albers del ciclo de fosforilación-defosforilación de la Na,K-ATPasa (adaptado de Heyse y cols, 1994).

Cuando el enzima es fosforilado por ATP en el estado E1, los tres iones sodio se ocluyen. La transición espontánea a la conformación E2 lleva a la liberación de los iones sodio hacia el medio extracelular. La subsecuente unión de potasio inicia la defosforilación del enzima y la oclusión de los iones potasio. Posteriormente, la unión de baja afinidad por el ATP cambia la conformación hacia el estado E1 desde el cual el potasio es liberado hacia el citoplasma.

Este ciclo de fosforilación-defosforilación asociado al cambio conformacional del enzima y el trasvase de iones, también se explica según el modelo electrostático (Heyse y cols, 1994): en el estado E1 no ocluido del enzima, dos sitios de unión cargados negativamente son accesibles en la superficie de la bomba. Iones potasio y, con mayor afinidad, dos iones sodio compiten por el

mismo sitio, que posiblemente contenga residuos carboxilos cargados negativamente.

El tercer sitio de unión es neutro y muy específico para el sodio, siendo la unión a éste sitio electrogénica. La oclusión del sodio por la fosforilación del enzima por ATP ocurre cuando los tres sitios están ocupados. Por tanto, la oclusión probablemente pueda consistir solamente en el cierre de una "puerta".

La transición conformacional al estado E2 es seguida de un acceso de los sitios de unión hacia el medio extracelular y de la liberación del primer sodio del sitio de unión neutro, representando este paso la mayor contribución electrogénica de todo el ciclo. Posteriormente, se liberan los otros dos sodios, los iones potasio se unen a los mismos sitios de unión cargados negativamente, siendo este también un proceso electrogénico. Los siguientes pasos: oclusión de los iones potasio, defosforilación, cambio conformacional E2-E1 y liberación de los iones potasio hacia el citoplasma son procesos electroneutros, ya que los cationes están emparejados a las zonas de unión cargadas negativamente, las cuales tienen un acceso directo a la fase acuosa en la conformación E1.

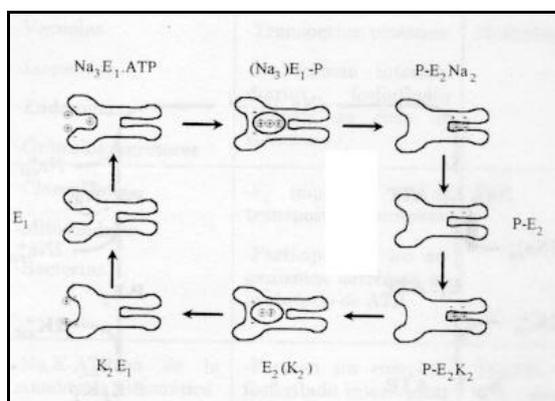


Figura 11: Modelo electrostático del ciclo fosforilación-defosforilación de la Na,K-ATPasa (Heyse y cols, 1994).

La Na,K-ATPasa está constituida por tres subunidades unidas de forma no covalente: un polipéptido de 112 kDa que atraviesa la membrana plasmática varias veces, denominada α , un polipéptido glicosilado de 45 kDa que atraviesa la membrana plasmática sólo una vez denominada β y un

pequeño proteolípido hidrofóbico que también atraviesa la membrana una sola vez de aproximadamente 10 kDa, denominado γ , del que aún se conoce muy poco de su papel en el sistema (Fig. 12).

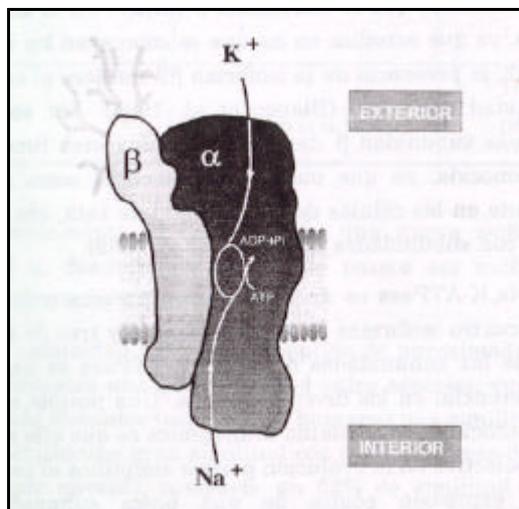


Figura 12: Modelo general para la Na,K-ATPasa: heterodímero **ab**

La Na,K-ATPasa es una familia multigénica (Sweadner, 1995), actualmente han sido identificadas cuatro isoformas de la subunidad α en mamíferos ($\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$ y $\alpha 4$) y tres de la subunidad β ($\beta 1, \beta 2$ y $\beta 3$), con un patrón de expresión diferencial en tejidos, células y etapas del desarrollo. A finales de 1986 se puso en evidencia la existencia de tres cDNAs que codificaban tres isoformas α en rata, denominándose $\alpha 1, \alpha 2$ y $\alpha 3$ (Schull y cols, 1986a). Aunque comparten regiones altamente conservadas en sus secuencias nucleotídicas, están codificadas por genes diferentes, que a su vez se encuentran en cromosomas diferentes (Sweadner, 1989). En 1994 se publicó la existencia de una nueva isoforma de la subunidad α , denominándose $\alpha 4$, que parece ser exclusiva de testículo (Shamraj y Lingrel, 1994). En 1986 se publicó la secuencia del cDNA que codifica $\beta 1$ (Schull y cols, 1986b), en 1989 la de $\beta 2$ (Martin vasallo y cols, 1989) y, posteriormente, en 1990 la de $\beta 3$ en etapas tempranas del desarrollo de Xenopus, pero no ha sido hasta 1996 que se ha descrito la isoforma $\beta 3$ en mamíferos (Malick y Levenson, 1996).

Todas las funciones enzimáticas se han asignado a la subunidad α : contiene los sitios de unión para ATP y para el inhibidor específico ouabaína, se fosforila por ATP y desarrolla cambios conformacionales dependientes de ligando, oclusión y traslocación de iones. La subunidad α , en ausencia de la subunidad β , tiene actividad ATPasa que difiere de la actividad enzimática normal en que ocurre en presencia de iones magnesio (actividad Mg-ATPasa) y no es inhibida por ouabaína (Blanco y cols, 1994a). El papel de la subunidad β en el sistema es todavía bastante desconocido, pero parece ser que su asociación correcta con la subunidad α juega un papel fundamental en conferir una actividad normal al complejo enzimático (Blanco y cols, 1994a, Martín-Vasallo y cols, 1989). Así mismo, es imprescindible para un correcto ensamblaje del enzima en la membrana (Kawamura y cols, 1994). También parece que la subunidad β influye en la afinidad por los cationes (Blanco y cols, 1995). Es posible que la subunidad β desempeñe alguna otra función, ya que se ha detectado como unidad independiente en las células del colon de rata, sin establecer interacción con subunidades α (Marxer y cols, 1989). Se sabe muy poco sobre el papel de la subunidad γ pero parece que se encuentra asociada obligatoriamente al complejo $\alpha\beta$, en una proporción 1:1.

La actividad de la Na,K-ATPasa es regulada directamente por ligandos, incluyendo cationes monovalentes, ATP y sus análogos o los glicósidos cardiotónicos y sus análogos endógenos e, indirectamente, por hormonas y factores de crecimiento (los esteroides y las hormonas tiroideas actúan regulando la transcripción de los genes que codifican para la enzima y las hormonas de naturaleza peptídica actúan sobre las bombas preexistentes modulando su actividad). Un aumento en la concentración intracelular de sodio activa inmediatamente la bomba, al contrario, variaciones fisiológicas en la concentración extracelular de potasio tienen muy poco efecto sobre la actividad de la bomba (Brodie y cols, 1994). La Na,K-ATPasa es el único receptor conocido de los glucósidos cardiotónicos (digoxina, digoxigenina y ouabaína) utilizados en terapia cardiológica por sus potentes efectos inotrópicos debidos a su habilidad de inhibir la Na,K-ATPasa. Esto sugiere que ligandos endógenos similares estructuralmente a los glucósidos cardiotónicos (hay evidencias de la

existencia de factores similares a la digital y a la ouabaína), pueden actuar como reguladores naturales de la bomba de sodio, interactuando directamente con la Na,K-ATPasa en el sitio de unión para la ouabaína en la subunidad α .

La Na,K-ATPasa en el cartílago articular.

El modelo en que, hasta ahora, se han desarrollado los estudios de la Na,K-ATPasa en condrocitos ha sido el cartílago articular de vaca siendo la densidad de la misma, relativamente alta para estas pequeñas células ($1.5-2.0 \times 10^5$ Na,K-ATPasa por 8-12 μ m células) (Mobasher y cols, 1994, 1996b). Estudios autoradiográficos con ^3H -ouabaína sugieren que la densidad de Na,K-ATPasa es sensible al medio iónico y osmótico de los condrocitos y que aumentos a largo plazo del Na extracelular produce un aumento en la regulación de la Na,K-ATPasa (Mobasher y cols, 1995b, 1997a, 1997b). Usando anticuerpos monoclonales específicos de las distintas isoformas, se ha visto que los condrocitos de vaca expresan al menos 2 unidades catalíticas α ($\alpha 1$ y $\alpha 2$) y 2 subunidades reguladoras β ($\beta 1$ y $\beta 2$) de la Na,K-ATPasa (Mobasher y cols, 1995a, 1996a,b, 1997a,b, 1998).

No hay estudios de Na,K-ATPasa en cartílago articular humano.

La presencia de múltiples isoformas de la Na,K-ATPasa en la membrana plasmática de los condrocitos puede reflejar una especialización del cartílago para mantener la relación Na:K en un medio iónico peculiar. Su papel en las patologías que afectan al cartílago es desconocida, pero dado que es el principal regulador de la homeostasis iónica celular debe estar implicada en situaciones donde el medio iónico se vea alterado.

INTERCAMBIADOR Na⁺ x H⁺

La familia de transportadores conocida genéricamente como los intercambiadores Na⁺xH⁺ (NHEs) es uno de los sistemas reguladores del pH intracelular mejor caracterizados (*Orlowski y Grinstein, 1997*). Se encargan de la expulsión de protones H⁺ intracelulares intercambiándolos por iones Na⁺ extracelular, eliminando así el exceso de ácido producido por el metabolismo celular. Son glicofosfoproteínas altamente reguladas, sensibles al pH intracelular y presentes en prácticamente todos los tejidos de los mamíferos. La actividad NHE es electroneutra (estequiometría 1:1) y se localiza tanto en membrana celular como en membrana mitocondrial. Una gran variedad de estímulos regulan el nivel de expresión y la actividad de este transportador (*Bianchini y Pouyssegur, 1994*). Son activados alostéricamente por el H⁺ citosólico promoviendo una rápida expulsión de ácido intracelular. Son inhibidos por el diurético amiloride y sus análogos.

El primer intercambiador Na⁺x H⁺ clonado fue el NHE1, por Sardet y colaboradores en 1989. Desde entonces se han identificado otras cuatro isoformas NHE (NHE2-NHE5), con una estructura similar (*Klange y cols, 1995*). NHE1-NHE5 comparten el 34-60% de los aminoácidos. Recientemente se ha aislado una nueva isoforma, NHE6, (*Nagase y cols, 1997*) aún incompletamente caracterizada que sólo comparte el 20% de los aminoácidos con las otras cinco isoformas. Aunque su topología de membrana precisa es desconocida se ha desarrollado un modelo basándose en su estructura primaria: constan de 10-12 regiones transmembrana (M) en el extremo N-terminal y una larga región citoplasmática en el extremo C-terminal (Fig. 13) (*Orlowski y Grinstein, 1.997*).

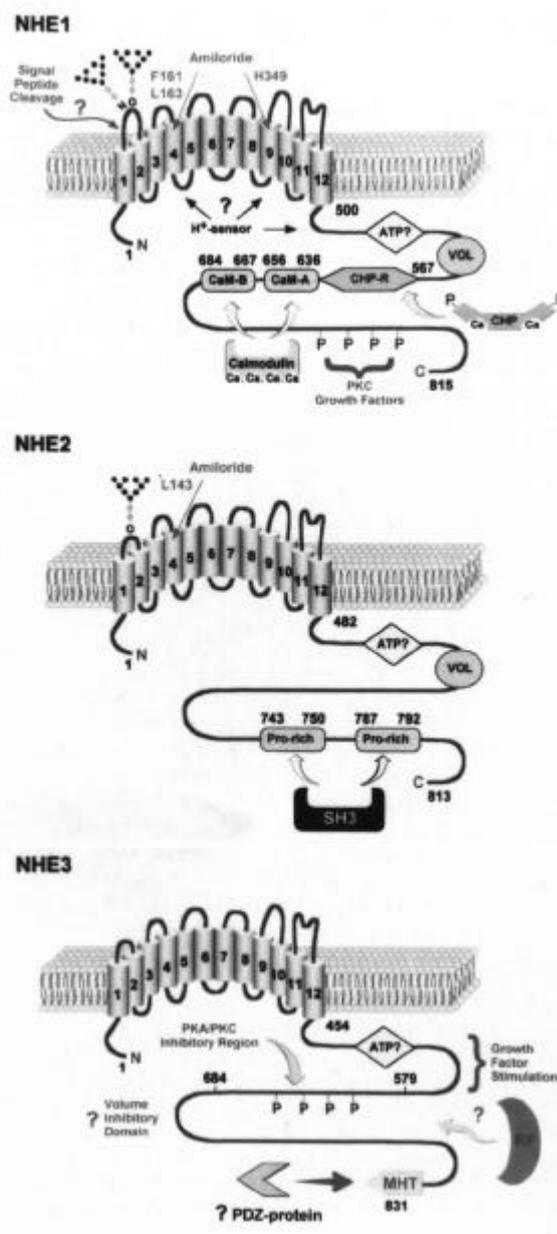


Figura 13: Representación esquemática de la estructura de las subunidades NHE1, NHE2 y NHE3 del intercambiador Na^+xH^+ . (CaM-A y CaM-B: regiones de unión a calmodulina. P: fosforilación. Pro-rich: región rica en prolina. RF: factor regulador. VOL: región sensible a volumen. ATP?: región sensible a ATP. CHP-R: región de unión a CHP).

NHE1 se expresa en casi todos los tejidos y células. NHE2, NHE3 y NHE4 muestran un patrón de expresión mas limitado, encontrándose preferentemente en el tracto gastrointestinal y riñón. NHE5 aparece en un número limitado de tejidos no epiteliales como cerebro, testículo y músculo esquelético. NHE6 se expresa en muchos tejidos, siendo sus mayores niveles en cerebro y músculo esquelético (Orlowski y Grinsteis, 1997).

NHE en el cartílago articular

Se ha demostrado que la regulación del pH intracelular del condrocito es mediada por el intercambiador Na^+/H^+ , sobre todo por la isoforma NHE1 (*Wilkins y cols, 1996*). También se ha confirmado que los condrocitos bovinos poseen más de una forma de intercambiador Na^+/H^+ ; usando anticuerpos monoclonales contra varias isoformas NHEs se ha comprobado que este sistema en condrocitos está compuesto por dos isoformas, NHE1 y NHE3 (*Wilkins y cols, 1996*). La presencia de dos isoformas del transportador en el cartílago puede ser una adaptación a la inusual matriz ácida extracelular del tejido (*Mobasheri y cols, 1998*).

No hay información sobre NHEs en el cartílago humano.

LA H,K-ATPasa

La H,K-ATPasa es un enzima asociado a membranas que acopla el intercambio electroneutro de K^+ extracelular por H^+ intracelular a la hidrólisis de ATP. En las células parietales del estómago es la responsable de la secreción de HCl y es el receptor farmacológico del omeprazol. Además de la pared gástrica, también se expresa en el colon y en riñón y, hasta ahora no se ha encontrado en ningún otro tejido o célula. La estructura de sus subunidades, denominadas α y β , son muy similares a las de Na,K-ATPasa, se piensa que todas ellas, aunque producto de genes distintos y mapeando en cromosomas distintos, provienen de un antepasado común (*Zinchuk y cols, 1997*).

Existen al menos dos isoformas α ; una específica de pared gástrica, $\text{HK}\alpha 1$, que funciona en presencia de la subunidad β ($\text{HK}\beta$ gástrica) y otra localizada en colon, $\text{HK}\alpha 2$, no asociada a $\text{HK}\beta$ gástrica ni a otra β propia y que recientemente se ha visto es capaz de unirse a la subunidad β de Na,K-ATPasa (*Codina y cols, 1998*).

COTRANSPORTADOR Na⁺/K⁺/2Cl⁻

El cotransportador Na-K-Cl es una de proteína de transporte de membrana celular que produce un mecanismo de entrada de Na⁺ junto con K⁺ y Cl⁻, siguiendo la corriente favorable producida por la elevada concentración de Na⁺ extracelular, de una manera eléctricamente neutra (estequiometría 1Na:1K:2Cl) (Haas, 1984).

Se han descrito dos formas de Na-K-Cl : una subunidad de epitelios secretores (NKCC1) ampliamente expresada en tejidos de vertebrados y que ha sido clonada de muchas fuentes incluyendo la glándula rectal del tiburón y otra subunidad localizada específicamente en el epitelio absortivo del segmento dilutor del riñon de vertebrados (NKCC2), de la cual se han aislado tres variantes en conejo y rata. Aunque su estructura es desconocida, se ha propuesto analizando la secuencia primaria de aminoácidos que tiene tres regiones: dos terminales -N y -C citoplasmáticos y una región central hidrofóbica conteniendo 12 hélices transmembrana (Figura 14) (Isenring y Forbuh, 1997).

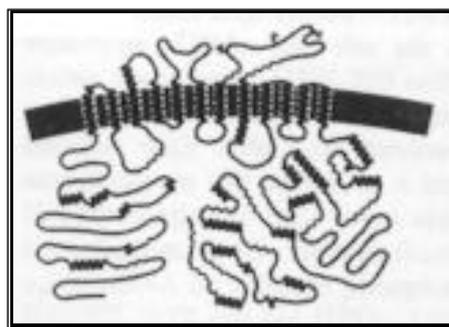


Figura 14: Modelo general para la subunidad NKCC1 del cotransportador Na-K-Cl.

La regulación del cotransportador Na-K-Cl es mediada a través de la fosforilación de la proteína transportadora. Es inhibido por los diuréticos furosemida y bumetanida.

Na-K-Cl está presente en una amplia variedad de células y tejidos, incluyendo epitelios secretores y reabsortivos, nervios, músculo, células endoteliales, fibroblastos y células sanguíneas. Juega un papel vital en la reabsorción y secreción renal de sales y en la secreción bronquial, intestinal, de glándulas salivares y otros epitelios secretores (*Hebert y cols, 1996*).

Na-K-Cl en el cartílago articular

Al menos una forma del cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$, implicado en el proceso de regulación de volumen, se expresa en condrocitos ya que cuando se incuban con bumetanida se inhibe la regulación del volumen celular (*Errington y Hall, 1995; Errington y cols, 1997*).

CANAL EPITELIAL DE SODIO

El canal epitelial de sodio (ENaC), es el prototipo de una nueva clase de canales iónicos conocida como la superfamilia Mec-ENaC; formada por proteínas homólogas que forman canales con propiedades distintas y diferente distribución tisular y tipo celular (*Canessa y cols, 1993*).

El papel fundamental del ENaC es la reabsorción de sodio siguiendo el gradiente electroquímico establecido por la $\text{Na},\text{K}\text{-ATPasa}$. En contraste con otros transportadores y canales de cationes, el movimiento de sodio a través del ENaC no está acoplado a otros iones, resultando, por tanto, una reabsorción específica de sodio sin el movimiento hacia el interior o el exterior de otros iones a través del mismo poro. Es un canal altamente selectivo de sodio con una cinética característicamente lenta; su tiempo de cierre y apertura puede ser mayor de varios segundos. La función del ENaC es regulada por factores intra y extracelulares, ajustándose a las necesidades de conservación de sodio. Se inhibe por el diurético amiloride y sus análogos.

En 1993, se aisló la primera subunidad del ENaC, la subunidad α , del colon de rata (*Lingueglia y cols, 1993*). Poco después otras dos subunidades, β y γ , fueron clonadas de oocitos. El ENaC es por lo tanto un canal multimérico formado por la sociación de tres subunidades α , β y γ distribuidas alrededor del poro (*Canessa y cols, 1994*).

Las tres subunidades del ENaC, son polipéptidos de 550 a 700 aminoácidos que comparten el 30-35% de ellos y una estructura secundaria similar. Cada subunidad del ENaC esta compuesta por dos largos dominios hidrofóbicos transmembrana (M1 y M2), los terminales amino y carboxilo que están localizados dentro de la célula y un largo dominio extracelular que constituye el 65-70% del total de aminoácidos (Figura 15) (*Renard y cols, 1994; Snyder y cols, 1994*).

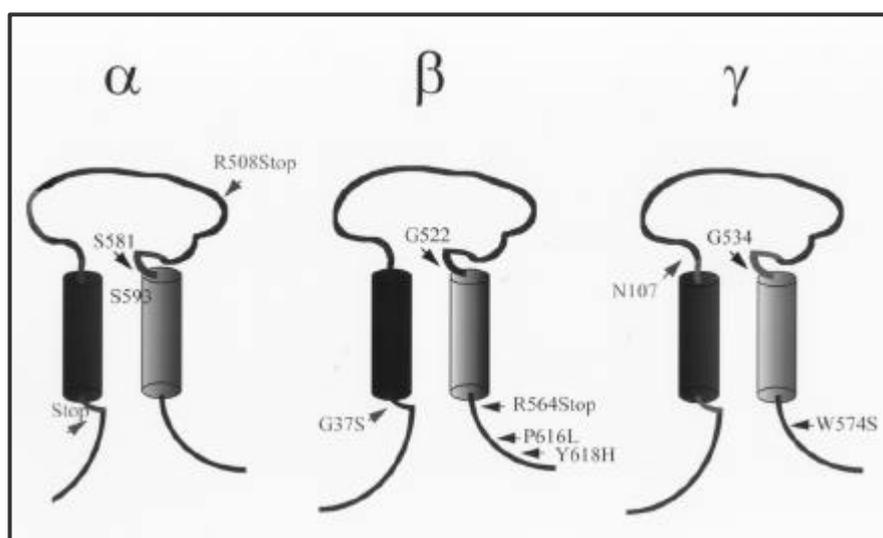


Figura 15: Topología de membrana del ENaC. Dos dominios transmembrana (M1 y M2), un largo bucle glicosilado extracelular y terminales $-NH_2$ y $-COOH$ localizados dentro de la célula.

El ENaC ha sido encontrado en epitelios de reabsorción, como el de la nefrona distal, los conductos de glándula salivar y sudorípara, vejiga urinaria y pulmón. También se ha visto en epitelio oral, esófago, estómago, hígado, páncreas y colon distal. Sin embargo la expresión del ENaC no se restringe a los tejidos epiteliales, una o mas subunidades han sido encontradas en células de una gran variedad de tejidos sin función absorptiva conocida; linfocitos B, osteoblastos, queratinocitos epidérmicos y folículos pilosos. No hay estudios de la expresión del ENaC en condrocitos (*Canessa y cols, 1998*).

La expresión de las subunidades del ENaC en sistemas heterólogos revela que la sola presencia de la subunidad α , induce una pequeña corriente de sodio, mientras que la coexpresión con β y γ multiplica por cien la magnitud de la corriente. Las diferencias en la abundancia relativa de las tres subunidades en los distintos tejidos estudiados sugiere la posibilidad de que ciertas células sean capaces de formar canales por la asociación de dos subunidades solamente, bien $\alpha\beta$ ó $\alpha\gamma$ (*Canessa y cols, 1998*).

EL CARTILAGO DE LA OSTEOARTROSIS

La osteoartrosis es una enfermedad del aparato locomotor caracterizada por la degeneración y pérdida del cartílago articular hialino, junto con proliferación y remodelación osea subcondral y en los márgenes de la articulación y diferentes grados de inflamación local en forma de sinovitis. Una definición útil consiste, por tanto, en caracterizarla por estos tres signos observables en la clínica, la radiología y el laboratorio:

- Pinzamiento del cartílago debido a su destrucción enzimática.
- Remodelación de la epífisis y metáfisis óseas en forma de neoformación y de rarefacción osea.
- Sinovitis secundaria, de poca intensidad en general.

Es una enfermedad articular muy compleja en la que intervienen procesos degenerativos y reparadores que afectan principalmente al cartílago y al hueso subcondral, y secundariamente a todas las estructuras articulares como la membrana sinovial, la cápsula articular o el aparato ligamentoso (*Dieppe, 1995; Kuettner y cols, 1992; Moskowitz y cols, 1992*).

Desde el punto de vista epidemiológico, es la más frecuente alteración osteoarticular en el mundo y con mayor repercusión social en cuanto a gasto sanitario. La prevalencia de la osteoartrosis en todas las localizaciones se correlaciona con la edad, siendo frecuente en los adultos a los 40 años y extremadamente frecuente después de los 60 años, afectando a más mujeres que varones a partir de los 50 años, mientras que hasta los 45 años, la proporción es similar (*Praemer y cols, 1992; Peyron, 1988*).

Las causas que inducen la aparición de éste proceso son múltiples y básicamente tienen como consecuencia la ruptura del equilibrio entre la resistencia del cartílago y las fuerzas que inciden sobre él. La osteoartrosis puede ser un proceso secundario a enfermedades inflamatorias, metabólicas o a alteraciones mecánicas de la articulación, denominándose secundarias, y en otras no tiene una causa conocida, siendo entonces una osteoartrosis primaria (*Schiller, 1995*).

Desde el punto de vista fisiopatológico hay dos mecanismos por los que se llega a producir osteoartrosis. El primero implica un defecto primario del cartílago, bien por alteraciones de los componentes de su matriz, como el colágeno o los proteoglicanos, o bien por alteraciones producidas por el depósito de sustancias que alteran sus propiedades, como la ocronosis, la enfermedad de Wilson, los cristales de pirofosfato cálcico dihidratado o los cristales de hidroxapatita, y el segundo mecanismo se produce por la sobrecarga de un cartílago normal, bien por lesión directa de la matriz o de los condrocitos, por ejemplo, por procesos inflamatorios o tóxicos locales, o bien por sobrecarga mecánica directa, ya sea por fuerzas físicas de normal intensidad pero repetitivas o por alteración de la transmisión de esas fuerzas en

el cartílago. Las causas genéticas o hereditarias van a corresponder principalmente al primer grupo (*Buckwalter y Martin, 1995*).

	Envejecimiento	Osteoartritis
Estructura	<ul style="list-style-type: none"> Fibrilación superficial estable y localizada 	<ul style="list-style-type: none"> Fibrilación superficial progresiva: se extiende hasta el hueso subcondral, produciendo pérdida de tejido (Disminución del grosor del cartílago con pérdida completa en algunas zonas)
Células	<ul style="list-style-type: none"> Disminución de la densidad celular. Disminución y alteración en su capacidad sintetizadora (produce agregados más pequeños) 	<ul style="list-style-type: none"> Aumento inicial de la densidad celular y capacidad sintetizadora. Posteriormente disminución celular y de la actividad sintetizadora.
Matriz	<ul style="list-style-type: none"> Disminución de la concentración de agua. Pérdida de los largos proteoglicanos agregados. Aumento la concentración de decorina. Aumento del diámetro y entramado fibrilar de las fibras colágenas. 	<ul style="list-style-type: none"> Inicial aumento en el contenido de agua y de los proteoglicanos. Disrupción de la organización del colágeno. Progresiva pérdida de proteoglicanos, ac. Hialurónico y colágeno. Aumento de concentración de fibronectina.

Tabla III: Diferencias entre los cambios producidos por el envejecimiento y los producidos por la osteoartritis en el cartílago.

El envejecimiento progresivo de la población, especialmente en países industrializados, agrava este problema por cuanto la edad es el más importante factor de riesgo, especialmente en la progresión de la enfermedad y, lógicamente, en la aparición de sus complicaciones clínicas y asistenciales. Sin embargo, la artrosis no es simplemente el resultado de la edad y el uso mecánico de la articulación puesto que los cambios observados en el cartílago afecto de osteoartritis difieren de los observados en el cartílago de ancianos (*Martin y Buckwalter, 1996*).

Características bioquímicas y metabólicas del cartílago osteoartrítico

Los cambios histológicos más precoces que se ven en la osteoartritis incluyen la fibrilación de la superficie articular del cartílago que se extiende a las zonas intermedias, la violación de la línea de calcificación por vasos sanguíneos del hueso subcondral y la remodelación del hueso subcondral. El signo más precoz visible de la osteoartritis es la fibrilación o disrupción de las

capas mas superficiales del cartílago. Cuando la enfermedad progresa, las irregularidades de la superficie llegan a formar fisuras que se extienden a la profundidad del cartílago, liberando fragmentos de cartílago superficial al espacio articular y disminuyendo así su grosor (*Reimann y cols, 1977; Schiller, 1995*).

Muchos de los mecanismos responsables de la pérdida progresiva de cartílago en la articulación afecta de osteoartrosis primaria permanecen son aun desconocidos, pero pueden dividirse en tres fases que se solapan (*Buckwalter y Mankin, 1998*) :

1. Alteración de la matriz del cartílago. Antes o con la aparición de la fibrilación, el armazón de macromoléculas de la matriz se altera así como el contenido de agua de la matriz. La alteración bioquímica más marcada en el cartílago osteoartrósico se observa en su composición de proteoglicanos. La concentración total de proteoglicanos disminuye de manera importante, fundamentalmente de los agregados, produciéndose además disminución en la longitud de las cadenas de glicosaminoglicanos y modificaciones en la proporción de los mismos. De este modo se observa pérdida de queratán-sulfato y aumento de la proporción de condroitín-4-sulfato, en relación con la de condroitín-6-sulfato. La concentración de colágeno tipo II no se modifica substancialmente en la osteoartrosis; sin embargo, las fibras son más cortas y delgadas que en condiciones normales y presentan alteraciones ultraestructurales. También se ha descrito un aumento en la presencia de colágenos menores, como los de tipo I y III. Esto sugiere la existencia de una alteración en el patrón normal de síntesis de colágeno por parte de los condrocitos en la osteoartrosis. El contenido acuoso del cartílago artrósico está incrementado respecto al cartílago normal.
2. Respuesta del condrocito a la alteración de la matriz. La respuesta consiste tanto en actividades anabólicas como catabólicas, así como en la proliferación celular. Factores de crecimiento mitogénico y anábolizantes presumiblemente tienen un importante papel en la estimulación de la síntesis de macromoléculas de matriz y en la proliferación de condrocitos: clones proliferativos de células rodeados de nuevas moléculas de matriz

constituyen una característica histológica de la respuesta condrocitaria a la degeneración del cartílago. Numerosos estudios han demostrado un aumento en la síntesis y secreción de enzimas degradantes de la matriz extracelular. La consecuencia de estas actividades enzimáticas aumentadas es la degradación de los agregados de proteoglicanos y sus unidades, liberándose proteoglicanos incapaces de agregarse. También se ha demostrado un aumento de actividad colagenasa en el cartílago osteoartrosico humano. Ésta es, probablemente, la responsable del debilitamiento y adelgazamiento de las redes de colágeno de este proceso. A pesar de la pérdida global de proteoglicanos, la síntesis de los diversos componentes de la matriz extracelular se encuentra incrementada, en esta fase del proceso. Sin embargo, a pesar de este incremento inicial en la síntesis de proteoglicanos, existen como hemos visto diferencias cualitativas entre éstos y los del cartílago normal.

3. Disminución de la respuesta del condrocito y pérdida progresiva del tejido.

Cuando la osteoartrosis se hace suficientemente intensa, declina la respuesta anabólica y sintetizadora de los condrocitos, así como la proliferación celular. Esta pérdida en la respuesta celular puede deberse al daño mecánico y muerte de los condrocitos que no están protegidos por una matriz extracelular adecuada, pero inicialmente se debe a una disminución de la respuesta celular a las citoquinas. Esto puede ocurrir como resultado de la síntesis y acumulación de moléculas de matriz que además de fijar citoquinas, pueden afectar a su función. La degeneración del cartílago se acompaña de una remodelación del hueso subcondral y secundariamente del resto de las estructuras que componen la articulación. En la sinovial osteoartrosica se pueden identificar focos inflamatorios aislados de intensidad variable. El origen de esta respuesta inflamatoria está probablemente relacionado con la degradación mecánica o enzimática del cartílago, que libera componentes de la matriz extracelular al espacio articular. Estos son posteriormente fagocitados por macrófagos de la membrana sinovial, lo que provoca la liberación de mediadores inflamatorios como citoquinas, productos de la cascada del araquidónico,

factores quimiotácticos, etc, que serían responsables de la inflamación observada en esta enfermedad. Aun siendo conscientes de que probablemente la inflamación en la osteoartritis es secundaria al propio proceso degenerativo, es muy probable que potencie los mecanismos de degradación cartilaginosa, en virtud de la acción catabólica de los potentes mediadores liberados durante este proceso.

Cartílago osteoartrítico e iones

Sobre todo en las fases iniciales de la osteoartritis, cuando la concentración de proteoglicanos totales disminuye y el contenido acuoso aumenta se producen cambios iónicos en el medio extracelular. Disminuye la concentración de cargas fijadas catiónicas en la matriz del cartílago, creando alteraciones físico-químicas que modifican el ambiente iónico del condrocito (*Buckwalter y Mankin, 1997b*).

EL CARTÍLAGO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica y multisistémica de etiología desconocida. Aunque existe una amplia gama de manifestaciones sistémicas, la alteración característica es una sinovitis inflamatoria persistente que afecta habitualmente a las articulaciones periféricas de forma sumativa y con una distribución simétrica. La actividad es fluctuante y con carácter destructivo y erosivo de las articulaciones (*Zvaifler y cols, 1993*).

Afecta alrededor del 1% de la población mundial. Puede presentarse a cualquier edad, aunque su máxima incidencia se sitúa entre los 40 y 60 años. Predomina en las mujeres en una proporción de 3:1 en relación con el varón. La prevalencia aumenta con la edad, y las diferencias entre los sexos disminuye en el grupo de población de edad avanzada. Se observa en todo el mundo y afecta a todas las razas (*Harris, 1989*).

El agente o agentes que desencadenan la enfermedad se desconocen, sin embargo existen datos inmunopatológicos que orientan a la existencia de una base genética, unos factores iniciadores-perpetuadores y factores inmunoreguladores. Se considera que la AR es el resultado de la acción de un antígeno en un individuo que tiene una base genética adecuada. La naturaleza del factor desencadenante es desconocida; podría tratarse de un antígeno exógeno (quizá infeccioso) o de un autoantígeno, que provocan una respuesta inmune en el huésped, de la cual deriva la reacción inflamatoria responsable de la enfermedad. En la inflamación desencadenada por la respuesta inmune en el medio sinovial se activan numerosos procesos que perpetúan la inflamación, estimulando así a las células sinoviales que proliferan y en las capas profundas activan los fibroblastos para producir más tejido conjuntivo. Asimismo, se estimula la proliferación vascular. Superpuesta a la inflamación crónica en el tejido sinovial, se puede observar un proceso inflamatorio agudo en el líquido sinovial. En las zonas de contacto con el cartílago articular, la sinovial se transforma en tejido de granulación o pannus, compuesto por fibroblastos

proliferantes, vasos sanguíneos de pequeño tamaño y células mononucleares, que invade y destruye progresivamente el cartílago (*Firestein, 1993; Maini y cols, 1989*).

Los cambios iónicos y osmóticos que se producen en el cartílago articular durante el desarrollo de la AR son desconocidos.

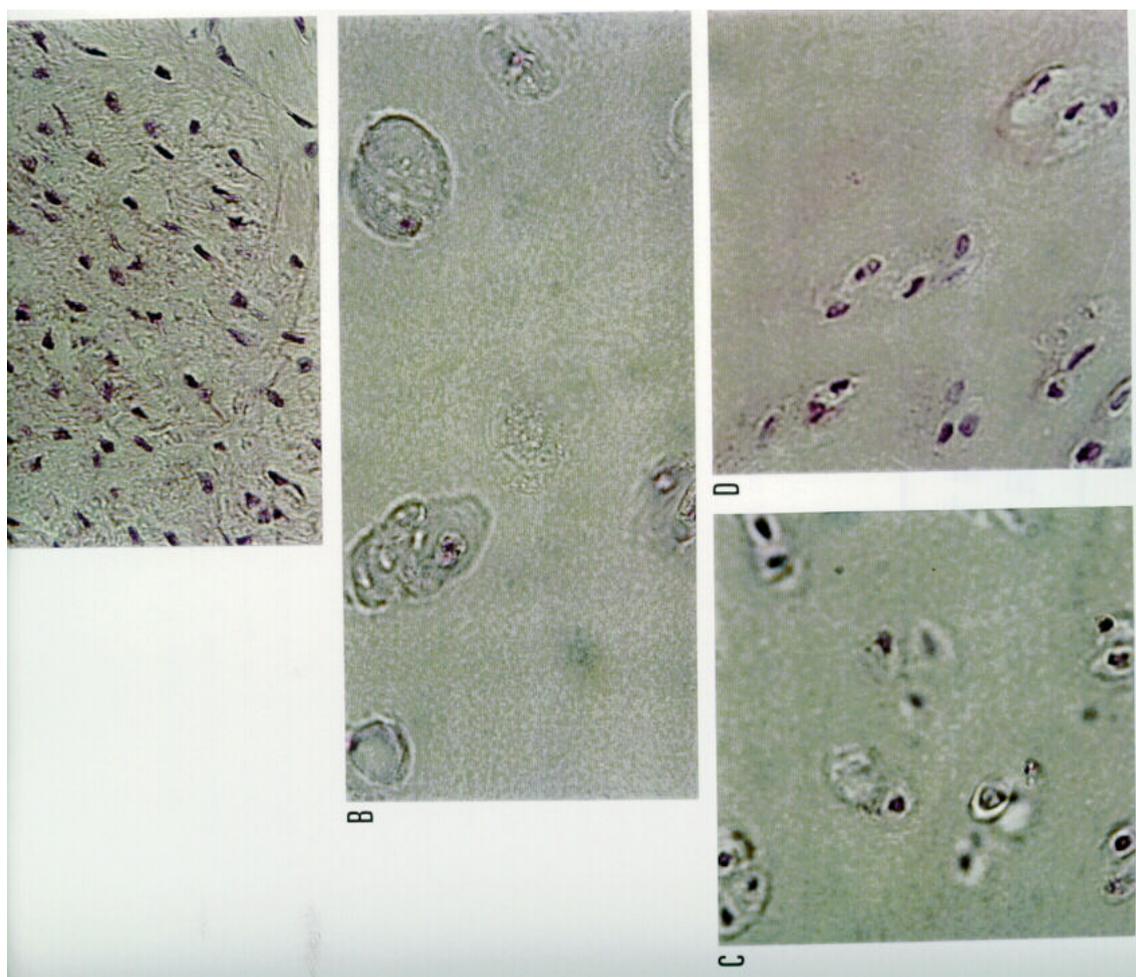


Figura 16: Fotomicrografías de cartílago articular humano. Hematosilina-eosina. A, cartílago de un feto de 22 semanas. B, cartílago de un varón de 34 años sin patología osteoarticular. C, cartílago de una mujer de 67 años afecta de osteoartrosis. D, cartílago de una mujer de 63 años afecta de artritis reumatoide.

**PLANTEAMIENTO
EXPERIMENTAL**

El transporte de iones a través de la membrana plasmática es una propiedad fundamental de todas las células animales, incluyendo los condrocitos, pero en éstos dado su peculiar ambiente iónico y osmótico constituye un pilar clave para el funcionamiento del cartílago.

En los últimos años se han hecho importantes avances en la identificación molecular y caracterización de las principales proteínas de membrana transportadoras de iones, sobre todo en tejido neuronal y epitelial. Sin embargo, el conocimiento de los mecanismos transportadores de iones así como de sus papeles en la biología del cartílago articular son muy limitados. Es de gran interés, por tanto, estudiar estos mecanismos para comprender como permiten a los condrocitos vivir en su peculiar medio iónico y como las alteraciones en la expresión de estos transportadores iónicos de membrana pueden ser importantes en las enfermedades del cartílago.

En este trabajo pretendemos profundizar en el conocimiento de los principales mecanismos de transporte iónico del cartílago articular humano implicados en el transporte de dos principales cationes, Na^+ y K^+ , así como en la regulación del pH mediante el transporte de H^+ , y de la posible influencia de estos en las enfermedades que afectan al cartílago. Para ello identificaremos primero los transportadores de estos iones en cartílago humano sano para luego estudiar las variaciones en la densidad y distribución de sus isoformas en el cartílago artrósico y reumatoide.

En el presente trabajo nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

1. Determinación de la expresión, localización de la proteína y actividad enzimática "*in situ*" de las isoformas de las subunidades α y β de la Na,K-ATPasa en el cartílago articular sano en el feto y en el adulto humano.
2. Inmunolocalización de las subunidades α y β del Canal Epitelial de Sodio en el cartílago articular humano sano.
3. Inmunolocalización de las subunidades NHE1, NHE2 y NHE3 del intercambiador $\text{Na}^+ \times \text{H}^+$ en el cartílago articular humano normal.
4. Inmunolocalización de la H,K-ATPasa (forma gástrica) en el cartílago articular humano.
5. Inmunolocalización del cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ en el cartílago articular humano normal.
6. Estudio de las variaciones en la expresión y localización de la Na,K-ATPasa, del Canal Epitelial de Sodio, del intercambiador $\text{Na}^+ \times \text{H}^+$, de H,K-ATPasa y del cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ en el cartílago humano patológico, afecto de osteoartrosis y artritis reumatoide.

**MATERIAL
Y
MÉTODO**

1. OBTENCIÓN DE LAS SECCIONES DE TEJIDO: para inmunohistoquímica y para la actividad p-nitrofenilfosfatasa.

• Pacientes y controles

Estudiamos muestras de cartílago articular humano sano, fetal y adulto, y de cartílago patológico, afecto de osteoartrosis y artritis reumatoide:

1. Cartílago humano fetal: Obtenido de las articulaciones metacarpofalángicas y de rodillas de necropsias de 4 fetos humanos de 22 a 24 semanas. Los fetos procedían de interrupciones voluntarias del embarazo según la legislación vigente, estando todos sanos según estudio histopatológico posterior.
2. Cartílago humano adulto sano: Obtenido de cirugía de fracturas traumáticas y de necropsias, de pacientes menores de 50 años sin enfermedad osteoarticular previa. Antes de extraer el cartílago se realizó estudio radiológico de la articulación para descartar enfermedad degenerativa. Se obtuvieron muestras de cartílago articular de 16 controles (11 de cirugía de fractura y 5 de necropsia). De los controles procedentes de cirugía, 7 eran hombres y 4 mujeres, en 6 se extrajo la muestra de la articulación coxofemoral (4 de la cadera derecha y 2 de la izquierda) y en 5 de la rodilla (3 de la rodilla derecha y 2 de la izquierda). Todos los controles procedentes de necropsias fueron varones y en todos se obtuvo la muestra de la rodilla derecha. La media de edad total fue de 36 ± 8.3 años.
3. Cartílago humano afecto de osteoartrosis: Obtenido de cirugía de reemplazamiento de pacientes afectos de osteoartrosis primaria coxofemoral o de rodilla, diagnosticados previamente según los criterios de clasificación de la Sociedad Americana de Reumatología (ARA), tabla IV. Se obtuvieron muestras de cartílago articular de 30 pacientes, 18 mujeres y 12 hombres, 21 de cirugía de reemplazamiento de cadera (12 de la derecha y 9 de la izquierda) y 9 de rodilla (6 de la derecha y 3 de la izquierda). La media de edad fue de 63 ± 6.4 años.

Artrosis coxofemoral	Artrosis de rodilla
<ul style="list-style-type: none"> • Dolor de cadera + 2 o más de los siguientes criterios:	<ul style="list-style-type: none"> • Dolor de rodilla + 3 o más de los siguientes criterios:
<ul style="list-style-type: none"> • VSG menor de 20 mm/hora • Osteofitos femorales o acetabulares • Estrechamiento radiológico articular 	<ul style="list-style-type: none"> • Más de 50 años • Rigidez matutina menor de 30 minutos • Crepitación • Dolorimiento a la presión ósea • Hipertrófia ósea • Ausencia de calor articular

Tabla IV: Criterios para la clasificación de osteoartrosis coxofemoral (Altman y col, 1991) y de rodilla (Altman y col, 1986).

4. Cartílago humano afecto de artritis reumatoide: Obtenido de cirugía de reemplazamiento de pacientes afectados de artritis reumatoide seropositiva, diagnosticados según los criterios de la ARA, Tabla V. Se obtuvo muestra de cartílago articular de 15 pacientes, todos mujeres, con un tiempo medio de evolución de su enfermedad articular de 11 ± 2.7 años. En 9 pacientes la muestra procedió de cirugía de reemplazamiento de cadera (6 de la derecha y 3 de la izquierda) y en 6 pacientes de la rodilla (4 de la derecha y 2 de la izquierda). La media de edad fue de 62 ± 7.6 años.

Artritis reumatoide
+ 4 o más de los siguientes criterios:
<ul style="list-style-type: none"> • Rigidez matutina superior a una hora, durante 6 meses. • Inflamación de la muñeca, metacarpofalángica e interfalángicas proximales durante 6 semanas. • Inflamación articular de carácter simétrico. • Cambios radiológicos típicos de artritis reumatoide en las manos: erosiones u osteoporosis yuxtaarticular. • Nódulos reumatoides • Factor reumatoide

Tabla V: criterios diagnósticos para la artritis reumatoide (Arnett y col, 1987).

Todos los pacientes y controles vivos procedían de los servicios de reumatología y traumatología del Hospital Universitario de Canarias, Tenerife. Los controles de necropsias procedían del servicio de anatomía patológica del

Hospital Universitario de Canarias y del Cuerpo de Medicina Forense del Ministerio de Justicia. Todas las muestras fueron obtenidas durante el período septiembre de 1996 a abril de 1998.

	Controles		Osteoartrosis	Artritis Reumatoide
	Necropsias	Cirugía ortop.		
<u>Na,K-ATPasa</u>	3	5	14	7
ENaC	1	2	8	4
Na ⁺ x H ⁺	1	2	4	2
Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻	-	2	4	2

TablaVI : N-muestras de pacientes y controles utilizados para la inmunohistoquímica de los cuatro principales trasportadores de membrana estudiados. De cada muestra se realizaron 7-10 secciones de criostato de 5μ..

Para el estudio de la isoforma b3 de la subunidad b de la Na,K-ATPasa, se utilizó cartilago articular procedente de las articulaciones femoro-tibiales de dos ratas Sprage-Dawley de 2 meses de edad, obtenidas del animalario de la Facultad de Medicina, siguiendo las normas del convenio de Helsinki para minimizar el sufrimiento de los animales.

• **Procesamiento y sección de los tejidos**

Se disecaron piezas de 0.5 a 1 cm de largo por 0.25 de ancho y 0.2 a 0.25 de grosor de cartilago articular, se lavaron con solución salina (NaCl 9g/L) y se conservaron en la misma solución hasta ser procesadas dentro de las siguientes 6 horas. Las piezas fueron congeladas y cortadas en secciones de 5μ con un criostato y posteriormente se montaron en portaobjetos gelatinizados y se almacenaron a -20°C.

2. INMUNOHISTOQUÍMICA

Se utilizaron las secciones de criostato montadas en portaobjetos gelatinizados.

- **Anticuerpos utilizados**

Los anticuerpos utilizados en éste trabajo para detectar isoformas de la Na,K-ATPasa, Canal epitelial de sodio, intercambiador Na/H, cotransportador Na/K/2Cl y H,K-ATPasa, así como su método de fijación para inmunohistoquímica, se muestran en la tabla VII.

- **Método de Avidina-Biotina**

Las secciones se fijaron, según el anticuerpo a utilizar (ver tabla VII), durante 15 minutos con paraformaldehído 4% en tampón fosfato 0.1M pH 7.4 o durante 30 minutos con periodato-lisina-paraformaldehído, a temperatura ambiente. Se lavaron y permeabilizaron 2 veces durante 10 minutos a temperatura ambiente en tampón fosfato 0.1M con 0.1% de albúmina sérica bovina (BSA) y 0.3% de tritón X-100 (solución de lavado) y se incubaron en una solución de H₂O₂ al 1% en metanol durante 20 minutos para neutralizar la actividad peroxidasa endógena. Posteriormente se lavaron de nuevo 2 veces en solución de lavado durante 10 minutos y se incubaron 12 horas a 4°C con el primer anticuerpo correspondiente (ver diluciones en la tabla); algunas secciones se incubaron sin el primer anticuerpo como controles negativos. A continuación, se lavaron 2 veces en solución de lavado durante 10 minutos y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente con un segundo anticuerpo biotinilado, a una dilución de 1:250. El segundo anticuerpo fue anti-IgG de conejo (Vector) o anti-IgG de ratón (Vector), según el primer anticuerpo fuese policlonal o monoclonal respectivamente.

Posteriormente, se lavaron 2 veces y se incubaron con el complejo ABC (sistema Avidina-Biotina, Vector) durante 2 horas en la oscuridad: se mezclaron 90 µl de solución A (Avidina DH) y 90 µl de solución B (enzima biotinilado) en 10 ml de solución de lavado. La actividad peroxidasa se reveló con H₂O₂ al 0.01%, usando 3',3'-diaminobencidina (DAB) al 30% en Tris-HCl 0.1M, pH 7.6 como cromógeno. Las preparaciones se montaron en glicerol:PBS (9:1) para su observación al microscopio óptico (Olympus BX 50).

- **Método de fluorescencia**

La primera parte, hasta la incubación con el primer anticuerpo es igual al método anterior, excepto que se realiza otro lavado durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la incubación con tampón fosfato 0.1M con 2% de BSA y 0.3% de tritón X-100 para evitar el marcaje no específico. Las diluciones del primer anticuerpo varían respecto al método anterior (ver tabla VII); algunas secciones se incubaron sin el primer anticuerpo como controles negativos. Transcurrido el período de incubación con el primer anticuerpo (12 horas a 4°C), se lavaron 2 veces y se incubaron con el segundo anticuerpo, 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. El segundo anticuerpo fue anti-IgG de conejo marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC)(Sigma) a una dilución 1:150 o anti-IgG de ratón marcado con tetrametilrhodamina (Boehringer Mannheim) a una dilución 1:50, para los anticuerpos policlonales y monoclonales, respectivamente. Posteriormente se realizaron 2 nuevos lavados y se montaron en glicerol:PBS (9:1) para su observación al microscopio de fluorescencia (Olympus BX 50).

Para comprobar adicionalmente la especificidad del anticuerpo anti β 2, se llevaron a cabo experimentos de competición incluyendo en la mezcla de incubación el antígeno β 2 expresado en *E. Coli* y purificado (*Gonzalez-Martinez y cols, 1994*) a una concentración de 0.8 ng/ μ l.

Anticuerpo	Isoforma	Dilución de trabajo	Fuente	Fijación	Refcia.
Na,K-ATPasa					
McK1	$\alpha 1$	1:5	K.J. Sweadner	(A)	Peng y cols.
McB2	$\alpha 2$	1:5	K.J. Sweadner	(A)	Peng y cols.
McBX3	$\alpha 3$	1:5	K.J. Sweadner	(A)	Arystarkhova y cols.
XVIF9G10	$\alpha 3$	1:5	K.J. Sweadner	(A)	Peng y cols.
SpETb1	$\beta 1$	1:1500	P. Martin-Vasallo	(B)	González-Martínez, y cols.
SpETb2	$\beta 2$	1:2000	P. Martin-Vasallo	(B)	González-Martínez, y cols.
RTN b3	$\beta 3$	1:2000	K.J. Sweadner	(B)	Peng y cols.
Canal epitelial de sodio					
Antiα ENaC	α	1:400	C. Canessa	(B)	Duc y cols.
Antiβ ENaC	β	1:200	C. Canessa	(B)	Duc y cols.
Intercambiador Na x H⁺					
Anti NHE1	NHE1	1:1000	B. Bianchini	(B)	B. Bianchini y cols.
Anti NHE2	NHE2	1:1000	B. Bianchini	(B)	B. Bianchini y cols.
Anti NHE3	NHE3	1:1000	B. Bianchini	(B)	B. Bianchini y cols.
Cotransportador Na/K/2Cl					
T4	NKCC1	1:100	B. Forbush	(B)	Isemring et al.
H,K-ATPasa					
Anti HKb	HK β gástrica	1:300	P. Martín-Vasallo	(B)	Ávila y cols. (no publicado)

(A) periodato-lisina-paraformaldehído. (B) paraformaldehído 4%.

Tabla VII: Anticuerpos utilizados para la detección de las isoformas y subunidades de los transportadores de membrana estudiados.

3. ACTIVIDAD p-NITROFENIL FOSFATASA DEPENDIENTE DE POTASIO EN CORTES DE TEJIDO

Las secciones de criostato (procedentes de muestras de cartílago articular de tres controles, tres pacientes afectos de osteoartrosis y tres pacientes afectos de artritis reumatoide) montadas en portaobjetos gelatinizados se fijaron durante 1 minuto a 4°C con 2% formaldehído en tampón cacodilato 100 mM pH 7. Posteriormente se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente en 50 mM de tampón Tricina pH 7.5, 8 mM levamisole y 40 mM L-fenilalanina, como inhibidores de fosfatasas alcalinas. En los controles con ouabaina, se añadió ésta a 10 mM. Se incubaron luego durante dos horas a 37°C en 10 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 2 mM Mg-p-nitro-fenilfosfatasa, 2 mM CeCl₃, 40 mM L-fenilalanina, 8 mM levamisole en 50 mM de tampón Tricina pH 7.5. También realizamos experimentos control sin pNPP, reemplazando el KCl por NaCl o añadiendo 10 mM ouabaína. Se lavaron tres veces a temperatura ambiente con 50 mM Tris-HCl pH 7.5 y se incubaron durante 15 minutos a 55-60°C con 1.4 mM DAB, 0.002% H₂O₂, 100 mM azida sódica y 12 mM sulfato de níquel hexamonio en tampón de Tris-HCl, 50 mM pH 7.6. Se añade el H₂O₂ justo antes de la reacción (*Zemanova y Pácha, 1996*). Se lavaron varias veces con agua destilada y se montaron con glicerol:PBS (9:1) para su observación al microscopio óptico Olympus BX-50.

4. HIBRIDACIÓN “IN SITU”

- **Obtención de sondas para hibridación in situ.**

Se utilizaron ribosondas marcadas con digoxigenina y generadas mediante RNA polimerasa a partir de fragmentos del cDNA de los genes de interés clonados en el vector pBlueScript KS⁻. Los fragmentos se obtuvieron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

-Amplificación de los cDNAs de interés

Los fragmentos de interés se amplificaron a partir de un molde de cDNA de cerebro humano. El cDNA se sintetizó mediante la retrotranscriptasa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV) utilizando un kit comercial (cDNA synthesis kit, Boehringer Mannheim) según las indicaciones del fabricante. El molde para la síntesis de cDNA consistió en RNA total extraído mediante el método de Chomczynski y Sacchi (1986) a partir de una muestra de cerebro humano obtenido de necropsia (*Ávila y cols, 1998*).

Los oligonucleótidos específicos que sirvieron como cebadores para la reacción de PCR se muestran en la tabla VIII; su diseño se realizó a partir de las secuencias depositadas en la base de datos GenBank (National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, EEUU). En el caso de $\alpha 2$ y $\alpha 3$, se eligió para el diseño las zonas no traducidas del mRNA, evitando de esta forma la posibilidad de hibridación cruzada con otras isoformas de subunidades α de ATPasas de tipo P. La síntesis de los cebadores se realizó en nuestro laboratorio en un sintetizador de oligonucleótidos (modelo PCR-mate 391, Applied Biosystems), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para la amplificación se utilizó Taq DNA polimerasa (Bioline) a una concentración de 0.2 U/ μ L, cebadores a 0.5 μ M cada uno y deoxinucleótidos trifosfato a 0.125 μ M cada uno. La composición del tampón de reacción fue 16 mM sulfato amónico, 67 mM cloruro de magnesio, 1.5 mM Tris HCl (pH 8.8 a 25°C) y 0.01% Tween-20. El volumen total de la reacción fue de 50 μ L. Tras una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, la PCR se desarrolló según los parámetros especificados en la tabla VIII en un termociclador Perkin Elmer.

Finalmente se realizó una etapa final de elongación durante 10 minutos a 72°C. Una alícuota de la reacción se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa SeaKem (FMC Bioproducts) al 1.2% en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). El resto de la muestra se separó en un gel de agarosa Nusieve GTG de bajo punto de fusión (FMC Bioproducts) y la banda de interés fue cortada y el DNA purificado según el procedimiento descrito en Sambrook et al, 1989.

GEN	GenBank	Nombre	5'-nt	Secuencia (5' a 3')	Producto	Ciclos
a2	J05069	F- α 2	24336	GGAATTCGAAGAACCAGGCATGGAA	229	35
		R- α 2	24564	CGGGATCCAAAGGATCTGGTCGGGG		
a3	X12910-23	F- α 3	2772	GGAATTCGGCGCTGCAGAGGCTCC	157	35
	M90658	R- α 32	1830	CGGGATCCGCGCTCCTTGCCCTTGT		
b3	U51478	F-HB3	245	CGGGATCCCGTGACCAGATTCTTAG	661	35
		R-HB3	906	GCCCTAGGCAACACACAACATTTACTCT		

Tabla VIII: Características de los oligonucleótidos específicos que sirvieron como cebadores para las PCR.

-Clonaje

En el caso de α 2 y α 3, el DNA amplificado por PCR y el vector de clonaje (pBluescript KS-, Stratagene) fueron digeridos simultáneamente con las enzimas de restricción Bam HI y Eco IR (Promega) y los productos se purificaron mediante separación en gel de agarosa Nusieve GTG. En el caso de β 3, el DNA amplificado y el vector de clonaje fueron digeridos simultáneamente con las enzimas de restricción Bam HI y Eco RV. La ligación de los insertos y los vectores se realizó según describe Sambrook et al. Los productos de la ligación se utilizaron para transformar células competentes de E. coli XL1-Blue según el método descrito por Hanahan (1985). Las bacterias se extendieron sobre placas de medio LB (Bacto®-tryptone 10%, Bacto®-yeast extract, 0.5%, cloruro sódico, 10%) solidificado con agar al 1,5% (p/v) y conteniendo para la selección de transformantes con inserto tetraciclina (12.5 μ g/ml), ampicilina (100 μ g/ml), isopropil-tio-galactósido 0.5 mM y X-gal 80 μ g/ml.

Los insertos de los clones positivos se secuenciaron mediante el método de los dideoxinucleótidos con el kit comercial Cy5TM AutoCycleTM Sequencing kit (Pharmacia) y los productos se analizaron en un secuenciador automático (ALFexpress DNA Sequencer, Pharmacia). En la figura 17 se muestran los mapas de las construcciones generadas.

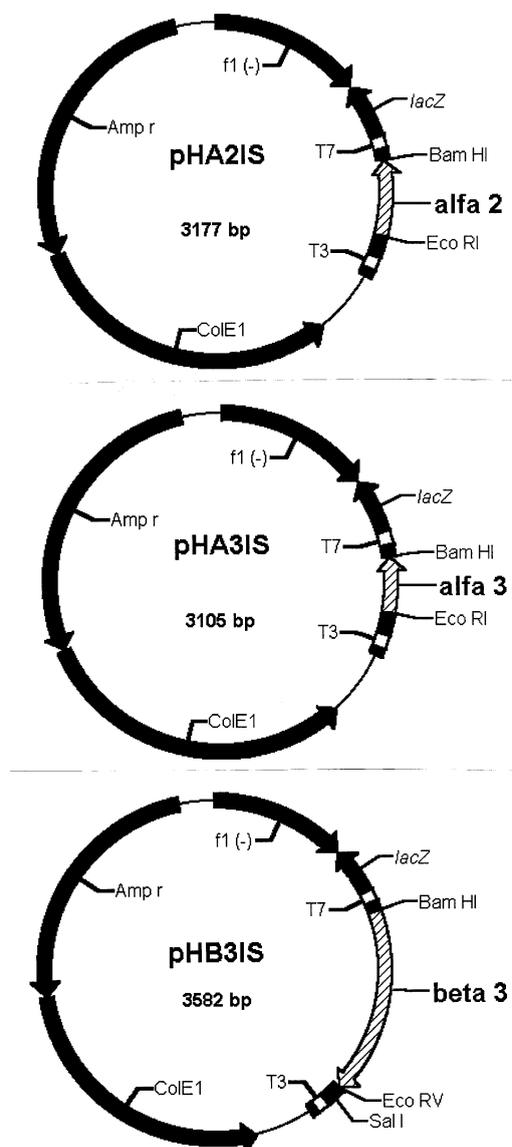


Figura 17: Mapas de las construcciones generadas para la clonación.

-Síntesis y marcaje de las sondas

Las sondas se sintetizaron mediante transcripción *in vitro* con las RNA polimerasas de los fagos T7 o T3 (Promega), utilizando como molde las construcciones linearizadas con una enzima de restricción y en presencia de una mezcla de ribonucleótidos trifosfato, uno de los cuales está unido a una molécula de digoxigenina (DIG RNA labeling mix, Boehringer Mannheim). La concentración de las sondas sintetizadas se determinó mediante diluciones seriadas y "dot-blot", comparando las muestras problema a una sonda control de concentración conocida (Boehringer Mannheim). La estrategia para la obtención de las sondas para $\alpha 2, \alpha 3$ y para $\beta 3$ con sentido y antisentido se muestra en la figura 17.

- **Eliminación de contaminación por ribonucleasas exógenas.**

Para evitar la contaminación de las muestras con ribonucleasa durante la extracción del RNA, todo el material utilizado fue de plástico desechable y estéril. Cuando hubo que utilizar material de vidrio, éste se trató previamente con peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos a temperatura ambiente seguido de repetidos lavados con agua desionizada tratada con DEPC. Fueron tratadas con DEPC al 0.1% todas las soluciones empleadas durante el proceso, excepto las que contienen Tris-HCL. El tratamiento con DEPC se realizó al 0.1% durante toda la noche a 37°C en fuerte agitación y posterior esterilización en autoclave. Para las soluciones con Tris-HCL se utilizó agua desionizada tratada previamente con DEPC.

- **Procesamiento de las muestras.**

Se recogieron muestras de cartílago articular, procedente de la cabeza femoral de tres controles con fractura traumática de cadera menores de 50 años, y se lavaron unos segundos en tampón fosfato salino (PBS). Se incubaron a 4°C durante 3 horas con paraformaldehído 4% pH 7.5, en PBS y posteriormente durante 12 horas a 4°C en sacarosa al 30% en PBS. Posteriormente fueron congeladas para realizar cortes con criostato de 5 μ que se colocaron en portas

gelatinizados. Las secciones de tejido así obtenidas se dejaron secar durante 12 horas a 40°C y se guardaron a -80°C.

- **Prehibridación.**

Las secciones fueron incubadas durante 2x5 minutos con PBS pH 7.4 y luego 2x5 min. con PBS conteniendo 100mM glicina. Se trataron durante 15 minutos con PBS conteniendo Triton X-100 0.3% y se lavaron 2X5 min con PBS. Posteriormente fueron permeabilizadas durante 30 min a 37°C con tampón TE (Tris-HCL 100 mM y EDTA 50 mM, pH 8.0) conteniendo 1µg/ml de Proteinasa K libre de RNasas. Luego fueron fijadas durante 5 min a 4°C con PBS conteniendo 4% de paraformaldehído y lavadas 2x5 min con PBS. Las secciones fueron luego acetiladas con tampón TEA (trietanolamina) 0,1M, pH 8.0 durante 2x5 min , conteniendo 0.25% de anhídrido acético. Posteriormente se incubaron a 37°C durante 10 min con tampón de prehibridación (4x SSC conteniendo 50% de formamida desionizada) (1 x SSC= 150 mM NaCl, 15 mM citrato sódico, pH 7.2).

- **Hibridación “*In situ*”**

Cada sección se cubrió con 30 µl de tampón de hibridación (40% de formamida desionizada, 10% de sulfato de dextrano, 1x de solución de Denhardt (0.02% Ficoll, 0.02% polivinilpirrolidona, 10 mg/ml de albúmina de suero bovina libre de RNasa) para digerir la sonda unida inespecíficamente, 4x SSC, 10 mM DTT, 1mg/ml yeast t-RNA y 1mg/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado y fragmentado mecánicamente) conteniendo 7µl de la sonda correspondiente ($\alpha 2$, $\alpha 3$ ó $\beta 3$), (aproximadamente 0.5 µg/ml de sonda), se cubrieron con parafilm y se incubaron a 42°C durante 12 horas en cámara húmeda.

- **Posthibridación**

Las secciones se sumergieron 2x10 min en 2xSSC a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron 2x15 min en 2xSSC y 2x15 min en 1xSSC en baño a 37°C en agitación. Luego se incubaron durante 30 min a 37°C en tampón NTE (500 mM NaCl, 10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0)

conteniendo 20 $\mu\text{g/ml}$ de RNasa A. Finalmente se lavaron 2x30 min con 0.1xSSC en baño a 37°C en agitación.

- **Detección inmunológica**

Las secciones se lavaron en agitación 2 x10 minutos con tampón 1 (100mM Tris-HCl pH 7.5 y 150 mM NaCl) y se cubrieron con la solución de bloqueo (tampón 1 con 0.1% de Triton X-100 y 2% de suero normal de carnero-Sigma). Luego se incubaron durante 2 horas en cámara húmeda en tampón 1 conteniendo 0.1% de triton X-100, 1% de suero normal de carnero y el anticuerpo anti -DIG-fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim) a una concentración de 1/1000. Una vez terminada la incubación con el anticuerpo las secciones se lavaron 2x10 minutos con el tampón 1 y se incubaron durante 10 minutos en tampón 2 (100mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl y 50 mM MgCl_2).

Luego se cubrieron con 200 μl de la solución de color y se incubaron durante 8-12 horas en cámara húmeda y oscuridad. La solución de color se compone de 10 ml de tampón 2, 45 μl de solución nitroazul tetrazolium (NBT) (75 mg NBT/ml en 70% de dimetilformamida), 35 μl de solución 5-IIIbromo-4-cloro-3-indol-fosfato (50 mg de X-fosfato/ml en 100% de dimetilformamida) y 1mM (2.4 mg/10ml) de levamisol.

Cuando el color fue óptimo la reacción se paró con el tampón 3 (10mM Tris-HCl pH 8.1 y 1mM de EDTA). Finalmente las secciones se lavaron varias veces con agua destilada y se montaron para ser vistas al microscopio óptico Olympus BX-50.

RESULTADOS

1.- INMUNOLocalIZACIÓN DE LA Na,K-ATPasa EN CARTÍLAGO ARTICULAR HUMANO SANO Y AFECTO DE OSTEOARTROSIS Y ARTRITIS REUMATOIDE.

El estudio se llevó a cabo mediante inmunohistoquímica por fluorescencia indirecta y por el método avidina-biotina-peroxidasa sobre cortes de criostato de cartílago articular humano fetal, adulto normal, afecto de osteoartrosis y afecto de artritis reumatoide.

- **En cartílago humano fetal**

El cartílago fetal aparece como un típico foco mesenquimatoso, con gran cantidad de células de aspecto indiferenciado de morfología estrellada con prolongaciones finas y una matriz todavía escasa. Sólo se observa una célula por condrón y no aparece espacio lacunar entre la célula y la pared del condrón.

Todos los condrocitos fetales humanos muestran intensa inmunoreactividad para las isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de la subunidad α utilizando la inmunofluorescencia (Figura 18) y para las isoformas $\beta 1$ y $\beta 2$ de la subunidad β de la Na,K-ATPasa utilizando el método de avidina-biotina-peroxidasa (Figura 19). La intensidad del marcaje es homogénea en toda la célula. No observamos variaciones en los niveles de expresión de las diferentes isoformas de cada subunidad. Queremos recordar que no hemos valorado la presencia de la isoforma $\beta 3$ en este tejido ya que no existen actualmente anticuerpos que reconozcan esta proteína en humanos.

Figura 18: Localización inmunohistoquímica de las isoformas de la subunidad α de la Na, K-ATPasa en cartílago articular de feto humano. En los paneles **A**, **B** y **C** se muestra la inmunotinción por avidina-biotina-peroxidasa de las isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ respectivamente, en secciones de la articulación metacarpofalángica de un feto humano de 23 semanas. Se observa inmunoreactividad global en todas las células, que aparecen rodeadas de un halo claro de matriz pericelular. 570X.

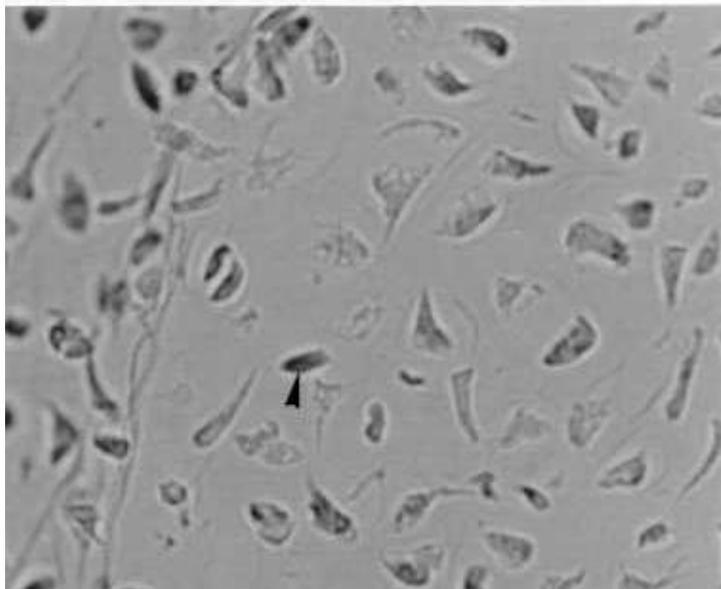
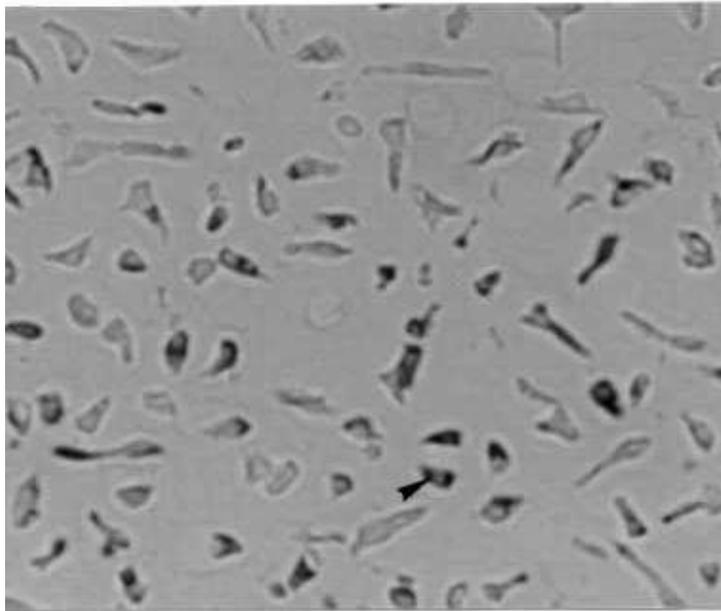
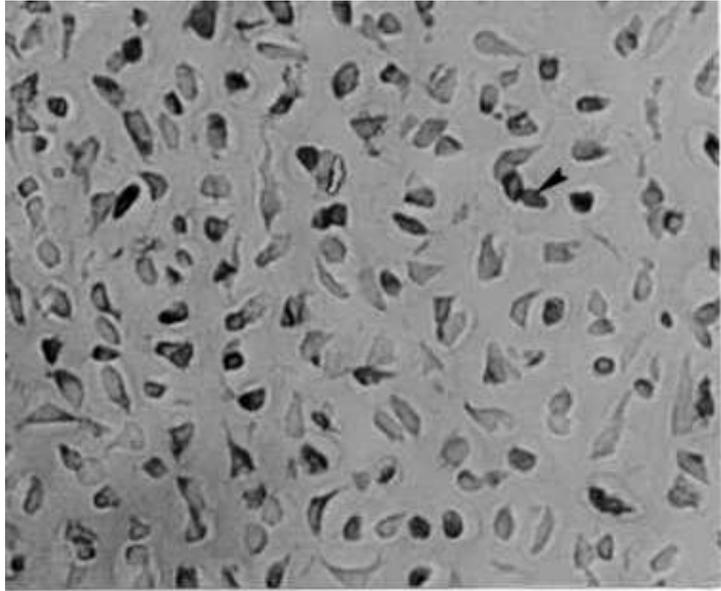
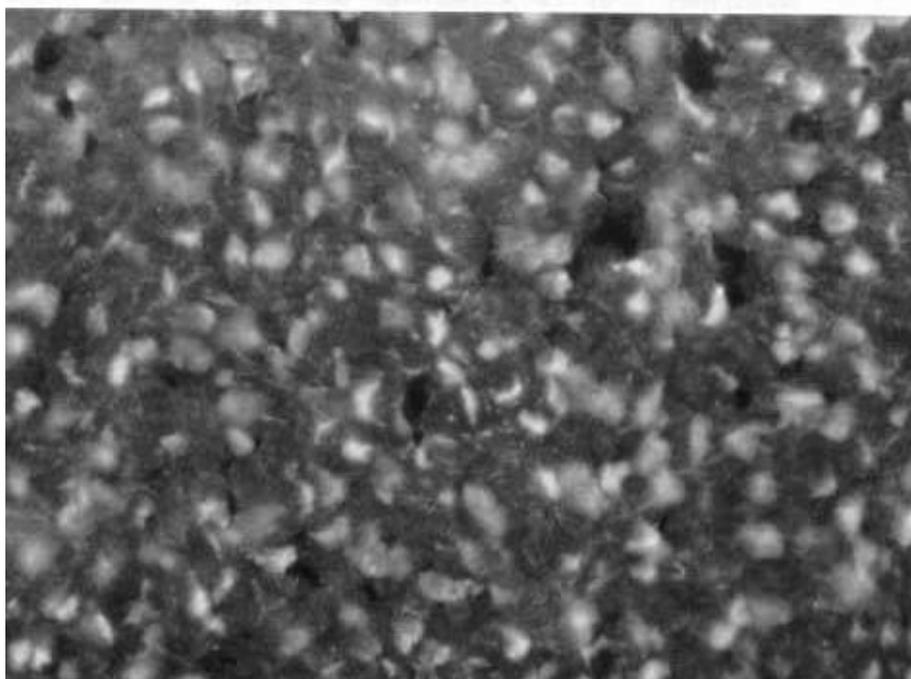
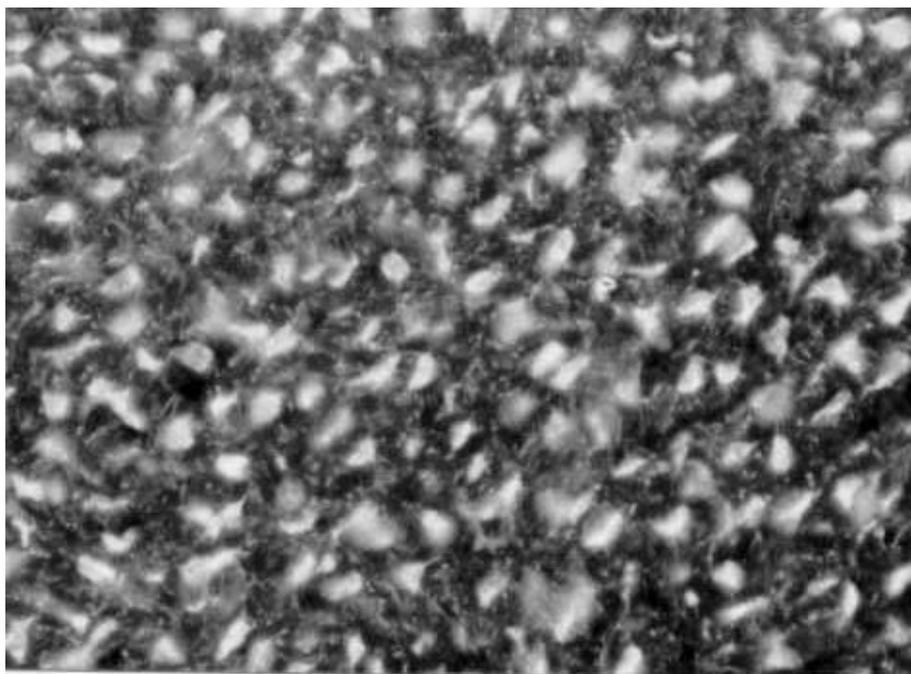


Figura 19: Inmunolocalización de las isoformas de la subunidad β de la Na, K-ATPasa en cartílago articular de feto humano. Los paneles **A** y **B** muestran la localización por inmunofluorescencia de las isoformas $\beta 1$ y $\beta 2$, respectivamente, en secciones de $5\mu\text{m}$ de cartílago de epífisis de la tibia de un feto humano de 22 semanas. Se observa una intensa inmunopositividad en todas las células para las dos isoformas. 570X.



- **En cartílago articular humano adulto sano y afecto de osteoartrosis y artritis reumatoide.**

El cartílago humano en el adulto sano, presenta escasas células aisladas de morfología esférica que aparecen incluidas en lagunas. Ocasionalmente, ver tabla IX, se observa la presencia de nidos formados por dos o más células por condrón. La matriz extracelular del cartílago sano aparece densa y homogénea, con aumento de la densidad en la región pericelular.

La matriz del cartílago de pacientes afectados de osteoartrosis aparece más heterogénea, con menos fluorescencia intrínseca de la observada en el cartílago sano y las lagunas condrocitarias presentan mayor número de células, de tres a cinco por condrón, pero de menor tamaño (tabla IX).

El cartílago de los pacientes afectados de artritis reumatoide presenta una mayor proporción de matriz, de aspecto mixoide con zonas de variable densidad y fluorescencia intrínseca, donde aparecen células de aspecto regresivo con la superficie irregular, no se observa espacio lacunar pericelular y el número de células por condrón predominante es dos (tabla IX).

	Normal	Osteoartrosis	Artritis Reumatoide
Células/campo	18 ± 1	27 ± 2	34 ± 1
Condrones/campo	16 ± 2	18 ± 2	34 ± 1
m.f. células/condrón	1 - 2	3 ± 1	1

Tabla IX: Parámetros de celularidad del cartílago articular sano y enfermo. El número de células se obtuvo contando con un objetivo de 25x (m.f.células=número de células más frecuente).

Tanto los condrocitos del cartílago adulto humano sano y como los de los afectados de osteoartrosis y artritis reumatoide muestran inmunoreactividad para la isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 1$ y $\beta 2$ de la Na,K-ATPasa, siendo esto evidenciable por los dos métodos de inmunohistoquímica que hemos utilizado:

inmunofluorescencia (Figuras 20, 21, 22, 23 Y 24) o avidina-biotina-peroxidasa. En los controles sin el primer anticuerpo o sin el segundo anticuerpo no se observa señal específica. Para la isoforma $\beta 2$ se realizaron experimentos de competición con el antígeno, desapareciendo la señal específica (Fig. 25).

Observamos un leve aumento en la intensidad relativa de la inmunoreactividad para las isoformas $\alpha 1$ y $\beta 1$ respecto a las demás isoformas de Na,K-ATPasa, tanto en el cartílago control como en el afecto por las dos enfermedades estudiadas.

No hemos observado variaciones en la intensidad relativa de la inmunoreactividad para las tres isoformas de la subunidad α entre el cartílago sano y el afectado por las dos patologías ni tampoco para las dos isoformas de la subunidad β .

En todas las secciones de cartílago, control y patológico, en las que se realizó inmunohistoquímica por fluorescencia se observa marcaje pericondrocitario inespecífico y un fondo difuso en la matriz extracelular, seguramente debido a la fluorescencia intrínseca peculiar de este tipo de tejido, que no desaparece cuando el anticuerpo secundario no está presente (Figura 26)

Figura 20: Localización por inmunofluorescencia indirecta de la isoforma $\alpha 1$ de la subunidad α de la Na, K-ATPasa en el cartílago humano adulto sano y patológico.

Panel A: localización inmunohistoquímica de la isoforma **a1** en secciones de cartílago de la cabeza femoral derecha de un control, mujer de 53 años, sin patología osteocartilaginosa previa. La cabeza de flecha señala el marcaje específico del condrocito dentro de su laguna condrocitaria. Las flechas muestran la tinción difusa inespecífica pericondrocitaria debida a la fluorescencia intrínseca del tejido.

Panel B: inmunolocalización de la isoforma **a1** en secciones de cartílago del cóndilo femoral lateral izquierdo de una paciente de 69 años afecta de osteoartrosis. La cabeza de flecha muestra la inmunopositividad específica de los condrocitos localizados dentro un condrón.

Panel C: localización de la isoforma **a1** en cortes de cartílago obtenido de la cabeza femoral izquierda de una paciente de 64 años afecta de artritis reumatoide (cabeza de flecha). 570X.

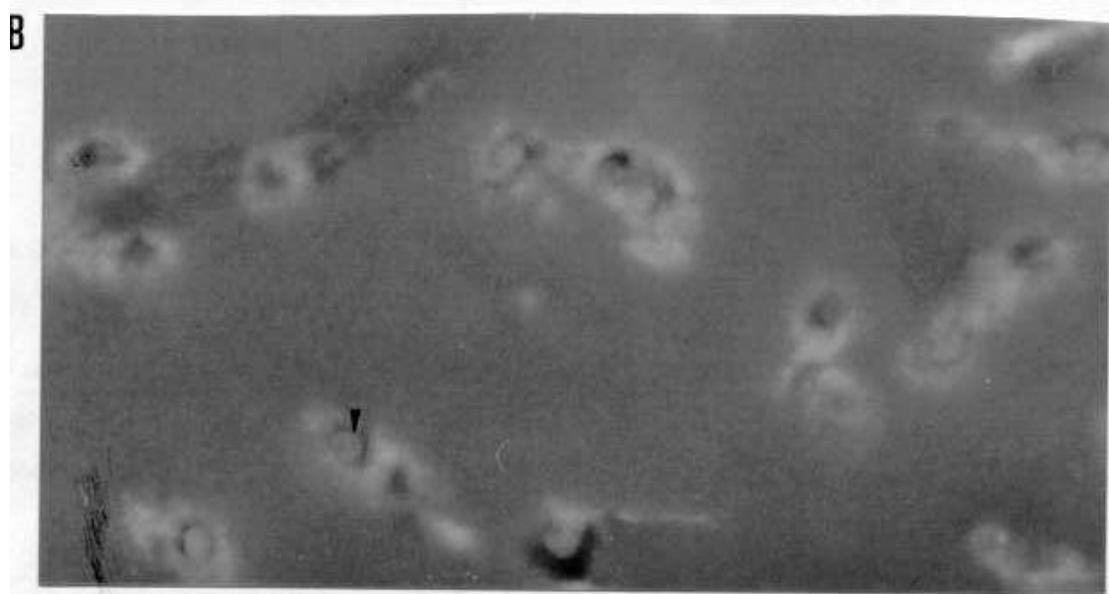
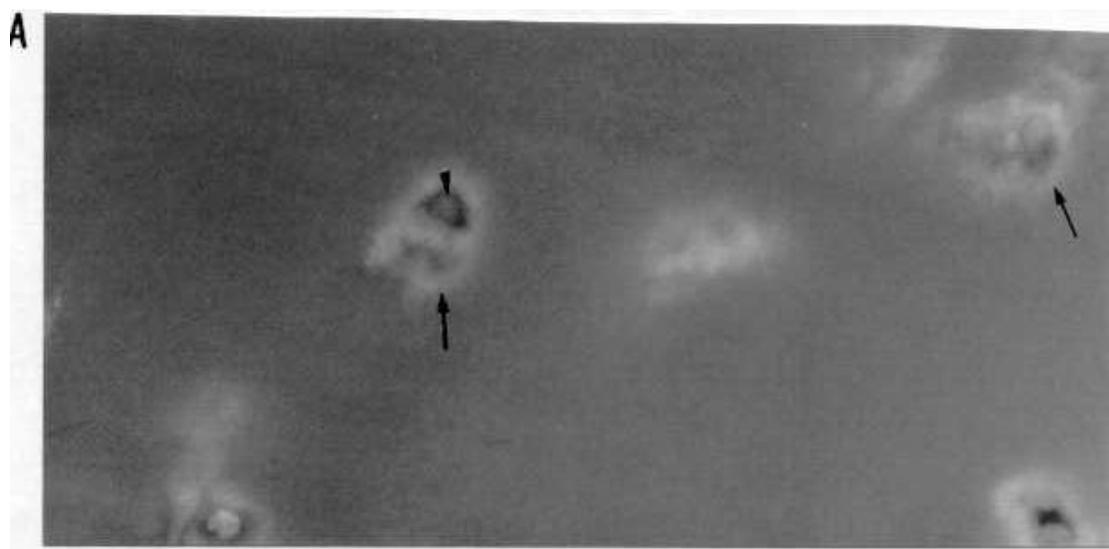


Figura 21: Inmunofluorescencia indirecta para la isoforma $\alpha 2$ de la subunidad α de la Na, K-ATPasa en secciones de cartílago humano adulto sano y patológico.

El panel A muestra la localización inmunohistoquímica de la isoforma $\alpha 2$ en cartílago obtenido de la cabeza femoral derecha de un control, varón de 32 años sin afectación osteocartilaginosa. La cabeza de flecha muestra la inmunopositividad del condrocito para esta isoforma.

En el panel B se muestra la inmunopositividad para la isoforma $\alpha 1$ de los condrocitos localizados dentro del condrón en cartílago del cóndilo femoral medial izquierdo de un paciente de 73 años afecto de osteoartrosis.

Panel C: localización inmunohistoquímica (cabeza de flecha) de la isoforma $\alpha 2$ en cartílago obtenido de la cabeza femoral izquierda de una paciente de 54 años afectada de artritis reumatoide. 570X.

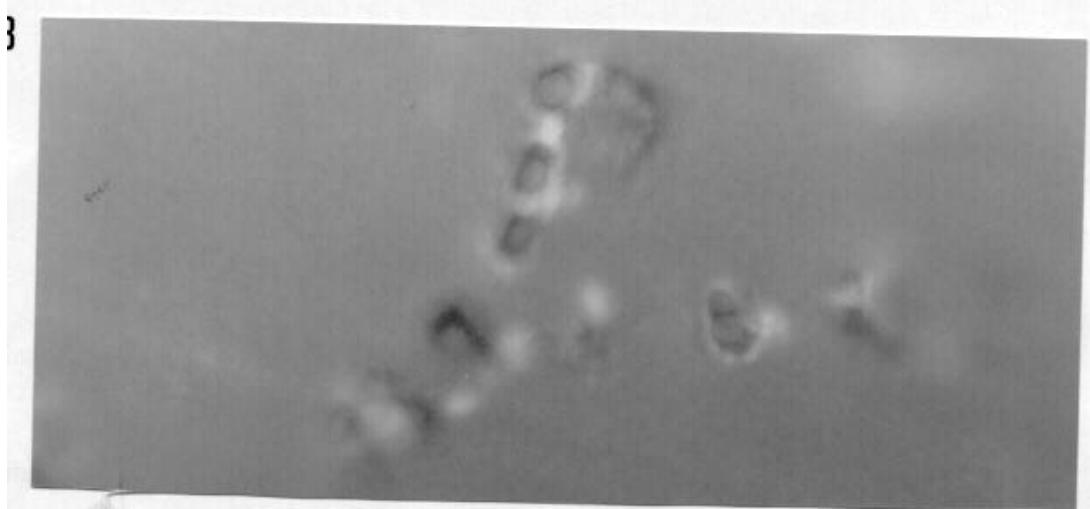
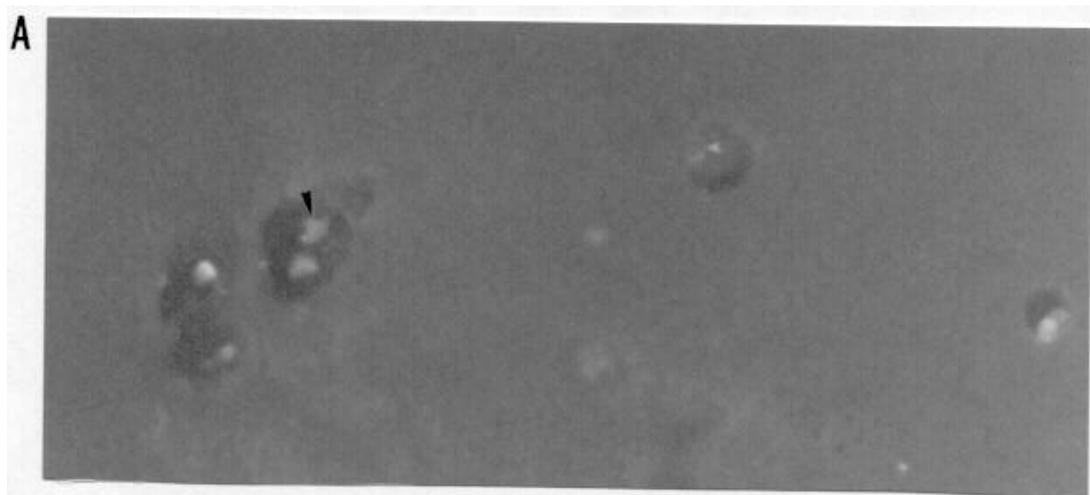


Figura 22: Inmunofluorescencia indirecta para la isoforma $\alpha 3$ de la subunidad α de la Na, K-ATPasa en el cartílago humano adulto sano y patológico.

Panel A: localización en secciones de cartílago obtenido del cóndilo femoral lateral derecho de un varón de 41 años sin patología osteocartilaginosa previa.

En el panel B vemos inmunopositividad en los condrocitos para la isoforma **a3** en secciones de cartílago de la cabeza femoral izquierda de una paciente 80 años afecta de osteoartritis.

El panel C presenta la localización inmunohistoquímica de la isoforma **a3** en cortes de cartílago obtenido de la cabeza femoral izquierda de una paciente de 64 años afecto de artritis reumatoide. 570X.



Figura 23: Inmunolocalización por inmunofluorescencia indirecta de la isoforma $\beta 1$ de la subunidad β de la Na, K-ATPasa en secciones de cartílago humano adulto sano y enfermo.

*A, cartílago obtenido de la cabeza femoral derecha de una mujer de 29 años sin patología osteocartilaginosa, la cabeza de flecha muestra la inmunopositividad específica del condrocito para la isoforma **$\beta 1$** .*

*B, inmunoreactividad celular para la isoforma **$\beta 1$** en cartílago del cóndilo femoral medial izquierdo de una paciente de 73 años afecta de osteoartritis.*

*C, cartílago obtenido de la cabeza femoral derecha de una paciente de 58 años afecta de artritis reumatoide en el que se observa inmunoreactividad específica celular para **$\beta 1$** (cabeza de flecha). 570X.*

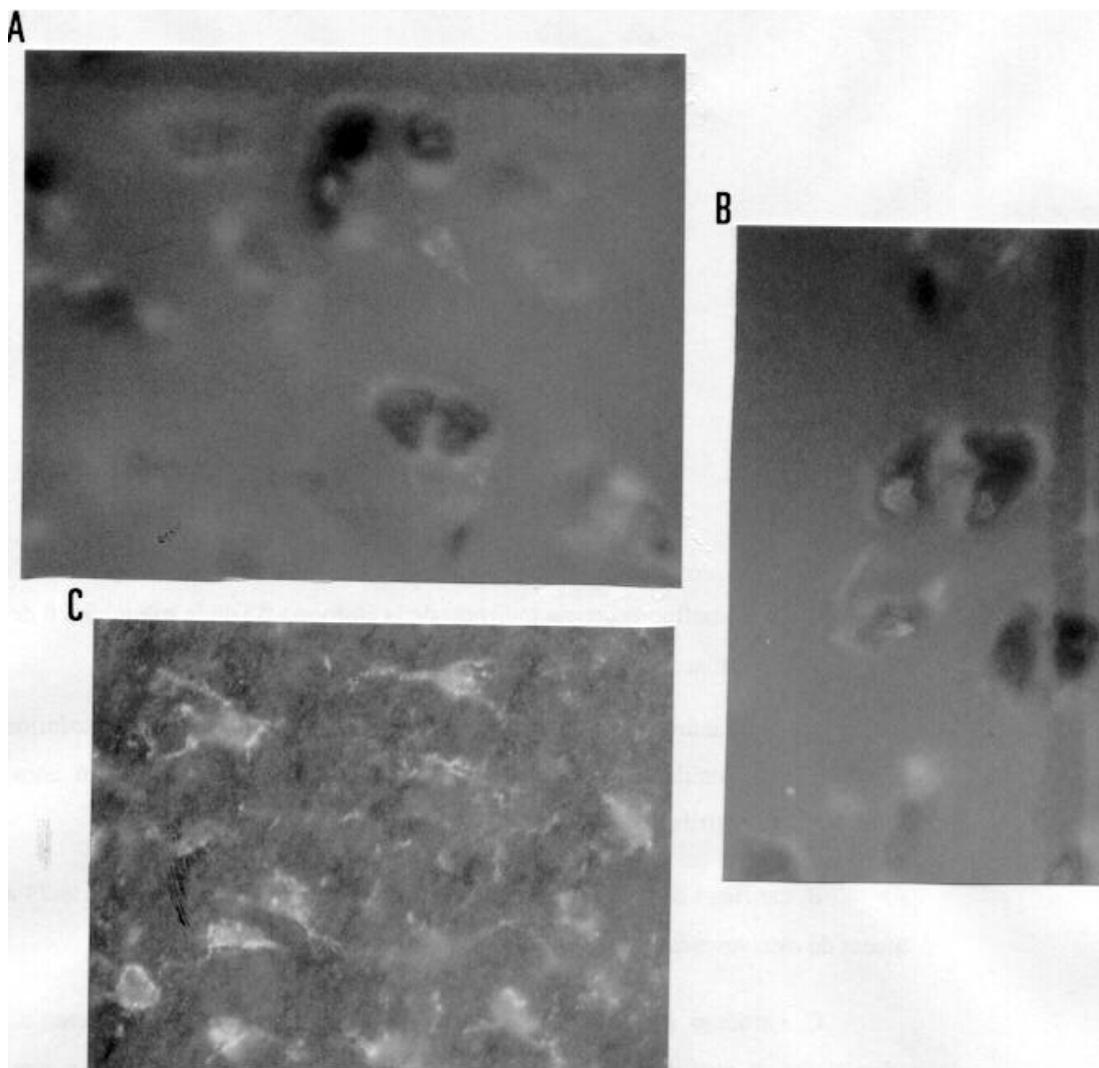


Figura 24: Inmunofluorescencia indirecta de la isoforma $\beta 2$ de la subunidad β de la Na, K-ATPasa en secciones de cartílago humano adulto sano y patológico.

*Panel A: inmunopositividad específica de los condrocitos para la isoforma **b2** en cartílago obtenido de la cabeza femoral derecha de un varón de 36 años sin patología osteocartilaginosa previa.*

***B**, cartílago del cóndilo femoral medial izquierdo de una paciente de 73 años afectada de osteoartritis con inmunoreactividad celular para la isoforma **b2**.*

***C**, cartílago obtenido de la cabeza femoral derecha de una paciente de 49 años afectada de artritis reumatoide con señal fluorescente específica celular para **b2**. 570X.*

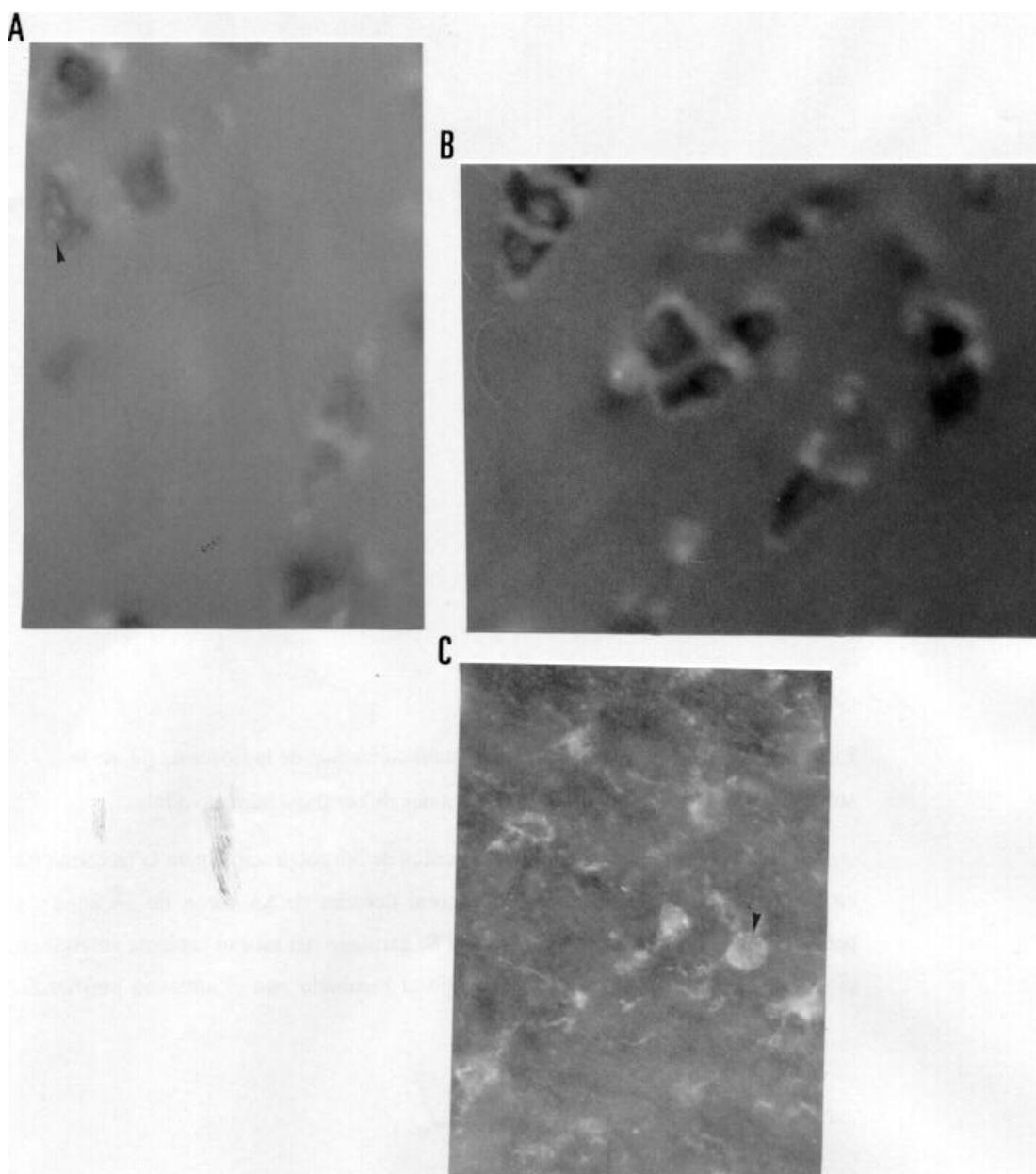


Figura 25: Experimento control de inmunolocalización de la isoforma β_2 de la subunidad β de la Na, K-ATPasa en secciones de cartílago humano adulto.

Panel A: inmunopositividad específica de los condrocitos para la isoforma **β_2** en cartílago obtenido de la cabeza femoral derecha de un varón de 36 años sin patología osteocondilaginosa previa. *Panel B:* cartílago del mismo paciente anterior en el que la señal específica ha desaparecido al incubarlo con el antígeno purificado.

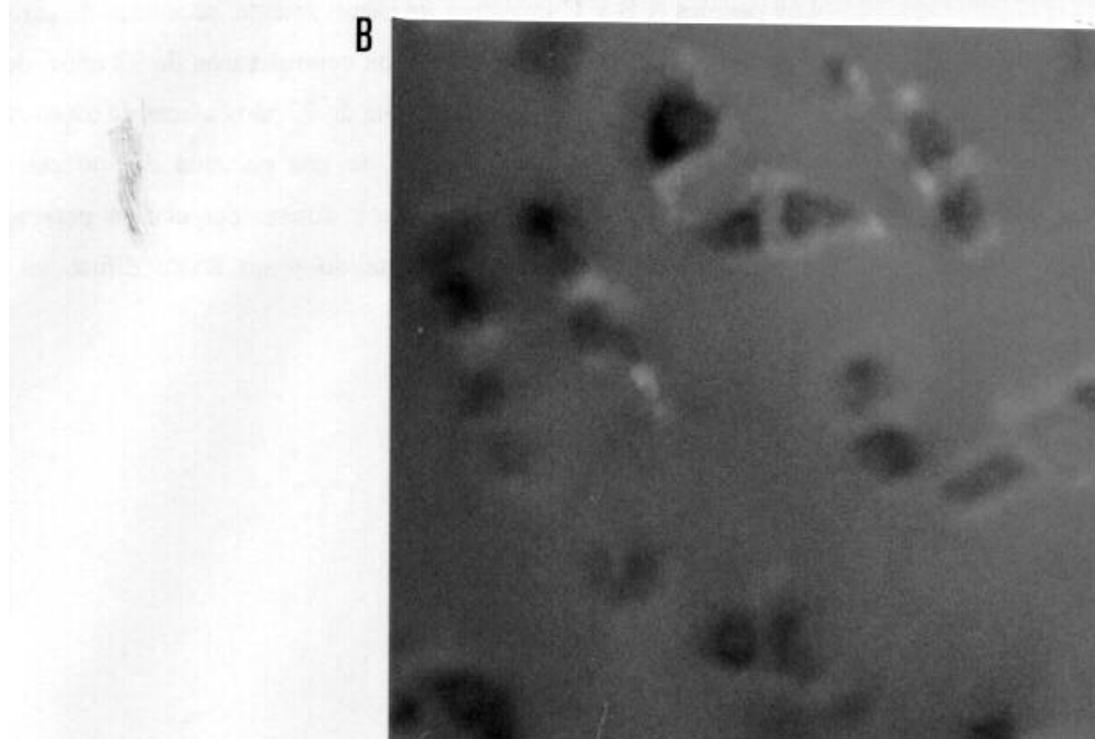
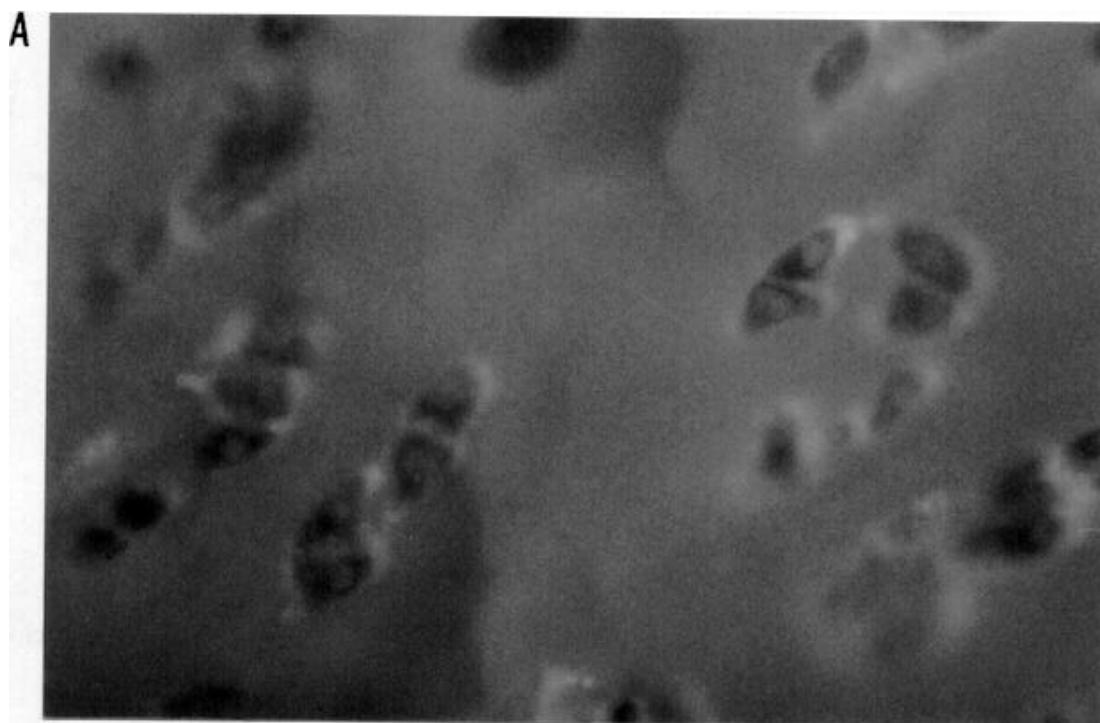
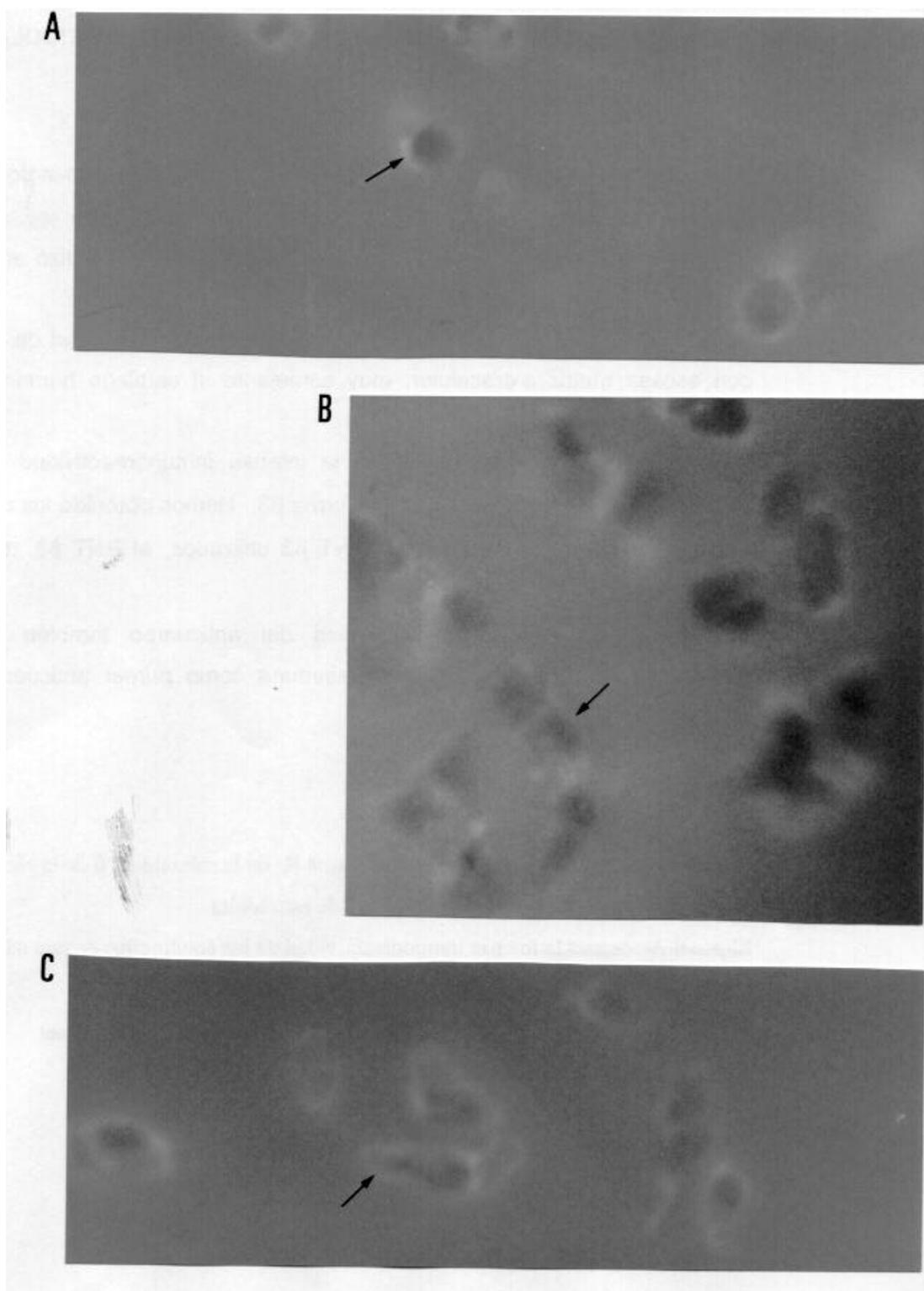


Figura 26: Controles negativos de inmunofluorescencia indirecta en secciones de cartílago humano adulto sano y enfermo.

Los paneles A,B y C muestran, respectivamente, secciones de cartílago sano obtenidos del cóndilo femoral derecho de un control varón de 32 años, de cartílago de la cabeza femoral derecha de una paciente de 77 años afecta de osteoartrosis y de cartílago de la cabeza femoral izquierda de una paciente de afecta de artritis reumatoide. Las flechas muestran la tinción difusa inespecífica pericondrocitaria debida a la fluorescencia intrínseca del tejido y un fondo difuso en la matriz extracelular. 570X.



2.- INMUNOLocalIZACIÓN DE LA ISOFORMA $\beta 3$ DE LA SUBUNIDAD β DE LA Na,K-ATPasa EN CARTÍLAGO ARTICULAR DE RATA.

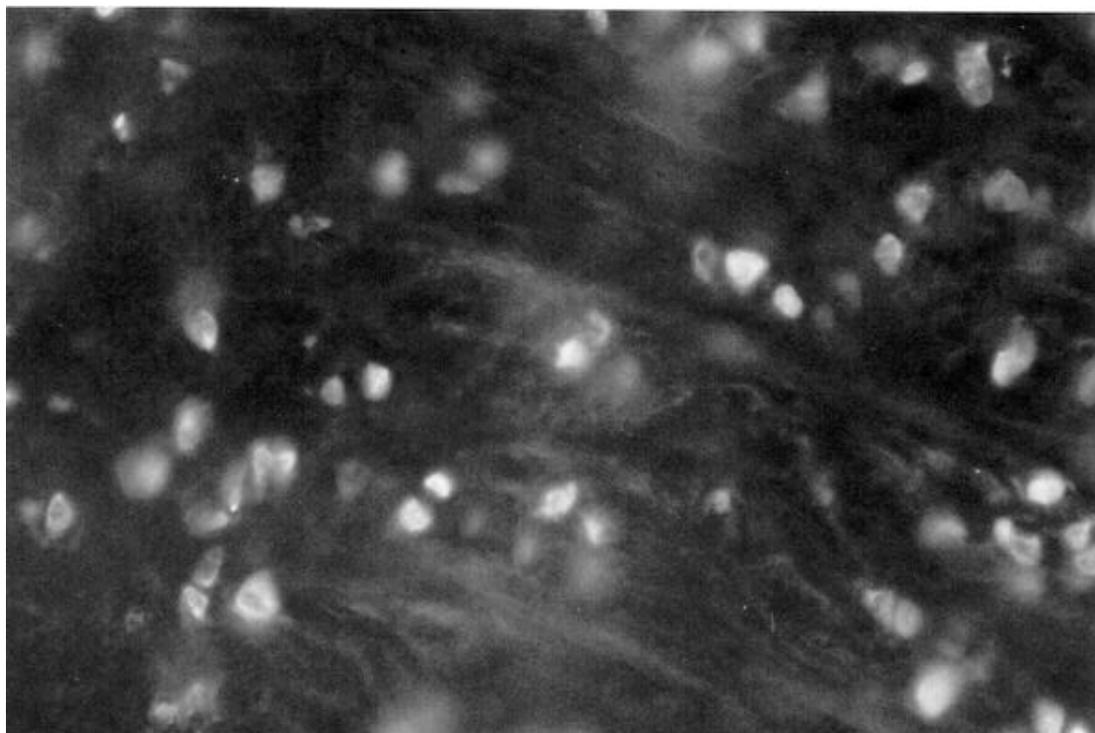
No se dispone actualmente de anticuerpo específico anti-isoforma $\beta 3$ de Na,K-ATPasa para la especie humana, por lo que el estudio inmunohistoquímico en secciones de cartilago articular se realizó en tejido de rata.

El cartílago articular de rata adulta presenta gran cantidad de células con escasa matriz extracelular, muy semejante al cartílago humano fetal aunque con células más diferenciadas.

En la figura 27 observamos la intensa inmunoreactividad de los condrocitos de rata adulta para la isoforma $\beta 3$. Hemos obtenido los mismos resultados con los dos antisueros RNT $\beta 3$ utilizados, el RNT $\beta 3$ 163 y el RNT $\beta 3$ 164.

Para confirmar la especificidad del anticuerpo también hemos realizado controles con el suero preimmune como primer anticuerpo, no observándose marcaje específico.

Figura 27: Inmunolocalización de la isoforma $\beta 3$ de la subunidad β de la Na, K-ATPasa en secciones de cartílago articular de rata adulta. Se observa una intensa inmunoreactividad de los condrocitos de rata adulta para la isoforma $\beta 3$, utilizando el antisuero RNT $\beta 3$ 163.



3.- HIBRIDACIÓN “IN SITU”

Utilizando la técnica de hibridación “*in situ*” para las isoformas $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de la subunidad a y para la isoforma $\beta 3$ de la subunidad b de Na,K-ATPasa, observamos en todos los condrocitos del cartílago articular humano control una fuerte tinción específica con las sondas complementarias a los mRNA de las tres isoformas estudiadas (panel A de la figura 28 y paneles A y C de la figura 29). Esta señal es homogénea en todas las células de las muestras.

Para las tres isoformas estudiadas con esta técnica, los controles con sondas de igual secuencia al mRNA resultaron negativos no observándose tinción específica (panel B de la figura 28 y paneles C y D de la figura 29).

También realizamos experimentos control usando usando muestras tratadas previamente con RNasa A o muestras a las que no se añadió sonda o en las que se omitió el anticuerpo anti-digoxigenina, no observándose señal específica celular.

Figura 28: Hibridación “in situ” para la detección del mRNA de la isoforma $\alpha 2$ de Na,K-ATPasa en secciones de cartílago articular humano.

El panel **A** muestra una fuerte tinción específica homogénea con la sonda complementaria al mRNA de la isoforma $\alpha 2$ en todos los condrocitos del cartílago obtenido de la cabeza femoral de un paciente control de 34 años.

El panel **B** muestra el control negativo con sonda de igual secuencia al mRNA de la isoforma $\alpha 2$ observándose ausencia de señal específica. 570X.

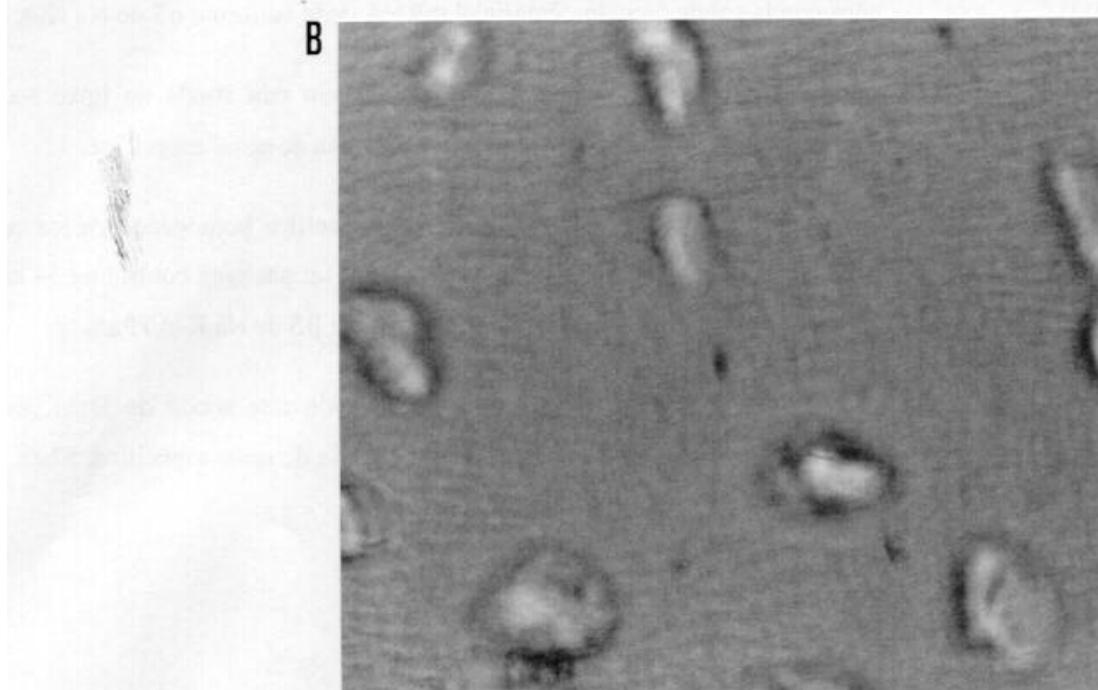
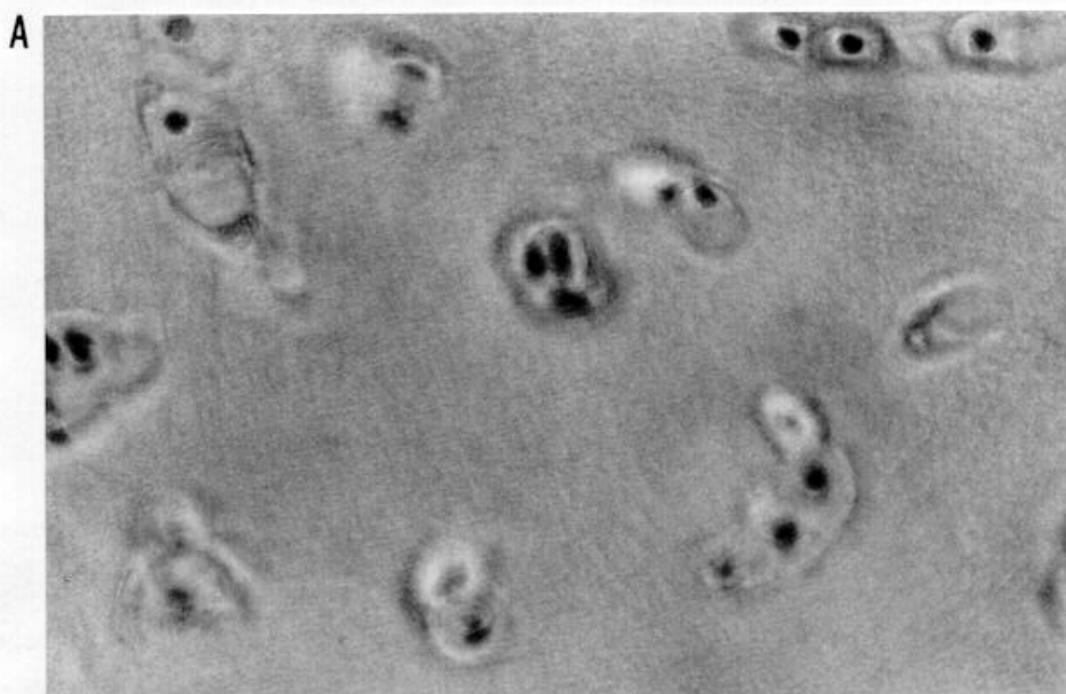


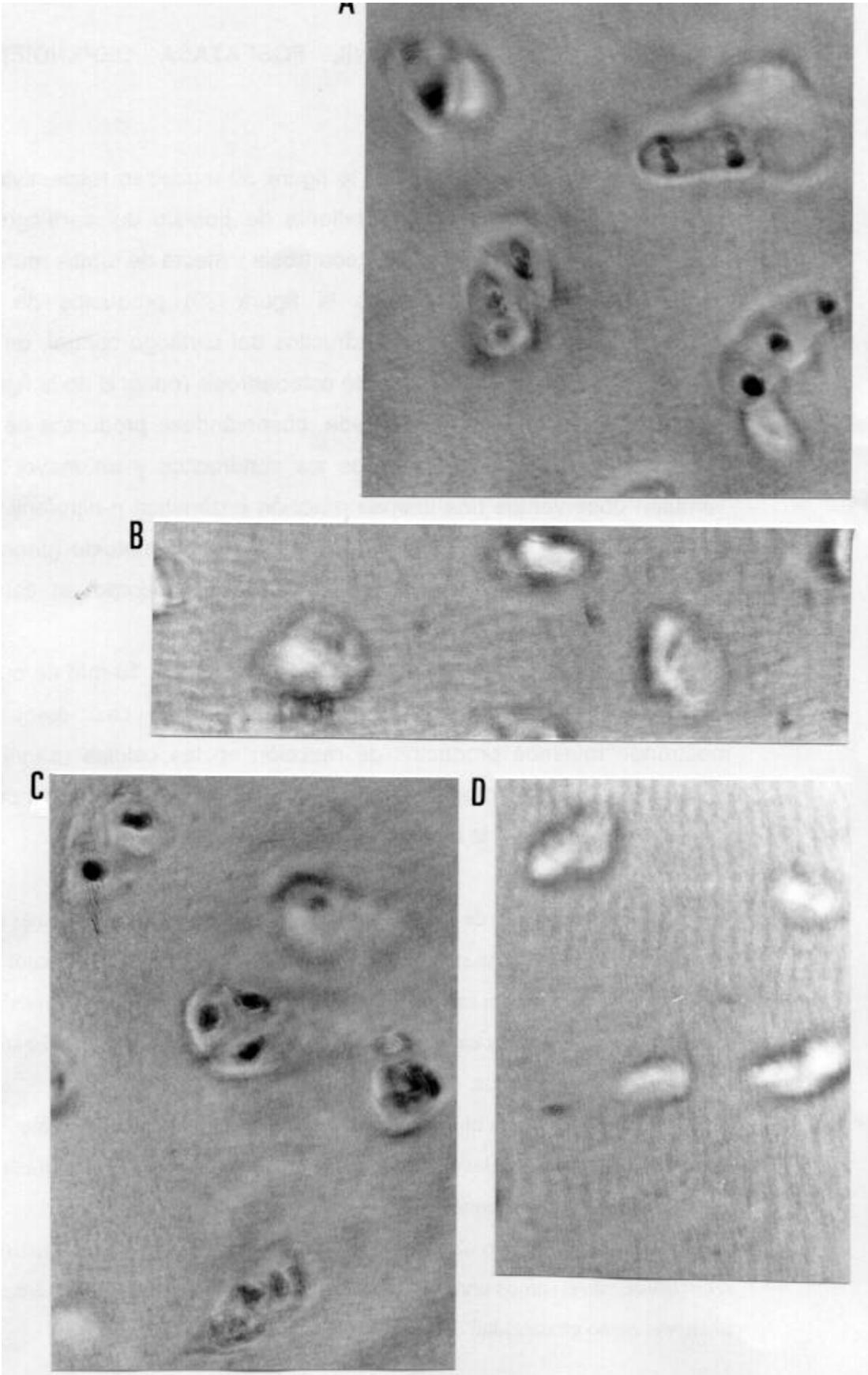
Figura 29: Hibridación “in situ” para la detección del mRNA de la isoforma $\alpha 3$ y $\beta 3$ de Na,K-ATPasa en secciones de cartilago articular humano.

El panel A muestra señal específica de hibridación homogénea en los condrocitos del cartílago obtenido de la cabeza femoral de un paciente control de 34 años con la sonda complementaria al mRNA de la isoforma a3 de Na,K-ATPasa.

El panel B muestra el control realizado con sonda de igual secuencia al mRNA de la isoforma a3 observándose ausencia de señal específica.

En el panel C observamos tinción específica homogénea en los condrocitos del cartílago obtenido de la cabeza femoral de un paciente control de 34 años con la sonda complementaria al mRNA de la isoforma b3 de Na,K-ATPasa.

El panel D muestra el control realizado con sonda de igual secuencia al mRNA de la isoforma b3 observándose ausencia de señal específica. 570X.



4.- ACTIVIDAD p-NITROFENIL FOSFATASA DEPENDIENTE DE POTASIO

Los paneles A, B y C de la figura 30 muestran respectivamente la actividad nitrofenilfosfatasa dependiente de potasio del cartílago articular humano adulto sano, afecto de osteoartrosis y afecto de artritis reumatoide.

Observamos (panel A de la figura 30) productos de reacción enzimática en algunos de los condrocitos del cartílago control, en cantidad intermedia. En el cartílago afecto de osteoartrosis (panel B de la figura 30) la actividad enzimática es mas elevada, observándose productos de reacción enzimática en prácticamente todos los condrocitos y en mayor cantidad. También observamos una intensa reacción enzimática p-nitrofenil fosfatasa en los condrocitos del cartílago afecto de artritis reumatoide (panel C de la figura 30), tanto en número de células positivas como en cantidad de productos de reacción.

En los controles realizados a los que se añadió 10 mM de ouabaína a la incubación, la reacción enzimática se inhibió casi completamente mostrando mínimos productos de reacción en las células (panel A de la figura 31). La reacción enzimática se vió completamente abolida cuando se suprimió el potasio de la incubación (panel B de la figura 31).

Figura 30: Localización de la actividad p-nitrofenil fosfatasa en secciones de cartílago articular humano sano y afecto de osteoartrosis y artritis reumatoide.

A, actividad p-NPPasa en cartílago obtenido de un varon de 31 años sin enfermedad osteoarticular, se observa cantidad media de productos de reacción enzimática en algunos de los condrocitos.

B, p-NPPasa en cartílago obtenido de una mujer de 68 años afecta de osteoartrosis, la actividad enzimática es elevada, se observan productos de reacción enzimática en prácticamente todos los condrocitos y en mayor cantidad.

C, p-NPPasa en cartílago obtenido de una mujer de 59 años afecta de artritis reumatoide, observamos una intensa reacción enzimática tanto en número de células positivas como en cantidad de productos de reacción. 570X.

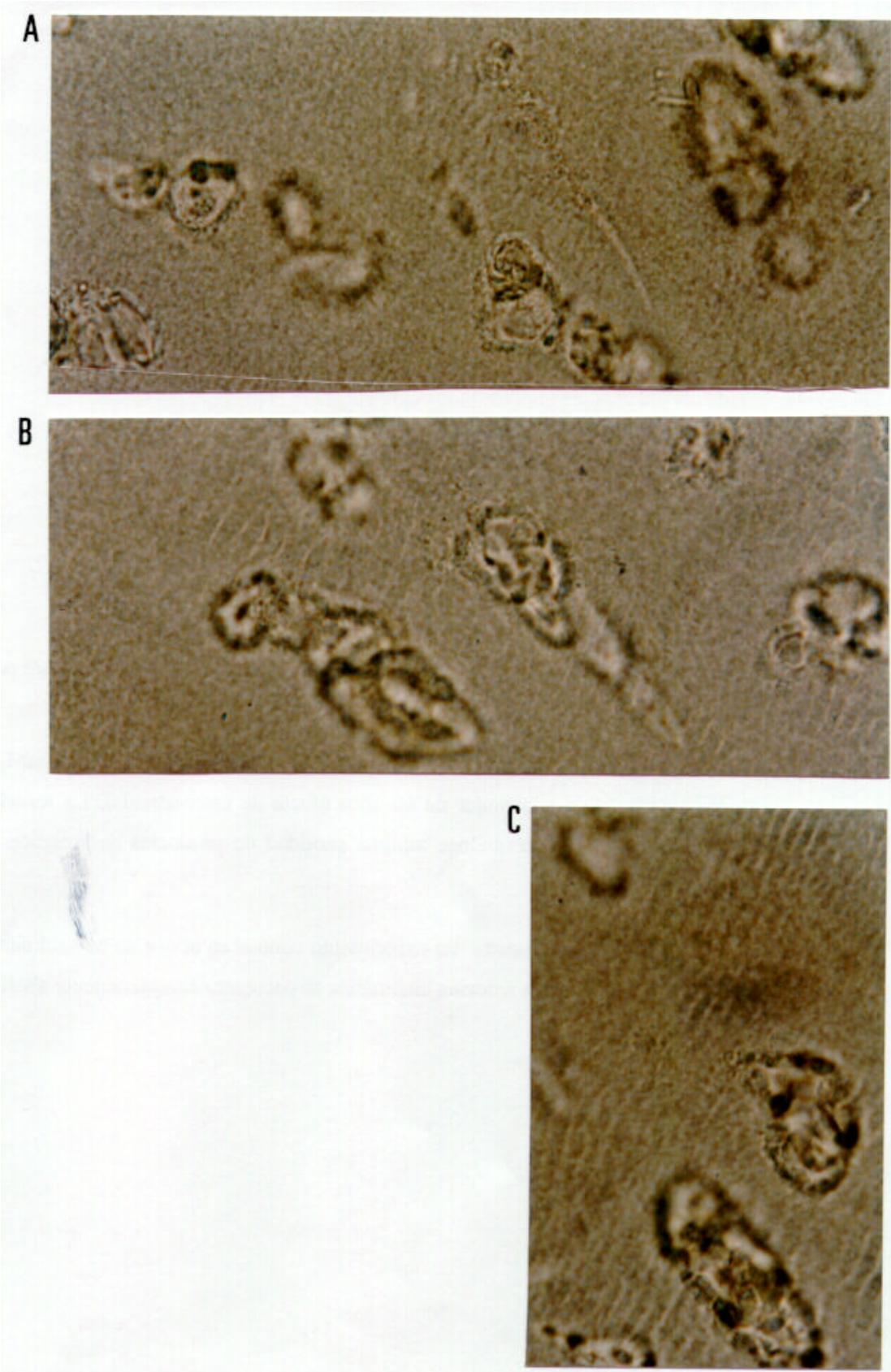
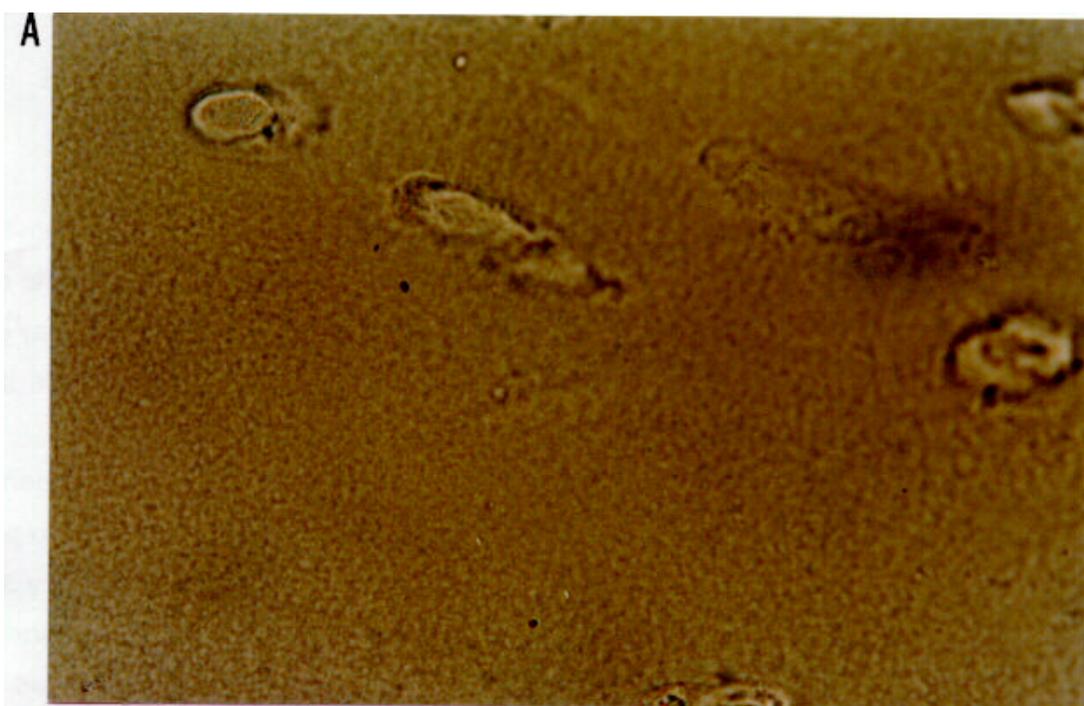


Figura 31: Experimentos control de actividad p-nitrofenil fosfatasa en secciones de cartílago articular humano.

A, experimento control en el que se ha añadido a la incubación 10 mM de ouabaína (cartílago de una mujer de 68 años afecta de osteoartritis). La reacción enzimática se reduce observándose mínima cantidad de productos de reacción en algunos condrocitos.

En el panel B se muestra un experimento control en el que se ha excluido el potasio de la incubación, la reacción enzimática se encuentra completamente abolida.
570X.



5.- INMUNOLocalización DEL CANAL EPITELIAR DE SODIO (ENaC) EN CARTÍLAGO ARTICULAR HUMANO SANO Y AFECTO DE OSTEOARTROSIS Y ARTRITIS REUMATOIDE.

La fluorescencia indirecta en cartílago articular adulto sano mostró inmunopositividad para las subunidades α y β del canal epitelial de sodio en los condrocitos (Figuras 32 y 33, paneles A), con una distribución regular en la membrana plasmática y con una localización homogénea en todas las regiones del cartílago.

En la artritis reumatoide, los condrocitos son intensamente inmunoreactivos para las subunidades α y β del canal epitelial de sodio por fluorescencia indirecta, según muestran los paneles C de las figuras 32 y 33. La inmunoreactividad de los condrocitos del cartílago afecto de artritis reumatoide es de mayor intensidad relativa que la que observamos en el cartílago sano, para las dos subunidades del canal epitelial de sodio.

La intensidad relativa de la inmunoreactividad para la subunidad α es mayor de la observada para la subunidad β , tanto en el cartílago control como en el afecto de artritis reumatoide.

Sin embargo la inmunoreactividad específica que observamos en los condrocitos del cartílago afecto de artrosis es indetectable para ambas subunidades (paneles B de las figuras 32 y 33). La ausencia de señal no se debe a daños en el tejido u otros artefactos, ya que las mismas preparaciones presentaron inmunoreactividad cuando se realizó un segundo marcaje con el anticuerpo monoclonal McK1, que detecta la isoforma $\alpha 1$ de Na,K-ATPasa (figura 34). Aparece, sin embargo, un marcaje difuso inespecífico pericondrocitario debido a la fluorescencia intrínseca de este tejido.

Para confirmar la positividad de estos datos y evitar los problemas de fluorescencia intrínseca en la misma gama, localizamos ambas subunidades por el método avidina-biotina-peroxidasa. Los resultados obtenidos son idénticos a los observados con la inmunofluorescencia indirecta, las figuras 35 y 36, una vez más nos indican que los condrocitos del cartílago sano o afecto

de artritis reumatoide muestran inmunotinción específica para las subunidades α y β de ENaC, de mayor intensidad en la artritis reumatoide y, contrariamente, los condrocitos del cartílago afecto de osteoartrosis son inmunonegativos utilizando los mismos anticuerpos .

En dos secciones de tejido procedentes de cartílago osteoartrósico sí observamos inmunoreactividad específica para las dos subunidades de ENaC estudiadas, apareciendo ésta exclusivamente en la región superficial, permaneciendo inmunoreactivos los condrocitos de las regiones intermedias como en el resto de las secciones sobre las que se realizó la técnica (figura 42).

Figura 32: Inmunolocalización por fluorescencia indirecta de la subunidad α del canal epitelial de sodio en el cartílago humano adulto sano y enfermo.

El panel **A** muestra la localización de la subunidad α en secciones de cartílago obtenido del cóndilo femoral lateral derecho de un control, varón de 38 años.

Panel **B**, no se observa inmunoreactividad celular específica para la subunidad α en secciones de cartílago, esta fotografía fue tomada de la cabeza femoral derecha de una paciente 76 años afecta de osteoartrosis, sólo vemos un marcaje pericondrocitario difuso, inespecífico, debido a la fluorescencia intrínseca del tejido (flecha).

En **C** vemos la señal que nos indica la localización de la subunidad α en cortes de cartílago obtenido de la cabeza femoral izquierda de una paciente de 64 años afecta de artritis reumatoide. 570X.

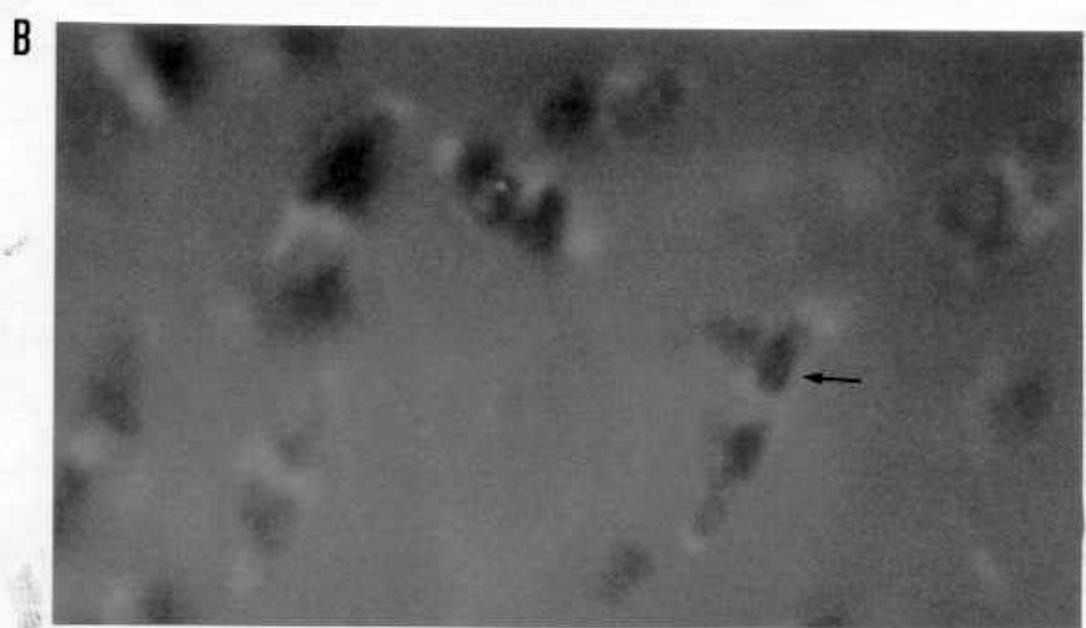
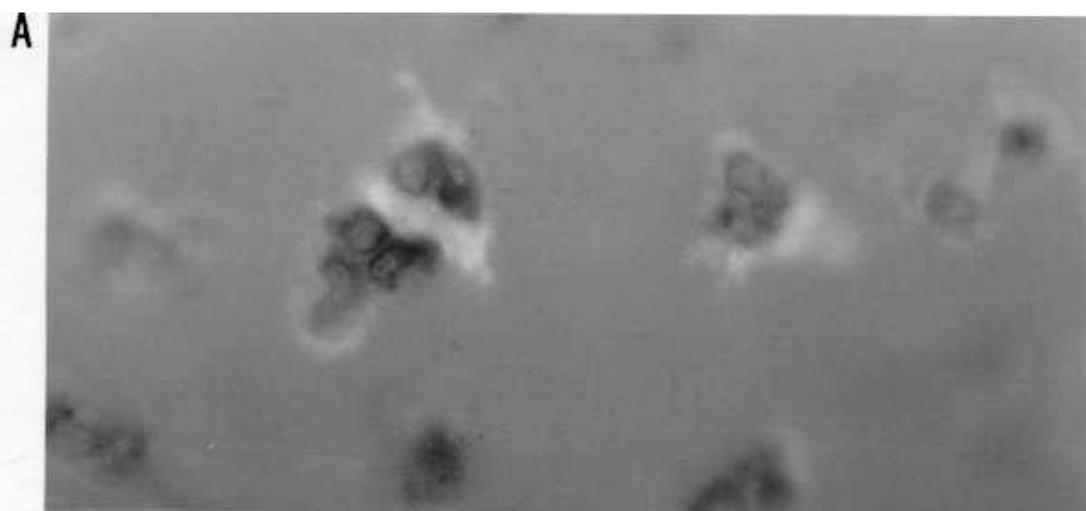


Figura 33: Localización por inmunofluorescencia indirecta de la subunidad β del canal epitelial de sodio en el cartílago humano adulto sano y patológico.

A, la cabeza de flecha señala regiones de inmunopositividad específica del condrocito dentro de su laguna condrocitaria en secciones de cartílago obtenido de la cabeza femoral derecha de un control, varón de 36 años.

*B, no se observa inmunoreactividad específica celular en la inmunolocalización de la subunidad **b** en secciones de cartílago (muestra obtenida de la meseta tibial izquierda de una paciente de 69 años afecta de osteoartritis). El marcaje pericelular es debido a la fluorescencia intrínseca del tejido.*

*El panel C presenta la localización inmunohistoquímica de la subunidad **b** en cortes de cartílago obtenido de la cabeza femoral izquierda de una paciente de 58 años afecta de artritis reumatoide. Observamos una intensa inmunoreactividad específica celular (cabeza de flecha). 570X.*



B

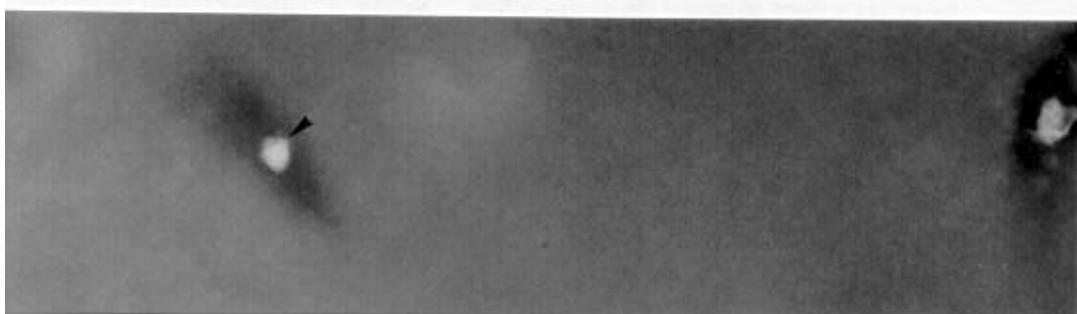
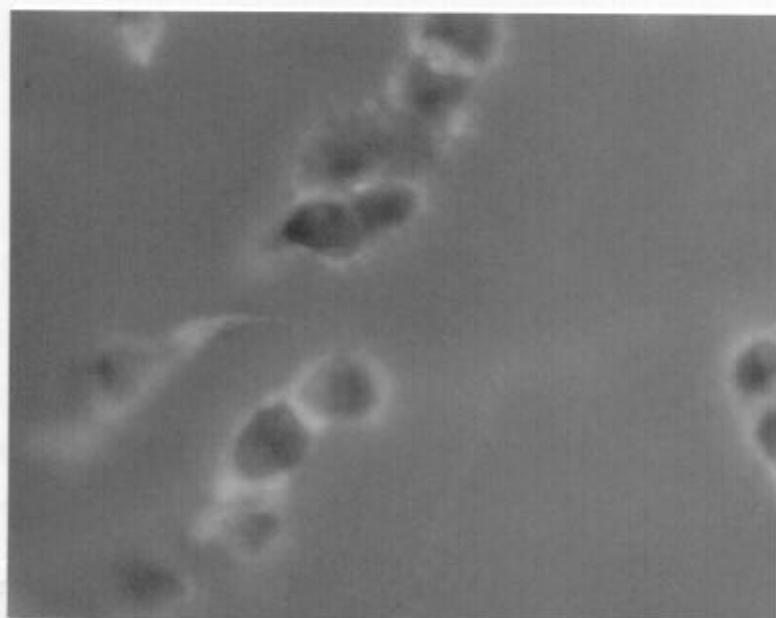


Figura 34: Experimento control de la inmunolocalización por fluorescencia indirecta de la subunidad α del canal epitelial de sodio en cartílago humano. En el panel **A** se observa, nula reactividad celular para la subunidad α en sección de cartílago de una paciente de 76 años afecta de osteoartrosis. El panel **B** muestra la misma sección anterior sobre la que se ha realizado un segundo marcaje con el anticuerpo McK1 que detecta la isoforma $\alpha 1$ de Na,K-ATPasa. Se observa inmunopositividad de los condrocitos (flecha), que anteriormente habían sido negativos para el canal de sodio.570X.

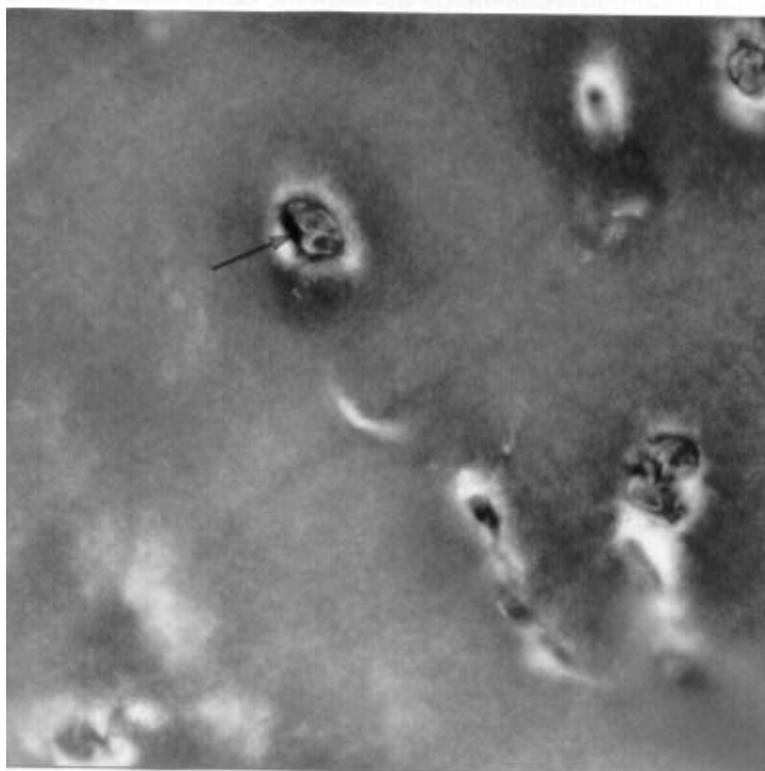


Figura 35: Inmunolocalización por avidina-biotina-peroxidasa de la subunidad α del canal epitelial de sodio en secciones de cartílago humano adulto sano y patológico.

A, control obtenido de la cabeza femoral izquierda de un paciente de 41 años sin patología osteocartilaginosa previa. Los condrocitos muestran inmunoreactividad positiva (cabeza de flecha).

B, no se observa inmunotinción celular subunidad α , espécimen obtenido del cóndilo femoral derecho de un paciente de 76 años afecto de osteoartrosis.

C, La cabeza de flecha muestra la inmunoreactividad condrocitaria para la subunidad α en cortes de cartílago obtenido de la cabeza femoral izquierda de una paciente de 64 años afectada de artritis reumatoide, comparativamente más intensa que la observada en el tejido sano (A). 570X.

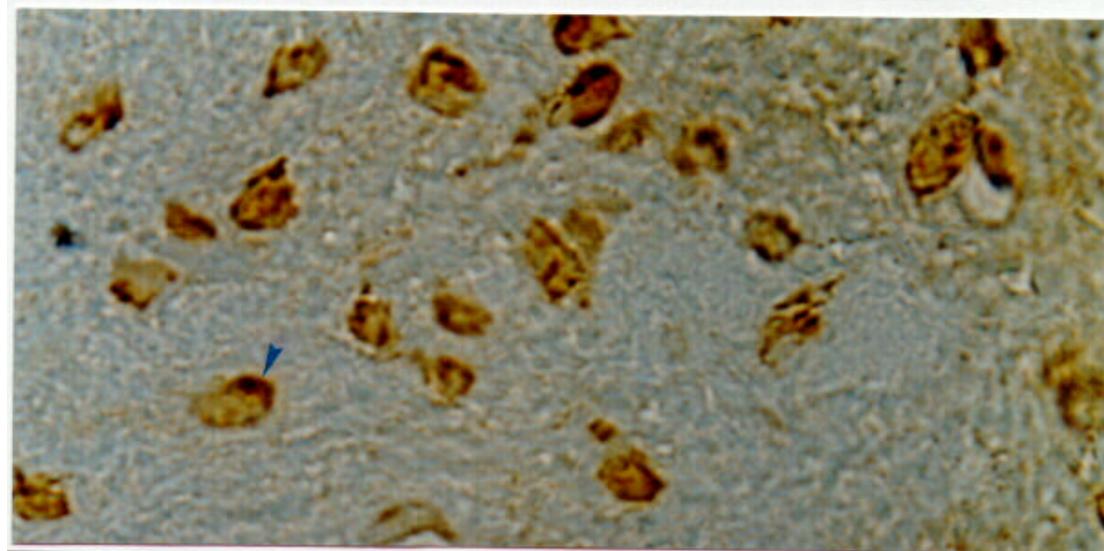
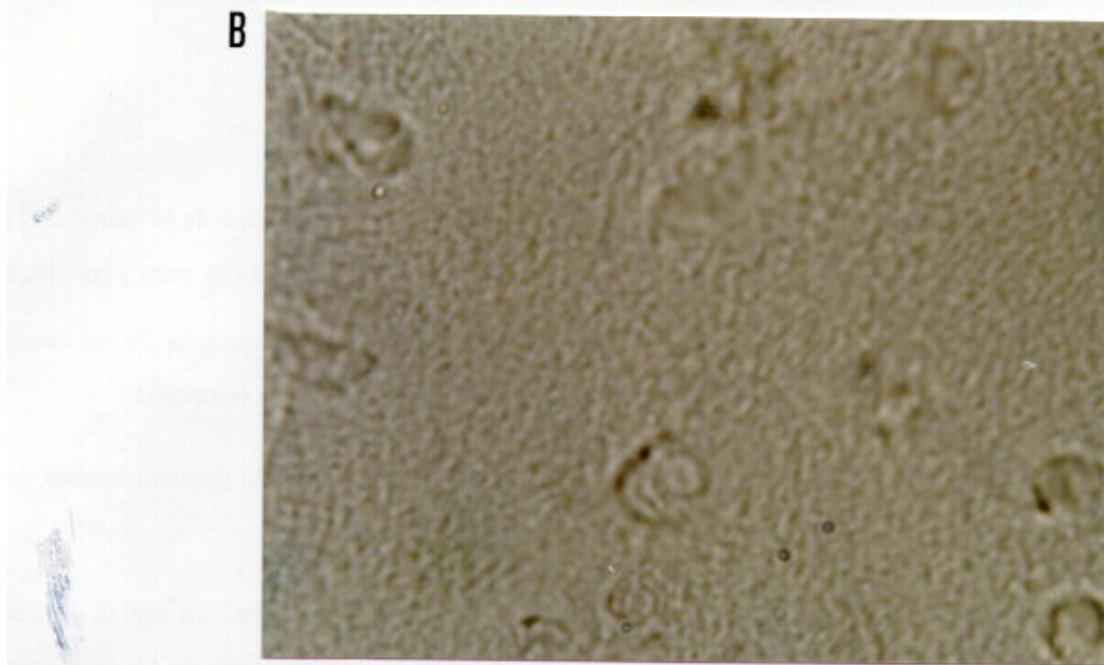
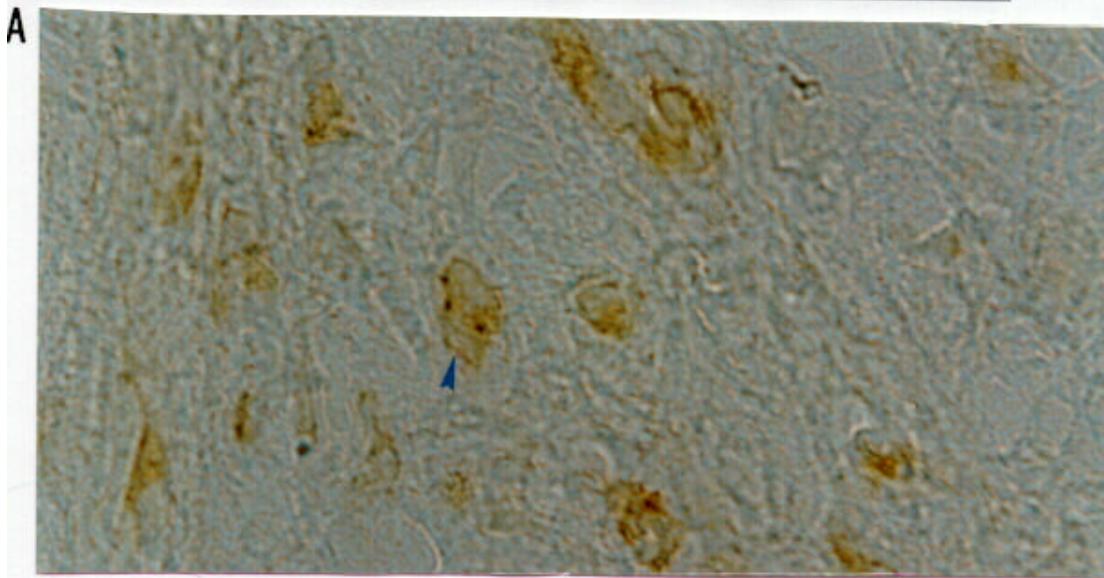
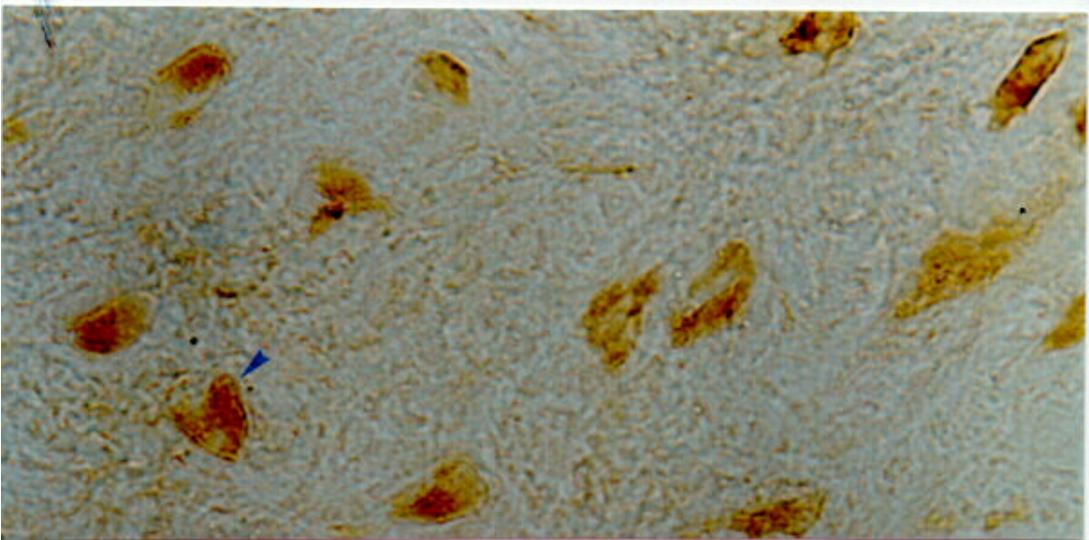
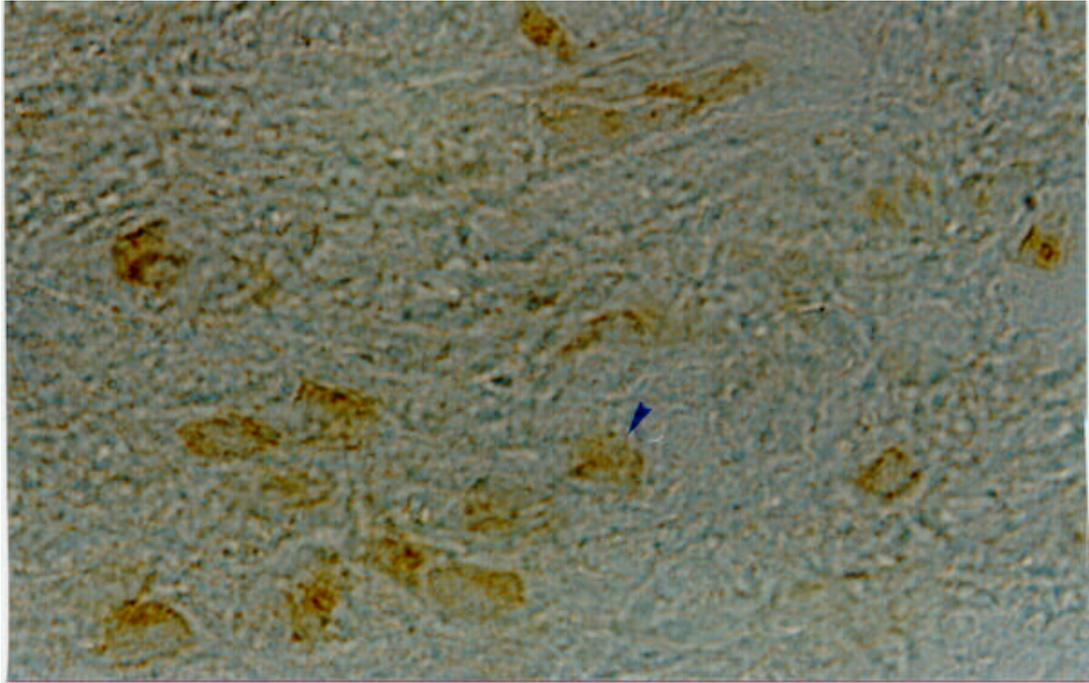


Figura 36: Inmunolocalización por avidina-biotina-peroxidasa de la subunidad β del canal epitelial de sodio en secciones de cartílago humano adulto sano y patológico.

A, En cartílago obtenido de la cabeza femoral izquierda de un control de 41 años. La cabeza de flecha muestra la positividad de los condrocitos.

B, no se observa inmunotinción celular en el cóndilo femoral medial derecho de una paciente de 76 años afecta de osteoartritis.

*C, inmunopositividad para la subunidad **b** de ENaC en cortes de cartílago obtenido de la meseta tibial lateral izquierda de una paciente de 69 años afecta de artritis reumatoide, la cabeza de flecha muestra una señal condrocitaria, comparativamente más intensa que la observada en el tejido sano(A) . 570X.*



6.- INMUNOLocalIZACIÓN DEL INTERCAMBIADOR Na^+ X H^+ (NHEs) EN CARTÍLAGO ARTICULAR HUMANO SANO Y AFECTO DE OSTEOARTROSIS Y ARTRITIS REUMATOIDE.

Las figuras 37, 38 y 39 muestran la inmunolocalización por fluorescencia indirecta de las isoformas NHE1, NHE2 y NHE3 del intercambiador Na^+/H^+ en el cartílago adulto sano y enfermo. Los condrocitos del cartílago sano presentan inmunopositividad para las isoformas NHE1 y NHE3 del intercambiador Na/H (paneles A de las figuras 37 y 39). También el cartílago afecto de osteoartrosis y artritis reumatoide presenta inmunopositividad para las mismas isoformas, NHE1 y NHE3 (paneles B y C de las figuras 37 y 39). La intensidad relativa de la inmunopositividad para la isoforma NHE1 es algo mayor de la observada para la isoforma NHE2, tanto en cartílago sano como en el de las dos patologías estudiadas.

La distribución de NHE1 y NHE3 es homogénea en toda la membrana plasmática de las células y en todas las zonas del cartílago, tanto en las muestras normales como en las patológicas y no parece haber ninguna diferencia significativa ni en la cantidad de expresión ni en la sublocalización entre los grupos estudiados. Por supuesto, la diferencia morfológica entre muestras viene definida por los cambios en la celularidad entre los casos estudiados.

Observamos mínima inmunoreactividad para la isoforma NHE2 en los condrocitos del cartílago articular humano, tanto en el sano como en el afectado de patología (paneles B de las figuras 37, 38 y 39), sin cambios significativos en la intensidad relativa de expresión entre los tres grupos de cartílago estudiados.

Figura 37: Localización mediante inmunofluorescencia indirecta de la isoforma NHE1 del intercambiador Na/H en el cartílago adulto sano y enfermo.

A, la cabeza de flecha muestra la inmunopositividad específica del condrocito para la localización en secciones de cartílago obtenido de la cabeza femoral izquierda de un control, varón de 51 años sin patología osteocartilaginosa previa. Las flechas muestran la tinción difusa inespecífica pericondrocitaria debida a la fluorescencia intrínseca del tejido.

B, inmunolocalización de la isoforma NHE1 en secciones de cartílago del cóndilo femoral lateral izquierdo de una paciente de 69 años afecta de osteoartrosis.

C, localización en cortes de cartílago obtenido de la cabeza femoral izquierda de una paciente de 64 años afecta de artritis reumatoide. 570X.

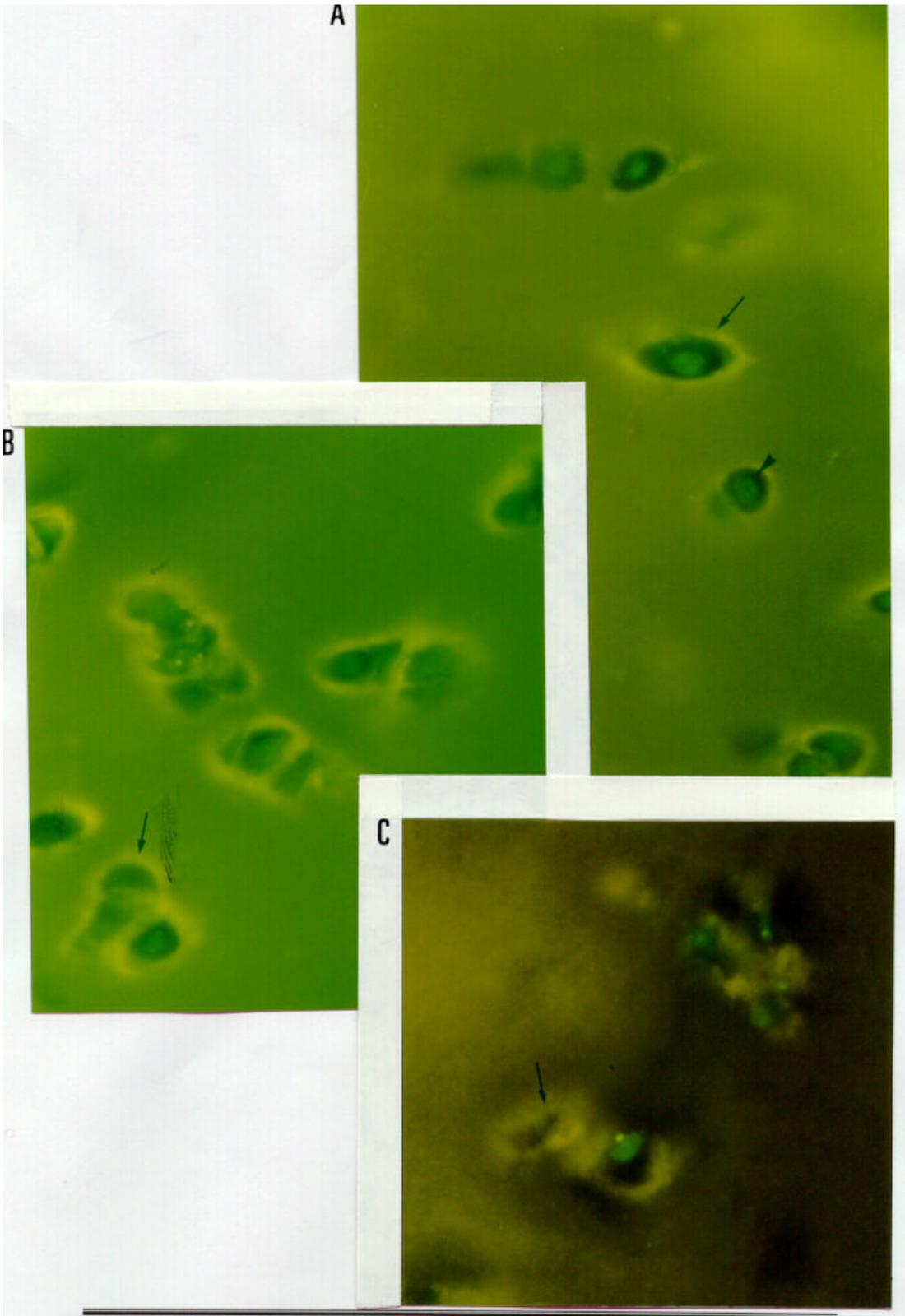


Figura 38: Inmunolocalización por inmunofluorescencia indirecta de la isoforma NHE2 del canal epitelial de sodio en el cartílago humano adulto sano y patológico.

A, débil inmunoreactividad en algunas células (cabeza de flecha) en secciones de cartílago obtenido de la cabeza femoral derecha de un control de 36.

B, secciones de cartílago de la meseta tibial izquierda de una paciente de 69 años afecta de osteoartrosis, la cabeza de flecha muestra una débil inmunoreactividad en un condrocito del campo.

C, cortes de cartílago obtenido de la cabeza femoral izquierda de una paciente de 58 años afecta de artritis reumatoide mostrando una débil inmunoreactividad celular aislada (cabeza de flecha). 570X.

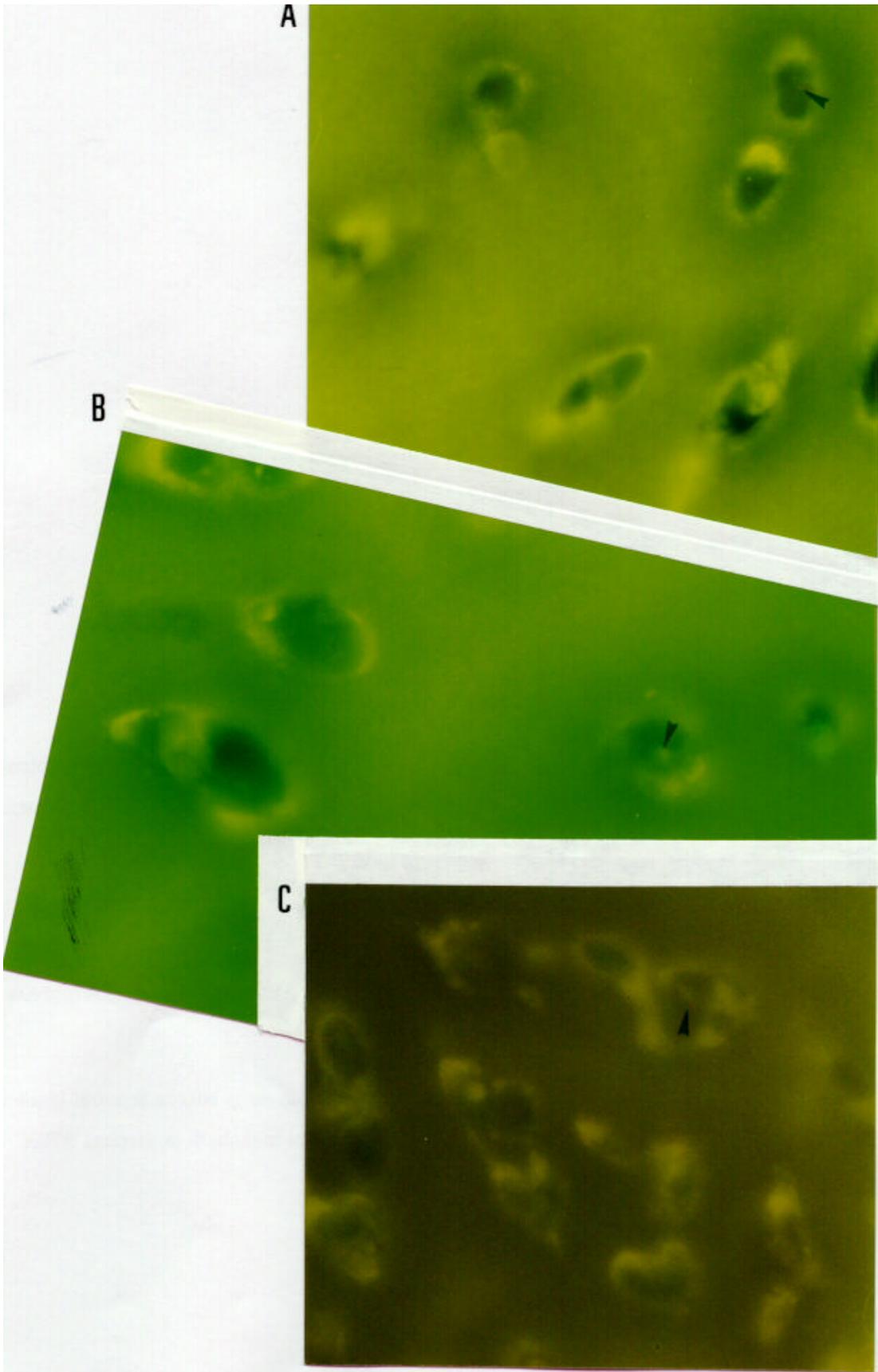
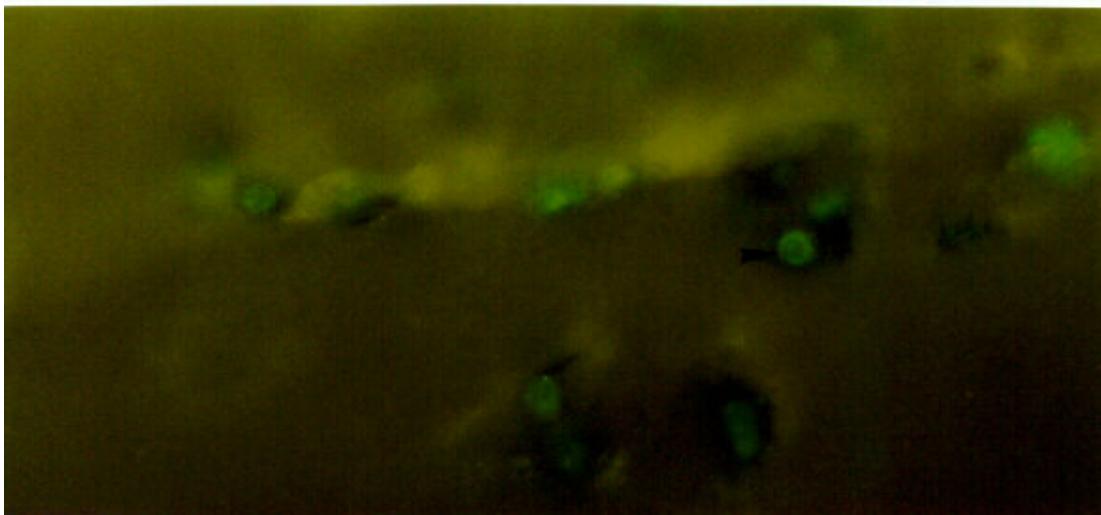
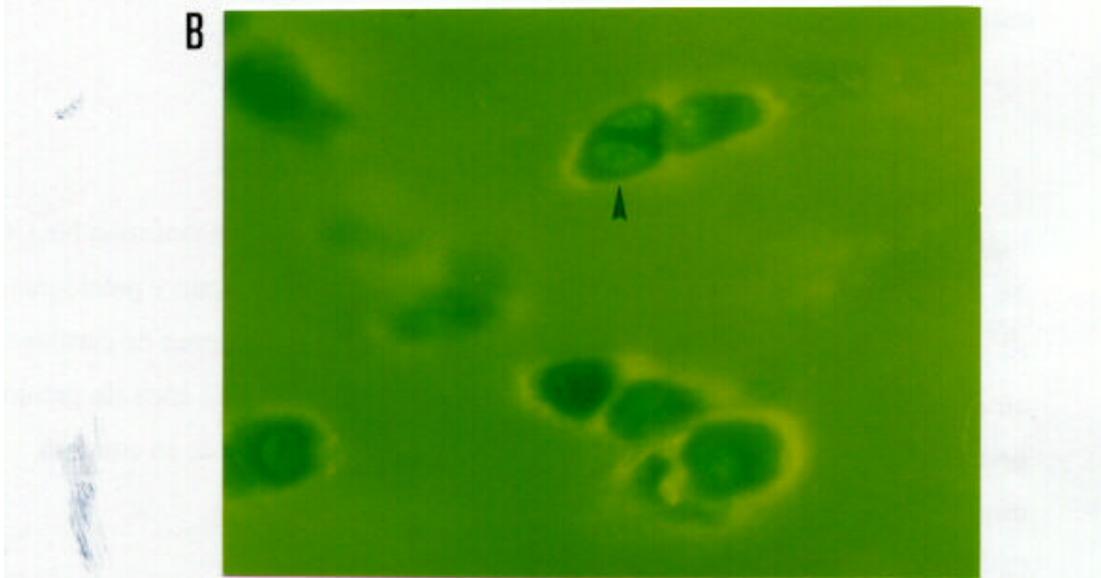
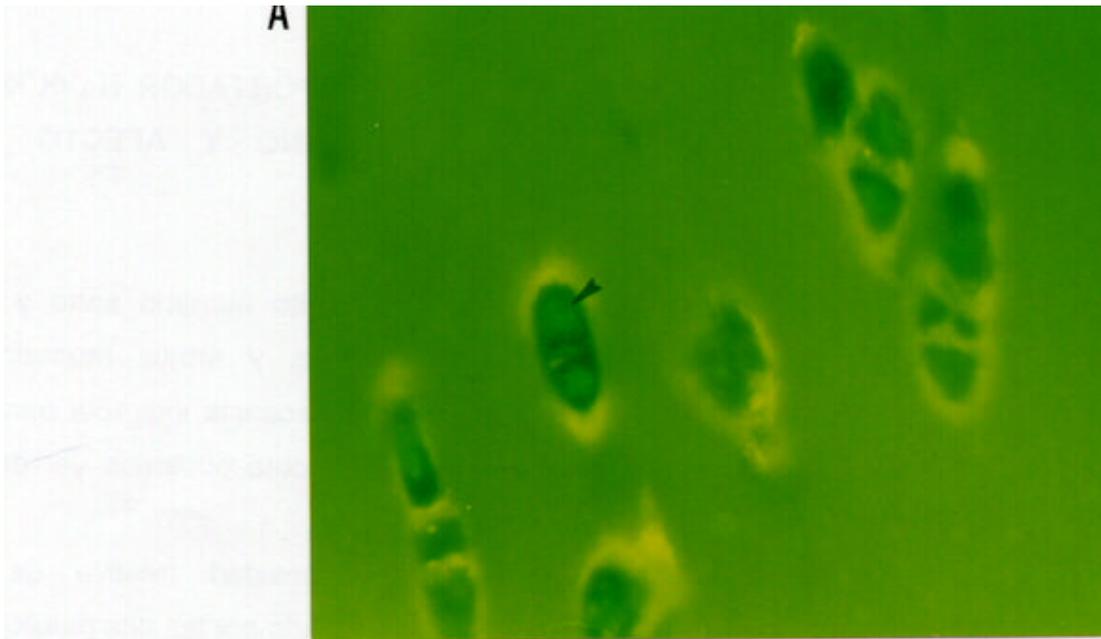


Figura 39: Inmunofluorescencia indirecta para la isoforma NHE3 del intercambiador Na/H en el cartílago adulto sano y patológico.

Panel A, localización inmunohistoquímica en secciones de cartílago obtenido de la cabeza femoral izquierda de un control de 51 años. La cabeza de flecha señala la reacción específica del condrocito.

B, muestra la inmunolocalización de la isoforma NHE3 en secciones de cartílago del cóndilo femoral lateral izquierdo de una paciente de 69 años afecta de osteoartritis, se observa inmunopositividad específica de los condrocitos (cabeza de flecha).

C, localización en cortes de cartílago obtenido de la cabeza femoral izquierda de una paciente de 64 años afecta de artritis reumatoide (cabeza de flecha). 570X.



7.- INMUNOLocalIZACIÓN DEL COTRANSPORTADOR $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ EN CARTÍLAGO ARTICULAR HUMANO SANO Y AFECTO DE OSTEOARTROSIS Y ARTRITIS REUMATOIDE.

Los condrocitos del cartílago articular adulto humano sano y los condrocitos del cartílago afecto de osteoartrosis y artritis reumatoide muestran reactividad específica inmune por fluorescencia indirecta para la subunidad NKCC1 del cotransportador Na-K-Cl, como podemos ver en la figura 40, paneles A; B y C respectivamente.

No observamos variaciones en la intensidad relativa de la inmunoreactividad entre el cartílago sano y el afectado por las dos patologías estudiadas.

Figura 40: Localización por inmunofluorescencia indirecta de la isoforma NKCC1 del cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ en el cartílago humano adulto sano y patológico.

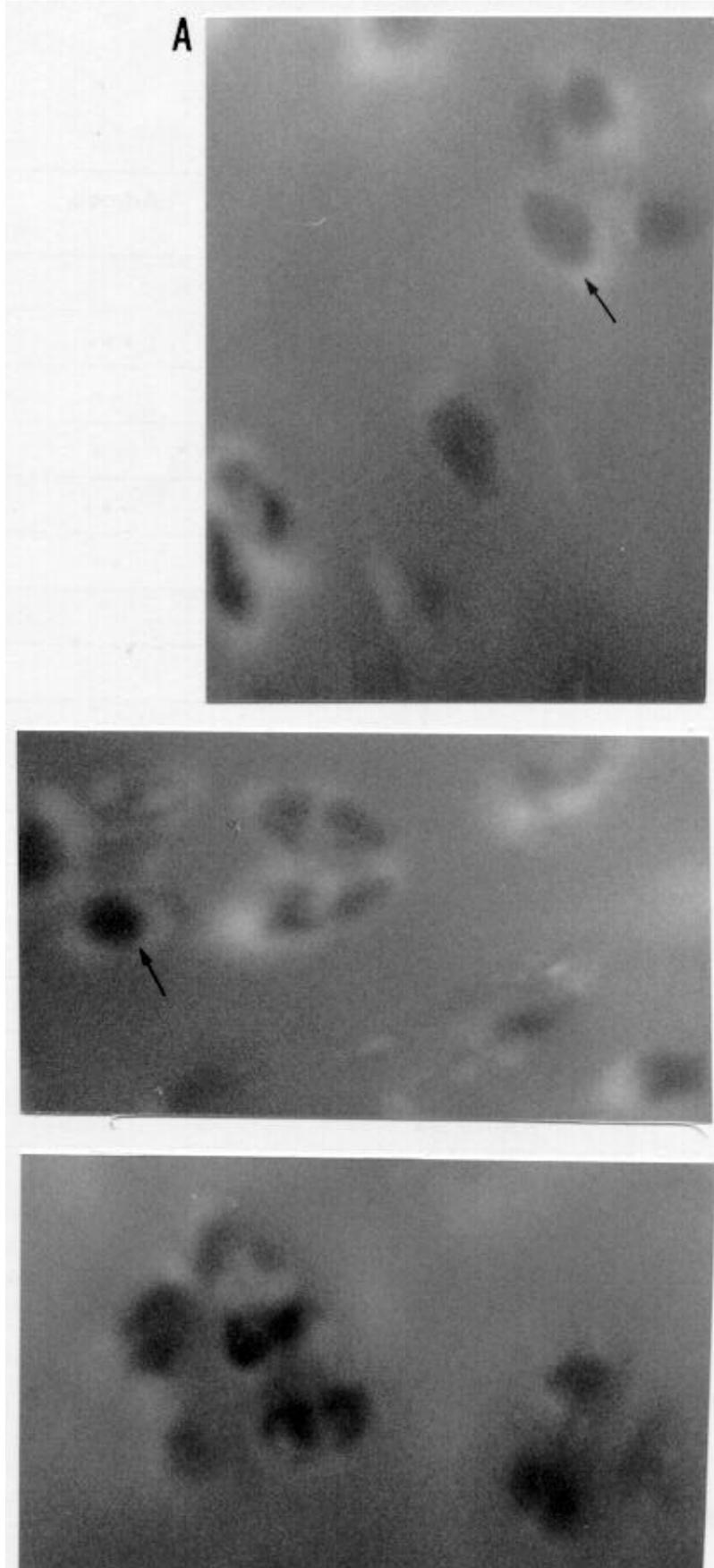
El panel **A** muestra la localización inmunohistoquímica en secciones de cartílago obtenido del cóndilo femoral lateral derecho de un paciente de 42 años sin patología osteocartilaginosa previa. Los condrocitos, que aparecen dentro de su condrón muestran inmunopositividad. (cabeza de flecha). **B**: inmunolocalización en cartílago del cóndilo femoral lateral derecho de una paciente de 68 años afecta de osteoartrosis, donde también observamos positividad para NKCC1. **C**: localización en cartílago de la cabeza femoral izquierda de una paciente de 64 años afecta de artritis reumatoide. Se observa igualmente inmunopositividad para NKCC1. 570X.



8.- INMUNOLocalIZACIÓN DE H,K-ATPasa EN CARTÍLAGO ARTICULAR HUMANO SANO Y AFECTO DE OSTEOARTROSIS Y ARTRITIS REUMATOIDE .

No observamos inmunoreactividad celular específica para la subunidad β de H,K-ATPasa en los condrocitos, tanto del cartílago control como del afecto por osteoartrosis ó artritis reumatoide (figura 41). Como en todas las secciones de cartílago en las que se realizó inmunofluorescencia se observa marcaje pericondrocitario inespecífico y un fondo difuso en la matriz extracelular, debido a la fluorescencia intrínseca peculiar de este tejido.

Figura 41: Inmunolocalización de la subunidad β de H,K-ATPasa en secciones de cartílago articular humano adulto sano (A), afecto de osteoartrosis (B) y afecto de artritis reumatoide (C). No se observa reactividad específica celular en ninguno de los tres grupos de cartílago estudiados. Las flechas muestran marcaje pericondrocitario inespecífico debido a la fluorescencia intrínseca del tejido. 570X.



	Normal	Artrosis	Artritis Reumatoide
Na,K-ATPasa			
a1	+++	+++	+++
a2	++	++	++
a3	++	++	++
b1	+++	+++	+++
b2	++	++	++
ENaC			
a	++	-	+++
b	+	-	+++
Na x H+			
NHE1	+++	+++	+++
NHE2	- +	- +	- +
NHE3	++	++	+++
Na-K-Cl			
NKCC1	++	++	++
H,K-ATPasa			
HKbgástrica	-	-	-

Tabla X: Expresión relativa de las isoformas y subunidades de los transportadores de membrana estudiados.

DISCUSIÓN

I. DEL MATERIAL UTILIZADO

- **De los fetos utilizados.**

Ninguno de los fetos utilizados presentaba malformación o enfermedad osteoarticular que pudiera alterar la histología y estructura del cartílago.

Aunque la histología del cartílago fetal difiere considerablemente de la del cartílago adulto no hemos encontrado diferencias aparentes en la expresión de las isoformas de Na,K-ATPasa entre ambos periodos, al contrario de lo que ocurre en otros tejidos como el hígado, (*Martín-Vasallo y cols, 1989*). Esto no excluye que pueda haber cambios en la actividad catalítica del transportador.

Los fetos utilizados para el estudio pertenecían al mismo estadio gestacional, por lo que no podemos extraer conclusiones sobre las modificaciones que pueden producirse en la expresión de las isoformas de Na,K-ATPasa durante el desarrollo embrionario y fetal.

- **De los controles adultos utilizados.**

En todos los controles adultos utilizados se excluyó patología articular mediante la realización previa de radiología convencional de la articulación de la que se obtuvo la muestra. Para minimizar la posibilidad de patología degenerativa se excluyeron los mayores de 50 años. De esta manera, podemos afirmar que los resultados obtenidos con estas muestras realmente corresponden a la distribución normal de transportadores en el cartílago humano.

- **Del grupo de pacientes utilizado.**

Los pacientes afectados de osteoartrosis utilizados estaban en un estadio avanzado de su enfermedad, dado que precisaban reemplazamiento de dicha articulación. Ninguno recibía tratamiento con fármacos de los que existan datos previos de su interacción con los transportadores de membrana estudiados. La

muestra de pacientes afectos de artritis reumatoide era homogénea en edad, años de evolución y estadio de la enfermedad. No podemos extraer por tanto conclusiones sobre el transporte de sodio en fases iniciales de ambas enfermedades del cartílago.

- **De los anticuerpos utilizados.**

Hemos utilizado los anticuerpos disponibles para cada proteína estudiada, todos ellos, incluso los desarrollados en nuestro laboratorio, han sido ampliamente probados y contrastados en su especificidad y en todos ellos se conocían las condiciones óptimas de fijación del tejido, título del suero y cromógeno a usar.

II. DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS.

- **De la inmunohistoquímica en secciones de tejido.**

Los procedimientos de aislamiento de condrocitos o los cultivos primarios de éstos conllevan una variación en la regulación de la expresión génica y de los procesos de distribución celular de varios genes y, sobre todo de los implicados en el mantenimiento del pH y de las concentraciones iónicas. Por ello hemos realizado el estudio en secciones de tejido.

Dada la escasa celularidad de este tejido y la dificultad de liberación de las células de la matriz intersticial, la técnica de elección para la detección de las proteínas, su distribución subcelular y su cuantificación relativa es la inmunohistoquímica. Hemos desarrollado los dos métodos mas conocidos, el de inmunofluorescencia indirecta y el de avidina-biotina-peroxidasa, para evitar que los posibles artefactos asociados a cada técnica induzcan a error.

Utilizando inmunofluorescencia indirecta observamos incluso en ausencia de segundo anticuerpo una señal difusa en la matriz extracelular más intensa en la región pericelular. Este efecto es mas evidente en el cartílago

adulto que en el fetal. Los elevados niveles de fluorescencia intrínseca de este tejido han sido descritos con anterioridad y se deben a las fibras de colágeno y elastina (Swatland, 1988). Otros estudios demuestran un aumento de la fluorescencia intrínseca del cartílago con la edad, debido a un mayor entrecruzamiento de las fibras de colágeno por la lisil-oxidasa (Pokharna y cols, 1995).

- **De la hibridación “*in situ*”.**

Mediante inmunohistoquímica localizamos la isoforma $\alpha 2$ en cartilago humano, contradiciendo estudios anteriores en cartílago bovino (Mobasheri y cols, 1997). Como un control adicional de la presencia de $\alpha 2$, detectamos el mRNA mediante la técnica de hibridación “*in situ*” , que con esta finalidad hemos adaptado para este tejido en nuestro laboratorio. También hemos utilizado esta técnica en el estudio de la expresión de la subunidad $\beta 3$ en humanos, ya que ninguno de los anticuerpos disponibles reconoce la isoforma en esta especie.

- **De la actividad pNPPasa.**

La actividad enzimática de la Na,K-ATPasa, clásicamente, se ha valorado como la diferencia en la producción de fosfato inorgánico (Pi) liberado del ATP, a concentraciones determinadas de Na^+ , K^+ y Mg^{2+} , entre los valores obtenidos en ausencia y presencia de oubaína. Dada la escasa cantidad células, en nuestro caso, esta técnica de determinación de actividad enzimática no puede ser utilizada. Sin embargo, secundariamente, se han utilizado substratos sintéticos como el p-NPP, denominando a esta actividad K-p-NPPasa (actividad para-nitrofenilfosfatasa dependiente de potasio) y cuyos valores representan el paso de defosforilación del sistema ($\text{E}_2\text{KP} \rightarrow \text{E}_2\text{K} + \text{Pi}$) en el ciclo de funcionamiento de la bomba de sodio (ciclo de Albers-Post) (Kaplan, 1985).

Para esta tesis doctoral hemos adaptado un método de determinación de actividad enzimática de Na,K-ATPasa “*in situ*” (Zamanova y Pacha, 1995). Así, y de forma integrada, obtenemos una valoración de la actividad enzimática desarrollada por la suma de los diversos isoenzimas que de este sistema pudieran formarse, de manera semicuantitativa (Kobayashi y cols, 1987). La tinción insensible a ouabaína podría corresponder a la actividad p-NPPasa de la H,K-ATPasa (Zinchuk y cols, 1997).

III. DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

- **De la celularidad.**

Los cambios de celularidad observados entre muestras de cartílago fetal y adulto y entre sano y enfermo corresponden a los descritos previamente en la literatura. Esto constituye un control interno adicional de que las muestras obtenidas corresponden a los tejidos que pretendíamos estudiar.

- **De Na,K-ATPasa.**

Desmostramos, por primera vez, la posibilidad de formación de nueve isoenzimas diferentes de Na,K-ATPasa en el condrocito humano. Previamente se habían descrito en condrocitos bovinos las isoformas $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\beta 1$ y $\beta 2$ (Mobasheri y cols, 1997). En la época en la que se realizó el trabajo citado la isoforma $\beta 3$ acababa de ser descrita y no se incluyó en el estudio. En la actualidad se sigue careciendo de anticuerpos específicos para esta isoforma en tejidos humanos, aunque hemos podido demostrar su presencia en cartílago articular utilizando tejido de rata e indirectamente, utilizando hibridación *in situ*, en humano.

Respecto a la isoforma $\alpha 2$, hemos demostrado su presencia con dos técnicas independientes. Pensamos que en el estudio anteriormente citado (*Mobasheri y cols, 1997*), $\alpha 2$ no fue detectada por la utilización de un método de fijación no adecuado que enmascara el epítipo reconocido por el anticuerpo McB2 (*Sweadner, comunicación personal*). El resultado negativo obtenido por Mobasheri y cols para la detección del mRNA de $\alpha 2$ mediante PCR en cartílago puede explicarse por la ausencia de datos acerca de la secuencia de esta isoforma en vaca. Los cebadores utilizados corresponden a la secuencia de $\alpha 2$ humana y por tanto un resultado negativo en vaca no es concluyente.

Para la detección de la isoforma $\alpha 3$ se utilizaron dos anticuerpos diferentes, que refuerza la validez del resultado. Para confirmar la presencia de $\beta 2$ realizamos también un experimento control, la competición con el antígeno purificado.

Hay evidencias de que la isoforma $\alpha 3$ sufre una modificación específica de téjido en el sitio de unión del anticuerpo McBX3, que anula dicha unión. Esta modificación está presente en el corazón humano, de rata, de perro y de macaco y en el riñón de algunas especies, pero ausente en cerebro y retina (*Arystakhova y Sweadner, 1996*). La isoforma $\alpha 3$ presente en el cartílago humano no presenta esta modificación, puesto que hemos visto que McBX3 es capaz de reconocer la proteína.

- **Del canal epitelial de sodio sensible a amiloride (ENaC).**

Es nuestro aporte al conocimiento de este canal en el cartílago lo que consideramos como, posiblemente, el hallazgo mas significativo de esta tesis. A ello contribuyen dos hechos: 1, no se había probado su existencia en el condrocito con anterioridad y 2, su ausencia, al menos dentro de los márgenes de resolución de nuestra técnica, en el condrocito de la artrosis. Si bien en dos muestras hemos encontrado una señal en la periferia del cartilago (figura 42) pensamos que ello podría ser explicado por dos circunstancias: la existencia de dos poblaciones distintas de enfermos artrósicos o bien, que las dos muestras

a que nos referimos procedan de regiones del cartílago en un estadio de la enfermedad anterior al terminal.

Hemos descartado la posibilidad de que se trate de un falso negativo mediante el doble marcaje de las mismas secciones con el anticuerpo McK1 específico de la isoforma $\alpha 1$ de Na,K-ATPasa, de la que previamente hemos demostrado que esta presente en todas las células del cartílago sano y enfermo.

Al no existir datos concluyentes de las modificaciones iónicas del cartílago en la artritis reumatoide, la expresión aumentada de ENaC en esta enfermedad no puede relacionarse con los mismos.

La presencia de ENaC en el cartílago articular podría deberse a una función de este canal recientemente propuesta (*Kizer y cols, 1997*), vía de entrada no selectiva de cationes en la célula. Esta función ha sido demostrada en osteoblastos, y sus autores proponen un papel general de ENaC en la transducción de señales por células mecanosensitivas.

Recientemente Briel y Cols. (1998), han observado una inhibición en la expresión de EnaC en oocitos de xenopus consecutiva a un incremento en el canal regulador de conductancia del cloro (CFTR) de la fibrosis quística. Este mismo efecto se ve en condiciones fisiológicas en el condrocito bovino que expresa grandes cantidades de CFTR y parece no expresar el EnaC (*Mobasheri, comunicación personal*).

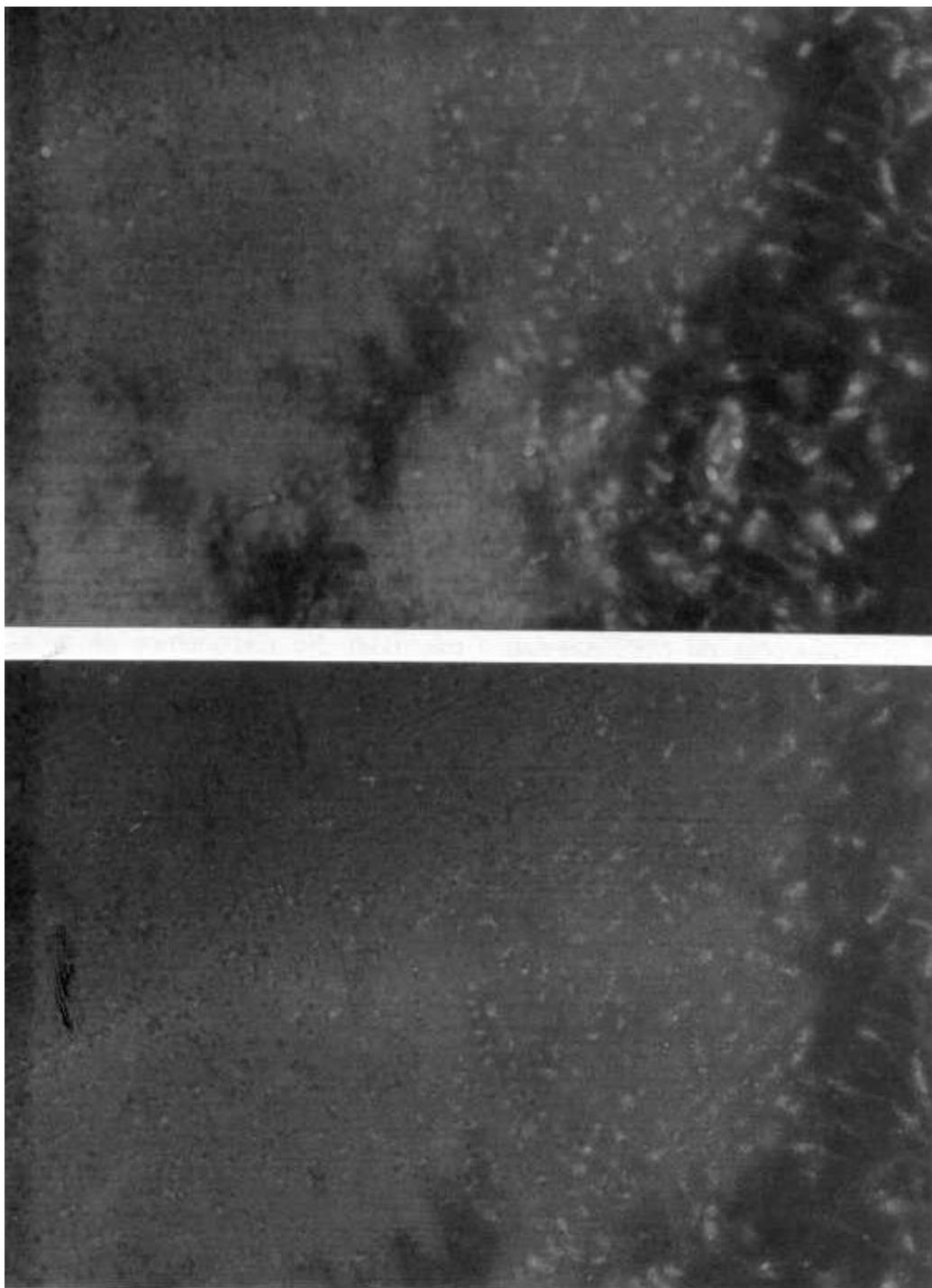


Figura 42: *Inmunofluorescencia indirecta para las isoformas **a** y **b** del canal epitelial de sodio en secciones transversales de cartilago humano adulto obtenido de la meseta tibial medial derecha de un control de 40 años sin patologia osteoarticular. A, localización de la subunidad **a**, se observa inmunoreactividad celular específica en las zonas superficial y profunda, pero no en la zona intermedia. B, inmunolocalización de la subunidad **b**, también observamos inmunoreactividad celular en las zonas superficial y profunda, pero no en la zona intermedia. 570X.*

- **Del intercambiador de sodio por protones (NHE)**

Demostramos la presencia de al menos tres isoformas de las seis descritas de NHE (*Grinstein y cols, 1998*). No disponemos de anticuerpos específicos para las isoformas NHE4, NHE5 y NHE6, por lo que no se han incluido en este estudio.

Una de las tres isoformas estudiadas, NHE2, aparece en niveles mínimos de expresión en el cartílago, aunque distinguibles del fondo inespecífico del tejido. La expresión de las otras dos isoformas es notable tanto en cartílago sano como enfermo.

NHE6 es la forma mitocondrial de este transportador y aunque en la actualidad no existe anticuerpo contra ella, es lógico pensar que las mitocondrias del condrocito también la posean.

El peculiar pH del cartílago, debido a la elevada concentración de cationes y a la producción de lactato por su metabolismo anaerobio, justifica la presencia de múltiples isoformas del regulador del pH intracelular NHE. En este sentido cabe considerar NHE1, cuyo funcionamiento óptimo es a pH 7.1, la isoforma fundamental en la regulación del pH del cartílago. Sin embargo NHE3 (igual que NHE2) cuya velocidad máxima de funcionamiento es a pH 7.4, se encuentra en el cartílago en unas condiciones alejadas de este funcionamiento óptimo (pH del cartílago 7.1) (*Levine y cols, 1993*).

- **Del cotransportador electroneutro $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (Na/K/2Cl)**

Hemos demostrado que la isoforma secretora NKCC1 del cotransportador electroneutro está presente en el cartílago humano, tanto sano como enfermo.

- **De H,K-ATPasa**

Nuestros experimentos demuestran que este sistema, en su forma gástrica, no se expresa en cartílago articular. Sabemos que si no existe la subunidad β , HK α 1 no puede estar presente de manera funcional. Esta falta de expresión hace que la expulsión de H⁺ del condrocito se lleve a cabo sólo por NHEs.

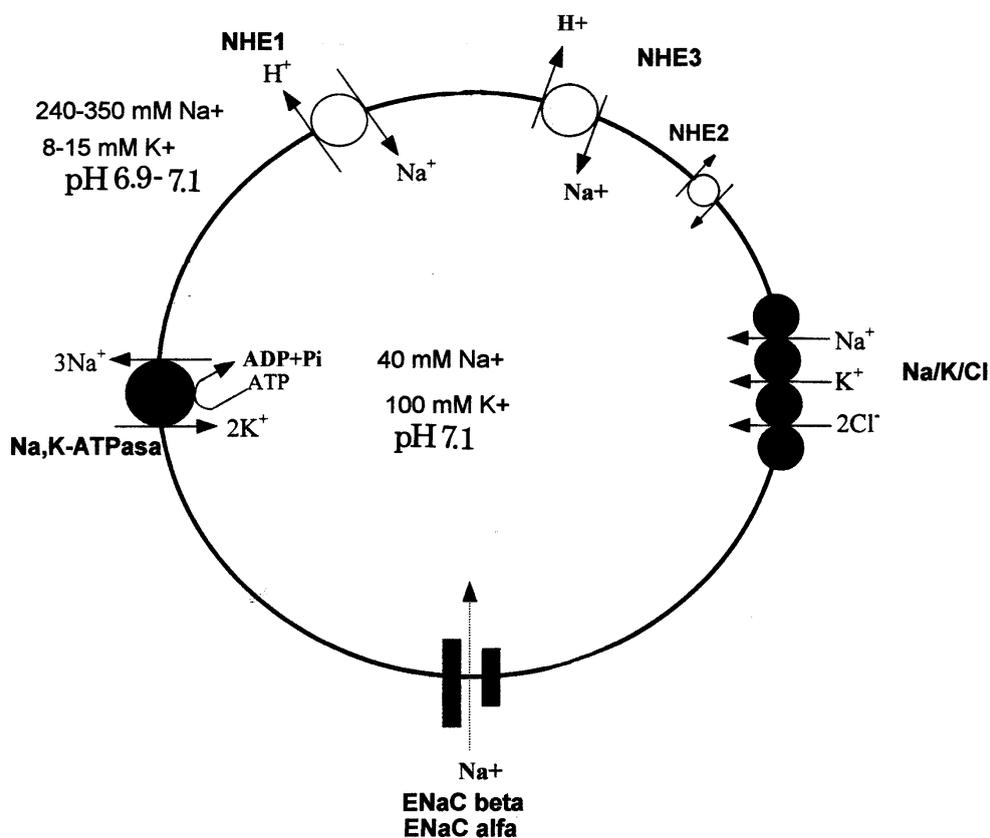
La falta de anticuerpo contra la isoforma de colon hace que, no podamos descartar la posibilidad de que el condrocito posea una forma colónica de H,K-ATPasa. A favor de su presencia en cartílago está la actividad pNPPasa insensible a ouabaina, que se interpreta como una actividad H,K-ATPasa (*Zinchuk y cols, 1997*).

IV. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS TOMADOS EN SU CONJUNTO.

Además del canal de sodio sensible a voltaje, estudios anteriores describen tres formas diferentes de manejo de sodio por el condrocito, el intercambiador NHE (dos isoformas: NHE1 y NHE3), el transportador electroneutro Na⁺/K⁺/2Cl⁻ y la Na,K-ATPasa. En esta tesis demostramos la presencia de, al menos, un cuarto sistema de transporte de sodio: el canal epitelial de sodio sensible a amiloride. También ponemos por primera vez de manifiesto que el condrocito expresa la subunidad α 2 de Na,K-ATPasa y, por ende, matizamos la posibilidad de existencia de nueve isoenzimas diferentes de Na,K-ATPasa. Nuevo hallazgo es también la presencia, en cantidades mínimas, de la isoforma NHE2 del intercambiador de sodio por protones. Ninguno de estos sistemas había sido estudiado con anterioridad en el hombre ni en ninguna de las enfermedades articulares que éste padece.

A continuación discutiremos nuestros hallazgos y lo que ellos pueden representar en la evolución, desarrollo, fisiología, patología y farmacología del cartílago humano sano y afecto de osteoartrosis y artritis reumatoide y propondremos modelos en los que se ve implicado el transporte de sodio en el condrocito sano y enfermo.

En la figura 43 podemos ver compilados todos los datos que hemos recogido para este trabajo en el condrocido humano sano: el ENaC (subunidades α y β), tres isoformas del NHE (la -1 , la -2 y la -3 , el menor tamaño de la NHE2 indica un menor nivel de expresión), el transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ y los nueve isoenzimas de $\text{Na},\text{K}-\text{ATPasa}$.



*Figura 43. Modelo de transporte de sodio en el cartílago adulto humano sano: nueve isoenzimas de $\text{Na},\text{K}-\text{ATPasa}$, las dos subunidades (**a** y **b**) del canal epitelial de sodio, al menos tres isoformas del intercambiador Na/H^+ (NHE1, y NHE3 en gran cantidad, y NHE2 en niveles mínimos) y la isoforma NKCC1 del intercambiador $\text{Na}/\text{K}/\text{Cl}$.*

Posiblemente sea el entorno del condrocito el más similar en concentración de sodio al que se encontraban las más primitivas células: un mar con elevada concentración de este catión. La membrana separaba un medio intracelular del entorno y un mecanismo de bombeo expulsaba los protones y disminuía un gran número de veces la concentración de sodio, creando la diferencia entre el medio intra y extracelular. Las rutas metabólicas funcionaban mejor con una concentración alta de potasio. Y así, aparece en primer lugar una primitiva bomba de protones de la que evolucionan una bomba de sodio-potasio y todas las demás bombas que funcionan contra gradientes de concentración y eléctricos. Desde este punto de vista, estrictamente evolutivo, el condrocito representa una paradoja: a pesar de vivir en un entorno primitivo, aparece como célula diferenciada muy tarde en la evolución, no parece existir en ningún organismo anterior a los peces, y sus sistemas de transporte de sodio han alcanzado la mayor complejidad conocida en lo que a mecanismos activos de transporte de sodio se refiere. No conocemos ninguna otra célula que exprese seis genes de subunidades de Na,K-ATPasa. El hecho de que esto suceda en todos los condrocitos, independientemente de su emplazamiento, nos indica que todas las variedades de isoenzimas deben de ser funcionantes con ajustes muy precisos, de otra forma el condrocito hubiera optado por tener un menor polimorfismo de transportadores de membrana.

Las distintas asociaciones entre isoformas de subunidades de Na,K-ATPasa (isoenzimas) presentan afinidades variables por los cationes y eficiencias catalíticas diferentes, por ello, basándonos en nuestros datos de incremento de actividad pNPPasa en los cartílagos enfermos respecto a los sanos, y aún cuando no encontramos variación en los niveles de expresión proteica de isoformas, deducimos que existen modificaciones en las proporciones de isoenzimas y cuya expresión experimental es una elevación de la actividad enzimática "in situ" valorada como "tinción" pNPPasa dependiente de potasio. Este hecho puede ser considerado como una forma de incrementar la eficiencia catalítica de un enzima mediante la regulación específica del

proceso de asociación de subunidades durante la biogénesis, dando esto lugar a la diversidad de isoenzimas.

Esta forma de determinación de actividad enzimática en la que monitorizamos la defosforilación del sistema en la transición $E_2KP \rightarrow E_2K + P_i$ es un buen indicador de la estimulación de los pasos limitantes de la cinética de translocación de este ion por Na,K-ATPasa (Forbush B y Klodos I, 1991) y, mas importante, una forma de conciliación de posibles fallos en la cinética de flujos iónicos del ciclo de Albers-Post al verse modificados los mecanismos de reacción por las modificaciones de interacciones entre dímeros (Sachs JR, 1991).

Según nuestro estudio, la entrada de sodio al condrocito se realiza, al menos, a través del ENaC, las tres isoformas del NHE y el transportador $Na^+K^+/2Cl$ a las que hemos de añadir el canal de sodio sensible a voltaje.

El ENaC (subunidades α y β) es el único sistema cuya expresión se ve alterada (ausencia completa de expresión en la artrosis). Seguramente esta represión es inducida por la elevación intracelular del sodio consecutiva a la elevación de este catión en la matriz del cartílago.

¿Por qué selectivamente la represión de ENaC y no la de los otros transportadores? El condrocito es una célula de origen mesenquimal, apolar y, por consiguiente, sin un flujo vectorial transcelular de Na^+ . El Na^+ no se transporta de un medio a otro, tan solo se usa para la generación de gradientes que puedan servir a la célula para captar glucosa, aminoácidos, calcio, regular su pH y toda una serie de mecanismos necesarios para la vida. Posiblemente, como respuesta, la forma mas fácil que tenga la célula de reducir la entrada de Na^+ sin comprometer ninguna de las entradas o salidas de otros solutos sea la de anular la expresión final del canal que específicamente transporta sólo Na^+ , el ENaC.

Esta diferencia patognomónica de la artrosis puede ser una manifestación que indique una alteración primaria de esta enfermedad. Para decir esto nos basamos en la circunstancia de que, aún cuando también existe

una alteración en la concentración de sodio en la artritis reumatoide, el condrocito afecto no disminuye o anula la expresión de su ENaC.

Como ya comentábamos en la introducción, la función primordial de los intercambiadores $\text{Na}^+ \times \text{H}^+$ es la de expulsar H^+ , resultado del metabolismo celular, para mantener el pH. Al no tener esta célula H,K-ATPasa, los NHE son los únicos sistemas encargados del mantenimiento del pH intracelular. La función del transportador electroneutro $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ es regular el volumen celular. Desde un punto de vista práctico, cabe resaltar que ambos son receptores farmacológicos de diuréticos usados en la clínica diaria como son el amiloride, la furosemida o la bumetanida. Tanto la difusibilidad de estas drogas como sus posibles efectos en la patología del cartílago está aún muy lejos de ser conocida, así como las variaciones en el pH intracondrocitario o subcompartimental del condrocito, pero sí que nos atrevemos a afirmar que estos hechos intervienen en los mecanismos de progresión de las enfermedades reumáticas.

Con todos los datos y consideraciones anteriormente expuestas hemos elaborado los modelos de manejo de sodio por el condrocito afecto de las dos enfermedades estudiadas en este trabajo y que representamos en las figuras 44 y 45. En la actualidad, en otros laboratorios se han comenzado a estudiar las variaciones de pH y sublocalizaciones celulares de pH mediante colorantes clásicos, y las alteraciones en los fenómenos de excitabilidad de la membrana, parámetros ambos imprescindibles para el conocimiento de una célula tan desconocida y a la vez tan cuantitativamente importante en la patología humana.

La hipótesis de regulación cinético-biogénica de expresión de isoenzimas de Na,K-ATPasa tenemos que conjugarla con otra de regulación por mensajeros, si no más compleja, sí más difícil de estudiar. En esta última debemos considerar hormonas, como la insulina o los gluco- y mineralocorticoides, tan directamente implicados en la expresión proteica, citoquinas y factores de crecimiento, como EGF o ILGF. En este mismo

sentido, queremos recordar la importancia que en el ciclo celular (fase G0) tiene los cambios de pH en la toma de decisión y compromiso de replicación y división celular, punto de contacto este de factores de crecimiento e intercambiadores NHE (Pouysségur J, 1985).

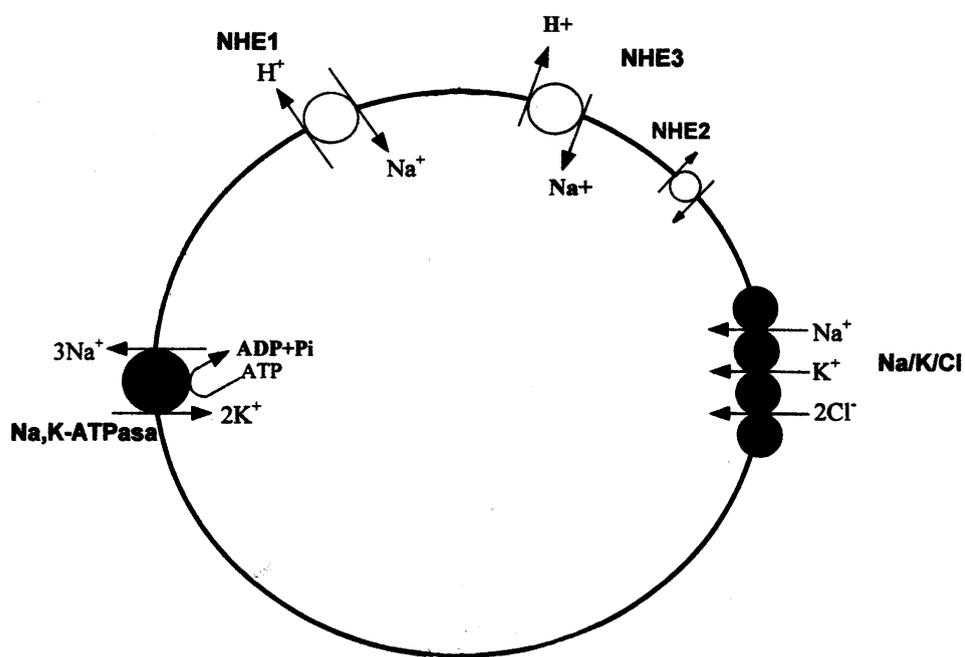


Figura 44. Modelo de transporte de sodio en el cartílago articular adulto humano afectado de osteoartritis: no se expresa el canal epitelial de sodio.

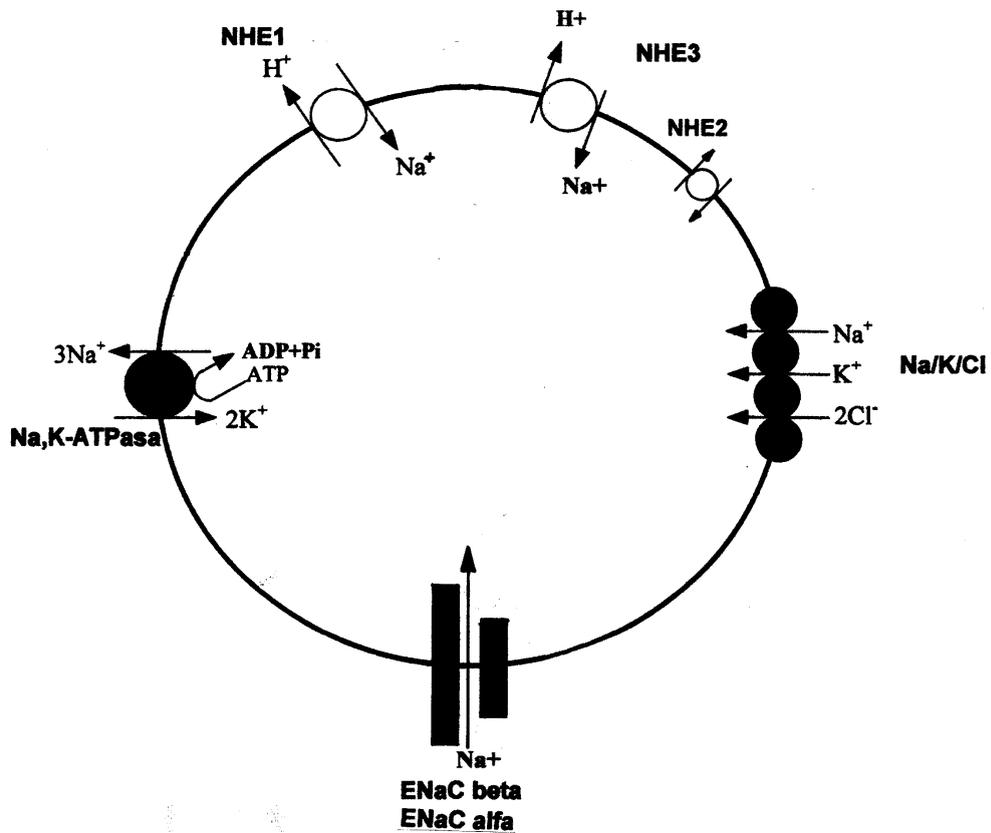


Figura 45. Modelo de transporte de sodio en el cartílago articular adulto humano afecto de artritis reumatoide: elevada expresión del canal epitelial de sodio.

CONCLUSIONES

1. Los condrocitos del cartílago articular humano sano, tanto en los estadios fetales estudiados como en adulto, expresan las proteínas de las tres isoformas de la subunidad α ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) y de las isoformas $\beta 1$ y $\beta 2$ de la subunidad β de la Na^+, K^+ -ATPasa. Dichas proteínas presentan una distribución homogénea en la membrana plasmática sin variaciones importantes en los niveles aparentes de expresión entre las isoformas estudiadas.
2. Los condrocitos del cartílago articular tanto humano como de rata también expresan la isoforma $\beta 3$ de la subunidad β de Na, K -ATPasa. Esto ha sido comprobado por inmunohistoquímica en la rata y mediante hibridación "*in situ*" en cartílago humano. Considerando en conjunto las dos primeras conclusiones, podemos deducir que de la asociación protomérica $\alpha\beta$ el condrocito puede formar nueve variedades de isoenzimas de Na^+, K^+ -ATPasa diferentes, lo que indica la gran especificidad y finura en el manejo y regulación de los cationes sodio y potasio por esta célula.
3. No hemos encontrado alteraciones significativas en la expresión de ninguna de las isoformas de las dos subunidades de Na^+, K^+ -ATPasa en el cartílago afecto de osteoartritis o artritis reumatoide. Pensamos que este hecho es mas bien debido al estadio en que se recogen las muestras, estadio terminal, que no a una ausencia de respuesta en la regulación de la expresión génica consecutiva a las variaciones iónicas que suceden durante la evolución clínico-biológica de ambas patologías.

4. La actividad enzimática ATPasa "*in situ*" valorada como actividad pNPPasa dependiente de potasio es significativamente mas elevada en el cartílago afecto de osteoartrosis y artritis reumatoide que en el cartílago sano, a pesar de la ausencia de variaciones en los niveles de expresión inmunohistoquímica de las isoformas de las subunidades de Na⁺,K⁺-ATPasa en las patologías estudiadas. Esta elevación podría ser indicativa de un incremento en la eficacia catalítica del enzima consecutivo a una formación alternativa de protómeros $\alpha\beta$ diferente entre el condrocito sano y el condrocito enfermo.
5. Los condrocitos del cartilago articular humano sano expresan las subunidades α y β del canal epitelial de sodio sensible a amiloride (ENaC).
6. El cartílago afecto de osteoartrosis presenta una expresión disminuida o nula de las subunidades estudiadas del canal epitelial de sodio en las regiones intermedias con unos niveles que consideramos normales en la superficie y en la región calcificada. La expresión de estas subunidades en el cartílago afecto de artritis reumatoide se encuentra significativamente incrementada con respecto a las señales que encontramos en los condrocitos de los cartílagos de los sujetos controles.
7. Las isoformas NHE1, -2 y -3 del intercambiador de sodio por protones presentan unos niveles expresión diferencial que varía entre isoformas. Hemos observado que NHE1 presenta los niveles mas altos de expresión, seguido muy de cerca por NHE3. La señal específica de NHE2 varía de muy débil a nula. Los niveles de expresión no presentan alteraciones significativas entre los controles y las patologías estudiadas.

8. El cotransportador electroneutro $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ presenta una expresión moderada en el condrocito y de distribución homogénea en toda la membrana plasmática tanto en cartílago control como en cartílago afecto de osteoartrosis y artritis reumatoide, no evidenciándose diferencias significativas entre los grupos estudiados.
9. La H,K-ATPasa, en su forma gástrica, no se expresa en el cartílago articular humano adulto, ni sano ni enfermo.
10. Pensamos que la regulación de la expresión génica, de la biogénesis o de la distribución subcelular de los cuatro mecanismos de transporte de sodio estudiados en este trabajo se ejerce fundamentalmente sobre el canal epitelial de sodio en la artrosis. El incremento de la concentración de sodio en la matriz del cartílago, seguramente debido a una disminución de la capacidad neutralizadora de cargas consecutiva a la variación estructural de los glicosaminoglicanos, conlleva una disminución del número de copias de subunidades de ENaC en la membrana plasmática con el fin de evitar la entrada indiscriminada de sodio a favor de gradiente.

BIBLIOGRAFÍA

- Alper SL. The band 3-related AE anion exchanger gene family. *Cell Physiol Biochem* 1.994;4:265-81.
- Altman R, Alarcón G, Appelrouth D, et al. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum* 1.991;34:505-14.
- Altman R, Asch E, Block D, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 1.986;29:1.039-49.
- Arnett FC, Edworthy S, Block DA et al. The 1.987 revised ARA criteria for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1.987;30:17.
- Arystarkhova E, Sweadner KJ. Isoform-specific monoclonal antibodies to Na,K-ATPase α subunits. Evidence for a tissue-specific post-translational
- Arystarkhova E, Sweadner KJ. Tissue-specific expression of the Na,K-ATPase β 3 subunit. The presence of β 3 in lung and liver addresses the problem of the missing subunit. *J Biol Chem* 1997; 272:22405-8.
- Aydelotte MB, Schumacher BL, Kuettner KE. Heterogeneity of articular chondrocytes. En Kuettner KE, Schleyerbach R, Peyton JG, Hascall YC Eds. *Articular cartilage and osteoarthritis*. New York: Raven Press;1.992.p.237-49.
- Bianchini L, Pouyssegur J. Molecular structure and regulation of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers. *J Exp Biol* 1.994;196:337-45.
- Blanco G, DeTomaso AW, Koster J, Xiez J, Mercer RW. The α -subunit of the Na,K-ATPase has catalytic activity independent of the β -subunit. *J Biol Chem* 1.994;269:23.420-5.
- Blanco G, Koster JC, Sánchez G, Mercer RW. Kinetic properties of the α 2 β 1 and α 2 β 2 isoforms of the Na,K-ATPase. *Biochemistry* 1.995;34:319-25.
- Briel M, Greger R, Kunzelmann P. Cl⁻ transport by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) contributes to the inhibition of epithelial Na⁺ channels (ENaCs) in xenopus oocytes co-expressing CFTR and ENaC. *J Physiol (Lond)* 1.998;508:825-36.
- Brighton CT, Happenstall RB. Oxygen tension in zones of epiphyseal plate metaphysis and diaphysis. *J Bone Joint Surg* 1.971;53:719-28.

- Brodie C, Sampson SR. Regulation of the sodium-potassium pump in cultured skeletal myotubes by intracellular sodium ions. *Journal of Cell Physiology* 1.989;140:131-7.
- Buckwalter JA, Mangkin HJ. Articular cartilage, part II: Degeneration and osteoarthritis ,repair, generation, and transplantation. *J Bone and Joint Surg* 1.997;79:612-32.
- Buckwalter JA, Mankin MD. Articular cartilage, part I: Tissue design and chondrocyte matrix interactions. *J Bone and Joint Surg* 1.997;79:600-11.
- Buckwalter JA, Martin Ja. Degenerative joint disease. In *Clinical Symposia*. New Jersey: Ciba-Geigy;1.995.p.2-32.
- Buckwalter JA, Rosenberg L. Structural changes during development in bovine fetal epiphyseal cartilage. *Collagen and Rel Res* 1.983;3:489-504.
- Buckwalter JA, Rosenberg LC, Hunziker EB. Articular cartilage: composition, structure ,response to injury and methods of facilitation repair. En: Ewing JW, Ed. *Articular cartilage and knee joint function. Basic science and arthroscopy*. New York: Raven Press;1.990.p.19-56.
- Buckwalter JA, Woo SLY, Goldberg VM, Hadley EC, Booth F, Oegema TR, Eyre DR. Soft - tissue aging and musculoskeletal function. *J Bone and Joint Surg* 1.993;75:1533-48.
- Buckwalter JA; Hunziker EB, Rosenberg LC, Coutts RD, Adams ME, Eyre DR. Articular cartilage. Composition and structure. En Woo SL, Buckwalter JA Eds. *Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues*. Illinois: The American Academy of Orthopedic Surgeons;1.988 .p 405-25.
- Canessa CM, Horisberg JD, Rossier BC. Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature Lond* 1.993;361:467-70.
- Canessa CM, Schild L, Buell G, et al. The amiloride-sensitive epithelial sodium channel is made of three homologous subunits. *Nature Lond* 1.994; 367:463-7.
- Codina J, Delmas-Mata JT, DuBose TD Jr. The alpha-Subunit of the Colonic H⁺,K⁺-ATPase Assembles with beta 1-Na⁺,K⁺-ATPase in Kidney and distal colon. *J Biol Chem* 1.998;273:7894-9.
- Chomczynski P, Nicoletta S. Single-Step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1.987; 162:156-9.
- Dieppe P. The classification and diagnosis of osteoarthritis. En Kuettner E, Goldberg VM Eds. *Osteoarthritis Disorders*. Illinois:The American Academy of orthopaedic surgeons; 1.995. p.5-12.

- Errington RJ, Fricker MD, Wood JL, Hall AC, White NS. Four - dimensional imaging of living chondrocytes in cartilage using confocal microscopy: a pragmatic approach. *Am J Physiol* 1.997;41:1.040-51.
- Errington RJ, Hall AC. Volume regulatory properties of porcine articular chondrocytes measured in situ using confocal microscopy. *J Physiol* 1.995;482:12-3.
- Eyre DR, Wu JJ, Wodd SP. Cartilage-specific collagens. En Keuttner KE, Schleyerbach R, Peyton JG, Hascall YC Eds. *Articular cartilage and osteoarthritis*. New York : Raven Press; 1.992. p119-31.
- Firestein GS. The immunopathogenesis of rheumatoids Arthritis. *Br J Rheumatol* 1.993;32:4-14.
- Fishcer AE, Carpenter TA, Tyler JA, Hall LD. Visualisation of mass transport of small organic molecules and metal ions through articular cartilage by magnetic resonance imaging. *Magnet Res Imag* 1.995;13:819-26.
- Forbush B, Klodos I . Rate-limiting steps in Na translocation by the Na/K pump. En: *The Sodium Pump: Structure, Mechanism, and Regulation*. New York; The Rockefeller University Press: 1991. pp, 211-26.
- Gonzalez Martinez LM, Avila J, Marti E, Lecuona E, Martin-Vasallo P. Expression of the α -Subunit isoforms of the Na,K-ATPase in rat embryo tissues, inner ear and choroid plexus. *Biol Cell* 1.994;81: 215-22.
- González T. Reparación del cartílago artrósico. En Tevar JP Ed. *Artrosis. Visión Actual*. Madrid; Aula Médica: 1.997. p.77-94.
- Good PJ, Richter K, Dawid IB. A nervous system-specific isoform of the β -subunit of the Na,K-ATPase expressed during early development of *xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1.990;87:9.088-92.
- Gray ML, Pizzanelli AM, Grodzinsky AJ, Lee RC. Mechanical and physicochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response. *J Orthop Res* 1.988; 6:777-92.
- Guerne PA, Blanco F, Kaelin A, Desgeorges A, Lotz M. Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes in aging and development. *Arthritis Rheum* 1.995;38:960-8.
- Haas M. The Na-K-Cl cotransporters. *Am J Physiol* 1.994; 267:869-85.
- Hanahan D. Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1985;166:557-80.

- Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans, many forms and many functions. *FASEB J* 1.992;6:861-70.
- Hardingham TE, Muiz H. Hyaluronic acid in cartilage and proteoglycan aggregation. *Biochem J* 1.974; 139:565-81.
- Harris DE. Rheumatoid Arthritis. En Kelley, Harris, Ruddy, Sledge, Eds. *Textbook of Rheumatology*. Filadelfia, WB Saunders:1993.pp 905-81.
- Hebert SC, Gamba G, Kaplan M. The electroneutral Na-K-Cl cotransport family. *Kidney Int* 1.996;49:1.638-41.
- Heinegard D, Pimentel ER. Cartilage matrix proteins. En Keuttner KE, Schleyerbach R, Peyton JG, Hascall YC Eds. *Articular cartilage and osteoarthritis*. New York: Raven Press;1.992.p.95-111.
- Heyse S, Wuddel I, Apell HJ, Stürmer W. Partial reactions of the Na,K-ATPase: determination of rate constants. *J Gen Physiol* 1.994;104:197-240.
- Isering P, Farbush B. Ion and bumetamide binding by the Na-K-Cl cotransporter. Importance of transmembrane domains. *J Biol Chem* 1.997; 272:24.556-62.
- Kawamura M, Nogushi S, Venu S, Kusabg M, Takeda K. Functional analysis of the disulfide bounds of the Na,K-ATPase β -subunit by sitedirected mutagenesis. En Bamberg E, Schorer W Eds. *The sodium pump*. New York; Springer:1.994.p.341-8.
- Kernan RP. *Cell potassium*. John Wiley & Sons. New York;1.980.
- Kernan, RP. *Cell Potassium*. New York, John Wiley & Sons, 1.980.
- Klanke CA, Su YR, Callen DF, et al. Molecular cloning and physical and genetic mapping of a novel human Na⁺/H⁺ exchanger (NHE5/SLC9A5) to chromosome 16q22.1 *Genomics* 1.995; 25:615-22.
- Kuettner KE, Schleyerbach R, Peyron JG, Hascall VC, Eds. *Articular cartilage and osteoarthritis*. New York: Raven Press; 1.992.
- Lesperance L, Gray ML, Birstein D. Determination of fixed charge density in cartilage using nuclear magnetic resonance. *J Orthop Res* 1.992;10:1-13.
- Lesperance L, Gray ML, Burstein D. Determination of fixed charge density in cartilage using nuclear magnetic resonance. *Journal of Orthopaedic Research* 1.992; 10:1-13.

- Lesperance L, Gray ML, Burstein D. Determination of fixed charge density in cartilage using nuclear magnetic resonance. *J Orthop Res* 1.992 ;10:1-13.
- Levine SA, Montrose MH, Ming Tse, Donowitz M. Kinetics and regulation of three cloned mammalian Na⁺/H⁺ exchangers stably expressed in a fibroblast cell line. *J Biol Chem* 1.993;268:25527-35.
- Lingueglia EN, Voilley N, Waldman R, Lazduunski M, Barbry P. Expression cloning of an epithelial amiloride-sensitive Na⁺ channel: a new channel type with homologies to *Caenorhabditis elegans* degenerins. *FEBS Lett* 1.993; 318:95-9.
- Lotz M, Blanco FJ, Von Kempis J, Ullrich J, Maier R, Villiger PM, Geng Y. Cytokine regulation of chondrocyte function. *J Rheumatol* 1.995 ;43:104-8.
- Maini RN, Zvaifler NJ. Rheumatoid Arthritis. En: Klippel, Dieppe. *Rheumatology*. San Luis; Mosby: 1.995. pp 4-8.
- Malik N, Canfield VA, Beckers MC, Gros P, Levenson, R. Identification of the mammalian Na, K-ATPase β 3 subunit. *J Biol Chem* 1.996;271:22754-8.
- Mandreperla SA, Editin M, Adler R. Na,K-adenosine triphosphatase polarity in retinal photoreceptors. A role for cytoskeletal attachment. *J Cell Biol* 1.996;109:1483-93.
- Mankin HJ. The water of articular cartilage. En: Simon WH, Ed. *The human joint in health and disease*. Philadelphia: University of Pennsylvania Press;1.978.p.37-42.
- Maroudas A. Physical chemistry of articular cartilage and the intervertebral disc. En Sokoloff L Ed. *Joints and synovial fluid*. Academic Press: New York; 1980. p.239-91.
- Maroudas A. Physico-chemical properties of articular cartilage. En Freeman MA Ed. *Adult articular cartilage*. Pitman Medical, Skeletal Research Vol II. Academic Press: New York; 1979. p.215-90.
- Martin JA, Buckwalter JA. Articular cartilage aging and degeneration. *Sports Med and Arthosc Rev* 1.996;4:263-275.
- Martín-Vasallo P, Dackowski W, Retting-Emanuel J, Levenson R. Identification of a putative isoform of the Na,K-ATPase β -subunit. *J Biol Chem* 1.989 ;264:4613-8.
- Martín-Vasallo P, Dackowski W, Emanuel JR, Levenson, R. Identification of a putative isoform of the Na,K-ATPase beta subunit: primary structure and tissue-specific expression. *J Biol Chem* 1.989;264: 4613-8.

- Marxer A, Stieger B, Quaroni A, Kashgarian M, Hauri HP. Na,K-ATPase and plasma membrane polarity of intestinal epithelial cells: presence of a brush border antigen in the distal large intestine that is immunological related to β -subunit. *J Cell Biol* 1.989; 109: 1057-69.
- McLean IW, Nakane PK. Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* 1.974 ;22:1007-83.
- Mobasher A, Errington RJ, Golding S, Hall AC, Urban JPG. Characterization of the Na,K-ATPase in isolated bovine articular chondrocytes; molecular evidence for multiple α and β isoforms. *Cell Biol Int* 1.997;21:201-12.
- Mobasher A, Errington RJ, Hall AC, Urban JPG. Increased extracellular $[Na^+]$ upregulates Na,K-ATPase density in isolated bovine articular chondrocytes. *Trans Am Orthop Res Soc* 1.996;21: 331P.
- Mobasher A, Hall AC, Urban JPG, France SJ, Smith AL. Immunologic and autoradiographic localisation of the Na,K-ATPase in articular cartilage; upregulation in response to changes in extracellular Na^+ concentration. *Int J Biochem Cell Biol*; 29 :649-57.
- Mobasher A, Mobasher R, Francis MJO, Trujillo E, Alvarez de la Rosa D, Martín-Vasallo P. Ion transport in chondrocytes: membrane transporters involved in intracellular ion homeostasis and the regulation of cell volume, free $[Ca^{2+}]$ and pH. *Histol Histopathol* 1.988. (In press).
- Mobasher A, Shackleton S, Harris A, Urban JPG, Hall AC. Molecular characterisation of the Na,K-ATPase density in isolated bovine articular chondrocytes; evidence for multiple catalytic isoforms. *J Physiol* 1.996;491:96P.
- Mobasher A, Smith AL, France SJ, Urban JPG, Hall AC. Autoradiographic localisation of the Na,K-ATPase in bovine articular chondrocytes; correlation of density with tissue $[Na^+]$. *J Physiol* 1.995; 489:96P.
- Mobasher A, Urban JPG, Hall AC. Characterisation of the catalytic isoforms of the Na,K-ATPase in isolated bovine articular chondrocytes by Western blotting and immunofluorescence confocal laser scanning microscopy. *Int J Exp Pathol* 1.995;76:A28.
- Mobasher A, Urban JPG, Hall AC. The effect of the extracellular environment on the Na^+/K^+ pump density in bovine articular cartilage. *Int J Exp Pathol* 1.994;75:A91.

- Moskowitz RW, Howell DS, Goldberg VM, Mankin HJ, Eds. Osteoarthritis, diagnosis and medical/surgical management. 2nd Ed. Philadelphia, WB Saunders, 1.992.
- Mow VC, Rosemwasser MP. Articular cartilage. Biomechanics. En Woo SL, Buckwalter JA Eds. Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues. Illinois: The American Academy of Orthopedic Surgeons;1.988. p.427-63.
- Muir H. The chondrocyt, architect of cartilage. Bio Essays 1.995 ;12:1939-48.
- Nakajima-Iijima S, Hamada H, Reddy P, Kakunaga T. Molecular structure of the human cytoplasmic beta-actin gene: interspecies homology of sequences in the introns. Proc Natl Acad Sci USA 1.985;82, 6133-7.
- Orlowski J, Grinstein S. Na⁺/H⁺ exchangers of mammalian cells. J Biol Chem 1.997;272 :22373-6.
- Pathak BG, Pugh DG, Lingrel JB. Characterization of the 5'-flanking region of the human and rat Na,K-ATPase alpha 3 gene. Genomics 1.990;8:641-7.
- Peyron JG. Epidemiologic aspects of osteoarthritis. Scandinavian J Rheumatol 1.988 ;77:29-33.
- Poole CA. The chondron and its pericellular environment. En Keuttner KE, Schleyerbach R, Peyton JG, Hascall YC Eds. Articular cartilage and osteoarthritis. New York: Raven Press;1.992.p.201-220.
- Praemer AP, Furner S, Rice DP. Musculoskeletal conditions in the United States. Park Ridge, Illinois. The American Academy of orthopaedic surgeons; 1.992.
- Reinmann I, Mankin HJ, Trahan C. Quantitative histologic analyses of articular cartilage and subchondral bone from osteoarthritic and normal human hips. Acta Orthop Scandinavica 1.977;48:63-73.
- Renar S, Lingueglia E, Voilley N, Lazdunski M, Barbry P. Biochemical analysis of the membrane topology of the amiloride -sensitive Na⁺ channel. J Biol Chem 1.994;269:12.881-6.
- Rosenberg LC, Buchwalter JA. Cartilage proteoglycans. En Kueltner Eds. Articular cartilage biochemistry. New York: Raven Press;1.986.p.39-57.
- Sachs JR. Successes and failures of the Albers-Post model in predicting ion flux kinetics. En: The Sodium Pump Structure, Mechanism, and Regulation. Tnew York; The Rockefeller University Press: 1991. pp, 249-65.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed, 1.989.
- Sandell LS. Molecular biology of collagens in normal and osteoarthritic disorders. En Kueltner KE Ed. Osteoarthritic disorders. Illinois: The American Academy of Orthopedic Surgeons;1.995. p.131-46.
- Sardet C, Franchi A, Pouysségur J. Molecular primary structure and expression of the human growth factor-activatable Na⁺/H⁺ antiporter. Cell 1.989;56:271-80.
- Saxnet T, Heinegard D. Cartilage oligomeric matrix protein: a novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood. Br J Rheumatol 1.992;31:583-91.
- Schiller AL. Pathology of osteoarthritis. En Kuettner E, Goldberg VM Eds. Osteoarthritis Disorders. Illinois:The American Academy of orthopaedic surgeons; 1.995. p.95-101.
- Schull GE, Greeb J, Lingret JR. Molecular cloning of three distinct forms of the Na,K-ATPase α -subunit from rat brain. Biochemistry 1.986;25 ;8125-32.
- Schull GE, Lane LK, Lingrel JB. Aminoacid sequence of the β -subunit of the (Na⁺ + K⁺)ATPase deduced from a CDNA. Nature 1.986;321:429-31.
- Shamraj OI, Lingrel JB. A putative fourth Na,K-ATPase α -subunit gene is expressed in testis. Proc Natl Acad Sci USA 1.994;91:12.952-6.
- Shull MM, Pugh DG, Lingrel JB. Characterization of the human Na,K-ATPase alpha 2 gene and identification of intragenic restriction fragment length polymorphisms. J Biol Chem 1.989;264: 17532-43.
- Sim Kin PA. Joints: structure and function. En: Schumacher HR, Ed. Primer on the rheumatic disease. Atlanta-Georgia, Arthritis Foundation 1.988.p.18-23.
- Snyder PM, McDonald FJ, Stokes JB, Elsh MJ. Membrane topology of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel. J Biol Chem 1.994;269:24.379-83.
- Stein WD. Channels, carriers and pumps. London; Academic Press:1.990.

- Stockwell RA. Carilage failure in osteoarthritis: Relevance of normal structure and function. A review. *Clin Anat* 1.991;4:161-91.
- Stockwell Ra. The cell density of human articular cartilage. *J Anat* 1.967;101:753-67.
- Sverdlov ED, Monastyrskaya GS, Broude NE, et al. Family of human Na,K-ATPase genes. Structure of the gene of isoform alpha 3. *Dokl Biochem* 1987;297,426-31.
- Sweadner KJ. Isozymes of the Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1.989; 988:185-220.
- Sweadner KJ. Na, K-ATPase and its isoforms. En: Kettenmann H, Ransom BR Eds. *Neuroglia*. New York: Oxford University Press;1.995. pp 259-72.
- Sweadner KJ. Na,K-ATPase and its isoforms. En Kettenmann H, Ransom BR Eds. *Neuroglia*. New York:Oxford University Press;1.995. p.259-72.
- Trippel SB. Growth factor actions on articular cartilage. *J Rheumatol* 1.995;43:129-32.
- Urban JPG, Bayliss M. Regulation of proteoglycan synthesis rate in cartilage in vitro: influence of extracellular ionic composition. *Biochim Biophys Acta* 1.989;Acta 16:447-63.
- Urban JPG, Hall AC. Physical modifiers of chondrocyte metabolism. En Keutner K, Hascall VC, Schleyerbach R, Peyron R, Eds. *Articular cartilage and osteoarthritis*. New York:Raven Press;1.992. P.393-406.
- Urban JPG. The chondrocyte: a cell under pressure. *Br J Rheumatol* 1.994;33:901-8.
- Urban JPG. The chondrocyte; a cell under pressure. *Br J Rheumatol* 1.994;33:901-8.
- Wilkins RJ, Hall AC. Measurement of intracellular pH in isolated bovine articular chondrocytes. *Exp Physiol* 1.992;77:521-4.
- Wilkins RJ, Mobasery A, Hall AC. Characterization of Na⁺ x H⁺ exchange in isolated bovine articular chondrocytes. *FASEB J* 1.996;10:3843P.
- Zemanova Z, Pacha P. Corticosteroid induction of renal and intestinal K⁺ dependent p-nitrophenylphosphatase in young and adult rats. *Histochem J* 1.996;28:625-34.
- Zinchuk VS, Kobaysahi T, García del Saz E, Seguchi H. Biochemical properties and cytochemical localization of ouabain-insensitive, potassium-dependent p-Nitrophenylphosphatase activity in rat atrial myocytes. *J Histochem Cytochem* 1.997;45: 177-87.

- Zvaifler NJ, Hough AJ, Krane SM, McCarty DJ, Bacon PA. Rheumatoid arthritis. En McCarty, Koopman Eds. Arthritis and allied conditions. Philadelphia; Lea and Febiger; 1993. pp.723-840.