

Estudio de la apoptosis en la coxartrosis: influencia de las cargas biomecánicas locales

J. Monfort^a, M. Nacher^b, J. Lloreta^c, L. Pérez-Edo^a, F.J. Blanco^d y P. Benito^a

^aServicio de Reumatología IMAS. Hospital del Mar i l'Esperança. Barcelona.

^bInstitut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM). Barcelona. ^cServicio de Anatomía Patológica IMAS. Hospital del Mar. Barcelona. ^dServicio de Reumatología. Hospital Juan Canalejo. A Coruña. España.

Introducción: La apoptosis es un tipo de muerte celular relacionada con la fisiopatología del proceso artrósico. Determinadas cargas mecánicas de alta frecuencia también se han relacionado con el mismo proceso. Existen pocos estudios que intenten determinar la influencia de las cargas mecánicas sobre la muerte celular por apoptosis.

Objetivo: Cuantificar el número de condrocitos apoptóticos en el cartílago articular de la cabeza femoral artrósica en las zonas de carga y no carga.

Material y métodos: Se obtuvieron muestras de cartílago a partir de cabezas femorales de pacientes sometidos a artroplastia de cadera por coxartrosis primaria ($n = 10$). Se estudió la apoptosis en los polos superior e inferior de dicha cabeza femoral mediante la técnica de TUNEL y microscopía electrónica (ME). Los resultados se expresaron como media aritmética de los porcentajes \pm desviación estándar.

Resultados: El estudio histológico utilizando la técnica de TUNEL demostró que el $11,9 \pm 17,6\%$ de las células fueron positivas en los cartílagos procedentes del polo superior y el $10,6 \pm 9,1\%$ en el polo inferior. El estudio ultraestructural de estos cartílagos reflejó que el $13,6 \pm 7,7\%$ de las células presentaban cambios apoptóticos en el polo superior, mientras que el $16,7 \pm 12,0\%$ presentaban apoptosis en el polo inferior.

Conclusión: Los resultados de nuestro estudio no apoyan la existencia de una relación directa entre el porcentaje de condrocitos apoptóticos y las zonas de máxima y mínima carga de la articulación coxfemoral de pacientes artrósicos.

Palabras clave: Apoptosis. Condrocito. Artrosis.

Correspondencia: Dr. J. Monfort.
Servicio de Reumatología. Hospital del Mar.
Passeig Marítim, 25-29. 08003 Barcelona. España.
Correo electrónico: jmonfort@imas.imim.es

Manuscrito recibido el 21-5-2002 y aceptado el 18-3-2003.

Study of apoptosis in hip-osteoarthritis: influence of local biomechanical loading

Introduction: Apoptosis is a form of cell death that has been related to the physiopathology of osteoarthritis. High frequency mechanical loading has also been related to this process. To date, there is limited information on the effect of mechanical loading on apoptotic cell death.

Objective: To quantify the number of apoptotic chondrocytes in the articular cartilage obtained from loading and non-loading areas of osteoarthritic hips.

Material and methods: Cartilage specimens were obtained from the femoral head of patients undergoing hip arthroplasty for primary hip osteoarthritis ($n = 10$). Apoptosis was studied at the superior and inferomedial joint space of the femoral head by means of the TUNEL technique and electron microscopy. The results are expressed as the mean of percentages \pm standard deviation.

Results: Histological study using TUNEL showed that $11.9 \pm 17.6\%$ and $10.6 \pm 9.1\%$ of cells were positive in the cartilage from maximum and minimum loading areas, respectively. Ultrastructural study of these cartilages revealed that $13.6 \pm 7.7\%$ and $16.7 \pm 12.0\%$ of chondrocytes presented apoptotic changes in the maximum and minimum loading areas, respectively.

Conclusions: The present results do not seem to support a relationship between the percentage of apoptotic chondrocytes and the areas of maximum and minimum loading of the hip in patients with osteoarthritis.

Key words: Apoptosis. Chondrocyte. Osteoarthritis.

Introducción

La apoptosis, o muerte programada, es un proceso fisiológico que tiene como función mantener la homeostasis del tejido embrionario y adulto¹, pero que puede tener relevancia en la fisiopatogenia de las enfermedades en las que se produce una degeneración del cartílago articular, como son la artritis reumatoide y la artrosis. Es importante la diferen-

ciación entre necrosis y apoptosis. La necrosis, a diferencia de la apoptosis, es un proceso patológico que tiene lugar cuando las células están expuestas a un daño físico o químico.

El condrocito es el único elemento celular en el cartílago y, por tanto, de él depende la síntesis y la integridad de la matriz extracelular, que es la que confiere al tejido sus propiedades fisicoquímicas. La muerte del condrocito tiene una significación patogénica tanto en el desarrollo de la artrosis como en el proceso de reparación de la pérdida de matriz extracelular². En el cartílago artrósico los condroцитos pierden su fenotipo diferenciado, dejando de sintetizar colágeno tipo II y aggrecano, y se encaminan hacia un proceso de muerte celular. La matriz extracelular es una fuente de señales tróficas y, por tanto, su alteración produce un cambio en las señales que regulan la apoptosis del condrocito³.

Las cargas mecánicas sobre las articulaciones son necesarias para que la matriz extracelular mantenga su metabolismo. Sin embargo, se ha comprobado que las cargas mecánicas de elevada frecuencia e intensidad son un factor de primer orden en la patogenia de la artrosis⁴. Las fuerzas biomecánicas locales condicionan cambios en la estructura del condrocito, observándose que los situados en las zonas de mayor carga tienen un tamaño superior y mayor volumen de organelas intracelulares⁵, así como una mayor composición de proteoglicanos y un mayor grado de deformidad de las fibras de colágeno⁶. Existen evidencias *ex vivo* de que las cargas articulares pueden modificar la composición y la función del sistema de metaloproteasas y citocinas proinflamatorias.

Por otro lado, algunos estudios han tratado de demostrar la relación entre la muerte celular por apoptosis y las diferentes cargas a las que se ve sometida una misma articulación. En este sentido, el trabajo publicado por Kim et al⁷ demuestra, en la gonartrosis, un mayor grado de apoptosis y relaciona la gravedad de la artrosis con el porcentaje de células apoptóticas observado.

A pesar de que la coxartrosis constituye un problema epidemiológico de enorme magnitud, existen pocos estudios que, utilizando modelos similares a los de Kim et al⁷, intenten relacionar en esta articulación el grado de apoptosis con las zonas de diferente carga. El objetivo de nuestro trabajo es cuantificar el número de condroцитos apoptóticos en el cartílago articular de la cabeza femoral artrósica en las zonas de carga y no carga.

Material y métodos

Obtención de las muestras

Las muestras de cartílago se obtuvieron a partir de cabezas femorales de pacientes afectados de coxartrosis primaria y sometidos a intervención quirúrgica programada para artroplastia total ($n = 10$). Se excluyeron aquellos pacientes con patología inflamatoria, microcristalina, osteonecrosis, displasias de cadera, trastornos de la alineación e hiperostosis vertebral anquilosante senil, así como aquellos tratados con corticoides y fármacos de acción lenta modificadores de los síntomas (SYSADOA). Previamente a la intervención, un reumatólogo examinaba la última radiografía de cada paciente practicada antes de la artroplastia y comprobaba que se trataba de una coxartrosis polar superior; se excluyeron, por tanto, las formas con afección concéntrica y del polo inferior.

En la cabeza femoral se distinguió el polo superior del inferior (zona de máxima y mínima carga, respectivamente) y se realizó una extracción del tejido cartilaginoso de cada una de estas dos zonas. Se consideró como zona de máxima carga la región superior y como zona de mínima carga la región inferior, según la división topográfica descrita por Li⁸, a excepción de un paciente en el que la zona de máxima carga se correspondía con la región inferior.

Las muestras de cartílago se dividieron y se fijaron en glutaraldehído al 2,5%, para su estudio mediante microscopía electrónica, o bien en formaldehído al 4% para su estudio mediante la técnica de TUNEL.

Estudio de la apoptosis mediante TUNEL

Las muestras de cartílago se fijaron en formalina y fueron incluidas en parafina. De cada bloque se realizaron dos cortes de 4 μm , que fueron utilizados para la técnica de TUNEL (*TdT-mediated dUTP nick end labelling*) (Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Germany). Las muestras se rehidrataron e incubaron con 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteinasa K durante 10 min a temperatura ambiente. La peroxidasa endógena fue inhibida mediante incubación con peróxido de hidrógeno al 0,3% y las células fueron permeabilizadas con un 0,1% de Tritón X-100 durante 2 minutos a 4 °C. Las secciones fueron incubadas con la mezcla de reacción de TUNEL siguiendo el protocolo estandarizado por Roche. El marcaje se detectó mediante incubación con un anticuerpo conjugado con peroxidasa, y el revelado se llevó a cabo mediante incubación con el sustrato DAB (diaminobencidina). En cada muestra se analizó un mínimo de 100 células.

Estudio de la apoptosis mediante microscopía electrónica

Las muestras se fijaron durante 24 h en glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato, y se lavaron dos veces en tampón cacodilato 0,2 M durante 10 min. A continuación, fueron fijadas en tetraóxido de osmio 0,2 M pH 7,4 durante 1 h y, posteriormente, fueron lavadas dos veces en tampón caco-

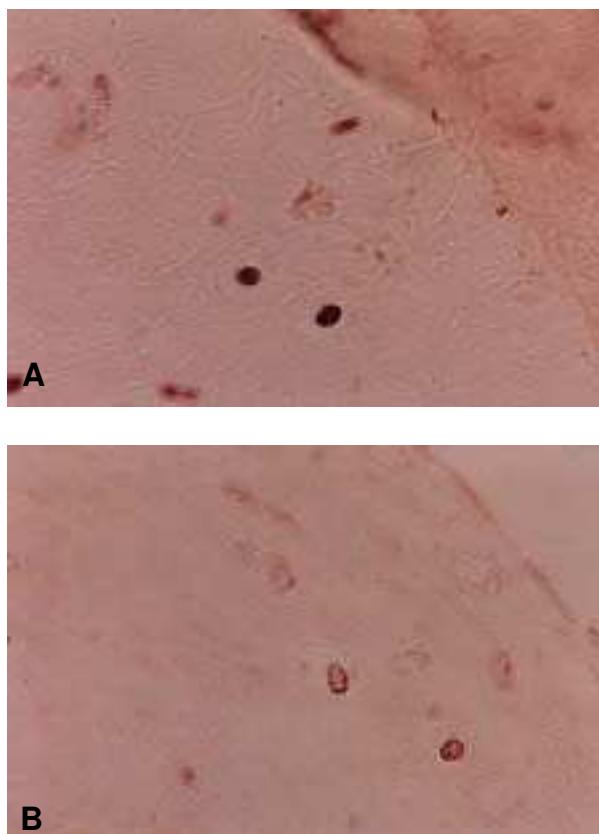


Figura 1. A) Células apoptóticas con el núcleo intensamente teñido (marrón) mediante la técnica de TUNEL ($\times 800$). B) Se pueden observar las células apoptóticas con el núcleo teñido conjuntamente con otras que son negativas para TUNEL ($\times 800$).

dilato durante 10 min. Tras ello, fueron deshidratadas en etanol al 96%, y finalmente incluidas en resina epoxídica. Para el examen ultraestructural, se efectuó un estudio preliminar de cortes semifinos al microscopio óptico, con el objetivo de seleccionar los bloques más adecuados para el estudio. Además de la comprobación de la calidad técnica del material, el único criterio de selección fue que existiera una buena representación numérica de condrocitos. Se cortaron secciones finas que fueron teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo, y estudiadas mediante un microscopio electrónico Phillips CM100. Para el estudio de la apoptosis se obtuvieron fotografías de las diferentes muestras de tejido, sobre las cuales se aplicó un método de recuento semicuantitativo⁸. Para la evaluación de la apoptosis se valoró desde una ligera condensación nuclear hasta cambios apoptóticos evidentes en el citoplasma y en el núcleo (acumulaciones de cromatina en la periferia de la membrana nuclear y pérdida de heterocromatina). Los cambios estructurales apoptóticos se expresaron como porcentaje de aparición en cada grupo de muestras. Se analizó un mínimo de 100 condrocitos en cada muestra.

TABLA 1. Porcentajes de apoptosis cuantificado mediante microscopía electrónica (ME) y tinción por TUNEL

Paciente	Grupo	Apoptosis ME	Apoptosis TUNEL
1	Carga	22	0
1	No carga	5	2
2	Carga	15	9
2	No carga	11	19
3	Carga	19	61
3	No carga	20	28
4	Carga	5	5
4	No carga	17	14
5	Carga	6	5
5	No carga	9	15
6	Carga	11	6
6	No carga	20	2
7	Carga	6	10
7	No carga	47	6
8	Carga	27	14
8	No carga	16	15
9	Carga	18	9
9	No carga	5	5
10	Carga	7	0
10	No carga	17	0
Media diferencias		-3,1 (16,7)	1,3 (12,5)
IC del 95%		Inferior Superior	-15,1 8,0
			-7,6 10,0

Los resultados están expresados como porcentaje.
IC del 95%: intervalo de confianza del 95%.

La hipótesis principal de nuestro estudio fue que la apoptosis cuantificada por TUNEL era mayor en el polo superior que en el inferior. No se encontraron estudios en la bibliografía que compararan datos similares en la cadera que permitieran realizar una estimación del tamaño de la muestra. Sin embargo, con 10 pacientes, y basándonos en los resultados obtenidos en nuestro estudio, se tenía una potencia estadística del 80% para detectar como significativa una diferencia media entre la apoptosis de ambos polos de, al menos, un 10%.

Para la realización del análisis estadístico de los resultados se empleó el test de la t de Student para datos apareados. Los resultados se expresaron como media aritmética \pm desviación estándar.

Resultados

Estudio histológico mediante TUNEL

Utilizando la técnica de TUNEL, la media de los porcentajes obtenidos fue de $11,9 \pm 17,6$ y $10,6 \pm 9,1$ en zonas de máxima y mínima carga, respectivamente. Las diferencias entre ambas zonas se hallaron lejos de la significación estadística. Los intervalos de confianza demostraron que estas diferencias no serían superiores al $\pm 10\%$, aproximadamente (tabla 1).

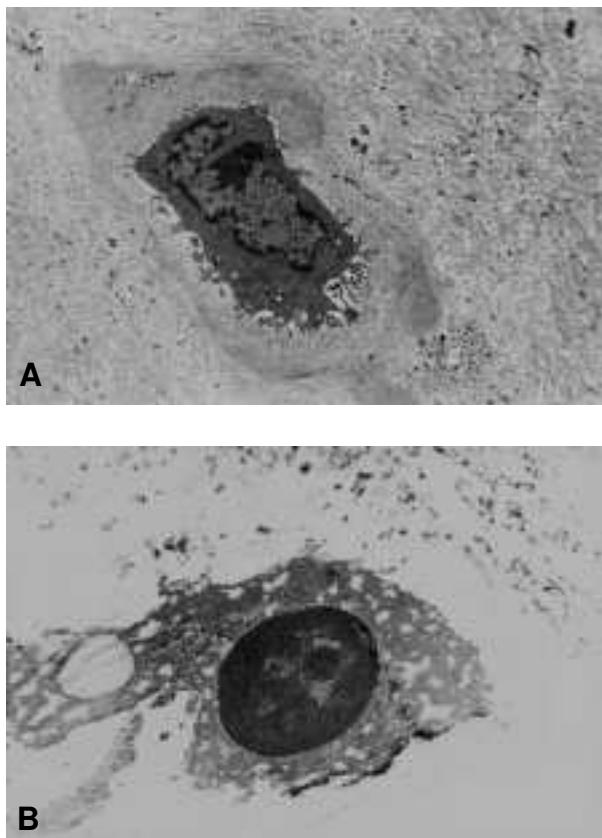


Figura 2. A) Condrocito normal y matriz territorial. B) Condrocito con características apoptóticas en el núcleo y en algunos de los componentes del citoplasma (microscopio electrónico de transmisión).

Estudio ultraestructural

En el examen ultraestructural se observó un rango de alteraciones de la morfología condrocitaria, desde condrocitos prácticamente normales dentro de su laguna y rodeados por su matriz territorial, con cromatina y nucléolo conservados (fig. 2 A), hasta imágenes típicas de apoptosis, con condensación homogénea de la cromatina nuclear en agregados esféricos o semicirculares. Estos cambios se acompañaban a menudo de alteraciones de tipo apoptótico en el citoplasma, con condensación de orgánulos y fragmentación focal (fig. 2 B).

Mediante microscopía electrónica, el $13,6 \pm 7,7\%$ y el $16,7 \pm 12,0\%$ de los condrocitos obtenidos de cartílago de zonas de máxima carga y mínima carga, respectivamente, presentaban cambios apoptóticos. Tampoco en este caso se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas (tabla 1) y los intervalos de confianza demuestran que estas diferencias no serían superiores al $\pm 15\%$, aproximadamente.

Discusión

A finales de la década de los setenta se empezó a utilizar el término «apoptosis» con el fin de describir un tipo de muerte celular diferenciada, histológica y biológicamente, de la ya conocida necrosis. Las células apoptóticas presentan características morfológicas y bioquímicas entre las que se incluyen la agregación de la cromatina, la condensación nuclear y citoplásmática, y la división del citoplasma y del núcleo en cuerpos apoptóticos (vesículas delimitadas por membrana y que contienen ribosomas y mitocondrias morfológicamente conservadas y material nuclear).

Es un hecho conocido que en el cartílago articular humano adulto la pérdida de células se incrementa con la edad⁹, y también se ha observado una pérdida de la celularidad en el cartílago humano artrósico respecto al cartílago normal^{9,10}. Fruto de un mayor conocimiento de los tipos de muerte celular y de las técnicas de detección de la apoptosis surgió la pregunta de si la hipocelularidad observada en el cartílago artrósico estaba relacionada con el proceso apoptótico. En estudios llevados a cabo por diversos autores se observó que el porcentaje de células apoptóticas es mayor en la artrosis que en el cartílago normal, tanto en humanos¹¹ como en modelos de experimentación animal^{12,13}. Posteriormente, Heraud et al¹⁴ aportaron nuevos datos al realizar en cartílago humano un estudio comparativo entre el porcentaje de apoptosis obtenido en secciones de cartílago y en cultivo de condrocitos. En ambos casos se obtuvo un mayor porcentaje de células apoptóticas en cartílago artrósico respecto al normal.

Una vez demostrada la participación de la apoptosis en el proceso artrósico, y conociendo la relación de las cargas mecánicas con la artrosis, es fácil preguntarse si las diferentes cargas mecánicas de una articulación pueden o no inducir el proceso apoptótico. Mediante un modelo de experimentación animal se demostró que la sección del ligamento cruzado anterior inducía un aumento del porcentaje de condrocitos apoptóticos y que éste era proporcional a la gravedad de la artrosis¹². Más recientemente, en un estudio comparativo entre muestras de cartílago de rodilla de pacientes artrósicos y no artrósicos, Kim et al⁷ demuestran una mayor proporción de células apoptóticas en el cartílago artrósico respecto a las muestras normales, así como un mayor porcentaje de condrocitos apoptóticos en zonas lesionadas respecto a las no lesionadas de una misma rodilla artrósica.

No existen apenas trabajos que hayan relacionado, en caderas procedentes de pacientes artrósicos, las zonas de distinta carga con el grado de apoptosis. A este respecto, cabe mencionar el estudio llevado a cabo por Vignon¹⁵ en 1976, en el cual, al estudiar cabezas femorales de individuos sin artrosis, se observó una disminución en el número de condroci-

tos y en la densidad celular al aumentar la edad de los sujetos. De todos modos, dicha hipocelularidad era similar en los polos superior e inferior y, por tanto, parecía ser independiente de factores ambientales locales, como la presión en un área determinada. Aunque el trabajo de Vignon se centraba en individuos no artrósicos, podemos considerar que en nuestro estudio hemos hallado resultados concordantes, ya que no hemos encontrado diferencias en el porcentaje de células apoptóticas entre zonas de máxima y mínima presión (polo superior y polo inferior) en caderas artrósicas.

Nuestros resultados son, por otro lado, discordantes con los obtenidos por Kim et al⁷ en que, utilizando también técnicas de microscopía electrónica y TUNEL, se describió un aumento del porcentaje de condrocitos apoptóticos en las zonas lesionadas de rodillas de pacientes con artrosis respecto a las no lesionadas. Sin embargo, en este estudio la selección de muestras de cartílago para su evaluación ultraestructural no se realizaba al azar, sino que para efectuar los cortes finos se preseleccionaban en los cortes semifinos los campos en los que se visualizaba un número de células con cambios apoptóticos, lo cual quizás podría alterar el porcentaje final de condrocitos que se hallaban en apoptosis. Por otro lado, no se especifica el número de células evaluadas para el cálculo del porcentaje de células apoptóticas. Es posible que, de forma ultraestructural, las diferencias encontradas entre el trabajo de Kim y el nuestro sean debidas a una distinta evaluación de las muestras de cartílago.

La microscopía electrónica es el patrón de referencia que permite la identificación de células apoptóticas. La técnica de TUNEL, aunque ha demostrado ser una valiosa herramienta para la cuantificación de apoptosis, ofrece una mayor variabilidad (especialmente en lo que se refiere a la detección de falsos positivos). Esto podría explicar en parte las diferencias numéricas (no estadísticamente significativas) obtenidas entre ambas técnicas utilizadas en nuestro estudio.

Sería plausible pensar que en la cabeza femoral el comportamiento de los condrocitos es diferente al de otras articulaciones, como la rodilla. De hecho, basándose en estudios previos y en los suyos propios, Vignon¹⁵ ya sugirió que el comportamiento de los condrocitos es distinto en la cabeza femoral respecto al cóndilo femoral y que, por tanto, dicho comportamiento puede ser diferente en función de la articulación que se evalúe. En nuestro modelo, los distintos grados de lesión del cartílago podrían estar directamente relacionados con un incremento de la degradación de la matriz extracelular por parte de metaloproteasas y/o con una disminución de la síntesis de proteínas por parte de los condrocitos. La apoptosis quizás no tenga un papel tan predominante como desencadenante de las lesiones artrósicas en la cabeza femoral respecto al encontrado en rodilla en los diversos trabajos publicados⁷.

En conclusión, los resultados de este estudio no apoyan la existencia de una relación directa entre el porcentaje de condrocitos apoptóticos y las zonas de máxima y mínima carga de la articulación coxofemoral de pacientes artrósicos, a pesar de que se sabe que las fuerzas físicas están relacionadas con la apoptosis. Los diferentes grados de lesión cartilaginosa en esta articulación podrían ser consecuencia de procesos apoptóticos sumados a otros mecanismos diferentes a los de la muerte celular programada y relacionados con el sistema enzimático responsable de la degradación de la matriz extracelular. Sería necesario realizar posteriores estudios con el fin de corroborar esta hipótesis y demostrar cuáles son los mecanismos implicados en la destrucción de la matriz extracelular. Por otro lado, nuestros resultados, en comparación con los obtenidos en otros estudios, podrían reabrir el debate sobre si los condrocitos se comportan de forma distinta en las distintas articulaciones y áreas de presión.

Bibliografía

- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
- Lotz M, Hashimoto S, Kühn K. Mechanisms of chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis and Cartilage* 1999;7:389-91.
- Horton WE Jr, Feng L, Adams C. Chondrocyte apoptosis in development, aging and disease. *Matrix Biol* 1998;17:107-15.
- Li B, Aspden RM. Composition and mechanical properties of cancellous bone from the femoral head of patients with osteoporosis or osteoarthritis. *J Bone Miner Res* 1997;56:247-54.
- Eggli PS, Hunziker EB, Schenk RK. Quantitation of structural features characterizing weight and less-weight-bearing regions in articular cartilage: a stereological analysis of medial femoral condyles in young rabbits. *Anatom Rec* 1988;222:217-27.
- Urban JG. The chondrocyte: a cell under pressure. *Br J Rheumatol* 1994;33:901-8.
- Kim HA, Lee YJ, Seong SC, Choe KW, Song YW. Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis. *J Rheumatol* 2000;27:455-62.
- Reith A, Mayhew TM. Stereology and morphometry in electron microscopy. New York: Hemisphere Publishing Co., 1988.
- Mitrovic DM, Quintero M, Stankovic A, Ruckerwaert A. Cell density of adult human femoral condylar articular cartilage. Joints with normal and fibrillated surfaces. *Lab Invest* 1983;49:309-16.
- Mankin H, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips (II). Correlation of morphology and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am* 1971;53:523-37.
- Blanco FJ, Guitian R, Vázquez-Martul E, De Toro FJ, Galdo F. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis: a possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum* 1998;41:284-9.
- Hashimoto S, Takahashi, Amiel D, Coutts RD, Lotz M. Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:1266-74.
- Hashimoto S, Ochs RL, Rosen F, Quach J, McCabe G, Solan J, et al. Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3094-9.
- Héraud F, Héraud A, Harmand M-F. Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 2000;59:959-65.
- Vignon E, Arlot M, Patricot LM, Vignon G. The cell density of human femoral head cartilage. *Clin Orthop* 1976;121:303-8.