

FACTORES REGULADORES DE LA OSIFICACIÓN ENDOCONDRALE

DRA. VERÓNICA MERICQ G.
ENDOCRINÓLOGA INFANTIL.
DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA.
CLÍNICA LAS CONDES.
PROFESOR ASOCIADO.
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES MATERNO INFANTIL (IDIMI).
FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE CHILE.

RESUMEN

El crecimiento longitudinal ocurre por osificación endocondral. La condrogénesis y osificación requieren de la expresión normal y participación organizada y secuencial de todos los factores sistémicos y locales, que deben actuar en conjunto y durante el tiempo necesario para lograr el óptimo crecimiento longitudinal. Se revisan mecanismos de acción de factores sistémicos y locales, y algunas displasias óseas secundarias a mutaciones de factores de regulación de osificación endocondral.

SUMMARY

Longitudinal bone growth occurs by the process of endochondral bone ossification. Chondrogenesis and ossification require the normal expression and organized sequential participation of all systemic and local growth factors. These factors must interplay during a certain period of time to obtain optimal longitudinal bone growth. Herein, we review the mechanism of action of systemic and local growth factors. In addition some skeletal dysplasias secondary to mutations of endochondral bone ossification factors are presented.

SISTEMAS DE OSIFICACIÓN

La formación ósea se inicia con la condensación de células mesenquimáticas, que en algunas zonas se diferencian a osteoblastos, que van a dar origen a la osificación membranosa, como ocurre, por ejemplo, en los huesos del cráneo. En otras zonas estas células mesenquimáticas

dan origen a condrocitos, los que van a generar la osificación endocondral. Estas células se diferencian a distintos fenotipos celulares que expresan proteínas características, si por ejemplo, los osteoblastos expresan el colágeno tipo I, mientras que los condrocitos expresan el colágeno tipo II.

- En la osificación endocondral, lo primero que ocurre es una condensación de las células mesenquimáticas; luego, estas células en condensación se diferencian a condrocitos, que después dejan de proliferar en el centro, formando los condrocitos hipertróficos. Los condrocitos hipertróficos adyacentes al pericondrio se tornan osteoblastos formando un collar óseo y dirigen la formación de la matriz mineralizada, atraen vasos sanguíneos y sufren apoptosis. Los osteoblastos de la capa esponjosa van a acompañar la invasión vascular, formando la esponjosa primaria. Posteriormente, los condrocitos continúan proliferando, alargando el hueso, mientras que los osteoblastos de la esponjosa primaria se transforman en precursores del hueso trabecular y los osteoblastos del collar óseo forman el hueso cortical, para finalizar con dos extremos. Habrá, entonces, una zona con los centros de osificación secundaria, la esponjosa, la médula ósea y el cartílago de crecimiento, en los dos extremos del hueso.

El crecimiento longitudinal ocurre principalmente en el cartílago de crecimiento y los participantes son: la condrogénesis, que ocurre en los cartílagos; y la osificación, que ocurre en los extremos. En la condrogénesis participan tres elementos que determinan el tamaño del cartílago epifisiario: la proliferación de los condrocitos, la síntesis de la matriz de estos condrocitos y la hipertrofia. En una muestra de cartílago de crecimiento, se observa en la zona epifisiaria del cartílago la zona de reposo,

donde están los condrocitos pequeños; la zona proliferante, donde se organizan como pilas de monedas y la zona hipertrófica, donde los condrocitos aumentan de tamaño y van a apoptosis, para llegar a la zona de invasión vascular y sufrir la transformación a osteoblastos.

La matriz extra celular que rodea al cartílago de crecimiento tiene algunas características: los condrocitos están rodeados por esta matriz, que es el soporte necesario y contiene moléculas de matriz, enzimas y factores de crecimiento que difunden a través de esta matriz para así interactuar en las distintas zonas del cartílago de crecimiento. Estas moléculas de matriz son responsables de la integridad de la matriz que tiene el cartílago de crecimiento y contiene moléculas tipo colágeno y algunas tipo proteoglicanos.

FACTORES SISTÉMICOS QUE REGULAN EL CRECIMIENTO LONGITUDINAL

Los factores que regulan el crecimiento longitudinal se clasifican en: factores sistémicos o factores paracrinos/ autocrinos. Primero se analizarán algunos factores sistémicos; se mostrará cómo ellos logran actuar a nivel del cartílago de crecimiento difundiendo a través de la matriz y cómo se produce la interacción con las moléculas paracrinas y autocrinas, que tiene una compleja regulación intracartilago.

La hormona de crecimiento, estimula a nivel hepático la síntesis del factor insulinosímil IGF-1, que es el principal factor que estimula el crecimiento en el período postnatal. Esta acción de la hormona de crecimiento parece estar modulada en forma sistémica a través de la regulación de la síntesis de IGF-1 hepática, aunque también se sintetiza IGF-1 a nivel local. Existen receptores en el cartílago y también proteínas transportadora para estas IGF en el cartílago de crecimiento. Sin embargo, la contribución de la IGF-1 sistémica al crecimiento del cartílago de crecimiento se ha cuestionado recientemente, debido a estudios en ratones con ausencia de expresión de IGF-1 hepático es decir, ratones *knock out* para este IGF-1 solo en hígado, en los que se observó que no existían diferencias en su crecimiento, con el ratón de tipo "wild" o normal (1). En humanos, el único paciente con delección del gen de IGF-1 tuvo un peso de nacimiento de 1400 gramos y presentó una reducción muy marcada del crecimiento prenatal y postnatal (2). Por lo tanto, no queda claro cuál es, realmente, la contribución de la IGF-1 local al crecimiento del ser humano.

Las hormonas tiroideas, T3 y T4, en menor proporción, son fundamentales en la maduración ósea, como lo demuestra el hecho de que los pacientes hipotiroideos tienen un retraso de su edad ósea, que es mayor en los casos de hipotiroidismo grave. Las hormonas tiroideas tienen acciones indirectas y directas. Entre las indirectas, la T3 induce la síntesis de IGF-1 en los condrocitos y regula la expresión del receptor de la hormona de crecimiento y de su proteína transportadora, regulando, de esta forma, la acción de la hormona de crecimiento a nivel del cartílago. En cuanto a las acciones directas, los receptores para hormonas tiroideas TRF alfa y TRF beta se expresan en los condrocitos,

en la zona de reposo y en la zona proliferativa; la T3 estimula el reclutamiento de las células de las zonas de reposo, es decir, el paso de los condrocitos pequeños hacia la zona proliferante, y facilita la diferenciación de los condrocitos, mientras que la T4 induce la diferenciación de condrocitos hipertróficos.

Los glucocorticoides enlentecen el crecimiento, al inhibir la proliferación de los condrocitos y la síntesis de matriz; a su vez, disminuyen el tamaño óseo, es decir, disminuyen todos los componentes del hueso. Estos efectos son producidos en forma indirecta por vía sistémica, y también a nivel local, por efecto directo del corticoide en la expresión del receptor de hormona de crecimiento y del receptor de IGF-1 local. También influyen en la actividad de desyodasa a nivel local, en el cartílago.

Los estrógenos estimulan la maduración del cartílago de crecimiento lo que se ha llamado "senescencia epifisiaria". El papel directo de los esteroides sexuales en el crecimiento era desconocido hasta que se publicó por Smith y cols. el año 1994 (3) el caso de un paciente que consultó a los 28 años de edad por dolor de rodillas bilateral. El traumatólogo solicitó una radiografía de rodilla y observó que no existía fusión de los cartílagos de crecimiento. La altura de este paciente era superior a dos metros y el cálculo de la edad ósea mediante radiografía de mano era concordante con una edad de 15 años. El estudio de este individuo demostró que tenía un retraso en la maduración ósea debido a la ausencia del receptor de estrógeno alfa a nivel del hueso. No se ha descrito otro caso como éste. Un modelo similar se observa en los casos de deficiencia de la enzima aromatasa, que convierte los andrógenos en estrógenos; su déficit se asocia a deficiencia de estrógenos, lo que da origen a individuos de gran estatura y portadores de osteoporosis y retraso grave de la maduración ósea, además de una composición corporal feminoide (4).

El efecto del estrógeno a nivel local fue investigado por el grupo de Jeff Baron en cartílago de conejo, que es parecido al modelo humano. Para ello se utilizaron conejas ooforectomizadas, es decir, sin exposición a estrógeno, las que se dividieron en un grupo formado por las que recibieron estrógenos y un grupo control (5). Luego se observaron las placas de crecimiento no fusionadas y se encontró que en las conejas del grupo control no existía fusión de la placa de crecimiento, tanto en la tibia como en el fémur y la tibia distal. Al agregar estrógeno se producía la fusión de las placas epifisiarias y la velocidad de crecimiento disminuía claramente, permaneciendo algo más elevada en el grupo que no tenía estrógeno. Este experimento ilustra los mecanismos de fusión epifisiaria que ocurren durante la pubertad normal.

FACTORES REGULADORES AUTOCRINOS Y PARACRINOS

Existen muchos factores paracrinos y autocrinos relacionados con el crecimiento; en esta presentación se revisarán algunos de ellos, en especial aquellos que están relacionados con algunas displasias esqueléticas, que son causadas por mutaciones de estos factores.

La proteína *indian hedgehog*, que pertenece a la familia de las proteínas *hedgehog*, que son morfógenas, es decir, indican como va a ir creciendo y hacia dónde se va a ir desarrollando el esqueleto. La proteína *indian hedgehog* se expresa en los condrocitos pre hipertróficos y estimula la proliferación de los condrocitos, retrasando su paso a hipertróficos, de modo que es responsable de mantener un *pool* grande de condrocitos proliferantes; y, por otra parte, controla la diferenciación de los osteoblastos. En modelos animales en donde se ha hecho *knockout* de esta proteína se observa que hay huesos normales hasta la etapa de condensación, pero los elementos cartilagosos posteriores son pequeños, por una disminución en la proliferación y por la presencia de mayor proporción de condrocitos hipertróficos.

El PTH related peptide (PTHrp) es un péptido relacionado con PTH y proviene de la duplicación del gen primitivo de PTH, por eso tiene esta denominación. Este gen se localiza en el cromosoma 12, en una posición similar a la del gen de PTH en el cromosoma hermano, en el 11. El RNA sufre *splicing* alternativo, lo que origina tres isoformas distintas, que son tejido específicos. Los primeros ocho aminoácidos de la zona aminoterminal del PTHrp son idénticos a los de PTH, lo que permite que ambos péptidos se unan al mismo receptor; éste estimula la proliferación de los condrocitos y su ausencia o la de su receptor produce diferenciación acelerada de los condrocitos y un cartílago de crecimiento desorganizado. Como ejemplos de patologías causadas por alteraciones de esta vía de señalización están: la condrodisplasia de Blomstrand, que es una mutación inactivante del receptor de PTHrp (6) y la condrodisplasia metafisiaria de Jansen, que se produce por mutaciones activantes del receptor (7). Los pacientes que presentan condrodisplasia de Blomstrand tienen muy baja estatura y ausencia de diferenciación de los condrocitos, debido a una mutación inactivante de este receptor; existen cinco reportes en la literatura, cuatro con un caso y uno con dos casos. La mortalidad es perinatal, *in útero* o inmediatamente después de nacer y los individuos afectados tienen un grado de maduración esquelética muy avanzada. La condrodisplasia metafisiaria de Jansen se produce por mutaciones activantes del receptor de PTHrp y se caracteriza por baja estatura y osificación acelerada, metáfisis irregulares y anchas, deformidad en flexión de las articulaciones, tórax pequeño, hipercalcemia y retraso del crecimiento intrauterino.

Los factores de crecimiento fibroblástico constituyen una gran familia, compuesta por 22 miembros que interactúan con alrededor de cuatro tipos de receptores en todo el organismo y son muy importantes en la diferenciación de todos los tejidos; son los principales reguladores del crecimiento embrionario. El factor fibroblástico FGF-18 (*Fibroblast Growth Factor*) es el más importante en la zona del cartílago de crecimiento; los receptores tipo 1, 2 y 3 se expresan en el cartílago de crecimiento: el tipo 3 se encuentra principalmente en los condrocitos proliferantes; el receptor tipo 1, en los pre hipertróficos, hipertróficos y en pericondrio; y el tipo 2, en pericondrio, periostio y esponjosa primaria. El FGF-18 actúa en el FGFR3, es decir, en el receptor tipo 3, disminuyendo la proliferación de los condrocitos; en el FGFR1, retrasando la diferenciación terminal de estos condrocitos hipertróficos; y en los

receptores tipo 1 y 2, retrasando el desarrollo osteoblástico. Cada uno, entonces, tiene un receptor específico que permite que actúe sobre una zona especial del cartílago, teniendo una acción diferente.

Las acondroplasias son un ejemplo de mutación del receptor tipo 3; es una mutación activante del receptor tipo 3 de FGF, que está ubicada en la zona extracelular y se manifiesta por talla baja severa, huesos anchos con metáfisis anchas y cortas (8). En el caso de la mutación que es un poco menos grave se produce la hipocondroplasia, esto es una mutación activante, pero transmembranosa; en la hipocondroplasia se encuentra una epífisis con alargamiento bulboso del radio y elongación del proceso estiloides, elongación del peroné distal, ensanchamiento metafisiario en varo y epífisis distal cuadrada. Esta es causa frecuente de confusión con el diagnóstico de talla baja idiopática en los casos que son menos graves.

Las proteínas morfogenéticas óseas. La familia de las BMP (*Bone Morphogenetic Protein*), también llamadas *growth differentiation factors*, se compone de 15 miembros, que son parte de la superfamilia de las TGF beta y tienen numerosas y diversas funciones, dependiendo del nivel donde actúan, en el cartílago de crecimiento. La BMP 2, 3, 4, 5, 7 se expresan en pericondrio, la BMP 2 y 6 en condrocitos hipertróficos y a BMP 7 en Condrocitos Proliferantes. Todas la BMP incrementan la proliferación. La BMP 2 además retrasa la diferenciación terminal de hipertróficos y en condrocitos hipertróficos las BMPs aumentan la señalización del *indian hedgehog*.

La condrodisplasia acromesomélica es una displasia esquelética cuya causa es una mutación de la BMP5, que es un tipo de proteína morfogenética, o del receptor tipo 1b de las proteínas morfogenéticas. Esta patología se caracteriza por un acortamiento intenso de los miembros, más grave hacia distal, con dedos muy pequeños por una falla en la extensión de las conizaciones que los forman, por lo tanto, estos pacientes tienen miembros distales cortos, prominencia frontal, cifosis dorsal marcada, dedos cortos, piel redundante y epífisis cónicas en la radiografías. La braquidactilia tipo C, que se debe a la mutación del factor de diferenciación tipo 5, es otro ejemplo de displasia esquelética causada por estos factores (9). La sinostosis múltiple y el sinfangismo también son causa de talla baja y son causadas por un antagonista de las BMP *in vivo* (10). En este caso el paciente tiene hipoplasia del ala nasal, fusión múltiple de las uniones interfalángicas, clino y braquidactilia (dedos cortos), anomalías vertebrales y sordera de conducción por fusión de los huesos del oído medio.

La mutación selectiva de la proteína quinasa tipo 2 GMP cíclico dependiente se describió en la revista *Science* en 1996, Pfeifer et al. (11) en una publicación sobre el estudio de esta mutación en el intestino de ratas cuyo objetivo era ver cómo interactuaba esta proteína quinasa con las enterotoxinas y cómo éstas producían la diarrea secretora. Para ello, mutaron en forma selectiva la proteína quinasa GMP cíclico dependiente en el intestino, para comprobar que la enterotoxina actuaba a través de esta proteína quinasa a nivel intestinal; entonces

descubrieron que la mutación originaba ratones más pequeños, con colas más cortas, gran cifosis dorsal, vértebras bastante más cortas y huesos largos más cortos. El tamaño entre la nariz y la cola era 16% menor; el tamaño de los huesos largos, 30% menor y el tamaño de las demás vísceras y órganos era similar.

Sobre la base de la publicación mencionada, se planteó que la proteína quinasa tipo 2 podría estar influenciando la osificación endocondral. Esta proteína quinasa 2 es estimulada por el GMP cíclico cuya producción intracelular es estimulada por péptidos natriuréticos. Existen tres péptidos natriuréticos: tipo A, tipo B y tipo C. El tipo A es el atrial, que tiene alta importancia en la regulación del volumen intracelular; el tipo B es el péptido de tipo cerebral, que tiene más importancia y expresión a nivel del cerebro; y el tipo C se expresa a nivel del cartílago de crecimiento e interactúa con el receptor tipo B. El péptido natriurético tipo C (CNP) interactúa fundamentalmente con el receptor tipo B, produciendo aumento de GMP cíclico intracelular e interacción con la proteína quinasa. En cultivos aislados se demostró que los péptidos natriuréticos tienen funciones diferenciadas: a nivel de los osteoblastos disminuyen la proliferación y aumentan la diferenciación; a nivel de los osteoclastos estimulan la actividad resorptiva; y a nivel de los condrocitos disminuyen la proliferación. Se cultivaron metatarsos de fetos de rata de 20 días de gestación, que en total dura 21 días, en un medio sin suero, con concentraciones crecientes de CNP. Se midió diariamente la longitud ósea, para verificar el crecimiento de los huesos y se encontró que, a medida que aumentaba la concentración de CNP, se lograba mayor crecimiento óseo. Se encontraron resultados similares al utilizar concentraciones crecientes de GMP cíclico. Este crecimiento se producía principalmente por aumento de la proliferación en la zona proliferativa, demostrado a través de la captación de timidina, aumento de la hipertrofia celular, demostrado a través de micrómetro y aumento de la incorporación de matriz, demostrado mediante la incorporación de sulfato (12).

Posteriormente se publicó que el ratón *knockout* de CNP se caracterizaba por un animal enano; las placas de crecimiento del ratón normal tenían un cartílago de crecimiento mucho más grueso que el del ratón mutado, lo que demostraba que el CNP es un factor importante en la regulación del cartílago de crecimiento (13). Después se observó que los ratones *knockout* para CNP se rescataban si se hacía un cruce en el cual estos ratones sobreexpresaban CNP en la placa epifisiaria. El ratón *knockout* para CNP era pequeño en tamaño, pero cuando se hacía sobreexpresión de este péptido se rescataba el tamaño y el ancho del cartílago de crecimiento, aunque su morfología era un poco desordenada (13). Posteriormente, en el año 2004 se estudió un modelo de acondroplasia de ratón, en el cual se generaba una mutación activante del receptor tipo 3 de FGF, que es lo que produce normalmente la acondroplasia; y se demostró que la sobreexpresión de CNP podía rescatar el fenotipo de estas ratas (15).

El rol crítico del GMP cíclico y los péptidos natriuréticos en la osificación endocondral se comprobó mediante un modelo en el que se

estudiaba el rol del receptor tipo B, que es donde actúa el CNP; al hacer el *knockout* del receptor donde actúa el CNP se producía un ratón pequeño y se alteraba la función reproductiva de las ratas hembra. Posteriormente se comprobó que este factor tiene importancia en el ser humano en la displasia ósea acromesomélica tipo Maroteaux (16) que se caracteriza por una talla baja muy grave y se mapea en la zona donde se encuentra el receptor tipo beta dbSNP. Para localizar el gen causante de esta displasia, los investigadores secuenciaron a 21 familias que tenían este tipo de displasia y encontraron mutaciones homocigotas de distinto tipo en todas ellas. El adulto afectado presenta acortamiento y conicidad de las epífisis, con dedos muy pequeños; pero lo interesante es que el promedio de estatura de los heterocigotos que no estaban afectados por el síndrome era menor que el promedio de los que no eran portadores. Recientemente, en Olney y cols. en el *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (17) apareció un artículo sobre la importancia de los heterocigotos como probable causa de talla baja idiopática; es decir, aquellos pacientes con talla baja que no se logran catalogar podrían ser portadores de una mutación heterocigota en este receptor. En esta publicación se estudiaron 39 miembros de una familia con un miembro afectado por esta displasia acromesomélica debido a la mutación homocigota y se observó que los portadores tenían una estatura de -1,8 desviaciones estándar en promedio, mientras que los no portadores tenían una estatura de -0,4 desviaciones estándar.

BIBLIOGRAFÍA

1. Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jun 22;96(13):7324-9.
2. Woods KA, Camacho-Hübner C, Savage MO, Clark AJ. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med*. 1996 Oct 31;335(18):1363-7.
3. Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H., Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS. Estrogen Resistance Caused by a Mutation in the Estrogen-Receptor Gene in a Man. *N Engl J Med* 1994; 331:1056-1061, Oct 20, 1994.
4. Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995 Dec;80(12):3689-98.
5. Martina Weise, Stacy De-Levi, Kevin M Barnes, Rachel I Gafni, Veronica Abad and Jeffrey Baron. Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *PNAS*; vol. 98 no. 12: 6871-6876, Jun 5, 2001.
6. Jobert AS, Zhang P, Couvineau A, Bonaventure J, Roume J, Le Merrer

M, Silve C Absence of functional receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Blomstrand chondrodysplasia. *J Clin Invest.* 1998 Jul 1;102(1):34.

7. Schipani E, Kruse K, Jüppner HA constitutively active mutant PTH-PTHrP receptor in Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia. *Science.* 1995 Apr ;268(5207):98-1040.

8. Bellus GA, Heferson TW, Ortiz de Luna RI, et al. Achondroplasia is defined by recurrent G380R mutations of FGFR3. *Am J Hum Genet.* 1995 Feb;56(2):368-73.

9. Everman DB, Bartels CF, Yang Y, Yanamandra N, Goodman FR, Mendoza-Londono JR, Savarirayan R, White SM, Graham JM Jr, Gale RP, Svarch E, Newman WG, Kleckers AR, Francomano CA, Govindaiah V, Singh L, Morrison S, Thomas JT, Warman ML. The mutational spectrum of brachydactyly type C. *Am J Med Genet.* 2002 Oct 15;112(3):291-6

10. Dawson K, Seeman P, Sebald E, King L, Edwards M, Williams J 3rd, Mundlos S, Krakow D. GDF5 is a second locus for multiple-synostosis syndrome. *Am J Hum Genet.* 2006 Apr;78(4):708-12

11. Pfeifer A, Aszodi A et al. Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science.* 1996 Dec 20;274(5295):2082-6.

12. Mericq V. et al. Regulation of fetal rat bone growth by C-type natriuretic peptide and cGMP. *Ped Research* 2000,47(2): 189-193.

13. Chuscho H et al. Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Mar 27;98(7):4016-21. Epub 2001 Mar 20

14. Yasoda A, et al. Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat Med.* 2004 Jan;10(1):80-6. Epub 2003 Dec 14.

15. Tamura N et al. Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Dec 7;101(49):17300-17305.

16. Bartels CF Mutations in the transmembrane natriuretic peptide receptor NPR-B impair skeletal growth and cause acromesomelic dysplasia, type Maroteaux. *Am J Hum Genet.* 2004 Jul;75(1):27-34. Epub 2004 May 14.

17. Olney R. et al. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (NPR2) are associated with short stature. *J of Clin endocrinol metab* 91(4): 1218-1232, 2006.