

La enigmática señalización del ácido lisofosfatídico durante el desarrollo de las extremidades, la artritis reumatoide y la osteoartritis

Roberto Sánchez-Sánchez,* Yazziel Melgarejo-Ramírez,*
Clemente Ibarra-Ponce de León,* Cristina Velasquillo-Martínez,*
Diana Escalante-Alcalde†

* Instituto Nacional de Rehabilitación, Laboratorio de Biotecnología, Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados (CENIAQ).

† División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México.

Dirección para correspondencia:
Roberto Sánchez-Sánchez
Instituto Nacional de Rehabilitación,
Laboratorio de Biotecnología,
Centro Nacional de Investigación y
Atención de Quemados (CENIAQ)
Calzada México-Xochimilco Núm.
289, Col. Arenal de Guadalupe,
14389, Delegación Tlalpan,
México, D.F.

Diana Escalante-Alcalde
División de Neurociencias, Instituto
de Fisiología Celular, Universidad
Nacional Autónoma de México
Circuito Exterior s/n, Ciudad
Universitaria, Coyoacán, 04510,
México, D.F.

Recibido: 30 de noviembre de
2013.

Aceptado: 4 de abril de 2014.

Este artículo puede ser consultado
en versión completa en:
<http://www.medigraphic.com/rid>

Palabras clave: Ácido
lisofosfatídico, receptores
acoplados a proteínas G,
desarrollo de la extremidad,
osteoartritis, artritis reumatoide.

Key words: *Lisophosphatidic acid, G-protein coupled receptors, limb development, osteoarthritis, rheumatoid arthritis.*

Resumen

El ácido lisofosfatídico (LPA, del inglés *lysophosphatidic acid*) es un lípido bioactivo que tiene la capacidad de unirse a receptores acoplados a las proteínas G y mediar a través de ellos distintas respuestas celulares tales como: proliferación, migración, apoptosis y diferenciación celular. En recientes años este lípido se ha visto involucrado en patologías como artritis reumatoide y osteoartritis; sin embargo, evidencias sugieren que también puede jugar un papel importante durante el desarrollo de las extremidades, así como de las articulaciones. Esta breve revisión aborda un panorama general de los procesos en los que se ha visto involucrado el LPA tanto en las patologías mencionadas y su posible papel en el desarrollo de la extremidad.

Abstract

Lisophosphatidic acid (LPA) is a bioactive lipid that binds to G-protein coupled receptors and induces a variety of cell responses, including proliferation, differentiation, migration and apoptosis. Over the last few years, the behaviour of this lipid has been associated to rheumatoid arthritis and osteoarthritis. However, some evidence suggests that LPA can play an important role during limb and joint development. Present review describes the processes in which LPA has been related to the above mentioned pathology and its possible roles on limb development.

Introducción

Diversas vías de transducción se han visto involucradas en el desarrollo de las extremidades durante el desarrollo embrionario, así como en patologías tales como la osteoartritis (OA) y la artritis reumatoide (AR). Dentro de las vías de señalización estudiadas se encuentran las de la familia *Int/Wingless* (Wnt), hedgehog (HH), los factores de crecimiento fibroblástico (Fgf) y miembros de la familia del factor de crecimiento transformante- β (Tgf- β).¹ Algunas de estas vías participan en la generación de las articulaciones incluyendo la formación de cartílago articular. En la extremidad, los condrocitos se generan en etapas tempranas del desarrollo y hasta la pubertad, sin embargo, su capacidad regenerativa se vuelve casi nula conforme la edad avanza, razón por la cual la OA y la AR son enfermedades progresivas. En esta breve revisión se describen y discuten datos que sugieren el importante papel regulatorio que podría tener el ácido lisofosfatídico (LPA) en el desarrollo de las extremidades, en particular las articulaciones; así como en la progresión de la OA y la AR.

El ácido lisofosfatídico

El ácido lisofosfatídico (LPA, 1- o 2 acil-*sn*-glicerol-3-fosfato) es un lisofosfolípido endógeno compuesto de una cadena de ácidos grasos unida a un glicerol y un grupo fosfato. Se dice que es biológicamente activo dado que se une a receptores específicos de membrana acoplados a las proteínas G. Estos receptores se expresan en una gran variedad de células y están involucrados en diversas funciones celulares como migración, proliferación, muerte y diferenciación celular.²⁻⁴ Este lípido puede ser generado por enzimas como la autotaxina (Atx) o lisofosfolipasa D (LysoPLD), la fosfolipasa A2 (PLA2) y la monoacilglicerol cinasa (MAG cinasa). La enzima Atx es la principal responsable de la síntesis del LPA extracelular y cataliza la remoción del grupo colina de la lisofosfatidilcolina (LPC) para formar el LPA. Hoy en día, se han caracterizado seis receptores específicos para este lípido (LPA₁₋₆) y cada uno de ellos puede iniciar cascadas de señalización mediante la activación de las proteínas G_i, G_q, G_{12/13} y G_s.⁵⁻⁷ A su vez, cada proteína G puede activar moléculas que inducen diferentes vías de señalización como la de Rho, asociada con migración; PI3K, involucrada en proliferación; PLC, relacionada con cambios en la morfología y secreción celular; PKC, importante para procesos de diferenciación celular y, la adenilato ciclasa, la cual participa en la adhesión celular, entre otras

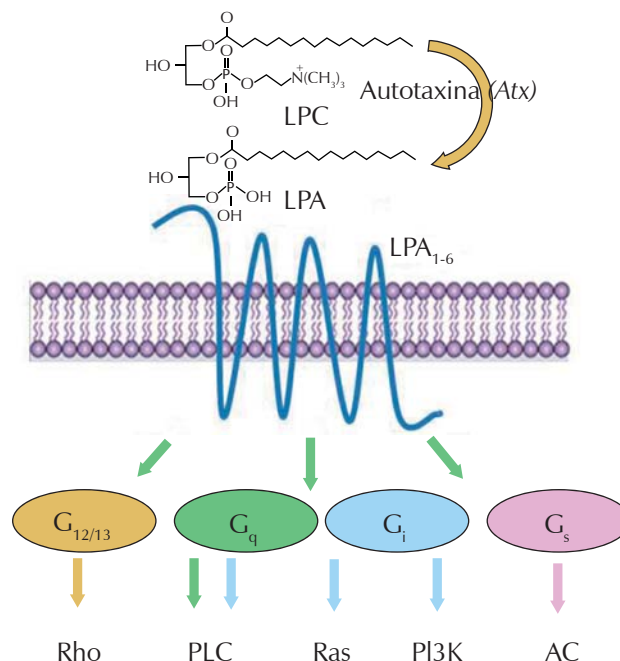


Figura 1. Formación de ácido lisofosfatídico (LPA) a partir de fosfatidil colina (LPC) mediante la autotaxina (ATX). El LPA es capaz de unirse a 6 distintos receptores acoplados a proteínas G (LPA₁₋₆) mediante los cuales activa distintas respuestas celulares dependiendo de la proteína G acoplada.

(Figura 1).⁸⁻⁹ Es importante mencionar que por décadas se ha descrito a los lípidos como simples componentes estructurales de la membrana plasmática, sin embargo, el LPA junto con otros lípidos tienen la propiedad de funcionar como «factores de crecimiento» al unirse a sus receptores de membrana y señalizar distintas respuestas celulares. El LPA puede ser producido por la Atx que se encuentra en la membrana plasmática y liberarse al espacio extracelular, por lo que dicho lípido puede tener una acción autocrina o paracrina.

El LPA y su posible papel durante el desarrollo de las extremidades

Los patrones de expresión de los receptores del LPA y de la Atx durante el desarrollo de la extremidad sugieren la importancia del LPA durante la morfogénesis de la misma. Los receptores LPA₁₋₅ se expresan durante las primeras etapas de la formación de la extremidad del ratón, y algunos de ellos coinciden con los patrones de expresión de moléculas que dirigen la polaridad y la diferenciación de estructuras específicas en la extremidad (Figuras 2 y 3). Para entender la posible

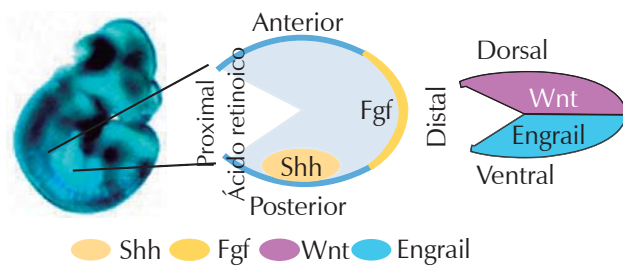


Figura 2. Representación de un embrión de ratón a los 10.5 días de gestación (E10.5) donde se observa el primordio que dará origen a la extremidad anterior. En amarillo se muestra la cresta ectodérmica apical (AER; Apical Ectodermal Ridge) donde se expresa Fgf, en rosa se muestra la zona de actividad polarizante que es definida por la expresión de Shh, mientras que en la parte proximal las somitas transforman al retinal en ácido retinoico. De lado derecho observamos la extremidad en posición dorso-ventral donde Wnt define la parte dorsal y Engrail la parte ventral. **Imagen en color en: www.medigraphic.com/rid**

relevancia del LPA, se describe a continuación el patrón de expresión y la función de moléculas clave en la formación de la extremidad de ratón.

De manera general podemos decir que Sonic hedgehog (Shh), los factores de crecimiento fibroblástico (FGF), el ácido retinoico (RA), las proteínas morfogénicas de hueso (BMP) y de la familia *Int/Wingless* (Wnt) están activas durante la formación temprana de las extremidades y son indispensables para lograr su desarrollo en vertebrados.¹⁰ Durante las etapas tempranas del desarrollo de la extremidad del ratón (alrededor del día 10 de gestación), las células mesenquimales multipotentes son capaces de adquirir identidad, de acuerdo con la posición en la que se encuentran. Las moléculas antes mencionadas son las principales reguladoras de esta identidad y por lo tanto generan los tres ejes de polaridad: proximal-distal, anterior-posterior y dorsal-ventral. El FGF8 se encuentra expresado en la cresta ectodérmica apical (AER), mientras que la retinaldehído deshidrogenasa produce RA en las somitas generando gradientes de concentración inversos; ambos gradientes son importantes para establecer el eje proximal-distal (P-D).¹¹⁻¹³ Por su parte, la expresión de Shh define la zona de actividad polarizante (ZPA) en la región posterior del primordio y su gradiente establece el eje antero-posterior (A-P).¹⁴ Las células del mesénquima requieren de la señalización de Wnt7a proveniente del ectodermo dorsal y la actividad de Engrailed 1 (En1) proveniente del ectodermo

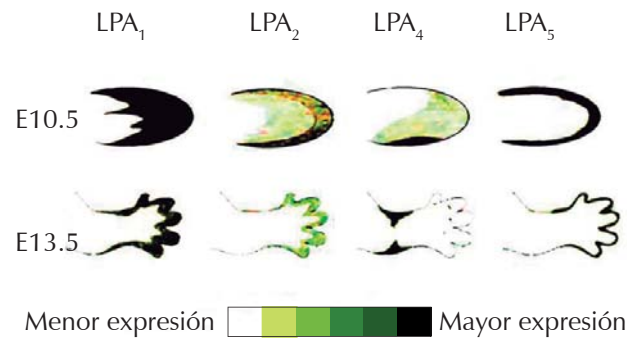


Figura 3. Expresión de los receptores para LPA_{1,2,4 y 5} en la extremidad de embriones de 10.5 y 13.5 días de gestación. El color negro ejemplifica mayor expresión mientras que el amarillo una menor expresión. **Imagen en color en: www.medigraphic.com/rid**

ventral para que se establezca el eje dorso-ventral (D-V) (Figura 2).¹⁵

Dentro de todas estas señales que regulan el posicionamiento de los ejes, es claro que la señalización mediada por factores Fgf regula la población de progenitores mesenquimales cercanos a la AER, además de contrarrestar la señalización del AR.^{11,16-18} Alrededor del día 9.5 de gestación del ratón, Fgf8 y Wnt3a se encuentran expresados en el mesénquima de la extremidad y mantienen a estas células en un estado proliferativo y multipotente. Conforme la extremidad crece, Wnt3a se expresa en el ectodermo y Fgf8 se restringe a la cresta ectodérmica apical. Esto tiene como resultado que las células que no reciben ambas señales puedan expresar Sox9 y comprometerse al linaje condrogénico en la región de los dígitos, mientras que las células del ectodermo que reciben las señales de Wnt presentan un estado proliferativo bajo y se comprometen a dar origen a la epidermis y anexos cutáneos. Las células en la parte distal que aún conservan la señalización de Wnt proveniente del ectodermo, además de las señales de Fgf8 proveniente de la AER son capaces de mantener su capacidad multipotencial.¹⁹

Shh es uno de los morfógenos más importantes que participa en la determinación de la identidad de los dígitos durante el desarrollo de la extremidad. La identidad de cada dígito es resultado de la expresión en el espacio y en el tiempo de Shh que define la ZPA. Además de Shh, se ha visto que durante el crecimiento de la extremidad, las células del mesénquima interdigital memorizan información posicional gracias a la señalización de las BMPs. Este factor actúa sobre la punta distal del primordio del dígito (llamado regiones de formación de falanges-PFRs) y se expresa justo

debajo del AER. Se ha sugerido que BMP ayuda en la determinación de los dígitos mediante un mecanismo río abajo de Shh.^{20,21} También se ha observado que la duración de la AER, identificada por Fgf, es capaz de alterar el número de falanges que se forman. Si la AER tiene una mayor duración se generarán más falanges mientras que habrá menor número de éstas cuando la expresión de Fgf sea más corta. En este sentido, se le atribuye a este factor la función de inhibir la formación de la falange terminal.^{22,23}

Para que ocurra el crecimiento de los dígitos es necesario que exista un reclutamiento de células progenitoras indiferenciadas hacia una región de crecimiento y condensación cartilaginosa. Esta población celular es positiva al receptor BmpR1b y muestra positividad para el marcador de linaje condrogénico Sox9. Se ha visto que la señalización de BMP fosforila a Smad 1, 5 y 8 siguiendo la vía canónica.^{21,24} Además de la condensación celular y la elongación, se requiere que ocurra una segmentación para generar las distintas falanges. Para que se formen las articulaciones, las células que van a dar origen a esta región cambian de forma, volviéndose aplanadas y generando una región conocida como la interzona. Las células de la interzona comienzan a expresar Gdf5, Wnt-9a, nogina y cordina, los cuales son marcadores de la formación de las articulaciones y reducen la expresión de genes como Sox9, colágeno II y la integrina $\alpha 5 \beta 1$.²⁵⁻²⁹

En años recientes, el grupo del Dr. Ohuchi publicó un estudio sobre los patrones de expresión de los receptores LPA₁₋₅ durante el desarrollo embrionario del ratón.³⁰ A pesar de que este grupo no hace una descripción minuciosa de dichos patrones en el desarrollo de las extremidades, es claro que la expresión de estos receptores es bastante dinámica en esta estructura. A continuación se hace una descripción detallada de los patrones publicados por este grupo.

Los receptores Lpa₁₋₄ se expresan de una manera débil pero específica en el primordio de la extremidad anterior de embriones de 9.5 días de gestación.

El receptor LPA₁ se expresa con mayor abundancia en la extremidad a los 10.5 días de gestación y lo hace en la mitad distal de la extremidad anterior y casi en la totalidad del primordio posterior. Este patrón se asemeja al patrón de expresión de Wnt5a, de receptores de factores Wnt y de proteínas que responden a la señalización del Fgf8 proveniente de la AER. El LPA₂ presenta un patrón más o menos similar al del LPA₁, aunque se restringe en la porción distal y dorsal de los primordios. El LPA₄ tiene un patrón de expresión muy interesante en esta etapa, ya que se restringe a un dominio en la región posterior del primordio, lo que

sugiere que su expresión podría estar regulada por la actividad de Shh. El LPA₅ se expresa en esta etapa en la región más distal del primordio incluyendo la AER (Figura 3).³⁰ El LPA₃ no se expresa en el primordio de la extremidad en esta etapa.

A los 13.5 días de gestación se observa que la expresión de estos receptores se mantiene y adquiere localizaciones más específicas. Por ejemplo, la expresión de los receptores LPA_{1,2,4} delinea a los dígitos y los tres se expresan con mayor abundancia en la zona distal de los dígitos en desarrollo, aunque los receptores LPA_{2,4} tienen una expresión comparativamente menor a la del LPA₁ en estos dominios. Por su parte, el LPA₄ tiene un patrón que llama la atención, dado que parece expresarse en la región media donde se formarán las articulaciones de los huesos largos. En estos dominios también se expresa Atx (ver adelante), de tal forma que en ese microambiente se encuentra tanto el ligando como un receptor específico y su señalización podría estar contribuyendo a procesos como la muerte celular, y por ende, la cavitación durante la formación de la articulación.^{31,32} En esta etapa, LPA₅ sigue manteniendo su patrón de expresión en la zona distal de la extremidad. Aunque no hay muchos datos del patrón de expresión del LPA₆, el proyecto del atlas embrionario de ratón revela que también este receptor se encuentra expresado en el ectodermo de la extremidad a los 14.5 días de gestación.⁵⁹

Como se puede notar, los patrones de expresión de estos receptores sugieren el importante papel que podría tener el LPA en la determinación de distintas estructuras de la extremidad. Como ya se mencionó, el LPA activa distintas vías dependiendo de su concentración y del tipo de receptor a través del que señalice, por lo que podría desencadenar distintas respuestas celulares relacionadas con la proliferación, migración o muerte.⁹ Desafortunadamente las estrategias que se han seguido para definir la participación de la señalización mediada por el LPA en una gran variedad de contextos biológicos no han permitido establecer un papel relevante en el desarrollo de la extremidad. Por ejemplo, la inactivación del gen que codifica para la autotaxina (la principal enzima productora de LPA extracelular) es letal previamente al inicio de desarrollo de la extremidad.³³ De igual manera, la inactivación génica del LPA₁, LPA₂ o la doble inactivación de ambos receptores no muestran algún fenotipo probablemente por la redundancia funcional con otros de los receptores expresados en la extremidad (por ejemplo, LPA₄) o a la presencia de receptores para LPA aún no descritos.³⁴

La Atx se expresa en el mesénquima en la región media de los primordios de la extremidad a los 10.5-

11.5 días de gestación. En el autópodo de 12.5-13.5 días se expresa en el mesénquima subepitelial, las regiones interdigitales de las extremidades anteriores y posteriores (siendo su expresión en las regiones proximales de los interdígitos mas abundante) y en el mesénquima en condensación que dará lugar a los elementos esqueléticos prospectivos.³⁵

En etapas más avanzadas del desarrollo de la extremidad del ratón (16.5 días de gestación), la Atx se expresa en el pericondrio de los elementos esqueléticos en desarrollo como los carpos, tarsos, metacarpos o metatarsos y tendones en desarrollo, presenta además una expresión mucho más abundante en las zonas que darán origen a las articulaciones. En el pollo, durante los estadios de desarrollo HH29 y HH36, la expresión de Atx se encuentra en los mismos dominios e incluso se le ha tomado como un marcador que define esta zona. Hasta la fecha se desconoce la participación de esta enzima durante el desarrollo de la articulación.^{36,37} La formación de articulaciones ocurre mediante un mecanismo de cavitación por muerte celular. El LPA es capaz de inducir muerte celular cuando su concentración es muy elevada,^{3,32} por lo que es probable que durante el proceso de cavitación la expresión de Atx aumente la concentración de LPA y favorezca la muerte celular. Sin embargo, no se puede descartar que el LPA tenga un papel en la formación del cartílago articular dada su función como activador de la proliferación y migración en células progenitoras de condrocitos.³⁸

Además de la Atx, en la región donde se formará la articulación, también se expresan moléculas como: Wnt9A, Gdf5, noggina y cordina.³⁶ Como ya se mencionó, el LPA es capaz de establecer una comunicación cruzada con la vía canónica de los factores Wnt, por lo que estudiar la interacción de ambas vías durante el desarrollo de la articulación resulta de gran relevancia.

En la extremidad en desarrollo se expresa la LPP3, un miembro de la familia de fosfatas de lípidos fosfatados. La LPP3 es capaz de desfosforilar al LPA y convertirlo en monoacilglicerol, de tal manera que el LPA no puede señalizar a través de sus receptores sugiriendo la contribución de esta enzima en el posible papel de la vía de señalización del LPA durante el desarrollo de la extremidad. Esta enzima regula las actividades mediadas por sus lípidos sustratos, se expresa en el desarrollo temprano de la extremidad de forma muy dinámica y su localización coincide con la de algunos dominios de expresión de Atx y/o algunos de los receptores de LPA.³⁹ A los 9.5 días de gestación se expresa en las células ectodérmicas que

darán origen a las células de la AER. En el día 10.5 se expresa en la región distal-dorsal del primordio y en la AER. La expresión de LPP3 en la AER continúa hasta el día 12, mientras que en la zona de progreso se restringe paulatinamente a los dominios distales de los dígitos, la región central de los mismos, en los tendones en desarrollo, en el primordio de los músculos y el pericondrio de los elementos esqueléticos entre E12.5 y E13.5. De acuerdo con sus patrones de expresión, la LPP3 podría modular la señalización mediada por LPA en varias etapas y dominios de la extremidad en desarrollo.

El papel del LPA en la osteoartritis y en la artritis reumatoide

La osteoartritis (OA) y la artritis reumatoide (AR) son patologías que afectan la estructura y fisiología de las articulaciones, desencadenando dolor y pérdida de las funciones articulares. Mientras que la OA se produce por algún daño mecánico (OA secundaria) o componente genético (OA primaria), la AR es una enfermedad autoinmune que tiene como principal característica la inflamación de las articulaciones y tejidos circundantes.⁴⁰⁻⁴² A pesar de que ambas patologías tienen un origen distinto, la progresión y degradación del cartílago articular puede converger en la activación de las mismas rutas metabólicas relacionadas con la producción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral- α , interleucina-1 β e interleucina-6. Dichas citocinas inducen la secreción de metaloproteasas que degradan la matriz extracelular del cartílago y destruyen el tejido hasta llegar al hueso.⁴³⁻⁴⁷ A continuación se mencionan algunas evidencias que apoyan la participación del LPA en ambas patologías.

En el 2008 se describió un polimorfismo de nucleótido simple en la región promotora del gen que codifica para el receptor LPA₁ (EDG2), el cual mostró una asociación significativa con el desarrollo de OA de rodilla en una población japonesa. Por este motivo la presencia de este polimorfismo se ha descrito como un marcador de susceptibilidad para adquirir OA. El mecanismo propuesto se relaciona con una expresión incrementada del LPA₁, lo que a su vez resulta en una mayor respuesta al estímulo por LPA y como consecuencia de su señalización una mayor secreción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6.⁴⁸ En otro estudio *in vitro* se sobreexpresó Atx en células de menisco, originando un incremento moderado en el depósito de calcio de las mismas. El proceso de calcificación es importante para la progresión de la

OA, por lo que la actividad de Atx en estas células también podría contribuir al desarrollo de la enfermedad mediante dicho mecanismo.⁴⁹ Es importante mencionar que la Atx se ha encontrado sobreexpresada en pacientes con AR. Cuando inactivamos esta enzima de forma condicional en un modelo murino de artritis reumatoide se produce una atenuación de la enfermedad, apoyando fuertemente la participación de la producción del LPA en la etiología de esta enfermedad.⁵⁰ Adicionalmente, se ha demostrado que los sinoviocitos aislados de pacientes con AR expresan los receptores LPA₁₋₃ y son capaces de secretar interleucina 6 y 8 en respuesta al LPA, mientras que el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) induce la expresión del receptor LPA₃ en este mismo tipo de celular.⁵¹ Se ha observado que la inhibición del receptor LPA₁ en los sinoviocitos los hace mucho más sensibles a la respuesta apoptótica mediada por TNF- α y reduce la proliferación celular⁵² sugiriendo que la modulación de las actividades mediadas por este lípido es un posible blanco terapéutico para el tratamiento de estas enfermedades. En la actualidad se están diseñando fármacos que inhiban la actividad de la autotaxina o a los receptores para el LPA con la finalidad de evitar la inflamación en las articulaciones.⁵³

Otra de las características que se presentan durante etapas avanzadas de la OA es la vascularización de la sinovia y los cartílagos, lo que desencadena mayor inflamación y la pérdida de la funcionalidad de las articulaciones.⁵⁴⁻⁵⁶ La angiogénesis es otro de los procesos mediante los cuales el LPA podría estar contribuyendo a la progresión de la OA, ya que es un promotor de la formación de vasos sanguíneos; sin embargo, no existen estudios que correlacionen el papel del LPA con la vascularización en la OA o en la AR.^{57,58} A pesar de que se ha sugerido la participación del LPA durante la OA y la AR por la expresión sus receptores, no se ha evaluado la dinámica de la expresión de estas proteínas durante la progresión de estas patologías ni su localización celular en cartílago y hueso. Estudios sobre los patrones de expresión nos darían mayor información acerca de los mecanismos por los que el LPA participa en el desarrollo de la OA.

Por su parte, el estudio de la formación de la extremidad durante el desarrollo embrionario nos brindaría un mejor panorama para entender el proceso de formación de estructuras como el cartílago articular, así como las vías de señalización que se desregulan durante procesos patológicos. Lo anterior nos permitiría proponer alternativas para lograr restaurar el tejido dañado, así como blancos terapéuticos para evitar la progresión de estas enfermedades.

Conclusión

Existen evidencias que indican que el ácido lisofosfatídico contribuye a la inflamación de las articulaciones mediante la inducción de la secreción de moléculas proinflamatorias en la sinovia. Por su parte, la correlación entre la osteoartritis y un polimorfismo de nucleótido simple del receptor uno del LPA también indica la participación de este lípido en esta patología. Sin embargo, poco se sabe acerca de la dinámica de expresión de los receptores para LPA, de las enzimas que lo regulan (autotaxina) o moléculas que lo degradan (fosfatasas de lípidos fosfatados-LPPs, LPA acil transferasas y las fosfolipasas). Los patrones de expresión de los receptores para LPA, algunas LPPs, así como de Atx sugieren que este lípido podría estar jugando un papel importante en el desarrollo de la extremidad, y en particular de las articulaciones. El estudio de los mecanismos de acción del LPA nos brindará información relevante para comprender su participación en el desarrollo de la extremidad y en patologías como la osteoartritis y artritis reumatoide.

Bibliografía

1. Van der Kraan PM. Understanding developmental mechanisms in the context of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2013; 15 (6): 333.
2. Dottori M, Leung J, Turnley AM, Pebay A. Lysophosphatidic acid inhibits neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2008; 26 (5): 1146-54.
3. Harrison SM, Reavill C, Brown G, Brown JT, Cluderay JE, Crook B et al. LPA1 receptor-deficient mice have phenotypic changes observed in psychiatric disease. *Mol Cell Neurosci.* 2003; 24 (4): 1170-1179.
4. Ye X, Ishii I, Kingsbury MA, Chun J. Lysophosphatidic acid as a novel cell survival/apoptotic factor. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1585 (2-3): 108-113.
5. Choi JW, Herr DR, Noguchi K et al. LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 2010; 50: 157-186.
6. Choi JW, Lee CW, Chun J. Biological roles of lysophospholipid receptors revealed by genetic null mice: an update. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1781 (9): 531-539.
7. Ishii I, Fukushima N, Ye X, Chun J. Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu Rev Biochem.* 2004; 73: 321-354.
8. Berliner JA, Subbanagounder G, Leitinger N, Watson AD, Vora D. Evidence for a role of phospholipid oxidation products in atherogenesis. *Trends Cardiovasc Med.* 2001; 11 (3-4): 142-147.
9. Gardell SE, Dubin AE, Chun J. Emerging medicinal roles for lysophospholipid signaling. *Trends Mol Med.* 2006; 12 (2): 65-75.

10. Zeller R, López-Ríos J, Zuniga A. Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis. *Nature reviews. Genetics*. 2009; 10 (12): 845-858.
11. Mariani FV, Ahn CP, Martin GR. Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning. *Nature*. 2008; 453 (7193): 401-405.
12. Maden M, Sonneveld E, van der Saag PT, Gale E. The distribution of endogenous retinoic acid in the chick embryo: implications for developmental mechanisms. *Development*. 1998; 125 (21): 4133-4144.
13. Maden M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nature reviews. Neuroscience*. 2007; 8 (10): 755-765.
14. Mariani FV, Martin GR. Deciphering skeletal patterning: clues from the limb. *Nature*. 2003; 423 (6937): 319-325.
15. Riddle RD, Ensini M, Nelson C, Tsuchida T, Jessell TM, Tabin C. Induction of the LIM homeobox gene *Lmx1* by WNT7a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell*. 1995; 83 (4): 631-640.
16. Sun X, Mariani FV, Martin GR. Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature*. 2002; 418 (6897): 501-508.
17. Yu K, Ornitz DM. FGF signaling regulates mesenchymal differentiation and skeletal patterning along the limb bud proximodistal axis. *Development*. 2008; 135 (3): 483-491.
18. Cooper KL, Hu JK, ten Berge D, Fernández-Teran M, Ros MA, Tabin CJ. Initiation of proximal-distal patterning in the vertebrate limb by signals and growth. *Science*. 2011; 332 (6033): 1083-1086.
19. ten Berge D, Brugmann SA, Helms JA, Nusse R. Wnt and FGF signals interact to coordinate growth with cell fate specification during limb development. *Development*. 2008; 135 (19): 3247-3257.
20. Harfe BD, Scherz PJ, Nissim S, Tian H, McMahon AP, Tabin CJ. Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell*. 2004; 118 (4): 517-528.
21. Dahn RD, Fallon JF. Interdigital regulation of digit identity and homeotic transformation by modulated BMP signaling. *Science*. 2000; 289 (5478): 438-441.
22. Sanz-Ezquerro JJ, Tickle C. Fgf signaling controls the number of phalanges and tip formation in developing digits. *Curr Biol*. 2003; 13 (20): 1830-1836.
23. Rowe DA, Cairns JM, Fallon JF. Spatial and temporal patterns of cell death in limb bud mesoderm after apical ectodermal ridge removal. *Developmental Biology*. 1982; 93 (1): 83-91.
24. Suzuki T, Hasso SM, Fallon JF. Unique SMAD1/5/8 activity at the phalanx-forming region determines digit identity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105 (11): 4185-4190.
25. Storm EE, Kingsley DM. GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development. *Developmental Biology*. 1999; 209 (1): 11-27.
26. Hartmann C, Tabin CJ. Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton. *Cell*. 2001; 104 (3): 341-351.
27. Guo X, Day TF, Jiang X, Garrett-Beal L, Topol L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation. *Genes Dev*. 2004; 18 (19): 2404-2417.
28. Brunet LJ, McMahon JA, McMahon AP, Harland RM. Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science*. 1998; 280 (5368): 1455-1457.
29. Garcíadiego-Cazares D, Rosales C, Katoh M, Chimal-Monroy J. Coordination of chondrocyte differentiation and joint formation by alpha5beta1 integrin in the developing appendicular skeleton. *Development*. 2004; 131 (19): 4735-4742.
30. Ohuchi H, Hamada A, Matsuda H et al. Expression patterns of the lysophospholipid receptor genes during mouse early development. *Dev Dyn*. 2008; 237 (11): 3280-3294.
31. Zheng ZQ, Fang XJ, Qiao JT. Dual action of lysophosphatidic acid in cultured cortical neurons: survival and apoptogenic. *Sheng Li Xue Bao [Acta Physiologica Sinica]*. 2004; 56 (2): 163-171.
32. Steiner MR, Holtsberg FW, Keller JN, Mattson MP, Steiner SM. Lysophosphatidic acid induction of neuronal apoptosis and necrosis. *Ann NY Acad Sci*. 2000; 905: 132-141.
33. Fotopoulou S, Oikonomou N, Grigorieva E et al. ATX expression and LPA signalling are vital for the development of the nervous system. *Dev Biol*. 2010; 339 (2): 451-464.
34. Contos JJ, Ishii I, Fukushima N, Kingsbury MA, Ye X, Kawamura S, Brown JH et al. Characterization of *lpa(2)* (*Edg4*) and *lpa(1)/lpa(2)* (*Edg2/Edg4*) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to *lpa(2)*. *Mol Cell Biol*. 2002; 22 (19): 6921-6929.
35. Ohuchi H, Hayashibara Y, Matsuda H, Onoi M, Mitsumori M, Tanaka M et al. Diversified expression patterns of autotaxin, a gene for phospholipid-generating enzyme during mouse and chicken development. *Dev Dyn*. 2007; 236 (4): 1134-1143.
36. Winslow BB, Burke AC. Atypical molecular profile for joint development in the avian costal joint. *Dev Dyn*. 2010; 239 (10): 2547-2557.
37. Bachner D, Ahrens M, Betat N, Schroder D, Gross G. Developmental expression analysis of murine autotaxin (ATX). *Mech Dev*. 1999; 84 (1-2): 121-125.
38. Itoh R, Miura S, Takimoto A, Kondo S, Sano H, Hiraki Y. Stimulatory actions of lysophosphatidic acid on mouse ATDC5 chondroprogenitor cells. *J Bone Miner Metab*. 2010; 28 (6): 659-671.
39. Escalante-Alcalde D, Morales SL, Stewart CL. Generation of a reporter-null allele of *Ppap2b/Lpp3* and its expression during embryogenesis. *Int J Dev Biol*. 2009; 53 (1): 139-147.
40. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum*. 2001; 44 (6): 1237-1247.

41. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988; 31 (3): 315-324.
42. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis. *Cell.* 1996; 85 (3): 307-310.
43. Van Eekeren IC, Clockaerts S, Bastiaansen-Jenniskens YM, Lubberts E, Verhaar JA, van Osch GJ et al. Fibrates as therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis? A systematic review. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2013; 5 (1): 33-44.
44. Goldring MB. Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. *Best practice & research. Clinical Rheumatology.* 2006; 20 (5): 1003-1025.
45. Ribel-Madsen S, Bartels EM, Stockmarr A et al. A synoviocyte model for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: response to ibuprofen, betamethasone, and ginger extract-a cross-sectional *in vitro* study. *Arthritis.* 2012; 2012: ID 505842.
46. Furuzawa-Carballeda J, Macip-Rodríguez PM, Cabral AR. Osteoarthritis and rheumatoid arthritis *pannus* have similar qualitative metabolic characteristics and pro-inflammatory cytokine response. *Clin Exp Rheumatol.* 2008; 26 (4): 554-560.
47. Meszaros E, Malemud CJ. Prospects for treating osteoarthritis: enzyme-protein interactions regulating matrix metalloproteinase activity. *Ther Adv Chronic Dis.* 2012; 3 (5): 219-229.
48. Mototani H, Iida A, Nakajima M, Furuichi T, Miyamoto Y, Tsunoda T et al. A functional SNP in EDG2 increases susceptibility to knee osteoarthritis in Japanese. *Hum Mol Genet.* 2008; 17 (12): 1790-1797.
49. Johnson K, Hashimoto S, Lotz M, Pritzker K, Goding J, Terkeltaub R. Up-regulated expression of the phosphodiesterase nucleotide pyrophosphatase family member PC-1 is a marker and pathogenic factor for knee meniscal cartilage matrix calcification. *Arthritis and Rheumatism.* 2001; 44 (5): 1071-1081.
50. Nikitopoulou I, Oikonomou N, Karouzakis E, Sevastou I, Nikolaidou-Katsaridou N, Zhao Z et al. Autotaxin expression from synovial fibroblasts is essential for the pathogenesis of modeled arthritis. *J Exp Med.* 2012; 209 (5): 925-933.
51. Zhao C, Fernandes MJ, Prestwich GD, Turgeon M, Di Battista J, Clair T, Poubelle PE et al. Regulation of lysophosphatidic acid receptor expression and function in human synoviocytes: implications for rheumatoid arthritis? *Mol Pharmacol.* 2008; 73 (2): 587-600.
52. Orosa B, González A, Mera A, Gómez-Reino JJ, Conde C. Lysophosphatidic acid receptor 1 suppression sensitizes rheumatoid fibroblast-like synoviocytes to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Arthritis Rheum.* 2012; 64 (8): 2460-2470.
53. Gierse J, Thorarensen A, Beltey K, Bradshaw-Pierce E, Cortes-Burgos L, Hall T et al. A novel autotaxin inhibitor reduces lysophosphatidic acid levels in plasma and the site of inflammation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010; 334 (1): 310-317.
54. Rüger B, Giurea A, Wanivenhaus AH, Zehetgruber H, Hollemann D, Yanagida G et al. Endothelial precursor cells in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2004; 50 (7): 2157-2166.
55. Mi M1, Shi S, Li T, Holz J, Lee YJ, Sheu TJ et al. TIMP2 deficient mice develop accelerated osteoarthritis via promotion of angiogenesis upon destabilization of the medial meniscus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 423 (2): 366-372.
56. Weng LH, Ko JY, Wang CJ, Sun YC, Wang FS. Dkk-1 promotes angiogenic responses and cartilage matrix proteinase secretion in synovial fibroblasts from osteoarthritic joints *Arthritis Rheum.* 2012; 64 (10): 3267-3277.
57. Chen Y, Ramakrishnan DP, Ren B. Regulation of angiogenesis by phospholipid lysophosphatidic Acid. *Frontiers in bioscience. Front Biosci (Landmark Ed).* 2013; 18: 852-861.
58. Teo ST, Yung YC, Herr DR, Chun J. Lysophosphatidic acid in vascular development and disease. *IUBMB Life.* 2009; 61 (8): 791-799.
59. http://www.emouseatlas.org/gxldb/dbImage/segment5/21139/detail_21139.html