



REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



Artigo de revisão

Papel da via de sinalização do HIF-1 α na osteoartrite: revisão sistemática



Javier Fernández-Torres^{a,b,*}, Gabriela Angélica Martínez-Nava^a,
María Concepción Gutiérrez-Ruíz^b, Luis Enrique Gomez-Quiroz^b e Marwin Gutiérrez^{a,b}

^a Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra", Laboratorio de Líquido Sinovial, Cidade do México, México

^b Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Programa de Doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud, Cidade do México, México

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 11 de fevereiro de 2016

Aceito em 28 de abril de 2016

On-line em 12 de julho de 2016

Palavras-chave:

Fator induzível por hipóxia 1- α

Via de sinalização do HIF-1 α

Polimorfismos genéticos

Osteoartrite

R E S U M O

A osteoartrite (OA) é a forma mais comum de artrite e frequentemente é diagnosticada e gerenciada na atenção primária; é caracterizada por perda da cartilagem articular hialina, um tecido conjuntivo único que fisiologicamente carece de vasos sanguíneos. A cartilagem articular sobrevive em um microambiente desprovido de oxigênio, que é regulado pelo fator induzível por hipóxia-1 α (HIF-1 α). O HIF-1 α é considerado o principal regulador transcricional da resposta celular e de desenvolvimento à hipóxia. Na atualidade, a relevância do HIF-1 α na avaliação da cartilagem tem aumentado, já que a sua participação é essencial na homeostase desse tecido. Considerando as novas perspectivas emergentes do HIF-1 α na literatura científica nos últimos anos, foca-se a presente revisão no potencial papel da via de sinalização do HIF-1 α no desenvolvimento da OA, especialmente no modo como alguns fatores genéticos podem influenciar na manutenção ou ruptura da cartilagem articular.

© 2016 Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Role of HIF-1 α signaling pathway in osteoarthritis: a systematic review

A B S T R A C T

Osteoarthritis (OA) is the most common form of arthritis and is frequently diagnosed and managed in primary care; it is characterized by loss of articular hyaline cartilage, which is a unique connective tissue that physiologically lacks blood vessels. Articular cartilage survives in a microenvironment devoid of oxygen, which is regulated by hypoxia inducible factor (HIF-1 α). HIF-1 α is considered the main transcriptional regulator of cellular and developmental response to hypoxia. To date, the relevance of HIF-1 α in the assessment of cartilage has increased since its participation is essential in the homeostasis of this tissue. Taking into

Keywords:

Hypoxia inducible factor-1 α

HIF-1 α signaling pathway

Genetic polymorphisms

Osteoarthritis

* Autor para correspondência.

E-mail: javier_astrofan@hotmail.com (J. Fernández-Torres).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2016.04.006>

0482-5004/© 2016 Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

account the new emerging insights of HIF-1 α in the scientific literature in the last years, we focused the present review on the potential role of HIF-1 α signaling pathway in OA development, especially in how some genetic factors may influence the maintenance or breakdown of articular cartilage.

© 2016 Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

A osteoartrite (OA) é uma condição crônica comum que afeta milhões de pessoas em todo o mundo e é uma causa importante de incapacidade.¹ Trata-se da doença reumática mais comumente encontrada, pode afetar todas as idades; contudo, sua prevalência aumenta drasticamente com a idade, com uma maior incidência em indivíduos entre 40 e 50 anos.²

As articulações envolvidas são caracterizadas por uma ruptura e perda da cartilagem articular, que levam a uma diminuição no espaço articular e atrito entre os ossos que causa inchaço, dor crônica, prejuízo funcional, deformidade e incapacidade.³⁻⁶

Até o momento, o fator induzível por hipóxia-1 α (HIF-1 α) tem aumentado a sua relevância para a avaliação da cartilagem, já que a sua participação é essencial na homeostase desse tecido.⁷ A cartilagem articular é um tecido hipóxico em que o HIF-1 α é de importância crucial para a sobrevivência e o crescimento de condrócitos durante o desenvolvimento da cartilagem, bem como para a geração de energia e síntese de matriz de condrócitos em condições fisiológicas e patológicas.^{8,9} Com microarrays, mostrou-se também que o HIF-1 α é expresso em condrócitos fetais humanos, o que significa que esse fator de transcrição é essencial para o desenvolvimento e manutenção da cartilagem.¹⁰

A viabilidade dos condrócitos é comprometida por vários fenômenos, como o estresse oxidativo, mediadores inflamatórios, lesões bioquímicas e condições de hipóxia. O avascularidade do tecido cartilaginoso possibilitou o estabelecimento de mecanismos bem conservados, com condições sob as quais os condrócitos podem sobreviver. É importante ressaltar que sob condições fisiológicas a concentração de oxigênio na cartilagem articular varia de 0,5 a 10% (~ 4 a 70 mmHg, respectivamente).^{11,12} Quando a concentração de oxigênio diminui e o ambiente torna-se cada vez mais hipóxico, o HIF-1 α desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase, por meio da indução da expressão de uma variedade de genes que codificam proteínas para aumentar a disponibilidade de oxigênio e nutrientes até níveis homeostáticos.^{8,13}

Considerando essas informações e o recente interesse crescente sobre o HIF-1 α em doenças reumáticas,^{14,15} foca-se a presente revisão no potencial papel do HIF-1 α na OA, especialmente em como alguns fatores genéticos podem

influenciar na manutenção ou degradação da cartilagem articular.

Métodos

Critérios de revisão da literatura e estratégia de busca

Revisou-se toda a literatura relevante na área do HIF-1 α e OA publicada nos últimos 15 anos. A busca incluiu artigos originais relativos a seres humanos e/ou modelos animais publicados entre janeiro de 2000 e dezembro de 2015. Para identificar todos os estudos disponíveis, fez-se uma pesquisa detalhada pertinente ao HIF-1 α e OA de acordo com as diretrizes do *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (Prisma).¹⁶ Fez-se uma busca sistemática na base de dados eletrônica PubMed com os seguintes descritores de busca Mesh em todas as combinações possíveis: "HIF-1 α " ou "osteoartrite" ou "cartilagem articular" ou "polimorfismos do HIF-1 α " ou "via de sinalização do HIF-1 α " ou "hipóxia" ou "doenças reumáticas" e as frases combinadas, a fim de levantar todos os estudos genéticos sobre a relação de polimorfismos genéticos da via de sinalização do HIF-1 α associados à osteoartrite. Além disso, as listas de referência de todos os artigos recuperados foram revisadas manualmente. Dois autores independentes (JFT e GAMN) analisaram cada artigo e fizeram a extração de dados de modo independente. As discrepâncias foram resolvidas por consenso.

Critérios de inclusão e exclusão

Foram excluídos desta revisão os seguintes tipos de publicações: artigos não publicados em inglês, relatos de casos, ensaios clínicos randomizados e cartas ao editor que eram puramente comentários. Os resultados da pesquisa foram selecionados de modo a evitar duplicações. Títulos, resumos e relatórios completos de artigos identificados foram sistematicamente selecionados e consideraram os critérios de inclusão e exclusão.

Resultados

Até o momento, compilaram-se importantes informações sobre a função do HIF-1 α em doenças reumáticas. Identificaram-se 5.599 publicações na base de dados PubMed entre janeiro de 2000 e dezembro de 2015. Os

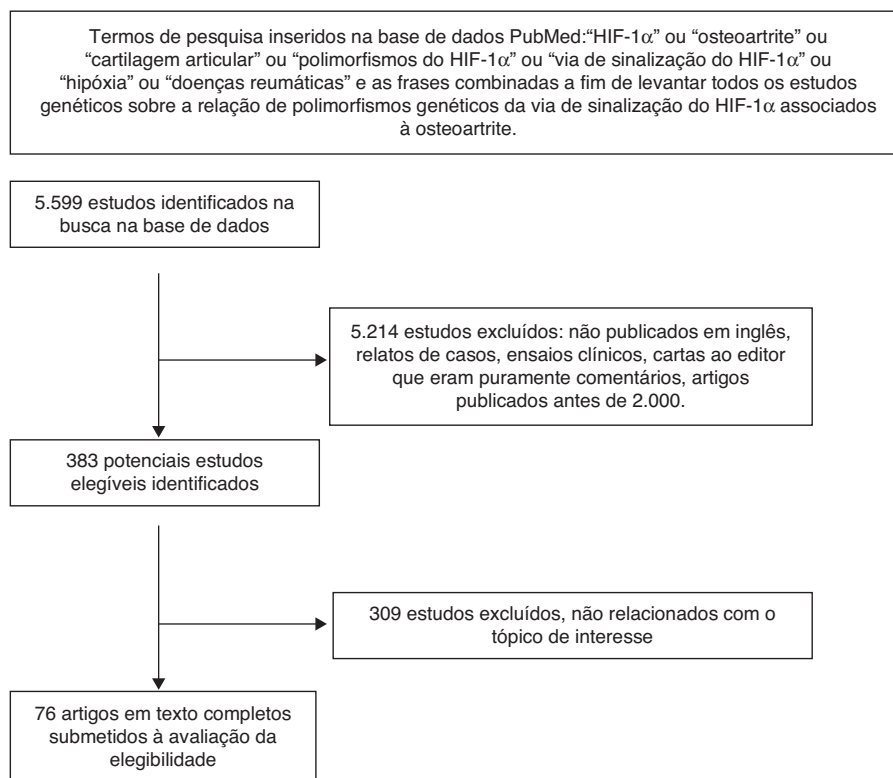


Figura 1 – Representação da estratégia de busca.

resultados da estratégia de busca estão ilustrados na figura 1.

Conceitos gerais da gênese e genética da OA

Nos últimos anos, os conhecimentos acerca da OA cresceram exponencialmente; no entanto, ainda existem lacunas que não foi possível abordar. Atualmente, os casos de OA em pessoas muito jovens são mais frequentemente relatados, o que gradualmente induz a mudar o conceito de que a OA é uma doença apenas de idosos. Além disso, existem fenótipos intermediários muito heterogêneos que definem os diferentes graus de gravidade da OA, desde leves crepitações articulares até perda total da cartilagem articular. Esse processo é complexo, mas se acredita que a interação entre o estresse biomecânico, citocinas pró-inflamatórias e fatores metabólicos, ambientais e principalmente genéticos sejam os orquestradores que promovem a ruptura da homeostase da cartilagem e a iniciação da via catabólica.^{6,17-22}

Embora a fisiopatologia da OA não esteja completamente caracterizada, vários genes candidatos foram descritos como associados à suscetibilidade à OA. Fernandez-Moreno, *et al.* determinaram que, apesar da natureza multifatorial da OA, ela não segue os padrões de herança mendeliana, provavelmente pelas alterações nas interações genéticas.²⁰ Eles analisaram diferentes genes localizados em cromossomos distintos e os resultados revelaram a complexidade da área. A tabela 1 mostra alguns genes e a sua relação com os diferentes fenótipos da OA descritos neste estudo. Meulenberg publicou um estudo que teve como objetivo determinar quais vias de sinalização

eram mais importante para o desenvolvimento da OA.⁶ As vias ou genes mais comuns foram o *lôcus 7q22*, que contém vários genes potenciais, o gene fator 5 de diferenciação de crescimento (*GDF5*), o gene proteína relacionada com *frizzled* (*FRZB*), o gene iodotironina deiodinase tipo II (*DIO2*) e o gene *Smad3*.

As bases genéticas na OA podem refinar ainda mais a compreensão da relação genótipo-fenótipo, por meio da presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP). Um polimorfismo genético pode ser um pivô entre um mecanismo de resistência ou a suscetibilidade a uma doença. Polimorfismos genéticos que afetam uma codificação ou sequência regulatória e produzem grandes mudanças na estrutura ou mecanismo de regulação da expressão da proteína podem resultar em diferentes fenótipos.^{23,24} A tabela 2 mostra alguns SNP com fenótipos bem estabelecidos.

Função e estrutura da cartilagem articular

A cartilagem articular é um tecido altamente especializado das articulações; a sua função principal consiste em proporcionar uma superfície lisa e lubrificada para a articulação e facilitar a transmissão de cargas com um baixo coeficiente de atrito. A lesão da cartilagem articular é reconhecidamente uma causa significativa de morbidade musculoesquelética. A estrutura única e complexa da cartilagem articular torna o tratamento e o reparo ou restauração de seus defeitos um desafio para o paciente, cirurgião e fisioterapeuta. A preservação da cartilagem articular é altamente dependente da manutenção da sua arquitetura organizada.⁴⁰

Tabela 1 – Genes associados ao desenvolvimento da OA

Gene	Cromossomo	Manifestação fenotípica
COL2A1, COL11A1, COL11A2	1, 6, 12	OA de início precoce
COL9A1	6	OA de início precoce do joelho
MATN3	2	OA de início precoce da mão e joelho
COMP	19	OA de início precoce do quadril
COL1A1	17	Redução da OA de quadril em mulheres
BMP2	20	Redução da OA de joelho em mulheres
TGFB1	19	OA
FRZB, IL4R	2, 16	OA de quadril em mulheres
IL1, ASPN, TIMP3	2, 9, 22	OA de quadril e joelho
IL6	7	OA de quadril
AGC1	15	OA de mão
VDR	12	Artrite em várias articulações
ERA	6	OA em mulheres
ADAM12, LRCH1, TNA	3, 10, 13	OA de joelho
CILP	15	OA de joelho em homens
CALM1	14	OA de quadril na população japonesa
IGF-1	12	Aumento do risco de OA
IL17	6	Suscetibilidade para desenvolver OA

Retirado de Fernandez-Moreno et al.²⁰ e modificado.

A cartilagem articular é o principal tecido alvo no processo degenerativo; existem características muito particulares que a tornam diferente dos outros tecidos, principalmente a sua ausência de rede capilar. A cartilagem articular consiste em matriz extracelular (MEC), proteoglicanos, condrócitos, colágeno e água; recebe seus nutrientes e suprimento de oxigênio por difusão a partir do fluxo dinâmico do líquido sinovial e osso subcondral. A regulação do metabolismo da cartilagem

articular envolve uma vasta rede de vias de sinalização; no caso da osteoartrite, o delicado equilíbrio entre a síntese e degradação de MEC é fortemente afetado. Assim, o processo osteoartítico começa com uma resistência diminuída ao estresse extrínseco dos condrócitos, juntamente com alterações na atividade de proliferação, no metabolismo energético e na resposta aos fatores de crescimento.⁴¹⁻⁴⁶ A degradação da cartilagem durante a patogênese da OA não se relaciona apenas com a perda de MEC, mas também com a morte de condrócitos. A morte de condrócitos por apoptose, necrose, condroptose ou uma combinação desses processos tem sido implicada na patogênese da OA.⁴⁷

Sistema HIF-1 α

O HIF-1 α é um fator de transcrição codificado pelo gene *HIF1A* localizado no interior do cromossomo 14q21-24, formado por 15 exons; o HIF-1 α consiste em 826 aminoácidos e tem um peso molecular de 120 kDa.⁴⁸ O HIF-1 α é um heterodímero de duas cadeias, a cadeia alfa (regulada pelo oxigênio) e a cadeia beta, ambas dispostas em uma dupla hélice (hélice-volta-hélice básico, bHLH). Existem dois sinais de localização nuclear (NLS), mas apenas aquele encontrado na posição C-terminal é responsável pelo acúmulo de HIF-1 α no núcleo. Na região N-terminal, estão localizados os domínios bHLH e PER-ARNT-SIM A (PAS A), necessários para a dimerização e ligação ao DNA por elementos de resposta à hipóxia (HRE). Por fim, o sítio ativo dessa proteína é um domínio de degradação dependente de oxigênio (ODDD) que atua como um sensor de oxigênio (fig. 2).⁴⁹⁻⁵¹

Sob condições de normóxia e na presença de Fe²⁺ e 2-oxoglutarato, os resíduos específicos de prolina 402 e 564 são hidroxilados no domínio ODDD pelas prolin-hidroxilases (PHD) dependentes de oxigênio, formam um complexo com o fator de Von Hippel-Lindau (BVS); por sua vez, esse complexo se liga à ubiquitina (Ub) e subsequentemente se degrada no proteossoma (fig. 3).

Um estímulo celular externo, como um fator de crescimento que se liga ao seu receptor de tirosina-quinase, desencadeia uma cascata de vias de sinalização no interior da célula. Por exemplo, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) ativa as vias da fosfatidilinositol-3-quinase

Tabela 2 – Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) associados aos processos da OA

Gene/dbSNP rs Id	Fenótipo	Primeiro autor [Referência]
WISP1 rs2929970	Suscetibilidade à OA da coluna vertebral na mulher	Urano et al. ²⁵
RAGE rs2070600	Suscetibilidade à OA de joelho	Han et al. ²⁶
DVWA rs7639618	Suscetibilidade à OA de joelho	Zhang et al. ²⁷
ACE rs4343, rs4362	Suscetibilidade à OA de joelho	Qing et al. ²⁸
MATN3 rs8176070	Suscetibilidade à OA	Gu et al. ²⁹
DIO2 rs225014	Suscetibilidade à OA	Meulenbelt et al. ³⁰
ADAMTS14 rs4747096	OA de joelho na mulher (população tailandesa)	Poonpet et al. ³¹
ADAM12 rs1871054	Aumento no risco de OA	Wang et al.; ³² Kerna et al. ³³
HIF1A rs11549465	Papel protetor na perda de cartilagem articular	Fernández, et al. ³⁴
IL6 rs1800796	Papel protetor para OA de quadril e joelho em idosos	Fernandes et al. ³⁵
IL16 rs11556218, rs4072111, rs4778889	Diminuição no risco de OA de joelho	Luo et al.; ³⁶ Liu et al. ³⁷
GDF5 rs143383	Fator de proteção para OA de joelho	Pan et al.; ³⁸ Tawonsawatruk et al. ³⁹

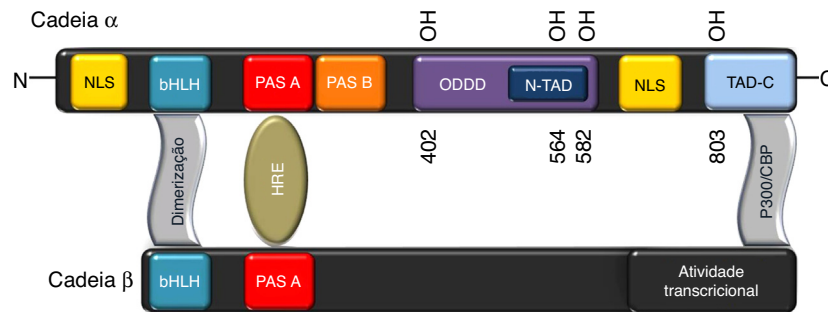


Figura 2 – Estrutura do fator induzível por hipóxia-1 α (HIF-1 α). O NH₂-terminal do HIF-1 α e HIF-1 β consiste nos domínios bHLH (hélice-alça-hélice) e PAS (homologia Per-ARNT-Sim), que são necessários para a heterodimerização e ligação do DNA. O terminal COOH do HIF-1 α (resíduos 531-826) contém dois domínios de transativação (TAD). A meia-vida curta do HIF-1 α sob condições não hipóxicas e pós-hipóxicas é decorrente da rápida ubiquitinação e degradação proteossomal. A região dos resíduos 400-600 do HIF-1 α foi designada domínio de degradação dependente de oxigênio (ODDD).

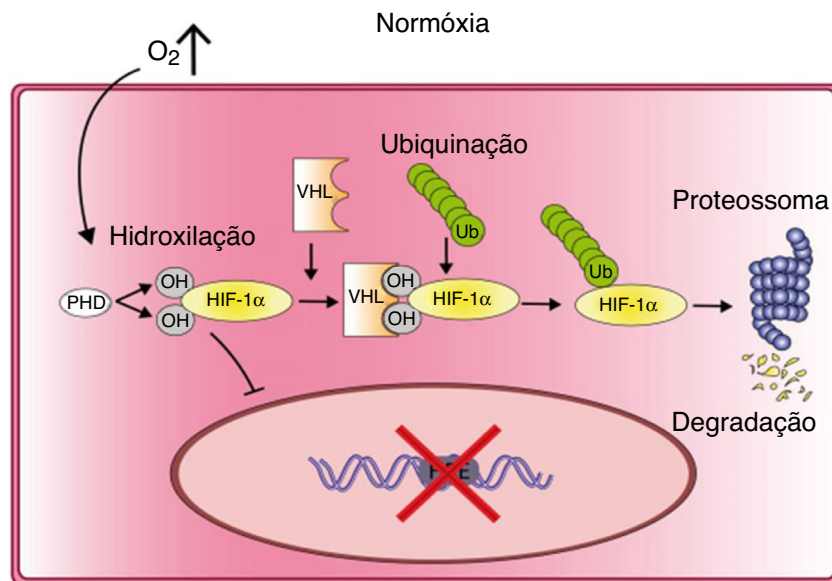


Figura 3 – Atividade do HIF-1 α sob condições de normóxia. Sob condições de normóxia, os resíduos específicos da prolina 402 e 564 no domínio ODDD são hidroxilados por prolin-hidroxilases dependentes de oxigênio (DPS), o que leva à formação de um complexo com o fator de von Hippel Lindau (VHL); por sua vez, esse complexo se liga à ubiquitina (Ub) e é subsequentemente degradado pelo proteossoma.

(PI3K) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (ERK1 e ERK2).⁵² O PI3K ativa a serina/treonina quinase (AKT) e a AKT ativa a proteína associada a FKBP12-rapamicina, mTOR, RAFT (FRAP), que induz à expressão de HIF-1 α .

Sob condições de oxigênio reduzido (hipóxia), a atividade das PHD diminui, o que estabiliza o HIF-1 α e o acumula no citoplasma para ser fosforilado pela MAPK.⁵³⁻⁵⁵ Uma vez fosforilado, o HIF-1 α se transloca para o núcleo e se liga à subunidade HIF-1 β (também conhecida como translocador nuclear receptor aril hidrocarboneto, ARNT) para formar o complexo [HIF-1 α /HIF-1 β]. Por meio do HRE, esse complexo

se liga a sequências de DNA 5'TAGCGTGH3' específicas presentes nas regiões promotoras de genes para a subsequente expressão.^{47,55,56}

Alguns destes genes alvo incluem o óxido nítrico sintase 2 (NOS2), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), a eritropoietina (EPO), alguns transportadores de glicose (GLUT1, GLUT3), o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2 (IGF2), que potencialmente atua a fim de manter as funções condroprotetoras desafiadas pelas condições prejudiciais que ocorrem no ambiente articular na OA (fig. 4).^{8,54-59} Essa relação entre os diferentes genes torna estreita a relação do HIF-1 α com diversas doenças.⁶⁰⁻⁶⁴

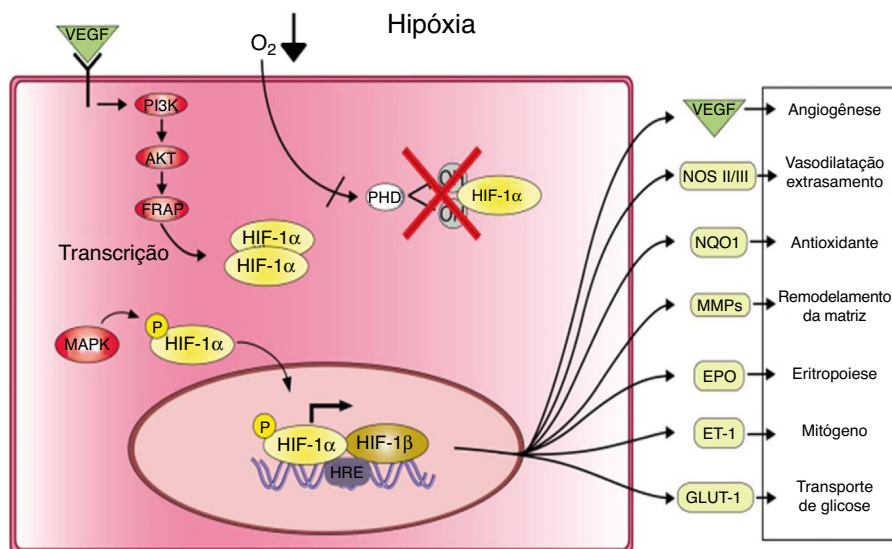


Figura 4 – Atividade do HIF-1 α sob condições hipóxicas. Sob condições hipóxicas, o HIF-1 α é estabilizado e fosforilado pelo MAPK; uma vez fosforilado, o HIF-1 α se transloca para o núcleo e se liga à subunidade HIF-1 β e forma o complexo [HIF-1 α /HIF-1 β]. Esse complexo, por meio do HRE, se liga à sequência de DNA específica 5'TAGCGTGH3' presente nas regiões promotoras dos vários genes para a subsequente ativação destes.

Polimorfismos genéticos no sistema HIF-1 α e sua importância na OA

Para tentar explicar de modo simplificado a interação entre os polimorfismos genéticos associados ao HIF-1 α com a importância na OA, dividiu-se esse sistema em três fases: 1) genes que ativam o HIF-1 α ; 2) proteínas que interagem diretamente com o HIF-1 α ; e 3) genes controlados pelo HIF-1 α .

Genes que ativam o sistema HIF-1 α

A ativação do HIF-1 α pode começar pela ligação de diferentes proteínas a seus receptores na membrana celular; essas proteínas podem ser enzimas, fatores de crescimento, interleucinas ou outros tipos de moléculas; aquelas podem ser afetadas pela presença de polimorfismos genéticos que podem estar associados ao desenvolvimento de OA. Yang et al. analisaram o efeito de polimorfismos de receptores para produtos finais de glicação avançada (RAGE) na suscetibilidade à OA e gravidade dessa doença em uma população Han chinesa. O gene RAGE participa na regulação da inflamação e até mesmo na produção de metaloproteinases de matriz (MPM). A MPM-1 degrada a cartilagem, o que pode resultar em desenvolvimento de OA. Descobriu-se que dois polimorfismos no gene RAGE (rs1800625 e rs2070600) mostraram uma associação significativa entre pacientes com OA e controles saudáveis (OR=0,42, p=0,016, e OR=2,78, p=0,047, respectivamente).⁶⁵ No estudo feito por Han et al.,²⁶ eles encontraram que a presença do polimorfismo rs2070600 no gene RAGE em interação com a obesidade podem determinar a suscetibilidade à OA de joelho.

Swellam et al. relataram uma potencial influência do polimorfismo genético do antagonista do receptor de

interleucina-1 (IL-1RA) no risco de OA de joelho. Acredita-se que o gene IL-1 esteja envolvido no processo de destruição da cartilagem. A esse respeito, o antagonista do receptor de interleucina-1 (IL-1RA) compete com a IL-1 para se ligar ao seu receptor e pode atuar como um inibidor da degradação da cartilagem. Esses autores fizeram um estudo de caso-controle com pacientes com OA de joelho e concluíram que o alelo IL-1RN*2 representa um importante fator a influenciar a gravidade e a evolução da OA de joelho (p=0,002).⁶⁶

Fernandes et al. analisaram a influência da citocina pró-inflamatória IL-6 na gravidade e no estado funcional da OA em indivíduos idosos; determinaram que o polimorfismo rs1800796 é um fator de proteção para a presença e gravidade da OA de quadril e joelho em idosos. Os indivíduos que apresentavam o alelo C tinham menor prevalência e gravidade da OA quando comparados com indivíduos sem esse polimorfismo.³⁵

Enquanto isso, a interleucina-16 (IL-16), uma citocina pleiotrópica, desempenha um papel fundamental nas doenças inflamatórias. Liu et al. determinaram que, em comparação com o genótipo C/C, o genótipo C/T aumentou o risco de OA de joelho primária no polimorfismo rs4072111 do gene IL-16 (OR=1,83); no entanto, em comparação com o genótipo T/T, o genótipo T/L diminuiu o risco de OA de joelho primária no polimorfismo rs11556218 (OR=0,37).³⁷ Da mesma maneira, Luo et al. avaliaram os mesmos polimorfismos e encontraram o mesmo comportamento.³⁶ Esses resultados sugerem que os polimorfismos do gene IL-16 estão associados ao risco de OA de joelho.

Por fim, existem outros genes associados à ativação do HIF-1 α , como PIK3R1, AKT2, GSK3B e IL6, e será necessário explorar suas variantes genéticas para determinar a sua participação no desenvolvimento da OA.

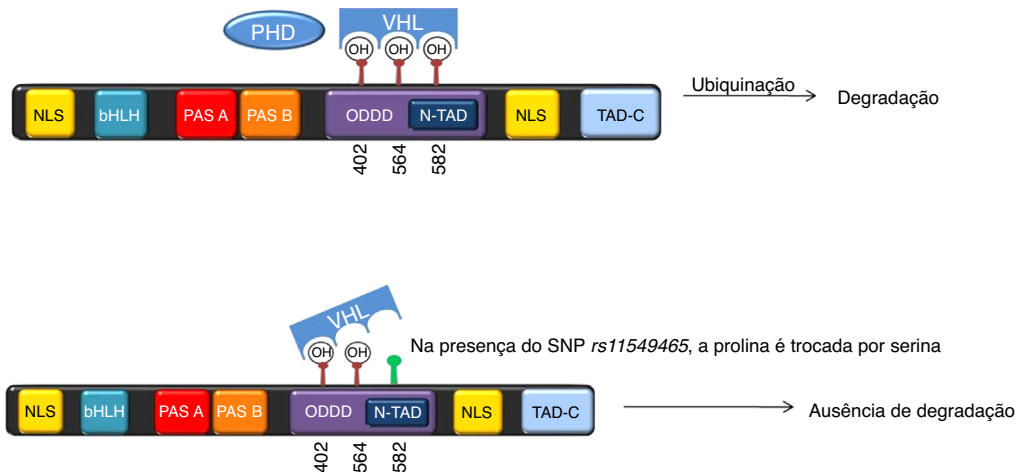


Figura 5 – A presença do polimorfismo *rs11549465* produz uma mudança de prolina por serina, o que confere uma maior estabilidade à proteína HIF-1 α em decorrência da fraca interação entre o VHL e os locais de hidroxilação no ODDD.

Proteínas que interagem diretamente com o HIF-1 α

A estabilização do HIF-1 α no citoplasma depende basicamente da hidroxilação em locais específicos dentro do domínio ODDD. No entanto, a presença de polimorfismos genéticos pode alterar as propriedades estruturais dos transcritos e isso pode influenciar na suscetibilidade ou resistência a doenças, conforme analisado por Uchanchka *et al.* em doenças autoimunes associadas ao alelo HLA-B*27.⁶⁷

Em 2003, Tanimoto *et al.* demonstraram que a substituição da prolina pela serina na posição 582 (P582S), em decorrência da presença de polimorfismos de nucleotídeo único (*rs11549465*) no interior do gene *HIF1A*, aumenta a sua atividade de transcrição⁵⁶; isso ocorre em razão de uma alteração nas características e propriedades dos sítios de ligação com os genes-alvo.^{67,68} Recentemente, os autores do presente estudo avaliaram a presença desse polimorfismo em amostras de pacientes com OA e descobriram que ele estava positivamente associado ao fator de proteção na perda de cartilagem (genótipo CT OR=0,2, p=0,003, ou alelo T OR=0,2, p=0,004).³⁴ Esse fenômeno pode ser explicado pelo fato de que a presença desse polimorfismo confere maior estabilidade à proteína HIF-1 α , em decorrência da fraca interação entre o VHL e os locais de hidroxilação no ODDD (fig. 5).

Outro polimorfismo clinicamente importante, com aumento na atividade de transcrição no interior do gene *HIF1A*, que também foi testado por Tanimoto *et al.* foi o Ala588Thr (*rs11549467*). Similarmente, o presente estudo avaliou esse polimorfismo em pacientes com OA, mas não encontrou associação. No entanto, isso abre a possibilidade de que seja avaliada em outras populações, a fim de compreender melhor a sua influência na OA.

Além disso, foram descritos polimorfismos para os genes *EGLN1* (também conhecido como PHD2, prolil-hidroxilase 2), *BVS* e *HIF1AN* (fator inibidor do HIF1A), que interagem diretamente com o HIF-1 α , mas que não foram avaliados na OA e que podem ser de importância clínica nessa doença. Alguns estudos na artrite reumatoide (AR) demonstraram a expressão e regulação de enzimas do domínio prolil-hidroxilase (PHD) e

fator inibidor do HIF-1 α (FIH-1), que regula os níveis celulares de HIF-1 α . Sabe-se que a AR é caracterizada por hipóxia e pela expressão de fatores de transcrição induzíveis por hipóxia (HIF), que coordenam as respostas celulares à hipóxia. Muz *et al.* conduziram esse estudo em sinoviócitos semelhantes a fibroblastos; concluíram que a PHD-2 é a principal hidroxilase que regula os níveis de HIF e a expressão de genes angiogênicos em células artríticas. O PHD-2 parece regular as respostas relevantes à artrite via HIF- α , destaca a grande importância dessa enzima nas doenças inflamatórias dependentes da hipóxia e da angiogênese.⁶⁹ Isso nos faz supor que a presença de polimorfismos genéticos desses genes pode afetar a estabilidade do HIF-1 α e contribuir de modo importante para a OA.

Genes controlados pelo HIF-1 α

Na OA, os condrócitos são metabolicamente ativos, exibem aumento na síntese de colágeno tipo II. Em comparação com a cartilagem saudável, na OA os condrócitos articulares exibem aumento na síntese *in vivo* de colágeno tipo II pela enzima prolil-hidroxilase-4, uma enzima essencial na formação da tripla hélice do colágeno.⁷⁰ Uma vez estabilizado o HIF-1 α no citoplasma, vários genes a jusante são expressos a fim de restaurar diversos componentes da matriz extracelular. A presença de polimorfismos genéticos nesses genes pode alterar a função de proteínas específicas que restauram tecidos articulares e promovem o desenvolvimento de OA.

Raine *et al.* fizeram uma análise da expressão alélica da suscetibilidade à OA do gene *COL11A1* em tecidos articulares humanos. Com o RNA da cartilagem de indivíduos com OA submetidos à substituição de quadril (artroplastia total do quadril, ATQ) ou de joelho (artroplastia total de joelho, ATJ), observaram um desequilíbrio significativo na expressão alélica (DEA) no *rs1676486* (p < 0,0001), com o alelo T se correlacionando com a expressão reduzida no *COL11A1*. O DEA no *rs1676486* é um fator de risco para hérnia de disco lombar, mas não para OA.⁷¹

Rodríguez-Fontenla *et al.* fizeram uma metanálise de nove GWAS para avaliar genes candidatos à associação à OA; apenas dois dos 199 genes candidatos (*COL11A1* e *VEGF*) estiveram associados à OA na metanálise. Dois polimorfismos no gene *COL11A1* (*rs4907986* e *rs1241164*) mostraram associação com a OA de quadril na análise combinada (OR=1,12, $p=1,29 \times 10^{-5}$, e OR=0,82, $p=1,47 \times 10^{-5}$, respectivamente); o *rs4908291* esteve associado na análise estratificada por sexo apenas no caso das mulheres (OR=0,87, $p=1,29 \times 10^{-5}$). Outro polimorfismo no gene *VEGF* (*rs833058*) mostrou associação com a OA de quadril apenas em homens (OR=0,85, $p=1,35 \times 10^{-5}$).⁷²

O suprimento de oxigênio e nutrientes à cartilagem articular se dá por difusão a partir do líquido sinovial. O papel do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é essencial para a angiogênese no osso subcondral.⁸ Há apenas alguns estudos relacionados com variantes genéticas do gene *VEGF* que podem contribuir para o desenvolvimento e progresso da OA.

Sánchez *et al.* avaliaram dois polimorfismos do gene *VEGF*, -460 T/C e +405 C/G, em pacientes com OA de joelho e compararam a controles saudáveis, mas não encontraram associação.⁷³ Yuan *et al.* fizeram uma metanálise a fim de entender a relação entre a patogênese da OA e os níveis de expressão do *VEGF* em vários tecidos lesionados nesses pacientes. Onze estudos de caso-controle, que englobam 302 pacientes com OA e 195 controles saudáveis, demonstram que os níveis de expressão do *VEGF* em pacientes com OA são significativamente mais elevados do que em controles saudáveis (média da diferença padronizada = 1,18, IC95%: 4,91 ~ 9,11, $p < 0,001$) e esses níveis se correlacionam fortemente com a patogênese da osteoartrite.⁷⁴

Um dos mecanismos de degradação da cartilagem na OA é a proteólise enzimática da matriz extracelular por metaloproteinases. A MPM-1, produzida por condrócitos e células sinoviais, é uma das principais proteases da família das MPM.

Barlas *et al.* avaliaram três polimorfismos no promotor dos genes das metaloproteinase de matriz-1 (MPM-1), MPM-2 e MPM-9 em pacientes com OA de joelho e compararam a controles etnicamente correspondentes. Eles encontraram diferenças significativas entre os grupos em relação à distribuição dos genótipos do polimorfismo do MPM-1 ($p=0,001$). As frequências dos genótipos 1G/1G e 1G/2G foram significativamente maiores nos pacientes com OA de joelho do que nos controles ($p=0,002$, e $p=0,006$, respectivamente). Além disso, a frequência do alelo 1G do gene MPM-1 foi maior nos pacientes do que no grupo controle ($p=0,0001$). As distribuições de genótipos e frequências alélicas dos polimorfismos dos genes MPM-2 e MPM-9 não diferiram entre os grupos OA e controle ($p > 0,05$). Esses achados sugerem que o polimorfismo -1,607 1G/2G (*rs1799750*) no gene MPM-1 pode contribuir para a suscetibilidade à OA de joelho.⁷⁵

Similarmente, Lepestos *et al.* avaliaram o polimorfismo *rs1799750* no gene MPM-1, mas não encontraram associação significativa na análise geral; no entanto, após a análise de regressão logística múltipla, o 1G/2G esteve associado a chances reduzidas de OA de joelho em 75% no sexo masculino, em comparação com os genótipos 1G/1G + 2G/2G, ajustando para idade e IMC (OR ajustado = 0,25, $p=0,035$).⁷⁶

Por fim, Honsawek *et al.* analisaram o polimorfismo no gene MPM-3 (*Rs3025058*, -1612) em pacientes com OA de joelho. A frequência do alelo 5A foi indicada como 15,5% e a do alelo 6A foi de 84,5% em pacientes com OA, ao passo que era de 10 e 90%, respectivamente, no grupo controle. Assim, o presente estudo indicou que o genótipo do polimorfismo -1612 5A/5G do promotor do gene MPM-3 não atua no desenvolvimento da OA.⁷⁷

Esses resultados sugerem que a atividade da família MPM é influenciada pela presença de variações genéticas, que quebrariam o equilíbrio entre a síntese e degradação da matriz extracelular, e essa condição pode contribuir para a suscetibilidade à OA.

O óxido nítrico (NO) é essencial para a manutenção do tônus vascular; a presença de disfunção endotelial (relaxamento vascular reduzido) pode sugerir um problema relacionado com a via do NO. O NO é produzido pela NO-sintase endotelial (eNOS) e a sua produção pode ser influenciada por polimorfismos no gene eNOS.⁷⁸ Até o momento, não foram feitos estudos relacionados com a OA e polimorfismos do gene eNOS; no entanto, vários polimorfismos genéticos no gene eNOS estão associados à patogênese da AR.

O nível de NO é aumentado em pacientes de AR; um estudo sugere que o NO pode regular o equilíbrio das citocinas Th1/Th2 em doenças autoimunes e que isso é um mediador-chave na apoptose no interior de articulações com artrite reumatoide. An *et al.* estudaram dois polimorfismos do gene eNOS (*rs2070244*, T-786 C; e *rs1799983*, G894 T) em pacientes com AR e observaram que os indivíduos com o genótipo -786CC tinham um risco aumentado de AR.⁷⁹

Brenol *et al.* avaliaram o polimorfismo T-786 C em pacientes com AR em comparação com manifestações extra-articulares. Eles descobriram que o alelo C esteve significativamente associado (p corrigido = 0,032), o que sugere a participação do polimorfismo T-786 C do gene eNOS na AR.⁸⁰

Esses resultados nos fazem supor que os polimorfismos no gene eNOS podem ter um impacto importante no desenvolvimento da OA; será necessário explorar essas variantes genéticas para corroborar isso.

A resposta à anemia da medula óssea mediada pela eritropoietina está sob o controle de fatores induzidos por hipóxia (HIF), os principais reguladores da homeostase de oxigênio e ferro. As características hipóxicas da cartilagem articular fazem com que o HIF-1 α participe ativamente da transcrição de genes-alvo. O gene eritropoietina (EPO) é expresso depois de um aumento do HIF-1 α no citoplasma.^{81,82} Contudo, até o momento, nenhuma evidência científica apoia a possível associação entre a eritropoietina e a perda de cartilagem na OA; além disso, a presença de polimorfismos no gene EPO poderia representar um importante fator associado ao risco de OA.

Relevância clínica dos inibidores de PHD como potenciais alvos terapêuticos na OA

Até o momento, os inibidores do HIF-1 são classificados pelo seu mecanismo de inibição do HIF, incluindo afetar o nível de proteína HIF-1 α , a dimerização do HIF-1, a ligação do HIF-1 ao DNA ou a transcrição dos genes alvo pelo HIF-1 α .⁸³

Em decorrência dos resultados descritos, o objetivo principal de alcançar um efeito terapêutico no tratamento da OA no nível da cartilagem pode ser estabilizar o HIF-1 α no citoplasma de modo que possa induzir à expressão de genes de restauração. Naturalmente, existem polimorfismos genéticos que aumentam a atividade de transcrição do HIF-1 α em comparação com a isoforma comum. Em nível experimental, avaliou-se a dimetilalil glicina (DMOG), um potente inibidor das prolil-hidroxilases.⁸⁴ Os níveis endógenos de HIF-1 α podem ser aumentados pela supressão da atividade do PHD, quer reduzindo o nível de oxigênio celular ou se combinando ao Fe (II) de modo competitivo. A DMOG é um inibidor competitivo permeável à célula dos PHD. A DMOG é uma análoga do 2-oxoglutarato e desse modo inibe não só o HIF prolil, mas também as asparaginil hidroxilases. Além disso, prediz-se que inibia outros membros das dioxigenases dependentes de 2-oxoglutarato. Existem três hidroxilases HIF-prolil conhecidas em mamíferos e elas são codificadas por genes distintos: *PHD1*, *PHD2* e *PHD3*. Como todas as dioxigenases dependentes de 2-oxoglutarato, os PHD requerem oxigênio para a hidroxilação, bem como ácido tricarbóxico de ciclo intermediário, 2-oxoglutarato (α -cetoglutarato), ferro (Fe 2⁺) e ascorbato como cofatores. Quando os níveis de oxigênio estão baixos, o HIF-1 α escapa da hidroxilação do PHD e reconhecimento pelo VHL.^{85,86}

Outros inibidores do PHD com potenciais efeitos benéficos são a deferroxamina (DFO) e o cloreto de cobalto (CoCl₂), um quelante do ferro e um inibidor competitivo do ferro, respectivamente; eles são rotineiramente usados tanto *in vitro* como *in vivo* para inibir a atividade do PHD, competem pelo ferro endógeno (II). Outros quelantes do ferro, como a ciclopirona, e inibidores competitivos do ferro, como o Cu²⁺, Zn²⁺ e Mn²⁺, também são usados como inibidores do PHD.⁵³

Do mesmo modo, existem estudos que demonstram que o HIF-1 α e o seu gene alvo VEGF são reguladores essenciais do acoplamento angiogênico-osteogênico.^{7,87} Além dos condrocitos, os osteoblastos também expressam o HIF-1 α e promovem a vascularização do esqueleto durante a formação do osso endocondral; a manipulação do sistema HIF por meio de abordagens farmacológicas ou genéticas é uma estratégia atrativa para o tratamento de doenças hipóxicas, incluindo as doenças esqueléticas, como a inflamação do osso subcondral durante a OA.⁵³

Conclusão

Vale ressaltar que os diversos estudos de associação entre o SNP e a OA permanecem não confirmados ou controversos em decorrência do viés nos critérios de seleção dos pacientes em relação às articulações afetadas pela OA, classificação e modo de estadiamento.

A destruição da cartilagem na OA mediada por enzimas catabólicas e morte de condrocitos, incluindo a apoptose e/ou autofagia, também contribuiu para a patogênese. Estudos demonstraram que a expressão do HIF-1 é aumentada na cartilagem acometida pela OA para mediar a resposta dos condrocitos à hipóxia; o HIF-1 atua como um fator de sobrevivência, melhora a síntese de matriz extracelular e inibe a apoptose⁸⁸; o HIF-1 regula tanto a autofagia quanto

a apoptose e o HIF-1 é de importância crucial na homeostase da cartilagem.⁸⁹ Além disso, também será necessário explorar outras isoformas do HIF, como a HIF-2 α , que parecem ter o efeito oposto ao do HIF-1 α . A proteína HIF-2 atua como um freio na função de acelerador da autofagia do HIF-1 e promove a hipertrofia dos condrocitos, um estado de diferenciação terminal caracterizado por um programa de expressão do gene original, incluindo o colágeno tipo X e a protease MPM-13 degradante de colágeno tipo II.⁹

Embora outros estudos precisem elucidar o mecanismo exato do HIF-1 na OA, as evidências atuais levam a considerá-lo como uma abordagem promissora para o tratamento da OA. No entanto, os resultados relatados indicam que os marcadores genéticos podem contribuir para a compreensão da história natural dessa doença.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

A Carlos Aguilar-González por seu valioso apoio na concepção da figuras 3 e 4.

REFERÊNCIAS

- Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, Lozano R, Michaud C, Ezzati M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380:2163-96.
- Fichera C, Pappalardo A, Triolo G, Gallo M, Valentini G, Bagnato G. Epidemiology and risk factors in osteoarthritis: literature review data from OASIS study. *Reumatismo*. 2004;56:169-84.
- Komatsu M, Kamimura M, Nakamura Y, Mukaiyama K, Ikegami S, Uchiyama S, et al. Rapid bone destruction in a patient with knee osteoarthritis. A case report and review of the literature. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2014;11:232-5.
- Schipphof D, van Middelkoop M, de Klerk BM, Oei EH, Hofman A, Koes BW, et al. Crepitus is a first indication of patellofemoral osteoarthritis (and not of tibiofemoral osteoarthritis). *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;20:631-8.
- Musumeci G, Aiello FC, Szychlińska MA, Di Rosa M, Castrogiovanni P, Mobasher A. Osteoarthritis in the XXIst century: risk factors and behaviours that influence disease onset and progression. *Int J Mol Sci*. 2015;16(3):6093-112.
- Meulenbelt I. Osteoarthritis year 2011 in review: genetics. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20:218-22.
- Schipani E, Ryan HE, Didrickson S, Kobayashi T, Knight M, Johnson RS. Hypoxia in cartilage: HIF-1 alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev*. 2001;15:2865-76.
- Pfander D, Cramer T, Hypoxia Swoboda B. HIF-1 alpha in osteoarthritis. *Int Orthop*. 2005;29(1):6-9.
- Coimbra IB, Jimenez SA, Hawkins DF, Piers-Velazquez S, Stokes DG. Hypoxia inducible factor-1 alpha expression in human normal and osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004;12(4):336-45.
- Stokes DG, Liu G, Coimbra IB, Piers-Velazquez S, Crowl RM, Jiménez SA. Assessment of the gene expression profile of

- differentiated and dedifferentiated human fetal chondrocytes by microarray analysis. *Arthritis Rheum.* 2002;46(2):404-19.
11. Pfander D, Swoboda B, Cramer T. The role of HIF-1 α in maintaining cartilage homeostasis and during the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2006;8:104. Epub 2006 Jan 18.
 12. Ströbel S, Loparic M, Wendt D, Schenk A, Candrian C, Lindberg R, et al. Anabolic and catabolic responses of human articular chondrocytes to varying oxygen percentages. *Arthritis Res Ther.* 2010;12:R34.
 13. Grimmer C, Pfander D, Swoboda B, Aingner T, Mueller L, Henning F, et al. Hypoxia-Inducible Factor 1 α is involved in the prostaglandin metabolism of osteoarthritic cartilage through up-regulation of microsomal prostaglandin E synthase 1 in articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2007;56:4084-94.
 14. Distler K. Hypoxia and angiogenesis in rheumatic diseases. *Z Rheumatol.* 2003;62 Suppl2:II43-5.
 15. Wu L, Huang X, Li L, Huang H, Xu R, Luyten W. Insights on biology and pathology of HIF-1 α /2 α , TGF β /BMP, Wnt/ β -catenin, and NF- κ B pathways in osteoarthritis. *Curr Pharm Des.* 2012;18(22):3293-312.
 16. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Group PRISMA. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLOS Med.* 2009;6:e1000097.
 17. Guilak F. Biomechanical factors in osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2011;25:815-23.
 18. Lee KM, Chung CY, Sung KH, Lee SY, Won SH, Kim TG, et al. Risk factors for osteoarthritis and contributing factors to current arthritic pain in South Korean older adults. *Yonsei Med J.* 2015;56:124-31.
 19. De Filippis L, Gulli S, Caliri A, Romano C, Munaó F, Trimarchi G, et al. Epidemiology and risk factors in osteoarthritis: literature review data from OASIS study. *Reumatismo.* 2004;56:169-84.
 20. Fernández M, Rego F, Blanco F. Genetics in osteoarthritis. *Reumatol Clin.* 2007;3 Supl 3:S13-8.
 21. Chapman K, Valdes AM. Genetic factors in OA pathogenesis. *Bone.* 2012;51:258-64.
 22. Shi D, Zheng Q, Chen D, Zhu L, Qin A, Fan J, et al. Association of single-nucleotide polymorphism in HLA class II/III region with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18:1454-7.
 23. Seal A, Gupta A, Mahalaxmi M, Aykkal R, Singh TR, Arunachalam V. Tools, resources and databases for SNPs and indels in sequences: a review. *Int J Bioinform Res App.* 2014;10:264-96.
 24. Knez K, Spasic D, Janssen KP, Lammertyn J. Emerging technologies for hybridization based single nucleotide polymorphism detection. *Analyst.* 2014;139:353-70.
 25. Urano T, Narusawa K, Hosoi T, Ouchi Y, Nakamura T, Inoue S. Association of a single nucleotide polymorphism in the WISP1 gene with spinal osteoarthritis in postmenopausal Japanese women. *J Bone Miner Metab.* 2007;25:253-8.
 26. Han Z, Liu Q, Sun C, Li Y. The interaction between obesity and RAGE polymorphisms on the risk of knee osteoarthritis in Chinese population. *Cell Physiol Biochem.* 2012;30:898-904.
 27. Zhang R, Yao J, Xu P, Ji B, Voegelgi G, Hou W, et al. Association between genetic variants of DVWA and osteoarthritis of the knee and hip: a comprehensive meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(6):9430-7.
 28. Qing Z, Ye J. Association between ACE polymorphisms and osteoarthritis susceptibility. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(6):7391-6.
 29. Gu J, Rong J, Guan F, Jiang L, Tao S, Guan G, et al. MATN3 Gene Polymorphism Is Associated with Osteoarthritis in Chinese Han Population: A Community-Based Case-Control Study. *Scientific World Journal.* 2012;2012:656084.
 30. Meulenbelt I, Min J, Bos S, Riyazi N, Houwing J, Slagboom E, et al. Identification of DIO2 as a new susceptibility locus for symptomatic osteoarthritis. *Hum Mol Genet.* 2008;17:1867-75.
 31. Poonpet T, Honsawek S, Tammachote N, Kanitnate S, Tammachote R. ADAMTS14 gene polymorphism associated with knee osteoarthritis in Thai women. *Genet Mol Res.* 2013;12:5301-9.
 32. Wang L, Guo L, Tian F, Hao R, Yang T. Analysis of single nucleotide polymorphisms within ADAM12 and risk of knee osteoarthritis in a Chinese Han population. *Biomed Res Int.* 2015;2015:518643.
 33. Kerna I, Kisand K, Tamm AE, Kumm J, Tamm AO. Two single-nucleotide polymorphisms in ADAM12 gene are associated with early and late radiographic knee osteoarthritis in Estonian population. *Arthritis.* 2013;2013:878126.
 34. Fernández-Torres J, Hernández-Díaz C, Espinosa-Morales R, Camacho-Galindo J, Galindo-Sevilla Ndel C, López-Macay A, et al. Polymorphic variation of hypoxia inducible factor-1 A (HIF1A) gene might contribute to the development of knee osteoarthritis: a pilot study. *BMC Musculoskelet Disord.* 2015;16:218.
 35. Fernandes MT, Fernandes KB, Marquez AS, Cólus IM, Souza MF, Santos JP, et al. Association of interleukin-6 gene polymorphism (rs1800796) with severity and functional status of osteoarthritis in elderly individuals. *Cytokine.* 2015;75:316-20.
 36. Luo SX, Li S, Zhang XH, Zhang JJ, Long GH, Dong GF, et al. Genetic polymorphisms of interleukin-16 and risk of knee osteoarthritis. *PLoS One.* 2015;10:e0123442.
 37. Liu Z, Ma L, Qiu S, Jia T. Genetic polymorphisms of interleukin-16 are associated with susceptibility to primary knee osteoarthritis. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8:1401-5, eCollection 2015.
 38. Pan F, Tian J, Winzenberg T, Ding C, Jones. Association between GDF5 rs143383 polymorphism and knee osteoarthritis: an updated meta-analysis based on 23,995 subjects. *BMC Musculoskelet Disord.* 2014;15:404.
 39. Tawonsawatruk T, Changthong T, Pingsuthiwong S, Trachoo O, Saura T, Wajanavisit W. A genetic association study between growth differentiation factor (GDF5) polymorphism and knee osteoarthritis in Thai population. *J Orthopaed Surg.* 2011;Res6:2-5.
 40. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health.* 2009;1:461-8.
 41. Mariani E, Pulsatelli L, Facchini A. Signaling pathways in cartilage repair. *Int J Mol Sci.* 2014;15:8667-98.
 42. Chen JL, Duan L, Zhu W, Xiong J, Wang D. Extracellular matrix production in vitro in cartilage tissue engineering. *J Transl Med.* 2014;12:88.
 43. Findlay DM, Atkins GJ. Osteoblast-chondrocyte interactions in osteoarthritis. *Curr Osteoporos Rep.* 2014;12:127-34.
 44. Iwamoto M, Ohta Y, Larmour C, Enomoto-Iwamoto M. Toward regeneration of articular cartilage. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2013;99:192-202.
 45. Maldonado M, Nam J. The role of changes in extracellular matrix of cartilage in the presence of inflammation on the pathology of osteoarthritis. *Biomed Res Int.* 2013;2013:284873.
 46. van der Kraan PM. Osteoarthritis year 2012 in review: biology. *Osteoarthritis Cartilage.* 2012;20:1447-50.
 47. Zhang FJ, Luo W, Lei GH. Role of HIF-1 α and HIF-2 α in osteoarthritis. *Joint Bone Spine.* 2015;82:144-7.
 48. Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 and HIF-2 transcription factors—similar but not identical. *Mol Cells.* 2010;29:435-42.

49. Görlach A. Regulation of HIF-1 alpha at the transcriptional level. *Curr Pharm Des.* 2009;15:3844-52.
50. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol.* 2000;88:1474-80.
51. Maxwell PH. Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator. *Exp Physiol.* 2005;90:791-7.
52. Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem.* 2002;277:38205-11.
53. Fan L, Li J, Yu Z, Dang X, Wang K. The hypoxia-inducible factor pathway, prolyl hydroxylase domain protein inhibitors, and their roles in bone repair and regeneration. *Biomed Res Int.* 2014;2014:239356.
54. Catrina SB, Okamoto K, Pereira T, Brismar K, Poellinger L. Hyperglycemia regulates hypoxia-inducible factor-1 alpha protein stability and function. *Diabetes.* 2004;53:3226-32.
55. Zhou J, Hara K, Inoue M, Hamada S, Yasuda H, Moriyama H, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by glucose availability under hypoxic conditions. *Kobe J Med Sci.* 2008;53:283-96.
56. Tanimoto K, Yoshiga K, Eguchi H, Kaneyasu M, Ukon K, Kumazaki T, et al. Hypoxia-inducible factor-1a polymorphisms associated with enhanced transactivation capacity, implying clinical significance. *Carcinogenesis.* 2003;24:1779-83.
57. Yamada N, Horikawa Y, Oda N, Iizuka K, Shihara N, Kishi S, et al. Genetic variation in the Hypoxia-Inducible Factor-1 α gene is associated with type 2 diabetes in Japanese. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:5841-7.
58. Tzouveleki A, Ntoliou P, Karameris A, Koutsopoulos A, Boglou P, Koulelidis A, et al. Expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α -vascular endothelial growth factor (VEGF)-inhibitory growth factor (ING)-4- axis in sarcoidosis patients. *BMC Res Notes.* 2012;5:654.
59. Sartori-Cintra AR, Mara CS, Argolo DL, Coimbra IB. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) expression by interleukin-1 β (IL-1 β), insulin-like growth factors I (IGF-I) and II (IGF-II) in human osteoarthritic chondrocytes. *Clinics (São Paulo).* 2012;67:35-40.
60. Konac E, Dogan I, Onen HI, Yurdakul AS, Ozturk C, Varol A, et al. Genetic variations in the hypoxia-inducible factor-1alpha gene and lung cancer. *Exp Biol Med.* 2009;234:1109-16.
61. Li P, Cao Q, Shao PF, Cai HZ, Zhou H, Chen JW, et al. Genetic polymorphisms in HIF1A are associated with prostate cancer risk in a Chinese population. *Asian J Androl.* 2012;14:864-9.
62. Alidoosti M, Ghaedi M, Soleimani A, Bakhtiyari S, Rezvanfar M, Golkhu S, et al. Study on the role of environmental parameters and HIF-1A gene polymorphism in coronary collateral formation among patients with ischemic heart disease. *Clin Biochem.* 2010;44:1421-4.
63. Bahadori B, Uitz E, Mayer A, Harauer J, Dam K, Truschnig-Wilders M, et al. Polymorphisms of the hypoxia-inducible factor 1 gene and peripheral artery disease. *Vasc Med.* 2010;15:371-4.
64. Nagy G, Kovacs R, Kereszturi E, Somogyi A, Szekely A, Nemeth N, et al. Association of hypoxia inducible factor-1 alpha gene polymorphism with both type 1 and type 2 diabetes in a Caucasian (Hungarian) sample. *BMC Med Genet.* 2009;10:79.
65. Yang HY, Chuang SY, Fang WH, Huang GS, Wang CC, Huang YY, et al. Effect of RAGE polymorphisms on susceptibility to and severity of osteoarthritis in a Han Chinese population: a case-control study. *Genet Mol Res.* 2015;14:11362-70.
66. Swellam M, Mahmoud MS, Samy N, Gamal AA. Potential influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on knee osteoarthritis risk. *Dis Markers.* 2010;28:299-305.
67. Uchanska-Ziegler B, Loll B, Fabian H, Hee CS, Saenger W, Ziegler A. HLA class I-associated diseases with a suspected autoimmune etiology: HLA-B27 subtypes as a model system. *Eur J Cell Biol.* 2012;91:274-86.
68. Hong JM, Kim TH, Chae SC, Koo KH, Lee YJ, Park EK, et al. Association study of hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha) with osteonecrosis of femoral head in a Korean population. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007;15:688-94.
69. Muz B, Larsen H, Madden L, Kiriakidis S, Paleolog EM. Prolyl hydroxylase domain enzyme 2 is the major player in regulating hypoxic responses in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2012;64:2856-67.
70. Grimmer C, Balbus N, Lang U, Aigner T, Cramer T, Müller L, et al. Regulation of type II collagen synthesis during osteoarthritis by prolyl-4-hydroxylases: possible influence of low oxygen levels. *Am J Pathol.* 2006;169:491-502.
71. Raine EV, Dodd AW, Reynard LN, Loughlin J. Allelic expression analysis of the osteoarthritis susceptibility gene COL11A1 in human joint tissues. *BMC Musculoskelet Disord.* 2013;14:85.
72. Rodriguez-Fontenla C, Calaza M, Evangelou E, Valdes AM, Arden N, Blanco FJ, et al. Assessment of osteoarthritis candidate genes in a meta-analysis of nine genome-wide association studies. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66:940-9.
73. Sánchez-Enríquez S, Torres-Carrillo NM, Vázquez-Del Mercado M, Salgado-Goytia L, Rangel-Villalobos H, Muñoz-Valle JF. Increase levels of apo-A1 and apo B are associated in knee osteoarthritis: lack of association with VEGF-460 T/C and +405 C/G polymorphisms. *Rheumatol Int.* 2008;29:63-8.
74. Yuan Q, Sun L, Li JJ, An CH. Elevated VEGF levels contribute to the pathogenesis of osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord.* 2014;15:437.
75. Barlas IO, Sezgin M, Erdal ME, Sahin G, Ankarali HC, Altintas ZM, et al. Association of (-1,607) 1G/2G polymorphism of matrix metalloproteinase-1 gene with knee osteoarthritis in the Turkish population (knee osteoarthritis and MMPs gene polymorphisms). *Rheumatol Int.* 2009;29:383-8.
76. Lepetos P, Pampanos A, Kanavakis E, Tzetis M, Korres D, Papavassiliou AG, et al. Association of MMP-1 -1607 1G/2G (rs1799750) polymorphism with primary knee osteoarthritis in the Greek population. *J Orthop Res.* 2014;32:1155-60.
77. Honsawek S, Malila S, Yuktanandana P, Tanavalee A, Deepaisarnsakul B, Parvizi J. Association of MMP-3 (-1612 5A/6A) polymorphism with knee osteoarthritis in Thai population. *Rheumatol Int.* 2013;33:435-9.
78. Cooke GE, Doshi A, Binkley PF. Endothelial nitric oxide synthase gene: prospects for treatment of heart disease. *Pharmacogenomics.* 2007;8:1723-34.
79. An JD, Li XY, Yu JB, Zhao Y, Jin ZS. Association between the eNOS gene polymorphisms and rheumatoid arthritis risk in a northern Chinese population. *Chin Med J (Engl).* 2012;125:1496-9.
80. Brenol CV, Chies JA, Brenol JC, Monticeli OA, Franciscatto P, Birriel F, et al. Endothelial nitric oxide synthase T-786 C polymorphism in rheumatoid arthritis: association with extraarticular manifestations. *Clin Rheumatol.* 2009;28:201-5.
81. Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev.* 2013;27:41-53.
82. Torti L, Teofili L, Capodimonti S, Nuzzolo ER, Iachininoto MG, Massini G, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α (Pro-582-Ser) polymorphism prevents iron deprivation in healthy blood donors. *Blood Transfus.* 2013;11:553-7.
83. Xia Y, Choi HK, Lee K. Recent advances in hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2012;49:24-40.

-
84. Yuan Q, Bleiziffer O, Boos AM, Sun J, Brandl A, Beier JP, et al. PHDs inhibitor DMOG promotes the vascularization process in the AV loop by HIF-1 α up-regulation and the preliminary discussion on its kinetics in rat. *BMC Biotechnol.* 2014;14:112.
 85. Brocato J, Chervona Y, Costa M. Molecular responses to hypoxia-inducible factor 1 α and beyond. *Mol Pharmacol.* 2014;85:651-7.
 86. Smith TG, Talbot NP. Prolyl hydroxylases and therapeutics. *Antioxid Redox Signal.* 2010;12:431-3.
 87. Danis A. Mechanism of bone lengthening by the Ilizarov technique. *Bull Mem Acad R Med Belg.* 2001;156(1-2):107-12.
 88. Koh MY, Powis G. Passing the baton: the HIF switch. *Trends Biochem Sci.* 2012;37:364-72.
 89. Bohensky J, Terkhorn SP, Freeman TA, Adams CS, Garcia JA, Shapiro IM, et al. Regulation of autophagy in human and murine cartilage: hypoxia-inducible factor 2 suppresses chondrocyte autophagy. *Arthritis Rheum.* 2009;60:1406-15.