

CAPÍTULO 6

Tejidos cartilaginoso y óseo

*Andrea V. Pachamé, Pedro Fernando Andrés Laube
y Mariano D. Scianda*

Introducción

El tejido cartilaginoso y el tejido óseo constituyen variedades especializadas de tejido conectivo que poseen una MEC que los identifica (matriz cartilaginosa y matriz ósea, respectivamente; ésta última se caracteriza por estar mineralizada). En ambos casos, la MEC alberga a las células en pequeñas cavidades individuales denominadas lagunas. Ambos tejidos son altamente especializados y realizan diferentes funciones, mecánicas, protectoras y metabólicas.

El tejido cartilaginoso forma la mayor parte de los cartílagos, estructuras que dan sostén a distintos órganos y que constituyen el molde para el desarrollo de algunos huesos. Este tejido se encuentra en los vertebrados, pero también en algunos invertebrados; el tejido óseo, por el contrario, es exclusivo de los vertebrados. El tejido óseo es el componente principal de los huesos. Estos órganos forman parte del sistema esquelético y, además, contienen otros tejidos de origen mesenquimático, como los tejidos conectivo ordinario y adiposo, vasos sanguíneos y nervios. Los vertebrados poseen un endoesqueleto formado principalmente por huesos, a excepción de los condriactos, como tiburones y rayas, cuyo esqueleto es cartilaginoso. Este endoesqueleto permite que los vertebrados terrestres alcancen un tamaño mucho mayor que aquel de algunos invertebrados terrestres (como los insectos) que desarrollan un exoesqueleto.

Tejido cartilaginoso

El tejido cartilaginoso es un tejido de sostén muy hidratado, lo que, en conjunto con otras características de la matriz, le otorgan una gran capacidad de amortiguación. Este tejido y las capas conectivas que lo rodean (**pericondrio**) forman estructuras denominadas cartílagos. Las células del tejido cartilaginoso, los **condrocitos**, son escasas, están distribuidas en espacios aislados dentro de la **matriz cartilaginosa** y son esenciales para la producción y el mantenimiento de esa matriz (**Fig. 1**). La matriz representa el 95 % del volumen total del tejido y está

constituida por fibras incluidas en una sustancia fundamental. El tejido cartilaginoso posee las siguientes características generales:

- es un tejido avascular. Como carece de vasos sanguíneos, las células reciben los nutrientes desde la sangre que llega al tejido conectivo circundante por difusión a través de la sustancia fundamental de la MEC.
- carece de terminaciones nerviosas, a excepción del tejido cartilaginoso de las articulaciones.
- las células se encuentran alojadas en pequeñas cavidades o **lagunas**, presentan una escasa actividad metabólica y, ante un estímulo, son capaces de dividirse por mitosis en cualquier momento de su vida.

En la vida posnatal la distribución del tejido cartilaginoso se limita a parte del armazón rígido de las vías aéreas y del pabellón auricular, y a los cartílagos articulares y costales del esqueleto. En la vida prenatal constituye un tejido esencial para la osificación, dado que la mayor parte del esqueleto se forma, inicialmente, sobre la base de un molde de cartílago (osificación endocondral).

De acuerdo, principalmente, con las características de la matriz (y como consecuencia, con sus propiedades mecánicas) existen tres variedades de tejido cartilaginoso: hialino, elástico y fibroso (fibrocartílago). Para la descripción de las células y la matriz del tejido cartilaginoso se tomará como modelo el tejido cartilaginoso hialino y luego se describirán las características diferenciales de las otras variedades.

Tejido cartilaginoso hialino

El tejido cartilaginoso hialino es la variedad más abundante. En estado fresco, presenta un aspecto vítreo azulado o hialino (del griego *hyalos*, vidrio) y se lo puede localizar formando parte del esqueleto fetal, en las vías respiratorias (laringe, tráquea y bronquios), en las superficies articulares y en los cartílagos costales. Este tipo de tejido tiene como función la amortiguación y la resistencia a la compresión en las articulaciones sinoviales. Además, provee un sostén estructural flexible a los órganos del sistema respiratorio. Con excepción del cartílago articular, el tejido cartilaginoso hialino está rodeado por una capa de tejido conectivo denso denominada pericondrio.

El **pericondrio** es una estructura vascularizada, cuyas funciones son nutrir y proveer al tejido cartilaginoso de nuevos condrocitos. Está formado por dos capas: una fibrosa externa, con las características de un tejido conectivo denso ordinario, compuesto principalmente de colágeno tipo I, fibroblastos y vasos sanguíneos y, una capa celular interna, también llamada **capa condrogénica** con células condrogénicas que se dividen, ingresan al tejido cartilaginoso y se diferencian a condrocitos, que comienzan a elaborar matriz (**Fig. 1A-B**). Por lo tanto, los condrocitos recién diferenciados se encuentran en las lagunas ubicadas inmediatamente por dentro del pericondrio y se denominan condrocitos inmaduros. A continuación, se describen las células del tejido cartilaginoso hialino y las características de su matriz.



Figura 1. Tejido cartilaginoso hialino (tráquea). Microfotografía. Pericondrio. A: capa fibrosa, externa; B: capa condrógena, interna. 1: condrocitos inmaduros, 2: condrocitos maduros; círculos: grupos isógenos. 40X. HE. Archivo de la Cátedra de Histología y Embriología, FCV-UNLP.

Células del tejido cartilaginoso

Condrocitos

Los **condrocitos** son células especializadas cuya función principal es sintetizar y mantener la MEC. Pueden encontrarse solos o formando agrupaciones llamadas **grupos isógenos**, que resultan de las divisiones mitóticas que realizan dentro de la laguna. Son células ovoides, con núcleo excéntrico, oval y de cromatina laxa (**Fig. 1**). El aspecto del citoplasma varía según la actividad celular, son más basófilos cuando son inmaduros, debido a la abundancia de RER y ribosomas, relacionada con la activa síntesis de MEC. Además, poseen un prominente aparato de Golgi. Durante el proceso de diferenciación hacia condrocito maduro disminuye el tamaño del aparato de Golgi y el RER. Además, secretan enzimas que degradan la MEC adyacente y, de este modo pueden crecer y expandirse dentro de la laguna. Frecuentemente poseen grandes inclusiones de glucógeno y pequeñas gotas lipídicas en el citoplasma, que no se colorean con la técnica de HE. A menudo los condrocitos se observan retraídos, esto sucede como consecuencia del proceso de deshidratación durante las preparaciones histológicas. Luego de dividirse cada uno de los condrocitos hijos comienza a sintetizar MEC y las células que forman el grupo isógeno se encuentran, entonces, muy cercanas entre sí, pero ya no dentro de la misma laguna.

Matriz cartilaginosa

Macroscópicamente, de la matriz cartilaginosa depende el aspecto algo translúcido y el color blanco azulado que posee el cartílago en estado fresco. Es homogénea, porque las fibras que forma el colágeno tipo II son muy delgadas y, además, poseen el mismo índice de refracción que la sustancia fundamental. El colágeno es la principal proteína de la matriz y las fibras de colágeno tipo II son las más abundantes. Además, existen otros tipos de colágeno, como IX, X y XI, que interactúan con el II y con el resto de los componentes de la matriz cartilaginosa. La sustancia fundamental contiene tres variedades de GAG: el hialuronato (que no forma proteoglicanos) el

condroitín sulfato y el queratán sulfato, con una fuerte carga negativa que atrae gran cantidad de moléculas de agua. Así, la matriz cartilaginosa contiene entre 60 a 80 % de agua y constituye un gel coloidal. La gran proporción de GAG respecto de las fibras de colágeno facilita la difusión de sustancias desde los vasos sanguíneos y a través de la matriz cartilaginosa hacia los condrocitos. El contenido de proteoglicanos disminuye durante el envejecimiento del tejido cartilaginoso.

En los preparados coloreados con HE la matriz es intensamente basófila, esta afinidad obedece a la acidez de los GAG. Según su afinidad tintorial, en la matriz se diferencian tres regiones (**Fig. 2**):

- la **matriz capsular (pericelular)**, de mayor intensidad tintorial, forma un halo fuertemente basófilo alrededor de la membrana celular de cada condrocito. Esta zona se caracteriza por poseer mayor concentración de hialuronato, proteoglicanos sulfatados (bioglicanos, decorina) y varias proteínas multiadhesivas (por ejemplo, fibronectina y laminina). Además, posee abundante colágeno tipo VI que interacciona con el resto de la matriz y forma una red compacta alrededor de cada condrocito.
- la **matriz territorial** es la que se observa alrededor de cada grupo isógeno. Su basofilia es menor con respecto a la matriz capsular. Esto obedece a una cantidad menor de proteoglicanos sulfatados. Presenta una red de fibrillas de colágeno tipo II y, en menor proporción, colágeno tipo IX.
- la **matriz interterritorial** es adyacente a la matriz territorial y ocupa los espacios que se encuentran entre cada grupo isógeno; es la de tinción menos intensa por la menor concentración de GAG ácidos.

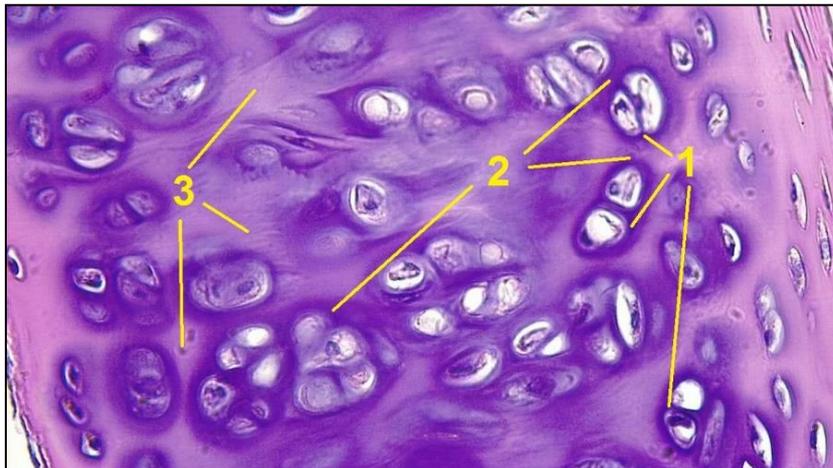


Figura 2. Tejido cartilaginoso hialino (tráquea). Microfotografía. 1: matriz capsular; 2: matriz territorial; 3: matriz interterritorial. 40X. HE. Archivo de la Cátedra de Histología y Embriología, FCV-UNLP.

Tejido cartilaginoso elástico

El tejido cartilaginoso elástico se localiza en el pabellón auricular, las paredes del conducto auditivo externo, la trompa auditiva (de Eustaquio) y, además, forma al cartílago epiglótico y parte

de otros cartílagos laríngeos. En comparación con el tejido cartilaginoso hialino, la MEC es menos abundante y está constituida principalmente por finas fibras elásticas muy ramificadas y fibras de colágeno de tipo II. Las primeras pueden ponerse en evidencia mediante técnicas especiales de coloración como, por ejemplo, orceína (**Fig. 3**). A diferencia de lo que ocurre con el tejido cartilaginoso hialino, la variedad elástica no se calcifica con el envejecimiento.

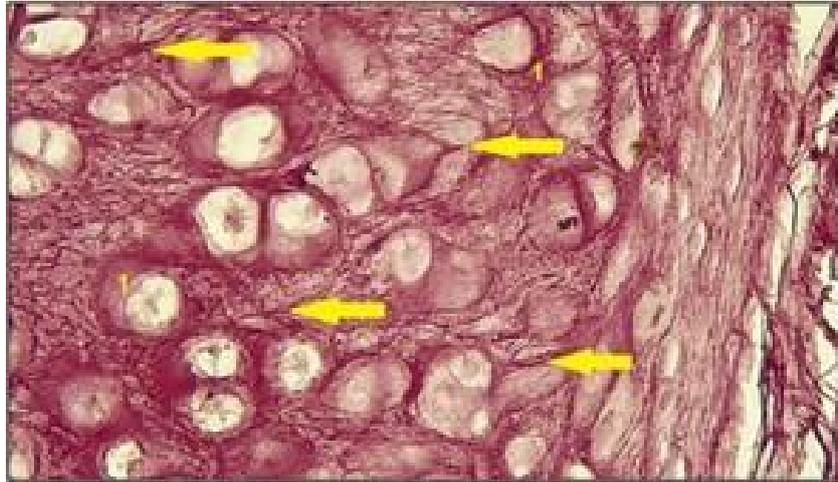


Figura 3. Tejido cartilaginoso elástico (pabellón auricular). Microfotografía. 1: condrocitos; flechas: fibras elásticas. 100X. Orceína. Archivo de la Cátedra de Histología y Embriología, FCV-UNLP.

Tejido cartilaginoso fibroso (fibrocartílago)

El tejido cartilaginoso fibroso o fibrocartílago presenta características intermedias entre las del tejido conectivo denso regular y las del tejido cartilaginoso hialino. En la MEC existe una combinación de fibras de colágeno tipo I (típicas del tejido conectivo ordinario) y fibras de colágeno tipo II (abundantes en el tejido cartilaginoso hialino), en una proporción variable. Comparado con la variedad hialina, posee escasa sustancia fundamental. Los condrocitos suelen disponerse formando grupos isógenos alargados o axiales entre los haces de fibras de colágeno tipo II. En otras zonas se encuentran fibroblastos y fibras de colágeno tipo I (**Fig. 4**). A diferencia de los cartílagos formados por las otras variedades de tejido cartilaginoso, los fibrocartílagos carecen de pericondrio. Esta variedad de tejido cartilaginoso se encuentra en los discos intervertebrales, sínfisis púbica, discos y meniscos articulares, en aquellos lugares de inserción de ligamentos y tendones, y en los triángulos fibrosos del corazón del perro.

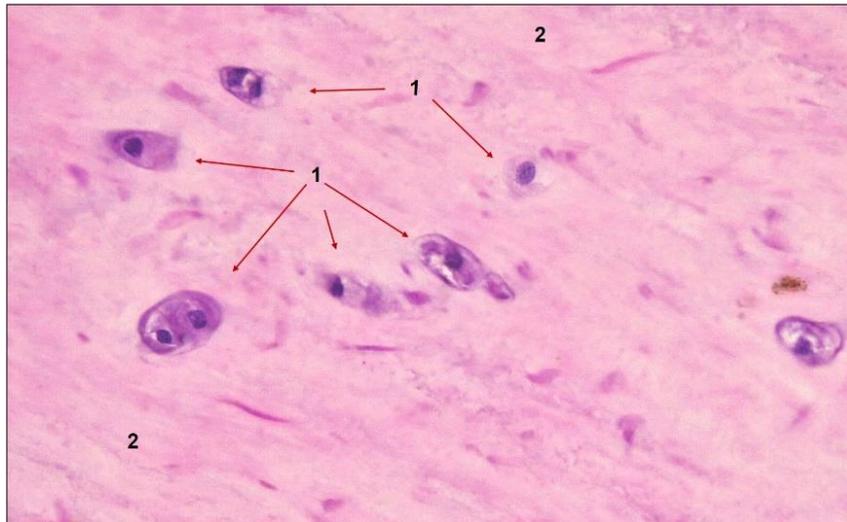


Figura 4. Tejido cartilaginoso fibroso. Microfotografía. 1: grupos isógenos; 2: haces de fibras de colágeno. 40X. HE. Archivo de la Cátedra de Histología y Embriología, FCV-UNLP.

Desarrollo tejido cartilaginoso (condrogénesis)

El desarrollo del tejido cartilaginoso, o **condrogénesis**, ocurre en la vida prenatal. Comienza con la agrupación de las células mesenquimáticas que pierden sus prolongaciones y sus uniones intercelulares, se hacen más redondeadas, se diferencian a condroblastos y conforman aglomeraciones celulares densas conocidas como **centros de condricación o nódulos condrogénicos**. A medida que los condroblastos sintetizan y depositan matriz cartilaginosa quedan rodeados por ella (y, por lo tanto, incluidos dentro de una laguna) y se diferencian gradualmente a condrocitos. Por otro lado, el tejido mesenquimático próximo al tejido cartilaginoso en formación se diferencia y forma una estructura de tejido conectivo denso, el **pericondrio**, responsable del crecimiento y mantenimiento del tejido cartilaginoso.

Crecimiento del tejido cartilaginoso

Una vez que el tejido cartilaginoso se ha formado, su **crecimiento** (pre y posnatal) ocurre por dos procesos: **aposicional** e **intersticial**.

Crecimiento aposicional

Este tipo de crecimiento del tejido cartilaginoso es consecuencia de la diferenciación de las células de la capa condrogénica del pericondrio. Estas células ingresan al cartílago y se convierten en condrocitos que comienzan a secretar MEC que se deposita sobre la superficie del tejido cartilaginoso preexistente. Dado que se mantienen células condrogénicas dentro de la capa condrogénica del pericondrio, esta población celular permitirá que el crecimiento aposicional continúe incluso en la etapa posnatal.

Crecimiento intersticial

El crecimiento intersticial ocurre desde el interior del tejido cartilaginoso. Los condrocitos que se encuentran dentro de las lagunas proliferan mediante sucesivas divisiones mitóticas y sintetizan y secretan matriz cartilaginosa que los rodea. Por lo tanto, a partir de una única célula se generan primero dos y luego cuatro células hijas iguales, conformando así el grupo isógeno. Inicialmente, las células comparten la laguna, luego sintetizan matriz y se separan. Por último, cada nueva célula podrá formar un nuevo grupo isógeno.

Reparación y calcificación

Cuando el tejido cartilaginoso hialino se daña, solamente puede regenerarse en algunas regiones y si la lesión es muy pequeña. Tiene una capacidad limitada de reparación que, generalmente, ocurre por reemplazo por tejido conectivo denso. Cuando disminuye el flujo sanguíneo alrededor del tejido cartilaginoso, sus células pueden morir y el tejido es invadido por vasos sanguíneos y células fagocíticas mientras que la matriz cartilaginosa es reabsorbida y sustituida por tejido conectivo denso. El tejido cartilaginoso hialino puede calcificarse, se trata de un cambio degenerativo que puede ocurrir como resultado del envejecimiento o en el contexto de ciertas enfermedades. La calcificación de la MEC desencadena la muerte de los condrocitos por que los nutrientes no pueden difundir en una matriz con esas características.

Tejido óseo

El tejido óseo constituye una de las variedades especializadas de tejido conectivo, es un tejido vascularizado e innervado y es el principal componente estructural de los **huesos**. Al igual que otras variedades de tejido conectivo está compuesto por células y una MEC rica en fibras colágenas, que en este caso está mineralizada. Es un tejido dinámico, altamente especializado y con gran actividad, que realiza diferentes funciones, mecánicas, de protección, y metabólicas. En el tejido óseo existen diferentes tipos celulares. Las **células osteoprogenitoras** dan origen a los osteoblastos. Los **osteoblastos** son células que sintetizan y secretan MEC y, una vez que quedan rodeados por la matriz secretada se diferencian a osteocitos. Los **osteocitos** son las células más abundantes, emiten proyecciones citoplasmáticas delgadas que se extienden por canalículos en la matriz y su función principal es mantener la viabilidad del tejido óseo. Las **células del revestimiento óseo** suelen hallarse en la superficie del tejido y se originan a partir de los osteoblastos cuando estos pasan a un estado de inactividad, no obstante, pueden volver a diferenciarse en osteoblastos. Los **osteoclastos** son células multinucleadas que se ubican en los sitios donde ocurre la resorción ósea, su origen es distinto al de las restantes células óseas, ya que provienen de las mismas células progenitoras que los monocitos sanguíneos.

El tejido óseo está cubierto en su superficie externa, excepto en las articulaciones sinoviales, por una estructura denominada **periostio**, que posee una **capa fibrosa** externa de tejido conectivo denso y una capa celular interna, también llamada **capa osteógena**, con células osteoprogenitoras y de revestimiento óseo. Entre el periostio y el tejido óseo se encuentran haces de fibras de colágeno tipo I (fibras de Sharpey) que facilitan la fijación entre ambos. El **endostio** reviste todas las cavidades del tejido óseo. Se compone de una única capa de células osteoprogenitoras y células de revestimiento óseo.

Matriz extracelular del tejido óseo

La MEC consta de fibras de colágeno de tipo I, con colágeno V asociado. En el tejido óseo maduro la matriz se dispone formando **laminillas óseas** que son estructuras de MEC organizada donde las fibras de colágeno se disponen en forma paralela. Las laminillas toman diferentes disposiciones en los distintos tipos de tejido óseo.

La matriz también contiene otras proteínas y péptidos no colágenos que forman la sustancia fundamental del tejido óseo, los cuatro grupos principales son: proteoglicanos; proteínas específicas del tejido óseo, glicoproteínas multiadhesivas, factores de crecimiento y citocinas. Los proteoglicanos son los componentes responsables de la resistencia a la compresión y además fijan factores de crecimiento. Las proteínas específicas del tejido óseo incluyen la osteocalcina, la proteína S y la proteína Gla matricial. Entre ellas, la osteocalcina es una proteína específica del tejido óseo importante para la fijación de Ca^{2+} . Las glicoproteínas multiadhesivas, como la osteonectina, la osteopontina y las sialoproteínas I y II actúan en la adhesión de las células óseas entre sí y con fibras colágenas.

Los factores de crecimiento y citocinas incluyen el factor de crecimiento similar a insulina, el factor de crecimiento de necrosis tumoral, diversas proteínas morfogénicas óseas (BMP*) y las interleucinas 1 y 6. Las BMP intervienen en el desarrollo del tejido óseo tanto en la etapa prenatal como en la posnatal.

La MEC recién sintetizada por los osteoblastos y aún no mineralizada se denomina **osteóide**. Luego, cuando se produce la mineralización, se la denomina **matriz ósea**. El componente mineral más abundante es la **hidroxiapatita**, una forma cristalina de fosfato de Ca^{2+} . El depósito de minerales le imparte una característica particular al tejido óseo, la dureza, capaz de proveer sostén y protección a los diferentes órganos. Además, es una característica de este tejido que lo diferencia del tejido conectivo ordinario y de otros tejidos especializados.

Células del tejido óseo

Las **células osteoprogenitoras** derivan de las células madre mesenquimáticas de la médula ósea; pueden diferenciarse en osteoblastos, aunque mantienen la potencialidad para hacerlo

también hacia condrocitos, adipocitos o fibroblastos. Son células aplanadas con escasas organelas que se hallan en la capa más profunda del periostio (células periósticas) y en el endostio (células endósticas). Se encuentran en estado de reposo y ante un estímulo, por ejemplo, una fractura, se diferencian a osteoblastos (**Fig. 5**).

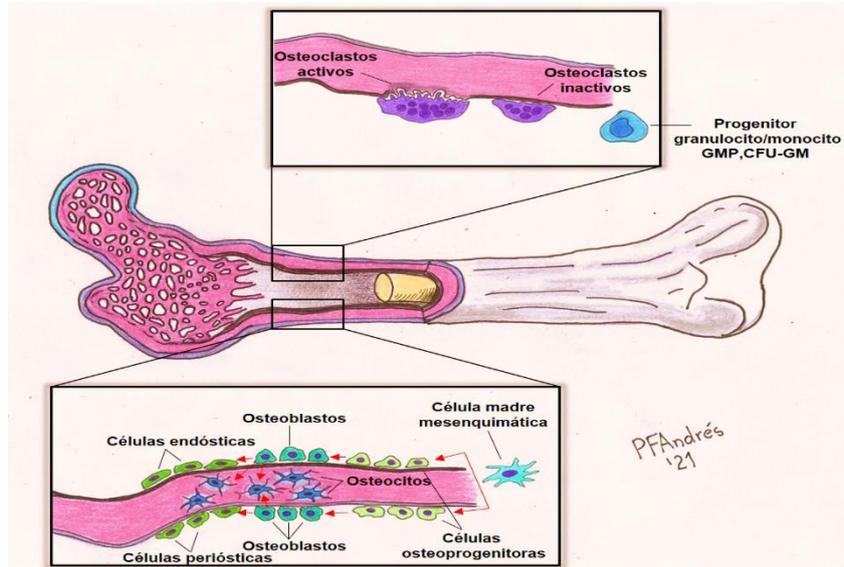


Figura 5. Esquema. Células del tejido óseo. Todas las células con excepción de los osteoclastos se originan de células madre mesenquimáticas. Autor: Méd.Vet. Pedro Fernando Andrés Laube.

Los **osteoblastos** son células diferenciadas que pueden dividirse ante algunos estímulos. Su función principal es sintetizar y secretar todos los componentes orgánicos de la MEC e inducir su mineralización. Las BMP estimulan la diferenciación de los osteoblastos y promueven su activación. Los osteoblastos “activos” forman una monocapa, alineados en la superficie del tejido óseo en formación. Se reconocen por su forma cuboide o poliédrica y su citoplasma basófilo (**Fig. 5 y 9B**). Poseen prolongaciones en su polo apical (el más alejado de las superficies óseas). Cuando los osteoblastos dejan de sintetizar matriz pueden convertirse en células de revestimiento óseo o pueden quedar totalmente rodeados de matriz ósea y diferenciarse en osteocitos. Los osteoblastos y los osteocitos permanecen conectados mediante uniones nexo en sus prolongaciones citoplasmáticas.

Los **osteocitos** son células más pequeñas que los osteoblastos que se encuentran inmersas en la matriz ósea dentro de la laguna (**Fig. 5 y 9B**). Presentan un núcleo oval, escaso citoplasma y contorno irregular. Carecen de polaridad. Poseen numerosas prolongaciones citoplasmáticas que, mediante canaliculos, se unen con las de otras células (otros osteocitos, osteoblastos, células de revestimiento óseo). Secretan diversas moléculas de señal, como el óxido nítrico y los transportadores de glutamato, de esta manera, se comunican con osteoblastos, pericitos de los vasos sanguíneos y otras células distantes. Además, son capaces de responder a diferentes estímulos mecánicos (mecanotransducción). Su función principal es el mantenimiento de la matriz ósea. Se pueden diferenciar tres estadios funcionales: **latentes, formativos y resorptivos**.

En el estado latente están inactivos, pero pueden salir de ese estado al ser estimulados. Por ejemplo, la actividad física induce la función formativa de matriz, mientras que la inactividad genera un incremento de la resorción. La capacidad resorptiva, que es menor que la del osteoclasto, consiste en la secreción de metaloproteasas de la matriz que degradan los componentes de la MEC, este proceso es denominado osteólisis osteocítica. En el estado formativo pueden sintetizar componentes de la MEC, pero en una cantidad mucho menor que los osteoblastos.

Las **células de revestimiento óseo** se encuentran revistiendo las superficies óseas en aquellas zonas donde no se está produciendo ni la resorción ósea ni la síntesis de nueva matriz. Como las células osteoprogenitoras, pueden ser células periósticas o endósticas (**Fig. 5**). Son planas, de citoplasma escaso, con prolongaciones cortas mediante las que contactan con células vecinas.

Los **osteoclastos** son células gigantes (hasta 100 μm), multinucleadas, que pueden llegar a tener 200 núcleos. Derivan de la fusión de las células progenitoras de monocitos sanguíneos y son parte del sistema fagocítico mononuclear. La función principal de los osteoclastos es la resorción del tejido óseo y del tejido cartilaginoso calcificado. Se localizan en cavidades del tejido óseo, las lagunas de Howship (**Fig. 5 y 6**). La membrana plasmática, que se yuxtapone a la superficie de la matriz ósea a reabsorber, presenta un contorno festoneado, con evaginaciones e invaginaciones que incrementan la superficie de contacto que es mucho más prominente en la célula activa. El citoplasma cercano a este borde posee numerosas mitocondrias, lisosomas y vesículas endocíticas que le otorgan acidofilia a la zona. La resorción ósea se produce mediante la acción de protones e hidrolasas lisosómicas liberados hacia un microambiente restringido del espacio extracelular, ubicado en las hendiduras que existen entre las invaginaciones citoplasmáticas (**Fig. 6**). Entre las enzimas lisosomales se encuentran las fosfatasa y diversas enzimas proteolíticas, como, por ejemplo, metaloproteasas de acción colagenasa y catepsina que degradan a la matriz ósea. La acidificación de la MEC, consecuencia de la secreción de protones, promueve la decalcificación y activa las enzimas lisosomales liberadas. El citoplasma del osteoclasto contiene anhidrasa carbónica II, enzima que cataliza la separación de los protones del ácido carbónico; estos luego son liberados al exterior por una bomba de protones (**Fig. 6**). El medio ácido inicia la degradación del componente mineral del tejido óseo (principalmente la hidroxiapatita). Entre los repliegues del borde festoneado suelen hallarse cristales de hidroxiapatita, indicios de la degradación de la matriz ósea. Los osteoclastos también endocitan los productos generados por esta degradación. Cuando se completa la resorción del tejido óseo, los osteoclastos mueren por apoptosis. La formación del borde festoneado es estimulada por la paratohormona u hormona paratiroidea (PTH) e inhibida por la hormona calcitonina (capítulo 19).

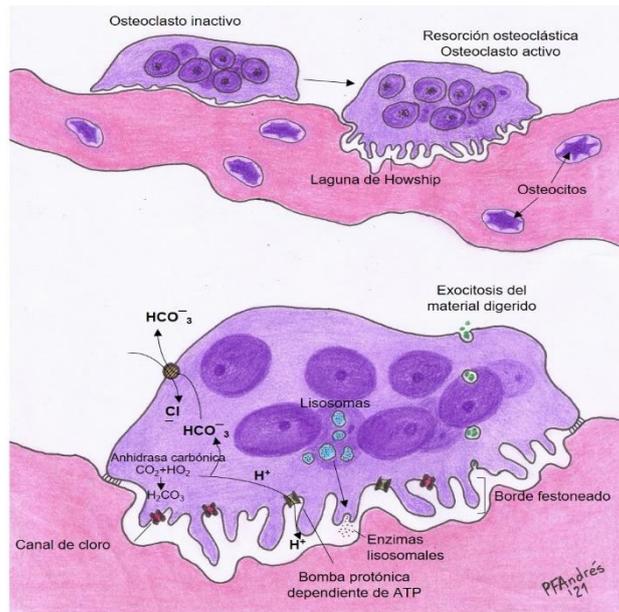


Figura 6. Esquema. Osteoclastos⁴³. Autor: Méd.Vet. Pedro Fernando Andrés Laube.

Los osteoclastos se fijan a la matriz ósea en los límites periféricos de la zona que se está degradando mediante proteínas de unión, de esa manera se sella la región y se impide que los protones y las enzimas difundan por la MEC y que la resorción se extienda en demasía.

Tipos y variedades de tejido óseo

Tejido óseo maduro e inmaduro

Durante el desarrollo se originan dos tipos de tejido óseo: el tejido óseo entretejido o inmaduro y el tejido óseo laminillar o maduro. El **tejido óseo entretejido o inmaduro** es el primero que se forma durante la vida embrionaria y se caracteriza por una proporción mayor de células y de sustancia fundamental y menor de fibras con respecto al tejido óseo maduro. La mayor concentración de proteoglicanos origina su basofilia. Las fibras colágenas se disponen en direcciones variables (disposición entrelazada) o bien pueden formar haces paralelos entre sí, pero nunca se organizan en laminillas. Este tejido inmaduro es menos resistente, más débil, y permite cierta movilidad. Es el tipo de tejido óseo del hueso alveolar (alvéolos dentarios), uno de los pocos sitios donde el tejido óseo inmaduro entretejido no es reemplazado por tejido maduro. También es el tipo de tejido óseo que se forma inmediatamente después de una fractura.

El **tejido óseo laminillar o maduro** se caracteriza por poseer laminillas óseas y posee mayor proporción de fibras respecto de la cantidad de células y de sustancia fundamental, lo que origina

⁴³ En este esquema la coloración citoplasmática del osteoclasto no es representativa respecto de la que adquiere con la técnica de HE.

su acidofilia. Las fibras colágenas presentan una disposición regular formando laminillas organizadas. En este tipo de tejido los osteocitos se disponen de manera más organizada, con su eje mayor paralelo a las laminillas (**Fig. 7 y 9A**).

Tejido óseo (maduro) compacto y esponjoso

De acuerdo con la disposición que adopten las laminillas de MEC dentro del tejido óseo maduro se pueden diferenciar dos variedades, el tejido óseo compacto y el tejido óseo esponjoso (**Fig. 7**).

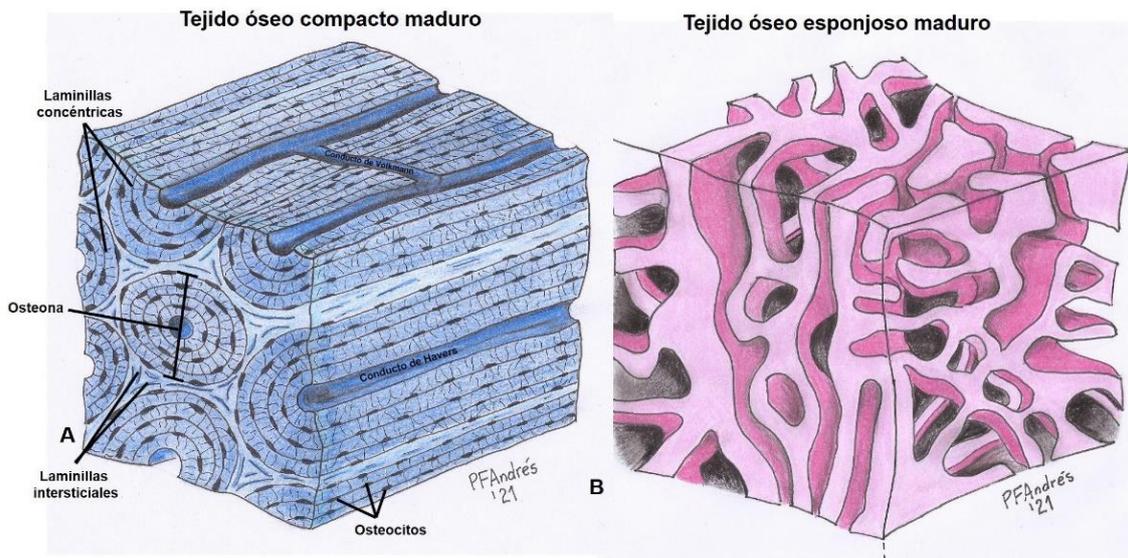


Figura 7. Esquemas representativos de A: tejido óseo maduro compacto, técnica de pulido y Azul de anilina; B: tejido óseo esponjoso descalcificado coloreado con HE. Autor: Méd. Vet. Pedro Fernando Andrés Laube.

Las variedades compacta y esponjosa se distribuyen de manera desigual en los huesos. Para mejor comprensión de esta distribución se presentan aspectos puntuales de la anatomía de los huesos largos. Un hueso largo típico consiste en un cuerpo llamado **diáfisis** y dos extremos expandidos que reciben el nombre de epífisis. Las **epífisis** están cubiertas por una fina capa de tejido cartilaginoso hialino que constituye la superficie articular. Las **metáfisis** son las zonas ensanchadas que se encuentran entre la diáfisis y las epífisis y se extienden desde la diáfisis hasta la placa de crecimiento. En el interior de la diáfisis se encuentra una gran cavidad que aloja a la médula ósea y se denomina **cavidad medular** (**Fig. 8**).

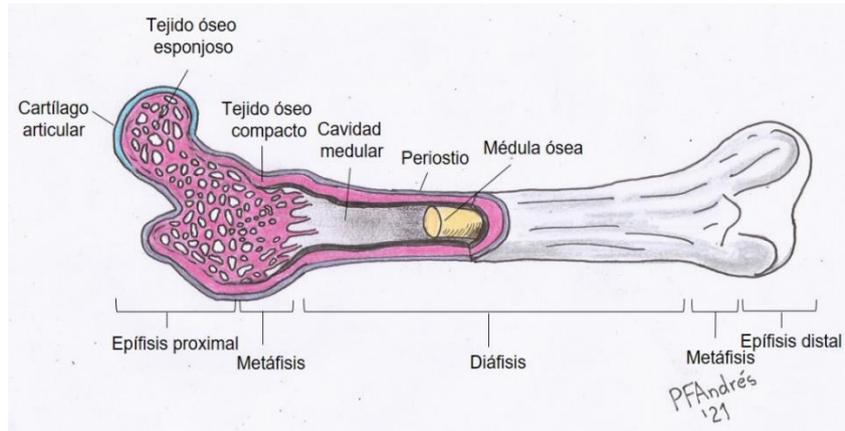


Figura 8. Esquema. Estructura de un hueso largo típico (horizontal). Autor: Méd.Vet. Pedro Fernando Andrés Laube.

En los huesos largos, el tejido óseo esponjoso suele encontrarse en las epífisis o en la parte interna de la cavidad medular, en cambio, el tejido óseo compacto se encuentra externamente y limitando la cavidad medular en la zona diafisaria (**Fig. 9**).

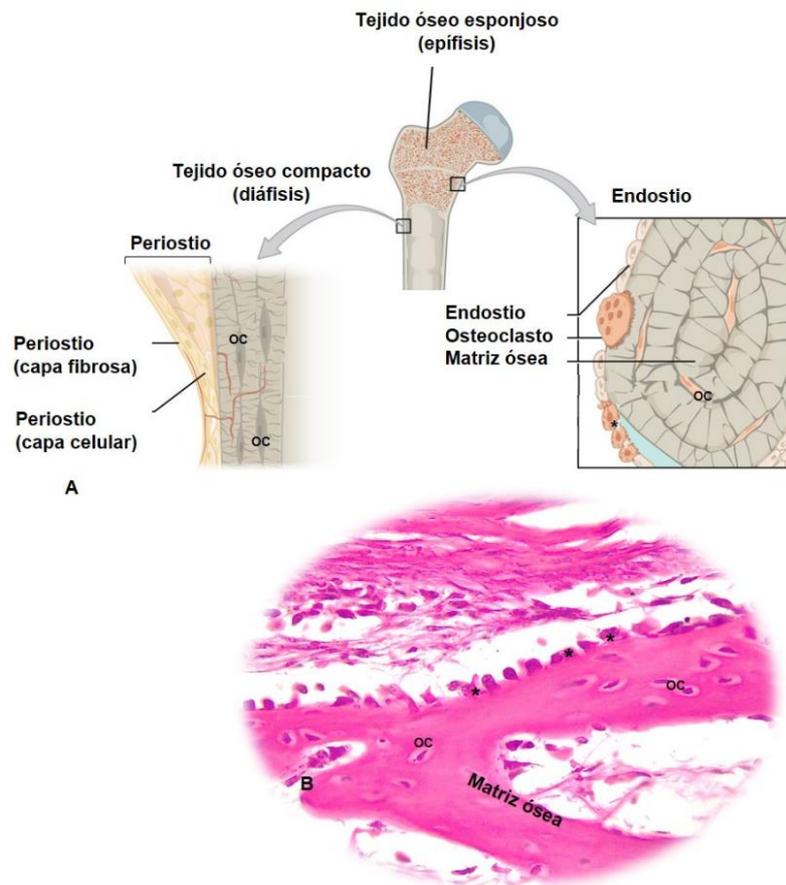


Figura 9. A. Esquema. Tejido óseo compacto (izq.) y esponjoso (der.). Periostio y endostio. Flechas gruesas: canaliculos que conectan osteocitos. B. Tejido óseo esponjoso. La microfotografía se corresponde con el esquema A (der.). Asteriscos: osteoblastos activos; OC: osteocitos en lagunas. 40x. HE. A. Modificada a partir de imagen en URL: t.ly/Lykb, Licencia CC-BY-SA-3.0. B. Archivo de la Cátedra de Histología y Embriología, FCV-UNLP.

El **tejido óseo compacto** está compuesto por unidades estructurales denominadas **osteonas** o sistemas de Havers (**Fig. 7 y 10A-B-D-F**). La osteona es una estructura cilíndrica que consiste en **laminillas concéntricas** dispuestas de manera similar a los anillos de crecimiento de un árbol, alrededor de un conducto central, el **conducto de Havers**. Este conducto contiene vasos sanguíneos, nervios y tejido conectivo y, como todas las cavidades del tejido óseo compacto, está revestido por endostio. Hacia el conducto de Havers llega el sistema de canalículos que contienen las prolongaciones de los osteocitos; existe continuidad entre la luz del conducto de Havers y el sistema canalicular y, por lo tanto, un intercambio de sustancias entre los osteocitos y los vasos sanguíneos (**Fig. 10C**). Los **conductos de Volkmann o conductos perforantes** son túneles por los que transcurren vasos sanguíneos y nervios que provienen del periostio y endostio. Su recorrido alcanza los conductos de Havers y los conecta entre sí (**Fig. 10A-B-E**).

Entre las osteonas se encuentran laminillas de disposición irregular, son las **laminillas intersticiales**, restos de antiguas osteonas que han sido remodeladas. Además, se encuentran laminillas que se disponen rodeando al resto del tejido óseo tanto externa como internamente, estas son las **laminillas circunferenciales** (**Fig. 10A-D**).

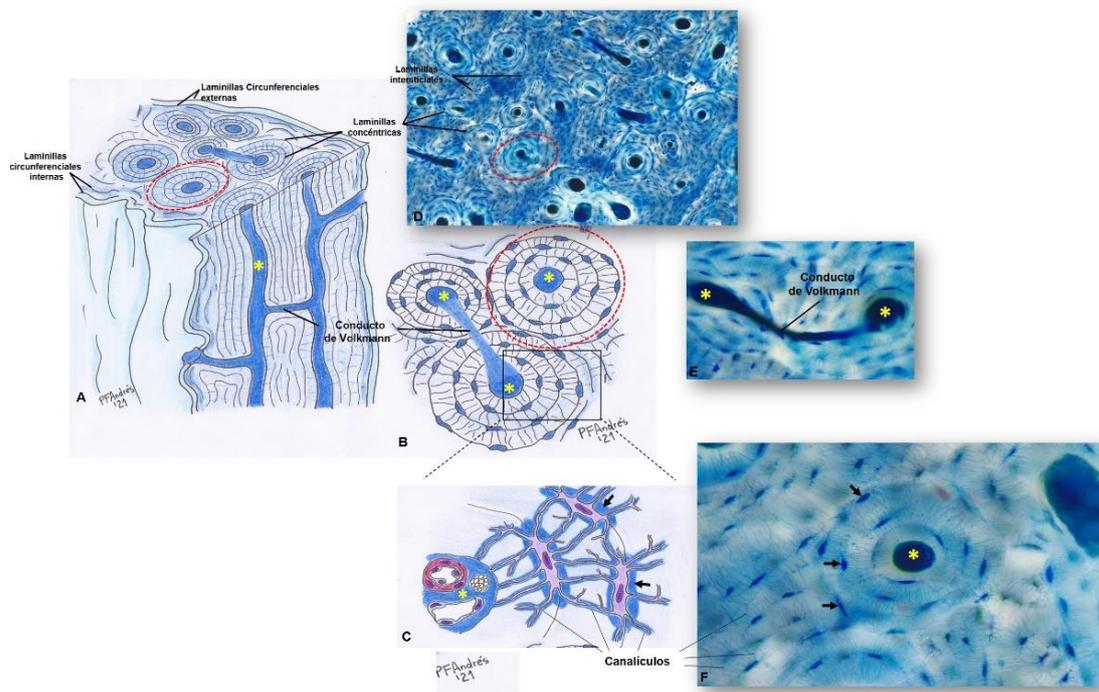


Figura 10. A-C: esquema del tejido óseo compacto. A. Osteonas en diáfisis de hueso largo. B-F. Osteonas con círculos rojos, esquema de corte transversal. Flechas negras: lagunas; asteriscos: conducto de Havers. C. Sector de una osteona. D-F. Microfotografías de tejido óseo compacto, técnica de pulido (D: 10X, E y F: 40X). Azul de anilina. A-C: Autor: Méd. Vet. Pedro Fernando Andrés Laube. D-F: Archivo de la Cátedra de Histología y Embriología, FCV-UNLP.

En el **tejido óseo esponjoso** la matriz mineralizada, dispuesta en laminillas, se distribuye formando trabéculas que se unen entre sí generando un aspecto irregular con forma de red (**Fig. 7B, 9B y 11**). Las trabéculas están rodeadas por endostio y entre ellas se encuentran espacios interconectados ocupados por la médula ósea. Esta variedad de tejido óseo carece de conductos de Havers y de Volkmann; por lo tanto, las trabéculas no poseen vasos sanguíneos en su interior.

La nutrición de los osteocitos en este caso se produce por la difusión de las sustancias desde la superficie del endostio o periostio y a través de los canalículos comunicantes.

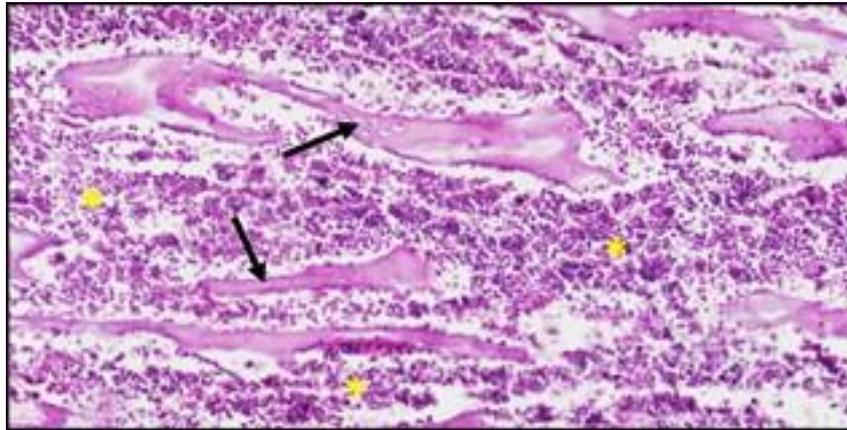


Figura 11. Microfotografía. Tejido óseo esponjoso, diáfisis, hueso largo. Flechas: osteocitos en trabéculas. Asteriscos: médula ósea. 4X. HE. Archivo de la Cátedra de Histología y Embriología, FCV-UNLP.

Desarrollo del tejido óseo (osteogénesis, osificación)

El tejido óseo se desarrolla siempre por sustitución de otro tejido conectivo preexistente. Existen dos formas de osificación u osteogénesis: **a)** la osificación endomembranosa en la que la formación del tejido óseo tiene lugar directamente en el mesénquima y **b)** la osificación endocondral que ocurre a partir de un molde cartilaginoso. Independientemente de cuál sea el mecanismo, el tejido óseo formado es idéntico y puede ser esponjoso o compacto.

Osteogénesis (osificación) endomembranosa

Los huesos del cráneo, entre otros, se desarrollan mediante este tipo de osificación. En las regiones en que ocurre este proceso las células mesenquimáticas se agrupan y se diferencian primero hacia células osteoprogenitoras, que expresan un factor de transcripción típico de este linaje celular (CBFA1), y finalmente a osteoblastos (**Fig. 12A**). Los osteoblastos comienzan a sintetizar la matriz ósea que, en etapas tempranas del desarrollo, se dispone formando espículas óseas delgadas de forma y tamaños diversos. Estas espículas se anastomosan entre sí para formar las típicas trabéculas más gruesas, los osteoblastos se encuentran en la superficie de las trabéculas y cuando quedan atrapados en la matriz ósea se diferencian a osteocitos (**Fig. 12B**).

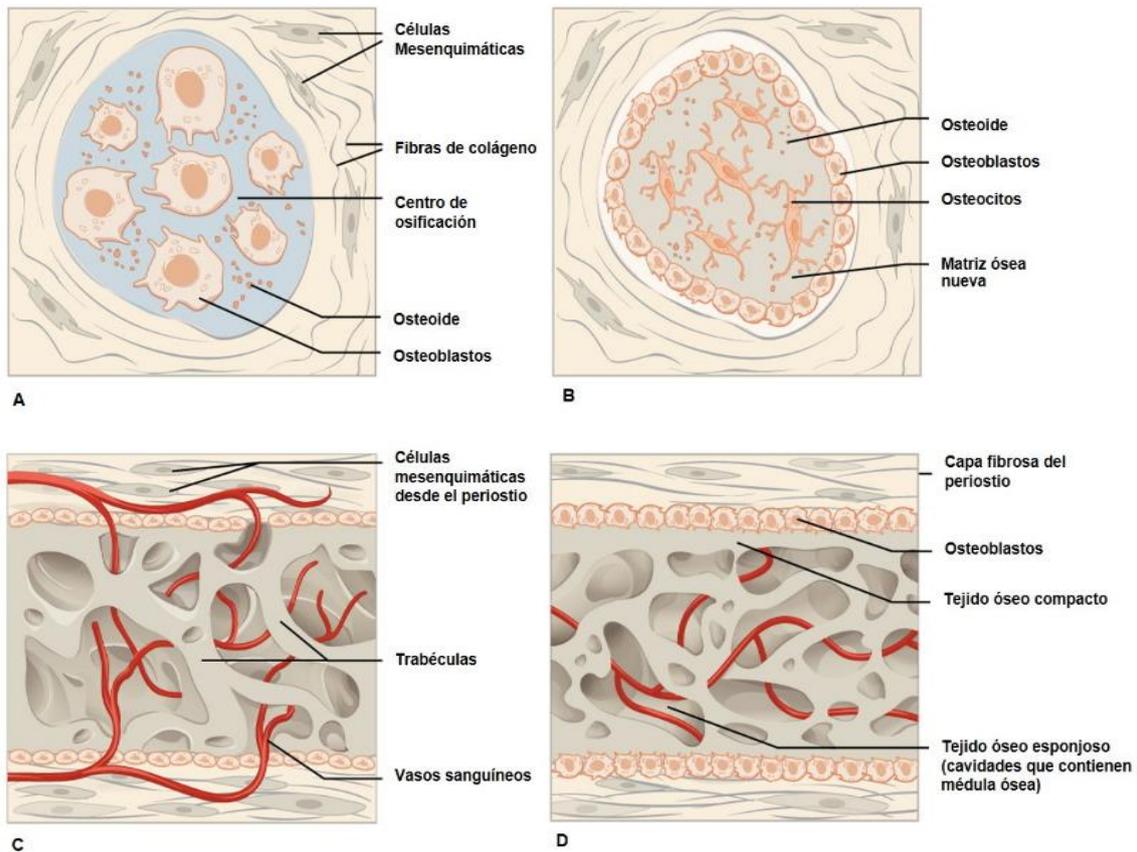


Figura 12. Esquema. Osificación endomembranosa. (A) agrupamiento de células mesenquimáticas y formación del centro de osificación; (B) osteoblastos se diferencian en osteocitos; (C) vasos sanguíneos, formación de trabéculas y se forma el periostio; (D) crecimiento del tejido óseo y espacios medulares. Biga, L (ver ref.).

Las células osteoprogenitoras mantienen su cantidad mediante mitosis continuas y así proveen una fuente constante de osteoblastos que sintetizan matriz ósea. Entre las trabéculas se encuentran abundantes espacios medulares, de diversos tamaños e intercomunicados, que contienen a la médula ósea (**Fig. 12C-D**).

Osteogénesis (osificación) endocondral

Los huesos de la columna vertebral, la pelvis y las extremidades se forman inicialmente a partir de un “molde” de tejido cartilaginoso hialino, que es sustituido progresivamente por tejido óseo en un proceso conocido como **osificación endocondral**.

Inicialmente se forma un molde de tejido cartilaginoso hialino que aumenta sus dimensiones en largo y ancho mediante crecimiento intersticial y aposicional, respectivamente. Este molde presenta la forma del hueso definitivo. Las células mesenquimáticas que rodean al molde cartilaginoso forman el pericondrio que promueve el crecimiento en ancho del molde. Los condrocitos presentes en la zona media del molde aumentan de tamaño y se hipertrofian. La matriz que los rodea comienza a calcificarse e impide la difusión de los nutrientes provocando su muerte. A la vez, en esta zona formada por una red irregular de espículas de tejido cartilaginoso calcificado y pequeñas cavidades, se va organizando la cavidad medular primitiva.

Hacia la mitad de la longitud del molde cartilaginoso, el pericondrio se transforma en periostio y las células de su capa interna pasan a ser osteoprogenitoras y comienzan a diferenciarse hacia osteoblastos, de esta manera, ese sector pasa a llamarse **collar perióstico** (Fig. 13). Sin embargo, las células de la capa osteógena conservan la capacidad para diferenciarse a células condroprogenitoras y formar tejido cartilaginoso incluso en la vida adulta, como se manifiesta durante la reparación de una fractura.

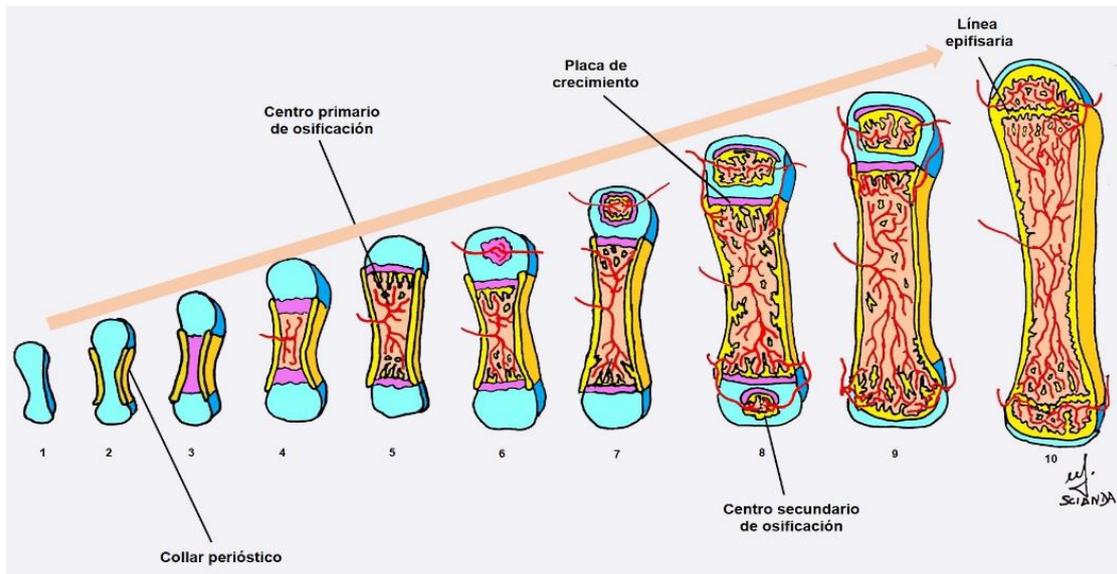


Figura 13. Esquema. 1 a 10: desarrollo embrionario de un hueso largo (longitudinal). 1: formación de molde cartilaginoso; 2: formación del collar perióstico; 3: calcificación de matriz cartilaginosa; 4: penetración de vasos sanguíneos; 5 y 6: centro de osificación primario; 7: centro de osificación secundario en epífisis; 8: placa de crecimiento; 9 y 10: desaparición de las placas de crecimiento proximal y distal. Autor: Mariano Scianda.

Posteriormente, este periostio se expande a toda la superficie ósea. De manera simultánea a estos procesos se produce el desarrollo progresivo del sistema vascular del embrión y los capilares comienzan a invadir el pericondrio que rodea el molde de cartílago. La aparición de capilares en el pericondrio guarda relación con un cambio en la diferenciación de las células condrógenas hacia células osteoprogenitoras que en presencia de vasos sanguíneos comienzan a diferenciarse en osteoblastos. Este cambio se atribuye a la gran modificación del microambiente que representa la mayor llegada de O_2 a partir de los capilares invasores debido a que, a diferencia de lo que ocurre con el tejido cartilaginoso, el tejido óseo requiere de elevadas concentraciones de oxígeno para desarrollarse. Cuando las células osteoprogenitoras junto con los capilares llegan al interior de la sección media del molde cartilaginoso forman un **centro primario de osificación** (Fig. 13).

El proceso de osteogénesis se inicia en este sitio; los osteoblastos comienzan a depositar matriz osteoide sobre los restos de matriz cartilaginosa calcificada, luego esa matriz se mineraliza. Los osteoclastos, formados a partir de progenitores que han llegado por los capilares, degradan la matriz cartilaginosa calcificada.

Posteriormente, durante el período perinatal, en las epífisis proximal y distal se establecen los **centros secundarios de osificación** que dan origen al tejido óseo esponjoso característico de las epífisis. La expansión posterior del centro de osificación secundario origina que todo el tejido cartilaginoso epifisario sea sustituido por tejido óseo.

En el centro primario el proceso de reemplazo de tejido cartilaginoso por óseo se extiende hacia ambas epífisis hasta sustituir la mayor parte del molde cartilaginoso. El tejido cartilaginoso que permanece del molde original queda limitado al cartílago articular en los extremos del hueso y a una placa transversal, llamada **placa o disco de crecimiento**, que se ubica entre la epífisis osificada y la metáfisis y es la región en la que ocurre el reemplazo de tejido cartilaginoso por tejido óseo (metaplasia mesenquimática).

Existen distintas zonas bien definidas en la **placa de crecimiento**. Desde la más alejada a la más cercana a la diáfisis, las zonas son: zona de cartílago de reserva, zona de proliferación, zona de hipertrofia, zona de calcificación del cartílago y zona de resorción y osificación (**Fig. 14**).

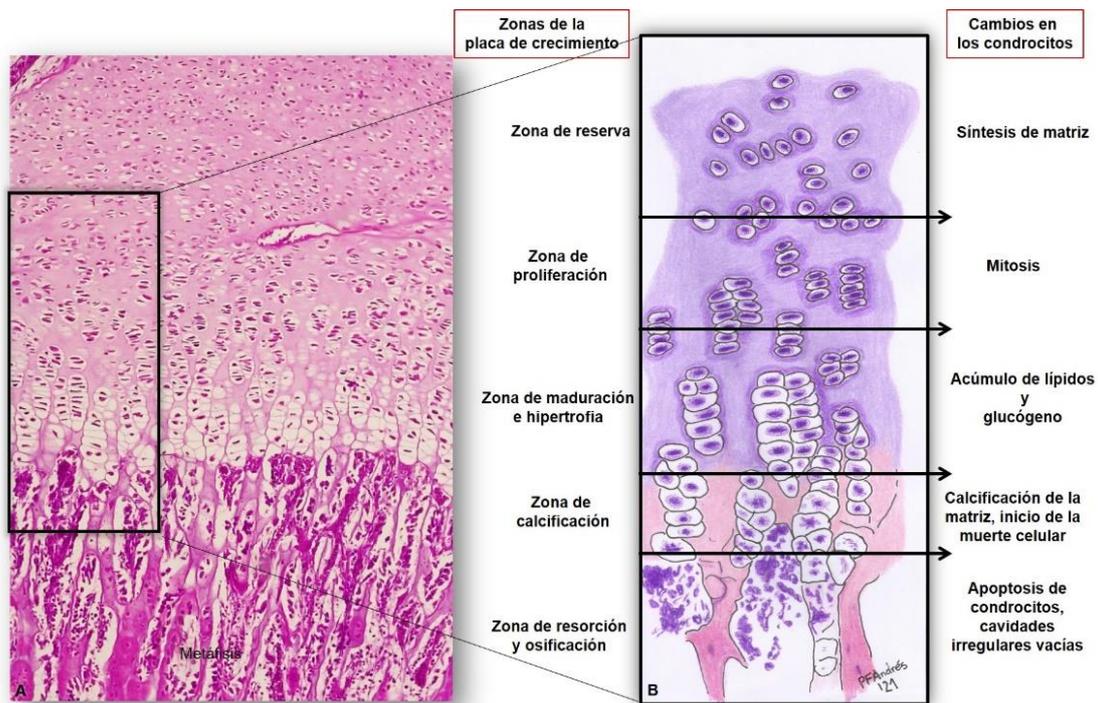


Figura 14. A: microfotografía y B: esquema. Placa de crecimiento: zonas y cambios en los condrocitos. A. Archivo de la Cátedra de Histología y Embriología, FCV-UNLP. B. Autor: Méd.Vet. Pedro Fernando Andrés Laube.

En la **zona de reserva**, los condrocitos se encuentran en reposo, no hay actividad proliferativa y tampoco síntesis de MEC. La **zona de proliferación**, que continúa a la zona de reserva, se caracteriza por una gran actividad mitótica de los condrocitos, estos proliferan y, guiados por la disposición del colágeno en esta zona (paralela al eje longitudinal del hueso), se disponen en hileras (grupos isogénicos axiales) similares a pilas de monedas. Además, estas células son más grandes que los condrocitos de la zona de reserva porque están activos y sintetizan diferentes proteínas de la matriz cartilaginosa entre las que se incluyen colágeno, principalmente los de tipo II y XI. La siguiente zona es la **zona de hipertrofia**, en la que los condrocitos acumulan glucógeno y su tamaño aumenta (condrocitos hipertróficos), se ensanchan sus lagunas a expensas de la reducción de la matriz cartilaginosa interpuesta. En la **zona de calcificación de cartílago**, la matriz cartilaginosa que persiste se calcifica. Esto impide la nutrición por difusión, los condrocitos mueren por apoptosis y se generan

cavidades irregulares por confluencia de las lagunas desprovistas de condrocitos. Luego el cartílago calcificado sirve como un almacén inicial sobre el que se deposita tejido óseo. La **zona de resorción y osificación** es la más cercana a la metafisis, en ella abundan condrocitos apoptóticos. Los espacios que quedan vacíos, producto de la muerte celular, son invadidos, desde la metafisis, por pequeños vasos sanguíneos y células osteoprogenitoras, que se encuentran inmersas en el tejido conectivo que acompaña a los vasos (**Fig. 14**). Las células osteoprogenitoras se diferencian a osteoblastos, se ubican sobre las espículas irregulares de matriz cartilaginosa calcificada y depositan una fina capa de matriz osteoide que se mineraliza rápidamente. A medida que se generan trabéculas óseas en la zona de calcificación (trabéculas metafisarias), estas van siendo remodeladas por los osteoclastos para formar la cavidad medular.

El crecimiento en longitud de los huesos, que continúa en la vida posnatal hasta después de la pubertad, es atribuible a la proliferación de los condrocitos de la placa de crecimiento y la sustitución por tejido óseo. Finalizada la etapa de crecimiento del animal, la proliferación de los condrocitos decrece y finalmente se interrumpe. De este modo las trabéculas óseas de la diáfisis se hacen continuas con el tejido óseo esponjoso de las epífisis y se produce la eliminación de la placa de crecimiento, proceso conocido como cierre epifisario; sin embargo, el disco perdura como un vestigio, la **línea epifisaria**, compuesta por tejido óseo (**Fig. 13**). En ese momento, se produce la detención del crecimiento longitudinal de los huesos. Por otra parte, el crecimiento en ancho de la diáfisis de un hueso ocurre mediante el mecanismo de aposición, a partir de la capa osteógena del periostio. El proceso de osteogénesis está regulado por distintas sustancias, una de las más importantes es el factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (IGF1, por su sigla en inglés). Este factor de crecimiento se forma en el hígado estimulado por la hormona de crecimiento hipofisaria. Cuando el IGF1 llega a los huesos en formación estimula la proliferación de las células del disco de crecimiento. La alteración de la vía de hormona de crecimiento e IGF1 genera enanismo o gigantismo.

Mecanismo de mineralización

La calcificación se produce en sitios de la MEC que contienen las proteínas que fijan el Ca^{2+} y generan una concentración elevada de este ion. La osteocalcina y otras sialoproteínas fijan el Ca^{2+} extracelular y su alta concentración induce a los osteoblastos a secretar fosfatasa alcalina (FA), que aumenta la concentración local de iones fosfato. Este proceso, a su vez, eleva aún más la concentración de Ca^{2+} en el sitio donde se iniciará la calcificación. En esta etapa y con concentraciones elevadas de Ca^{2+} y fosfato, los osteoblastos liberan por gemación vesículas matriciales hacia la matriz ósea. Las vesículas matriciales son pequeñas estructuras rodeadas por membrana que acumulan Ca^{2+} y escinden iones fosfato de otras moléculas de la matriz. A partir de la FA y pirofosfatasa, producen la cristalización del fosfato cálcico en forma de hidroxiapatita. Los cristales de hidroxiapatita precipitados se van uniendo con los vecinos y crecen con rapidez, de esta manera una onda de mineralización recorre el osteoide. El depósito mineral se produce tanto entre las fibras colágenas de la matriz como sobre ellas.

Remodelación ósea

Los huesos en crecimiento conservan su forma más allá de los cambios que en ellos ocurran. Esto es consecuencia de la remodelación de la superficie del tejido óseo, un proceso que implica la resorción por parte de los osteoclastos y, la secreción que realizan los osteoblastos de una cantidad equivalente de tejido óseo nuevo. En la remodelación del tejido óseo los osteoclastos se encuentran bajo la influencia de estímulos paracrinos y endocrinos (la calcitonina actúa directamente sobre estas células y la paratohormona lo hace de manera indirecta mediante su acción en los osteoblastos).

La remodelación comienza en las primeras etapas de la vida posnatal y continúa durante toda la vida. Es un proceso en el que la actividad de los osteoblastos y los osteoclastos está acoplada, de modo tal que trabajan en conjunto como una unidad. La estructura interna del tejido óseo adulto se altera continuamente y puede adaptarse a los cambios que se le imponen, cambios de peso, las alteraciones posturales o las microfracturas del hueso que involucran a las osteonas individuales.

Este proceso se conoce como remodelación interna y lo realiza la unidad de remodelación ósea cuyos dos elementos son el cono de corte (cavidad de resorción) y el cono de cierre (formación laminar). En las regiones en las que se remodela el tejido óseo compacto, los osteoclastos son reclutados y resorben el tejido, formando túneles en forma de cono, conocidos como “conos de corte” (Fig. 15). La actividad osteoclástica continua aumenta el diámetro y la longitud de estos conos de corte. Después que estos túneles alcanzan su tamaño máximo, son invadidos por vasos sanguíneos y células osteoprogenitoras. En este punto, la resorción ósea cesa, y los osteoblastos depositan laminillas concéntricas alrededor de los vasos sanguíneos, formando nuevas osteonas (cono de cierre). Este proceso es un sistema acoplado de activación, resorción y formación. Las laminillas intersticiales que se observan en el hueso adulto son restos de osteonas remodeladas.

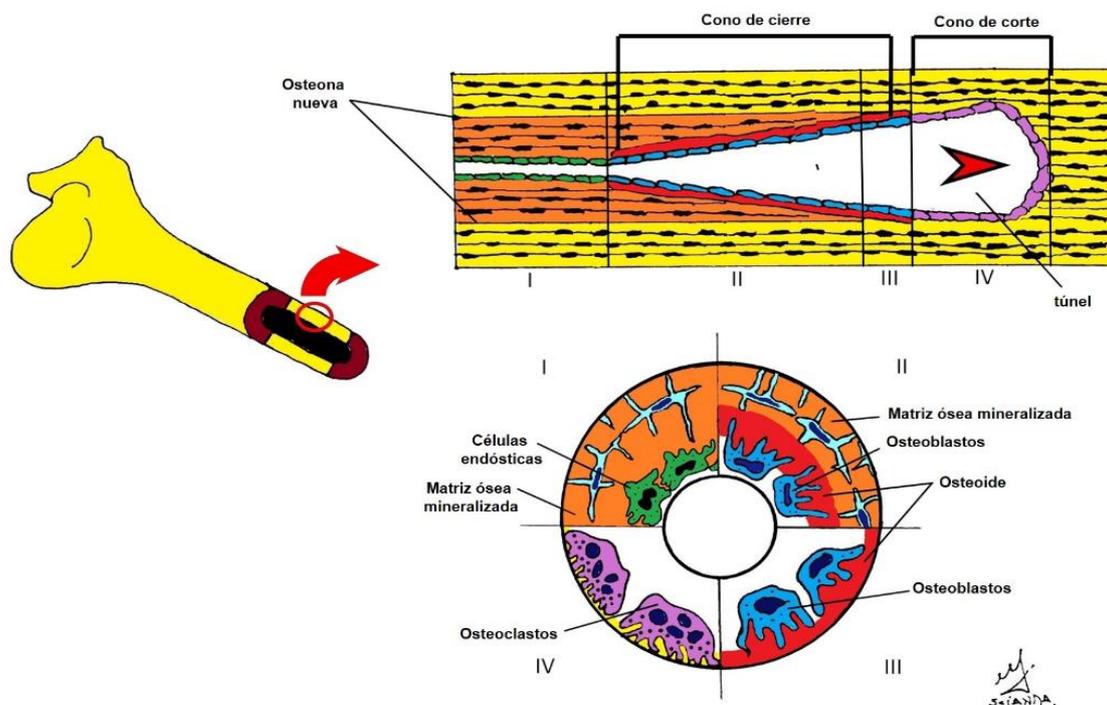


Figura 15. Esquema. Unidad de remodelado óseo: cono de corte y cono de cierre. Autor: Mariano Scianda.

Reparación del tejido óseo

Una fractura es la pérdida de la continuidad o integridad estructural de los huesos; en su reparación están involucrados los mismos mecanismos que ocurren durante la osificación. En la fractura se produce daño y destrucción de la matriz ósea, muerte de las células, desgarro en el periostio y el endostio, y posible desplazamiento de los extremos del hueso roto (fragmentos). Se produce una discontinuidad de los vasos sanguíneos y la hemorragia localizada rellena la zona de la fractura, lo que da lugar a la formación de coágulos de sangre en el lugar de la lesión. Durante un período de semanas, el tejido óseo muerto es degradado por los osteoclastos. Se forma inicialmente tejido cartilaginoso hialino que, junto con el tejido conectivo denso, prolifera, cubre al hueso en el sitio de la fractura y forma un callo fibrocartilaginoso. En esta etapa a partir del tejido cartilaginoso se produce osificación endocondral y se forma tejido óseo (callo óseo) que inicialmente es inmaduro y luego maduro. En un período de meses, los osteoclastos eliminan el callo óseo y el remodelado gradual restaura la forma original del hueso y las características del tejido óseo.

Funciones y metabolismo óseo

El tejido óseo ejerce diferentes funciones dentro del organismo. Conformar la parte estructural de los huesos, de modo que posibilita la estación, los movimientos corporales y la protección de órganos vitales como los pulmones, el corazón y los órganos del sistema nervioso central. Además, forma un almacén estructural que aloja a la médula ósea, órgano donde se originan las células sanguíneas. En virtud de su contenido mineral, como el fosfato de Ca^{2+} en forma de cristales de hidroxapatita, el tejido óseo constituye un reservorio de Ca^{2+} y fósforo, por consiguiente, interviene en la regulación homeostática de la calcemia (concentración de Ca^{2+} en la sangre) y fosfatemia (concentración de fosfato en la sangre). Estos procesos están regulados por la PTH, secretada por la glándula paratiroides, y la calcitonina, secretada por las células parafoliculares de la glándula tiroidea. La PTH actúa sobre el tejido óseo, estimula los osteocitos y los osteoclastos que resorben tejido óseo, e induce la liberación de Ca^{2+} hacia la sangre. Como consecuencia de esa actividad se eleva la calcemia hasta alcanzar valores normales. Por otra parte, la acción de la calcitonina baja la calcemia hasta llegar a la normalidad, estimulando el depósito de Ca^{2+} en la matriz ósea. Una deficiencia de calcio o fósforo lleva a la fragilidad del hueso y susceptibilidad a fracturas. El tejido óseo es un tejido altamente dinámico que puede responder a una serie de estímulos metabólicos, físicos y endocrinos.

Referencias

Arbolea, L., Castañeda, S. (2014) Osteoclastos: mucho más que células remodeladoras del hueso, *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 6(4), pp. 109-121.

DOI: 10.4321/S1889-836X2014000400007.

- Craig, L.E., Dittmer, K.E., Thompson, K.G. Bones and Joints. En: Grant Maxie, M. (2016). *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of domestic animals*. 6^{ta} ed. St. Louis: Elsevier.
- Czerniak, B., Dorfman, H. (2016). *Dorfman and Czerniak's bone tumours*. 2^{da} ed. Filadelfia: Elsevier.
- Eurell, J.A., Frappier, B.L. (2006). *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology*. 6^{ta} ed. Iowa: Blackwell Publishing.
- Fawcett, D.W. (1995). *Bloom-Fawcett. Tratado de Histología*. 12^{ma} ed. Madrid: Interamericana McGraw-Hill.
- Gartner, L.P. (2017). *Textbook of Histology*. 4^{ta} ed. Filadelfia: Elsevier.
- Gasser, J.A., Kneissel, M. Bone Physiology and Biology. En: Smith, S.Y., Varela, A., Samadfam, R. (2017). *Bone Toxicology*. Cham: Springer.
- Grgurevic, L., Pecina, M., Vukicevic, S. (2017) Marshall R. Urist and the discovery of bone morphogenetic proteins, *International Orthopaedics*, 41(5), pp. 1065-1069.
DOI: 10.1007/s00264-017-3402-9.
- Grigoriou, E., Trocle, A., Dormans, J.P. The Growth Plate: Embryologic Origin, Structure, and Function. En: Polin, R., Abman, S., Rowitch, D., Benitz, W. (2017). *Fetal and Neonatal Physiology*. 5^{ta} ed. Filadelfia: Elsevier.
- Junqueira, L.C., Carneiro J. (2015). *Histología Básica. Texto y atlas*. 12^{ma} ed. México D.F.: Editorial Médica Panamericana.
- Miyazono, K., Kamiya, Y., Morikawa, M. (2010) Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction, *Journal of Biochemistry*, 147(1), pp. 35-51. DOI: 10.1093/jb/mvp148.
- Paulina, W. (2015). *Ross-Histología. Texto y atlas. Correlación con biología celular y molecular*. 7^{ma} ed. Barcelona: Wolters Kluwer.
- Peinado Cortés, L.M., Garzón Alvarado, D.A., Cárdenas Sandoval, R.P. (2009) Proceso biológico del desarrollo epifisario: aparición y formación del centro secundario de osificación, *Revista cubana de ortopedia y traumatología*, 23(2), pp. 1-25.

Referencias de figuras

- Figuras 1-4, 11 y microfotografías en figuras 9, 10 y 14: Archivo de la Cátedra de Histología y Embriología, FCV-UNLP.
- Figuras 5-8 y dibujos en figuras 10 y 14. Autor: Méd. Vet. Pedro Fernando Andrés Laube.
- Figura 9. Esquema. Tomada y modificada a partir de imagen en URL: t.ly/Lykb. Licencia CC-BY-SA-3.0.
- Figura 12. Tomada y modificada de URL: t.ly/VpoK. Licencia CC-BY-SA-4.0. Oregon State University. Anatomy & Physiology. Autores: Biga L., Sierra Dawson, Harwell A., Robin Hopkins R., Kaufmann J., LeMaster M., Matern P., Morrison-Graham K., Quick D. y Runyeon J.
- Figuras 13 y 15. Autor: Mariano Scianda.