

El rol de Indian Hedgehog en el sistema osteoarticular

Audisio, S.A.¹; Vaquero, P.G.¹, Cristofolini, A.L.² y Merkis, C.I.²

¹Docente Cátedra Técnica y Patología Quirúrgica. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa. Calle 5 y 116, General Pico, La Pampa, Argentina. saudisio@vet.unlpam.edu.ar

²Laboratorio de Microscopía, Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

RESUMEN

El presente artículo hace revisión de las vías íntimas del accionar y regulación de la proteína Indian Hedgehog (Ihh) en la esqueletogénesis embrionaria y en el desarrollo del esqueleto en la vida post-natal. Ihh también se expresa en la reparación de fracturas y en procesos patológicos del sistema osteoarticular tales como osteocondritis, osteoartritis, enfermedad del disco intervertebral y oncología ósea. Las revisiones demuestran que las vías de señalización y expresión de Ihh que se producen en condiciones embriológicas y desarrollo del hueso en condiciones normales, intervienen también en la patogenia molecular de las afecciones mencionadas, pudiendo éstas constituir motivos de futuras investigaciones con fines terapéuticos.

Palabras clave: Indian Hedgehog, hueso, cartílago, osificación endocondral.

The role of Indian Hedgehog in the osteoarticular system

ABSTRACT

This article reviews the pathways by which the Indian Hedgehog protein (Ihh) acts and regulates embryonic skeletogenesis and in the development of the skeleton during post-birth life. Ihh is also expressed in the repair of fractures and pathological processes of the osteoarticular system, such as osteochondritis, osteoarthritis, intervertebral disk disease and bone oncology. The reviews show that the signaling and expression pathways of Ihh which are produced in embryological conditions and in the development of bones in normal conditions, also take part in the molecular pathogeny of the aforementioned conditions, thus justifying research with therapeutic purposes.

Keywords: Indian Hedgehog, bone, cartilage, endochondral ossification

INTRODUCCIÓN

La familia de proteínas Hedgehog (HH), es una familia de glicoproteínas secretoras que desempeñan funciones clave en la regulación del desarrollo embrionario, la diferenciación y proliferación celular y la homeostasis tisular en los vertebrados (Petrova y Joyner, 2014; Gradilla *et al.*, 2018). Esta familia está conformada por las proteínas Desert Hedgehog (Dhh), Sonic Hedgehog (Shh) e Indian Hedgehog (Ihh).



Dhh es esencial para el desarrollo de nervios periféricos e interviene en la espermatogénesis; Shh interviene en establecer la asimetría lateral, el eje antero-posterior de las extremidades y el desarrollo del sistema nervioso central; mientras que Ihh es un regulador maestro del desarrollo óseo endocondral (McMahon, 2003).

En los vertebrados las proteínas HH traducen sus señales a través de una misma vía en la que intervienen las proteínas de transmembrana de Patched 1 (Ptch1) y Smoothened (Smo)(Logan y Nusse, 2004; Lum, 2004; Huangfu, 2006; Tiet *et al.*, 2006). Cuando Ihh no está presente, Ptch1 inhibe a Smo y reprime la expresión génica suprimiendo los factores de transcripción de Gli (Gli 1, 2 y 3)(Tiet *et al.*, 2006, Wuelling y Vortkamp, 2009; Mackie *et al.*, 2011). Las isomorfias de Gli contienen dominios activadores y represores, y la escisión y eliminación del dominio de activación da como resultado la represión transcripcional. La activación transcripcional mediada por Gli genera la regulación positiva de los genes diana, incluida la proteína transmembrana Ptch1 y el factor Gli1. Cuando Ihh está presente, se une a Ptch1 y libera a Smo, activando la vía de señalización, permitiendo que los factores de transcripción Gli activos ingresen al núcleo celular y mejoren el nivel de transcripción de los objetivos posteriores(Long *et al.*, 2001)(Figura N°1). La expresión de Ptch1 y Gli actuarán sobre los condrocitos posibilitando su diferenciación celular (Tiet *et al.*, 2006).

En el presente artículo se hace revisión bibliográfica del rol de Ihh en la esquetogénesis y cartilago de crecimiento, la osteocondrosis, en la reparación de fracturas, la participación en neoplasias óseas y afecciones del sistema osteoarticular.

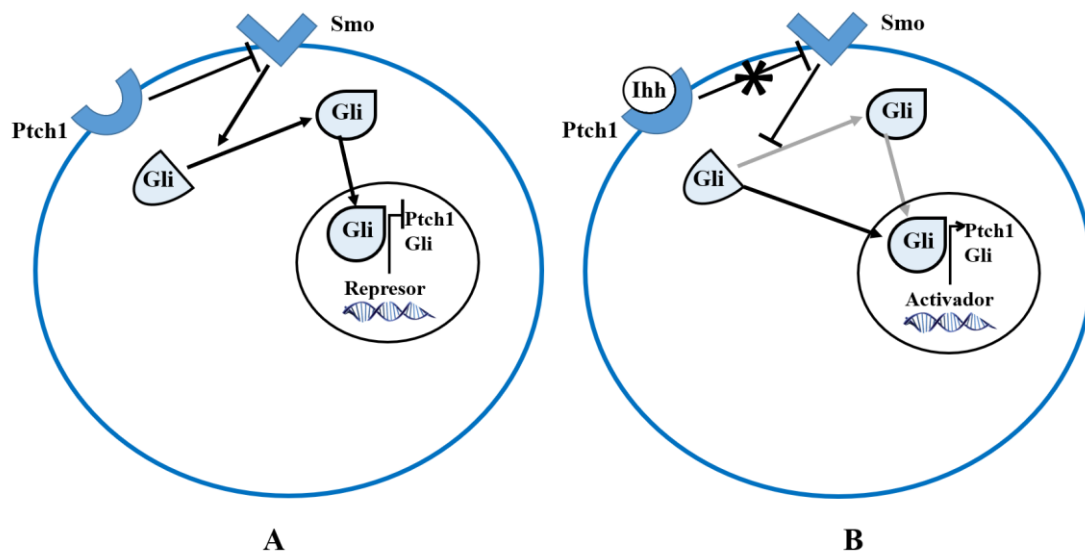


Figura N°1. Vía de señalización de Ihh. **A)** En ausencia de Ihh, el receptor Ptch1 inhibe la proteína de transmembrana Smo. La inhibición mantiene los factores de transcripción Gli mediados por Hedgehog (Gli1, Gli2 y Gli3). La inhibición de Smo está asociada con formas represivas de los factores de transcripción Gli que ingresan al núcleo e inhiben la expresión de los genes diana de Hedgehog, como Ptch1 y Gli. **B)** En presencia de Ihh Ptch1 ya no inhibe a Smo y los factores de transcripción Gli ingresan al núcleo activando la transcripción. Esto da como resultado la expresión de los genes diana Ptch1y Gli que regula Ihh como componentes de su propia cascada de señalización, actuando como un circuito de retroalimentación para regular el nivel de activación. Modificado de Tiet *et al.*, 2006.

El rol de Indian Hedgehog en la esquelotogénesis y cartilago de crecimiento

La función de Shh e Ihh en la esquelotogénesis fue estudiada en ratones transgénicos incapaces de expresar estas proteínas. En esos animales se registraron anomalías del desarrollo temprano del esqueleto, retraso severo del crecimiento de los huesos, ausencia de vértebras y de estructuras distales de los miembros (Chiang *et al.*, 1996). Ihh coordina los eventos celulares durante el desarrollo del hueso endocondral, incluida la proliferación y diferenciación de condrocitos (condrocitos redondos → planos → prehipertróficos → hipertróficos) en osteoblastos (St-Jacques *et al.*, 1999).

En los huesos planos, estudios realizados en huesos parietales de ratones que no expresaban a Ihh, la osificación intramembranosa se llevó a cabo, aunque resultó en huesos de tamaño reducido. La osificación en esos animales presumiblemente se realizó por una vía independiente a Ihh mediante otra molécula Hh (Shh o Dhh) o bien los osteoblastos en estos huesos no requieren señalización Hh (Chung *et al.*, 2001). Los estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que la pérdida de Ihh reduce la expresión de BMP (*bone morphogenetic protein*, por su sigla en inglés) en los huesos del cráneo (Lenton *et al.*, 2011).

Durante la esquelotogénesis del esqueleto axial en embriones de ratones, se constató que Ihh se expresa en condensaciones de condrocitos de los cuerpos vertebrales a partir del día 14 post-concepción y más tarde en sus placas terminales (Dipaola *et al.*, 2005).

En el cartilago de crecimiento la actividad celular se halla regulada por las vías de señalización de Ihh y de la proteína con homología a la hormona paratiroides (PTHrP). Ambas regulan el crecimiento longitudinal de la placa de crecimiento controlando el desarrollo y el crecimiento endocondral al conformar un circuito de retroalimentación negativo (Karp *et al.*, 2000; Minina *et al.*, 2001; Vortkamp, 2001; Kobayashi *et al.*, 2002; Tiet *et al.*, 2006). En los vertebrados, HH traduce sus señales a través de una misma vía, en la que intervienen las proteínas de transmembrana de Patched1 (Ptch1) y Smoothened (Smo) (Logan y Nusse, 2004; Lum, 2004; Huangfu, 2006; Tiet *et al.*, 2006). En el caso de Ihh, cuando ésta no se halla presente, Ptch1 inhibe a Smo y reprime la expresión génica aguas abajo al suprimir los factores de transcripción de Gli (Gli1, 2 y 3) (Tiet *et al.*, 2006, Wuelling y Vortkamp, 2009; Mackie *et al.*, 2011). Cuando Ihh está presente, se une a Ptch1 y libera a Smo, activando la vía de señalización permitiendo que los factores de transcripción Gli activos ingresen al núcleo celular y mejoren el nivel de transcripción de los objetivos posteriores (Long *et al.*, 2001) (Figura N°1). La expresión de Ptch1 y Gli obrarán sobre los condrocitos posibilitando su diferenciación celular (Tiet *et al.*, 2006).

Ihh es secretada por los condrocitos prehipertróficos y es regulador positivo aguas arriba para PTHrP. PTHrP es secretada por los condrocitos en reposo y actúa inhibiendo a Ihh (St-Jacques *et al.*, 1999). Cuando se inhibe la expresión de Ihh, también se evita que los condrocitos se hipertrofien (Juppner, 2000; Goldring *et al.*, 2006). De esta forma se promueve la tasa de proliferación y diferenciación de condrocitos y la subsecuente formación de condrocitos columnares (Kobayashi *et al.*, 2002; Kronenberg, 2003; Mak *et al.*, 2008).

Cuando aumenta Ihh, se incrementa PTHrP a través de la señalización molecular de Ptch1, Gli y Smo, lo que inhibe la diferenciación de condrocitos (Semevolos *et al.*, 2005). En este proceso de regulación intervienen la familia de las proteínas *transforming growth factors-β* (TGF-β), las proteínas morfogénicas del hueso (BMP) (Chung *et al.* 2001) y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) (Alvarez *et al.* 2001, 2002) que se encuentran en

el pericondrio. Promueven la expresión de estas proteínas (Grimsrud *et al.*, 2001; Shum *et al.* 2003) que simultáneamente estimulan a las células pericondriales y yuxtaarticulares para aumentar la síntesis de PTHrP que ralentiza la progresión de las células en proliferación para avanzar hacia la fase hipertrófica (Vortkamp *et al.*, 1996; Kronenberg *et al.*, 1997; St-Jacques *et al.*, 1999)(Figura N°2).

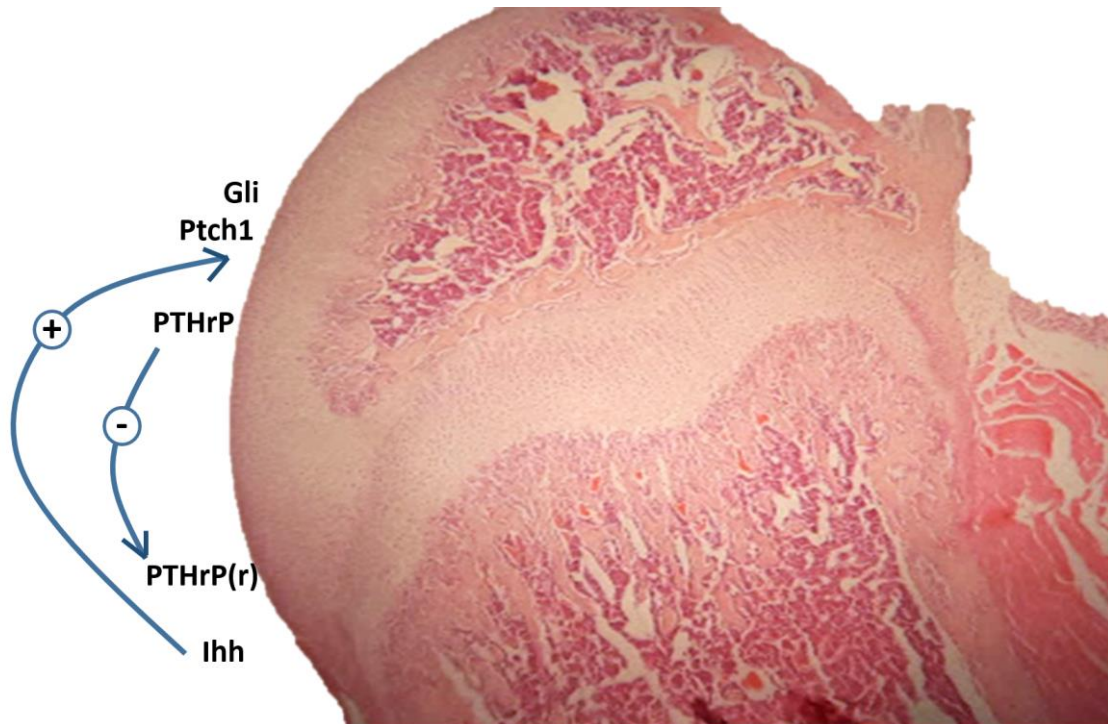


Figura N°2. Representación esquemática de la diferenciación de los condrocitos por acción del Ihh/PTHrP. Los condrocitos en proliferación comienzan a diferenciarse en condrocitos hipertróficos, pasando por la etapa intermedia de condrocitos prehipertróficos. Algunos de ellos, secretan Ihh, mientras que otros, en una etapa más temprana, sólo expresan el receptor PTHrR(r) para PTHrP. En el pericondrio Ihh activa sus genes diana Pctch y Gli y, directa o indirectamente, la secreción de PTHrP. PTHrP reconoce su receptor en los condrocitos prehipertróficos tempranos, lo que bloquea su posterior diferenciación en células sintetizadoras de Ihh y en condrocitos hiperplásicos. Cuando los condrocitos pre-hiperplásicos tardíos, que sintetizan Ihh, se han transformado en condrocitos hiperplásicos, la producción de Ihh cesa y también cesa el bucle de retroalimentación negativa de la diferenciación cartilaginosa, lo que resulta en la transformación de condrocitos proliferativos en células positivas para PTHrP(r), luego Ihh se incrementa y el ciclo se inicia nuevamente. Modificado de Kahn, 1996. Microfotografía: Prof. MV Daniel Lacolla, FCV-UNLPam.

Sin la expresión concurrente de PTHrP, Ihh también puede promover a los condrocitos ya predeterminados para que se diferencien en células de linaje osteoblástico (Chung *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2002). Junto con BMP-7 y bajo la influencia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), proporcionado por la médula ósea de la metáfisis, regula la formación de hueso en la placa de crecimiento (Vortkamp, 2001). La transección perióstica (TP) en modelos ovinos aumentó la expresión de Ihh, PTHrP, receptores de PTHrR, TGF- β y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) en los condrocitos de la placa de crecimiento y el pericondrio (von Rechenberg *et al.*, 2010). El mismo procedimiento efectuado en el periostio de tibias de ratones esqueléticamente

inmaduros promovió el crecimiento longitudinal del hueso alterando la estructura del cartílago de crecimiento y densidad metafisaria (Kaneko *et al.*, 2020). La remoción del periostio tiene un efecto sobre el circuito de retroalimentación *Ihh*/PTHrP/PTHrR en el crecimiento epifisario. Dado que estos mecanismos son muy similares en la mayoría de las especies, se puede suponer con seguridad que constituye el fundamento de la TP como medida terapéutica indicada en las desviaciones angulares en los potrillos (Smith, 2010).

Osteocondrosis/osteocondritis disecante (OC/OCD)

Diversas/os autoras/es comunicaron que en caballos con lesiones de osteocondrosis/osteocondritis disecante (OC/OCD) constataron alteraciones del eje *Ihh*/PTHrP, lo que sugiere la relación de la afección con lateraciones de expresión del eje (Semevolos *et al.*, 2002, Semevolos *et al.*, 2005; Serteyn *et al.*, 2010; Mendoza *et al.*, 2015). En la OC equina la expresión del *Ihh* se encuentra incrementada en el cartílago lesionado, lo que resulta en la retención del cartílago en el estadio prehipertrófico provocando el retraso de la osificación endocondral. A pesar que *Ihh* se halla incrementada, *Gli1*, el factor de transcripción primaria de *Ihh*, se halla reducido (Vortkamp 2001, Semevolos *et al.*, 2002, Semevolos *et al.*, 2005). La observación sugiere que *Ihh* cumple un rol en el cartílago afectado, aunque los niveles inalterados de *Gli1* indicarían que la proteína no ejerce su efecto por mecanismos paracrinos y autocrinos locales. De hecho, la disparidad entre el aumento de la expresión de *Ihh* y la disminución de la expresión del receptor en el cartílago osteocondrítico sugieren la presencia de un factor de transcripción primario diferente para *Ihh* en estos tejidos, o incrementos de proteínas inhibitoras de Hedgehog (Hh)(Semevolos *et al.*, 2005).

En los estadios tempranos de la OC se encuentran alteradas las vías que involucran la maduración y osificación del cartílago y que podrían estar asociadas con la patogénesis de la enfermedad. Las expresiones de *Ihh*, PTHrP y el factor de agregación plaquetaria A (PDGF-A), tienen el potencial de inhibir la progresión de la vía de diferenciación terminal, particularmente en la capa profunda del cartílago articular cerca de la unión osteocondral. En esta fase de OC los condrocitos que rodean los canales del cartílago registran aumento de la expresión génica de PDGF-A y de metaloproteinasa-13 (MMP-13), lo que estaría indicando una invasión vascular alterada al sitio de la osificación endocondral (Riddick *et al.*, 2012; Duesterdieck-Zellmer *et al.*, 2015).

Actividad de Indian Hedgehog en la reparación de la fractura

Diversos estudios comunican que *Ihh* se expresa durante el proceso de reparación de fracturas y defectos óseos promoviendo la condrogénesis, osteogénesis y angiogénesis (Zou *et al.*, 2014; Baht *et al.*, 2014). Mejora la deposición de osteoide en el callo de fractura donde se expresa en los condrocitos maduros e hipertróficos (Ferguson *et al.*, 1998; Vortkamp *et al.*, 1998), regula el tamaño del callo cartilaginoso, el grado de osificación (Murakami y Noda, 2000) e interviene en la mineralización temprana del callo (Liu *et al.*, 2017). Los mecanismos mecánicos cíclicos que se producen en las reparaciones de las fracturas estimulan la expresión de *Ihh*; una observación que también se reportó durante el crecimiento del hueso (Wu *et al.*, 2001).

La estabilidad de la fractura durante la curación también afecta la expresión de *Ihh*. Estudios realizados en fracturas experimentales en tibia de ratas informaron que *Ihh* se

expresó y persistió en el callo de fractura inestable. Esa observación se relaciona con el volumen de callo cartilaginoso que se produce en fracturas inestables (Le *et al.*, 2001) donde se prolonga el tiempo de curación. En fracturas de las articulaciones cóndilo mandibulares de ratas jóvenes se observó que se incrementó el número de células que expresaban a *Ihh* en las primeras dos semanas post-fractura y luego disminuyó gradualmente hasta la octava semana (Tatsumi *et al.*, 2014).

La expresión de *Ihh* es factible de ser incrementada con el suministro de su agonista *smoothened agonist* (SAG), que demostró que acelera la diferenciación osteoblástica *in vitro* (Lee *et al.*, 2016) e *in vivo* (Kashiwagi *et al.*, 2016). En estudios *in vivo*, la reparación obtenida por efecto de SAG aumentó la angiogénesis y el volumen de hueso nuevo en la reparación (Lee *et al.*, 2017). SAG actuaría directamente sobre los preosteoblastos a los que induce a que se diferencien en osteoblastos que conduce a la formación del callo óseo, respaldado por aumento en el número de células que expresan a *osterix* (*Osx*). Por otra parte, incrementa el número de condrocitos que sufren transdiferenciación hacia osteoblastos (Kashiwagi *et al.*, 2016). Comorbilidades como la diabetes deprimen la inmunexpresión de *Ihh* en las células mesenquimáticas afectando la reparación de las fracturas de los animales que la padecen (Tevlin *et al.*, 2017).

Osteoartritis

Estudios realizados en modelos animales establecieron que *Ihh* se expresa en estados osteoartroticos en respuesta a situaciones articulares postraumáticas, lo que sugiere que es un gen mecanosensible de los condrocitos (Ng, 2006). Estas fuerzas podrían ser un mecanismo que activa la señalización de Hh, provocando la osteoartritis (OA) (Lin *et al.*, 2009). En la articulación osteoartrotica PTHrP abunda en el líquido sinovial, mientras que la expresión de *Ihh* está disminuida en el cartilago (Kohno *et al.*, 1997).

La expresión de *Ihh* se correlaciona con la progresión de la OA y los cambios de la morfología de los condrocitos y la expresión génica consistentes con la hipertrofia de los condrocitos y la degradación del cartilago (Wei *et al.*, 2012). La degradación del cartilago se encuentra mediada por metaloproteinasas (MMP) de forma similar a lo que sucede durante el proceso de osificación endocondral (Loughlin, 2001).

El cartilago osteoartrotico comparte algunos de los procesos de diferenciación que ocurren durante la embriogénesis, como la proliferación e hipertrofia de los condrocitos, mineralización de la matriz extracelular y la apoptosis. *Ihh* se encuentra en el líquido sinovial de articulaciones con daño temprano del cartilago articular, aunque no es lo suficientemente sensible para predecir la progresión de la gravedad del daño del cartilago en la articulación (Zhang *et al.*, 2014).

La anulación del gen que expresa a *Ihh* previene el desarrollo de la OA inducida quirúrgicamente en ratas. Este efecto condroprotector resulta de la inhibición de la hipertrofia de los condrocitos y de la expresión de los genes que causan la degradación del cartilago. Esta evidencia respalda el concepto de que la inhibición de *Ihh* constituye una estrategia terapéutica para prevenir y tratar a la OA (Zhou *et al.*, 2014).

Intervención de *Ihh* en degeneración de los discos intervertebrales (DDIV)

En el perro, el eje *Ihh*/PTHrP interviene en el desarrollo del disco intervertebral (DIV). Interviene en la transición de la diferenciación de las células notocordales (CN) del núcleo pulposo del disco intervertebral (DIV), a células fenotípicamente similares a condrocitos.

Luego la expresión de *Ihh*/PTHrP disminuye con la pérdida de las células y vuelve a incrementar en las etapas avanzadas de la degeneración del DIV (Bach *et al.*, 2019). El grado de degeneración del DIV en el perro cuenta con correlación positiva significativa con el grado de expresión de *Ihh*, lo que puede indicar que *Ihh* promueve la degeneración de los DV (Tuinman, 2016).

Oncología

Se han propuesto tres métodos para explicar cómo la señalización de HH conduce a la formación de tumores (Lavine, 2006). En el primero, tanto la expresión aumentada de ligandos de HH como *Gli* o *Ptch1* ectópicos conducirán a la activación autocrina o yuxtacrina. En segundo lugar, la activación de HH ocurre independientemente del ligando, donde la mutación de *Ptch1* o de *Smo*, permite que *Smo* permanezca a partir de la intervención de *Gli*. Por el contrario, en el último enfoque, la activación paracrina de HH ocurre de manera dependiente del ligando. La expresión ectópica o los elementos mutados pueden pasar del tumor al estroma de soporte. Se ha demostrado que esta señalización aumenta tanto la capacidad invasiva como la proliferativa tumoral (Nguyen *et al.*, 2014).

Los niveles de expresión de los genes que comprenden a la vía Hedgehog están positivamente correlacionados entre sí. La sobreexpresión de estos genes puede provocar la desregulación de la vía, lo que puede conducir a la progresión del osteosarcoma. Lo *et al.* (2007) estudiaron en cultivos celulares el papel proliferativo de esta vía en el osteosarcoma (OSA) a través de *Gli1*, *Ptch* e *Ihh*.

El eje PTHrP/*Ihh* fue considerado para establecer estrategias terapéuticas para los condrosarcomas. Este tipo de neoplasia suele ser resistente a la radiación y la quimioterapia, por esa razón el tratamiento que suele indicarse es la ablación quirúrgica (Fiorenza *et al.*, 2002). El bloqueo de la señalización de *Ihh* con triparanol puede atenuar la proliferación celular en el condrosarcoma. Esta observación sugiere que el bloqueo de *Ihh* en condrosarcomas pueda ser un tratamiento quimioterápico eficaz para estos tumores, que de otra manera serían difíciles de manejar. El bloqueo de *Ihh* probablemente no sea citotóxico en la forma en que lo hace la quimioterapia convencional, razón por la cual podría ser útil como parte de una estrategia de supresión a largo plazo (Tiet *et al.*, 2006).

Los hallazgos de que *Hh*/*Smo* se activa en las líneas celulares del osteosarcoma (OSA) canino y que la ciclopatina suprime la supervivencia de las células mediante la inhibición de *Smo*, sugieren que la vía de señalización de *Hh*/*SMO* podría ser un nuevo objetivo terapéutico para el (OSA) canino (Nam *et al.*, 2022).

CONCLUSIÓN

La presente revisión contribuye a comprender la actividad de *Ihh* en dos aspectos centrales; la primera es la vía de señalización de *Ihh* y, la segunda los cambios que genera a nivel celular y tisular. No obstante, referirnos a *Ihh*, requiere poner atención en la PTHrP, ya que desempeña un rol de control indirecto sobre *Ihh*. Ese eje de retroalimentación que conforman en el desarrollo normal del esqueleto, se puede alterar y conformar un elemento de la etiopatogenia de enfermedades osteoarticulares.

En ese sentido se exploró el rol del *Ihh* y el control de PTHrP en enfermedades ortopédicas, la osteoartritis, oncología y en la reparación de fracturas. Conocer cómo

interviene Ihh en esas condiciones patológicas contribuye a comprender los mecanismos de desarrollo de las enfermedades y establecer tratamientos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, J., Horton, J., Sohn, P., Serra, R. (2001). *The perichondrium plays an important role in mediating the effects of TGF-beta1 on endochondral bone formation*. *Development Dynamic*, 221(3), 311–321. doi:10.1002/dvdy.1141
- Alvarez, J., Sohn, P., Zeng, X., Doetschman, T., Robbins, D.J., Serra, R. (2002). *TGFbeta2 mediates the effects of hedgehog on hypertrophic differentiation and PTHrP expression*. *Development*, 129, 1913–1924. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.11.006>
- Bach, F.C., Rooij, K.M., Riemers, F.M., Snuggs, J.W., Jong, W.A.M., Zhang, Y., Creemers, L.B., Chan, D., Le Maitre, C., Tryfonidou, M.A. (2019). *Hedgehog proteins and parathyroid hormone-related protein are involved in intervertebral disc maturation, degeneration, and calcification*. *JOR Spine*, 2(4):e1071. doi:10.1002/jsp2.1071
- Baht, G.S., Silkstone, D., Nadesan, P., Whetstone, H., Alman, B.A. (2014). *Activation of hedgehog signaling during fracture repair enhances osteoblastic-dependent matrix formation*. *Journal of Orthopedic Research*, 32(4):581–586. doi: 10.1002/jor.22562.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H., Beachy, P.A. (1996). *Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function*. *Nature* 383(6), 407–413. doi: 10.1038/383407a0
- Chung, U., Schipani, E., McMahon, A.P., Kronenberg, H.M. (2001). *Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development*. *The Journal of Clinical Investigation*, 107(3), 295–304. doi: 10.1172/JCI11706. doi: <https://doi.org/10.1172/JCI11706>
- DiPaola, C.P., Farmer, J.C., Manova, K., Niswander, L.A. (2005). *Molecular signaling in intervertebral disk development*. *Journal of Orthopaedic Research* 23(5), 1112–1119. doi:10.1016/j.orthres.2005.03.008
- Duesterdieck-Zellmer, K., Semevolos, S., Kinsley, M., Riddick, T. (2015). *Age-related differential gene and protein expression in postnatal cartilage canal and osteochondral junction chondrocytes*. *Gene Expression Patterns*, 17(1), 1–10. doi:10.1016/j.gep.2014.11.002
- Ferguson, C.M., Miclau, T., Hu, D., Alpern, E., Helms, J.A. (1998). *Common molecular pathways in skeletal morphogenesis and repair*. *Annals of New York Academy of Science*, 857:33–42. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb10105.x.
- Fiorenza, F., Abudu, A., Grimer, R.J., Carter, S.R., Tillman, R.M., Ayoub, K., Mangham, D.C., Davies, A.M. (2002). *Risk factors for survival and local control in chondrosarcoma of bone*. *Journal of Bone and Joint Surgery - Brazil*. 84(1):93–99. doi: 10.1302/0301-620x.84b1.11942.
- Goldring, M.B., Tsuchimochi, K., Ijiri, K. (2006). *The control of chondrogenesis*. *Journal Cell Biochemistry*, 97(1):33–44. doi: 10.1002/jcb.20652.97: 33–44
- Gradilla, A.C., Sanchez-Hernandez, D., Brunt, L., Scholpp, S. (2018). *From top to bottom: Cell polarity in Hedgehog and Wnt trafficking*. *BMC Biology*, 10;16(1):37–48. doi: 10.1186/s12915-018-0511-x
- Grimsrud, D.C., Romano, P.R., D'Souza, M., Puzas, J.E., Schwarz, E.M., Reynolds, P.R., Roiser, R.N., O'Keefe, R.J. (2001). *Signaling stimulates chondrocyte maturation and the expression of Indian hedgehog*. *Journal of Orthopaedic Research*, 19(1), 18–25. doi:10.1016/s0736-0266(00)00017-6
- Huangfu, D. (2006). *Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates*. *Development*, 133(1), 3–14. doi:10.1242/dev.02169
- Juppner, H. (2000). *Role of parathyroid hormone-related peptide and Indian hedgehog in skeletal development*. *Pediatric Nephrology*, 14(7), 606–611. doi: 10.1007/s004670000343
- Kahn, A. (1996). *Régulation par Indian Hedgehog de la différenciation cartilagineuse*. *Medicine/Science*, 12(10), 1111–1112.
- Kaneko, S., Matsushita, M., Mishima, K., Takegami, Y., Imagama, S., Kitoh, H. (2020). *Effect of periosteal resection on longitudinal bone growth in a mouse model of achondroplasia*. *Bone Reports*, 13, 100708. doi:10.1016/j.bonr.2020.100708
- Karp, S.J., Schipani, E., St-Jacques, B., Hunzelman, J., Kronenberg, H., McMahon, A.P. (2000). *Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and -independent pathways*. *Development*, 127:543–548.

- Kashiwagi, M., Hojo, H., Kitaura, Y., Maeda, Y., Aini, H., Takato, T., Ohba, S. (2016). *Local administration of a hedgehog agonist accelerates fracture healing in a mouse model*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 479(4), 772–778. doi:10.1016/j.bbrc.2016.09.134
- Kobayashi, T., Chung, U.I., Schipani, E., Starbuck, M., Karsenty, G., Katagiri, T., Goad, D.L., Lanske, B., Kronenberg, H.M. (2002). *PTHrP and Indian hedgehog control differentiation of growth plate chondrocytes at multiple steps*, *Development* 129(12):2977–86. doi: 10.1242/dev.129.12.2977.
- Kobayashi, T., Soegiarto, D.W., Yang, Y., Lanske, B., Schipani, E., McMahon, A.P., Kronenberg, H.M. (2005). *Indian hedgehog stimulates periarticular chondrocyte differentiation to regulate growth plate length independently of PTHrP*. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(7), 1734–1742. doi: 10.1172/JCI24397
- Kohno, H., Shigeno, C., Kasai, R., Akiyama, H., Iida, H., Tsuboyama, T., Nakamura, T. (1997). *Synovial fluids from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis contain high levels of parathyroid hormone-related peptide*. *Journal of Bone and Mineral Research*, 12(5), 847–854. doi:10.1359/jbmr.1997.12.5.847
- Kronenberg, H.M. (2003). *Developmental regulation of the growth plate*. *Nature*, 423(6937), 332–336. doi:10.1038/nature01657 .
- Lavine, K.J. (2006). *Fibroblast growth factor signals regulate a wave of Hedgehog activation that is essential for coronary vascular development*. *Genes & Development*, 20(12), 1651–1666. doi:10.1101/gad.1411406
- Le, A.X., Miclau, T., Hu, D., Helms, J.A. (2001). *Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures*. *Journal of Orthopedic Research*, 19(1), 78–84. doi: 10.1016/S0736-0266(00)00006-1
- Lee, S., Shen, J., Pan, H.C., Shrestha, S., Asatrian, G., Nguyen, A., Meyers, C., Nguyen, V., Lee, M., Soo, C., Ting, K., James, A.W. (2016). *Calvarial defect healing induced by small molecule smoothed agonist*. *Tissue Engineering Part A*. 22(23–24), 1357–1366. doi:10.1089/ten.tea.2016.0167
- Lee, S., Wang, C., Pan, H.C., Shrestha, S., Meyers, C., Ding, C., James, A.W. (2017). *Combining smoothed agonist and NEL-Like protein-1 enhances bone healing*. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 139(6), 1385–1396. doi:10.1097/prs.00000000000003367
- Lenton, K., James, A.W., Manu, A., Brugmann, S.A., Birker, D., Nelson, E.R., Leucht, P., Helms, J.A., Longaker, M.T. (2011). *Indian Hedgehog positively regulates calvarial ossification and modulates bone morphogenetic protein signalling*. *Genesis*, 49(10), 784–796. doi: 10.1002/dvg.20768
- Lin, A.C., Seeto, B.L., Bartoszko, J.M., Khoury, M.A., Whetstone, H., Hsu, C., Ali, S.A. Ho, L., Alman, B.A. (2009). *Modulating hedgehog signaling can attenuate the severity of osteoarthritis*. *Nature Medicine*, 15(12), 1421–1425. doi:10.1038/nm.2055
- Liu, X., McKenzie, J.A., Maschhoff, C.W., Gardner, M.J., Silva, M.J. (2017). *Exogenous hedgehog antagonist delays but does not prevent fracture healing in young mice*. *Bone*. 103:241–251. doi: 10.1016/j.bone.2017.07.017.
- Lo, W., Wunder, J., Gokgoz, N., Parkes, R., Alman, B., Andrulis, I. (2007). *Indian hedgehog signaling in osteosarcoma: Co-expression of GLI1, PTCH1, and IHH*. *Cancer Research*, 67:(9_Supplement):1010
- Logan, C.Y., Nusse, R. (2004). *The Wnt signaling pathway in development and disease*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20(1), 781–810. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126.
- Long, F., Zhang, X.M., Karp, S., Yang, Y., McMahon, A.P. (2001). *Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation*. *Development*. 128:5099–5108. doi: 10.1242/dev.128.24.5099
- Lum, L. (2004). *The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers*. *Science*, 304(5678), 1755–1759. doi:10.1126/science.1098020
- Mackie, E.J., Tatarczuch, L., Mirams, M. (2011). *The skeleton: a multi-functional complex organ. The growth plate chondrocyte and endochondral ossification*. *Journal of Endocrinology*, 211(2), 109–121. doi:10.1530/joe-11-0048
- Mak, K.K., Kronenberg, H.M., Chuang, P.T., Mackem, S., Yang, Y. (2008). *Indian hedgehog signals independently of PTHrP to promote chondrocyte hypertrophy*. *Development* 135(11), 1947–1956. doi:10.1242/dev.018044
- McMahon, A.P. (2003). *Developmental roles and clinical significance of Hedgehog signaling*. *Current Topics in Developmental Biology*, 53:1–114. doi:10.1016/S0070-2153(03)53002-2
- Mendoza, L., Piquemal, D., Lejeune, J.P., Vander Heyden, L., Noguier, F., Bruno, R., Sandersen, C., Serteyn, D. (2015). *Age-dependent expression of osteochondrosis-related genes in equine leukocytes*. *Veterinary Record Open*, 2(1), e000058–e000058. doi:10.1136/vetreco-2014-000058

- Minina, E., Wenzel, H.M., Kreschel, C., Karp, S., Gaffield, W., McMahon, A.P., Vortkamp, A., (2001). *BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation*. *Development*, 128(22), 4523–4534. doi: 10.1242/dev.128.22.4523.
- Murakami S, Noda M. (2000). *Expression of Indian hedgehog during fracture healing in adult rat femora*. *Calcified Tissue International*, 66(4), 272–676. doi: 10.1007/pl00005843.
- Nam, A., Song, W.J., An, J.H., Rebhun, R.B., Youn, W.Y., Seo K.W. (2022). *Expression of the hedgehog signaling pathway and the effect of inhibition at the level of smoothened in canine osteosarcoma cell lines*. *Veterinary and Comparative Oncology*, 1–10. doi: <https://doi.org/10.1111/vco.12828>
- Ng, T.C.S. (2006). *Repeated mechanical loading enhances the expression of Indian Hedgehog in condylar cartilage*. *Frontiers in Bioscience*, 11(1), 943. doi:10.2741/1850
- Nguyen, A., Nguyen, V., Pham, D., Mravic, M., Scott, M.A., James, A.W. (2014). *Novel signaling pathways in osteosarcoma*. *International Journal of Orthopedics*, 1(3), 73–84. doi:10.6051/j.issn.2311-5106.2014.01.24
- Petrova, R., Joyner, A.L. (2014). *Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair*. *Development*, 141(18), 3445–3457. doi:10.1242/dev.083691
- Riddick, T.L., Duesterdieck-Zellmer, K., Semevolos, S.A. (2012). *Gene and protein expression of cartilage canal and osteochondral junction chondrocytes and full-thickness cartilage in early equine osteochondrosis*. *The Veterinary Journal*, 194(3), 319–325. doi:10.1016/j.tvjl.2012.04.023
- Semevolos, S.A., Brower-Toland, B.D., Bent, S.J., Nixon, A.J. (2002). *Parathyroid hormone-related peptide and Indian hedgehog expression patterns in naturally acquired equine osteochondrosis*. *Journal of Orthopaedic Research*. 20:1290–1297. doi: 10.1016/S0736-0266(02)00055-4
- Semevolos, S.A., Strassheim, M.L., Haupt, J.L., Nixon, A.J. (2005). *Expression patterns of Hedgehog signaling peptides in naturally-acquired equine osteochondrosis*. *Journal of Orthopaedic Research*, 23(5), 1152–1159. doi: 10.1016/j.orthres.2005.01.024
- Serteyn, D., Piquemal, D., Vanderheyden, L., Lejeune, J.-P., Verwilghen, D., Sandersen, C. (2010). *Gene expression profiling from leukocytes of horses affected by osteochondrosis*. *Journal of Orthopaedic Research*, n/a–n/a. doi:10.1002/jor.21089
- Shum, L., Coleman, C.M., Hatakeyama, Y., Tuan, R.S. (2003). *Morphogenesis and dysmorphogenesis of the appendicular skeleton*. *Birth Defects Research*, 69(2), 102–122. doi:10.1002/bdrc.10012
- Smith, L. (2010). *Treatment of angular limb deformities in foals*. In *Practice*, 32(4), 156–162. doi:10.1136/inp.c1435
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M., McMahon, A.P. (1999). *Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation*. *Genes & Development*, 13(16), 2072–2086. doi:10.1101/gad.13.16.2072
- Tatsumi, H., Hideshima, K., Kanno, T., Hashimoto, R., Matsumoto, A., Otani, H., Sekine, J. (2014). *Effect of ageing on healing of bilateral mandibular condyle fractures in a rat model*. *International Journal of Oral Maxillofacial Surgery*. 43(2), 185–193. DOI: 10.1016/j.ijom.2013.07.742.
- Tevlin, R., Seo, E.Y., Marecic, O., McArdle, A., Tong, X., Zimdahl, B., Malkovskiy, A., Sinha, R., Gulati, G., Li, X., Wearda, T., Morganti, R., Lopez, M., Ransom, R.C., Duldulao, C.R., Rodrigues, M., Nguyen, A., Januszyk, M., Maan, Z., Paik, K., Yapa, Rajadas, J., Wan, D.C., Gurtner, G.C., Snyder, M., Beachy, P.A., Yang, F., Goodman, S.B., Weissman, I.L., Chan, C.K.F., Longaker, M.T. (2017). *Pharmacological rescue of diabetic skeletal stem cell niches*. *Science Translational Medicine*, 9(372), eaag2809. doi:10.1126/scitranslmed.aag2809
- Tiet, T.D., Hopyan, S., Nadesan, P., Gokgoz, N., Poon, R., Lin, A.C., Wunder, J.S. (2006). *Constitutive Hedgehog signaling in chondrosarcoma up-regulates tumor cell proliferation*. *The American Journal of Pathology*, 168(1), 321–330. doi:10.2353/ajpath.2006.050001
- Tuinman, A.E. (2016). *The role of the PTHrP-IHH feedback loop in canine intervertebral disc degeneration*. Utrecht University
- Velcheti, V., Govindan, R. (2007). *Hedgehog signaling pathway and lung cancer*. *Journal of Thoracic Oncology*. 2(1), 7–10. doi: 10.1097/JTO.0b013e31802c0276
- von Rechenberg, B., Tanner, S.V., Hilbe, M., Zlinszky, K., Kämpf, K., von Wedel, F., Kümmerle, J., Picek, S., Vogt, R., Auer, J.A. (2010). *Molecular signaling within growth plates of the radius and tibia after periosteal stripping: an experimental study in lambs*. *Pferdeheilkunde* 26(4):484–494
- Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. (1996). *Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein*. *Science*, 273:613–622.

Vortkamp, A. (2001). *Interaction of growth factors regulating chondrocyte differentiation in the developing embryo*. Osteoarthritis Cartilage 9 Suppl A:S109-17.

Wei, F., Zhou, J., Wei, X., Zhang, J., Fleming, B.C., Terek, R., Wei, L. (2012). *Activation of indian hedgehog promotes chondrocyte hypertrophy and upregulation of MMP-13 in human osteoarthritic cartilage*. Osteoarthritis and Cartilage, 20(7), 755-763. doi:10.1016/j.joca.2012.03.010

Wu, Q., Zhang, Y., Chen, Q. (2001). *Indian hedgehog is an essential component of the mechanotransduction complex to stimulate chondrocyte proliferation*. The Journal of Biology Chemistry, 276(38):35290-6. doi: 10.1074/jbc.M101055200.

Wuelling, M., Vortkamp, A. (2009). *Transcriptional networks controlling chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral ossification*. Pediatric Nephrology, 25(4), 625-631. doi:10.1007/s00467-009-1368-6

Zhang, C., Wei, X., Chen, C., Cao, K., Li, Y., Jiao, Q., Wei, L. (2014). *Indian Hedgehog in synovial fluid is a novel marker for early cartilage lesions in human knee joint*. International Journal of Molecular Sciences, 15(5), 7250-7265. doi:10.3390/ijms15057250

Zhou J, Chen Q, Lanske B, Fleming BC, Terek R, Wei X, Zhang G, Wang S, Li K, Wei L. (2014). *Disrupting the Indian hedgehog signaling pathway in vivo attenuates surgically induced osteoarthritis progression in Col2a1-CreERT2; Ihhf1/fl mice*. Arthritis Research & Therapy. 16:11. doi:10.1186/ar4437

Zou, S., Chen, T., Wang, Y., Tian, R., Zhang, L., Song, P., Yang, S., Zhu, Y., Guo, X., Huang, Y., Li, Z., Kan, L., Hu, H. (2014). *Mesenchymal stem cells overexpressing Ihh promote bone repair*. Journal of Orthopaedic Surgery and Research, 9(1), 102-115. doi: 10.1186/s13018-014-0102-7.