



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO COMPARATIVO DE GLUCOSAMINOGLUCANOS
DURANTE LA DIFERENCIACION CELULAR DEL CARTILAGO
in vivo E in vitro

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

B I O L O G A

P R E S E N T A :

Ana Laura Hernández Lagunas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1994



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A la memoria de mi padre,
por sus conocimientos y su
fuerza incomparables que
siempre me han acompañado.
Ahora, aunque sea un poco
tarde por tu ausencia,
te brindo una muestra más
de mi amor. Gracias Padre Mio...

A mi Madre, mi mejor amiga,
por su gran amor, comprensión
y sus palabras que siempre
me han servido de guía.

A todos mis hermanos,
por su apoyo y cariño:
Alberto, José Luis, Eduardo,
Tere quien ha sido como mi
segunda Madre, Marco Antonio,
Carlos, Guillermo y Adrianita.

A Felipe, quien ha soportado
mis momentos de histeria,
por ayudarme a resolver mis
problemas y por brindarme
parte de su alegría y cariño.

Este trabajo se hizo en el Departamento de Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M., bajo la dirección del Dr. Lino Díaz de León Hernández y del M. en C. Jesús Chimal Monroy, a quienes expreso mi agradecimiento.

Agradezco a los miembros del jurado, por sus apreciables correcciones y su valioso tiempo dedicado a esta revisión:

Dr. Lino Díaz de León Hernández.

Dr. Jesús Manuel León Cázares.

M. en C. Jesús Chimal Monroy.

Dra. Genoveva González Morán.

Dra. Sara Frías Vázquez.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer muy especialmente, a mi gran maestro Jesús Chimal Monroy, porque a pesar de los problemas que se presentaron durante mi trabajo, siempre me brindó alternativas, su confianza, una paciencia increíble y principalmente por su impulso por seguir adelante.

Agradezco al Dr. Lino Díaz de León por todo el apoyo y comprensión que me ha brindado para poder seguir adelante con mis estudios.

También, doy gracias a Violeta por su gran ayuda para el arreglo e impresión de esta tesis.

Por último a todos mis compañeros del laboratorio, a quienes agradezco sus comentarios durante mi trabajo. A Hortensia, quien me brindó su paciencia en el laboratorio y siempre tuvo una alternativa para resolver mis problemas. Y especialmente a Francisco por sus palabras de ánimo que siempre fueron muy oportunas.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	14
OBJETIVOS	16
MATERIALES	17
METODOS	18
A) CULTIVO CELULAR EN MONOCAPA	18
B) CULTIVO CELULAR EN MICROMASA	18
C) EVALUACION DE LA PROLIFERACION CELULAR	19
D) AISLAMIENTO DE LAS EXTREMIDADES EMBRIONARIAS	19
E) ANALISIS DE LOS GLICOSAMINOGLICANOS SINTETIZADOS <i>in vitro e in vivo</i>	19
F) MARCAJE CON PROLINA-C ¹⁴	21
G) ELECTROFORESIS	21
H) INMUNOTRANSFERENCIA	21
RESULTADOS	22
REGULACION <i>in vitro</i> DE LA DIFERENCIACION CELULAR DEL CARTILAGO POR EL ACIDO RETINOICO	22
SISNTESIS DE LOS GLICOSAMINOGLICANOS <i>in vitro e in vivo</i>	22
SINTESIS DE COLAGENA EN LA REEXPRESION DE LA CONDROGENESIS <i>in vitro</i> .	34
EXPRESION DE LA COLAGENA TIPO I Y DE LA COLAGENA TIPO II	37
DISCUSION Y CONCLUSIONES	42
PERSPECTIVAS	49
REFERENCIAS	51

RESUMEN

El cartilago se forma mediante tres etapas del desarrollo, en los que se ha identificado la expresión de varios componentes de la matriz extracelular: mesénquima laxo (colágena tipo I), blastema condrogénico (tenascina) y cartilago fenotípicamente diferenciado (colágena tipo II). Se sabe que el ácido retinoico (AR), regula la diferenciación de los condrocitos cultivados *in vitro*, al bloquear la expresión de la colágena tipo II e inducir la síntesis de la colágena tipo I. Esta inhibición de la condrogénesis por el AR, ocurre en un estado posterior al compromiso celular. Con base en estos resultados, se estudió la reexpresión de la condrogénesis en las células previamente tratadas con el AR, en condiciones de micromasa. Así, tenemos que para determinar dicha reexpresión, se usaron isótopos radiactivos para medir la biosíntesis de los glicosaminoglicanos (GAG) ($\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$) y la colágena (Prolina-C14). Asimismo, se identificó el cambio en la expresión de los tipos de la colágena (I y II) por inmunotransferencia. Los resultados mostraron, un incremento de 3 veces en la síntesis de los GAG al día 5 de cultivo, donde el 58% correspondió al sulfato de heparán, cuando se comparó con los otros GAG. Esto coincide con la reexpresión de los GAG presentes en la etapa de blastema condrogénico. De igual manera, se observó que la síntesis de la colágena también aumentó en ese día de cultivo. Además, la colágena tipo I se expresó durante los dos primeros días de cultivo. Mientras tanto la colágena tipo II inició su reexpresión en el día 3 de cultivo y se mantuvo hasta el día 11 de cultivo. Por lo tanto, sugerimos que alrededor del día 5 de cultivo se encuentra la etapa de blastema condrogénico, en días previos a ese día, el mesénquima laxo y posteriores, el cartilago fenotípicamente diferenciado. Con base en esto, se sugiere que los tres estadios del desarrollo que llevan a la diferenciación del cartilago *in vivo*, pueden ser reconocidos en nuestro sistema experimental *in vitro*.

INTRODUCCION

Durante el desarrollo embrionario de los metazoarios existen una serie de fenómenos que actúan, en espacios y tiempos específicos, para la producción de todos los diversos tipos celulares que llegan a ser organizados en diferentes estructuras para conformar un organismo adulto. La generación de los diversos tipos celulares, incluye un conjunto de procesos que conducen a que las células con el mismo genoma expresen fenotipos diferentes y funciones especializadas. Estos procesos han sido denominados en conjunto diferenciación celular.

La diferenciación celular es uno de los temas principales de estudio dentro del campo de la Biología del Desarrollo, ya que siempre ha existido el interés por conocer y comprender, cómo es que a partir de una célula huevo (óvulo fecundado), se activan una serie de procesos que restringen gradualmente su potencialidad para dar origen a los distintos linajes celulares, hasta un punto en el que las poblaciones celulares se determinan hacia una ruta específica del desarrollo y por consiguiente a expresar un fenotipo y una función características. Asimismo, se considera que una célula está **determinada** o **comprometida** hacia una ruta de diferenciación, cuando experimenta un cambio heredable para expresar un fenotipo que la distinga a ella y a su progenie de otras células del embrión. Este cambio las hace seguir una vía específica y especializada del desarrollo (Alberts y col, 1989). Aunque algunos autores no concuerdan en que los términos determinación y compromiso sean referidos de igual manera, en el presente trabajo estos términos se usarán indistintamente. De esta manera, se considera a la diferenciación celular de cualquier linaje, como una sucesión de fases de restricción que llevan a que las células se determinen hacia un camino específico del desarrollo. Así, tenemos que las células determinadas presentan un fenotipo que no es reconocible en su momento, sino hasta estados posteriores.

Entonces, cuando una célula queda determinada a seguir una ruta específica del desarrollo, su progenie experimenta cambios internos, como lo es en la expresión diferencial de genes, que codifican diferentes ARNm que se traducirán en proteínas. Estas modificaciones están relacionadas con la actividad genética, la cual a su vez se encuentra continuamente regulada: los genes se pueden activar y desactivar durante los procesos de la diferenciación celular por medio de las interacciones núcleo-citoplasma, las interacciones célula-célula y célula con su matriz extracelular (Alberts y col, 1989). Además, se ha postulado que esta regulación genética presenta una secuencia jerárquica, de tal manera que el producto de un gen puede controlar la expresión de otros genes (Darnell y col, 1990; Watson y col, 1987).

La identificación de genes maestros que regulan el desarrollo, no ha sido fácil debido a la poca accesibilidad de sistemas experimentales para distinguir las diferentes etapas de la diferenciación celular. Con respecto a estos estudios, se ha visto que las mutaciones homeóticas, mutaciones que provocan la transformación de una estructura corporal por otra (Malvilio, 1993) afectan a los genes que controlan el desarrollo de un organismo, como es el caso en *Drosophila* donde al mutarse una secuencia dentro del complejo de genes **Antennapedia** se sustituye una antena por una pata. Asimismo, durante el desarrollo de un organismo vertebrado la expresión genética está regulada por familias de genes que contienen secuencias *homeobox*, los genes **Hox**. Estos genes son similares en estructura, organización y función, a los genes homeóticos de *Drosophila*. Con base en ésto, se ha sugerido que los genes que contienen secuencias del tipo *homeobox* regulan la expresión de otros genes y por lo tanto, deben controlar la embriogénesis al determinar la organización espacial del embrión (Watson y col, 1987; Wright, 1991; Duboule, 1992).

Por otro lado, se ha observado que la matriz extra celular (MEC) de los embriones de mamíferos, se encuentra presente desde el estadio de dos células, y es un componente de los tipos celulares generados durante el desarrollo de cualquier organismo. Sin embargo, la composición de la MEC y las relaciones espaciales entre ésta y las células difieren durante el desarrollo. Esto ha llevado a mencionar que la MEC juega un papel central durante los procesos de la diferenciación celular.

Las células pueden estar completamente rodeadas por una MEC, como es en el caso de los condrocitos del cartílago; o podrían interactuar con la MEC solamente sobre una superficie, como en el caso de las células epiteliales y endoteliales.

Con base en lo anterior, es que los procesos de la diferenciación celular se pueden estudiar desde un punto de vista en que se resalte la importancia de las interacciones célula-MEC, así como de las interacciones célula-célula.

EL CARTILAGO COMO UN MODELO DE LA DIFERENCIACION CELULAR.

El cartilago es un tejido altamente especializado que está formado por células (condrocitos) y una MEC secretada por estas células. Los componentes principales de la MEC del cartilago son la colágena tipo II y un proteinglicano rico en sulfato de condroitina, denominado agregano, además de otros proteinglicanos sulfatados. Estos componentes de la MEC dan las características de resistencia y flexibilidad del tejido. El cartilago es esencialmente avascular, por lo que la nutrición de los condrocitos se lleva a cabo por difusión a través de la MEC (Ham y Cormack, 1983). Los estudios por microscopía electrónica muestran que los condrocitos *in vivo* típicamente son ovoides (Horton, 1993).

De acuerdo a la cantidad y al tipo de fibras elásticas y colágenas presentes en la MEC, se encuentran tres tipos de cartilago: hialino, elástico y fibroso.

El cartilago hialino prácticamente forma todo el esqueleto de los vertebrados en estadios embrionarios. Posteriormente, este tejido se osifica para dar lugar al hueso. En algunos casos, como en los mamíferos adultos, el cartilago persiste en las superficies articulares de los huesos y como órgano de sostén en las vías respiratorias.

Se sabe que el cartilago que se observa durante el desarrollo embrionario de los vertebrados, tiene un origen distinto. Así tenemos, que los cartílagos del septo nasal y de Meckel presente en la mandíbula, se derivan de las células de la cresta neural craneal. El primero permanece como cartilago hialino hasta estados adultos; mientras el segundo, degenera en una región y en otra región del mismo parece tener una asociación con la formación del hueso mandibular. Asimismo, también existe cartilago de origen somítico, que da origen a las vértebras en el embrión, éstas en estados postfetales se osifican. Por último,

el cartilago presente en las extremidades embrionarias se origina de la placa lateral del mesodermo.

Los conocimientos acerca de la diferenciación celular del cartilago se han desarrollado un tanto del estudio del cartilago de origen somítico, pero principalmente provienen del desarrollo del cartilago de las extremidades embrionarias. Por los estudios llevados a cabo con el cartilago somítico se ha demostrado que la diferenciación de éste depende en gran medida de las interacciones entre el tubo neural y la notocorda con las somitas. Sin embargo, parece ser que no se requieren interacciones celulares directas entre estas estructuras, más bien se supone que alguno o algunos factores presentes en la MEC intervienen en este proceso (Hall, 1983; Aoyama, 1993).

Por otra parte, el cartilago de las extremidades embrionarias de los vertebrados se origina de las células del mesénquima, provenientes de la placa lateral del mesodermo, las cuales migran desde esa región y se colocan debajo de una capa delgada de ectodermo para desarrollarse primero como un primordio. Cabe hacer aquí la aclaración que las interacciones entre estos dos tejidos, mesodermo y ectodermo, son importantes para el desarrollo de las extremidades. Sin embargo, a diferencia del cartilago de origen somítico, no se conoce cómo se lleva a cabo la inducción del cartilago, en esas estructuras.

Es necesario mencionar, que sin importar el origen del cartilago, éste se desarrolla de manera similar en todos ellos. Por lo tanto describiré en forma general, cómo se desarrolla el cartilago desde un punto de vista en el que haré hincapié en las interacciones célula-célula y célula-MEC y mencionaré la expresión diferencial de varias moléculas de la MEC durante la condrogénesis. Posteriormente trataré de esclarecer los posibles factores que participan en la regulación de la diferenciación del cartilago.

Durante el desarrollo embrionario de los vertebrados, la diferenciación celular del cartilago se inicia cuando las células del mesénquima laxo (células fibroblastoides) empiezan a agregarse unas con otras, de tal manera que el número de células por unidad de área se incrementa. A partir de esta condensación, que en el proceso de la condrogénesis se denomina blastema condrogénico, es que el cartilago se diferencia fenotípicamente. Así, podemos distinguir tres etapas que llevan a la diferenciación del cartilago: mesénquima laxo, mesénquima condensado (blastema condrogénico) y cartilago fenotípicamente diferenciado.

Durante estas tres etapas del desarrollo del cartilago, existe una expresión diferencial de varias moléculas características de cada una de esas fases. Así, tenemos que en el mesénquima laxo, se expresan moléculas como la colágena tipo I (Sandberg y Vuorio, 1987; Sasano y col, 1992) y un proteinglicano rico en sulfato de condroitina (PG-CS; Kimata y col, 1986). Además, proteínas como la fibronectina (FN; Kosher y col, 1982) la colágena tipo VI (Quarto y col, 1993) y el hialuronato (Toole, 1972) son abundantes en esta primera etapa de la diferenciación. En el inicio de la formación del blastema condrogénico, disminuye el hialuronato extracelular por la actividad de la hialuronidasa (Toole, 1972; Toole y col, 1972), mientras la colágena tipo I (Silver y col, 1981; Kosher y col, 1986a), la FN (Silver y col, 1981; Kosher y col, 1982) y el PG-CS (Kimata y col, 1986) se acumulan en esta etapa. Sin embargo, algunas moléculas como la tenascina (Mackie y col, 1987), la molécula de adhesión celular-neuronal (N-CAM; Jiang y col, 1993) y los proteinglicanos ricos en sulfato de heparán (Frenz y col, 1989a; 1989b) son moléculas específicas de esta etapa. Finalmente, en el estado de la diferenciación fenotípica es característica la expresión de la colágena tipo II (Castagnola y col, 1988; Kosher y col, 1986a; Sasano y col, 1992) y un proteinglicano rico en sulfato de condroitina llamado agrecano, éste es distinto al de etapas precondrogénicas (Kosher y col, 1986b). Además de otras moléculas tales como, la proteína

de unión, la proteína de la matriz del cartilago (Stirpe y Goetinck, 1989), la colágena tipo IX y la colágena tipo X (Castagnola y col, 1988). La síntesis de la colágena tipo II y del agregano persisten en su expresión. Mientras que la síntesis de la colágena tipo I y del PG-CS, de etapas precondrogénicas, cesa. Por otro lado, aunque la colágena tipo II y el agregano sirven como marcadores de la diferenciación del cartilago, estas moléculas inician su expresión desde la etapa del blastema condrogénico.

Ahora bien, esta descripción del desarrollo del cartilago es válida para todos los tipos de cartilago. Sin embargo, en los cartilagos en los que ocurre una hipertrofia y degeneración celular, se debe añadir que la colágena tipo I reinicia su expresión, al igual que la colágena tipo X y la fosfatasa alcalina.

El cartilago, por ser un tejido muy rico en MEC ha favorecido el diseño de modelos experimentales para estudiar su regulación en la diferenciación celular.

Como ya se mencionó, durante la diferenciación del cartilago, los PG ricos en sulfato de heparan intervienen en la formación del blastema condrogénico (Frenz y col, 1989a; 1989b). Esto fue demostrado al inhibir la formación de las condensaciones celulares hasta en un 50% en presencia de un anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio de unión a la heparina en el extremo amino-terminal de la fibronectina, así como la presencia del oligopéptido glicina-arginina-glicina, que contiene un determinante repetido en el dominio amino-terminal de la fibronectina y la presencia de heparinasa en el medio de cultivo.

Se ha propuesto que el hialuronato, es otro glicosaminoglicano que puede intervenir en el proceso de la condrogénesis (Toole, 1972; Toole y col, 1972). Estos trabajos demuestran que el hialuronato se encuentra presente en las regiones precondrogénicas de las

extremidades, pero que en la región donde se formará el blastema condrogénico, se incrementa la producción del sulfato de condroitina y se disminuye la proporción del hialuronato, además de incrementarse la actividad de la hialuronidasa (Toole, 1972; Toole y col, 1972). Estos resultados sugieren que, la síntesis del hialuronato y su subsecuente degradación es un proceso esencial para la condensación del mesénquima.

Las moléculas más importantes que median las interacciones celulares en la regulación de la formación del blastema condrogénico, son las ya mencionadas N-CAM y tenascina. Ambas intervienen en la agregación celular en las extremidades embrionarias, dado que los anticuerpos dirigidos contra la N-CAM y la tenascina inhiben la formación del blastema condrogénico (Jiang y col, 1993).

También se ha demostrado que otras moléculas que se expresan en la etapa del blastema condrogénico son, los glicoconjugados D-galactosa (β 1-3)-N-acetil-D-galactosamina y la N-acetil glucosamina, los cuales se identificaron por la aglutinina de cacahuete (PNA) y la aglutinina de germen de trigo (WGA), respectivamente (Hurle y col, 1988). La degradación de estos glicoconjugados con las enzimas β -galactosidasa y la N-acetil- β -glucosaminidasa (GlcNAC-asa), inhibe la condrogénesis, al evitar la formación del blastema condrogénico (Elmer y col, 1991). La degradación con la β -galactosidasa, altera la morfología de las células, que de ser ovoides adquieren una forma estrellada y de huso. Mientras que las células en presencia de la GlcNAC-asa, presentan una morfología bipolar. El efecto anticondrogénico no se recupera aún cuando las células sean inducidas a adquirir una forma esférica por el tratamiento con citocalacina D, lo cual sugiere que la inhibición de la condrogénesis no se debe al cambio de la morfología provocado por las degradaciones específicas de los glicoconjugados (Elmer y col, 1991). Esta inhibición probablemente se

deba al impedimento de establecer o favorecer las interacciones célula-célula y por lo tanto, no se forma el blastema condrogénico.

Por otro lado, Hall (1983), menciona que los niveles del AMPc varían con la densidad celular, en los cultivos de células del mesénquima de las extremidades embrionarias del pollo, en el estado 24 del desarrollo. Estos autores, observaron que estas células sembradas en altas densidades presentaron altos niveles de AMPc y que éstos se incrementaron conforme las células se diferenciaron en condrocitos. Mientras que las células cultivadas en bajas densidades mostraron bajos niveles de AMPc, los cuales se mantuvieron y las células nunca formaron condrocitos. En tanto, que en los cultivos preparados con mesénquima de las extremidades del pollo en el estado 19, que no exhibieron fenotipos condrogénicos, los niveles del AMPc permanecieron bajos (Ahrens y col, 1977). Sin embargo, cuando estos cultivos fueron tratados con el dibutiril AMPc se estimuló a que los agregados presentes formarán cartilago, definido por la presencia de una matriz que se tiñe con el azul de alciano (Ahrens y col, 1977).

Entonces, la respuesta de las células del mesénquima de las extremidades embrionarias al dibutiril AMPc es una propiedad de las células, la cual cambia temporal y espacialmente durante la formación de las extremidades (Solursh y col, 1981). Por lo que se ha establecido que el mesénquima de las extremidades embrionarias tiene células capaces de desarrollarse hacia cartilago en respuesta al incremento en AMPc y que el AMPc intracelular resultante, podría ser un efecto de las interacciones celulares. En resumen, estos resultados sugieren que las células del mesénquima tienen un tiempo limitado para interactuar y llegar a ser células condrogénicas y que el AMPc podría facilitar las interacciones celulares y promover la formación del blastema condrogénico. Otra posibilidad sería que las

interacciones celulares establecidas durante la condensación o al inicio de la condrogénesis, podría facilitar la transferencia directa del AMPc de célula a célula.

Los niveles del AMPc endógeno *in situ*, en regiones condrogénicas, no han sido reportados, pero la localización inmunohistoquímica durante la condrogénesis es consistente con asignar un papel para el AMPc durante el proceso de la diferenciación celular del cartilago (Elmer y col, 1981).

REGULACION DE LA DIFERENCIACION CELULAR DEL CARTILAGO POR DIVERSOS FACTORES.

Los estudios hechos *in vivo* e *in vitro*, han mostrado que además de los componentes de la MEC, varios factores que pertenecen la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), intervienen en la diferenciación temprana y en la modulación de la diferenciación celular del cartilago. Desde el trabajo de Urist en 1965 (citado en Urist y col, 1983), se demostró que a partir del material desmineralizado del hueso e implantado en sitios ectópicos (regiones subcutáneas o intramusculares), se indujo la formación de cartilago y hueso. Esta formación del cartilago y hueso *de novo* en un sitio ectópico incluyó una serie de procesos muy semejantes a aquéllos que ocurren durante el desarrollo embrionario: activación y migración de las células progenitoras, adhesión celular a la MEC, proliferación de las células del mesénquima, diferenciación del cartilago, hipertrofia, mineralización del mismo y subsecuente formación del hueso (Hall, 1983). Los dos primeros factores inductores de cartilago, fueron aislados de hueso desmineralizado (Seyedin y col, 1985), los cuales se denominan como factores de crecimiento transformante β -1 y β -2. Se han caracterizado otros TGF- β (TGF- β 3 a 5), pero se desconoce sus funciones y participación en la condrogénesis.

En los trabajos hechos *in vitro*, basados en los cultivos de micromasa de células aisladas de las extremidades de pollo en los estados 22 y 23 del desarrollo, el TGF- β induce la condrogénesis al incrementar la síntesis de proteoglicanos y la expresión de colágena tipo II (Kulyk y col, 1989; Schofield y Wolpert, 1990), además de la estimulación de la formación de sitios de condensación y expresión de fibronectina (Leonard y col, 1991). Por el contrario, en los estados 24 y 25, el TGF- β inhibe la síntesis de los proteoglicanos (Chen y col, 1991).

Entonces, el TGF- β tiene efectos estimuladores e inhibidores en la diferenciación del cartilago *in vitro*, pero estos efectos dependen del estado de diferenciación de las células.

Las otras moléculas aisladas y purificadas del hueso, que inducen la formación de cartilago y de hueso *in vivo*, son las denominadas proteínas morfogénicas de hueso (BMP; Urist y col, 1983). Actualmente, se han reportado 7 tipos de BMP, las cuales pertenecen a la superfamilia del TGF- β , excepto la BMP-1. Las BMP 1(o BMP7), 2A, 2B(o BMP 4), 3, 5 y 6 tienen actividad para inducir cartilago y hueso. Además, muchas de las BMP participan en el mantenimiento y diferenciación terminal de los fenotipos condrogénicos y osteogénicos. Esto ha sido demostrado por la adición de varias BMP a cultivos celulares. En células condrogénicas de las extremidades embrionarias del pollo de los estados 24 y 25 del desarrollo, las BMP-2B y BMP-3 (osteogenina) estimularon la formación de cartilago al promover la síntesis de proteoglicanos y colágena tipo II (Carrington y col, 1991; Chen y col, 1991). La estimulación y el mantenimiento del fenotipo condrocítico fue estudiado en cultivos de micromasa y de explantes de condrocitos fetales de rata y condrocitos articulares de conejo (Vukicevic y col, 1989). Aquí, la BMP-3 y el TGF- β estimularon la proliferación y diferenciación de estas células.

También, se ha sugerido que el factor de crecimiento semejante a la insulina I y II (IGF-I y -II), juegan un papel importante en el desarrollo del cartilago. Por ejemplo, el IGF-I estimula la duplicación celular y la producción de colágena en cultivos de condrocitos derivados de esternón de pollo (Böhme y col, 1992).

Por otro lado, una hormona que está estrechamente relacionada con la condrogénesis es la hormona de crecimiento (GH). La GH se encuentra en células precondrogénicas situadas en el pericondrio *in vivo*. También se muestra que la GH estimula directamente la proliferación de los condrocitos (Madsen y col, 1983). Esto llevó a sugerir a Green y col, (1985), la teoría del efecto dual de la hormona de crecimiento. En esta teoría, se sugiere que la GH induce por un lado, la proliferación de las células precondrogénicas y por el otro, interviene en la regulación de la síntesis del IGF.

Cabe mencionar, que de todos los factores inductores de la condrogénesis (TGF- β , las BMP, IGF y la GH), sólo el TGF- β , se sabe que induce una gran cantidad de las moléculas de la MEC, como lo son la FN, la colágena tipo I, el hialuronato, proteinglicanos, y la tenascina (Massagué, 1990). Además, el TGF- β también induce la expresión de los receptores para proteínas de la MEC, como lo son las integrinas (Massagué, 1990). Sin embargo, para la diferenciación del cartilago, sólo se ha demostrado que el TGF- β induce la síntesis de la FN (Leonard y col, 1991).

ANTECEDENTES

Los procesos de la diferenciación celular en muchos tipos celulares, están mediados por las interacciones célula-célula, célula-MEC, así como mediante diversos factores solubles. Estos procesos de la diferenciación celular del cartilago, pueden ser estudiados en el desarrollo *in vivo* de las extremidades embrionarias. Sin embargo, dado que el desarrollo de estas estructuras es complejo, aunado a que en éstas existe una heterogeneidad de tipos celulares, resulta difícil seguir únicamente la diferenciación de las poblaciones condrogénicas. Otra alternativa, es hacer este tipo de estudios a partir de líneas celulares ya establecidas, pero hasta el momento no se han establecido líneas de células precursoras del cartilago. Entonces, una estrategia desarrollada en nuestro laboratorio, fue trabajar con poblaciones condrocíticas, obtenidas, por ejemplo de estermones de rata, bajo condiciones experimentales que regulan la diferenciación de los condrocitos hasta llevarlos a etapas tempranas.

Así tenemos que los condrocitos diferenciados fenotípicamente, pueden ser inhibidos *in vitro* a seguir su diferenciación terminal por ciertas moléculas de la MEC, como la fibronectina (West y col, 1979), y por ciertos factores solubles tales como el ácido retinoico (un análogo de la vitamina A) (Benya y col, 1988). Se sabe que los condrocitos sembrados sobre sustratos de fibronectina celular o en presencia del ácido retinoico, dejan de expresar la colágena tipo II, típica de cartilago y expresan la colágena tipo I, característica de etapas precondrogénicas (Swalla y Solursh, 1984; Benya y col, 1988). Además, tanto el ácido retinoico como la fibronectina, parecen aumentar la adhesión y la extensión de las células y provocan cambios morfológicos en éstas, de manera que de ser poligonales adquieren una forma fibroblastoide, al modificarse las interacciones célula-célula y célula-MEC.

Estos cambios de las expresiones genética y fenotípica, sugieren que el ácido retinoico y la fibronectina intervienen en el programa de la diferenciación de los condrocitos, lo que ha llevado a varios autores a mencionar que estas moléculas "desdiferencian" a las células. Asimismo, los resultados obtenidos en nuestro laboratorio han demostrado que los condrocitos tratados *in vitro* con el ácido retinoico, la fibronectina o ambos, regresan a estados más tempranos de la diferenciación, pero posteriores al compromiso del linaje condrocítico (Chimal y col, manuscrito en preparación).

Con base en esto, se plantea como hipótesis, determinar si los condrocitos tratados con el ácido retinoico reexpresan el fenotipo condrogénico de manera similar como sucede *in vivo*, es decir, expresan los tres estados de la condrogénesis: mesénquima laxo, blastema condrogénico y cartilago fenotípicamente diferenciado.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue caracterizar la reexpresión de la condrogénesis *in vitro* y compararla con el desarrollo del cartilago en las extremidades *in vivo*.

Los objetivos particulares fueron los siguientes:

- 1) Determinar los tipos de glicosaminoglicanos sintetizados durante la reexpresión de la condrogénesis *in vitro*.
- 2) Determinar los tipos de glicosaminoglicanos sintetizados *in situ* en las extremidades embrionarias de diferentes estados del desarrollo embrionario.
- 3) Comparar los tipos de glicosaminoglicanos sintetizado *in situ* con los que se sintetizan durante la condrogénesis *in vitro*.
- 4) Determinar el cambio de expresión del tipo de colágenas durante la reexpresión de la condrogénesis *in vitro*.

MATERIALES

Todos los reactivos químicos y biológicos empleados en este trabajo se obtuvieron de diferentes fuentes comerciales. El medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco-Vögt (DMEM), el suero de bovino fetal (SBF), el ácido trans-retinoico, la tripsina tipo I, la colágenasa tipo II, la heparinasa III, las condroitin 4 y 6 sulfatasa, la condroitinasa ABC, el SDS (lauril sulfato de sodio), y la albúmina sérica de bovino se compraron en Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA). El medio de cultivo Ham F-10 libre de sulfatos se adquirió en In Vitro. El TRIS (tris (hidroximetil aminometano), la N, N, N', N'-tetrametilendiamina (TEMED), la N, N'-metilen-bis acrilamida, acrilamida y el persulfato de amonio fueron obtenidos de los laboratorios Bio-Rad (Richmond, CA, USA). La Prolina-C¹⁴ (uniformemente marcada) con una actividad específica de 286.0 mCi/mM fue de New England Nuclear Corp. El Na₂S³⁵O₄ con una actividad específica de 1 mCi/mM se compró en Amersham Life Sciences products. Las ratas de la cepa Wistar y las ratonas con tapón positivo de la cepa BALB/C fueron proporcionados por los bioterios del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Los anticuerpos policlonales dirigidos contra la colágena tipo I de rata que no cruzan con la colágena tipo II y los anticuerpos contra la colágena tipo II de bovino que no cruzan con la colágena tipo I, así como un suero que contenía anticuerpos IgG-peroxidasa fueron comprados en Chemicon.

METODOS

A) CULTIVO CELULAR EN MONOCAPA.

Los condrocitos se aislaron a partir de esternones de ratas de 35 días de nacidas. Los esternones se digirieron con tripsina tipo I preparada en PBS al 0.25% (pH 7.4), durante 30 minutos a 37°C. En seguida, se agregó colagenasa tipo II preparada en medio de Eagle modificado por Dulbeco (DMEM) al 0.25%, se incubó a 37°C durante 4 horas. Las células obtenidas se cultivaron a densidades de 10,000 células/cm², en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero de bovino fetal (SBF) y en presencia de 10 µM/ml de ácido retinoico (AR) preparado en etanol (en condiciones de oscuridad). Las células se mantuvieron a 37°C en un incubador NAPCO, con una atmósfera de aire-CO₂, hasta alcanzar la densidad de confluencia. Se hicieron cambios de medio cada 3 días.

B) CULTIVO CELULAR EN MICROMASA.

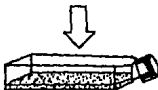
A partir de las células tratadas con el AR, la FN o ambos, las monocapas se levantaron y se sembraron en condiciones de micromasa de acuerdo a Ahrens y col (1977). Las células se resuspendieron en 200,000 células/ml de medio de cultivo con SBF y se tomaron alícuotas de 10 µl con una micropipeta (Eppendorf) y se colocaron en el centro de cada pozo de placas Costar de 48 pozos (Fig. 1) durante 40 a 60 minutos. Posteriormente se adicionó el medio DMEM en presencia del SBF.



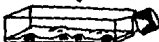
**AISLAMIENTO DE ESTERNON
DE RATAS (36 DIAS)**



**DIGESTION CON TRIPSINA I
Y COLAGENASA II
A 37° DURANTE 4 A 5 HRS.**



**CULTIVO CELULAR EN MONOCAPA
 1×10^4 CELULAS/ cm^2
CON $10 \mu M$ / ml DE AR, 37° C,
5% CO_2**



**OBTENCION DE CULTIVOS CONFLU-
ENTES. TRIPSINIZACION**



**CULTIVOS EN MICROMASA
 2×10^5 CELULAS / $10 \mu l$
30 MINUTOS, 37° C**



**MICROMASAS EN DMEM SUPLEMEN-
TADO CON 10% SBF**

**FIGURA 1. CULTIVOS EN MONOCAPA
Y CULTIVOS EN MICROMASA**

C) EVALUACION DE LA PROLIFERACION CELULAR.

A partir de los condrocitos tratados con el AR y nuevamente sembrados en condiciones de micromasa durante diferentes días de cultivo, se evaluó el número celular al triplicar las micromasas y contar en una cámara de Neubauer el número de células por micromasa.

D) AISLAMIENTO DE LAS EXTREMIDADES EMBRIONARIAS.

Los primordios de las extremidades embrionarias se aislaron por disección de embriones de ratón que correspondieron al estadios del desarrollo 18, 19, 20, 21 y 22.

Las extremidades se procesaron para el marcaje con $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$ (50 $\mu\text{Ci/ml}$) como se menciona en Matsui y col (1986), para determinar el tipo de glicosaminoglicanos sintetizados *in situ*.

E) ANALISIS DE LOS GLICOSAMINOGLICANOS SINTETIZADOS *in vitro*.

Para determinar la biosíntesis de los GAG, los cultivos en confluencia tratados con el AR y las micromasas de diferentes días de cultivo fueron marcados radiactivamente con $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$ (5 $\mu\text{Ci/ml}$) en medio de cultivo Ham F-10 libre de sulfatos, a 37°C durante 6 horas. Posteriormente, el medio se retiró y se lavó dos veces con medio fresco. Para la extracción y purificación de los (S^{35}O_4)-GAG, los cultivos se procesaron de acuerdo Oohira y col (1977), sólo con una modificación para precipitar los GAG, que se llevó a cabo como menciona Kao y col (1990). La radiactividad incorporada se consideró como cuentas

por minuto (cpm) y se midió en un contador de centelleo líquido marca Beckman, modelo LS 18001.

Los ($S^{35}O_4$)-GAG purificados se resuspendieron en agua destilada (5,000 cpm/10 μ l) y se degradaron selectivamente con enzimas específicas.

DIGESTION CON HEPARINASA III. La enzima se preparó a la concentración de 0.1 mg/ml en 0.1 M de una solución amortiguadora de acetato de sodio a pH 7.0. La reacción se llevó a cabo con 10 μ l de la muestra y 30 μ l de la enzima, a 37°C durante 15 horas. El heparán sulfato es degradado selectivamente por esta enzima.

DIGESTION CON LAS 4-SULFATASA Y 6-SULFATASA DE CONDROITINA. Cada enzima se preparó a 2.5 U/ml en 0.1M de un amortiguador de TRIS-HCl a pH 7.3. La reacción fue con 10 μ l de la muestra y 30 μ l de la enzima. Primero se usó la condroitin 6-sulfatasa. Ambas enzimas se usaron a 37°C durante 24 horas.

DIGESTION CON CONDROITINASA ABC. Esta enzima se preparó a 2.5 U/ml en un amortiguador de TRIS-HCl a pH 8.0. Se mezcló 10 μ l de cada muestra con 10 μ l de la enzima, la reacción fue a 37°C por 1 hora y 30 minutos. Esta enzima se utilizó para degradar el dermatán sulfato.

Después de cada degradación, los GAG resistentes a cada enzima se precipitaron como se mencionó anteriormente y los GAG liberados en el sobrenadante fueron evaluados al medir la radiactividad en cpm.

F) MARCAJE CON PROLINA-C¹⁴.

Para determinar la biosíntesis de la colágena sintetizada por los condrocitos tratados con AR, así como las micromasas de diferentes días de cultivo, se marcaron con Pro-C¹⁴ (1.5 µCi/ml) en DMEM no suplementado de acuerdo a Benya y col. (1978), pero sin utilizar ácido ascórbico y β-aminopropionitrilo. La colágena radiactiva tanto del medio como de la capa celular fue purificada como previamente se describió (Benya y col, 1977). Este material fue utilizado para electroforesis. El porcentaje de biosíntesis de colágena fue calculado de acuerdo a la fórmula de Diegelman y Peterkofsky (1972), al considerar los valores de radiactividad incorporada como cpm.

G) ELECTROFORESIS.

Las muestras obtenidas de la colágena radiactiva se corrieron en geles de poliacrilamida al 6% en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS), de acuerdo a Laemmli (1970).

H) INMUNOTRANSFERENCIA.

Las proteínas separadas en geles de SDS-PAGE, se transfirieron a papel de nitrocelulosa (0.45µ) durante 3 a 4 horas a voltaje constante (230 v). El papel de nitrocelulosa que contenía las proteínas tranferidas se bloqueó previamente con albúmina sérica de bovino (ASB) toda una noche a 4°C. Posteriormente, el papel se incubó con un anticuerpo policlonal para colágena tipo I y uno para colágena tipo II por 60 minutos a temperatura ambiente. El papel se lavó como menciona Burnette (1981), antes de incubar con el anticuerpo secundario anti IgG acoplado con peroxidasa, el cual se incubó como se hizo en el caso del anticuerpo primario, y se reveló con ortocloronaftol (0.5 mg/ml) y H202 (Burnette, 1981).

RESULTADOS

REGULACION *in vitro* DE LA DIFERENCIACION CELULAR DEL CARTILAGO POR EL ACIDO RETINOICO.

Existen cambios en el programa de la diferenciación de los condrocitos aislados de esternones de rata cuando se siembran a bajas densidades (1×10^4 células/cm²) y en presencia del ácido retinoico. Estas condiciones de cultivo inhiben la diferenciación del cartilago al bloquear la expresión de moléculas específicas, como lo es la colágena tipo II e inducir la síntesis de la colágena tipo I (característica de etapas precondrogénicas) (Figura 2). Además, las células pierden la morfología poligonal característica de los condrocitos en cultivo (Fig. 3a) y adquieren una forma fibroblastoide (Fig. 3b). Estos cambios en las expresiones genotípica y fenotípica, pueden ser nuevamente promovidas, al sembrar las células en condiciones de micromasa, esto es, condiciones que favorecen la condrogénesis *per se* (Fig. 4).

Por lo tanto, para evaluar la reexpresión de la condrogénesis *in vitro*, se analizó la expresión diferencial de los glicosaminoglicanos (GAG) y de las proteínas colagénicas.

SINTESIS DE LOS GLICOSAMINOGLICANOS *in vitro* E *in vivo*.

La síntesis de los GAG sulfatados fue evaluada por el marcaje metabólico con el $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$ en condrocitos cultivados en monocapa en bajas densidades en presencia del AR. También se marcó durante la reexpresión de la condrogénesis a diferentes días de cultivo de las células previamente tratadas con el retinoide y posteriormente cultivadas en condiciones de micromasa en medio de cultivo suplementado con 10% de SBF.

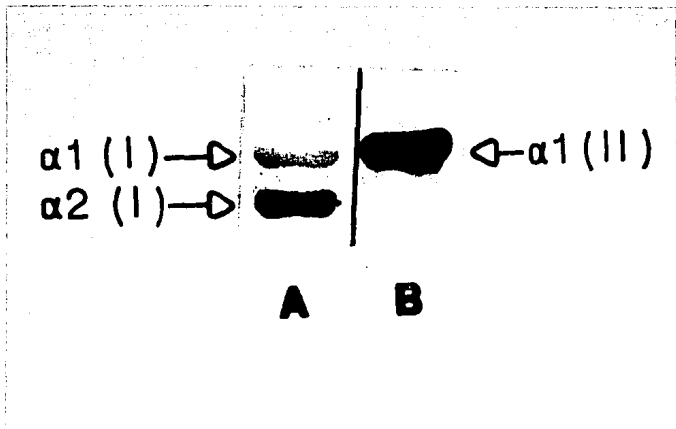


FIGURA 2. Se muestra una inmunotransferencia para detectar el tipo de colágena sintetizada. En A se observa la presencia de la colágena tipo I en los condrocitos que fueron tratados con el AR, sembrados a una densidad de 1×10^4 células/cm². En B, se observa la presencia de la colágena tipo II, típica de los condrocitos cultivados en altas densidades sin el retinoide.

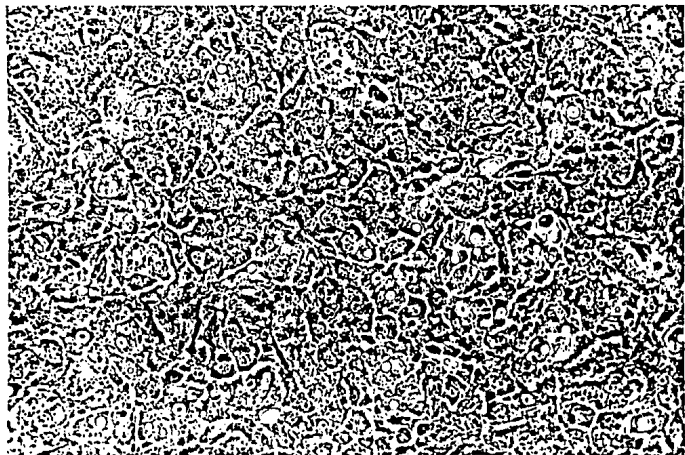


FIGURA 3a. Se muestra la morfología poligonal característica de los condrocitos cultivados *in vitro*. (Barra=10 μ m).

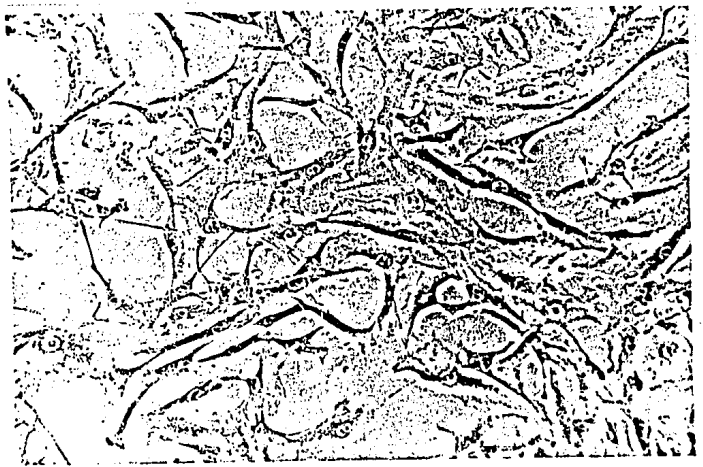


FIGURA 3b. Se muestra el efecto del AR sobre los condrocitos cultivados *in vitro*, en la que se observa el cambio de morfología poligonal a fibroblastoide. (Barra=10 μ m).

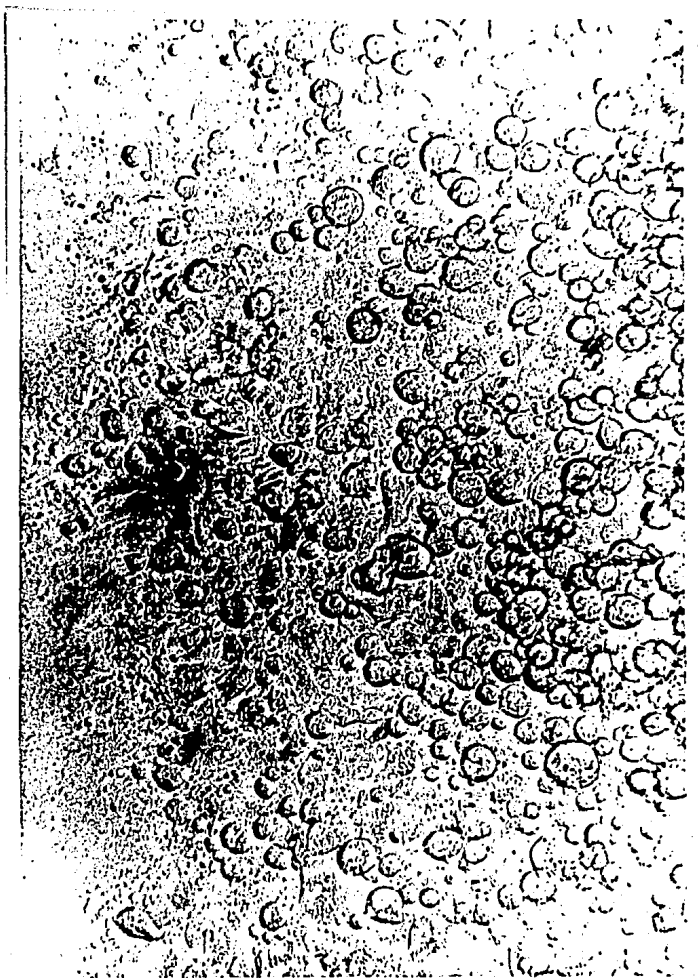


FIGURA 4. Se muestran los condrocitos previamente tratados con el AR y posteriormente sembrados en condiciones de micromasa. (Barra=10 μ m).

La figura 5 muestra que los condrocitos que crecieron en la presencia del AR presentaron baja incorporación de $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$ en los GAG (día cero). Por otra parte, durante la reexpresión de la condrogénesis, los condrocitos incrementaron la incorporación de la marca radiactiva comparado con los cultivos en presencia del AR y fue en el día 5 de cultivo cuando hubo un incremento de hasta 3 veces por arriba de los expresado en los otros días de cultivo. Sin embargo, estos resultados sólo muestran la síntesis de GAG totales que se llevó a cabo, pero no que tipo de GAG se sintetizan.

Por lo tanto, para evaluar el tipo de GAG marcados metabólicamente se hicieron degradaciones con enzimas específicas. En la tabla I se muestran los datos para cada una de las actividades enzimáticas; con estos datos se determinó el tiempo necesario para degradar cada tipo de los GAG sulfatados.

Los cultivos tratados con el AR, sintetizaron en mayor proporción el sulfato de heparán (Fig. 6). En lo que se refiere a la reexpresión de la condrogénesis *in vitro*, los los GAG del tipo heparán sulfato fueron los más abundantes en todos los días de cultivo (Fig. 6) y fue en el día 5 de cultivo donde el incremento del sulfato de heparan fue muy marcado y corresponde al día en que existió la mayor síntesis de los GAG (Fig. 5). La figura 6, también muestra que el segundo grupo de los GAG más abundantes, fueron los 6-sulfato de condroitina. La disminución del sulfato de heparán y del 6-sulfato de condroitina coincidió con el incremento del 4-sulfato de condroitina (30.76%, día 11). Mientras tanto, los otros tipos de GAG se sintetizaron de manera más homogénea durante la reexpresión de la condrogénesis.

INCORPORACION DE $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$

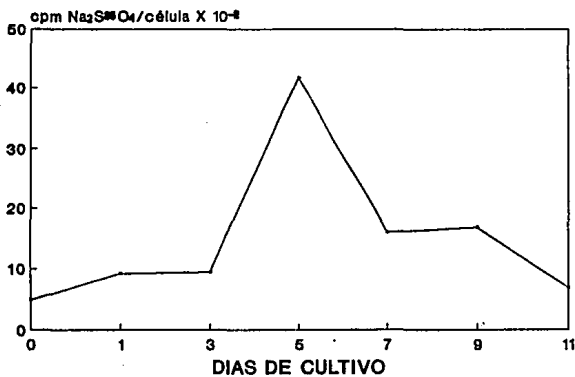


FIGURA 5. Se muestra la síntesis de los glicosaminoglicanos, determinada por la incorporación de $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$. El día cero, corresponde a las células cultivadas en monocapa en presencia del AR. Los días 1 a 11 de cultivo son células en condiciones de micromasa previamente tratadas con el retinoide.

TABLA I

**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA DETERMINAR EL TIEMPO
DE DEGRADACION DE LOS GLICOSAMINOGLICANOS.**

SUSTRATO	ENZIMA	ABSORBENCIA A 678 nm		
		1 h	2h	15 h
4 sulfato de condroitina	4 sulfatasa de condroitina	>0.75	0.75	0.098
6 sulfato de condroitina	6 sulfatasa de condroitina	>0.75	0.75	0.085
Sulfato de heparán	Heparinasa III	0.73	0.72	0.071
Dermatan sulfato	Condroitinasa ABC	0.052	0.001	-----

La actividad enzimática de cada una de las enzimas usadas para las degradaciones de los GAG, se determinaron al incubar sustratos específicos con las enzimas respectivas, a diferentes tiempos. Las mezclas se tiñeron con el azul de alciano al 0.2%, el cual tiñe a los GAG no degradados, y se midieron por espectrofotometría a 678 nm. En todos los casos donde no se adicionó alguna enzima la absorción fue de 0.77.

SINTESIS DE LOS GAG "in vitro" REEXPRESION DE LA CONDRÓGENESIS

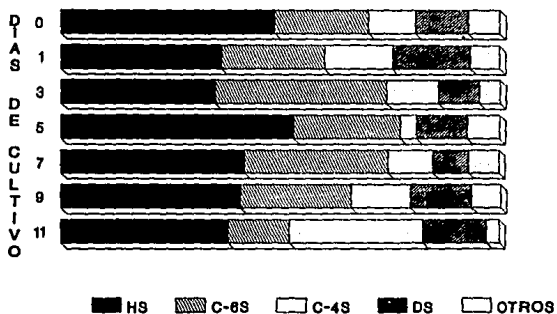


FIGURA 6. Se muestra las cantidades sintetizadas de los GAG marcados radiactivamente con $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$ durante la reexpresión de la condrogénesis a diferentes días de cultivo. Los (S^{35}) -GAG se degradaron con enzimas específicas. Los productos de cada degradación se cuantificaron al medir la radiactividad incorporada. Los porcentajes se determinaron para cada muestra con base en la suma total de la radiactividad dada en cpm. Los (S^{35}) -GAG denominados como OTROS, fueron resistentes a las enzimas probadas, por lo que debieron constituir principalmente queratan sulfato, además de disacáridos sobresulfatados y/o complejos de glicosaminoglicanos.

Se sabe que los proteoglicanos ricos en sulfato de heparán existen en la membrana celular y en la MEC. La expresión de estos proteoglicanos se encuentra sujeta a un control temporal y espacial durante el desarrollo embrionario. Con base en ésto decidimos investigar la expresión diferencial de los GAG sintetizados *in situ* en las extremidades embrionarias del ratón a diferentes estados del desarrollo (19 a 22), para correlacionar dicha expresión con los resultados obtenidos *in vitro*.

Así, tenemos que en la figura 7 desde el estado el 19 del desarrollo del ratón, en las extremidades ya pueden observarse la zona de condensación en la región más proximal donde habría de formarse el húmero (en la extremidad anterior) o el fémur (en la extremidad posterior) y en el estado 20 del desarrollo se observan las condensaciones más distales (por ejemplo, las zonas correspondientes a los dígitos). En estos estados del desarrollo 19 y 20, las proporciones relativas del sulfato de heparán corresponden al mayor porcentaje del total de los GAG sintetizados *in situ* por las extremidades embrionarias, 63.2% y 62.2% respectivamente (Fig. 8). En el estado 21 del desarrollo, la cantidad del 4 sulfato de condroitina empezó a incrementarse y ésto coincide con una disminución del sulfato de heparan. Asimismo, en las extremidades embrionarias en el estado 22A del desarrollo se observó la mayor proporción del 4 sulfato de condroitina.

Estos resultados mostraron una correlación con la expresión del tipo de GAG sintetizados *in vitro* e *in vivo*.

Por otro lado, dado que el cambio de expresión del tipo de colágena también es un buen parámetro para medir la reexpresión de la condrogénesis, dicha expresión fue evaluada durante el desarrollo de este trabajo.

a. stage 15

b. stage 16

c. stage 18

d. stage 19

e. stage 20

f. mid stage 21

FIGURA 7. Fotografía de los primordios de las extremidades embrionarias del ratón en distintos estadios del desarrollo, tomada de Owens y Solursh (1981). Las secciones de las extremidades fueron teñidas con el azul de alciano, para teñir la matriz del cartilago, y con hematoxilina, para teñir agregaciones celulares que aún no depositan matriz de cartilago. (a) Una extremidad en el estadio 15 de desarrollo (9.5 d.p.c.). El mesénquima es homogéneo. (b) Una extremidad del estadio 16 (10 d.p.c.). El mesénquima también se observa homogéneo. (c) Una extremidad del estadio 18 (11 d.p.c.) Las condensaciones más proximales, ahora son aparentes (flecha), pero sólo se tiñe con hematoxilina. (d*) En el estadio 19 del desarrollo, (11.5 d.p.c.). Los tres grupos de condensaciones celulares la región proximal y hacia el centro del primordio de la extremidad. Estas condensaciones se tiñen con el azul de alciano. Las áreas periféricas consisten de una población morfológicamente más o menos homogénea de células mesenquimáticas, que se encuentran rodeadas por una capa delgada de ectodermo. (e*) En el estadio 20 (12 d.p.c.), una porción del primordio del húmero es observado en esta sección (flecha). En las regiones más distales se inician las condensaciones. (f*) Una extremidad en el estadio 21 (13 d.p.c.). El cartilago está presente en todos los promordios esqueléticos, incluso en las regiones de los presuntos dígitos. La flecha indica células musculares, las cuales sólo en este estado empiezan a ser evidentes.

*Estadios del desarrollo que se tomaron para el trabajo de esta tesis.

SINTESIS DE LOS GAG "in situ" EN DISTINTOS ESTADOS DEL DESARROLLO

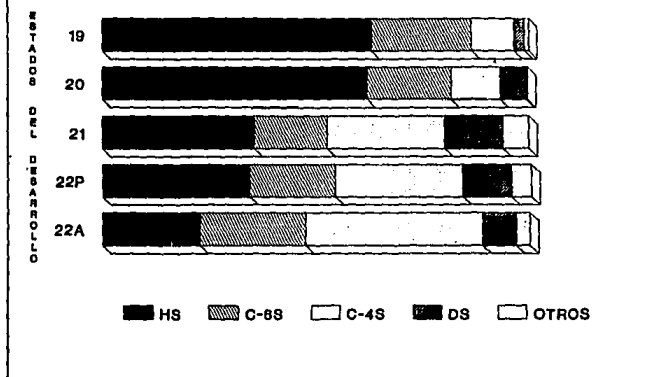


FIGURA 8. Se representan los GAG metabólicamente marcados con $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$ en las extremidades embrionarias del ratón de diferentes estadios del desarrollo 19, 20, 21, 22 Posterior (22P) y 22 Anterior (22A). Los tipos de GAG sintetizados se determinaron por el uso de degradaciones enzimáticas específicas como se hizo para el estudio de la biosíntesis de los (S^{35}) -GAG *in vitro*.

SINTESIS DE COLAGENA EN LA REEXPRESION DE LA CONDRÓGENESIS *in vitro*.

La capacidad en la biosíntesis de los cultivos tratados con el AR y de los cultivos de condrocitos sembrados en condiciones de micromasa, se midió mediante un marcaje metabólico con Prolina- C^{14} . La incorporación de la radiactividad precipitable con el ácido tricloroacético (TCA), fue considerada como la síntesis total de proteínas (proteínas colagénicas y no colagénicas), además de la prolina transformada en hidroxiprolina, pareció no variar significativamente en las células durante el tratamiento con el AR y durante la reexpresión de la condrogénesis a excepción del día 5 de cultivo, donde se observa la mayor incorporación del isótopo (Fig. 9). Sin embargo, para determinar las proporciones de colágena sintetizada, se calculó el porcentaje de la biosíntesis de colágena. El porcentaje de colágena sintetizada durante el cultivo en presencia del retinoide fue del 15.6%, este porcentaje fue similar a aquellos que correspondieron a los cultivos en micromasa en los primeros días de cultivo (1 a 3 días) y en los días 7 a 11 de cultivo, lo cual podría indicar que el AR no afecta la síntesis de colágena (Fig. 10). Por el contrario, en el día 5 de cultivo se observó un incremento del 35.5% de la colágena metabólicamente marcada y al día 7 de cultivo disminuyó marcadamente el porcentaje de colágena del total de proteínas sintetizadas (4.5%), (Fig. 10).

Estos cambios en síntesis de proteínas colagénicas nos llevaron a determinar, si ésto se debía a un cambio en la expresión del tipo de colágena durante la reexpresión de la condrogénesis.

SINTESIS DE COLAGENA Y PROTEINAS TOTALES

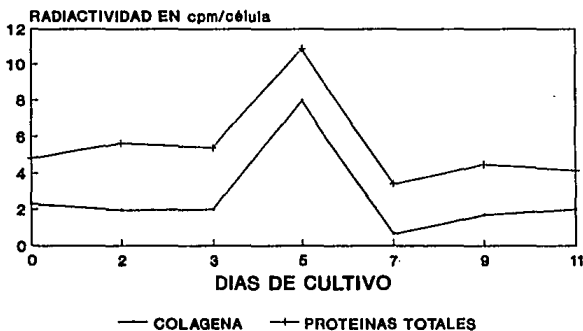


FIGURA 9. Mediante un marcaje metabólico con Prolina- C^{14} , se muestra la síntesis de proteínas totales y la síntesis de proteína colagénicas. El día cero corresponde a los cultivos en monocapa tratados con el AR. Los días 1-11 de cultivo representan los cultivos en micromasa.

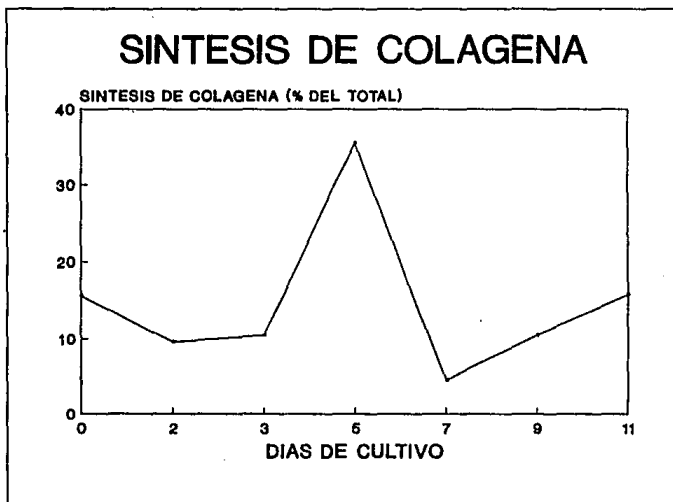


FIGURA 10. Representación del porcentaje de colágena- C^{14} sintetizada en relación al contenido total de proteínas. Los porcentajes se calcularon de acuerdo a la ecuación de Diegelman y Peterkofsky (1972).

EXPRESION DE LA COLAGENA TIPO I Y DE LA COLAGENA TIPO II.

La expresión de la colágena tipo I y la colágena tipo II está estrechamente regulada durante los procesos de la condrogénesis. La colágena tipo I es una proteína heterotrímera constituida por dos cadenas $\alpha 1(I)$ y una cadena $\alpha 2(I)$; la colágena tipo II está constituida por tres cadenas $\alpha 1(II)$. La expresión de los genes que codifican para estos dos tipos de proteínas se ve regulada, *in vitro*, por ciertos factores solubles, como lo es el AR.

Los extractos celulares de los cultivos tratados con el AR y los cultivos en micromasa marcados metabólicamente con Pro-C¹⁴, se corrieron en geles de SDS-PAGE. Estos geles se revelaron por autoradiografía durante 17 días. La autoradiografía de la figura 11 revela, como ya se mencionó, que los condrocitos tratados con el AR dejan de expresar la colágena tipo II para expresar la colágena tipo I, como puede observarse por la presencia de las cadenas $\alpha 1(I)$ y $\alpha 2(I)$. Durante la reexpresión de la condrogénesis a diferentes días de cultivo, la autoradiografía muestra que las cadenas $\alpha 1(I)$ y $\alpha 2(I)$ continuaron su expresión después del tratamiento con el retinoide hasta el día 2 de cultivo. Esta expresión parece ser que desapareció desde el día 3 hasta el día 8 de cultivo y nuevamente se observaron dichas cadenas de la colágena tipo I en los días 9 y 11 de cultivo. Por el contrario, las cadenas $\alpha 1(II)$ constituyentes de la colágena tipo II, pudieron corresponder a los días 3 a 7 de cultivo. Sin embargo, debido a que las cadenas $\alpha 1(I)$ y $\alpha 1(II)$ corren en la misma posición, la autoradiografía no muestra con claridad si las cadenas $\alpha 1(II)$ se expresan en otros días de cultivo. Por ello, se recurrió a un análisis por inmunotransferencia.

Así tenemos que, por medio del uso de anticuerpos específicos dirigidos contra las colágenas tipo I y II, se pudo ver por un análisis de inmunotransferencia, que el AR si interviene en la regulación de la diferenciación condrocítica (Figs. 2 y 12), es decir, se ha

comprobado que el AR bloquea la síntesis de la colágena tipo II, característica del cartilago fenotípicamente diferenciado e induce la síntesis de la colágena tipo I, típica de etapas precondrogénicas, considerado aquí como el día cero. En tanto, los condrocitos pretratados con el AR y posteriormente cultivados en condiciones de micromasa a diferentes días de cultivo, mantienen la expresión de la colágena tipo I en los primeros días de cultivo (1 y 2); su expresión desaparece en los días 3 a 5, para nuevamente expresarse a partir del día 7 (Fig. 12).

Finalmente, durante los cultivos en micromasa, los condrocitos reexpresan la síntesis de la colágena tipo II a partir del día 3 de cultivo y su expresión se mantuvo hasta el día 11 de cultivo (Fig. 13).

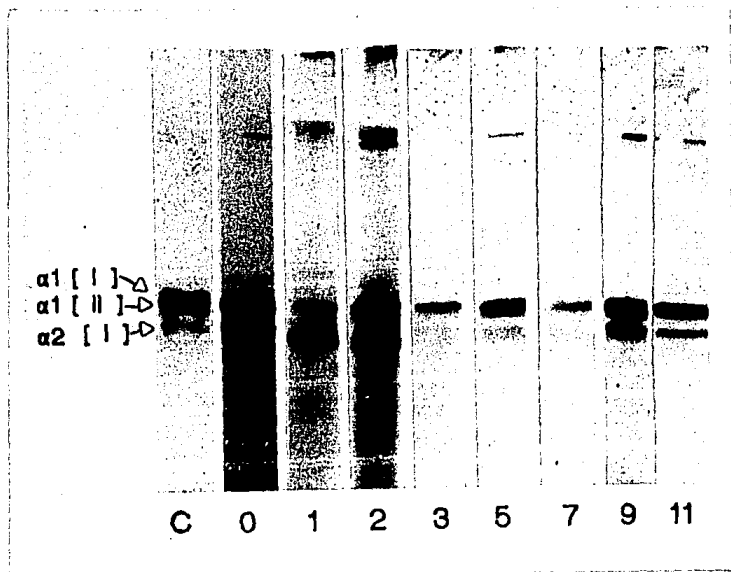


FIGURA 11. Autoradiografía de proteínas separadas en geles de SDS-PAGE 6%, a una exposición de 17 días a -70°C . (C) Colágena- H^3 tipo I de bovino ($2\alpha_1(\text{I});1\alpha_2(\text{I})$). (0) Condrocitos en monocapa tratados con el AR, sintetizaron Colágena- C^{14} tipo I. (1-11) Condrocitos previamente tratados con el AR y sembrados en micromasa. Expresión de colágena tipo I en los días 1-3; 7-11. Síntesis de colágena tipo II ($3\alpha_1(\text{II})$) en los días 3-11.

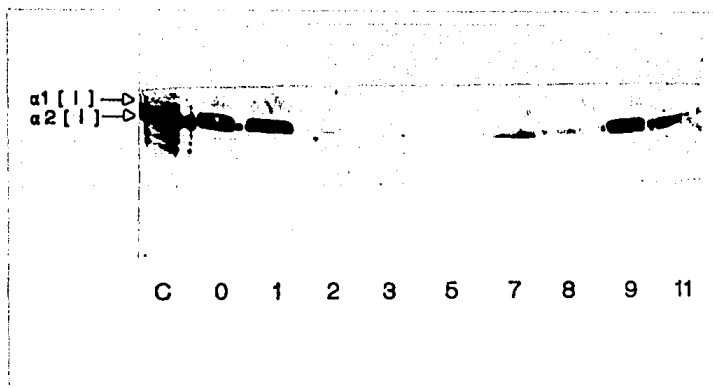


FIGURA 12. Inmunotransferencia de las proteínas separadas en geles de SDS-PAGE 6%. Detección con un anticuerpo contra colágena tipo I, el cual reconoce con mayor preferencia la cadena $\alpha 2(I)$. (C) Colágena tipo I de cola de rata. (0) Condrocitos tratados con el AR. (1 a 11) Condrocitos en condiciones de micromasa. Expresión de la colágena tipo I, en 1 y 7 a 11 días de cultivo.

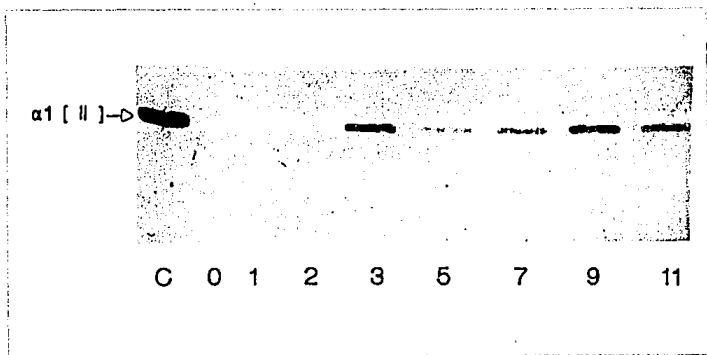


FIGURA 13. Inmunotransferencia de las proteínas separadas en geles de SDS-PAGE 6%. Detección con un anticuerpo contra colágena tipo II. (C) Colágena tipo II aislada de esternón de rata. (0) Condrocitos tratados con el AR, no sintetizan colágena tipo II. (1 a 11) Condrocitos en condiciones de micromasa. Reexpresión de colágena tipo II desde el día 3 de cultivo.

DISCUSION

Los resultados de este trabajo sugieren que en nuestro sistema *in vitro* pueden ser reconocidas las tres etapas de la condrogénesis: mesénquima laxo, blastema condrogénico y cartilago fenotípicamente diferenciado. Los condrocitos cultivados *in vitro* en bajas densidades y en presencia del AR, no sintetizan colágena tipo II, por el contrario, expresan colágena tipo I. También, disminuyen la síntesis de los GAG (Shapiro y Poon, 1976). Además, estas células adquieren una morfología fibroblastoide. Recientemente, se ha establecido que los condrocitos tratados con el AR se encuentran en etapas posteriores al compromiso de su linaje de diferenciación (Chimal y col, manuscrito en preparación). Probablemente, se encuentran en la etapa de mesénquima laxo. Durante la reexpresión de la condrogénesis *in vitro*, alrededor del día 5 de cultivo, las células se encuentran en una etapa semejante a la del blastema condrogénico, debido a que en este día de cultivo existe la mayor proporción del sulfato de heparán. Los proteinglicanos ricos en sulfato de heparán se sintetizan mayoritariamente en los estados tempranos del desarrollo del cartilago, especialmente en el mesénquima de aquellas áreas que experimentan condensaciones celulares, como es en el caso de las extremidades embrionarias del ratón (estados 19 a 21 del desarrollo). Estos datos coinciden con lo que se ha reportado por Frenz (1989b) y Matsui y col (1986). Asimismo, el análisis del cambio de la expresión de la colágena muestra, por un lado, que ésta se incrementa en su síntesis en el día 5 de cultivo. Por otro lado, la reexpresión de la colágena tipo II ocurre al día 3 de cultivo y se mantiene hasta el momento en que se evaluó este trabajo (día 11). Como ya se mencionó, el sulfato de heparán es un componente importante de la MEC en la etapa del blastema condrogénico. Mientras, que la colágena tipo II aunque es característica del cartilago diferenciado, ésta inicia su expresión en la etapa del blastema condrogénico. En este trabajo la colágena tipo II se expresa antes que ocurra el incremento significativo del sulfato de heparán. Esto podría significar que el

control de la expresión de ambas moléculas sucede de manera independiente. Otra alternativa, se relaciona con las dos isoformas que presenta la colágena tipo II (colágena tipo IIA y colágena tipo IIB) en el desarrollo del cartilago. Las células del pericondrio, células precondrogénicas, sintetizan la colágena tipo IIA y las células en fase de condensación expresan la colágena tipo IIB (Jim y col, 1993). Esta relación, nos lleva a sugerir que en el día 3 de cultivo se expresaría la colágena tipo IIA, mientras que al día cinco de cultivo, donde existe la mayor síntesis de colágena, se presentarían tanto la colágena tipo IIA como la colágena tipo IIB. Durante los días de cultivo subsecuentes, tal vez desaparece la colágena tipo IIA, en tanto se mantiene la expresión de la colágena tipo IIB. La identificación de estas dos isoformas de la colágena tipo II mediante el uso de las sondas de ADNc específicas permitirá demostrar la validez esta sugerencia.

Cabe mencionar que para determinar el establecimiento del blastema condrogénico, es necesario identificar la presencia de otras moléculas específicas de esta etapa, como lo son la tenascina y la N-CAM, las cuales proveen sitios potenciales de adhesión para una variedad de componentes de la superficie celular. En el caso de que estas proteínas se expresen alrededor del día 5 de cultivo, se confirmaría que el blastema condrogénico puede ser reconocido en nuestro sistema. Por otro lado, si las moléculas específicas del blastema condrogénico coinciden con nuestras sugerencias, se podría decir que las cadenas del sulfato de heparán, presentes en el día cero (mesénquima laxo), son diferentes de aquéllos proteinglicanos presentes en el día 5 (blastema condrogénico). Además, ayudaría a determinar si la expresión de la colágena tipo II precede al incremento del sulfato de heparán.

La tercera etapa del desarrollo del cartilago, caracterizada por la diferenciación fenotípica del mismo, se reconoce en el sistema utilizado; una característica es el

mantenimiento de la reexpresión de la colágena tipo II que ocurre desde el día 3 al día 11 de cultivo. Otra evidencia, es el aumento en las proporción del 4 sulfato de condroitina, lo cual coincide con una disminución en la expresión del sulfato de heparán. De acuerdo con lo que sucede en la síntesis diferencial de los GAG durante el desarrollo de las extremidades embrionarias del ratón, en los estados 21 a 22 donde el cartilago ya se ha diferenciado fenotípicamente, la disminución del sulfato de heparán se compensa por el incremento del 4 sulfato de condroitina. En contraste, el 4 sulfato de condroitina se incrementa hasta el día 11 de cultivo. Esto podría ser porque *in vitro* es necesaria la presencia o la concentración de otro u otros factores que promueven la síntesis del 4 sulfato de condroitina. Se sabe que el sistema usado en este trabajo, favorece la adquisición de una morfología redonda y de las interacciones celulares. Estas son las condiciones mínimas para que ocurra la reexpresión de la condrogénesis. Sin embargo, diversos factores solubles tales como, el TGF- β promueven la condrogénesis al influir directa o indirectamente sobre la síntesis de los proteinglicanos (Kulyk y cols., 1989; Harrison y cols., 1992; Benya y Padilla, 1993). Con base en ésto, sería interesante realizar experimentos en los que se evalúe la reexpresión de la condrogénesis en ausencia de suero y en presencia del TGF- β u otros factores de crecimiento.

Los resultados también muestran que la colágena tipo I reinicia su síntesis en el día 7 y continua hasta el día 11 de cultivo. Esto requiere por un lado, la formación de una hipertrofia, etapa en la que la colágena tipo I se expresa. Sin embargo, para demostrar ésto debemos detectar otras moléculas específicas del estado de la diferenciación, como la colágena tipo X y la fosfatasa alcalina, entre otras. Por otro lado, de acuerdo a las observaciones de los cultivos al microscopio, las células localizadas en la periferia de la micromasa exhiben una morfología más extendida y se hacen más evidentes después de cinco días de cultivo (datos no mostrados), lo cual podría indicarnos que representan una población que permanece en estados más tempranos de la diferenciación y por lo tanto, al

Incrementar esta población se aumenta la concentración de la colágena tipo I por lo que nuevamente se detecta. Las observaciones por inmunofluorescencia, podrían definir la localización de ambas colágenas, tipo I y tipo II. Es conveniente mencionar que, en caso de que en nuestro sistema ocurra inducción de la hipertrofia, sería ventajoso comparado a otros trabajos donde, por ejemplo la dexametasona y el ácido ascórbico se usan para inducir la hipertrofia *in vitro*.

Este trabajo provee la posibilidad de estudiar *in vitro* las tres etapas que conducen a la condrogénesis: mesénquima laxo, blastema condrogénico y cartilago fenotípicamente diferenciado. La reexpresión de la condrogénesis ocurre en un período de once días de cultivo. En contraste con otros sistemas propuestos, donde el efecto del AR, sobre los condrocitos en monocapa se revierte por el uso de la dihidrocitocalasina B (DHCB) a concentraciones en que se altera el arreglo de los microfilamentos de actina y 10% de SBF. La reexpresión de la condrogénesis fue medida por el cambio de síntesis de la colágena tipo I a la colágena tipo II (Benya y col, 1988; Brown y Benya, 1988). Este cambio de expresión se inicia entre los días 6 y 8 de cultivo y se completa hasta el día 14, pero en dicho sistema la reexpresión condrogénica no se da de manera homogénea, aún después de los 14 días.

Nuestro trabajo también difiere de aquel reportado por Castagnola y col (1988), quienes al cultivar los condrocitos por varios pases, condiciones que bloquean la expresión de la colágena tipo II e inducen la síntesis de la colágena tipo I, encontraron que a partir de esas células adherentes y posteriormente transferidas a cultivos en suspensión, hay una disminución en los niveles de los ARNm para la colágena tipo I y un inicio en la reexpresión de los ARNm de colágena tipo II, en las dos primeras semanas y se alcanza un máximo de la expresión de los ARNm para la colágena tipo II hasta las dos semanas de cultivo. Mientras que, nosotros detectamos la colágena tipo II desde el día 3 de cultivo.

Ahora bien, se sabe que durante los procesos iniciales de la condrogénesis *in vivo*, las células del mesénquima laxo, al formar las condensaciones celulares, adquieren una forma ovoide. La condrogénesis *in vitro* es dependiente de la forma celular, como ocurre en células condrogénicas cultivadas en geles de agarosa (Benya y Shafer, 1982) o colágena. En estos cultivos, las células solitarias expresan moléculas de la MEC características del cartilago (Solursh y col, 1982). Sin embargo, el efecto del ácido retinoico no puede ser revertido sólo por inducir el cambio de la morfología. Horton y Hassel (1986), muestran que la forma esférica no inhibe el efecto del AR, cuando las células son transferidas a geles de agarosa, colágena o metilcelulosa. Con base en esto, podemos decir que en nuestro sistema, la reexpresión de la condrogénesis no solamente ocurre por un cambio en la morfología de las células, sino que este proceso es promovido por cultivar a las células en altas densidades (cultivos en micromasa); bajo estas condiciones se favorecen las interacciones célula-célula. Asimismo, no sólo la forma celular y las interacciones celulares, sino más bien el bloqueo de los procesos que ocurren en la transducción de la señales mediados por el citoesqueleto (mecanotransducción), es lo que promueve la condrogénesis (por ejemplo, el bloqueo de la unión de los receptores de membrana a su ligando o por la desestabilización de los microfilamentos) (Zanetti y Solursh, 1984; Zanetti y col, 1990). Esto, también se ha observado al usar la dihidrocitocalasina B (DHCB) en los cultivos de micromasa durante la reexpresión de la condrogénesis (Chimal y col, manuscrito en preparación).

Finalmente, se puede decir que los factores que son capaces de influir en la modulación de la condrogénesis en el sistema propuesto aquí, se encuentran regulados de una manera más próxima a lo que ocurre *in vivo*. Es decir, nosotros encontramos que la reexpresión de la diferenciación de los condrocitos, ocurre bajo condiciones de cultivos en micromasa, ésto es condiciones semejantes que se adquieren durante la formación del

blastema condrogénico *in vivo*. Cabe aclarar que esta reexpresión también puede estar regulada por diferentes moléculas de la MEC (la tenascina, la N-CAM, el sulfato de heparán, entre otros), las cuales interactúan entre ellas y con sus receptores de membrana, así como por los factores solubles presentes en el medio.

CONCLUSIONES

-Los resultados de este trabajo confirman que el AR induce la síntesis de la colágena tipo I y bloquea la expresión de la colágena tipo II en condrocitos cultivados *in vitro*. Además el AR provoca un cambio de morfología de los condrocitos que de ser poligonales adquieren una forma fibroblastoide. Con base en ésto se sugiere que los condrocitos puede ser regresados a etapas más temprana de su diferenciación, mesénquima laxo.

-La reexpresión de la condrogénesis ocurre en cultivo de micromasa, ésto es condiciones que favorecen la condrogénesis *per se*.

-La incorporación del $S^{35}O_4$ en la síntesis de los glicosaminoglicanos de células en condiciones de micromasa previamente tratadas con el AR, muestra al día 5 de cultivo existe la mayor síntesis de los glicosaminoglicanos y esto coincide con la mayor proporción del sulfato de heparán. Esto sugiere que alrededor del día cinco de cultivo se establece la etapa del blastema condrogénico.

-La colágena tipo II se reexpresa a partir del día 3 de cultivo y se mantiene hasta el día 11 de cultivo. Entonces, también se forma la fase del cartilago fenotípicamente diferenciado.

-Finalmente, se sugiere que las tres etapas que llevan a la diferenciación del cartilago se pueden reconocer y ser reguladas bajo un modelo experimental.

PERSPECTIVAS

Consideramos que las perspectivas abiertas al sistema experimental de la condrogénesis *in vitro*, que se propone en este trabajo, son de gran interés, ya que nos permitió identificar algunos componentes de la MEC que pueden ser utilizados como marcadores para reconocer cada etapa que lleva a la diferenciación del cartilago. Es importante mencionar, que dado al enfoque usado en este trabajo, no hemos identificado los marcadores específicos del blastema condrogénico (por ejemplo, la tenascina y la N-CAM). Sin embargo, creemos que uno de los aspectos más importantes de la presente tesis, fue lograr un sistema experimental en el que se estudiara la reexpresión de la condrogénesis y en el que se sugiere se pueden reconocer las tres etapas de este proceso: mesénquima laxo, blastema condrogénico y cartilago diferenciado. Esto facilitará los estudios futuros para caracterizar un modelo experimental que reproduzca lo que más se asemeje a lo que sucede *in vivo*. Asimismo, nos permitirá estudiar el papel que juegan los componentes de la MEC en la condrogénesis, al degradar o bloquear específicamente moléculas de la MEC, como lo son los GAG, la fibronectina, entre otras, para ver si estas moléculas tienen algún papel estructural o bien regulador de la diferenciación del cartilago. Además, dado que la regulación de la condrogénesis puede ocurrir por la expresión de los receptores a esas moléculas de la MEC, será de gran interés determinar la expresión diferencial de estas proteínas de membrana en la condrogénesis *in vitro* y posteriormente relacionar esto con lo que se presenta *in vivo*.

Por otro lado, dado que se sabe que la expresión de diversas moléculas de la MEC y sus receptores se encuentra mediada por diversos factores, como lo son los diferentes componentes de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (los TGF- β 1 a 5, las BMP), también resultará de gran importancia determinar cuál es el papel de estos

factores en el control de la expresión de dichas moléculas durante el proceso de la diferenciación del cartílago *in vitro*. Asimismo, será interesante correlacionar nuestro modelo experimental con lo que sucede *in vivo*.

REFERENCIAS

- Ahrens, P.B., Solorsh, M. y Reiter, R.S. (1977). Stage-related capacity for limb chondrogenesis on cell culture. *Dev. Biol.* 60:69-82.
- Alberts, B, Bray, D., Lewis, J., Raff, M. Roberts, K. y Watson, J.D. (1989). *Molecular Biology of The Cell*. Garland Publishing Inc. New York, U.S.A. 1219 pp.
- Aoyama, H. (1993). Developmental Plasticity of Prospective Dermatome and the Prospective Sclerotome Region of Avian Somite. *Develop. Growth & Differ.* 35 (5):507-519.
- Benya, P.D., Padilla, S.R. y Nimni, M.E. (1977). The progeny of rabbit articular chondrocytes synthesize collagen types I and III and type I trimer, but not type II. Verification by cyanogen bromide peptide analysis. *Biochemistry.* 16:865-872.
- Benya, P.D., Padilla, S.R. y Nimni, M.E. (1978). Independent Regulation of Collagen Types by Chondrocytes during the Loss of Differentiated Function in Culture. *Cell.* 15:1313-1321.
- Benya, P.D. y Shafer, J.D. (1982). Dedifferentiated Chondrocytes Reexpress the Differentiated Collagen Phenotype When Cultured in Agarose Gels. *Cell.* 30:215-224.
- Benya, P.D., Brown, P.D. y Padilla, S.R. (1988). Microfilament Modification by Dihydrocytochalsin B Causes Retinoic Acid-modulated Chondrocytes to Reexpress the Differentiated Collagen Phenotype without a Change in Shape. *J. Cell Biol.* 106:161-170.
- Benya, P.D. y Padilla, S.R. (1993). Dihydrocytochalsin B Enhances Transforming Growth Factor- β -Induced Reexpression of the Differentiated Chondrocyte Phenotype without Stimulation of Collagen Synthesis. *Exp. Cell Res.* 204:268-277.
- Böhme, K., Consience-Egli, M., Tshan, T., Winterhalter, K.H. y Bruckner, P. (1992). Induction of proliferation or hypertrophy of chondrocytes in serum-free culture: the role of insulin like factor-I, insulin, or thyroxine. *J. Cell. Biol.* 116:1035-1042.
- Brown, P.D. y Benya, P.D. (1988). Alterations in Chondrocyte Cytoskeletal Architecture during Phenotypic Modulation by Retinoic Acid and Dihydrocytochalsin B-induced Reexpression. *J. Cell Biol.* 106:171-179.

- Burnette, W.N. (1981). "Western Blotting". Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem* 112:195-203.
- Carrington, J.L., Chen, P., Yanagishita, M., y Reddi, A.H. (1991). Osteogenin (Bone Morphogenetic Protein-3). Stimulates Cartilage Formation by Chick Limb Bud Cells In Vitro. *Dev. Biol.* 146:406-415.
- Castagnola ,P., Dozin, B., Moro, G. y Cancedda, R. (1988). Changes in the Expression of Collagen Genes Show Two Stages in Chondrocyte Differentiation In Vitro. *J. Cell. Biol.* 106:461-467.
- Chen, P., Carrington, J.L., Hammonds, R.G. y Reddi, A.H. (1991). Stimulation of Chondrogenesis in Limb Bud Mesoderm Cells by Recombinant Human bone Morphogenetic Protein 2B (BMP-2B) and Modulation by Transforming Growth Factor β 1 and β 2. *Exp. Cell Res.* 195:509-515
- Darnell, J.D., Lodish, H. y Baltimore, D. (1990). *Molecular Cell Biology*. 2a. ed. Scientific American Books, Inc. New York, N.Y. 1105 pp.
- Diegelman, R.F. y Petrkofsky, B. (1972). Collagen Biosynthesis During Connective Tissue Development in Chick Embryo. *Dev. Biol.* 28:443-453.
- Duboule, D. (1992). The Vertebrate Limb: A model system to study the Hox/HOM Gene Network during Development and Evolution. *BioEssays*. 14 (6):375-384.
- Elmer, W.A., Smith, M.A. y Ede, D.A. (1981). Immunohistochemical localization of cyclic AMP during normal and abnormal chick and mouse limb development. *Teratology*. 24:215-223.
- Elmer, W.A., Pollard, S. y Cochran, J.D. (1991). Lack of Chondrogenic Expression in Mouse limb Bud Micromass Culture Exposed To Exogenous β Galactosidase or N-Acetyl- β -glucosaminidase. *Exp. Cell Res.* 195:154-162.
- Frenz, D.A., Akiyama, S.K., Paulsen, D.F. y Newman, S.A. (1989a). Latex Beads as Probes of Cell Surface-Extracellular Matrix Interactions during Chondrogenesis: Evidence for a Role Amino-Terminal Heparin-Binding Domain of Fibronectin. *Dev. Biol.* 136:87-96.
- Frenz, D.A., Jaokaria, N.S., y Newman, S.A. (1989b). The Mechanism of Precartilage Mesenchymal Condensation: A Major Role for Interaction of the Cell Surface with the Amino-Terminal Heparin-Binding Domain of Fibronectin. *Dev. Biol.* 136:97-103.

- Green, H., Morikawa, M. y Nixon, T. (1985). A dual effector theory of growth-hormone action. *Differentiation*. **29**:195-198.
- Hall, B.K. (1983). *Cartilage: Development, Differentiation, and Growth*. Academic Press. New York, U.S.A. Volumen 2. 409 pp.
- Ham, A.W. y Cormack, D.H. (1986). *Tratado de Histología*. 8a. ed. Interamericana. México. 1079 pp.
- Harrison, E.T., Luyten, F.P. y Reddi, A.H. (1992). Transforming growth factor-beta: its effect on phenotype reexpression by dedifferentiated chondrocytes in the presence and absence of osteogenin. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **28A**:445-448.
- Horton, W. y Hassel, J.R. (1986). Independence of the cell shape and loss of cartilage matrix production during retinoic acid treatment of cultured chondrocytes. *Dev Biol.* **115**:392-397.
- Horton, W.A. (1993). Capítulo 2. *Morphology of Connective Tissue, Cartilage in: Connective Tissue and Its Heritable Disorders* (Royce, P.M. y Steinmann, B.). Wiley-Liss, Inc Publication. New York, U.S.A. páginas 73-84.
- Hurle, J.M., Ros, M.A. y Hinchliffe. (1988). Spatial and temporal changes in the pattern of glycosylation of the developing chick limb tissue components as revealed by fluorescent conjugated lectin probes. *Cell Differ.* **24**:149-158.
- Jiang, T.X. Yi, J.R., Ying, S.Y. y Chuong, Ch.M. (1993). Activin Enhances Chondrogenesis of Limb Bud Cells: Stimulation of Precartilaginous Mesenchymal Condensations and Expression of NCAM. *Dev. Biol.* **155**:545-557.
- Jim, L.Ng., Tam, P.P. y Cheah, K.S. (1993). Preferential Expression of Alternative Spliced mRNAs Encoding Type II Procollagen with a Cystein-Rich Amino-Propeptide in Differentiating Cartilage and Nonchondrogenic Tissues during Early Mouse Development. *Dev. Biol.* **159**:403-417.
- Kao, J., Huey, G., Kao, R. y Stern, R. (1990). Ascorbic Acid Stimulates Production of Glycosaminoglycans in Culture Fibroblasts. *Exp. Molecular Pathology*. **53**:1-10.
- Kimata, K., Oike, Y., Tani, K., Shinomura, T., Yamagata, M., Uritani, M. y Suzuki, S. (1986). A Large Chondroitin Sulfate Proteoglycan (PG-M) Synthesized before Chondrogenesis in the Limb Bud of Chick Embryo. *J Biol. Chem.* **261** (29):13517-13525.
- Kosher, R.A., Walker, J.H. y Ledger, P.W. (1982). Temporal and spatial distribution of fibronectin during development of the embryonic chick limb bud. *Cell Differ.* **11**:217-228.

- Kosher, R.A., Kulyk, W.N. y Gay, S.W. (1986a). Collagen gene expression during limb cartilage differentiation. *J Cell Biol.* 102:1151-1156.
- Kosher, R.A., Gay, S.W., Kamanitz, J.R., Kulyk, W.M., Rodgers, B.J., Sai, S., Tanaka, T. y Tanzer, M.L. (1986b). Cartilage Proteoglycan Core Protein Gene Expression during Limb Cartilage Differentiation. *Dev. Biol.* 118:112-117.
- Kulyk, W.M., Rodgers, B.J., Greer, K. y Kosher, R. (1989). Promotion of embryonic chick limb cartilage differentiation by transforming GF- β . *Dev. Biol.* 135:424-430.
- Laemli, U.K. (1970)._ Cleave of Structural Proteins During the Assembly of Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 227:440-447.
- Leonard, C., Fuld, H., Frenz, D., Downie, S., Massagué, J. y Newman, S. (1991). Role of transforming growth factor β in chondrogenic pattern formation in the embryonic limb. *Dev. Biol.* 145:99-109.
- Mackie, E.J., Thesleff, I. y Chiquet-Ehrismann, R. (1987). Tenascin Is Associated with Chondrogenic and Osteogenic Differentiation In Vivo and Promotes Chondrogenesis In Vitro. *J. Cell Biol.* 105:2569-2579.
- Madsen, K., Friberg, U., Roos, P., Eden, S. e Isaksson, O. (1983). Growth hormone stimulates the proliferation of cultured chondrocytes from rabbit ear and rat rib growth cartilage. *Nature.* 304:545-547.
- Malvilio, F. (1993). Regulation of vertebrate homeobox-containing genes by morphogens. *Eur. J. Biochem.* 2:273-288.
- Massagué, J. (1990). The transforming growth factor- β family. *A. Rev. Cell Biol.* 6:597-611.
- Matsui, F., Oohira, A., Shoji, R. y Nogami, H. (1986). Glycosaminoglycans and Proteoglycans synthesized by rat limb buds during prechondrogenic and chondrogenic stages. *Differentiation.* 31:29-34.
- Oohira, K., Tamaki, Y., Chiba, A. y Nogami, H. (1977). Glycosaminoglycans in Congenital Pseudarthrosis. *Calcif. Tiss. Res.* 23:271-275.
- Owens, E.M. y Solursh, M. (1981). In vitro Histogenic Capacities of Limb Mesenchyme from Various Stage Mouse Embryos. *Dev. Biol.* 88:297-311.
- Quarto, R., Dozin, B., Bonaldo, P., Cancedda, R. y Colombatti, A. (1993). Type VI collagen expression is upregulated in the early events of chondrocyte differentiation.

- Sandberg, M. y Vuorio, E. (1987). Localization of types I, II and III Collagen mRNAs in Developing Human Skeletal Tissues by In situ Hybridization. *J. Cell Biol.* 104:1077-1084.
- Sasano, Y.. (1992). Distribution of Type I collagen, Type II and PNA binding glycoconjugates during chondrogenesis of three distinct embryonic cartilages. *Anat. Embryol.* 186:205-213.
- Schofield, J.N. y Wolpert, L. (1990). Effect of TGF- β 1, TGF- β 2, and bFGF on Chick Cartilage and Muscle Cell Differentiation. *Exp. Cell Res.* 191:144-148.
- Seyedin, S.M., Thomas, C.T., Thompson, A.Y., Rosen, D.M. y Piez, K.A. (1985). Purification and characterization of two cartilage-inducing factors from bovine demineralized bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:2267-2271.
- Shapiro, S.S. y Poon, J.P. (1976). Effect of Retinoic Acid on Chondrocyte Glycosaminoglycan Biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 174:74-81.
- Silver, M.H., Foidart, J.M. y Pratt, R.M. (1981). Distribution of fibronectin and collagen during mouse limb and palate development. *Differentiation.* 18:141-149.
- Solorsh, M., Reiter, R.S., Ahrens, P.B. y Vertel, B.M. (1981). Stage- and Position-Related Changes in Chondrogenic Response of Chick Embryonic Wing Mesenchyme to Treatment with Didutryl Cyclic AMP. *Dev. Biol.* 83:9-19.
- Solorsh, M., Lisenmayer, T.F. y Jensen, K.L. (1982). Chondrogenesis from Single Limb Mesenchyme Cells. *Dev. Biol.* 94:259-264.
- Stirpe, N.R. y Goetinck, P.F. (1989). Gene regulation during cartilage differentiation: temporal and spatial expression of link protein and cartilage matrix protein in the developing. *Development.* 107:23-33.
- Swalla, B.J. y Solorsh, M. (1984). Inhibition of limb chondrogenesis by fibronectin. *Differentiation.* 26:42-48.
- Toole, B. (1972). Hyaluronic turnover during chondrogenesis in the developing chick limb and axial skeleton. *Dev. Biol.* 29:321-329.
- Toole, B.P., Jackson, G. y Gross, J. (1972). Hyaluronate in morphogenesis: Inhibition of chondrogenesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 63:1384-1386.
- Urist, M.R., DeLange, R.J. y Finerman, G.A. (1983). Bone Cell Differentiation and Factors. *Science.* 220: 680-686.

- Vukicevick, S., Luyten, F.P. y Reddi, A.H. (1989). Stimulation of the expression of osteogenic and chondrogenic phenotypes in vitro by osteogenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:8793-8797.
- Watson, J. D., Hopkins, N.H., Roberts, J.W., Steitz, J.A. y Weiner, A.M. (1987). *Molecular Biology of the gene*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California, U.S.A. II:1163 pp.
- West, Ch.M., Lanza, R., Rosenbloom, J. Lowe, M. y Holtzer, H. (1979). Fibronectin Alters the Phenotypic Proprieties of Cultured Chick Embryo Chondroblasts. *Cell*. 17:491-501.
- Wright, Ch. (1991). Vertebrate homeobox genes. *Curr. Op. in Cell Biol.* 3:976-982.
- Zanetti, N.C. y Solorsh, M. (1984). Induction of chondrogenesis in limb mesenchymal cultures by disruption of the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 99:115-123.
- Zanetti, N.C., Dress, V.M. y Solorsh, M. (1990). Comparasion between ectoderm-conditioned medium and fibronectin in their effects on chondrogenesis by limb bud mesenchymal cells. *Dev. Biol.* 139:383-395