

03062  
8  
2002

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES  
Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y  
HUMANIDADES.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
BIOMÉDICAS.

**IDENTIFICACION DE INTEGRINAS  
DE LA CLASE  $\beta_1$  EN CONDROCITOS Y  
CONDROCITOS TRATADOS CON  
ACIDO RETINOICO.**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN INVESTIGACION  
BIOMÉDICA BÁSICA  
P R E S E N T A:  
*Ana Laura Hernández Lagunas*

MEXICO, D.F.

1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 esta 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.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biología Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas bajo la dirección del Dr. Lino Díaz de León Hernández y del M. en C. Jesús Chimal Monroy, a quienes agradezco la oportunidad y facilidades para realizarlo, así como el apoyo que me otorgaron.

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

Dr. Carlos Rosales Ledezma.

Dra. Irma Villalpando Fierro.

Dr. Alejandro Zentella Dehesa.

Dr. Lino Díaz de León Hernández.

A la memoria de mi padre, por sus conocimientos y su fuerza espiritual que han continuado en mi camino y siempre me han fortalecido.

A mi madre por su paciencia, sus enseñanzas y sobre todo por su amor incondicional.

Agradezco profundamente a Manuel por todo su apoyo para continuar con mi vida profesional, por su confianza y el amor que me ha brindado cuando más lo he necesitado.

A todos mis hermanos y sobrinos por su apoyo y cariño.

Finalmente agradezco muy especialmente al Dr. Raúl Mena del Depto. de Neurociencias del CINVESTAV, IPN por todas las facilidades que me brindó para trabajar en el Microscopio Confocal, a José Luna por su valioso trabajo realizado en el Microscopio Confocal y sobre todo por su paciencia y enseñanza que me otorgó. A todos mis amigos que me han ayudado tanto en mi vida profesional como personal: Saúl, Rosa, Carlos y Diana.

## CONTENIDO

Resumen.....	1
Introducción.....	2
1.1 Origen embrionario de los condrocitos.....	3
1.2 Diferenciación de los condrocitos.....	3
1.3 Las interacciones célula-célula en la diferenciación de los condrocitos.....	7
1.4 El papel de la MEC en la diferenciación de los condrocitos.....	8
1.5 El papel de los receptores de la MEC en la condrogénesis.....	11
Justificación e Hipótesis.....	15
Objetivos.....	16
Materiales.....	17
Métodos.....	19
I. Cultivo celular.....	19
II. Análisis de GAG sintetizados in vitro.....	19
III. Preparación de sustratos para pruebas de adhesión.....	20
IV. Pruebas de adhesión celular.....	21
V. Inmunofluorescencias.....	21
VI. Microscopía Confocal.....	22
VII. Marcado de células adherentes en monocapa.....	23
VIII. Inmunoprecipitación.....	23
IX. Electroforesis.....	24
X. Electrotransferencia.....	24
XI. Quimioluminiscencia.....	25
Resultados.....	26
I. Modulación del fenotipo condrocítico por el ácido retinoico.....	26
II. Adhesión celular.....	31
III. Localización de las subunidades $\alpha$ y $\beta 1$ por inmunofluorescencia.....	35
IV. Identificación de las integrinas por inmunoprecipitación.....	38
Discusión y Conclusiones.....	41
Perspectivas.....	55
Referencias.....	56

## ABREVIATURAS

ADNc	- ácido desoxiribonucleico complementario
ARNm	- ácido ribonucleico mensajero
ABS	- albúmina sérica de bovino
AR	- ácido trans-retinoico
condrocitos-AR	- condrocitos tratados con ácido retinoico
Colg. I	- colágena tipo I
Colg. II	- colágena tipo II
C-4S	- condroitín 4-sulfato
C-6S	- condroitín 6-sulfato
DS	- dermatán sulfato
DipF	- diisopropilfosfato
DMEM	- medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco-Vögt
ECL	- (enhanced chemiluminescent) detección por quimioluminiscencia aumentada
FN	- fibronectina
GAG	- glicosaminoglicanos
HS	- heparán sulfato
NCAM	- molécula de adhesión celular neuronal
PBS	- amortiguador de fosfatos
PBS-Tween	- amortiguador de fosfatos con 0.1% de Tween 20
PG	- proteinglicano
PMSF	- fenilmetilsulfonil fluoruro
RGD	- péptido Arg-Glis-Asp
SDS-PAGE	- electroforesis en geles de poliacrilamida

## RESUMEN

Se sabe que los condrocitos aislados de esternón de rata y sembrados en presencia del ácido retinoico (condrocitos-AR) revierten su programa de diferenciación asemejándose a estadios más tempranos. En estas condiciones cambian su expresión de colágena tipo II por colágena tipo I, disminuyen la síntesis de los glicosaminoglicanos totales (GAG) y producen básicamente GAG ricos en heparán sulfato. Todas estas características bioquímicas son similares a las de condrocitos de estadios tempranos de diferenciación. En este modelo de reversión del estado de diferenciado de los condrocitos, existen cambios en algunos componentes de la matriz extracelular (MEC). Por lo tanto, fue de nuestro interés identificar si también existen cambios en los receptores que reconocen a las moléculas de la MEC. Con base en esto, identificamos diferencias en algunos tipos de integrinas de la familia  $\beta_1$ , mediante inmunolocalización e inmunoprecipitación. Los resultados mostraron que los condrocitos sin AR (fenotípicamente diferenciados), presentaron en su superficie la subunidad  $\alpha_1$  y las integrinas  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_V\beta_1$  y  $\alpha_V\beta_3$ . Mientras que los condrocitos-AR exhibieron las integrinas  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$  y  $\alpha_V\beta_1$ . Por otro lado, pruebas de adhesión celular a substratos de colágena tipo II, colágena tipo I y fibronectina, mostraron que los condrocitos sin AR se adhirieron en mayor porcentaje a la colágena tipo II. Los condrocitos-AR, se adhirieron preferencialmente a la colágena tipo I. La adhesión a fibronectina fue similar en ambos tipo celulares. La integrina  $\alpha_1\beta_1$  fue abundante en los condrocitos-AR, lo cual correlaciona con la identificación de  $\alpha_1$  en células precondrogénicas de la zona del pericondrio. Además, esto coincide con la presencia de la colágena tipo I en la MEC. Las subunidades  $\alpha_2$  y  $\alpha_4$  fueron exclusivas de los condrocitos sin AR. Se ha sugerido que la integrina  $\alpha_2\beta_1$  se une a la colágena tipo II. Hasta el momento, no se ha reportado la presencia de  $\alpha_1$  en los condrocitos. Entonces, la identificación de esta subunidad en los condrocitos maduros (sin AR) en nuestro modelo muestra la posibilidad de presentarse las integrinas  $\alpha_4\beta_1$  y/o  $\alpha_4\beta_7$ . Por lo tanto, sugerimos que además de ciertas moléculas de la MEC que se han tomado como marcadores de la diferenciación condrocítica, las integrinas también son una estrategia alterna para estudiarlas como marcadores. Así tenemos que la integrina  $\alpha_1\beta_1$  coincide su presencia con el momento de síntesis de colágena tipo I en los condrocitos-AR semejantes a las células mesenquimáticas, mientras que las integrinas  $\alpha_2\beta_1$  y la subunidad  $\alpha_1$  se presentarían en los condrocitos maduros.

## INTRODUCCIÓN

Los condrocitos son las células especializadas que forman el cartílago, ocupan del 1-12% del volumen del tejido y están entre una abundante matriz extracelular (MEC) secretada y mantenida por ellas mismas. Tradicionalmente los cartílagos son clasificados como hialino, elástico y fibroso de acuerdo a su apariencia morfológica e histológica y a su historia en el desarrollo. Así, tenemos que en el cartílago auricular (cartílago elástico), los condrocitos sintetizan elastina. A diferencia de esto, los condrocitos del cartílago fibroso sintetizan en abundancia las colágenas tipo I y tipo II (Eyre y Muir, 1975 y 1977). Además, el cartílago de diferentes especies podría variar considerablemente en su composición y propiedades; por ejemplo, el cartílago auricular en pollo contiene un 80% de colágena tipo I (Eyre et al., 1978) mientras que en mamíferos carece de colágena tipo I en condiciones normales (Herbage et al., 1977). En cuanto al cartílago hialino, éste prácticamente forma todo el esqueleto de los vertebrados en estadios embrionarios. En vista de la gran diversidad de los componentes de la MEC encontrados en varios cartílagos, una descripción más específica de los condrocitos diferenciados se hace posible con las características fenotípicas del cartílago hialino. Estos componentes de la MEC dan las características de resistencia y flexibilidad del tejido. Otra característica del cartílago es que es esencialmente avascular, por lo que la nutrición de los condrocitos se lleva a cabo por difusión a través de la MEC (Ham y Comarek, 1983).

Los condrocitos diferenciados en el cartílago hialino pueden ser identificados por sus características morfológicas e histológicas; los estudios por microscopía electrónica muestran que los condrocitos *in vivo* son ovoides con una gran extensión del retículo endoplasmático rugoso y del aparato de Golgi, los bordes de la superficie celular son ondulados y presentan una clara interacción con la MEC.

## **ORIGEN EMBRIONARIO DE LOS CONDROCITOS.**

Los condrocitos pueden ser de origen mesodérmico, como los condrocitos de las extremidades embrionarias y el cartílago de las vértebras, o de origen ectodérmico, como el cartílago craneal, pero nunca derivan del endodermo (Hall, 1983).

Así, tenemos a los condrocitos de los cartílagos del septo nasal y de Meckel presentes en la mandíbula, los cuales se derivan de las células de la cresta neural. El primero permanece como cartílago hialino hasta la etapa adulta; mientras el segundo degenera en una región y en otra parte del mismo parece tener una asociación con la formación del hueso mandibular. Por otro lado, las células condrogénicas de origen somático formarán a las vértebras en el embrión, éstas en estado postfetal se osifican. Por último, los condrocitos que forman las extremidades embrionarias se originan de la placa lateral del mesodermo.

## **DIFERENCIACION DE LOS CONDROCITOS.**

Los procesos que conducen a la diferenciación condrogénica son verdaderamente complejos, por ello una forma útil de clasificar a las vías condrogénicas es; por un lado, aquéllas en las cuales intervienen las interacciones celulares heterólogas, tales como en el cartílago, vertebral el cual se origina del mesénquima somático que después interacciona con el epitelio notocordal o el cartílago escleral originado por la interacción del mesénquima ocular con el epitelio retinal pigmentado. Sin embargo, es necesario mencionar que sin importar el origen de los condrocitos, su diferenciación se lleva a cabo de manera similar en todas las regiones condrogénicas y el paso inicial y decisivo de la condrogénesis podría ser disparado por el mismo mecanismo, principalmente mediante diversos factores como las proteínas morfogenéticas de hueso (Urist, 1965 citado en Urist et al., 1983), así como por las interacciones transmembranales de la MEC con el sistema de red del citoesqueleto mediadas a través de

receptores de superficie de las células condrogénicas. Por lo tanto, en este trabajo haremos mayor énfasis en las interacciones célula-célula y célula-MEC.

El proceso de diferenciación de los condrocitos inicia desde las etapas embrionarias de los vertebrados. Este programa implica una secuencia de estadios transitorios que han sido definidos de acuerdo a la forma y volumen celular, por las actividades biosintéticas y metabólicas, pero principalmente por diferentes moléculas sintetizadas por los condrocitos en su línea de diferenciación. Así tenemos que la diferenciación de los condrocitos se origina a partir de células del mesénquima laxo, células precondrogénicas, las cuales debido a la falta de la identificación de marcadores específicos sólo se reconocen por una apariencia fibroblastoide y con una alta capacidad de proliferación. Posteriormente, estas células comienzan a agregarse unas con otras, de tal manera que el número de células por unidad de área se incrementa y forman una estructura denominada, blastema condrogénico. A partir del blastema condrogénico, los condrocitos se diferencian fenotípicamente, dejan de proliferar para producir y secretar una gran cantidad de moléculas de la MEC. Por último, los condrocitos pueden o no llegar a diferenciarse terminalmente y en esta etapa se les denomina condrocitos hipertróficos, ésta fase depende del tipo de cartílago. De esta manera, se pueden distinguir cuatro etapas que llevan a la diferenciación de los condrocitos: células precondrogénicas del mesénquima laxo; células del blastema condrogénico; condrocitos fenotípicamente diferenciados y condrocitos hipertróficos.

Se ha establecido que tanto las interacciones célula-célula como las interacciones célula-MEC, son un factor importante en la condrogénesis. Por ejemplo, las interacciones celulares incrementadas obtenidas por cultivos en alta densidad estimulan a una producción de componentes de la matriz del cartílago (Owens y Solursh, 1981). Además, la síntesis de los componentes de la MEC de los condrocitos cambia considerablemente durante el periodo de

cultivo (Lavietes, 1970). También, se ha propuesto a un factor o varios factores solubles positivos en la condrogénesis que han sido detectados y probados de medios condicionados de cultivos de cartílago (Solursh y Reiter, 1975). Por otro lado, se observó en cultivos de condrocitos donde se agregan otros tipos celulares, la expresión fenotípica de los condrocitos se pierde (Bryan, 1968).

Está bien establecido que la modulación del fenotipo condrocítico se encuentra asociado con un cambio en la expresión de colágenas, proteoglicanos, disminución y tipo de glicosaminoglicanos, así como cambios en la forma celular. La modulación del fenotipo condrocítico, observado *in vivo* durante la embriogénesis del cartílago, desarrollo o degeneración patológica tal como la osteoartritis (Ronzière et al., 1990; von der Mark et al., 1992; Aigner et al., 1993; Mayne y Brewton, 1993), puede ser reproducida *in vitro* bajo distintas condiciones de cultivo; por ejemplo, los cultivos a baja densidad, sobre superficies sólidas como en cajas de Petri de plástico y cultivos de varios pases permiten a los condrocitos extenderse, para formar placas de adhesión y desarrollan fibras de estrés (Marchisio et al., 1984; Bruckner et al., 1989 y Descalzi Cancedda et al., 1992). Estas condiciones de cultivo inhiben la producción de las colágenas y los proteoglicanos específicos del cartílago. Los condrocitos pierden sus funciones diferenciadas al cambiar su programa de síntesis de colágena tipo II a colágena tipo I y colágena tipo III (Hein et al., 1984; Benya et al., 1977, 1978; Horton et al., 1987; Dietz et al., 1993). Las células llegan a ser móviles y adquieren una morfología estrellada como fibroblastos (Holtzer y Abbott, 1968; Chacko et al., 1969). La transición a la síntesis de colágena tipo II no ocurre simultáneamente en todas las células y no correlaciona estrictamente con un cambio en la morfología celular (von der Mark et al., 1977), sino con la pérdida de la síntesis de los proteoglicanos ricos en condroitín sulfato (Vertel y Dorfman, 1979; Dessau et al., 1981). Además, la presencia de agentes exógenos tales como el retinol y el ácido trans-retinoico (AR)

(Solursh y Meier, 1973; Vasan y Lash, 1975; Shapiro y Poon, 1976; Benya y Padilla, 1986) y la 5-bromo-2-deoxiuridina (Mayne et al., 1984; Askew et al., 1991) provocan la extensión sobre la superficie de los condrocitos en cultivo, alteran sus actividades de síntesis y a su vez inhiben la diferenciación condrocítica, aunque esto depende del estado de desarrollo o diferenciación de los condrocitos. El AR ha sido utilizado extensamente para modificar el fenotipo condrocítico para inducir la pérdida de la funcionalidad diferenciada de los condrocitos en cultivo en monocapa (Hein et al., 1984; Benya y Padilla, 1986; Horton et al., 1987; Dietz et al., 1993) o para estimular la proliferación o diferenciación terminal de los condrocitos y su maduración a un estado como osteoblastos (Descalzi Cancedda et al., 1992). Los mecanismos implicados en el proceso de diferenciación y específicamente en la acción de los retinoides aún no están claros. Se ha sugerido que la acción primaria del AR podría ser a nivel de membranas celulares o subcelulares, de tal forma que se da un cambio en la forma celular, lo cual a su vez provoca alteraciones bioquímicas (Fell y Dingle, 1963). Alternativamente, el AR podría actuar a un nivel de expresión genética para inducir cambios en la expresión bioquímica de los condrocitos y ocurre una alteración en la morfología celular, aunque esto último es un efecto secundario (Ong y Chytil, 1975; Horton y Hassel, 1986). Además, de conocer los cambios de expresión de colágenas y proteoglicanos en condrocitos tratados con el AR, recientemente se han identificado modificaciones en la síntesis de proteínas intra y extracelulares bajo condiciones de cultivo en presencia del AR (Freyria et al., 1995).

Así, tenemos que los condrocitos fenotípicamente diferenciados, pueden ser inhibidos *in vitro* a seguir su proceso de diferenciación terminal por ciertos factores solubles tales como el ácido retinoico. Está bien establecido que los condrocitos en presencia del retinoide muestran cambios en su expresión genética y fenotípica, lo cual ha llevado a una posibilidad de establecer un modelo *in vitro*, donde se establecen diferencias en la síntesis de la MEC por los condrocitos.

## LAS INTERACCIONES CELULA-CELULA EN LA DIFERENCIACION DE LOS CONDROCITOS.

Las interacciones celulares son importantes para diversas funciones de los condrocitos; por ejemplo para la proliferación, migración, adhesión y diferenciación celular. Así, tenemos que en los cultivos en monocapa o micromasa de células mesenquimáticas de las extremidades de pollo, la diferenciación condrogénica ocurre solamente a altas densidades, tales como  $6 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> o  $2 \times 10^7$  células/ml, lo cual sugiere que las interacciones célula-célula juegan un papel importante en la condrogénesis (Umansky, 1966; Ahrens et al., 1977; Owens y Solursh, 1981; Solursh, 1983). Además las interacciones entre los condrocitos se han visto ser necesarias para la condrogénesis *in situ*.

Las moléculas más importantes en mediar las interacciones celulares en la regulación de la formación del blastema condrogénico, son las molécula de superficie celular: la molécula de adhesión celular neuronal (N-CAM), la N-cadherina, y una proteína de la MEC llamada, tenascina. Se ha demostrado que estas proteínas intervienen en la agregación celular en las regiones condrogénicas de las extremidades embrionarias, ya que anticuerpos dirigidos contra la N-CAM, N-cadherina y la tenascina inhiben la formación del blastema condrogénico y subsecuentemente el desarrollo del cartílago (Mackie et al., 1987; Widelitz et al., 1993).

También, se han identificado otras moléculas en la etapa de blastema condrogénico como son, los glicoconjugados D-galactosa ( $\beta$ 1-3)-N-acetil-D-galactosamina y la N-acetil glucosamina, ambos identificados por la aglutinina de cacahuete (PNA) y la aglutinina de germen de trigo (WGA), respectivamente (Hurle et al., 1988). La degradación de estos glicoconjugados por las enzimas  $\beta$ -galactosidasa y la N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa (GlcNAC-asa), inhibe la condrogénesis al evitar la formación del blastema condrogénico (Elmer et al., 1991). La degradación con la  $\beta$ -galactosidasa, altera la morfología de las células, 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 son 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 morfológico provocado por las degradaciones específicas de los glicoconjugados (Elmer et al., 1991). Esta inhibición probablemente se debe al impedimento de establecer o favorecer las interacciones célula-célula que son necesarias para la formación de agregados celulares.

#### **EL PAPEL DE LA MEC EN LA DIFERENCIACION DE LOS CONDROCITOS.**

La MEC es una red molecular constituida por una gran variedad de moléculas, entre ellas fibronectina, colágena, proteinglicanos, etc. Las macromoléculas de la MEC son multifuncionales y presentan varios dominios. Algunos de los dominios tienen altas afinidades a otras macromoléculas de la MEC, así bien como a componentes de la superficie celular. Además, muchos de los constituyentes de la MEC son capaces de interactuar con las células e influir en los procesos del desarrollo tales como la condrogénesis (Daniels y Solursh, 1991). La noción de que la MEC juega un papel activo en el desarrollo no es nuevo, sino la idea de la reciprocidad dinámica entre las células y la MEC fue claramente propuesta desde hace más de diez años por Bisell et al. (1982) quienes manifestaron la posibilidad de que la MEC puede dirigir la expresión genética.

Los contactos célula-MEC pueden transmitir señales a las células a través de receptores transmembranales que desencadenan una respuesta intracelular cuando se unen a su ligando al establecerse un anclaje físico de la célula con la MEC. Así tenemos que durante la condrogénesis de origen somático se inicia con las interacciones heterólogas del mesénquima somático (esclerotomo) con el epitelio de la cuerda espinal y la notocorda. Inicialmente Strudel (citado en von der Mark, 1986), sugirió que la matriz de colágena secretada por la notocorda

podría disparar la diferenciación condrogénica del esclerotomo. Esta sugerencia fue confirmada al cultivar somitas de embrión de pollo sobre colágena (Kosher y Church, 1975; Lash y Vasani, 1978), lo cual aceleró y aumentó el grado de condrogénesis. De manera similar, la diferenciación condrogénica se incrementó con proteoglicanos ricos en condroitín sulfato, éstos también constituyen el epitelio de la notocorda (Kosher et al., 1973; Lash y Vasani 1978).

También la condrogénesis de las extremidades embrionarias se incrementa altamente en cultivos de colágena (Kimura et al., 1984). Un punto importante relacionado al mecanismo de condrogénesis podría ser aquel en que la colágena exógena reemplaza la necesidad de agregación celular y permite la diferenciación condrogénica de células separadas, aisladas de las extremidades embrionarias (Solursh et al., 1982).

En general, se ha observado que durante las cuatro etapas de la diferenciación de los condrocitos, se da una expresión diferencial de varias moléculas características de cada una de esas fases. Así, tenemos en el mesénquima laxo, las células precondrogénicas sintetizan colágena tipo I, colágena tipo III (Sandberg y Vuorio, 1987; Sasano, 1992), proteinglicanos ricos en sulfato de heparán y en condroitín sulfato (Kimata et al., 1986). Además, otras proteínas se incrementan como la fibronectina (Kosher et al., 1982), la colágena tipo VI (Quarto et al., 1993) y el hialuronato (Toole, 1972). Se ha propuesto al hialuronato, como un glicosaminoglicano capaz de intervenir en la condrogénesis (Toole, 1972; Toole et al., 1972). Estos trabajos demuestran que el hialuronato se encuentra presente en las regiones precondrogénicas de las extremidades. Posteriormente, en las regiones donde se formará el blastema condrogénico se incrementa la producción del condroitín sulfato y se disminuye la proporción del hialuronato; además de incrementarse la actividad de la hialuronidasa. Estos resultados, sugieren que la síntesis del hialuronato y su subsecuente degradación es un proceso esencial para la condensación del mesénquima. Además, la colágena tipo I (Silver et al., 1981; Kosher et al., 1986a) y la

fibronectina (Silver et al., 1981; Kosher et al., 1982) se acumulan en esta etapa. Por otro lado, los PG ricos en sulfato de heparán también intervienen en la formación del blastema condrogénico (Frenz et al., 1989a; 1989b). Esto se demostró 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. Asimismo, la presencia del oligopéptido glicina-arginina-glicina, el cual contiene un determinante repetido en el dominio amino-terminal de la fibronectina, inhibe la condrogénesis. De manera más específica otras proteínas como la tenascina (Mackie et al., 1987), la molécula de adhesión celular neuronal (N-CAM; Widelitz et al., 1993) y la N-cadherina, son moléculas específicas y esenciales para la formación del blastema condrogénico. En los momentos finales de la formación del blastema condrogénico, la colágena tipo II-A comienza a expresarse. Finalmente, se sabe que en el estado de diferenciación fenotípica de los condrocitos hay una ausencia de las colágenas tipo I y tipo III, en tanto la expresión de la colágena tipo II-B se incrementa (Castagnola et al., 1988; Kosher et al., 1986a; Sasano et al., 1992), en menor proporción la colágena tipo IX y aumenta un proteoglicano rico en condroitín sulfato llamado agregano, éste es distinto al de etapas precondrogénicas (Kosher et al., 1986b). Además de otras moléculas tales como, la proteína de unión, la proteína de matriz de cartílago (Stirpe y Goetinck, 1989), la colágena tipo XI y la colágena tipo X (Castagnola et al., 1988).

Ahora bien, esta descripción del desarrollo de los condrocitos es válida para todos los tipos de cartílago. Sin embargo, en aquellas regiones donde ocurrirá hipertrofia, se debe añadir que los condrocitos reinician la síntesis de la colágena tipo I; la colágena tipo X (Castagnola et al., 1988) y la fosfatasa alcalina se incrementan. En tanto que la colágena tipo II y el agregano disminuyen su síntesis.

Con base en lo anterior, podemos señalar que los condrocitos durante su proceso de diferenciación llevan a cabo una síntesis activa de las moléculas de la MEC y lo más importante es que la composición de esa MEC cambia a lo largo de este proceso. Por lo tanto, estos fenómenos han favorecido el diseño de modelos experimentales para estudiar la diferenciación de los condrocitos por medio de los seguimientos en los cambios de su MEC.

#### **EL PAPEL DE LOS RECEPTORES DE LA MEC EN LA CONDROGENESIS.**

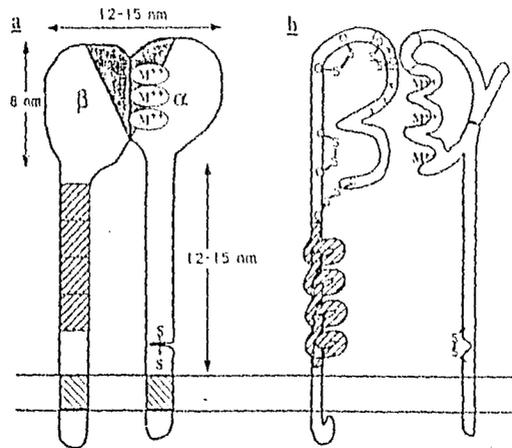
Las interacciones entre las células y la MEC son mediadas por receptores de superficie. Mientras estos receptores se han encontrado bajo una investigación intensa en los últimos años, su papel en la condrogénesis ha recibido poca atención.

Uno de los factores que determinan el estado fenotípicamente diferenciado de una célula es la regulación de los receptores de superficie y su ligando presente en la MEC, la alteración de la afinidad del receptor por su ligando o su degradación selectiva, así como el impedimento estérico de los sitios de unión receptor-ligando. Unos de los componentes de superficie posiblemente implicados en las conexiones transmembranales y que son expresados durante los estadios tempranos del desarrollo de las extremidades son los proteoglicanos ricos en sulfato de heparán, por ejemplo el Sindecano-1 (Solursh et al., 1990) y el Sindecano-3 (Gould et al., 1992). Las moléculas de la MEC interactúan con el citoesqueleto via los receptores localizados en las placas de adhesión de la superficie celular (Alhelda y Buck, 1990; Ruoslahti, 1991).

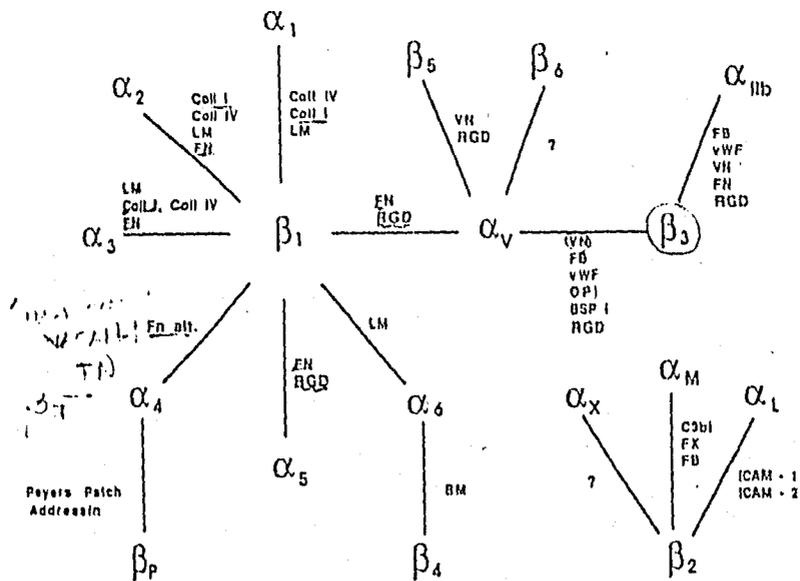
Las integrinas representan otra gran familia de receptores propuestos como los candidatos más probables para mediar el control de la forma celular, el citoesqueleto, así como la adhesión de los condrocitos. Las integrinas son proteínas diméricas presentes en la membrana citoplasmática y están constituidas por una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ . Estos receptores se unen a componentes de la MEC o a ligandos que se encuentran en las membranas de otras células. Las integrinas están constituidas de tres segmentos: un dominio extracelular, uno

transmembranal y otro dominio citoplásmico que se une al citoesqueleto (Fig. 1). Estas interacciones permiten las interacciones específicas de las células con la MEC e informan a las células de la composición de la matriz. Asimismo, las integrinas intervienen en la regulación del comportamiento de las células (Hynes, 1987, 1992; Albelda y Buck, 1990; Ruoslahti y Pierschbacher, 1987, 1991). La familia de las integrinas en los mamíferos está formada por al menos 14 subunidades  $\alpha$  y por al menos 9 subunidades  $\beta$  que se pueden asociar en varias combinaciones (Fig. 2). Las integrinas que constituyen la familia  $\beta_1$  (VLA, genes de activación muy tardía) son las predominantemente responsables para la unión a la MEC. El conocimiento acerca de la regulación de la expresión de las integrinas durante la condrogénesis aún está incompleta. Existen evidencias de que el complejo  $\beta_1$  de las integrinas incrementa conforme las células del mesénquima laxo de las extremidades dejan la proximidad de la cresta apical ectodérmica (Swalla et al., 1991). Asimismo, otros autores han demostrado la presencia de las subunidades  $\beta_1$  y  $\beta_3$  en el cartílago de diferentes especies *in vivo* e *in vitro* (Dür et al., 1993; Enomoto et al., 1993; Shakibaei et al., 1993; Ramachandrupa et al., 1992; Salter et al., 1992; Woods et al., 1991). Por otra parte, el receptor a la fibronectina (RFN) en pollo, constituido por las subunidades  $\alpha_5\beta_1$ , disminuye su expresión durante la condrogénesis (mencionado en Daniels y Solursh, 1991). La modulación de la expresión del RFN se ha reportado en otros sistemas de diferenciación: miogénesis (Menko y Boettiger, 1987), queratinocitos (Adams y Watt, 1990) y adipocitos (Fernández y Ben-Ze'ev, 1989). Esto ha sugerido que las integrinas son las responsables para la unión de los condrocitos a la colágena tipo II, vitronectina y fibronectina (Ramachandrupa et al., 1992; Sommarin et al., 1989). Sin embargo, aún no se conoce cuáles de las cadenas  $\alpha$  participan en esta unión específica de la MEC. Shakibaei (1995) y Salter et al. (1992) proponen como el candidato más prometedor para la unión a la colágena tipo II a la subunidad  $\alpha_3$ , debido a que han observado a esta cadena en tejido de cartílago. Por otro lado, se

ha observado que la integrina  $\alpha_1\beta_1$  es un receptor para colágena tipo I (Enomoto et al., 1993; Ignatius et al., 1990; Kramer y Marks, 1989), la cual está presente antes de la condrogénesis y durante la etapa hipertrófica de los condrocitos. Además, Shakibaei et al. (1995) encontraron una colocalización de las integrinas  $\alpha_1$  y  $\alpha_3$  con las colágneas tipo I y II durante la condrogénesis de cartílago en cultivo de órganos. Por lo anterior, se ha sugerido que tales cambios regulados durante el desarrollo en la expresión de los receptores a la MEC podrían tener funciones importantes en los procesos de diferenciación y estabilización del fenotipo de los condrocitos.



**FIGURA 1.** Representación esquemática de la estructura general de las integrinas. Las integrinas se constituyen por dos subunidades, una denominada  $\alpha$  y la otra  $\beta$ , las cuales se unen mediante la interacción con cationes divalentes. Además, presentan tres dominios citoplasmáticos: uno extracelular, otro transmembranal y uno citoplasmático.



**FIGURA 2.** La familia de las integrinas (tomada de Hay, 1991). Las subunidades de la integrinas que hasta el momento se conocen forman diversos complejos entre las subunidades  $\beta$  y varias cadenas  $\alpha$ . También, se ejemplifican algunos de los ligandos para estas integrinas, así como la especificidad al péptido RGD de algunas integrinas que reconocen esta secuencia. FN, fibronectina; Fn alt, dominio originado por empalme alternativo de la FN; LM, laminina; VN, vitronectina; Coll, colágena; vWF, factor de von Willebrand; FB, fibrinogeno; OP, osteopontina; BSP 1, sialoproteína de hueso 1; ICAM-2, molécula de adhesión intercelular-2; FX, factor X; BM, membrana basal; C3bi, componente del complemento C3bi.

### **JUSTIFICACION.**

Se sabe que los condrocitos pueden ser modulados *in vitro* por el ácido trans-retinoico ( condrocitos-AR) en su programa de diferenciación, de tal forma que se observan diferencias en la síntesis de ciertas moléculas de la MEC, por ello sugerimos también podrían presentarse diferencias en la localización o presencia de los receptores a estas moléculas dentro de una familia de receptores específicos, denominados integrinas.

### **HIPOTESIS.**

La hipótesis de este trabajo implica que los condrocitos sin AR y los condrocitos-AR pertenecen a dos estados diferentes de su diferenciación, al mostrar diferencias en la síntesis de algunas moléculas de la MEC como: colágenas y glicosaminoglicanos (GAG), así como cambios en su morfología, entonces podría darse también cambios en la presencia del tipo integrinas de la familia  $\beta 1$ .

## **OBJETIVOS:**

- El uso de un modelo *in vitro* para la modulación del estado de diferenciación de los condrocitos basado en el cultivo en monocapa de condrocitos aislados de esternón de rata en presencia y ausencia del AR.
- Comparar los cambios de síntesis algunos componentes de la matriz extracelular: colágena tipo I, colágena tipo II y glicosaminoglicanos.
- Realizar pruebas de adhesión celular tanto para los condrocitos sin AR como para los condrocitos-AR, en substratos de colágenas tipo I y tipo II, y fibronectina.
- Identificar y localizar mediante métodos inmunológicos (immunofluorescencia e inmoprecipitación) y bioquímicos (quimioluminiscencia) las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha V$  que forman parte de la familia  $\beta 1$  de las integrinas, tanto en condrocitos sin AR como en condrocitos-AR.
- Correlacionar los cambios de la MEC con los posibles cambios en el tipo de integrinas.

## MATERIALES

Todos los reactivos se obtuvieron de diferentes fuentes.

El medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco-Vögt (DMEM) y el medio de cultivo Ham F-10 libre de sulfatos se compraron en MICROLAB products (México, D.F.). El suero bovino fetal (SBF), fue de HyClone Laboratories Inc (Logan, Utah USA). El ácido trans-retinoico, la tripsina tipo I, la colagenasa tipo II, la heparinasa III, las condroitín 4- y 6-sulfatasa, la condroitinasa ABC, la aprotinina A, el pepstatin A, la leupeptina, la benzamidina, la N-etilmaleimida, el fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), el diisopropilfosfato (DipF), el rojo de Ponceau y la albúmina sérica de bovino (ASB) libre de inmunoglobulinas IgG se compraron en Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). El TRIS [Tris (hidroximetil aminometanol)], LA N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED), se obtuvieron de los laboratorios Bio-Rad (Richmond, CA, USA). El anticuerpo policlonal anti subunidad  $\alpha_1$  (AB1934) se obtuvo a partir de un péptido sintético derivado de la secuencia COOH-terminal (dominio citoplasmático) de la subunidad  $\alpha_1$  de rata y no da reacción cruzada con otras subunidades alfa de las integrinas. Los antisueros para  $\alpha_2$  (AB1936),  $\alpha_3$  (AB1920),  $\alpha_4$  (AB1924) y  $\alpha_V$  (AB1930) se obtuvieron al usar como inmunogénos péptidos sintéticos derivados de la secuencia COOH-terminal (dominio citoplasmático) de cada subunidad alfa de las integrinas humanas, no muestran reactividad cruzada entre cada subunidad alfa y hay reconocimiento con especies de roedores (Ann. Rev. Biochem. 1988. 57:375; Science. 1987. 238:491; Cell. 1989. 56:281-290; Histol. Histopath. 1991. 8:715-723). El anticuerpo anti heterodímero  $\alpha_5\beta_1$  se produjo a partir de un peptido sintético de la región amino terminal de la integrina  $\alpha_5\beta_1$  de rata, no da reacción cruzada con otras integrinas. El anticuerpo policlonal a la proteína colágena tipo I se produjo al usar como inmunogéno colágena tipo I de piel de rata y no cruza con otras colágenas. El anticuerpo policlonal para colágena tipo II se obtuvo a partir de colágena tipo II purificada de cartílago bovino, establece reacción cruzada con especies de roedores y porcino, muestra una especificidad del 100% para colágena tipo II, 0.1% para colágena tipo IX y 3% para colágena tipo XI. Todos los anticuerpos hasta el momento mencionados se compraron en Chemicon International Inc (Temecula, CA, USA). El antisuero para la fibronectina fue producido al usar como inmunogéno fibronectina plasmática de rata y se compró en GIBCO BRL (New York, USA). El anticuerpo policlonal contra  $\alpha_5$  (cys-23mer #161) fue una donación del Dr. Richard Hynes (Howard Hughes Medical Institute, USA), el cual se obtuvo a partir de un péptido

sinéptico correspondiente a los 23 aminoácidos de la región COOH-terminal (dominio citoplasmático) de la secuencia  $\alpha_5$  humana, no muestra reacción cruzada con otras subunidades alfa, establece reacción cruzada con aves y roedores (Hynes et al., 1989). El anticuerpo policlonal  $\beta_1$  fue una donación del Dr. Erkki Ruoslahti (La Jolla, Cancer Center, USA), éste se produjo a partir de un péptido sinéptico de la región COOH-terminal (dominio citoplasmático) de la cadena  $\beta_1$  de integrina humana y mostró reacción cruzada con rata.. Todos los anticuerpos primarios antes mencionados se obtuvieron de sueros de conejos que sirvieron como la especie hospedera. El anticuerpo secundario anti IgG de conejo hecho en cabra y acoplado a fluoresceína, se adquirió en Sigma. El  $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$  con una actividad específica de 286.0 mCi/mM y el Kit de Quimioluminiscencia se adquirieron en Amersham Life Sciences products (Buckinghamshire, England). Las ratas de la cepa Wistar fueron proporcionados por el bioterio de Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

## MÉTODOS

### I. CULTIVO CELULAR.

Los condrocitos se aislaron a partir de esternones de ratas de 35 a 40 días. Los esternones se digirieron con tripsina tipo I preparada en verseno al 0.25% y glucosa al 1%, pH 7.4, a 37°C, durante 30 minutos. Después, se incubaron con colagenasa tipo II preparada en medio de cultivo al 0.25%, a 37°C durante 3 a 4 horas. Las células obtenidas se resuspendieron en DMEM suplementado con 12% de SBF. Por un lado, las células se sembraron a altas densidades,  $6 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Por otro lado, se establecieron cultivos a bajas densidades,  $1.5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> y en presencia del ácido trans-retinoico preparado en alcohol absoluto, 0.5 mg/ml, (mantenido por no más de 15 días a -20°C protegido de la luz) a una concentración final de 10 µM. Las células se mantuvieron a 37°C en una incubadora NAPCO, con una atmósfera de 95% aire-5% CO<sub>2</sub> hasta alcanzar la densidad de confluencia. Los condrocitos en presencia del retinoide se ocuparon sólo si estuvieron en presencia de éste por un mínimo de 8 días de cultivo. Se realizaron cambios de medio cada dos o tres días.

### II. ANALISIS DE LOS GLICOSAMINOGLICANOS SINTETIZADOS *in vitro*.

Para determinar la biosíntesis de los GAG, los cultivos en confluencia en presencia y ausencia del AR se marcaron radiactivamente con Na<sub>2</sub>S<sup>35</sup>O<sub>4</sub> (5 µCi/ml) en medio de cultivo Ham F-10 libre de sulfatos, a 37°C durante 6 horas. Después, el medio se retiró y se lavó dos veces con medio fresco. Para la extracción y purificación de los (S<sup>35</sup>O<sub>4</sub>)-GAG, los cultivos se procesaron de acuerdo a Oohira et al. (1977), sólo con una modificación para precipitar los GAG que se llevó a cabo como lo menciona Kao et al. (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 ( $5 \times 10^5$  cpm/ml) y se degradaron selectivamente con enzimas específicas.

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

**DIGESTION CON LAS CONDROITIN 4-SULFATASA Y 6-SULFATASA.** Cada enzima se preparo a 2.5U/ml en 0.1M de un amortiguador de Tris-HCl a pH 7.3. La reacción se hizo con 10 $\mu$ l de la muestra y 30 $\mu$ l de la enzima. Primero se usó la condroitín 6-Sulfatasa. Ambas enzimas se usaron a 37°C durante 24 horas.

**DIGESTION CON CONDROITINASA ABC.** Esta enzima se preparo a 2.5U/ml en un amortiguador de Tris-HCl a pH 8.0. Se mezcló 10  $\mu$ l de la muestra con 10  $\mu$ l de la enzima, la reacción fue a 37°C por 1 hora y 30 minutos. Esta enzima se usó 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. El número de cpm iniciales ( $5 \times 10^5$ cpm/ml) para las degradaciones enzimáticas se consideró como el 100% y a partir de este porcentaje se calcularon los porcentajes para cada tipo de GAG correspondientes a las cpm de cada degradación enzimática específica.

### **III. PREPARACIÓN DE SUBSTRATOS PARA PRUEBAS DE ADHESIÓN CELULAR.**

Las placas de 96 pozos para cultivo con fondo plano se cubrieron con 35  $\mu$ l de diferentes concentraciones disueltas en PBS de colágena tipo I de piel de cerdo y de colágena tipo II de esternón de rata (ambas colágenas preparadas en ácido acético 5 mM). Las placas se

mantuvieron en agitación suave, durante 48 horas a temperatura ambiente. Los pozos preparados con colágenas, se lavaron tres veces con PBS para eliminar el exceso del ácido acético.

#### **IV. PRUEBAS DE ADHESIÓN CELULAR.**

Los pozos cubiertos con los diferente substratos y sin substratos se bloquearon con 0.1% ASB preparada en PBS, durante 30 minutos a 37°C. Después de bloquear se lavó con PBS. Los condrocitos y los condrocitos-AR cultivados en monocapa, se desprendieron con tripsina. Se resuspendieron en un medio de recuperación de membranas plasmáticas que contenía: DEMEM con 25 mM de Hepes y 0.5% de ASB, por 15 minutos a 37°C. Posteriormente, las células se resuspendieron en medio de cultivo libre de suero y se sembraron a una densidad de  $2 \times 10^4$  células/pozo. Los experimentos control se hicieron: 1) en medio con 12% de SBF, la presencia de los diversos factores séricos fueron necesarios para la adhesión celular sobre plástico (control positivo); 2) en medio libre de SBF sobre plástico (control negativo) y se incubaron a 37°C. Los pozos se lavaron con PBS, las células se fijaron con el fijador de Karnowski por 20 minutos, a temperatura ambiente. Las células adherentes se tiñeron con 1% del azul de toluidina por 24 horas a temperatura ambiente. El exceso del colorante se retiró y se lavó varias veces con agua destilada. El colorante que tiñó a las células adheridas se extrajo con 2% de dodecil sulfato de sodio (SDS). Se midió la absorbencia con un espectro para ELISA a 595 nm. Los experimentos se realizaron en tres ocasiones diferentes por triplicado.

#### **V. INMUNOFLUORESCENCIA.**

Los condrocitos aislados de esternones de rata como ya se mencionó anteriormente, se cultivaron a altas densidades sin el retinoide y a bajas densidades con el retinoide sobre cubreobjetos redondos de vidrio. Al obtener monocapas semiconfluentes, se lavaron con PBS y se fijaron con 2.5% de paraformaldehído por 2 horas o toda la noche en frío. Después de tres

lavados, las monocapas celulares se trataron con 1 mg hialuronidasa/ml de PBS para degradar GAG y hialuronato que estuviesen enmascarando a las integrinas y 12 mg/ml para detectar proteínas de MEC, durante 30 minutos a 37°C. Inmediatamente se lavaron las monocapas, para localizar las subunidades de las integrinas con anticuerpos policlonales que reconocen la región citoplasmática, las células se permeabilizaron con 0.5% de NP-40, por 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavo con PBS. Se bloqueó con 0.1% ASB libre de IgG preparada en PBS, en un tiempo de 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios (1:50), toda una noche a 4°C y una hora a 37°C. Se lavó exhaustivamente y se incubó con el anticuerpo anti IgG de conejo acoplado a la fluoresceína (1:40) por 2 a 4 horas a temperatura ambiente. Se lavó una vez con PBS/0.1% Tween 20 y dos veces con PBS. Después se tiñeron los núcleos con 3 µl Ioduro de propidio/ml en PBS durante 15 minutos, seguido de un lavado con PBS. Se montó con Vectashield. El análisis se efectuó por microscopía confocal.

## **VI. MICROSCOPIA CONFOCAL.**

Las muestras se analizaron con un microscopio de scanning láser confocal (CLSM) que está equipado con una lámpara láser de ion de argón con una fuente de poder de 2-50 mW, dos tubos fotomultiplicadores y una banda de filtros para experimentos de doble marcaje. Las preparaciones de cultivos en monocapa previamente procesadas para inmunofluorescencia (tinción en verde) y marcaje de núcleos con el ioduro de propidium (tinción en rojo), se observaron con el objetivo de 60 x (N.A.=1.0) con aceite de inmersión. Las secciones ópticas fueron tomadas de a través de una a dos capas celulares. Las imágenes se analizaron y aumentaron por medio de un sistema computarizado y fotografiadas con una cámara de 35 mm/lentes 50 mm con película Kodak Ektachrome asa 100.

## VII. MARCAJE DE CÉLULAS ADHERENTES EN MONOCAPA.

Las proteínas de superficie celular de los condrocitos en confluencia sin o con el ácido retinoico, se marcaron con biotina de acuerdo al protocolo del módulo ECL de biotinilación de proteínas, Amersham LIFE SCIENCES, con pequeñas modificaciones. Brevemente, las monocapas celulares se lavaron dos veces con PBS frío. Se adicionó la biotina preparada en un amortiguador de bicarbonato a una concentración de 150 µg/ml. El marcaje se hizo en agitación suave, a 4°C durante 45 minutos. Se retiró la biotina y se lavó como ya se mencionó anteriormente.

## VIII. INMUNOPRECIPITACIÓN.

Las células marcadas con biotina,  $10^7$  células/ml, se lisaron con un amortiguador de extracción que contenía: 50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM de NaCl, 0.5 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 0.5% NP-40 (Marchantio y Hynes, 1988), más una batería de inhibidores de proteasas: 3µg/ml Pepstatin A, 10 µg/ml Leupeptina, 1µg/ml Aprotinina, 2 mM PMSF, 1 mM DipF, 10 mM N-etilmaleimida y 1 mM Benzamidina. La lisis celular fue en agitación, a 4°C por 30 a 40 minutos. Se revisó al microscopio que las células se lisaran completamente. Este extracto se limpió por centrifugación en una microfuga Eppendorf (14,000 rpm) por 10 minutos. El sobrenadante se almacenó a -70°C, hasta su uso. Es importante mencionar, que se debe evitar el exceso de congelación-descongelación, ya que se desnaturalizan las proteínas.

Cada ml del sobrenadante se preincubó con 50 µl de Proteína A-Sefarosa en agitación suave, por una hora a 4°C. Las perlas se sedimentaron en la microfuga por dos minutos a 14,000 rpm. El sobrenadante resultante se usó para las inmunoprecipitaciones.

Las inmunoprecipitaciones se realizaron al añadir 5µl del anticuerpo por cada  $10^6$  células (dilución 1:200), se incubó con agitación suave, dos horas a 4°C. Enseguida, se agregaron 60µl de Proteína A-Sefarosa y se incubó con agitación suave, en frío durante toda una noche.

Después, las perlas de Sefarosa se lavaron cuatro veces con 1 ml del amortiguador de extracción. Finalmente, las perlas se eluyeron en el amortiguador de muestra (0.5M de Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerol, 10% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) de azul de bromofenol) por ebullición a 95°C, durante 10 minutos.

#### **IX. ELECTROFORESIS.**

Las proteínas inmunoprecipitadas se separaron por corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) de acuerdo al método de Laemmli (1970). El gel concentrador fue del 4% y el separador fue del 7%. Como referencia se corrieron marcadores de alto peso molecular: miosina (200,000 Da), beta-galactosidasa (116,000 Da), fosforilasa B (97,000 Da) y albúmina sérica de bovino (66,000 Da).

#### **X. ELECTROTRANSFERENCIA**

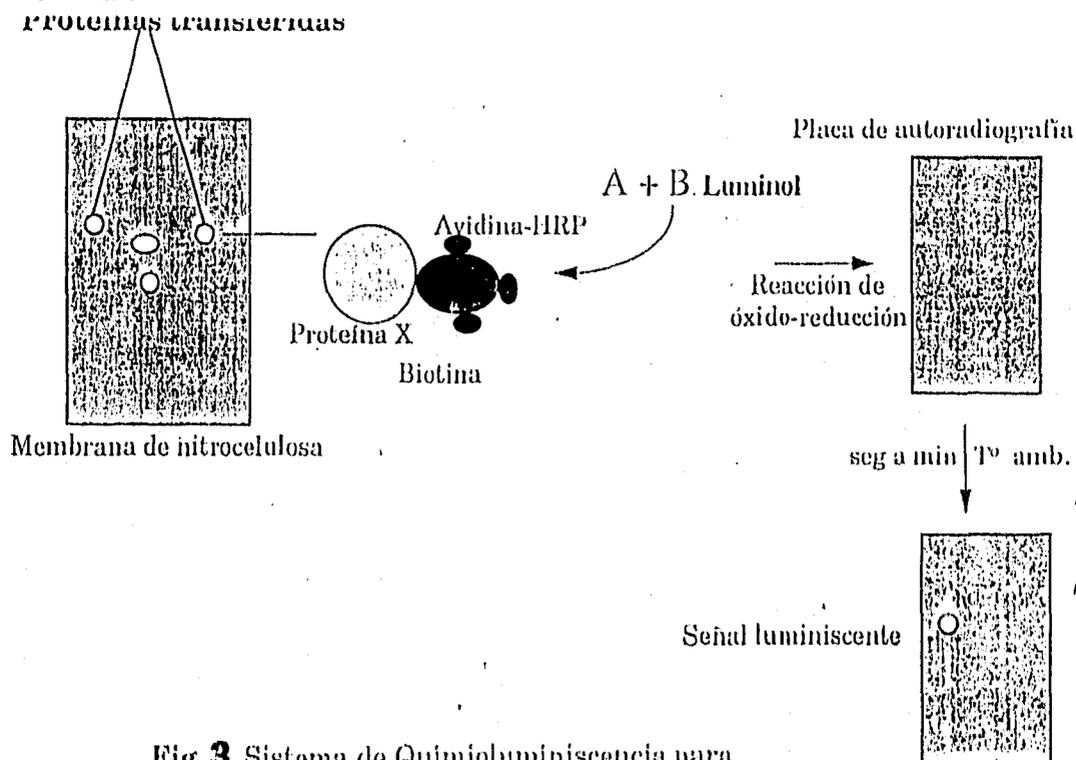
Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (0.45µ) en un aparato para transferencia de Bio-Rad a 300 mA por 8 horas en un amortiguador de 25mM de Tris-Base con 0.192M de glicina y 20% de metanol. Después de transferir, las membranas se tiñeron con el rojo de Ponceau para corroborar las transferencia de las proteínas. La región de los marcadores de alto peso molecular se recortó, se lavó con PBS y se retinó con negro de amida por 10 minutos. Se lavó con 25% isopropanol-10% ácido acético. El resto de la membrana se trató de acuerdo al protocolo de Amersham, con pequeñas modificaciones. En breve, se bloqueó con 8% de leche descremada preparada en PBS/0.1% Tween 20, en agitación suave, en frío toda la noche. Se lavó dos veces con PBS cada uno de 5 minutos y 4 veces con PBS/Tween 20, 15 minutos cada uno.

En seguida, se incubó con el complejo avidina peroxidasa a una dilución 1:1000 en PBS/Tween 20 con 0.1% de ASB, a temperatura ambiente durante una hora. Se lavó como ya se mencionó después de bloquear.

## XI. QUIMIOLUMINISCENCIA

El sistema ECL para biotilación de proteínas resultó una buena opción para la detección de proteínas por quimioluminiscencia. Al usar un marcaje de proteínas de membrana plasmática con un éster de biotina-N-hidroxisuccinamida, la cual se une covalentemente a las proteínas en el sitio amino-terminal. La biotina resulta ser accesible para unirse a la estreptoavidina. Los estudios de los complejos que usan los compuestos bifuncionales han mostrado que se establece una unión estérica entre el complejo biotina-avidina. Esta formación del complejo es más estable. Por lo tanto, al presentar un sistema de estreptoavidina conjugada con peroxidasa de rábano, este complejo a su vez permite catalizar la oxidación del luminol para producir una señal luminosa que se detecta en una placa para autoradiografía (Fig. 3). Este sistema provee una sensibilidad alternativa al marcaje con  $^{125}\text{I}$ -lactoperoxidasa.

Las proteínas inmunoprecipitadas y contenidas en el papel de nitrocelulosa se detectaron de acuerdo al protocolo del sistema ECL para quimioluminiscencia de Amersham LIFE SCIENCES.

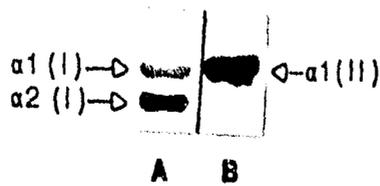


**Fig. 3.** Sistema de Quimioluminiscencia para detectar proteínas en bajas concentraciones.

## RESULTADOS

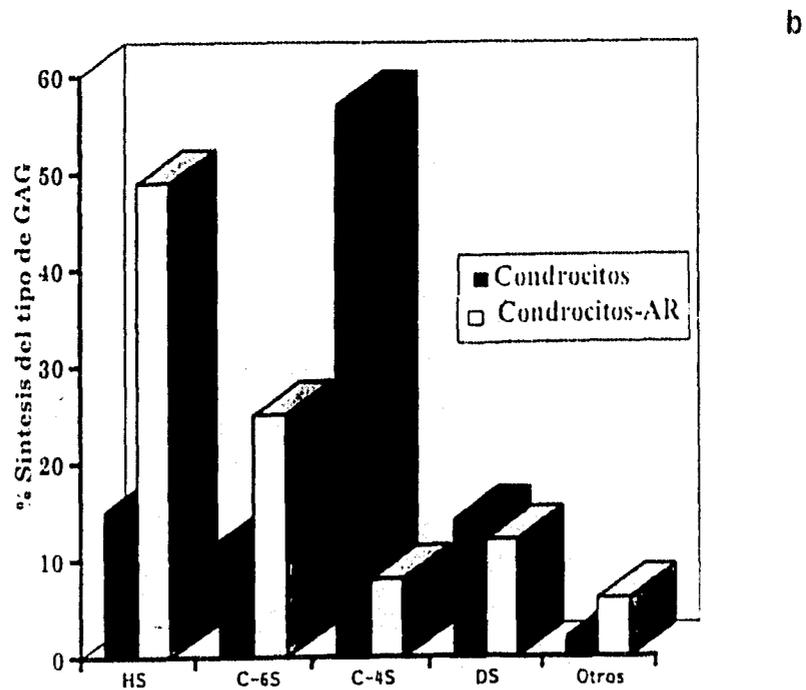
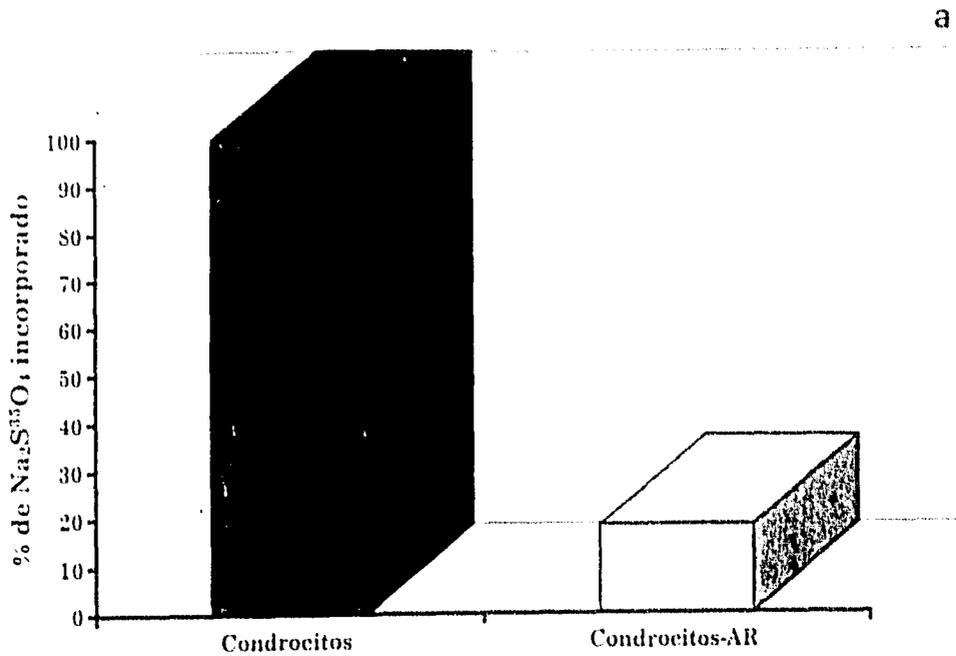
### *I. MODULACIÓN DEL FENOTIPO CONDROCÍTICO POR EL ACIDO RETINOICO.*

En base a las investigaciones realizadas por Benya y Padilla (1986) y trabajos previos en nuestro laboratorio, se ha establecido que existen cambios en el programa de la diferenciación de los condrocitos fenotípicamente diferenciados cuando se aislaron y se cultivaron a bajas densidades ( $1.5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>) en presencia del ácido trans-retinoico. Estas condiciones de cultivo revierten el estado diferenciado de los condrocitos al bloquear la expresión de ciertos componentes de la MEC; por ejemplo, dejan de expresar la colágena tipo II y se induce la síntesis de la colágena tipo I, esto se confirmó mediante inmunotransferencia (Fig. 4). Además, se observan cambios en la síntesis y composición de los glicosaminoglicanos, determinado al llevar a cabo un marcaje con sulfato radiactivo y una degradación enzimática específica para cada tipo de GAG. Los resultados mostraron que los condrocitos no tratados con el AR sintetizaron una gran cantidad de GAG (Fig. 5a), con una mayor síntesis de los GAG ricos en condroitín 4-sulfato (C4-S) (Fig. 5b). Mientras que los condrocitos-AR producen una baja cantidad de GAG (18%) y no predominan el C4-S sino los GAG ricos en condroitín 6-Sulfato y el heparán sulfato (HS) en condrocitos-AR (Fig. 5). Por otro lado, las células pierden su morfología poligonal y adquieren una forma fibroblastoide (Fig. 6). Además, los condrocitos en presencia del retinoide secretan una mayor cantidad de fibronectina (Fig. 7).

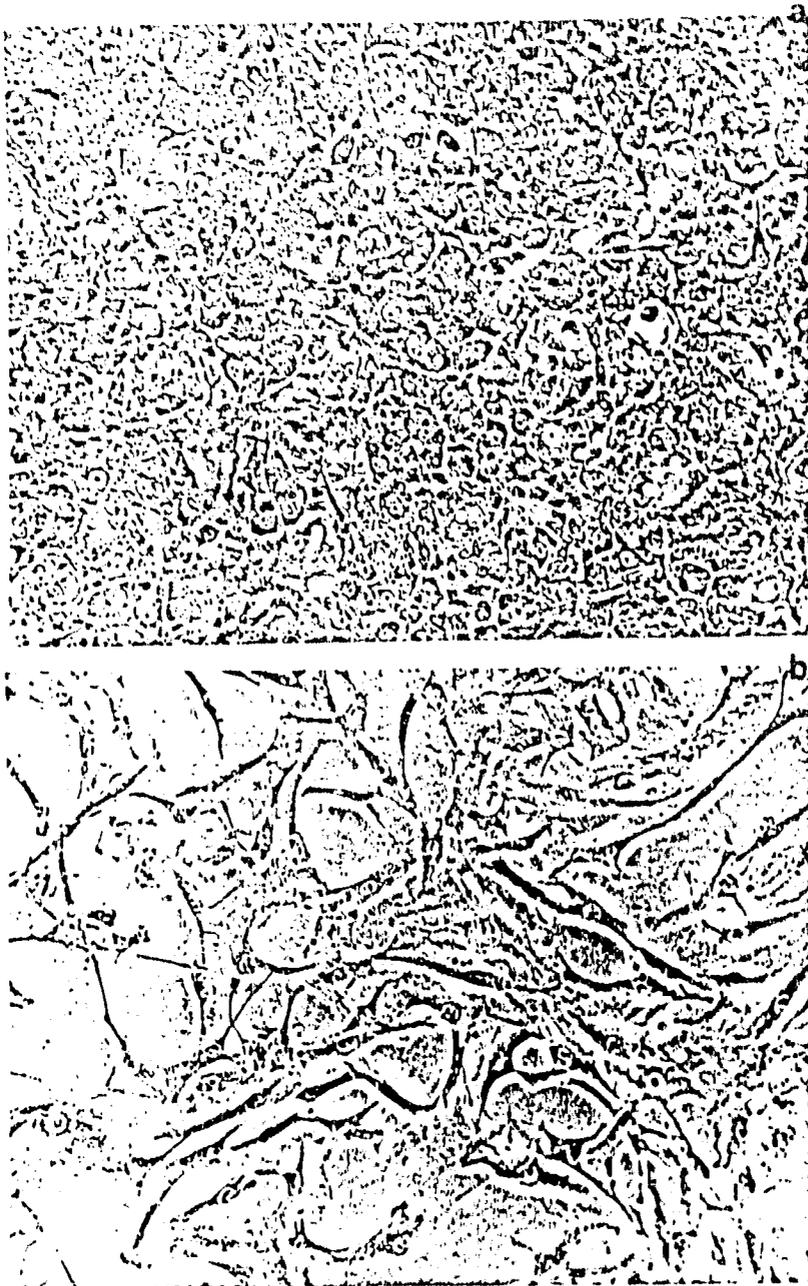


**FIGURA 4.** Se muestra una inmunotransferencia para detectar el tipo de colágena sintetizada. A partir de cultivos en monocapa de los condrocitos los extractos se corrieron en geles SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se hizo una inmunodetección con anticuerpos anti colágena tipo I y anti colágena tipo II. En (A) se observa la presencia de la colágena tipo II, constituida por dos cadenas  $\alpha 1 (II)$  y una cadena  $\alpha 2 (II)$ , en los condrocitos que fueron tratados con el AR, sembrados a una densidad de  $1.5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Note que la cadena  $\alpha II$  se tiñó más porque el anticuerpo tiene mayor afinidad por esta cadena. En (B), se observa la presencia de la colágena tipo II, formada por tres cadenas  $\alpha 1 (II)$ , característica de los condrocitos cultivados a altas densidades en monocapa sin el retinoide.

## Síntesis de Glicosaminoglicanos

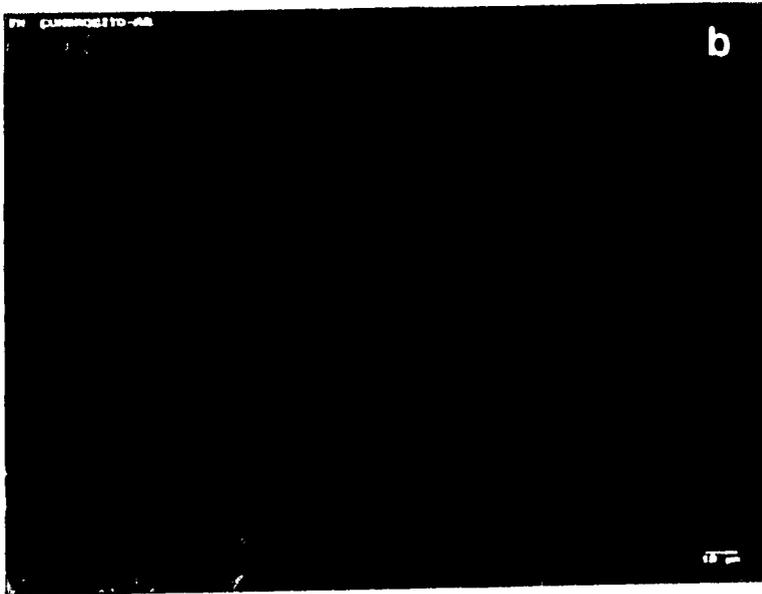
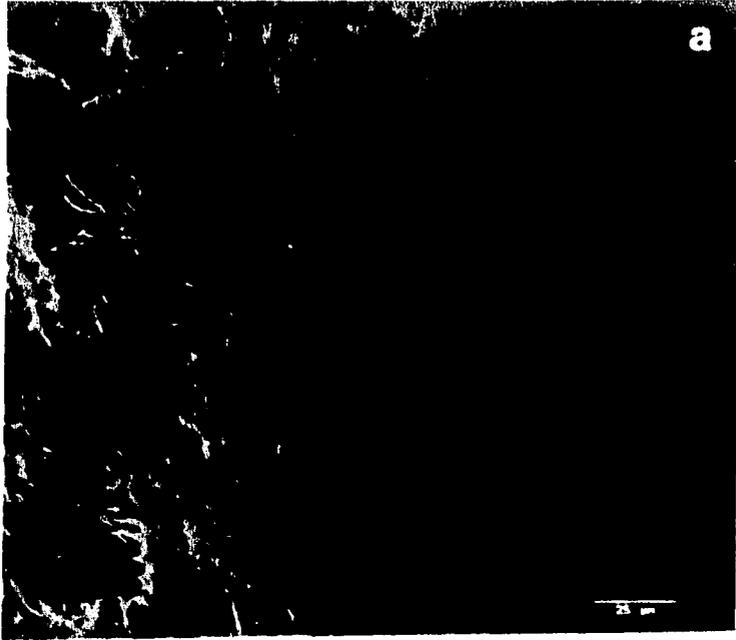


**FIGURA 5.** Gráficas que muestran la biosíntesis de los GAG y los tipos de GAG producidos por los condrocitos en ausencia o presencia del AR. La biosíntesis se determinó mediante un marcaje radiactivo con  $\text{Na}_2\text{S}^{35}\text{O}_4$  (a). Los porcentajes correspondiente a cada tipo de GAG sintetizados por los condrocitos con o sin tratamiento, se determinaron al seguir degradaciones enzimáticas específicas de los ( $\text{S}^{35}\text{O}_4$ )-GAG, para determinar el porcentaje de síntesis del HS=heparán sulfato, C-6S=condroitin 6-sulfato, C-4S=condroitin 4-sulfato, DS=dermatán sulfato y otros en menor proporción (b).



**FIGURA 6.** Micrografías que muestran la morfología poligonal de los condrocitos maduros cultivados en monocapa y en ausencia del AR (a). Los condrocitos cultivados a bajas densidades ( $1.5 \times 10^4$  célula/cm<sup>2</sup>) y en presencia del AR (10  $\mu$ M), adquieren una forma fibroblastoide (b).

**FIGURA 7.** Inmunofluorescencias para detectar la fibronectina de la MEC en condrocitos cultivados en ausencia (a) y presencia del AR (b). Las fibras de fibronectina son más abundantes en los condrocitos-AR.

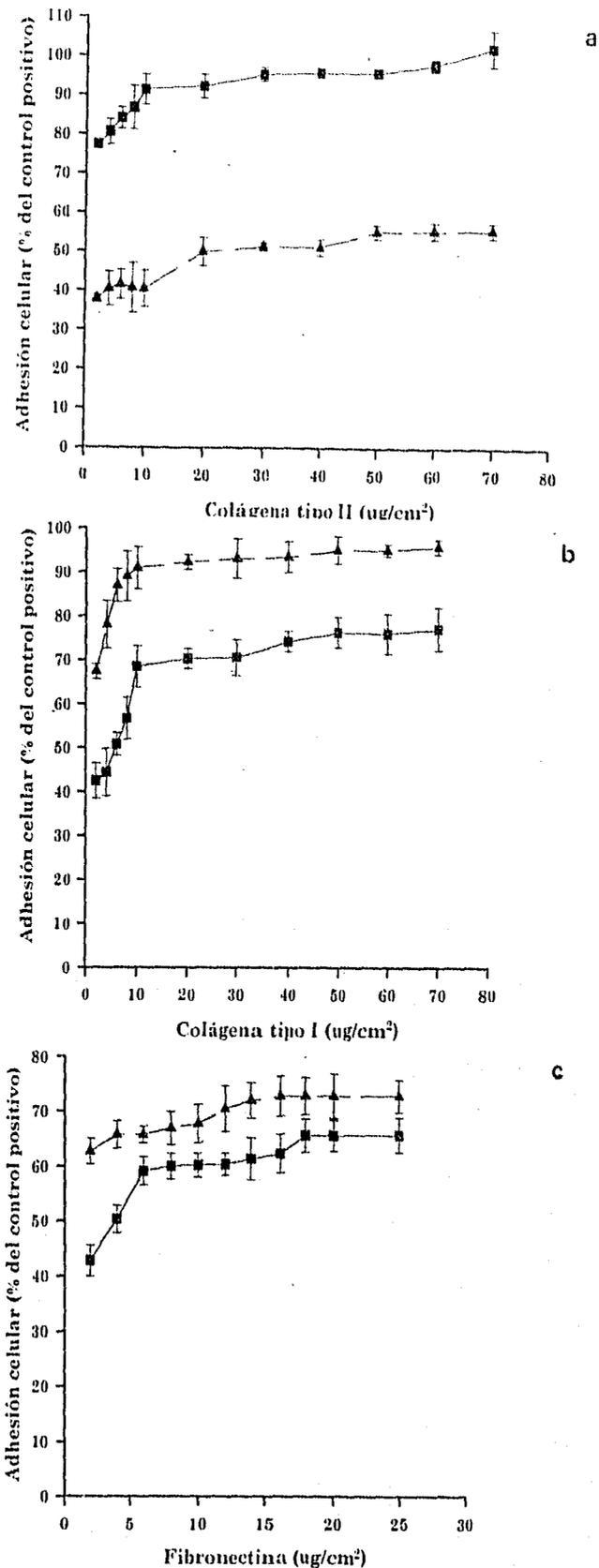


## **II. ADHESIÓN CELULAR.**

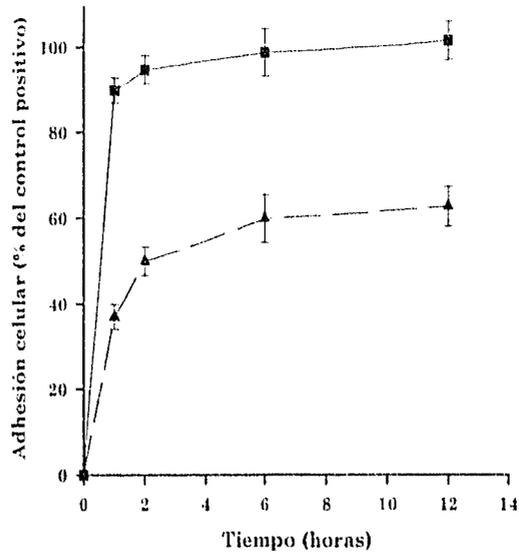
Para conocer la especificidad con que los condrocitos reconocen una MEC, se realizaron pruebas de adhesión celular. Así, tenemos que los condrocitos sin el retinoide y los condrocitos-AR sintetizan diferentes componentes de la MEC. Los resultados demostraron que cuando los condrocitos derivados de cultivos confluentes en monocapa, con y sin tratamiento y sembrados sobre sustratos de colágena tipo II, colágena tipo I y fibronectina, las células exhibieron diferencias en su capacidad de reconocimiento por los distintos sustratos.

Primero, se estableció la concentración óptima de los sustratos para los ensayos de adhesión. Estas primeras pruebas mostraron que desde los 3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de colágena tipo II los condrocitos sin AR alcanzaron un 84% de adhesión; a los 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  se obtuvo un 91% (Fig. 8a). A diferencia, con los condrocitos-AR el porcentaje de adhesión no varió significativamente desde 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (40%) hasta los 70  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  y se mantuvo en general entre un 50-55% de adhesión (Fig. 5a). Los condrocitos sin tratamiento de AR se adhirieron en un 76% en un sustrato de colágena tipo I hasta los 20  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , mientras que los condrocitos-AR se adhirieron en un 90% desde los 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . (Fig. 8b). Por otra parte, la adhesión de los condrocitos sin AR sobre la fibronectina fue casi del 60% entre 6 a 25  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  del sustrato (Fig. 8c). Con los condrocitos-AR se obtuvo una adhesión del 65% al 70% entre 4 y 25  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Fig. 8c). Estos resultados indican que la adhesión celular sobre colágenas y fibronectina fue dependiente del tipo de sustrato. Sin embargo la adhesión sobre colágena tipo II fue siempre mayor en los condrocitos sin AR; mientras que en los condrocitos-AR se observó un comportamiento inverso, cuando se utilizó colágena tipo I como sustrato. No se determinaron diferencias significativas en el caso de la fibronectina.

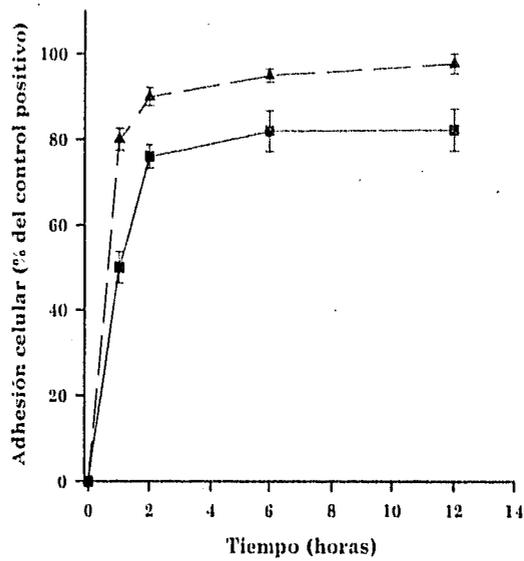
En base a los resultados obtenidos, se realizaron otros experimentos al utilizar la concentración óptima de los sustratos a diferentes tiempos, para ver si se favorecía la adhesión celular. Los resultados, mostraron que el tiempo también fue un factor importante para favorecer la adhesión de las células. Los condrocitos sin tratamiento previo del AR, se adhirieron preferencialmente al sustrato de colágena tipo II, desde 1-2 h de incubación con un 90% y hasta las 12 h 102% (Fig. 9a) y los condrocitos-AR sólo llegaron a un 63% de adhesividad aún a 12 horas de cultivo. A diferencia, en los condrocitos-AR el porcentaje de adhesión nuevamente fue de 90% al 95% desde las 2 primeras horas de incubación sobre colágena tipo I (Fig. 9b); mientras que los condrocitos sin AR se adhirieron en un 82% a las 6 h de incubación. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de adhesión en ambos tipos celulares cuando se utilizó fibronectina como sustrato (Fig. 9c). Estos resultados sugieren que los condrocitos mantienen una relación estrecha con su MEC y que dicha interacción es específica, dependiente del tipo de sustrato y del tiempo de adhesión en cultivo.



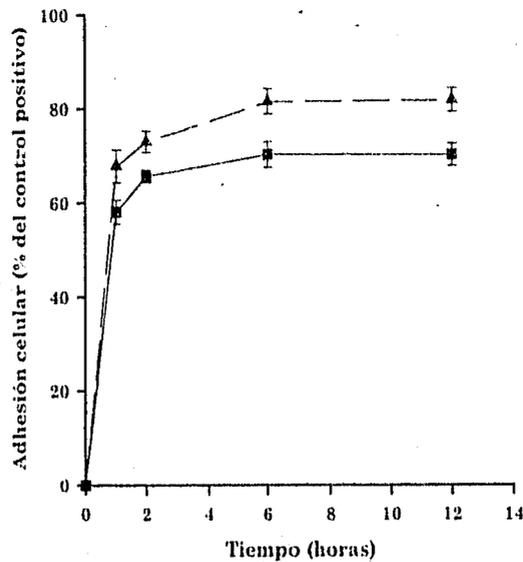
**FIGURA 8.** Los condrocitos en ausencia (■) y presencia del AR (▲), se incubaron en diferentes concentraciones de: (a) Colágena tipo II, (b) Colágena tipo I y (c) fibronectina, durante 120 minutos en medio libre de suero. Los porcentajes se determinaron en base al número de células adheridas sobre plástico en medio suplementado con 12% de SBF, lo cual significó el 100% (control positivo).



a



b



c

**FIGURA 9.** Los condrocitos en ausencia (■) y presencia del AR (▲), se incubaron a diferentes tiempos en medio libre de suero en los sustratos de: (a) Colágena tipo II, 15  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; (b) Colágena tipo I, 15  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; (c) fibronectina, 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Los porcentajes de adhesión se determinaron como se mencionó en la Fig. 8.

### III. LOCALIZACIÓN DE LAS SUBUNIDADES $\alpha$ Y $\beta_1$ POR INMUNOFLUORESCENCIA.

La localización de las integrinas de la familia  $\beta_1$  en los condrocitos fenotípicamente diferenciados y en las células que se revirtieron a un estado más temprano de su diferenciación con el ácido retinoico (condrocitos-AR), resultó interesante al correlacionar los resultados con los cambios en la MEC. Con base en esto se estudió la localización de las diversas subunidades  $\alpha$  que se unen con  $\beta_1$ . Por un lado, la inmunofluorescencia indirecta para  $\beta_1$  evaluada por microscopía confocal indicó la presencia de esta subunidad tanto en los condrocitos con y sin AR se mostró de un modo similar (Fig. 10c y d). Sin embargo, pareciera existir una poza intracelular mayor de la cadena  $\beta_1$  en los condrocitos-AR, cuando se realizaron varios cortes ópticos (fotografías no mostradas).

La tinción para la integrina  $\alpha_1$  sólo fue claramente evidente a nivel de membrana plasmática en los condrocitos tratados con el AR (Fig. 10f) y fue muy escasa en los condrocitos sin AR (Fig. 10e). Los condrocitos-AR dejaron de sintetizar la colágena tipo II y sintetizaron la colágena tipo I. Estos cambios en la composición de la MEC parecieran relacionarse estrechamente con la escasa presencia de  $\alpha_1$  en condrocitos fenotípicamente diferenciados.

Otra evidencia para apoyar nuestra sugerencia en los cambios de las integrinas relacionados con los modificaciones en la MEC en nuestro modelo, fue el detectar claramente por inmunofluorescencia indirecta la presencia de la subunidad  $\alpha_2$  en condrocitos sin AR y escasamente en los condrocitos-AR (Fig. 10g y h). Además, la tinción para  $\alpha_2$  en los condrocitos sin AR se observa de manera puntada, muy bien definida a nivel de la superficie celular y aún más el marcaje parece definirse en sitios específicos de adhesión célula-MEC denominados, contactos focales.

En cuanto a la subunidad  $\alpha_3$  se localizó cualitativamente en mayor proporción en los condrocitos-AR, aunque los condrocitos en ausencia del AR también fueron positivos a esta integrina (Fig. 10i y j). Interesamente en ambos casos se observaron puntos agregados de fluorescencia, que bien podrían corresponder a las regiones de adhesión de las células sobre el sustrato.

Un resultado sorprendente fue la localización de la subunidad  $\alpha_4$  a nivel de membrana plasmática e intracelular en los condrocitos en cultivo sin AR (Fig. 10k). En contraste,  $\alpha_4$  sólo se identificó en vesículas citoplasmáticas de los condrocitos-AR (Fig. 10l).

En lo que se refiere a la subunidad  $\alpha_5$ , por medio de microscopía confocal se localizó cualitativamente en mayor proporción en los condrocitos-AR principalmente a nivel intracelular (Fig. 10n). La cadena  $\alpha_5$  para los condrocitos sin AR se observó en parches (Fig. 10m) y casi no se detectó tinción a nivel intracelular. Para confirmar la localización de la subunidad  $\alpha_5$ , se usó un anticuerpo dirigido al complejo  $\alpha_5\beta_1$ . Las imágenes mostraron que esta integrina se encuentra en ambos tipos de células de manera muy similar (Fig. 10o y p). Además, como en la mayoría de los casos el marcaje se observó en parches.

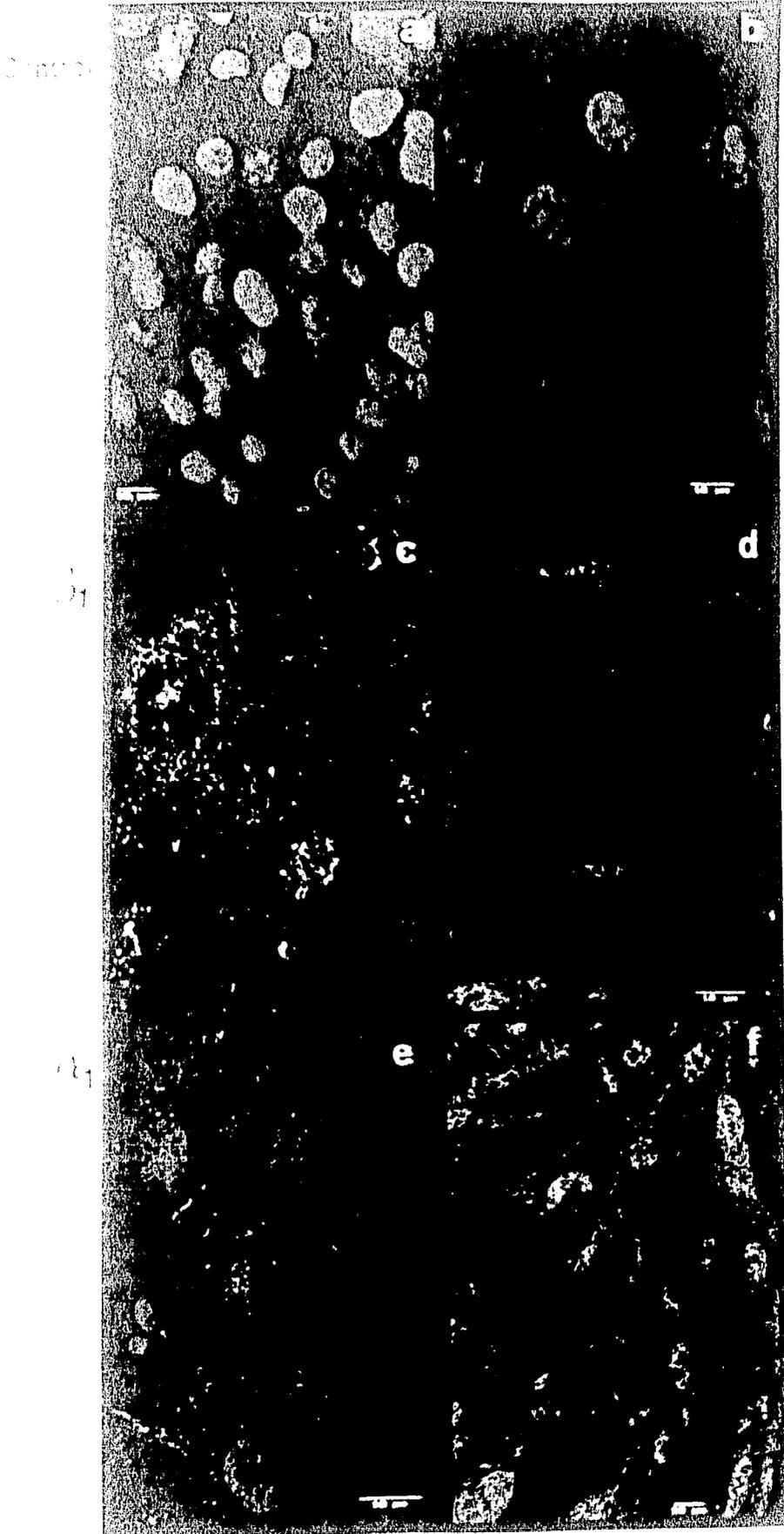
En cuanto a la subunidad  $\alpha_v$ , en los condrocitos sin tratamiento la tinción se observó en parches (Fig. 10q). Por el contrario, en los condrocitos-AR, la subunidad  $\alpha_v$  se inmunolocalizó abundantemente y de una forma muy difusa (Fig. 10r).

**FIGURA 10.** Inmunolocalización de la subunidad  $\beta 1$  y las diferentes subunidades  $\alpha$  que interaccionan para formar los diferentes complejos de las integrinas, de monocapas semiconfluentes de condrocitos maduros en ausencia del AR (columna izquierda) y de condrocitos en presencia del AR (columna derecha). Los anticuerpos primarios que se utilizaron fueron anticuerpos policlonales específicos que reconocen el dominio citoplasmático de cada subunidad, así como un anticuerpo policlonal para la región extracelular del heterodímero  $\alpha 5\beta 1$ . Los controles no se incubaron con el anticuerpo primario, sólo con el anticuerpo secundario acoplado a la fluoresceína (tinción en verde). El marcaje de núcleos se hizo con el yoduro de propidio (tinción en rojo). El análisis se hizo por microscopía confocal, con un máximo de dos cortes ópticos para localizar el marcaje de las integrinas a nivel de superficie e intracelular.



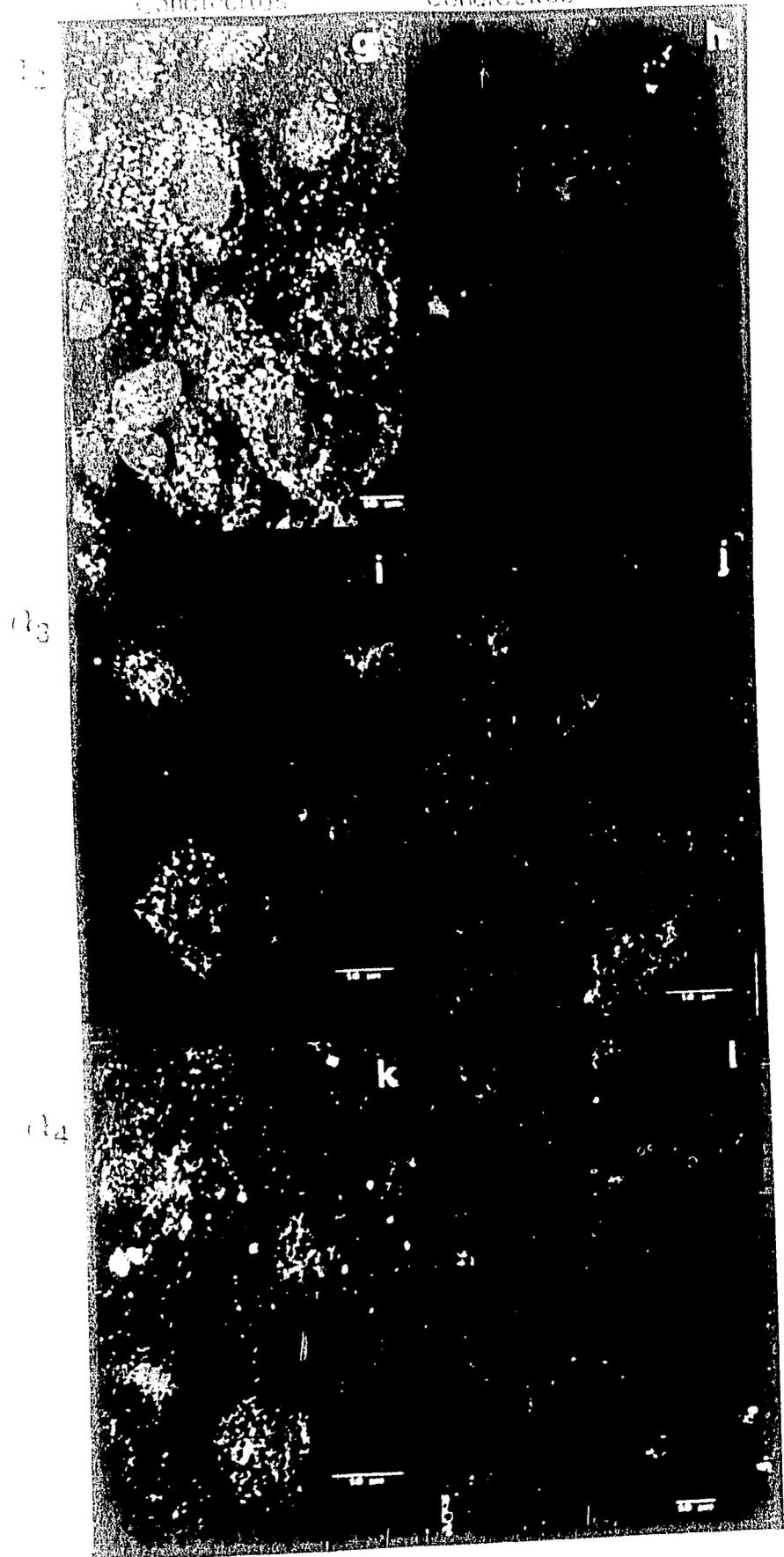
Condrocitos

Condrocitos-AR



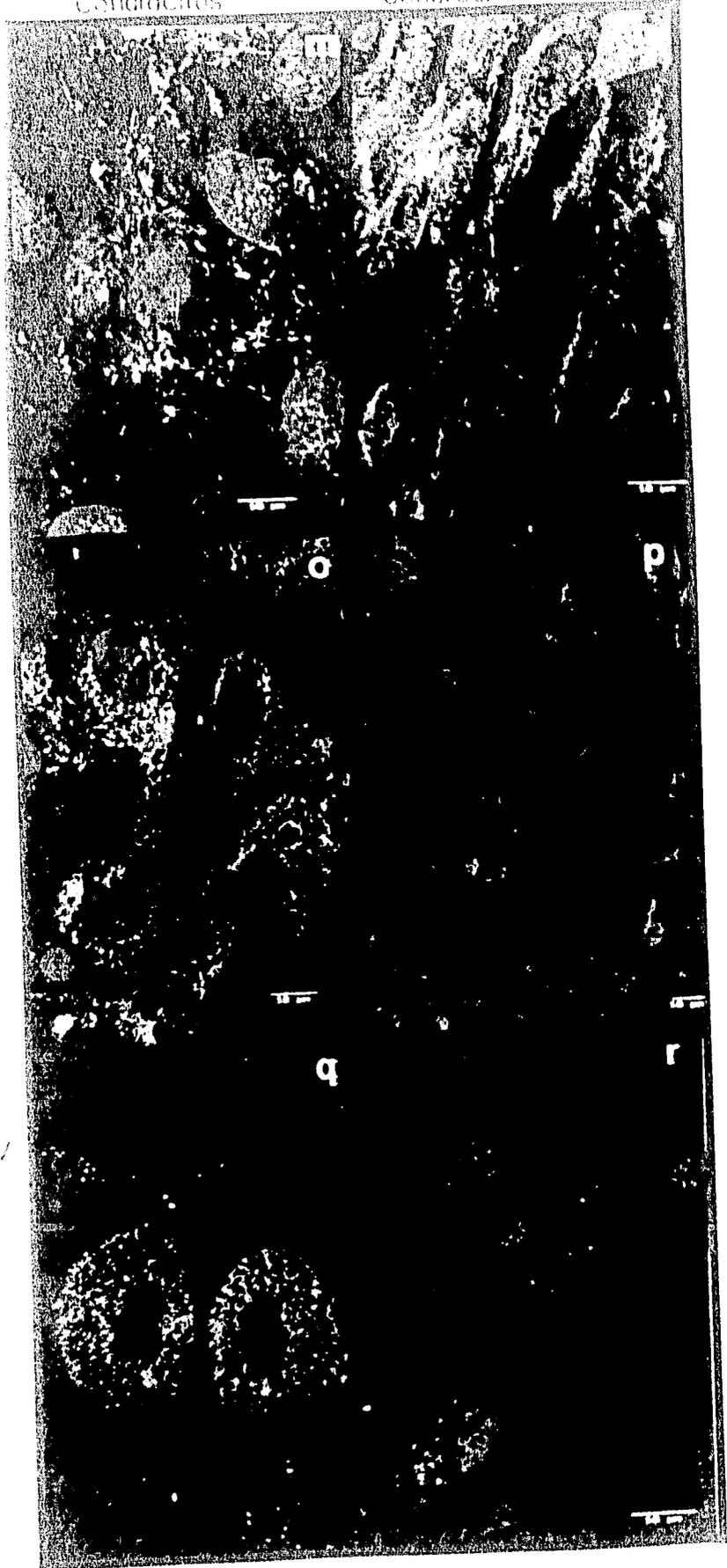
Condrocitos

Condrocitos - AB



Chondrocytes

Chondrocytes-AB



51

154

157

#### **IV. IDENTIFICACIÓN DE LAS INTEGRINAS POR INMUNOPRECIPITACIÓN.**

Para corroborar la presencia o no de las integrinas en los condrocitos y además, comprobar su identificación como proteínas maduras localizadas exclusivamente en la superficie celular, se recurrió al marcaje de las proteínas de superficie celular con biotina y su inmunoprecipitación con los anticuerpos policlonales específicos para cada subunidad de las integrinas.

El análisis semicuantitativo realizado por inmunoprecipitación, electrotransferencia y detección por quimioluminiscencia se presenta en la figura 11.

Con este método se logró identificar la subunidad  $\alpha_1$  en condrocitos sin AR, pero sólo al usar una gran cantidad de muestra en la inmunoprecipitación ( $10^6$  células versus  $2.5 \times 10^5$  células). Este resultado correlacionó con las observaciones por inmunofluorescencia indirecta, en donde se determinó en los condrocitos sin AR poca o nula inmunoreactividad para  $\alpha_1$ . En contraste, con los condrocitos-AR se logró inmunoprecipitar  $\alpha_1$  con un peso molecular (P.M.) de 182 kDa. Además, la subunidad  $\beta_1$  co-inmunoprecipitó con  $\alpha_1$ . Por lo tanto, la inmunotinción y la inmunoprecipitación mostraron que los condrocitos-AR presentaron el heterodímero  $\alpha_1\beta_1$  en la superficie celular.

Por el contrario, la subunidad  $\alpha_2$  al ser inmunoprecipitada, se detectó sólo en condrocitos fenotípicamente diferenciados *in vitro*, con un P.M. de 160-165 kDa. Esto, también correlacionó con las observaciones de microscopía confocal.

Al inmunoprecipitar las subunidad  $\alpha_3$  con un P.M. de 150 kDa y se detectó en ambos tipos celulares, lo cual coincide con los datos de inmunofluorescencia.

Al identificar la subunidad  $\alpha_4$  por inmunoprecipitación, fue determinada sólo en condrocitos sin AR; se identificaron tres bandas. La primera banda coincidió con el P.M. reportado para  $\beta_1$  (120 kDa); la segunda y tercera bandas con P.M. de 150 y 180 kDa, respectivamente.

Esta inmunoprecipitación se llevó a cabo en varias ocasiones para rectificar el hallazgo de la banda de mayor P.M. (180 kDa) y en todas las situaciones la proteína  $\alpha 4$  de 150kDa siempre co-precipitó con la proteína de 180 kDa.

La subunidad  $\alpha 5$  presentó un P.M. de aproximadamente 155-160 kDa, en ambos tipos de células. Asimismo,  $\beta 1$  coprecipitó con la subunidad  $\alpha 5$ . Esta confirmación se obtuvo al inmunoprecipitar con el anticuerpo que reconoce al complejo  $\alpha 5\beta 1$ .

Finalmente, con respecto a la inmunoprecipitación para  $\alpha v$  en los condrocitos sin AR se identificaron 4 bandas con P.M. de: 97 kDa, la cual por su P.M. podría corresponder a la subunidad  $\beta 3$ ; La segunda banda de 120 kDa correspondió a  $\beta 1$  y las últimas bandas de 160 y 175 kDa. La proteína de 160 kDa podría corresponder a  $\alpha v$ , como ya se ha reportado. Por otro lado, en los condrocitos-AR, se encontró claramente que la subunidad  $\alpha v$  inmunoprecipitó con un P.M. de 160 kDa.

## Identificación de las Integrinas en Condrocitos y Condrocitos-AR en cultivo.

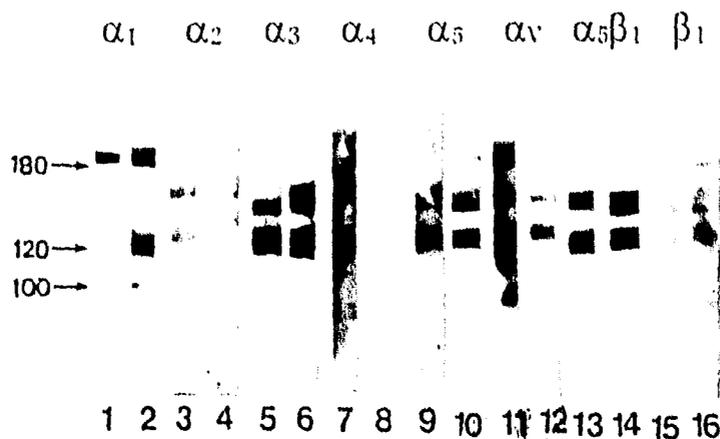


Fig.11. Las diferentes subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , se inmunoprecipitaron por separado (ver materiales y métodos) de condrocitos en cultivo sin AR (1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15) y con AR (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16). Los extractos de la inmunoprecipitación se separaron en geles de 7% PAGE, se transfirieron y se reveló por el sistema de Quimioluminiscencia ECL durante 30 seg a 2 minutos de exposición a temperatura ambiente.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES.

En este trabajo examinamos la identificación de las diferentes subunidades  $\alpha$  que forman heterodímeros con la subunidad  $\beta_1$  de las integrinas, en un modelo *in vitro* en el que podemos modular el fenotipo o estado de diferenciación de los condrocitos derivados de esternón de rata.

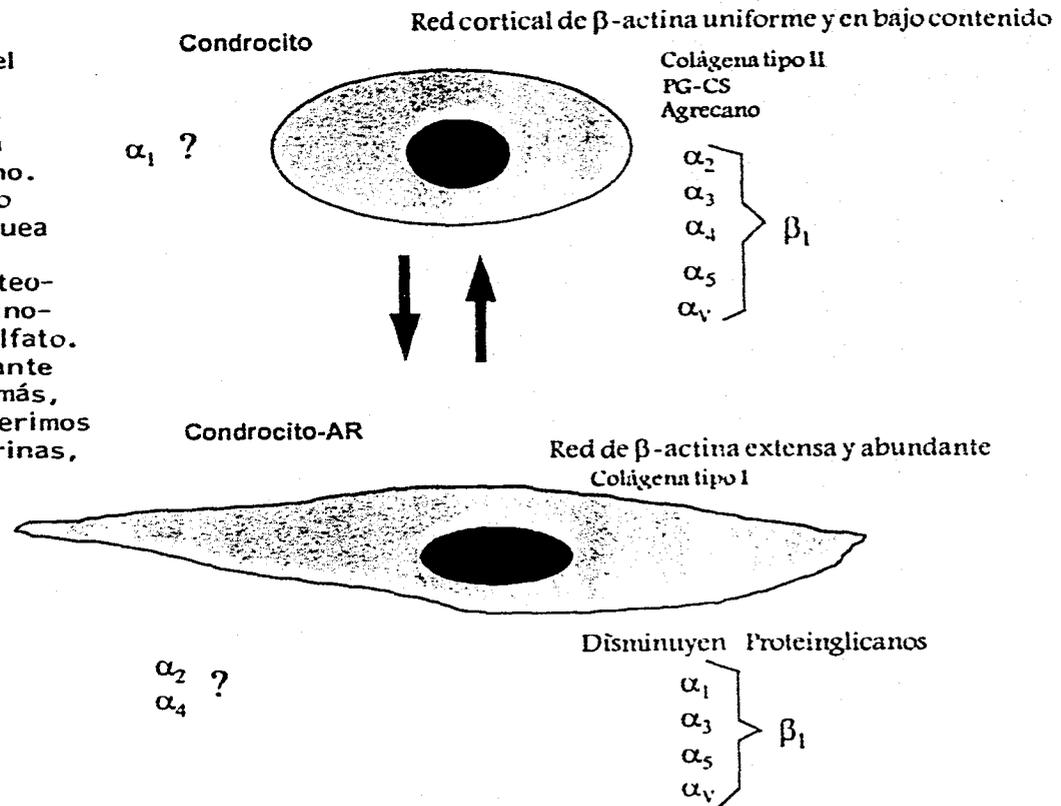
### LOS CONDROCITOS MODULADOS POR EL ACIDO RETINOICO.

En el modelo utilizado en este trabajo, los condrocitos cultivados en monocapa a altas densidades se mantienen fenotípicamente diferenciados como en su tejido *in vivo*. Su morfología es poligonal debido a que los microfilamentos de  $\beta$ -actina se encuentran menos organizados. En estas condiciones, los condrocitos sintetizan su propia matriz con los componentes característicos como la colágena tipo II, el agrecano y otros proteinglicanos ricos en condroitín sulfato, entre otros. Al cambiar las condiciones de cultivo, a baja densidad y en presencia del ácido retinoico (10  $\mu$ M), se modula el fenotipo diferenciado de los condrocitos caracterizado por la producción de colágena tipo II y el agrecano. El AR induce la síntesis de la colágena tipo I y se deja de expresar las colágenas tipo II. También se sabe dejan de expresarse las colágenas tipo IX y tipo XI y el agrecano (Mayne et al., 1984; Vertel y Dorfman, 1979), entre otros. Asimismo, disminuye la síntesis de los GAG y cambia el tipo de éstos; se incrementan los GAG ricos en sulfato de heparán, estos resultados coinciden con los publicados por Shapiro y Poon (1976). Además, de este cambio en el programa de síntesis de los condrocitos, su morfología típica *in vitro* de ser poligonal, cambia a una forma fibroblastoide dado que los microfilamentos de  $\beta$ -actina aumentan y forman una red más organizada. Aún no se

sabe cómo el ácido retinoico influye en los condrocitos para cambiar su patrón de síntesis de proteínas y proteoglicanos. La hipótesis más aceptada hasta el momento, es aquella que considera que el ácido retinoico podría actuar a nivel de la expresión genética; se sabe que el AR interactúa con receptores nucleares, entonces posiblemente el complejo ligando receptor se transloca al núcleo y altera la expresión del genoma (Ong y Chytil, 19759). Recientemente, se aisló un ADNc, el cual fue denominado como una región que codifica para una proteína sensible-al ácido retinoico derivada de cartílago (CD-RAP), a partir de esta sonda de ADNc se ha observado que la expresión de los ARNm para la proteína CD-RAP está presente solamente en cartílago fetal y en líneas celulares derivadas de condrosarcomas de humano y de rata (Dietz y Sandell, 1995). Estos últimos hallazgos nos permiten sugerir que el AR tiene una acción primaria en la expresión bioquímica de los condrocitos y que el cambio en la forma celular es un efecto secundario. Entonces, al contar con un modelo *in vitro* en el que podamos estudiar a los condrocitos maduros (fenotípicamente diferenciados) y a los condrocitos que se asemejan a los condrocitos de etapas tempranas resulta una alternativa para la identificación de otros marcadores condrocíticos y sus posibles funciones en procesos como la diferenciación celular.

Con este modelo *in vitro*, podemos hacer énfasis en que la diferenciación de los condrocitos puede ser modulada por el AR presentandose cambios en los componentes de la MEC y a su vez se originarían cambios en el tipo de integrinas al menos de la familia  $\beta_1$  (Fig. 12). Los condrocitos fenotípicamente diferenciados, presentan en su superficie, las integrinas  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_V\beta_1$  e incluso  $\alpha_V\beta_3$ .

FIGURA 12. Modelo que muestra la modulación del fenotipo condrocítico inducido por el AR. Los condrocitos fenotípicamente diferenciados se caracterizan por sintetizar colágena tipo II, una gran cantidad de proteoglicanos como el agregano. Morfológicamente son ovoides en cultivo. Cuando los condrocitos son tratados con el AR, se bloquea la síntesis de la colágena tipo II y se produce colágena tipo I, disminuyen sus síntesis de proteoglicanos, desaparece el agregano y los glicosaminoglicanos principales son los del tipo heparán sulfato. Los condrocitos-AR muestran un fenotipo semejante al de los condrocitos de etapas tempranas. Además, de los cambios de las moléculas de la MEC, sugerimos que también existe una modulación de las integrinas, receptores de los componentes de la MEC. Esta modulación podría ocurrir simultáneamente en la MEC y las integrinas o no se sabe si el cambio en la MEC lleva a las células a expresar otro tipo de receptores o modular su afinidad por el ligando.



Los condrocitos al ser tratados con el AR, dejaron de mostrar las funciones específicas del estado diferenciado y por el contrario mostraron funciones semejantes a las células condrogénicas en etapa de mesénquima laxo. En los condrocitos modulados por el AR, se identificaron los complejos  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$  y  $\alpha\nu\beta_1$ .

#### **LA ADHESION CELULAR A COLAGENAS TIPO II, TIPO I Y FIBRONECTINA.**

Las pruebas de adhesión celular sugieren que los condrocitos son capaces de reconocer de manera específica una matriz más semejante a la que ellos sintetizan. Los condrocitos *in vivo* sintetizan mayoritariamente colágena tipo II. Los condrocitos fenotípicamente diferenciados en cultivo sintetizan colágena tipo II y se adhieren preferencialmente a un substrato de colágena tipo II. Sin embargo, aunque en menor porcentaje, también pueden interactuar con los substratos de colágena tipo I y fibronectina. Sucede todo lo contrario con los condrocitos-AR, los cuales reconocen con mayor especificidad una matriz de colágena tipo I que una de colágena tipo II. Las diferencias en la capacidad de adhesión al tipo de colágena pudo deberse a la presencia previa de receptores para un determinado substrato. Por otro lado, aunque los niveles de fibronectina disminuyen durante la condrogénesis (Dessau et al., 1980), esta proteína de MEC se ha encontrado en cartílago articular normal (Burton-Wurster et al., 1988). Asimismo, en este trabajo tanto los condrocitos sin AR como los condrocitos-AR sintetizaron fibronectina. Los condrocitos en cultivo podrían sintetizar fibronectina para el establecimiento de una nueva MEC. Por otra parte, los condrocitos al ser expuestos al AR se estimula la síntesis y la acumulación de la fibronectina como ya se ha reportado (Hassell et al., 1978) y como se observó en este trabajo. Sin embargo, se ha demostrado que el efecto del AR no simplemente es por medio de un cambio en la forma celular inducido por la fibronectina, sino que su efecto puede ocurrir vía otro (s) mecanismo (s) (Horton y Hassell, 1986). Además, en nuestros resultados observamos que los condrocitos sin AR y los condrocitos-AR presentaron una capacidad para

adherirse a un sustrato de fibronectina que no fue muy diferente, ésto podría explicarse por la gran variedad de integrinas que pueden unirse a la fibronectina.

## **IDENTIFICACION DE SUBUNIDADES $\alpha$ DE LA FAMILIA $\beta 1$ DE LAS INTEGRINAS EN CONDROCITOS Y CONDROCITOS-AR.**

### **Integrina $\alpha_1\beta_1$**

Se ha demostrado que esta integrina se une a las colágenas tipos I-IV (Kramer y Marks, 1989; Belkin et al., 1990). La subunidad  $\alpha_1$  se encontró escasamente en los condrocitos fenotípicamente diferenciados (condrocitos sin AR) y abundantemente en condrocitos-AR, al hacer el análisis por microscopía. Sin embargo por inmunoprecipitación la subunidad  $\alpha_1$  se identificó en los condrocitos sin AR al usar una muestra correspondiente a  $10^6$  células. Por el contrario, en los condrocitos-AR, la subunidad  $\alpha_1$  inmunoprecipitó con tan sólo  $2.5 \times 10^5$  células y aún más, coprecipitó junto con la subunidad  $\beta_1$ , lo cual muestra que existe el complejo  $\alpha_1\beta_1$  en los condrocitos-AR. El hecho de haber identificado la cadena  $\alpha_1$  en los condrocitos maduros (sin AR) por inmunoprecipitación únicamente al usar un mayor número celular, podría implicar sólo una parte de la población condrocítica expresa esta subunidad, dado que podría existir una heterogeneidad metabólica en un mismo cultivo. Shakibaei (1995) ha reportado la inmunolocalización de  $\alpha_1$  en células provenientes de extremidades embrionarias de ratón y cultivadas en monocapa a baja densidad, estas células morfológicamente son fibroblastoides, aunque no está bien definido si esas células fibroblastoides son exclusivas de una población condrogénica. Asimismo, en otro trabajo reciente con extremidades embrionarias de ratón (12 días) en cultivo de órganos, la integrina  $\alpha_1$  sólo estuvo presente en células mesenquimáticas durante los tres primeros días de cultivo y siempre se encontró marcaje en células de la zona del pericondrio (región en la que residen células precondrogénicas) (Shakibaei et al., 1995).

Por otra parte,  $\alpha_1$  se inmunolocalizó durante la etapa de hipertrofia de los condrocitos (Shakibaei, 1993 y Shakibaei et al., 1995). Se sabe que los condrocitos en etapa de hipertrofia

disminuyen la producción colágena tipo II y sintetizan nuevamente colágena tipo I. También se detectó  $\alpha_1$  por inmunotransferencia en condrocitos aislados de la porción cefálica de esternón de embriones de pollo (14 días) y cultivados en agarosa (Enomoto et al., 1993). Los condrocitos de esternón, pero sólo de la región cefálica experimentan hipertrofia para posteriormente ocurrir la osificación.

Los datos en este trabajo con los condrocitos-AR y los de otros autores se observa que la presencia de la cadena  $\alpha_1$  de las integrinas coincide con el momento de síntesis de colágena tipo I. Sin embargo, no podemos descartar la presencia de la subunidad  $\alpha_1$  en los condrocitos maduros *in vivo* y su posible ligando. Muy recientemente, se ha reportado la localización de la laminina y la integrina  $\alpha_6\beta_1$  en cartílago en la zona de maduración (von der Mark, 1996), lo cual es interesante porque no se había establecido la presencia de esta proteína en tejido de cartílago. Se sabe que a parte de la integrina  $\alpha_6\beta_1$  también la integrina  $\alpha_1\beta_1$  se une a la laminina y esto podría explicar con nuestra identificación de  $\alpha_1$  en los condrocitos maduros.

#### **Integrina $\alpha_2\beta_1$**

Esta integrina ha sido reportada como un receptor para colágenas tipos I-IV (Kramer et al., 1989; Staatz et al., 1989; Santoro et al., 1988; Wayner et al., 1988), laminina (Languini et al., 1989), posiblemente fibronectina (Kirchhofer et al., 1990) y recientemente para colágena tipo II (Puckwell et al., 1994; Wu y Santoro, 1994; Enomoto et al., 1993).

La inmunolocalización para la subunidad  $\alpha_2$  fue claramente positiva en condrocitos sin AR y aparentemente negativa en condrocitos-AR. Además, en los condrocitos sin AR se localizó en la superficie celular, aún cuando el anticuerpo utilizado al reconocer la región citoplasmática podría haber teñido la poza intracelular como ocurrió con otras subunidades  $\alpha$ .

Los datos que apoyan la sugerencia de que la colágena tipo II sea un ligando para la integrina  $\alpha_2\beta_1$  son: la inmunoprecipitación de  $\alpha_2$  en este trabajo ocurrió sólo en los condrocitos

sintetizadores de colágena tipo II. Staatz et al. (1991), localizaron el sitio de unión para  $\alpha_2\beta_1$  dentro de la cadena  $\alpha_1$ [I]CB3 al péptido KDGEA, el cual fue capaz de inhibir la interacción plaqueta-colágena, aunque en una alta concentración. La colágena tipo II muestra una homología considerable a la colágena tipo I y la secuencia correspondiente en colágena tipo II es KDGET. Otra evidencia para una participación de  $\alpha_2\beta_1$  en la interacción con colágena tipo II, se obtuvo de extractos con detergente de condrocitos aislados de épifisis de bovino fetal pasados por una columna de Sefarosa-colágena tipo II, identificándose en una fracción la integrina  $\alpha_2\beta_1$ . El análisis por inmunoprecipitación de las proteínas eluidas con anticuerpos anti- $\beta_1$  o anti- $\alpha_2$ , revelaron la identificación de las dos subunidades (Dürr et al., 1993). Por otro lado, Enomoto et al. (1993) sugirieron que una subunidad de 145 kD capaz de formar un complejo con  $\beta_1$  y mediante una cromatografía de afinidad, podría ser el receptor crítico para colágena tipo II al menos en condrocitos en cultivo. Esta subunidad de 145 kD reconocida en el trabajo de Enomoto et al., podría corresponder a las subunidades  $\alpha_2$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_6$ ,  $\alpha_7$  y  $\alpha_V$ . La integrina  $\alpha_2\beta_1$  se ha descrito como un receptor de colágena (Wayner y Carter, 1987; Staatz et al., 1989; Languino et al., 1989), mientras  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_7\beta_1$  y  $\alpha_V\beta_1$  se unen a otros ligandos diferentes de colágena (Vogel et al., 1990; Rosen et al., 1992). Por lo tanto, Enomoto et al. sugieren que la proteína de 145 kDa debe ser  $\alpha_2$ . En otro trabajo en el que se utilizó tejido de cartílago embrionario de ratón, los condrocitos maduros exhiben una señal para el ARNm de  $\alpha_2$ , asimismo para la proteína correspondiente a un P.M. de 165 kDa (Wu y Santoro, 1994). El trabajo de Wu y Santoro coincide con nuestros resultados, ya que la inmunoprecipitación que nosotros realizamos para la cadena  $\alpha_2$  también presentó un P.M. de 160-165 kDa. Las diferencias entre los P.M. podrían deberse a cambios en la glicosilación de esta proteína, lo cual a su vez podría depender del estado de diferenciación de los condrocitos o bien del tipo de cartílago estudiado.

### **Integrina $\alpha_3\beta_1$**

Se ha reportado que es un receptor de colágena, laminina y fibronectina en su dominio RGD (Wayner y Carter, 1987; Takada et al., 1988; Gehlsen et al., 1989). También, se ha encontrado en contactos célula-célula en una variedad de células (Kaufmann et al., 1989). La localización de  $\alpha_3$  mediante el análisis por microscopía, no mostró una diferencia clara entre condrocitos sin AR y condrocitos-AR. Por otro lado, mediante inmunoprecipitación la cadena  $\alpha_3$  coprecipitó con la subunidad  $\beta_1$ , en ambas condiciones condrocitos sin AR y condrocitos-AR. Entonces,  $\alpha_3\beta_1$  pareciera no mostrar algún cambio en abundancia o distribución en los condrocitos fenotípicamente diferenciados o modulados por el AR. Esto sugiere que puede haber una variedad de ligandos, y podrían completar múltiples funciones en el desarrollo de los condrocitos. La subunidad  $\alpha_3$  se ha identificado durante la formación de agregados celulares (Shakibaei et al., 1995) y en condrocitos fenotípicamente diferenciados de cortes histológicos y de cultivo (Shakibaei et al., 1995; Enomoto et al., 1993; Salter et al., 1992). Pero, Dürr et al. (1993) no localizó  $\alpha_3$  en cartílago. Las discrepancias entre nuestros resultados y los de otros autores podrían deberse tanto a las diferencias en las especies y posiblemente a los diversos enmascaramientos de las cadenas  $\alpha_3$  por los proteoglicanos, así como a las distintos métodos (es decir, se hizo un pretratamiento con hialuronidasa en Dürr et al. y en nuestro laboratorio, tripsina en Enomoto et al., y colagenasa en Shakibaei et al.) y a las diferentes técnicas de cultivo.

### **Integrina $\alpha_4\beta_1$**

La subunidad  $\alpha_4$  de la integrina puede asociarse con las subunidades  $\beta_1$  o  $\beta_7$ . Algunos tipos celulares se adhieren al sitio CSH (sitio de unión a la heparina o también llamado segmento conector), un dominio de empalme alternativo de la fibronectina, via  $\alpha_4\beta_1$  (Wayner et al., 1989; Guan y Hynes, 1990). La información de  $\alpha_4\beta_1$  y  $\alpha_4\beta_7$  ha sido obtenida de los leucocitos, porque es

en estas células donde se expresan abundantemente. Un estudio más reciente demostró que  $\alpha_4\beta_1$  funciona como un contrarreceptor para VCAM-1 (Wayner et al., 1989). Por lo cual, se ha sugerido que  $\alpha_4\beta_1$  podría estar implicada en las adhesiones celulares homotípicas. Esta última actividad es independiente del estado de activación de la célula y de la fibronectina, pero dependiente de cationes divalentes (Campanero et al., 1990; Letarte et al., 1993; Bednarczyk et al., 1993).

En este trabajo,  $\alpha_4$  se localizó abundantemente en los condrocitos a ausencia del AR, a nivel de superficie y esto se confirmó por inmunoprecipitación. Asimismo, como ocurrió con otras subunidades alfa, otra proteína co-precipitó junto con  $\alpha_4$ , la cual corresponde a  $\beta_1$ . Sin embargo, cabe señalar que la banda para  $\alpha_4$  si corresponde con el P.M. reportado para esta proteína (150-160 kDa), pero se observó otra banda de 180 kDa. Se ha reportado que  $\alpha_4$  es muy versátil porque puede localizarse en forma madura en la superficie celular como una proteína intacta de 150 kDa y a su vez puede segmentarse en dos formas una de 80 kDa y otra de 70 kDa. Además, se ha reportado que la subunidad  $\alpha_4$  puede establecer un rearrreglo conformacional, dependiente de ciertas cisteínas críticas y cationes divalentes, lo cual provoca una migración en geles de SDS-PAGE con un P.M. mayor, de 180 kD (Parker et al., 1993). Entonces, esa última banda observada en nuestra placa revelada por quimioluminiscencia, pareciera correlacionar por su P.M. a una modificación de  $\alpha_4$ . Además, estos resultados se apoyan por la ausencia de  $\alpha_4$  en forma madura en los condrocitos-AR; únicamente la inmunotinción pareció indicar la presencia de  $\alpha_4$  a nivel intracelular.

Finalmente, queda una gran puerta abierta para confirmar estos resultados, así como para elucidar el ligando para  $\alpha_4\beta_1$  en condrocitos diferenciados. Como ya se ha mencionado  $\alpha_4\beta_1$  es un receptor para una región no RGD, CSII, de la fibronectina en distintos tipos celulares. Asimismo,  $\alpha_4\beta_1$  puede funcionar como un contrarreceptor para VCAM-1.

### **Integrina $\alpha_5\beta_1$**

En cualquier tipo celular se ha encontrado que el ligando para  $\alpha_5\beta_1$  es el dominio de unión central de la fibronectina, es decir, en el péptido RGD (Adams y Watt, 1990; Hynes, 1987; Wayner et al., 1989).

La subunidad  $\alpha_5$  se identificó tanto en condrocitos sin AR, así como en condrocitos-AR; sin embargo, los condrocitos-AR se inmunotñieron más fuertemente a nivel intracelular y la integrina  $\alpha_5\beta_1$  se identificó por inmunoprecipitación en ambos casos. Asimismo,  $\alpha_5$  y  $\beta_1$  se han localizado en condrocitos en cualquier estado de su desarrollo, aunque los resultados de inhibición para  $\alpha_5$  fueron mayores para los condrocitos de etapas tempranas (Dürr et al., 1993). Está bien establecido que en los cultivos de condrocitos-AR se incrementa la fibronectina, lo cual coincide con una mayor localización cualitativa de  $\alpha_5$ . Aunque la capacidad de adhesión a la fibronectina por los condrocitos sin AR así como por los condrocitos-AR, es similar, ésto podría indicar una redundancia de receptores para un mismo ligando, lo cual puede ocurrir en los condrocitos independientemente de cualquier estado de su diferenciación.

### **La subunidad $\alpha_V$**

Esta subunidad puede formar heterodímeros con  $\beta_1$ ,  $\beta_3$  o  $\beta_5$  y puede participar en la unión a vitronectina, fibronectina, osteonectina y trombospondina, entre otras proteínas (Hay, 1993). El análisis de inmunolocalización de  $\alpha_V$  tanto en condrocitos sin AR como en condrocitos-AR fue positivo. Por otra parte, el análisis por inmunoprecipitación proporcionó una información adicional. En los condrocitos sin AR, junto con  $\alpha_V$  coprecipitaron otras proteínas, las cuales de acuerdo a su P.M. corresponderían a la subunidad  $\beta_1$  y otra banda a  $\beta_3$ . Sin embargo, no podemos concluir con qué grado o en qué relación se forman los heterodímeros  $\alpha_V\beta_1$  y  $\alpha_V\beta_3$ . En los condrocitos-AR, sólo se observaron las bandas para  $\alpha_V$  y  $\beta_1$ .

Ahora bien, cuáles serían los posibles ligandos para ambas integrinas y en ambas condiciones. Se sabe que el complejo  $\alpha_v\beta_1$  es un receptor para la región RGD de la fibronectina y  $\alpha_v\beta_3$  es un receptor para vitronectina. La posible presencia de  $\alpha_v\beta_3$  en la MEC de los condrocitos diferenciados, sugiere la de la presencia de la trombospondina o que se un receptor alternativo para la fibronectina.

De acuerdo a la localización de las integrinas estudiadas en los condrocitos en diferentes condiciones y al relacionar ésto con algunos componentes de la MEC, se puede sugerir algunos ligandos para dichos receptores:

Integrina	CONDROCITOS SIN AR Ligando	CONDROCITOS-AR Ligando
$\alpha_1\beta_1$	LM ? u otro	Colg. I
$\alpha_2\beta_1$	Colg. II u otro	-----
$\alpha_3\beta_1$	FN (RGD) u otro	FN (RGD) u otro
$\alpha_4\beta_1$	FN (CSII)	-----
$\alpha_5\beta_1$	FN (RGD)	FN (RGD)
$\alpha_v\beta_1$	FN	FN
$\alpha_v\beta_3$	VN, TBP	-----

LM = laminina

Colg. = colágena

FN = fibronectina

TBP = trombospondina

CSII = Sitio de unión a la heparina

VN = vitronectina

RGD = péptido Arg-Glis-Aspártico

Nuestros resultados obtenidos en los condrocitos fenotípicamente diferenciados muestran un perfil semejante al de otros sistemas. Por ejemplo: el de condrocitos de pollo (Enomoto et al., 1993), en el cartílago de extremidades embrionarias de ratón (Shakibaei et al., 1995) y de la línea celular de condrosarcoma humano, HCS-2/8, (Fueckwell et al., 1994), en el que presentan las subunidades de las integrinas  $\beta_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_5$  y  $\alpha_v$ . Por otra parte los condrocitos-AR que muestran funciones similares a la de los condrocitos de estadios más tempranos (mesénquima laxo), presentaron las cadenas  $\beta_1$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_v$  y no así  $\alpha_2$  ni  $\alpha_4$ . Esto último parece coincidir con

datos reportados en los modelos de Shakibaei et al. (1993, 1995) y Enomoto et al. (1993). Entre otros estudios de condrocitos, por ejemplo en condrocitos articulares de humano, se expresan las integrinas  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$  pero no  $\alpha_2\beta_1$  ni  $\alpha_4\beta_1$  (Salter et al., 1992). Estas diferencias podrían ser parcialmente explicadas por las técnicas usadas: Salter et al. determinaron las integrinas por inmunohistoquímica de cortes de tejido congelado, en el cual el enmascaramiento de antígeno (s) es un problema potencial, mientras que técnicas de tratamiento enzimático para degradar componentes abundantes en la MEC, permeabilización de células, inmunoprecipitaciones e incluso el análisis por FACS, usadas aquí (excepto FACS), en Enomoto et al. y por Tuckwell et al. son vías más factibles para la localización de las integrinas. Además, es importante mencionar que hasta el momento los diferentes trabajos de integrinas en condrocitos aislados e *in situ* varían los tipos de fuentes de donde se obtienen para cultivarlos o de donde se hacen cortes de cartílago, así como de diferentes estadios de desarrollo de los condrocitos, lo cual es un factor central para explicar las diferencias en algunos de los resultados.

Otro factor importante en el estudio de receptores, es la estructura conformacional del ligando o la integrina. Por ejemplo, la importancia de la estructura de la colágena en la adhesión celular ha sido reconocida para colágena tipo II, IV y VI (Schor y Court, 1979; Aumailley et al., 1989; Tuckwell y Humphries, 1994), y más recientemente para colágena tipo II nativa se muestra que su receptor tipo integrina es  $\alpha_2\beta_1$  y para colágena tipo II desnaturalizada los condrocitos se adhieren a ésta por un nuevo puente de  $\alpha_5\beta_1$  (Tuckwell et al., 1994).

En algunas ocasiones resulta difícil poder correlacionar los resultados en cuanto a la especificidad de una integrina por su ligando, ya que está bien definido que esta familia de receptores son verdaderamente versátiles. En general, una misma integrina puede unirse a más de un tipo de ligando, aunque esto puede ocurrir en momentos distintos del desarrollo, en un

misma población celular o también dependiente del tipo celular. Por otro lado, el que las células presenten varias integrinas con diferentes especificidades de unión a un mismo ligando parecería ser una estrategia de redundancia de receptores, algo importante para fenómenos como la adhesión celular; sin embargo, también se ha observado que si dos integrinas unen al mismo ligando no necesariamente sirven para funciones idénticas en una misma célula, sino pueden regular diferentes señales. Por ejemplo, se sabe que la información codificada en varios de los dominios de la fibronectina pueden ser reconocidos por una misma célula, los receptores de superficie como las integrinas deben ser capaces de detectar e integrar las diversas señales originadas de la interacción con la fibronectina.

La actividad funcional de las integrinas es estrictamente regulada por al menos dos mecanismos principales, uno cualitativo y uno cuantitativo (Hynes, 1992). La activación cualitativa implica cambios conformacionales (añado a la estimulación por agonistas y/o unión al ligando) en integrinas sin alteraciones significativas en el nivel de expresión, lo cual se ha observado con las integrinas de las subunidades  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  (Chan et al., 1991; Hynes, 1992; Wright y Meyer, 1986). La regulación cuantitativa de la función de las integrinas es modular su nivel de expresión, esto se puede ejemplificar por una movilización rápida de las integrinas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  del acervo intracelular a la membrana plasmática de plaquetas en respuesta a la estimulación de la trombina (Wencel-Drake et al., 1986). Para algunos heterodímeros de las integrinas, ambos mecanismos podrían operar para una regulación fina de su actividad biológica.

En conclusión nosotros hemos encontrado que existen diferencias al menos cualitativa y semicuantitativamente para algunas subunidades  $\alpha$  e incluso de la cadena  $\beta_1$ , tanto a nivel intracelular ( $\alpha_5$  y  $\beta_1$ ) como a nivel de superficie (por ejemplo,  $\alpha_2$  y  $\alpha_4$ ). Esto nos hace sugerir que en nuestro modelo, existe una modulación de las integrinas en los condrocitos dependiendo de su estado de diferenciación celular.

Además, hemos obtenido evidencia de que las integrinas podrían ser otros marcadores para el seguimiento de la diferenciación de los condrocitos. Se ha demostrado que los componentes de la MEC cambian, así como las subunidades de las integrinas se expresan de manera diferente y su distribución se modifica en condrocitos modulados por el AR con características de células mesenquimáticas pero ya determinadas al linaje condrocítico, las cuales expresan específicamente la integrina  $\alpha_1\beta_1$ , mientras que los condrocitos maduros es casi nula la presencia de dicha integrina y en su lugar presentan las integrinas  $\alpha_2\beta_1$  y  $\alpha_4\beta_1$ . Es interesante, hacer énfasis en que la subunidad  $\alpha_4$  aún no ha sido reportada en cartílago. Finalmente, la observación de que esos cambios en las integrinas determinadas en condrocitos in vitro pudieran correlacionarse con datos in vivo. Además, sugerimos que nuestro modelo ofrece un gran potencial para un análisis más profundo del papel de las integrinas en la condrogénesis y su participación en la regulación del establecimiento y mantenimiento del fenotipo condrocítico.

## PERSPECTIVAS

El modelo establecido *in vitro* por la modulación del condrocito mediante el AR, podría ayudarnos a identificar otros marcadores de la MEC, superficie celular u otro tipo, en las diferentes etapas de la diferenciación condrocítica como se vio con  $\alpha_1$  que estuvo presente únicamente en condrocitos maduros.

Además, es necesario determinar si las integrinas hasta el momento identificadas, se encuentran de manera funcional o latentes. Por lo tanto, en adelante será necesario enfocarse al estudio de la funcionalidad de las integrinas mediante el uso de anticuerpos con capacidad para bloquear la función de subunidades individuales de las integrinas y determinar su efecto en la condrogénesis así como evaluar si otros factores externos como la MEC o en particular alguno o algunos de sus componentes pueden regular la expresión de las integrinas.

Al identificar el tipo de integrinas en los condrocitos, será interesante para definir las vías en que estos receptores pueden regular o mediar las señales recibidas para el mantenimiento fenotípico de los mismos. También, es importante mencionar que la identificación de las diferentes subunidades alfa que se relacionan con la cadena  $\beta_1$  no son los únicos heterodímeros posibles, porque existen otras clases de subunidades  $\beta$  de las integrinas posibles de encontrarse en los condrocitos, entonces existe un amplio campo de continuar este estudio.

Finalmente, también el modelo de modulación condrocítica por el AR nos lleva a estudiar e identificar a nivel molecular el efecto del retinoide para encontrar una explicación de la acción del AR en la expresión genética.

## REFERENCIAS

- Adams, J.C. y Watt, F.M. (1990). Changes in keratinocyte adhesion during terminal differentiation: reduction in fibronectin binding precedes  $\alpha_5\beta_1$  integrin loss from the cell surface. *Cell*. **63**, 425-435.
- Ahrens, P.B., Solursh, M. y Reiter, R.S. (1977). Stage-related capacity for limb chondrogenesis on cell culture. *Dev Biol*. **60**, 69-82.
- Aigner, T., Bertling, W., Stöh, H., Weseloh, G. y von der Mark, K. (1993). Independent expression of fibril-forming collagens I, II and III in chondrocytes of human osteoarthritic cartilage. *J. Clin. Invest.* **91**, 829-837.
- Albelda, S.M. y Buck, C.A. (1990). Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.* **4**, 2868-2871.
- Askew, G.R., Wang, S. y Lukens, L.N. (1991). Different levels of regulation accomplish the switch from type II to type I collagen gene expression in 5-bromo-2'-deoxyuridine-treated chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **266**, 6834-6841.
- Aumailley, M., Mann, K., von der Mark, H. y Timpl, R. (1989). Cell attachment properties of collagen type VI and arg-glyc-aspartic acid dependent binding to its  $\alpha_2(VI)$  and  $\alpha_3(VI)$  chains. *Exp. Cell Res.* **181**, 463-474.
- Bednarczyk, J., Wygant, J.N., Szabo, M.C., Mollinari-Storey, L., Renz, M. Fong, S. y McIntyre, B.W. (1993). Homotypic leukocyte aggregation triggered by a monoclonal antibody specific for a novel epitope expressed by the integrin beta 1 subunit: conversion of nonresponsive cells by transfecting human integrin alpha 4 subunit cDNA. *J. Cell. Biochem.* **51**, 465-478.
- Belkin, V.M., Belkin, A.M., y Koteliansky, V.E. (1990). Human smooth muscle VLA-1 integrin: purification, substrate specificity, localization in aorta, and expression during development. *J. Cell Biol.* **111**, 2159-2170.
- Benya, P.D., Padilla, S.R. y Nimmi, 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 Nimmi, 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 Padilla, S.R. (1986). Modulation of the rabbit chondrocyte phenotype by retinoic acid terminates type II collagen synthesis without inducing type I collagen: the modulated phenotype differs from that produced by subculture. *Dev. Biol.* **118**, 296-305.
- Bisell, M.J., Hall, H.G. y Parry, G. (1982). How does the extracellular matrix direct gene expression?. *J. Theor. Biol.* **99**, 31-68.

- Bruckner, P., Hörler, L., Mendler, M., Houze, Y., Winterhalter, K.H., Eich-Bender, S.G. y Spycher, M.A. (1989). Induction and prevention of chondrocyte hypertrophy in culture. *J. Cell Biol.* **109**, 2537-2545.
- Campanero, M.R., Pulido, R., Ursa, M.A., Rodríguez-Moya, M., de Landazuri, M.O. y Sanchez-Madrid, F. (1990). An alternative leukocyte homotypic adhesion mechanism, LFA-1/ICAM-1-independent, triggered through the human VLA-4 integrin. *J. Cell Biol.* **110**, 157-165.
- 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.
- Chacko, S.J., Abbot, S., Holtzer, S. y Holtzer, H. (1969). The loss of phenotypic traits by differentiated cells. Behaviour of the progeny of a single chondrocyte. *J. Exp. Med.* **130**, 417-442.
- Chan, B.M., Wong, J.G., Rao, A. y Hemler, M.E. (1991). T cell receptor-dependent, antigen-specific stimulation of a murine T cell clone induces a transient, VLA protein-mediated binding to extracellular matrix. *J. Immunol.* **147**, 398-404.
- Daniels, K. y Solursh, M. (1991). Modulation of chondrogenesis by the cytoskeleton and extracellular matrix. *J. Cell Sci.* **100**, 249-254.
- Descalzi Cancedda, F., Gentili, C., Manduca, P. y Cancedda, R. (1992). *J. Cell Biol.* **117**, 427-435.
- Dessau, W., von der Mark, H., von der Mark, K. y Fischer, S. (1980). Changes in the patterns of collagen and fibronectin during limb bud chondrogenesis. *J. Embryol. Exp. Morph.* **57**, 51-60.
- Dessau, W., Vertel, B.M., Mark, H. von der y Mark, K., von der. (1981). Extracellular matrix formation by chondrocytes in monolayer culture. *J. Cell Biol.* **90**, 78-83.
- Dietz, U., Aigner, T., Bertling, W.M. y von der Mark, K. (1993). *J. Cell Biochem.* **52**, 57-68.
- Dietz, U. y Sandel, L.J. (1995). CP-RAP: a novel growth factor involved in chondrogenesis: en *Abstracts of Molecular and Developmental Biology of Cartilage Meeting of New York Academy of Sciences.* pp. 40.
- Dürr, J., Goodman, S., Potocnik, A., von der Mark, H. y von der Mark, K. (1993). Localization of  $\beta_1$ -Integrins in Human Cartilage and their role in chondrocyte adhesion to collagen and fibronectin. *Exp. Cell Res.* **207**, 235-244.
- Dürr, J., Lammi, P., Goodman, S.L., Aiguer, T. Y von der Mark, K. (1996). Identification and Immunolocalization of Laminin in Cartilage. *Exp. Cell Res.* **222**, 225-233.
- Elmer, W.A., Pollard, S. y Cochran, J.D. (1991). Lack Chondrogenic Expression in Mouse Limb Bud Micromass Culture Exposed to Exogenous  $\beta$  Galactosidase or N-Acetyl- $\beta$ -glucosaminidase. *Exp. Cell Res.* **195**, 154-162.

- Enomoto, M., Leboy, Ph.S., Menko, S. y Boettiger, David. (1993).  $\beta_1$  Integrins mediate chondrocyte interaction with type I collagen, type II collagen, and fibronectin. *Exp. Cell Res.* **205**, 276-285.
- Eyre, D.R. y Muir, H. (1975). Distribution of different molecular species of collagen in fibrous, elastic and hyaline cartilages of pig. *Biochem. J.* **151**, 595-602.
- Eyre, D.R. y Muir, H. (1977). Quantitative analysis of type I collagen and Type II collagen in human intervertebral disks at various ages. *Biochim. Biophys. Acta.* **492**, 29-42.
- Eyre, D.R., Brickley-Parson, D.M. y Glimcher, M.J. (1978). Predominance of type I collagen at the surface of avian articular cartilage. *FEBS Lett.* **85**, 259-263.
- Fernández, J.L. y Ben-Ze'ev, A. (1989). Regulation of fibronectin, integrin and cytoskeleton expression in differentiating adipocytes: inhibition by extracellular matrix and polylysine. *Differentiation.* **42**, 65-74.
- 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 precartilaginous 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.
- Freyria, A.-M., Ronzière, M.-C., Boutillon, M.-M. y Herbage, D. (1995). Effect of retinoic acid on protein synthesis by foetal bovine chondrocytes in high-density culture: down-regulation of the glucose-regulated protein, GRP-78, and type II collagen. *Biochem. J.* **305**, 391-396.
- Gehlsen, K.R., Dickerson, K., Argraves, W.S., Engvall, E. y Ruoslahti, E. (1989). Subunit structure of a laminin-binding integrin and localization of its binding site on laminin. *J. Biol. Chem.* **264**, 19034-19038.
- Gould, S.E., Upholt, W.B., Kosher, R.A. (1992). Syndecan 3: a member of the syndecan family of membrane-intercalated proteoglycans that is expressed in high amounts at the onset of chicken limb cartilage differentiation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **89** (8), 3271-3275.
- Guan, J.-L. y Hynes, R.O. (1990). Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor  $\alpha_4\beta_1$ . *Cell.* **60**, 53-61.
- 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. (1983). *Tratado de Histología*. 8a.ed. Edit Interamericana. México, D.F. páginas 413-420.
- Hassel, J.R., Pennypacker, J.P. y Lewis, C.A. (1978). Chondrogenesis and cell proliferation in limb bud cell cultures treated with cytosine arabinoside and vitamin A. (1978). *Expe. Cell Res.* **112**, 409-417.

- Hay, E. (1991). *Cell Biology of Extracellular Matrix*. 2a ed. Plenum Press, New York, USA. 468 pp.
- Hein, R., Krieg, T., Müller, P.K. y Braun-Falco, O. (1984). Effect of retinoids on collagen production by chondrocytes in culture. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 3262-3267.
- Herbage, D., Bouillet, J. y Bernengo, J.C. (1977). Biochemical and physicochemical characterization of pepsin solubilized type II collagen from bovine articular cartilage. *Biochem. J.* **161**, 303-312.
- Holtzer, H. y Abbot, J. *Oscillations of the chondrogenic phenotype*; in Ursprung, The stability of the differentiated state. pp. 1-15.(Springer, Berlin 1968).
- Horton, W.E. (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.
- Horton, W.E. y Hassel, J.R. (1986). Independence of Cell Shape and Loss of Cartilage Matrix Production during Retinoic Acid Treatment of cultured Chondrocytes. *Dev. Biol.* **115**, 392-397.
- Horton, W.E., Yamada, Y. y Hassell, J.R. (1987). Retinoic acid rapidly reduces cartilage matrix synthesis by altering gene transcription in chondrocytes. *Dev. Biol.* **123**, 508-516.
- 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.
- Hynes, R.O. (1987). Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell.* **48**, 549-554.
- Hynes, R.O., Marcantio, E., Stepp, M.A., Urry, L.A. y Yee, G.H. (1989). Integrin heterodimer and receptor complexity in avian and mammalian cells. *J. Cell Biol.* **109**, 409-420.
- Hynes, R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* **69**, 11-25.
- Ignatius, M.J., Large, T.H., Houde, M., Tawil, J.W., Batton, A., Esch, F., Carbonetto, S. y Reichardt, L. (1990). Molecular cloning of the rat integrin  $\alpha 1$ -subunit: a receptor for laminin and collagen. *J. Cell Biol.* **111**, 709.
- Kao, J., Huey, G., Kao, R. y Stern, R. (1990). Ascorbic Acid Stimulates Production of Glycosaminoglycans in Culture Fibroblasts. *Exp. Mol. Pathol.* **53**, 1-10.
- Kaufmann, R., Frösch, D., Westphal, C., Weber, L. y Klein, C.E. (1989). Integrin VLA-3: ultrastructural localization at cell-cell contact sites of human cell cultures. *J. Cell Biol.* **109**, 1807-1815.

- 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.
- Kimura, T., Yasui, N., Obsawa, S. y Ono, K. (1984). Chondrogenic differentiation of limb bud cells in collagen gel culture. *Biomed. Res.* **5**, 465-471.
- Kirchhofer, D., Languino, L.R., Ruoslahti, E. y Pierschbacher, M.D. (1990).  $\alpha_2\beta_1$  integrins from different cell types show different binding specificities. *J. Biol. Chem.* **265**, 615-618.
- Kosher, R.S., Lash, J.W. y Minor, R.R. (1973). Enviromental enhancement of in vitro chondrogenesis. IV. Stimulation of somite chondrogenesis by exogeneous chondronucoprotein. *Dev. Biol.* **35**, 215-220.
- Kosher, R.A. y Church, R.L. (1975). Stimulation of in vitro somite chondrogenesis by procollagen and collagen. *Nature (Lond.)* **258**, 327-330.
- 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.
- Kramer, R.H. y Marks, N. (1989). Identification of integrin collagen receptors on human melanoma cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 4684-4688.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* **227**, 680-685.
- Languino, L.R., Gehlsen, K.R., Wayner, E., Carter, W.G., Engvall, E. y Ruoslahti, E. (1989). Endothelial cells use  $\alpha_2\beta_1$  Integrin as a Laminin Receptor. *J. Cell Biol.* **109**, 2455-2462.
- Lash, J.W. y Vasan N.S. (1978). Somite chondrogenesis in vitro. Stimulation by exogenous extracellular matrix components. *Dev. Biol.* **66**, 151-171.
- Lavietes, B. (1970). Cellular interaction and chondrogenesis in vitro. *Dev. Biol.* **21**, 584-593.
- 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.
- Marcantonio, E.E. y Hynes, R.O. (1988). Antibodies to the conserved cytoplasmic domain of the integrin  $\beta_1$  subunit react with proteins in vertebrates, invertebrates, and fungi. *J. Cell Biol.* **106**, 1765-1772.

- Marchisio, P.C., Capasso, O., Nitsch, L. Cancedda, R. y Gionti, E. (1984). Cytoskeleton and adhesion patterns of cultured chick embryo chondrocytes during cells spreading and Rous sarcoma virus transformation. *Exp. Cell Res.* **151**, 332-343.
- Mayne, R. y Brewton, R.G. (1993). in *Extracellular Matrix of Cartilage: Collagen* (Woessner, J.F. Jr. and Howell, D.S. eds.), pp. 81-108, Marcel Dekker, New York.
- Mayne, R., Elrod, B.W., Mayne, P.M., Sanderson, R.D. y Lisenmayer, T.F. (1984). Changes in the synthesis of minor cartilage collagen after growth of chick chondrocytes in 5-bromo-2'-deoxyuridine or to senescence. *Exp. Cell Res.* **151**, 171-182.
- Menko, A.S. y Boettiger, D. (1987). Occupation of extracellular matrix receptor, integrin, is a control point for myogenic differentiation. *Cell.* **51**, 51-57.
- Ong, D.E. y Chytil, F. (1975). Retinoic acid-binding protein in rat tissue. *J. Biol. Chem.* **250**, 6113-6117.
- 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.
- Parker, C.M., Pujades, C., Brenner, M.B. y Hemler, M.E. (1993).  $\alpha_4/180$ : a novel form of the integrin  $\alpha_4$  subunit. *J. Biol. Chem.* **268**, 7028-7035.
- Pawlowski, P.J., Brierley, G.T. y Lukens, L.N. (1981). Changes in the type II and type I collagen messenger RNA population during growth of chondrocytes in 5-bromo-2-deoxyuridine. *J. Biol. Chem.* **256**, 7695-7698.
- 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. *Development.* **117**, 245-251.
- Ramachandrala, A., Tiku, K., Tiku, M.L. (1992). Triopeptido RGD-dependent adhesion of articular chondrocytes to synovial fibroblasts. *J. Cell Sci.* **101**, 859.
- Ronzière, M.-C., Ricard-Blum, S., Tiollier, J., Hartman, D.J., Garrone, R. y Herbage, D. (1990). Comparative analysis of collagen solubilized from human foetal, and normal and osteoarthritic adult articular cartilage, with emphasis on type VI collagen. *Biochim. Biophys. Acta.* **1038**, 222-230.
- Rosen, G.D., Sames, J.R., LaChance, R., Cunningham, J.M., Roman, J. y Dean, D.C. (1992). *Cell.* **69**, 1107-1120.
- Ruoslahti, E. y Pierschbacher, M.D. (1987). New perspectives in cell adhesion. RGD and integrins. *Science.* **238**, 491-494.

- Ruoslahti, E. (1991). Integrins. *J. Clin. Invest.* **87**, 1-13.
- Salter, D.M., Hughes, D.E., Simpson, R. y Gardner, D.L. (1992). Integrin expression by human articular chondrocytes. *Br. J. Rheumatol.* **31**, 231-238.
- 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.
- Santoro, S.A., Rajpara, S.M., Staatz, W.D. y Woods, V.L. (1988). Isolation and characterization of a platelet surface collagen binding complex related to VLA-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**, 217-223.
- Sasano, Y. (1992). Distribution of Type I collagen, Type II and PNA binding glycojugates during chondrogenesis of three distinct embryonic cartilages. *Anat. Embryol.* **186**, 205-213.
- Schor, S.L. y Court, J. (1979). Different mechanisms in the attachment of cells to native and denatured collagen. *J. Cell Sci.* **38**, 267-281.
- Shakibaei, M., Abou-Rebyeh, H. y Merker, H.-J. (1993). Integrins in ageing cartilage tissue *in vitro*. *Histol. Histopathol.* **8**, 715-723.
- Shakibaei, M. (1995). Integrin expression on epiphyseal mouse chondrocytes in monolayer culture. *Histol. Histopathol.* **10**, 339-349.
- Shakibaei, M., Zimmermann, B. y Merker, H.J. (1995). Changes in integrin expression during chondrogenesis *in vitro*: an immunomorphological study. *J. Histochem. Cytochem.* **43**, 1061-1069.
- 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.
- Solursh, M. y Meier, S. (1973). The selective inhibition of mucopolysaccharide synthesis by vitamin A treatment of cultured chick embryo chondrocytes. *Calcif. Tissue Res.* **13**, 131-142.
- Solursh, M. y Reiter, R.S. (1975). The enhancement of *in vitro* survival and chondrogenesis of limb bud cells and cartilage conditioned medium. *Dev. Biol.* **44**, 278-287.
- Solursh, M. *Cell-cell interactions and chondrogenesis*; en Hall, Cartilage, pp. 121-141. (Academic Press, New York 1983).
- Solursh, M., Reiter, R.S., Jensen, K.L., Kato, M. y Bernfield, M. (1990). Transient expression of a cell surface heparan sulfate proteoglycan (syndecan) during limb development. *Dev. Biol.* **140**, 83-92.
- Sommarin, Y., Larsson, T. y Heinegard, D. (1989). Chondrocyte-matrix interactions: attachment to proteins isolated from cartilage. *Exp. Cell Res.* **184**, 181-190.

- Staatz, W.D., Rajpara, S.M., Wayner, E.A., Carter, W.G. y Santoro, S.A. (1989). The membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediates the magnesium-dependent adhesion of platelets to collagen. *J. Cell Biol.* **108**, 1917-1924.
- Staatz, W.D., Fok, K.F., Zutter, M.M., Adams, S.P., Rodríguez, B.A. y Santoro, S.A. (1991). Identification of a tetrapeptide recognition sequence for the  $\alpha_2\beta_1$  integrin in collagen. *J. Biol. Chem.* **266**, 7363-7367.
- 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.
- Takada, Y., Wayner, E.A., Carter, W.G. y Hemler, M.E. (1988). Extracellular matrix receptors, ECMRII and ECMRI, for collagen and fibronectin correspond to VLA-2 and VLA-3 in the VLA family of heterodimers. *J. Cell Biochem.* **37**, 385-393.
- Tuckwell, D.S., Ayad, Sh., Grant, M.E., Takigawa, M. y Humphries, M.J. (1994). Conformation dependence of integrin-type II collagen binding. Inability of collagen peptides to support  $\alpha_2\beta_1$  binding, and mediation of adhesion to denatured collagen by a novel  $\alpha_5\beta_1$ -fibronectin bridge. *J. Cell Sci.* **107**, 993-1005.
- Toole, B. (1972). Hyaluronic turnover during chondrogenesis in the developing chick limb and axial skeleton. *Dev. Biol.* **29**, 321-329.
- Toole, B., Jackson, G. y Gross, J. (1972). Hyaluronate in morphogenesis: Inhibition of chondrogenesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **63**, 1384-1386.
- Umansky, R. (1966). The effect of cell population density on the developmental fate of reaggregating mouse limb mesenchyme. *Dev. Biol.* **13**, 31-56.
- Urist, M.R., DeLange, R.J. y Finerman, G.A. (1983). Bone Cell Differentiation and Factors. *Science.* **220**, 680-686.
- Vasan, N. y Lash, J.W. (1975). Chondrocyte metabolism as affected by vitamin A. *Calcif. Tissue Res.* **19**, 99-107.
- Vertel, B.M., y Dorfman, A. (1979). Simultaneous localization of type II collagen and core protein of chondroitin sulfate proteoglycan in individual chondrocytes. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA.* **76**, 1251-1264.
- Vogel, B.E., Tarone, G., Giancotti, F., Gailit, J. y Ruoslahti, E. (1990). *J. Biol. Chem.* **265**, 5934-5937.
- Vonderheide, R.H. y Springer, T.A. (1992). Lymphocyte adhesion through very late antigen 4: evidence for a novel binding site in the alternatively spliced domain of vascular cell adhesion molecule 1 and an additional alpha 4 integrin counter-receptor on stimulated endothelium. *J. Exp. Med.* **175**, 1433-1442.

- von der Mark, K. (1986). Differentiation, Modulation and Dedifferentiation of Chondrocytes. *Rheumatology*. **10**, 272-315.
- von der Mark, K., Kirsch, T., Aigner, T., Reichenberger, E., Nerlich, A., Weseloh, G. y Stöb, H. (1992). in *Articular Cartilage and Osteoarthritis*. (Kuettner, K., Hascall, V. y Schleyerbach, R. eds.), pp. 221-234, Raven Press, New York.
- Wayner, E.A. y Carter, W.G. (1987). Identification of multiple cell adhesion receptors for collagen and fibronectin in human fibrosarcoma cells possessing unique alpha and common beta subunits. *J. Cell Biol.* **105**, 1873-1884.
- Wayner, E.A., Carter, W.G., Piotrowicz, R.S. y Kunicki, T.J. (1988). The function of multiple extracellular matrix receptors in mediating cell adhesion to extracellular matrix: preparation of monoclonal antibodies to the fibronectin receptor that specifically inhibit cell adhesion to fibronectin and react with platelet glycoproteins Ic-IIa. *J. Cell Biol.* **107**, 1881-1891.
- Wayner, E.A., García-Pardo, A., Humphries, M.J., McDonald, J.A. y Carter, W.G. (1989). Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin. *J. Cell Biol.* **109**, 1321-1330.
- Wencel-Drake, J.D., Plow, E.F., Kunicki, T.J., Keller, D.M. y Ginsberg, M.H. (1986). Localization of internal pool of membrane glycoproteins involved in platelet adhesion responses. *Am. J. Pathol.* **124**, 324-334.
- Widelitz, R., Jiang, T.X., Murray, B. y Chuong, C.M. (1994). Adhesion molecules in skeletogenesis: II. Neural cell adhesion molecules (NCAM) mediate precartilaginous condensations and enhances chondrogenesis during chicken limb development. *J. Cell Physiol.* **156**, 399-411.
- Wright, S.D. y Meyer, B.C. (1986). Phorbol esters cause sequential activation and deactivation of complement receptors on polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* **136**, 1759-1764.
- Woods, V.L., Gesink, D.S., Pacheco, H.O., Amiel, D., Akeson, W.H. y Lotz, M. (1991). Integrin expression y human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **34** (suppl 9), 40.
- Wu, L.N.Y., Genge, B.R., Lloyd, G.C. y Wuthier, R.E. (1991). Collagen-binding Proteins in Collagenase-released Matrix Vesicles from Cartilage. Interaction between matrix vesicle proteins and different types of collagen. *J. Biol. Chem.* **266**, 1195-1203.
- Wu, J.E. y Santoro, S.A. (1994). Complex Patterns of Expression Suggest Extensive Roles for the  $\alpha\beta_1$  Integrin in Murine Development. *Dev. Dynamics*. **199**, 292-314.