

03081

2  
2j

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

EFFECTOS DIFERENCIALES DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO  
TRANSFORMANTE  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  Y  $\beta 5$  SOBRE LA CONDROGÉNESIS EN  
LAS CÉLULAS MESENQUIMÁTICAS DE EXTREMIDADES  
EMBRIONARIAS DEL RATÓN.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO  
DE DOCTOR EN INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA BÁSICA PRESENTA:  
M. en C. JESÚS CHIMAL MONROY

México D.F.

1997

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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

A Guillermina y Sebastián  
por todo su amor, amistad y  
apoyo que siempre me han  
brindado y por alentarme a  
seguir adelante cuando más  
lo necesitaba.

A mis padres y hermanos por  
todo su amor que siempre han  
tenido para conmigo y mi fa-  
milia.

A todos mis maestros por  
sus enseñanzas, a ellos les  
debo mucho de lo que soy  
en la actualidad. Gracias.

## AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Lino Díaz de León Hernández por su dirección, asesoría, enseñanzas y apoyo que siempre me brindó durante la realización de mis estudios de Doctorado. Además, le agradezco el permitir desarrollar mis ideas libremente en su laboratorio y por el cuestionamiento hacia ellas.

A los Drs. Horacio Merchant Larios y Jesús Manuel León Cázares, en primer lugar por su asesoría durante la realización experimental de este trabajo. En segundo lugar por transmitirme su conocimiento y enseñarme a cuestionar la Ciencia. Espero seguir aprendiendo de ellos.

A los miembros del jurado por sus comentarios, sugerencias y correcciones hechas a esta tesis:

Dr. Luis Covarrubias Robles  
Dr. Lino Díaz de León Hernández  
Dr. Fernando López Casillas  
Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera  
Dra. Irma Villalpando Fierro  
Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Al Dr. Raúl Mena y al Biol. José Luna por su ayuda con la microscopía confocal. Al Dr. Koji Kimata por la donación del anticuerpo anti-proteína de unión. A los MVZ Ciro Lomelí, Gerardo Arrellín, Georgina Díaz Herrera, Javier Arzate y otros cuyo nombre olvidé por su asistencia en la producción de ratonas preñadas. Al personal de la biblioteca por todo el apoyo que tuve para obtener la información bibliográfica necesaria para este proyecto.

A todos los miembros del laboratorio, desde los que ya no están hasta lo de recién ingreso. De manera muy especial quiero agradecer a Laura y a Teresa por todo el apoyo que siempre me brindaron durante su estancia en el laboratorio.

Finalmente, me quiero disculpar si olvidé agradecer a alguna persona.

Cuando la práctica es buena, quizás uno pueda sentirse orgulloso de ello. Lo que se hace es bueno, pero entonces se le ha añadido algo. El orgullo sobra. El esfuerzo correcto es deshacerse de lo que está demás.

*Shunryu Suzuki.*

## CONTENIDO

• RESUMEN .....	1
• ABSTRACT.....	11
• INTRODUCCIÓN.....	1
• Formación de las extremidades embrionarias.....	2
• Inducción de la extremidad embrionaria.....	3
• Polaridad próximo-distal.....	3
• Polaridad antero-posterior.....	4
• Polaridad dorso-ventral.....	5
• Diferenciación celular del cartílago.....	5
• Características moleculares del blastema condrogénico.....	7
• La superfamilia del TGF- $\beta$ .....	9
• Localización <i>in situ</i> de los miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$ , durante el desarrollo del cartílago y su correlación con anomalías del desarrollo esquelético.....	11
• Cultivos de micromasa.....	12
• El papel de los factores de crecimiento de la superfamilia del TGF- $\beta$ en la condrogénesis.....	12
• Otras moléculas que regulan la condrogénesis <i>in vitro</i> .....	13
• JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	14
• RESULTADOS.....	16
• Human Cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells.....	18
• Regulation of chondrocyte differentiation by transforming growth factors $\beta$ 1, $\beta$ 2, $\beta$ 3 and $\beta$ 5.....	19
• Differential effects of transforming growth factors $\beta$ 1, $\beta$ 2, $\beta$ 3 and $\beta$ 5 on chondrogenesis in mouse limb bud mesenchymal cells.....	20
• Regulación de la N-cadherina, N-CAM, tenascina y fibronectina por los TGF- $\beta$ .....	21
• DISCUSIÓN.....	24
• Efectos diferenciales de las isoformas de los TGF- $\beta$ en el patrón morfológico del cartílago.....	25
• Efectos de los TGF- $\beta$ en la expresión de marcadores específicos del cartílago.....	27
• Participación de los TGF- $\beta$ en la formación de las condensaciones celulares.....	28
• PERSPECTIVAS.....	31
• REFERENCIAS.....	33

**RESUMEN.**

En este estudio se analizó la participación de los factores de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ )  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 y  $\beta$ 5, en la regulación de la diferenciación celular del cartilago en cultivos de células mesenquimáticas de la extremidad embrionaria del ratón. Los resultados mostraron que las cuatro isoformas produjeron efectos diferenciales sobre el patrón morfogenético del cartilago y la expresión de moléculas específicas del cartilago, en distintos estadios del desarrollo. En el mesénquima de ratón de 11.5 días post coito (estadio 19), los cuatro factores de crecimiento indujeron en las células la formación de una capa continua de cartilago. En contraste, en el mesénquima de ratón de 12 y 12.5 días post coito (estadios 20 y 21, respectivamente) los patrones morfogenéticos fueron diferentes; los TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 5 mantuvieron el efecto sobre la formación de una capa continua de cartilago, en tanto que los TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 la cambiaron de un patrón de capa continua a uno nodular. Asimismo, se evaluaron las actividades de los TGF- $\beta$  sobre la expresión de la colágena tipo II, la proteína de unión, la actividad de la fosfatasa alcalina y la biosíntesis de los proteoglicanos en el estadio 20, ya que en éste ocurre el cambio en la respuesta de las células a los TGF- $\beta$ . Los TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 5 estimularon en mayor proporción la expresión de esas moléculas, en cambio los TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 lo hicieron en menor proporción. Al adicionar los TGF- $\beta$  a las células por períodos de 24 horas, en los días 1 y 2 de cultivo, estimularon de manera muy semejante la diferenciación del cartilago. Durante estos dos días de cultivo se inicia la formación de las condensaciones celulares, que llevan a la formación del cartilago. Por lo tanto, el hecho de que los TGF- $\beta$  estimulen la condrogénesis en los dos primeros días de cultivo sugiere que los TGF- $\beta$  participan en las etapas tempranas de la diferenciación, tal vez al estimular la formación de las condensaciones celulares. De igual manera, los TGF- $\beta$  también estimularon la expresión de la N-cadherina, la N-CAM, la fibronectina y la tenascina, las cuales son moléculas que participan en la formación y establecimiento de las condensaciones celulares. Esto apoya la sugerencia de que los TGF- $\beta$  participan en las etapas tempranas de la diferenciación del cartilago. Finalmente, hasta donde se tiene información, este estudio reporta por primera vez la actividad biológica del TGF- $\beta$ 5 y apoya la sugerencia de que el TGF- $\beta$ 5 de *Xenopus* es el equivalente funcional del TGF- $\beta$ 1 de mamíferos.

**ABSTRACT.**

The present study was performed to determine whether mammalian TGF- $\beta$  isoforms and *Xenopus* TGF- $\beta$ 5 elicit a differential chondrogenic response on mesenchymal cells during mouse limb development. Results showed that TGF- $\beta$  isoforms produced a distinct chondrogenic pattern depending of embryonic stage. When they were applied to 5 days micromass cultures of limb mesenchymal cells from embryonic stages 19, 20 and 21, a differential response to all four TGF- $\beta$  isoforms assayed was observed. By stage 19 the cells formed a uniform sheet of cartilage cells; by stage 20, mesenchymal cells were more responsive to TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 5 than at stages 19 and 21, showing an entire cell layer of chondrogenic cells with higher accumulation of extracellular matrix. The diminished effect of TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 at stages 20 and 21 was accompanied by a nodular pattern of chondrogenic cells rather than by a uniform sheet, as seen at stage 19. Likewise, at stage 20 TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 5 enhanced the expression of sulfated proteoglycans, type II collagen, cartilage link protein and alkaline phosphatase activity. In contrast, TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 caused less expression in the same parameters. Only a transient exposure to TGF- $\beta$  isoforms at days 1 and 2 of culture stimulate chondrogenesis, indicating that TGF- $\beta$  isoforms could regulate chondrogenesis at early stages of chondrocyte differentiation, since at this time is when the formation of cellular condensations occurs. To confirm this sentence the expression of N-cadherin, N-CAM, tenascin and fibronectin is stimulated differentially by all four TGF- $\beta$  isoforms. Finally, in this study we report by first time the biological activity of TGF- $\beta$ 5, and support the hypothesis that TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 5 are functional equivalents.



## EFFECTOS DIFERENCIALES DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE $\beta 1$ , $\beta 2$ , $\beta 3$ y $\beta 5$ SOBRE LA CONDRÓGENESIS EN LAS CÉLULAS MESENQUIMÁTICAS DE EXTREMIDADES EMBRIONARIAS DEL RATÓN.

Jesús Chimal Monroy

**RESUMEN.** En este estudio se analizó la participación de los factores de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ )  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  y  $\beta 5$ , en la regulación de la diferenciación celular del cartílago en cultivos de células mesenquimáticas de la extremidad embrionaria del ratón. Los resultados mostraron que las cuatro isoformas produjeron efectos diferenciales sobre el patrón morfogénico del cartílago y la expresión de moléculas específicas del cartílago, en distintos estadios del desarrollo. En el mesénquima de ratón de 11.5 días post coito (estadio 19), los cuatro factores de crecimiento indujeron en las células la formación de una capa continua de cartílago. En contraste, en el mesénquima de ratón de 12 y 12.5 días post coito (estadios 20 y 21, respectivamente) los patrones morfogénicos fueron diferentes; los TGF- $\beta 1$  y TGF- $\beta 5$  mantuvieron el efecto sobre la formación de una capa continua de cartílago, en tanto que los TGF- $\beta 2$  y TGF- $\beta 3$  la cambiaron de un patrón de capa continua a uno nodular. Asimismo, se evaluaron las actividades de los TGF- $\beta$  sobre la expresión de la colágena tipo II, la proteína de unión, la actividad de la fosfatasa alcalina y la biosíntesis de los proteoglicanos en el estadio 20, ya que en éste ocurre el cambio en la respuesta de las células a los TGF- $\beta$ . Los TGF- $\beta 1$  y TGF- $\beta 5$  estimularon en mayor proporción la expresión de esas moléculas, en cambio los TGF- $\beta 2$  y TGF- $\beta 3$  lo hicieron en menor proporción. Al adicionar los TGF- $\beta$  a las células por períodos de 24 horas, en los días 1 y 2 de cultivo, estimularon de manera muy semejante la diferenciación del cartílago. Durante estos dos días de cultivo se inicia la formación de las condensaciones celulares, que llevan a la formación del cartílago. Por lo tanto, el hecho de que los TGF- $\beta$  estimulen la condrogénesis en los dos primeros días de cultivo sugiere que los TGF- $\beta$  participan en las etapas tempranas de la diferenciación, tal vez al estimular la formación de las condensaciones celulares. De igual manera, los TGF- $\beta$  también estimularon la expresión de la N-cadherina, la N-CAM, la fibronectina y la tenascina, las cuales son moléculas que participan en la formación y establecimiento de las condensaciones celulares. Esto apoya la sugerencia de que los TGF- $\beta$  participan en las etapas tempranas de la diferenciación del cartílago. Finalmente, hasta donde se tiene información, este estudio reporta por primera vez la actividad biológica del TGF- $\beta 5$  y apoya la sugerencia de que el TGF- $\beta 5$  de *Xenopus* es el equivalente funcional del TGF- $\beta 1$  de mamíferos.

### INTRODUCCIÓN

El cartílago, como muchos otros tejidos conjuntivos se caracteriza por su bajo contenido en células y abundante matriz extracelular (MEC). Durante el inicio de la vida fetal el cartílago forma temporalmente la mayor parte del esqueleto, y persiste en los mamíferos adultos en las superficies articulares de los huesos y como órgano de sostén en las vías respiratorias y partes del oído. La matriz extracelular contiene fibras elásticas y colágenas que aumentan la elasticidad y la fuerza ténsil respectivamente, y adaptan el tejido a los requerimientos mecánicos de distintas regiones del cuerpo. Las diferencias en tipo y cantidad de fibras incorporadas a la MEC permitieron establecer las bases de la clasificación del cartílago; el cartílago hialino, el cartílago elástico y el fibrocartilago.<sup>1</sup>

El cartílago hialino tiene aspecto de masa translúcida, forma las caras de los huesos en las articulaciones, los cartílagos costales y los cartílagos de la nariz, la laringe, la tráquea y los bronquios. En el feto, prácticamente todo el esqueleto está formado por cartílago hialino, que después es substituido por hueso. El cartílago elástico se presenta en los sitios en que se necesita apoyo y flexibilidad, por ejemplo en el oído externo, el conducto auditivo, la epiglotis y los cartílagos de la laringe. Su MEC, además de presentar colágenas, se compone de fibras elásticas. Por último, el fibrocartilago se ubica en los sitios donde se necesita un apoyo firme o fuerza ténsil. Se localiza en los discos intervertebrales, y en los discos intraarticulares de algunas articulaciones. Su MEC está formada principalmente por haces densos de colágenas.<sup>1</sup>

El cartílago articular es un *cartílago hialino* que juega un papel fundamental en la función normal de todas las articulaciones, de manera que es capaz de soportar las fuerzas de compresión, tensión y fricción a las que está sometido. Durante el desarrollo fetal y posnatal el cartílago sirve como un tejido intermediario en el proceso de la formación del hueso, a través del proceso de la *osificación endocondral*.<sup>2,3</sup> Incluso en los procesos de reparación de fracturas, el cartílago es un intermediario en la formación y consolidación del tejido óseo. El cartílago que participa en la formación del hueso se le llama *cartílago transitorio*, éste se encuentra de manera muy evidente en la *placa de crecimiento*, en la cual las células del cartílago, los condrocitos, proliferan y maduran para después ser reemplazados por los osteoblastos durante la *osificación endocondral*. En un corte histológico de la *placa de crecimiento*, se observan cuatro estadios de desarrollo; el *cartílago en reposo*, el *cartílago en proliferación*, el *cartílago maduro* y el *cartílago hipertrófico*.<sup>1</sup> En el *cartílago en reposo* existe una síntesis muy baja del DNA, con una expresión moderada del agrecano, las colágenas tipo II y IX y una abundante expresión de la tenascina-C. En la zona de *proliferación*, el cartílago presenta una tasa de síntesis del DNA muy alta, con una expresión nula del agrecano y muy baja de las colágenas tipo II y IX. En el *cartílago maduro*, la síntesis del DNA es nula, la expresión del agrecano y de las colágenas tipo II y IX es muy alta. Finalmente, en el *cartílago hipertrófico* no existe síntesis del DNA, disminuye la expresión del agrecano y de las colágenas tipo II y IX y se incrementa de manera muy importante la expresión de la colágena tipo X. Asimismo, este proceso de hipertrofia se continúa con una mineralización de la MEC y una abundante expresión de moléculas marcadoras de hueso, tales como la osteonectina y la osteopontina, colágena tipo I y la fosfatasa alcalina.<sup>4</sup>

Al hacer una observación radiológica de las extremidades de los vertebrados es evidente que la forma de cada uno de los huesos es diferente. Esta forma se establece desde la embriogénesis, donde los moldes del cartílago se originan a partir de las condensaciones del mesénquima que responden a señales provenientes de regiones específicas del primordio de la extremidad.<sup>5</sup> Después de recibir esas señales, las células distinguen su posición y forman las estructuras correspondientes, por ejemplo, en las regiones proximales de una extremidad anterior se formará el húmero, después la ulna y el radio y más distalmente las falanges de los dígitos.<sup>6</sup> El proceso de la formación

del cartílago, denominado *condrogénesis*, es muy semejante en cada una de las estructuras, es decir, después de que existe una señal que induce la *condrogénesis* en las células del mesénquima laxo, éstas se agregan para formar un *blastema condrogénico*, a partir del cual se forma el cartílago.<sup>2</sup> La morfogénesis de los primordios de cada uno de los huesos es independiente del proceso de diferenciación del cartílago, ya que al disgregar extremidades en diferentes estadios del desarrollo y sembrar las células *in vitro*, la *condrogénesis* que se obtiene es similar.

En las secciones subsecuentes se hará una descripción de la formación de las extremidades embrionarias y, después se enfocará al proceso de la diferenciación del cartílago.

#### Formación de las extremidades embrionarias

La formación de las extremidades embrionarias inicia cuando las células del mesodermo de la placa lateral migran hacia una región cercana al ectodermo. Éste se engrosa como consecuencia de las interacciones inductivas entre el mesodermo y el ectodermo, lo que da origen a la *cresta apical del ectodermo* (AER por sus siglas en inglés). Una vez formada la AER la extremidad se elonga y se establece la polaridad **próximo-distal**. Subyacente a la AER existe una zona celular con alta capacidad proliferativa, denominada *zona de progreso*, si la AER se elimina, la proliferación celular en la *zona de progreso* cesa y se detiene el desarrollo ulterior de la extremidad. Por otro lado, en la parte posterior de la extremidad se localiza una región con capacidad para dirigir la polaridad **antero-posterior**. Esta zona es llamada *zona de actividad polarizante* (ZPA). Cuando esta zona es transplantada a regiones anteriores de la extremidad se originan estructuras duplicadas y en imagen especular. La ZPA mantiene su actividad por la presencia de la AER y viceversa. En lo que se refiere a la polaridad **dorso-ventral**, el ectodermo no perteneciente a la AER, dirige al mesénquima en el establecimiento de la polaridad, pues la rotación de 180° del ectodermo, con respecto al mesodermo, invierte la polaridad **dorso-ventral** (Fig. 1).<sup>6-9</sup>

Estudios recientes han permitido determinar la naturaleza molecular de las señales que establecen los tres centros de inducción de las polaridades **próximo-distal**, **antero-posterior** y **dorso-ventral**. Además de que muestran la estrechas interacciones interdependientes que existen entre los centros, que llevan a la iniciación y mantenimiento del desarrollo de la extremidad de po-

llo.<sup>9,10</sup> Sin embargo, antes de explicar las interacciones existentes entre los tres centros, se explicará como ocurre la inducción de la extremidad embrionaria.

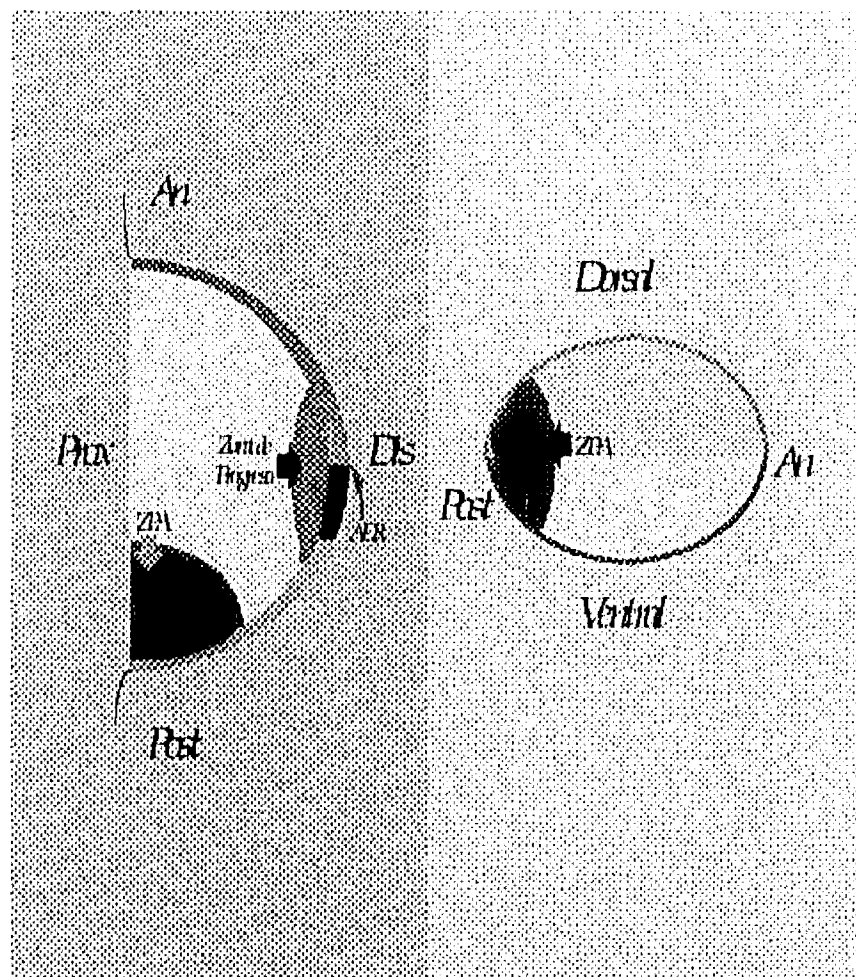


Figura 1. Esta figura muestra los tres centros de polaridad que se establecen durante la formación de las extremidades embrionarias. ZPA significa Zona de Actividad Polarizante; AER significa Apical Ectodermal Ridge.

#### Inducción de la extremidad embrionaria

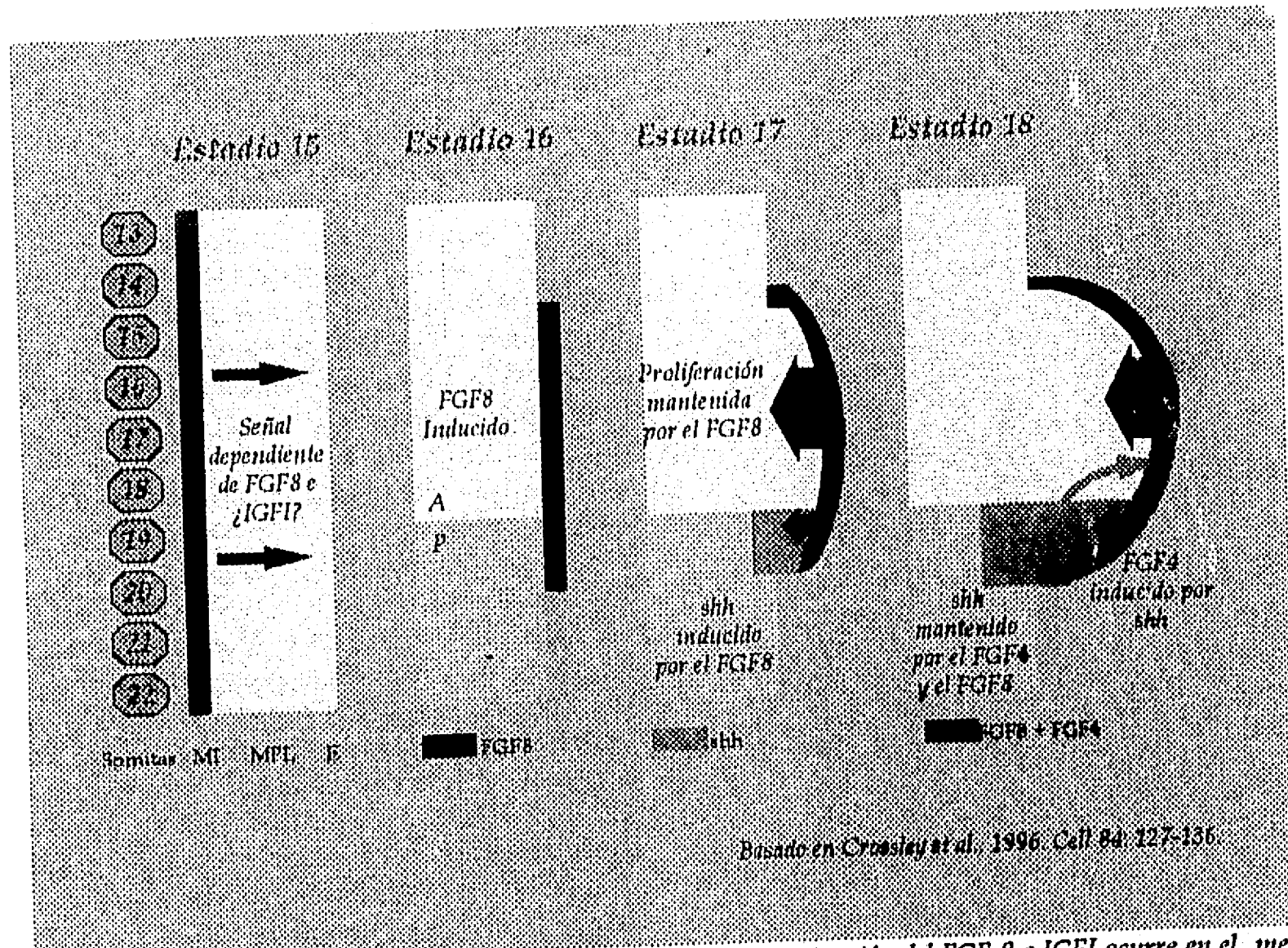
Experimentos clásicos de Harrison<sup>11</sup> mostraron que el transplante del mesodermo de la región presuntiva de la extremidad a un lugar ectópico origina una nueva extremidad, mientras que el transplante del ectodermo no tiene efecto alguno. Por otro lado, Balinsky<sup>12</sup> mostró que el implante de un esbozo nasal en el flanco del embrión entre la extremidad anterior y la posterior es capaz de formar extremidades ectópicas. Lo que indica que el mesodermo de la placa lateral es competente para el desarrollo de las extremidades. Estos experimentos mostraron las regiones en las que se pueden formar las extremidades y la capacidad inductiva del mesodermo, pero no mostraron el origen del inductor ni ayudaron a identificar el momento en el que actúa.

Experimentos realizados en embriones de pollo para prevenir, con barreras impermeables, la comunicación entre el mesodermo y la presuntiva región de la extremidad, y la eliminación del mesonefros por cirugía láser, sugieren que existe alguna señal proveniente del mesodermo inter-

medio entre los estadios 13 y 15 del embrión de pollo, con capacidad de inducir la formación de la extremidad.<sup>13,14</sup> En estas etapas del desarrollo existe una expresión coordinada entre el factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 (IGF-1) y su receptor.<sup>15</sup> De igual manera se observó para el factor de crecimiento fibroblástico-8 (FGF-8), que se expresa en el mesodermo intermedio y que puede servir como inductor endógeno de la extremidad, como lo sugiere la formación ectópica de extremidades con esferas cubiertas de FGF-8.<sup>16</sup> Sin embargo, recientemente en pollos con la mutación *limbless* no se encontró la expresión de FGF-8 en la presuntiva región de la extremidad, y ésta, aunque de manera reducida, se formó.<sup>17-19</sup> Esto sugiere que debe existir otra señal o señales, además del FGF-8 que sean capaces de inducir la formación de la extremidad, aunque no se ha evaluado su acción como inductor de extremidades ectópicas. Una posibilidad alterna consiste en que tanto el IGF-1 y el FGF-8 participaran en paralelo para llevar a cabo la inducción de la extremidad. Por otro lado, los FGF-1, FGF-2 y FGF-4 inducen la formación de extremidades ectópicas, pero estas moléculas no presentan una distribución espacio-temporal semejante a la que presentan el FGF-8 o el IGF-1 por lo que se descartan como los inductores endógenos de la formación de las extremidades (Fig. 2).<sup>20</sup>

#### Polaridad próximo-distal

La polaridad **próximo-distal** está regulada por la AER. En esta región se expresan los FGF-2, FGF-4 y FGF-8.<sup>21, 22,16</sup> Los FGF-2 y FGF-8 se localizan a todo lo largo de la AER, mientras que el FGF-4 se localiza en la región posterior de la AER. Se mencionó previamente que la eliminación de la AER interrumpe el crecimiento de la extremidad,<sup>6-9</sup> pero la aplicación de esferas recubiertas con los FGF-2, FGF-4 y FGF-8 en el mesénquima posterior distal, reemplaza a la AER y dirige el crecimiento y la formación completa de la extremidad.<sup>20,23,24</sup> Esta misma serie de estudios mostró que los FGF no solo promueven la proliferación del mesénquima, sino que además, mantienen la funcionalidad de la ZPA. Cuando los FGF son aplicados en regiones del mesénquima anterior, la ZPA no se mantiene, aunque la proliferación del mesénquima sí ocurre. De acuerdo a su localización se sugiere que los FGF-4 y FGF-8 inducen y mantienen la actividad de la ZPA (Fig. 2).<sup>25,26</sup> Por otro lado, la AER regula la proliferación de la *zona de progreso*, probablemente a través, de la expresión del gen



**Figura 2.** Inducción de la extremidad embrionaria del pollo. La expresión del FGF-8 e IGF1 ocurre en el mesodermo intermedio (MI) entre las somitas 15 y 20. Estos factores inducen al ectodermo (E) a expresar el FGF-8. Esta señal promueve y mantiene la proliferación del mesénquima de la zona de progreso, que se origina del mesodermo de la placa lateral (MPL) y además induce la expresión de *shh* en la ZPA. El *shh* promueve la expresión del FGF-4 que a su vez y en conjunto con el FGF-8 mantienen la expresión de *shh*.

*Eox-1*, ya que la eliminación de la AER reduce la expresión de este gen y la expresión del mismo puede mantenerse por la presencia del FGF.<sup>26,27</sup> Por otro lado, se ha mostrado que el IGF-I puede estimular la proliferación del mesénquima de la extremidad y que además puede participar en la formación o mantenimiento de la cresta apical.<sup>28</sup> En términos del establecimiento del crecimiento próximo-distal, se sugiere que el IGF-I pudiera regular la expresión de los FGF en la AER, y que entonces los FGF sean capaces de regular la expresión del IGF-I en el mesénquima.<sup>28</sup> También podría ocurrir que tanto el IGF-I como los FGF pudieran participar en el crecimiento próximo-distal y en el establecimiento de la AER, donde tal vez la expresión de uno dependa de la expresión del otro o que ambos puedan actuar en rutas paralelas (Fig. 3).

#### Polaridad Antero-Posterior.

La polaridad antero-posterior de la extremidad al parecer está regulada por el gen *sonic hedgehog* (*shh*), este gen se expresa en la ZPA y el implante de células que expresan el *shh* a la región anterior de la misma es capaz de inducir duplicación de estructuras en imagen especular.<sup>29</sup> Antes de determinar que el *shh* tuviera actividad polarizante se había considerado al ácido retinoico (AR) como el morfógeno natural de la ZPA, ya que la implantación de esferas recubiertas de AR, en la región anterior, también induce estructuras duplicadas y en imagen especular como sucede con los implantes de la ZPA.<sup>30</sup> No obstante, la distribución y concentración de los receptores al AR y de las proteínas de unión al AR en la extremidad hacían difícil considerarlo como el morfógeno. En cambio se sugirió que la posible función del AR sea la inducción de la ZPA en el mesénquima poste-

rior,<sup>31,32</sup> a través de la expresión del gen *shh*.<sup>29</sup> La eliminación de la AER suprime la actividad de la ZPA y la expresión de *shh*, la aplicación del FGF-4 reestablece la expresión del *shh* y por lo tanto, la actividad polarizante de la ZPA.<sup>33,34</sup> Por otro lado, la expresión ectópica del *shh* en la región anterior estimula la expresión del FGF-4.<sup>33,34</sup> La expresión del *shh* depende de la expresión de *Hoxd-8*, ya que al inducir la expresión ectópica del gen *Hoxd-8* ocurre la formación de otra ZPA, con una expresión ectópica de *shh*.<sup>35</sup> Éste a su vez induce la expresión del gen *Gli-1* e inhibe la del gen *Gli-3*, y *Gli-1* induce la expresión del gen *patched*.<sup>36</sup> Todo esto ocurre de una manera muy semejante a lo observado durante la embriogénesis de *Drosophila* con los genes homólogos *hedgehog*, *cubitus interruptus* y *patched*.<sup>37</sup> Asimismo, los implantes ectópicos de la ZPA y de células que expresan el gen *shh* inducen la expresión de la proteína morfogenética del hueso-2 (*BMP-2*) en las células adyacentes.<sup>34</sup> La expresión de la *BMP-2* requiere la presencia de los FGF producidos por la AER.<sup>34</sup> y por lo tanto, la *BMP-2* puede actuar como una molécula de señalamiento secundaria, al promover la expresión de los genes *Hoxd11-Hoxd13* en el mesénquima.<sup>34,38</sup> La expresión ectópica de la *BMP-2* en el mesénquima anterior induce la expresión del FGF-4 en el AER y *Hoxd13* en el mesénquima.<sup>38,39</sup> Estudios *in vitro* muestran que la *BMP-2* inhibe el crecimiento de la extremidad y contrarresta el efecto del FGF-4 (Fig. 3).<sup>40</sup>

#### Polaridad Dorso-Ventral.

La polaridad dorso-ventral parece estar controlada por el ectodermo dorsal, en esta zona se expresa el gen *Wnt7A*,<sup>41,42</sup> el cual regula la polaridad dorso-ventral ya que la eliminación del mismo en ratones provoca que las extremidades tengan un doble patrón ventral.<sup>43</sup> Por otro lado, la eliminación del ectodermo dorsal conlleva a la pérdida de los elementos esqueléticos posteriores y a una ausencia en la expresión de *shh*.<sup>44</sup> La pérdida del ectodermo dorsal puede ser substituida por células que expresan el gen *Wnt7A*. El implante de estas células es suficiente para mantener la expresión del gen *shh* en presencia de la AER o FGF-4.<sup>44</sup> El gen *Wnt7A* regula la expresión de *Lmx1* en el mesénquima dorsal.<sup>45</sup> El gen *Wnt5a* se expresa en el ectodermo ventral pero su función en el establecimiento de la polaridad dorso-ventral se desconoce.<sup>41,42</sup> Por lo tanto, estos estudios muestran que *Wnt7A* también tiene una estrecha interacción con los otros centros de polari-

dad, ya que la expresión de *shh* es mantenida por *Wnt7A* y FGF-4, y la interacción entre estas moléculas sirve para establecer la ZPA (Fig. 3).<sup>44</sup>

Los estudios mencionados han ayudado a establecer los mecanismos moleculares y las interacciones celulares que ocurren entre los tres centros de polaridad, y que llevan a la formación del patrón espacial de la extremidad en sus tres ejes y al control de su crecimiento. Con base en estos antecedentes, en las siguientes secciones se señalarán los procesos celulares y moleculares que llevan a la diferenciación celular del cartílago en las extremidades embrionarias.

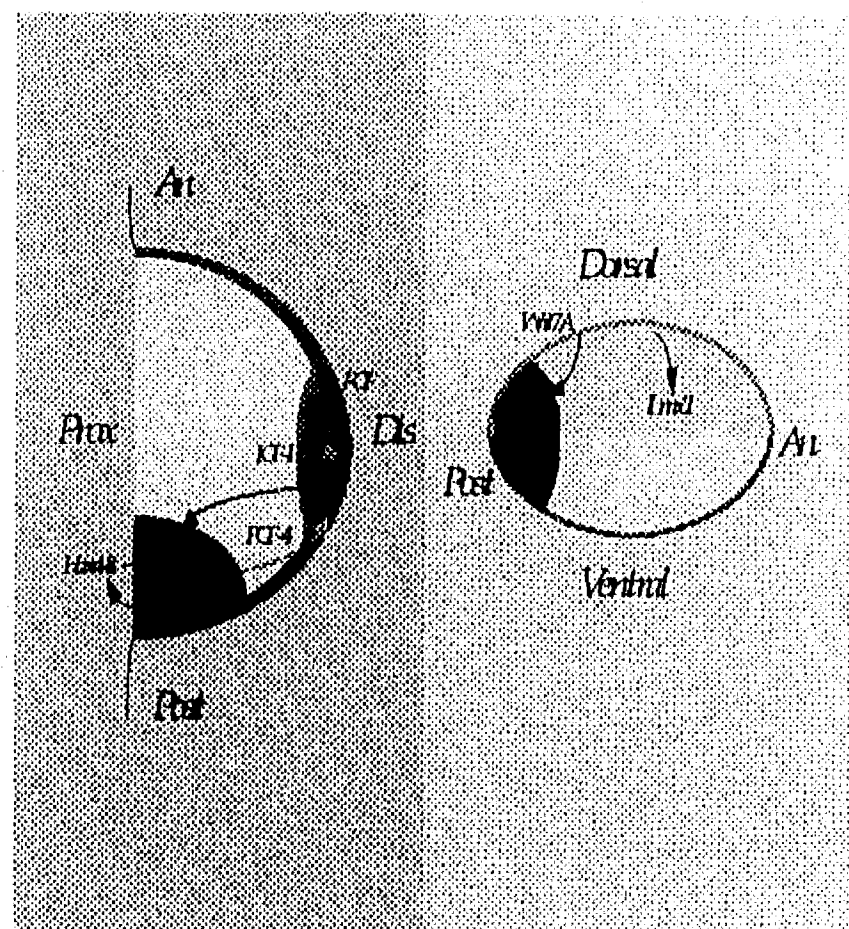


Figura 3. En esta figura se indican las interacciones moleculares que existen entre los tres centros de polaridad que se llevan a cabo en las extremidades embrionarias de pollo y ratón. Véase detalles en el texto.

#### Diferenciación celular del cartílago

El esqueleto en los vertebrados está formado por cartílago y hueso y tiene múltiples orígenes embrionarios, éstos son la *cresta neural*, el *mesodermo cefálico*, el *mesodermo paraxial dorsal*, y el *mesodermo lateral* (Fig. 4). El esqueleto craneofacial se deriva de las células de la *cresta neural* que migran desde la región dorsal del tubo neural hacia los diferentes arcos branquiales y otras regiones de la cara y la cabeza. Una vez que llegan a sus destinos, las células se diferencian hacia cartílago y hueso. El *mesodermo cefálico* contribuye en la formación de varios huesos craneales.<sup>2</sup>

Por otro lado, las costillas y las vértebras se derivan a partir de las somitas, las cuales se forman por la segmentación del *mesodermo paraxial*.

En la región ventral de las somitas ocurre una conversión epitelio-mesénquima que da origen al *esclerotomo*. Las células restantes de la región dorsal de las somitas forman el *dermamiotomo*, que formará los precursores de la dermis y el tejido muscular. Las células mesenquimáticas del *esclerotomo* responden a señales de la notocorda y forman las vértebras y los discos intervertebrales. Las células del *esclerotomo lateral* migran hacia los extremos para formar las costillas.<sup>46</sup>

Finalmente el esqueleto apendicular, se deriva del *mesodermo lateral*. La formación de los huesos de las extremidades requiere de la migración de las células mesenquimáticas precursoras (stem cells) hacia los primordios de la mismas, donde se agregan para formar los precursores condrogénicos de los huesos largos.<sup>5,6</sup> Posteriormente por el proceso de *osificación endocondral* se formará el tejido óseo.<sup>3</sup>

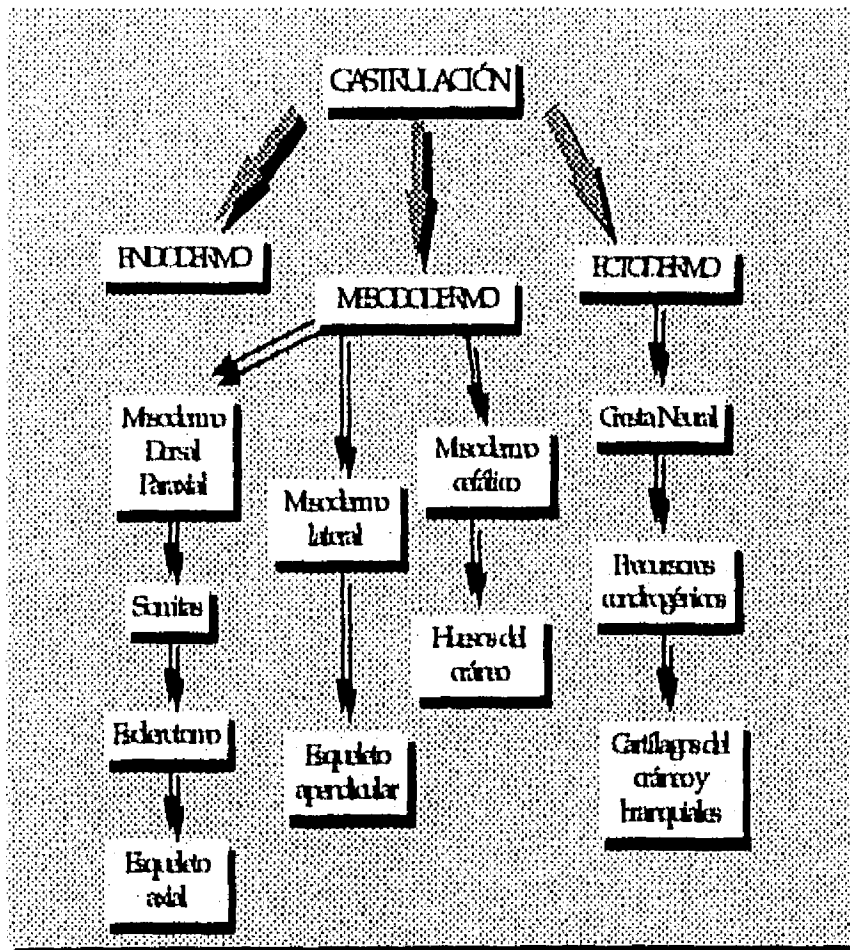


Figura 4. En esta figura se muestra un diagrama esquemático de los orígenes embrionarios del cartílago. (Basado de Olson et al., 1996. *The Ann of The NY Acad. Sci.* 785:108-118.)

La formación de cada uno de los diferentes tipos de elementos esqueléticos implica diferentes orígenes embrionarios del linaje condrogénico. Sin embargo, ocurren procesos comunes que llevan a la formación del esqueleto, esto es, agregación de

las células mesenquimáticas precursoras en condensaciones que crecen y se diferencian eventualmente para formar el cartílago y el hueso.<sup>47</sup> En las secciones siguientes se hará referencia de manera particular a la formación del cartílago en las extremidades. Una vez que ocurre la colonización del primordio de la extremidad embrionaria por las células mesenquimáticas precursoras del mesodermo lateral, se llevan a cabo una serie de contactos célula-célula y célula-MEC que son cruciales para la *condrogénesis*.<sup>48</sup> La diferenciación celular de los componentes de la extremidad embrionaria proceden desde la región proximal hacia la región distal. Como se mencionó anteriormente, en la región más distal se encuentra la *zona de progreso*, que mantiene a las células en constante proliferación y en un estado indiferenciado. Al continuar el crecimiento de la extremidad, las células en proliferación dejan de recibir los estímulos de la *zona de progreso* e inician el proceso de la diferenciación del cartílago.<sup>48</sup>

El programa de diferenciación del cartílago, durante la embriogénesis *in vivo*, se ha dividido en cuatro fases. La primera fase se denomina *mesénquima laxo*, y corresponde a las células del mesénquima de la *zona de progreso*, que se encuentran aisladas unas de otras y rodeadas por una abundante MEC, compuesta principalmente por la colágena tipo I, la fibronectina, y el versicano.<sup>49-53</sup> Al elongarse la extremidad, las células mesenquimáticas dejan de recibir las señales de la *zona de progreso* y se diferencian hacia cartílago. En este proceso ocurren cambios en la MEC, que favorecen los contactos célula-célula y que llevan al establecimiento del *blastema condrogénico*. En esta segunda fase se expresan varias moléculas que favorecen esos contactos celulares. Entre las más importantes se encuentran la N-cadherina,<sup>54</sup> la N-CAM,<sup>55</sup> la tenascina,<sup>56</sup> los sindecanos 1, 2 y 3,<sup>57-60</sup> proteoglicanos ricos en sulfato de heparán,<sup>61,62</sup> glicoproteínas compuestas principalmente por D-galactosa ( $\beta$ 1-3)-N-acetil-D-galactosamina, y N-acetil-glucosamina,<sup>63,64</sup> además de la colágena tipo IIA.<sup>65</sup> Al culminar la formación del *blastema condrogénico* cesa la expresión de esas moléculas e inicia la diferenciación condrogénica con la formación del *cartílago maduro*. Éste se caracteriza por la presencia de las colágenas IIB, IX y XI, el agregano, la proteína de unión, la proteína de la matriz del cartílago (CMP), y la proteína Gla de la Matriz (MGP).<sup>66-69</sup> Finalmente, antes de que se lleve a cabo la osificación, existe un cartílago intermediario que favorece la misma, éste es el *cartílago hipertrófico*. Se caracteriza por la abundante expresión de la coláge-

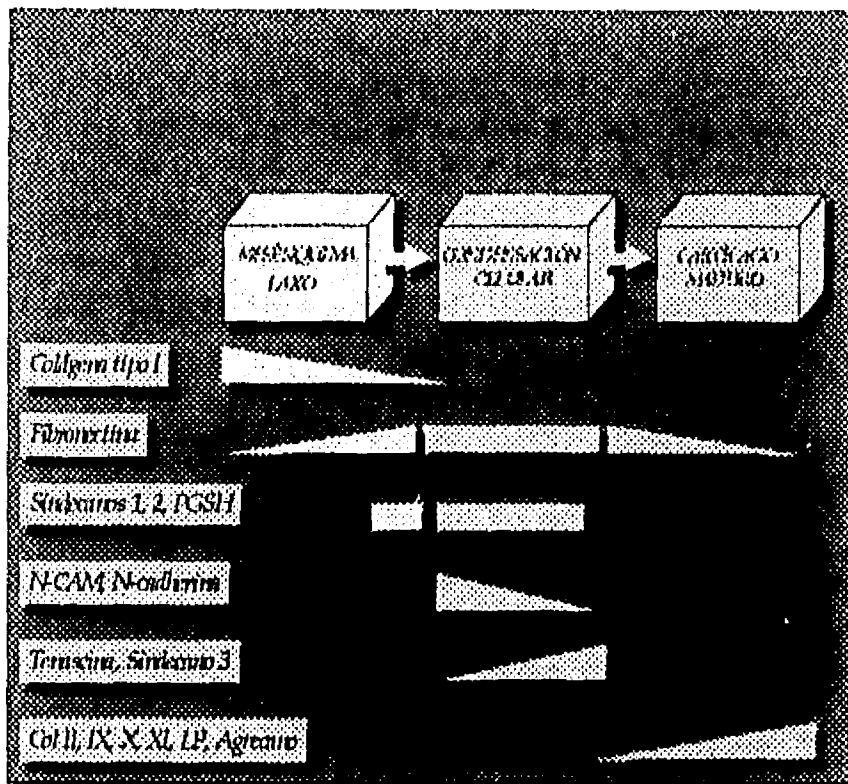


Figura 5. En esta figura se muestra una representación simplificada de la expresión de algunas moléculas durante las etapas de la condrogénesis.

na tipo X, la fosfatasa alcalina, la osteopontina y la osteonectina (Fig. 5).<sup>4,70</sup>

Cabe señalar que de las cuatro fases del programa de diferenciación del cartílago mencionadas, es la del *blastema condrogénico* la que regula la *condrogénesis*, ya que la agregación celular coincide con una disminución de la proliferación celular y estimulación de las actividades de los genes específicos del cartílago. Sin embargo, es importante aclarar que aunque las moléculas que se expresan en el *blastema condrogénico* son importantes en la regulación de los contactos célula-célula, su expresión depende en gran medida de factores de crecimiento. En este sentido se ha observado que muchos defectos genéticos que afectan al esqueleto, son debidos a la mutación de algunos genes de la superfamilia del TGF- $\beta$  que intervienen en la fase de la condensación celular.<sup>47</sup> Por lo tanto, en las siguientes líneas se indicará la probable participación de las moléculas que se expresan en el *blastema condrogénico* y después se hará referencia a los miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  y su participación en el establecimiento del *blastema condrogénico*.

#### Características moleculares del *blastema condrogénico*

i) moléculas de la superficie celular y de la MEC que participan en la formación del *blastema condrogénico*

La formación del cartílago requiere una inducción previa de las células mesenquimáticas

hacia el linaje condrocítico por factores de crecimiento. Estas células responden a la información presente en el embrión y la interpretan de acuerdo a su posición en el mismo para generar las estructuras del esqueleto. Las agregaciones celulares que llevan a la formación del *blastema condrogénico* dependen de que miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  promuevan los contactos célula-célula y célula-MEC, los cuales a su vez mantienen la forma celular a través de las interacciones con el citoesqueleto.

La N-cadherina y la N-CAM inician su expresión en mayor proporción que la tenascina, el síndecano 3 y los proteinglicanos ricos en sulfato de heparán (Fig. 5).<sup>47</sup>

Estudios de bloqueo de la función de la N-CAM y la N-cadherina en embriones de pollo y cultivos celulares, con anticuerpos específicos, muestran que estas moléculas intervienen en la formación de las condensaciones celulares, al evitar los contactos celulares.<sup>54,55</sup>

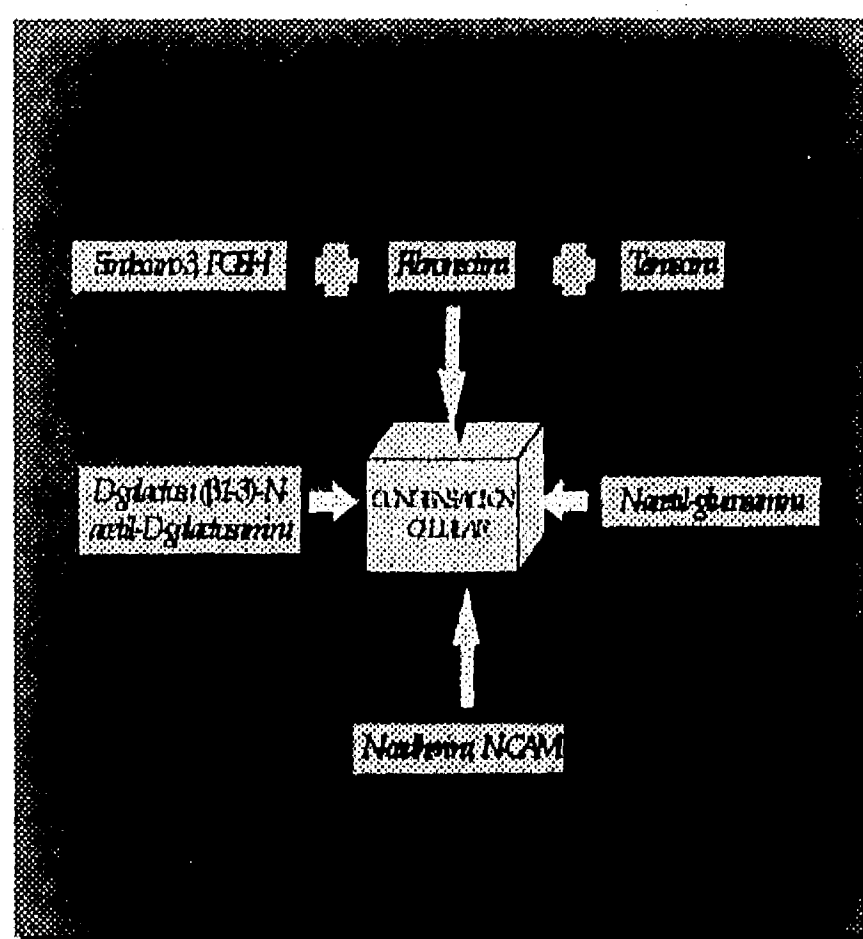
Por otro lado, la degradación selectiva con las enzimas B-galactosidasa y la N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa (GlcNAc-asa), de los residuos de la D-galactosa ( $\beta$ 1-3)-N-acetil-D-galactosamina y la N-acetil-glucosamina de glicoproteínas presentes en el *blastema condrogénico* evita la formación de los agregados celulares *in vitro*. La morfología de las células se altera con el tratamiento enzimático, ya que las células incubadas con  $\beta$ -galactosidasa presentan una morfología estrellada y de huso, mientras que las células tratadas con GlcNAc-asa, presentan una morfología bipolar.<sup>63</sup>

En el caso de la tenascina se ha observado que interactúa directamente con la fibronectina, la cual tiene la capacidad de revertir el estado diferenciado de los condrocitos *in vitro*. Sin embargo, cuando se siembran condrocitos en sustratos de fibronectina y después se tratan con tenascina, se induce la reexpresión de la colágena tipo II y la formación de nódulos condrocíticos.<sup>71</sup> Otros componentes que intervienen en la formación del *blastema condrogénico* y que interactúan directamente con la fibronectina son los proteoglicanos ricos en sulfato de heparán, a través del dominio de unión a la heparina en el extremo amino-terminal. El bloqueo *in vitro* con un anticuerpo específico de ese dominio, así como la presencia del oligopéptido glicina-arginina-glicina, que contiene un determinante repetido en el dominio amino-terminal de la fibronectina, y la presencia de heparinasa en el medio de cultivo, reducen hasta en un 50% la formación de las condensaciones celulares.<sup>61,62</sup>

Los síndecanos 1, 2 y 3 son proteoglicanos de

superficie celular ricos en sulfato de heparán, recientemente se reportó que la neutralización del sindecano 3 evita la formación de condensaciones celulares.<sup>57-60</sup> No se sabe cual pueda ser el papel de los sindecanos 1 y 2 en la formación del *blastema condrogénico*.

En general estos datos muestran una relación muy estrecha entre todas las moléculas que participan en la formación del *blastema condrogénico*, ya que, la neutralización de varios de ellos llevan al mismo resultado. Aunque la neutralización de los proteoglicanos ricos en sulfato de heparán, sugieren que el proceso de condensación celular es asincrónico o que existe un mecanismo alternativo que lleva a la formación de las condensaciones celulares. Probablemente la N-cadherina y la N-CAM favorecen las primeras interacciones célula-célula, lo que podría coincidir con una alta expresión de la fibronectina, tenascina, sindecano 3 y proteoglicanos ricos en sulfato de heparán. La capacidad adhesiva de la fibronectina podría ser bloqueada por la presencia de la tenascina, el sindecano 3 y los proteoglicanos ricos en sulfato de heparán entre la fibronectina y los receptores celulares, lo



**Figura 6.** Esta figura muestra la relación que existe entre las diferentes moléculas que se expresan en la etapa de condensación celular. La propiedad adhesiva de la fibronectina sobre las células es interrumpida por su interacción con la tenascina, los sindecanos y los proteoglicanos ricos en sulfato de heparán. Los contactos célula-célula son mediados por la N-cadherina y la N-CAM, y tal vez por la expresión de glicoproteínas ricas en D-galactosa  $\beta$ 1-4 N-acetil-galactosamina y N-acetil-glucosamina.

que llevaría al establecimiento del *blastema condrogénico* (Fig. 6). Se desconoce cual de estas moléculas se expresa primeramente al iniciar la formación de las condensaciones celulares. Aunque por el tiempo de expresión de la N-cadherina y la N-CAM *in vitro*,<sup>72</sup> se sugiere que la N-cadherina inicia las condensaciones celulares, y que su estabilización depende de la expresión de la N-CAM.

#### ii) Genes homeobox y factores de transcripción que participan en la condrogénesis

Existe una gran cantidad de información referente al origen embrionario del cartílago, sin embargo, poco se conoce acerca de los mecanismos que regulan la expresión de los genes específicos del cartílago. En los últimos años se han identificado varios genes que controlan el desarrollo del esqueleto. Entre éstos tenemos a los *Homeobox (Hox)*, *Pax*, *Escleraxis* y *Paraxis*, *Cart-1*, *runtB*, *Sox-9*, *ck-erg* y *frzb*.<sup>73-75,80-85</sup>

Se sugiere que el papel de los genes *Hox* es el de especificar la identidad celular a largo del eje antero-posterior del embrión. Una posible función de los genes *Hox* en el establecimiento de la identidad de los elementos esqueléticos, es evidente con el gen *Hoxa-13*. Al inducir una expresión ectópica de este gen, durante el desarrollo de la extremidad de pollo, se observa que el radio y la ulna, en las extremidades anteriores, y la fíbula y la tibia, en las extremidades posteriores, son mucho más cortos de lo normal y presentan una morfología muy semejante a la de los huesos de la muñeca y el tobillo. Este gen se expresa normalmente después del estadio 20 del desarrollo en el pollo. Al evaluar, antes del estadio 20, la adhesividad de las células que expresan ectópicamente el gen, se observa que las células se segregan de aquéllas que no expresan *Hoxa-13*. Lo que sugiere que el gen *Hoxa-13* tiene efecto en la adhesividad de las células que lo sintetizan.<sup>73</sup>

Los genes *Paraxis* y *Escleraxis* son miembros de la familia de los factores de transcripción bHLH (basic helix-loop-helix).<sup>74,75</sup> Entre los miembros mejor caracterizados de esta familia se encuentran los genes miogénicos, *MyoD*, *Myf5*, *miogenina* y *MRF4*, los genes neurogénicos *NeuroD* y los miembros de la familia *Achaete scute* en mamíferos y en *Drosophila*.<sup>76-78</sup> Se sugiere que tanto *Paraxis* como *Escleraxis* participan en la ruta de desarrollo que controla la formación de las somitas y el establecimiento de los linajes condrogénicos.<sup>74,75</sup> Durante el desarrollo embrionario del ratón, *Paraxis* se expresa en las células que forma-



rán el *mesodermo paraxial* y se mantiene en una expresión alta durante la formación de las somitas y transitoriamente durante la formación del *esclerotomo*. Es en esta última fase cuando se expresa *Escleraxis* y declina la expresión de *Paraxis*. Además, *Escleraxis* también se expresa en altos niveles en las costillas, vértebras y discos intervertebrales, en los precursores condrogénicos del cráneo y la cara, y finalmente en los precursores condrogénicos de las extremidades. Aunque hasta la fecha no se sabe la función de estos genes en el desarrollo, se cree que puedan participar en la especificación del cartílago, de manera similar a como lo hacen los genes miogénicos *MyoD* y *Myf5* en la determinación de los precursores mioblásticos.<sup>79</sup>

El gen *Pax-1* presenta un patrón de expresión, en el mesénquima del *esclerotomo*, muy similar al que presenta *Escleraxis*. Sin embargo, *Pax-1* se expresa en la región ventral media del *esclerotomo* adyacente a la notocorda y *Escleraxis* en la región lateral del *esclerotomo*, además *Pax-1* se expresa más tempranamente que *Escleraxis*.<sup>80</sup>

El gen *Cart-1* con dominio homeobox presenta una distribución muy similar a la de *Escleraxis* en los precursores condrogénicos de las extremidades, es decir, en el mesénquima en condensación y en los condrocitos tempranos del primordio del cartílago.<sup>81</sup>

Otros genes tales como *ck-erg*, *runtB*, *Sox9* y *frzb* también se expresan durante las fases de condensación del mesénquima que llevan a la formación del *blastema condrogénico*.<sup>82-85</sup> No se sabe cuáles puedan ser sus funciones en la *condrogénesis*. Aunque la expresión de *ck-erg* depende del  $TGF-\beta 1$  durante la inducción ectópica del cartílago en el mesénquima interdigital de la pata del pollo.<sup>86</sup>

### La superfamilia del $TGF-\beta$

Entre los factores de crecimiento que regulan de manera importante la diferenciación del cartílago se encuentran los miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta ( $TGF-\beta$ ).<sup>87-90</sup> Antes de mencionar las funciones que tienen estos factores de crecimiento en la *condrogénesis*, se hará una descripción de los miembros de la superfamilia y de sus receptores.

La superfamilia del  $TGF-\beta$  comprende una gran diversidad de factores de crecimiento con gran capacidad multifuncional para regular la proliferación, la diferenciación y la adhesión celulares. La familia del  $TGF-\beta$  está conjuntada por 5 miembros.<sup>87-89</sup> A la superfamilia del  $TGF-\beta$  también la integran la familia de las *Activi-*

*nas/Inhibinas*,<sup>88</sup> la familia *MIS*<sup>89</sup> y la familia *DPP/BMP/DVR*<sup>91-95</sup> (Tabla 1). En general todos los miembros de esta superfamilia tienen diversas funciones que incluyen, desde efectos en la embriogénesis temprana como en la diferenciación de linajes específicos y en la organogénesis, tanto en invertebrados como en vertebrados, hasta efectos que llevan al control de la proliferación celular.

Entre las funciones de la familia de las *activinas/inhibinas* destacan la capacidad de estimular la secreción de la hormona estimulante del folículo en las células de la hipófisis anterior. Sus miembros también participan en la diferenciación de las células eritroides, en la determinación de los ejes embrionarios, en la inducción del mesodermo y del sistema nervioso de *Xenopus*, en el desarrollo facial, de la epidermis, y de las vibrisas del ratón.<sup>96-100</sup>

La familia *MIS* está representada principalmente por la sustancia inhibidora de los conductos de Müller (*MIS*), que durante el desarrollo de los genitales internos del macho, es capaz de inducir la regresión del conducto de Müller, específico de las hembras.<sup>101</sup>

La familia *DPP/BMP/DVR* está compuesta por más de 20 miembros entre los que se incluyen a las proteínas morfogenéticas del hueso (*BMP*),<sup>91-95</sup> los factores de crecimiento y diferenciación (*GDF*),<sup>102-104</sup> las proteínas morfogenéticas derivadas del cartílago (*CDMP*),<sup>102-104</sup> los genes de *Drosophila* decapentaplégico (*dpp*),<sup>105</sup> *screw* (*scw*)<sup>106</sup> y *60A*.<sup>107</sup> Inicialmente las *BMP* fueron identificadas por su capacidad de inducir la formación de hueso en sitios ectópicos en roedores.<sup>91</sup> Sin embargo, más recientemente, se demostró que las *BMP* también participan en la especificación de los ejes embrionarios y en una gran variedad de tejidos y órganos durante el desarrollo de los vertebrados.<sup>94,95</sup>

Finalmente, la familia del  $TGF-\beta$ , compuesta por 5 miembros, tiene una gran participación en fenómenos relacionados con el ciclo celular, en la regulación de la MEC, ya sea al estimular la producción de componentes de la matriz extracelular o al inhibir la degradación de los mismos, a través de la regulación positiva de la expresión de los inhibidores de las proteasas y la regulación negativa sobre las proteasas. También estimula los contactos célula-MEC y célula-célula, al promover la expresión de las integrinas y de proteínas de adhesión celular. Asimismo, participa en la diferenciación celular de las células de Schwann en el sistema nervioso, la diferenciación del hueso, el

TABLA 1. SUPERFAMILIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE-BETA\*

TGF- $\beta$	Activinas/Inhibinas	MIS	DPP/BMP/DVR'
TGF- $\beta$ 1	n-inhibina	MIS	BMP2
TGF- $\beta$ 2	Inhibina- $\beta$ A- $\alpha$		BMP3
TGF- $\beta$ 3	Inhibina- $\beta$ B- $\alpha$		BMP4
TGF- $\beta$ 4	Inhibina- $\beta$ C		BMP5
TGF- $\beta$ 5	Activina- $\beta$ A- $\beta$ A		BMP6/Vgr-1
	Activina- $\beta$ B- $\beta$ B		BMP7/OP1
	Activina- $\beta$ A- $\beta$ B		BMP8/OP2
			BMP9
			BMP10

\*Tabla adaptada de las referencias 87-95

\*En esta familia hay más de 20 miembros, aquí sólo se mencionan las BMP.

cartilago, el músculo, la hematopoyesis, etc.<sup>87-90,108</sup> En general todos los miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  se unen a receptores específicos del tipo de las cinasas de serina-treonina.<sup>87-90,109-111</sup> Se sabe que la interacción del ligando con su receptor estimula la actividad de la cinasa de serina-treonina en los dominios citoplasmáticos de los receptores y esto induce la formación de complejos de receptores dimericos o multiméricos. Estos receptores pueden ser divididos en dos grupos con base en su homología. El primero incluye a los receptores tipo I con actividad cinasa de serina-treonina, que se caracteriza por presentar 10 residuos de cisteína en su dominio extracelular, un dominio transmembranal único y un dominio intracelular rico en serina/glicina, que precede inmediatamente al dominio de cinasa de serina/treonina. Los receptores tipo II con actividad cinasa de serina-treonina contienen un patrón de cisteínas extracelulares similar al de los receptores tipo I. Presentan también un dominio intracelular único, pero carecen del dominio intracelular rico en serina/glicina, que precede al dominio de cinasa de serina/treonina, presente en los receptores tipo I.<sup>109-111</sup> Aunque ambos tipos de receptores contienen dominios extracelulares de unión al ligando y sitios de señalamiento en sus dominios intracelulares, no son suficientes esas características para que ocurra el efecto del ligando.<sup>112,113</sup> El receptor tipo II une al TGF- $\beta$  en ausencia del receptor tipo I y la unión del TGF- $\beta$  al receptor tipo I requiere la presencia del receptor tipo II. Para que ocurra la transducción de la señal el receptor tipo

II forma complejos heteroméricos con el receptor tipo I, después de la unión del ligando.<sup>112-114</sup> La activación de la transducción de la señal inicia cuando el receptor tipo II transfosforila al receptor tipo I en el dominio GS, activándolo para transducir las señales. Este proceso al parecer implica fosforilación de las proteínas MADR (*mother against dpp-related gene*) que podrían funcionar como factores de transcripción para generar respuestas específicas.<sup>114a</sup>

Existen otro grupo de proteínas que sin ser receptores, tienen la capacidad de unir a algunos miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$ . Estas proteínas pueden enmascarar o estimular la función de los ligandos. Entre estas moléculas tenemos a la *folistatina*<sup>115</sup> que tiene una gran afinidad por la activina, de manera que regula negativamente los efectos de la activina. El *betaglicano*, un proteoglicano unido a membrana tiene como función la presentación de los TGF- $\beta$ , principalmente el TGF- $\beta$ 2, a los receptores tipo I y II. Esta molécula también puede presentarse en forma soluble, en cuyo caso secuestra al TGF- $\beta$ 2 y evita la unión de este factor a los receptores tipo I y II.<sup>116-118</sup> Por el contrario la *endoglina* una glicoproteína muy semejante al betaglicano tiene afinidad por los TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3, pero no por el TGF- $\beta$ 2.<sup>119</sup> La expresión en la superficie celular del *betaglicano* no es detectable en las células endoteliales que expresan la *endoglina*.

*Localización in situ de los miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$ , durante el desarrollo del cartílago, y su correlación con anomalías del desarrollo esquelético*

Durante el desarrollo temprano de la extremidad del embrión del ratón se observa que las BMP2, BMP4 y BMP7 se expresan igualmente en la AER y diferencialmente en el mesénquima.<sup>94</sup> La BMP2 se encuentra en la región posterior de la extremidad, en las zonas interdigitales y cuando ocurre la formación de los dígitos se ubica alrededor de ellos, después en las articulaciones y en los cojinetes.<sup>94,120</sup> La BMP4 presenta una expresión alta en el mesénquima anterior y posterior, así como en la zona de progreso, en los interdígitos y finalmente también en las articulaciones y en los cojinetes.<sup>94,121</sup> La BMP7 se localiza de manera difusa en todo el mesénquima y en proporciones elevadas en las zonas interdigitales, cuando ocurre la formación de los dígitos y desaparece, al igual que las BMP2 y BMP4, para cuando ha finalizado la muerte celular programada en las zonas interdigitales.<sup>94,120</sup> Por otro lado, la BMP5 se expresa durante la condrogénesis de la oreja en las zonas de condensación celular de la base y el pabellón, así como en regiones de condensaciones celulares en las costillas.<sup>101</sup> Las BMP2 y BMP7, también se encuentran en regiones del pericondrio de las costillas y las vértebras.<sup>120</sup> La BMP4 está presente sólo en ciertas regiones del lado dorsal y ventral de las vértebras.<sup>122,123</sup> La BMP6 se expresa en las regiones centrales de las costillas y vértebras cervicales y en el cartílago hipertrófico de las extremidades.<sup>123</sup> Sin embargo, ninguna de esas 5 moléculas se expresa en las zonas de condensación celular, que dan origen al blastema condrogénico en las extremidades.

Los ratones con la mutación short ear (*se*) se caracterizan por presentar orejas muy cortas, un cráneo más amplio y nariz más corta que los ratones silvestres. Además, la mutación se afecta el tamaño y la forma de otros elementos esqueléticos.<sup>124</sup> Recientemente, se determinó que el gen que es mutado en los ratones se codifica para la BMP5.<sup>125</sup> De manera, que se entiende que la mutación de este gen provoque que el tamaño de la oreja sea muy pequeño, ya que la BMP5 es la única BMP que se expresa en las condensaciones celulares de esta estructura, y no existe otra BMP que pudiera substituir la mutación de BMP5. En un estudio con ratones deficientes de BMP7 se observó que el desarrollo de las costillas, el cráneo y los dígitos se ve afectado; además, la ausencia de la

BMP7 origina polidactilia en las extremidades posteriores.<sup>126</sup>

El GDF5/CDMP1, a diferencia de las moléculas anteriores, se expresa en las zonas de condensación celular y el cartílago de los huesos de la extremidad humana y del ratón.<sup>102,103</sup> La CDMP2 se expresa en el cartílago hipertrófico al igual que la BMP6.<sup>103</sup> El papel del GDF5/CDMP1 es evidente en la mutación del locus *brachypodism (bp)* en el ratón, que corresponde a la mutación del gen GDF5/CDMP1.<sup>102</sup> Esta mutación se caracteriza por reducir el tamaño de los huesos largos en las extremidades, y cambiar el número de falanges en todos los dedos de las extremidades (anteriores y posteriores). Además, altera las condensaciones celulares, de manera que *in vitro* se observa que las células mesenquimáticas de ratones *bp* forman pocos agregados celulares en comparación con las células normales.<sup>127</sup> La adición de GDF5/CDMP1 a cultivo de células derivadas de extremidades de ratón normal estimula la agregación celular y la condrogénesis.<sup>128</sup> Recientemente se reportó que una condrodysplasia en humanos se asocia a la mutación del gen GDF5/CDMP1, este desorden genético en humanos es fenotípicamente similar al observado en la mutación *bp* en el ratón.<sup>104</sup>

La distribución de los TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y el TGF- $\beta$ 3 durante la condrogénesis en el ratón varía con cada región del esqueleto y con la edad del tejido. De manera que el TGF- $\beta$ 2 es el factor que se observa más temprano en la diferenciación del cartílago durante el desarrollo de las extremidades embrionarias, al expresarse en las etapas de condensación celular.<sup>129</sup> Los TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 también se observan en las condensaciones celulares que llevan a la formación de las vértebras.<sup>129,130</sup> El TGF- $\beta$ 1 se observa muy débilmente en el cartílago de las extremidades y el del esternón.<sup>130</sup> Más adelante en el desarrollo del ratón, el TGF- $\beta$ 3 se expresa en el pericondrio de muchos elementos cartilaginosos del esqueleto axial.<sup>129,130</sup> En el pollo no se observa la expresión de las isoformas del TGF- $\beta$  en las regiones de condensación celular, pero es evidente en los condroblastos, condrocitos en proliferación, hipertróficos y en zonas de cartílago calcificado.<sup>131</sup> Hasta la fecha no se ha reportado ninguna anomalía del esqueleto asociada a una expresión alterada de cualquiera de las isoformas del TGF- $\beta$ . El TGF- $\beta$ 5 es un factor que sólo se expresa en *Xenopus* al inicio de la neurulación, en tejidos adultos tales como el hígado, estómago, riñón, pulmones y corazón. Presenta mayor homología con el TGF- $\beta$ 1 de mamíferos y TGF- $\beta$ 4 de pollo que con los TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3.<sup>164</sup>

### Cultivos De Micromasa.

Antes de describir los efectos de los factores de crecimiento sobre la *condrogénesis*, es necesario incluir una sección que defina a los cultivos de micromasa, ya que este sistema experimental es la base para la evaluación de los factores de crecimiento sobre la *condrogénesis* obtenida de células mesenquimáticas de extremidades embrionarias. Además, también fue la base para los experimentos durante el desarrollo del presente trabajo.

El establecimiento de los cultivos de micromasa fue desarrollado por el grupo de Michael Solursh.<sup>132</sup> Estos cultivos se desarrollaron como una estrategia técnica para implementar una gran cantidad de cultivos celulares a partir de un número reducido de células. Existe un factor importante que regula la diferenciación del cartílago en estas condiciones, que es la densidad celular al inicio del inóculo para su cultivo. Durante el desarrollo normal de la extremidad es evidente que la densidad celular se incrementa al iniciar la formación de las condensaciones celulares. Mientras que en las regiones que no dan origen al cartílago la densidad celular es baja. Se ha observado que la *condrogénesis* que se lleva a cabo en cultivo es similar al que se desarrolla *in vivo*.<sup>133</sup> Por lo tanto, es necesario que se promuevan los contactos celulares *in vitro* y esto ocurre a altas densidades. El sistema de micromasa consiste en sembrar  $2 \times 10^5$  células o más en 10 microlitros de medio de cultivo, estas condiciones de alta densidad, favorecen la formación de los agregados celulares que llevan a la formación de los nódulos del cartílago, mientras que cultivos similares pero sembrados a bajas densidades no formarán cartílago o lo harán de manera muy reducida.<sup>132,134</sup>

Un aspecto muy importante del sistema de micromasa es que los procesos celulares que llevan a la *condrogénesis* recapitulan la secuencia de procesos observados *in vivo*. Esto ha permitido determinar las actividades histogénicas que tiene el mesénquima de extremidades embrionarias para desarrollar la *condrogénesis* en varios estadios de desarrollo, tanto del pollo como del ratón. Los resultados muestran que existe una etapa crítica para el desarrollo del cartílago en ambos modelos, esto es, cultivos de mesénquima de extremidades de embrión de pollo en los estadios 17 al 19, y del estadio 15 del embrión de ratón, forman agregados celulares sin formar nódulos de cartílago. Sin embargo, sólo los cultivos de mesénquima del estadio 19 del embrión de pollo son capaces de formar cartílago en presencia del *dibutiril AMP cíclico*. A través de este mismo sistema de cultivo

se ha podido determinar que el mesénquima en las extremidades embrionarias no es homogéneo en su capacidad condrogénica, así como en su respuesta a factores externos.<sup>132,134</sup> Además, este sistema ha sido usado para determinar los efectos sobre la *condrogénesis* de factores de crecimiento, ácido retinoico, fibronectina, etc.<sup>135-137</sup>

### El papel de los factores de crecimiento de la superfamilia del TGF- $\beta$ en la condrogénesis

Desde el trabajo clásico de Urist,<sup>139</sup> se sabe que la implantación del polvo de hueso desmineralizado en sitios subcutáneos o intramusculares induce la formación de cartílago y de hueso. Posteriormente, se aislaron dos factores inductores del cartílago, a partir de hueso desmineralizado. Estos dos factores presentaron homología con los TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2.<sup>140-142</sup> Por otro lado, también se han aislado las BMP del hueso desmineralizado, con capacidad para inducir la formación de hueso y cartílago en sitios ectópicos.<sup>91</sup> Actualmente se han identificado 13 BMP, todas ellas presentan homología con el TGF- $\beta$ ,<sup>94</sup> a excepción de la BMP-1, que presenta una estructura primaria distinta y homología con la proteinasa C de la procolágena.<sup>143</sup>

Las isoformas del TGF- $\beta$  ejercen efectos inhibidores o estimuladores sobre la *condrogénesis in vitro*, que dependen del origen embrionario, el estadio de diferenciación de las células, así como de las condiciones de cultivo. Los TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 estimulan la *condrogénesis* en cultivos de micromasa de células mesenquimáticas de extremidades embrionarias de pollo en los estadios de desarrollo 22/23 y 23/24, en presencia de suero.<sup>135,144-147</sup> Esto se logra al adicionar los TGF- $\beta$  por 2 horas al inicio del cultivo o durante los días 1 y 2 de cultivo de extremidades completas de los estadios 23/24.<sup>135,146</sup> Estos factores estimulan la producción de la colágena tipo II, el agregano, la síntesis de proteoglicanos, la actividad de la fosfatasa alcalina y la acumulación del azul de Alciano pH 1.0\* en la MEC.<sup>135,144-147</sup> Se obtuvieron efectos similares a partir de una exposición continua a los TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 en células de la punta de la extremidad, que incluyen a las células de la *zona de progreso*, o de mesénquima de extremidades completas del estadio 24 de desarrollo o por una exposición de 3 a 6 horas de TGF- $\beta$ 1 al inicio del cultivo de células de extremidades completas de los estadios 22/23.<sup>135,145</sup> Además de estimular

\*La tinción con azul de Alciano pH 1.0 distingue MEC ricas en glicosaminoglicanos sulfatados.

la *condrogénesis*, también se observó un incremento en la expresión de la fibronectina en las condensaciones celulares.<sup>145</sup> Sin embargo, en las extremidades posteriores se observó que el *TGF-β1* estimula en mayor proporción la expresión de la fibronectina y se ve asociada a un incremento de la *condrogénesis*, así como a un cambio en el patrón morfológico de las condensaciones celulares, esto es, de un patrón nodular a uno de capa continua de cartílago.<sup>148,149</sup> Por otro lado, se observó que el *TGF-β1* estimula la expresión de la N-cadherina,<sup>146</sup> que al igual que la fibronectina, se incrementa en las condensaciones celulares. En el ratón se encontró que el *TGF-β1* regula la diferenciación del cartílago de la cápsula ótica, al modular las interacciones epitelio-mesénquima que llevan a la *condrogénesis*. Este efecto parece ser sinérgico con el *FGF2*.<sup>150-152</sup>

En otros estudios se encontró que los *TGF-β1* y *TGF-β2* reprimen la *condrogénesis* en los estadios 23/24 y 24/25, en presencia del 0.5% de suero,<sup>153</sup> aunque esta inhibición es revertida por la adición de las *BMP3* y *BMP4*.<sup>154,155</sup> La adición de las *BMP3* y *BMP4* estimulan la expresión de la colágena tipo II, la síntesis de proteoglicanos y la acumulación de azul de Alciano en la MEC en los estadios 24/25 de desarrollo del pollo.<sup>154-156</sup> En los estadios 21/22, la *BMP2* estimula la *condrogénesis* e inhibe la miogénesis,<sup>156</sup> mientras que en los estadios 23/24 o 25 es más efectiva en su estimulación cuando se aplica después de que se formaron las condensaciones celulares,<sup>154,155</sup> no así para las isoformas del *TGF-β*, donde su acción es más efectiva cuando se administra antes de la formación de las condensaciones celulares.<sup>135,145-147,153</sup>

Otro grupo de moléculas de la superfamilia del *TGF-β*, que regulan la diferenciación del cartílago en células mesenquimáticas son la *activina* y la *inhibina*.<sup>56,157</sup> En un estudio se muestra que la *activina* inhibe la *condrogénesis* en el mesénquima de las extremidades de pollo en el estadio 24 de desarrollo, al disminuir la expresión de la colágena tipo II, la síntesis de proteoglicanos y la acumulación del azul de Alciano en la MEC.<sup>157</sup> Mientras que en otro estudio en el mismo sistema experimental, pero en los estadios 22/23 se observó que la *Activina* estimula la *condrogénesis*, al incrementar el tamaño de las agregaciones celulares y esto coincidió con un incremento en la expresión de la N-CAM y la tenascina.<sup>56</sup> La *Inhibina* también estimuló la *condrogénesis* al incrementar la expresión de la colágena tipo II, la síntesis de proteoglicanos y la acumulación de azul de Alciano en la MEC en

las células de extremidades embrionarias de pollo en el estadio 24.<sup>157</sup>

Estos estudios sugieren que las diferentes isoformas del *TGF-β* pueden regular la diferenciación del cartílago de células mesenquimáticas de extremidades de pollo *in vitro*, de manera semejante a las *BMP*. Parecer ser que las isoformas del *TGF-β* participan en etapas anteriores a la condensación celular y que estimulan la expresión de la N-cadherina y la fibronectina, mientras que las *BMP* lo hacen en etapas posteriores. Sin embargo, no se sabe si la *condrogénesis* estimulada por las *BMP*, ocurre a través de la expresión de moléculas características del *blastema condrogénico*.

#### Otras moléculas que regulan la *condrogénesis in vitro*

La *vitamina D* es un estimulador de la *condrogénesis* en cultivos de células de extremidad de pollo en el estadio 24 de desarrollo, a través de la expresión de la colágena tipo II y el agregano.<sup>158</sup> Además, incrementa la expresión de la N-cadherina y disminuye la del *TGF-β2*.<sup>146,159</sup> Los autores sugieren que esta hormona, al incrementar la expresión de moléculas de adhesión, regula negativamente la expresión del *TGF-β2*.<sup>159</sup> El efecto de la *vitamina D* sobre la *condrogénesis* parece estar mediado por los receptores *VDR/RXR* (*vitamin D receptor/retinoic X receptor*).<sup>163</sup>

El ácido retinoico (*AR*) es un factor multifuncional que también presenta actividades biológicas sobre la *condrogénesis*. El *AR* estimula la diferenciación del cartílago a bajas concentraciones (5 ng/ml) y la inhibe a altas concentraciones (50 ng/ml), en cultivos de mesénquima de extremidades de pollo de los estadios 23/24 de desarrollo.<sup>137,160-162</sup> El efecto del *AR* depende de la posición de las células en la extremidad embrionaria y del estadio de desarrollo. De manera que a la concentración de 5 ng/ml las células de la región proximal de los estadios 21/22 no acumulan una MEC positiva al azul de Alciano, como lo hacen las células de la región distal de los mismos estadios y células de las regiones subdistal y distal de los estadios 23/24.<sup>160</sup> También, se observan diferencias cuando se subdividen en anterior y posterior las regiones proximal, subdistal y distal de las extremidades de pollo de los estadios 21/22 y 23/24.<sup>161</sup> De igual manera, se observó que el *9-cis AR* también estimula la *condrogénesis*, pero antagoniza el efecto estimulador de la *vitamina D*.<sup>163</sup>

# JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

## JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

En el presente estudio se describen los efectos diferenciales de cuatro de las isoformas de la familia del TGF- $\beta$  sobre células mesenquimáticas de la extremidad embrionaria, durante varios estadios del desarrollo del ratón. Estos efectos han sido estudiados como casos aislados en embriones de pollo; sin embargo, antes del presente estudio no se reportó trabajo alguno que mostrará los efectos de los TGF- $\beta$  sobre mesénquima de la extremidad del ratón. Por otro lado, la expresión de las isoformas del TGF- $\beta$  en pollo no se observa en las regiones de condensación celular de las extremidades.<sup>131</sup> Mientras que en el ratón los TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 se expresan en regiones de condensaciones celulares de los diferentes elementos esqueléticos. Esto sugiere que las isoformas del TGF- $\beta$  puedan tener efectos distintos sobre la diferenciación del cartilago en el mesénquima del ratón, en comparación con el sistema de pollo. Por lo tanto, en este estudio nos enfocamos a determinar los efectos de las isoformas del TGF- $\beta$  sobre la *condrogénesis* en el mesénquima de extremidades embrionarias del ratón. Esto con el fin de poder distinguir si la morfogénesis y la diferenciación del cartilago son reguladas de manera independiente por las isoformas del TGF- $\beta$ , al igual que la expresión de moléculas marcadoras de la diferenciación del cartilago. Por todo esto los objetivos de este estudio fueron;

1) determinar si las células mesenquimáticas de extremidades anteriores de ratón embrionario en los días 11, 12 y 12½ post coito (estadios 19, 20 y 21 del desarrollo, respectivamente) responden diferencialmente a cada una de las isoformas del TGF- $\beta$ . Este objetivo se estableció con el fin de observar si existen diferencias en la respuesta de las células a los TGF- $\beta$  durante el desarrollo de las extremidades.

2) Evaluar si las isoformas del TGF- $\beta$  producen un estímulo diferencial sobre marcadores específicos del cartilago, en células mesenquimáticas de extremidades anteriores de ratón embrionario en el estadio 20 de desarrollo.

3) Establecer si los efectos de las isoformas del TGF- $\beta$  en la estimulación de la *condrogénesis* son mediados a través de moléculas específicas del *blastema condrogénico*, tales como la N-cadherina, la N-CAM, la tenascina y la fibronectina.

4) Finalmente, con base en la alta homología en la secuencia de genes que hay entre el TGF- $\beta$ 1 de mamíferos y el TGF- $\beta$ 5 de *Xenopus*<sup>164</sup> decidimos comparar los efectos del TGF- $\beta$ 5 y del TGF- $\beta$ 1

sobre la *condrogénesis* en células mesenquimáticas de extremidades anteriores de ratón embrionario, con el objeto de determinar si esta homología se ve reflejada en la funcionalidad de ambos factores.

# RESULTADOS



## RESULTADOS

En esta sección se mostrarán los resultados del presente trabajo y se harán a través de la presentación de copias de los artículos publicados y al final de la sección se presentarán algunos resultados aún no publicados. En el primer artículo se presenta la validación del sistema experimental desarrollado en el presente estudio. Para esto evaluamos el efecto de un extracto proteico de la región del cemento del diente, sobre células mesenquimáticas de embrión de ratón, sembradas en micromasa y la propiedad adhesiva sobre condrocitos de esternón de rata. En el extracto se encontraba presente la proteína de adhesión del cemento (CAP). En este estudio encontramos que el extracto es capaz de incrementar la formación de nódulos de cartilago, el depósito de la MEC positiva a azul de Alciano y la síntesis de glicosaminoglicanos. Además de presentar actividad mitogénica y de estimular la mineralización de la MEC, así como la actividad de la fosfatasa alcalina en cultivos a largo plazo. En los condrocitos se observó que el extracto estimula su adhesión de una manera dosis-dependiente. Hasta antes de este trabajo, se sabía que proteínas del diente promueven la *condrogénesis* y mineralización *in vivo* e *in vitro*, pero este trabajo muestra por primera vez que componentes específicos del cemento tienen la capacidad de estimular esos procesos.<sup>138</sup>

En el segundo y en el tercer artículos se describen los resultados centrales de la presente tesis. En éstos se muestra que las cuatro isoformas del TGF- $\beta$  regulan diferencialmente la *condrogénesis* en los tres estadios de desarrollo examinados. Por un lado son capaces de afectar el patrón morfogénico del cartilago y por otro la expresión de la colágena tipo II, la proteína de unión, la actividad de la fosfatasa alcalina y la biosíntesis de proteoglicanos. La diferenciación del cartilago es estimulada cuando los TGF- $\beta$  se administran durante los dos primeros días de cultivo. Esto sugiere que los TGF- $\beta$  podrían actuar durante las fases que llevan a la formación de las condensaciones celulares.

Finalmente, en la última parte de esta sección se describen los efectos de las cuatro isoformas del TGF- $\beta$  sobre la expresión de la N-cadherina, N-CAM, tenascina y fibronectina, para determinar la participación de los TGF- $\beta$  en la formación de las condensaciones celulares. Los resultados muestran que las cuatro isoformas del TGF- $\beta$  también regulan diferencialmente la expresión de la fibronectina, la tenascina, la N-CAM y la N-cadherina, lo que sugiere una posible participación de los TGF- $\beta$

en el establecimiento del *blastema condrogénico* durante el desarrollo del cartilago *in vivo* en el ratón.

Human cementum protein  
extract promotes chondro-  
genesis and mineralization  
in mesenchymal cells

# Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells

H. Arzate<sup>1</sup>, J. Chimal-Monroy<sup>2</sup>,  
L. Hernández-Lagunas<sup>2</sup>, L. Díaz de  
León<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Odontología, División de Estudios de Posgrado e Investigación, <sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

Arzate H, Chimal-Monroy J, Hernández-Lagunas L, Díaz de León L: Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells. *J Periodont Res* 1996; 31: 144-148. © Munksgaard 1996

Lino Díaz de León, Department of Cellular Biology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad Universitaria, P.O. Box 70228, México, D.F.

Key words: cementum; mesenchymal cells; chondrogenesis

Accepted for publication May 19, 1995

The formation of new bone, cementum and periodontal ligament has been the goal of periodontal therapy. However, there has been limited success in understanding the cellular and molecular mechanisms underlying these processes (1, 2). Cementum, particularly, has not been well studied, probably because of its low metabolic turnover rate and the laborious dissecting procedures required to obtain enough tissue to study its chemical and biological properties. According to some reports, cementum possesses unique molecules that could play a key role in periodontal regeneration. Some of these molecules have been shown to promote the migration, attachment and growth of periodontal ligament cells and influence their extracellular matrix (ECM) synthesis (3-10). Recently, a partially purified cementum extract with an  $M_r$  of 55,000 has been isolated. It promotes the attachment of periodontal ligament fibroblasts and seems to be located only in cementum (11). Although we do not know if this human cementum extract contains a single protein, it appears to have a different molecule from other molecules located in cementum and bone which induce attachment activity (12, 13). Since bone derived molecules have shown chondrogenic and osteogenic properties both *in vitro* and *in vivo* and because cementum resembles bone, it was thought that cementum protein extract in the  $M_r$  55,000 range might also regulate

cartilage and bone differentiation. In this report, the action of  $M_r$  55,000 cementum protein extract (CPE) on mesenchymal cells isolated from stage 19 mouse embryo forelimb buds is described.

Cementum protein extract was obtained as described elsewhere (14). Briefly, healthy teeth were obtained from the oral surgery clinic at the School of Dentistry, UNAM. Adhering soft connective tissue was removed from the root surfaces and cementum was harvested with sharp Gracey curettes under a stereoscopic microscope. Approximately 100 g of wet weight healthy cementum were obtained and extracted in 4M guanidine HCl for 7 days at 4°C. The protease inhibitors, 1 mM N-ethylmaleimide and phenyl methane sulfonyl fluoride, 25 mM EDTA and 1 µg/ml leupeptin and pepstatin were added. The extract was subjected to DEAE-cellulose ion-exchange chromatography and the proteins were eluted with 0.5 M NaCl. This fraction was electrophoresed onto SDS-PAGE 12.5% cross-linked slab gels. Gel bands representing an  $M_r$  55,000 were cut from the gel and the proteins contained in this fraction were electroeluted. They were then precipitated with acetone and used for the experiments described below. Protein concentration was determined by the Bradford assay utilizing a Bio-Rad assay kit. Serum albumin was used as the standard (15).

Since the mesenchymal cells at embryonic stage

19 are a heterogeneous population of cells which do not express the cartilage phenotype, chondrocytes were thought to be the ideal cells to determine whether cementum extract promoted cell attachment. Chondrocytes were obtained from adult rat sternum as follows: the apex of the sternum was minced with sterile scalpels and digested with 0.25% porcine trypsin for 30 min at 37°C. The minced tissue was washed with DMEM and redigested with 0.25% type II collagenase for 3 h at 37°C. The cell suspension was washed with DMEM supplemented with 10% FBS. Only primary cultures were used for the attachment activity experiments. Twenty-four multiwell Costar plates, not treated for tissue culture, were incubated with 1, 5 and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CPE. The protein extract was dissolved in PBS and the plates were incubated overnight at 4°C. The plates were then washed with PBS. Non-specific binding was blocked with 2 mg/ml BSA in serum free media for 1 h. Chondrocytes ( $2 \times 10^4$ ), were resuspended in serum free media, plated and allowed to attach for 1 h. The unattached cells were then removed with PBS and the attached cells were evaluated according to Hayman et al. (16) with some modifications. Briefly, fixed cells were incubated with 0.1% toluidine blue for 3 h. The dye was extracted with 1.0% SDS and read at 600 nm. Wells coated with 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of type I collagen served as a positive control and serum free media as a negative control. Attachment assays were performed in triplicate and the assays were repeated at least 3 times. The attached chondrocytes represented 54.23%, 67.18% and 84.65% of the control at 1, 5 and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CPE, as shown in Fig. 1 ( $p < 0.01$ ). No significant attachment was observed with the negative control.

Whether CPE promotes the expression of cartilage phenotype cells, forming cartilage nodules, or increases proteoglycan synthesis into ECM on limb bud mesenchymal cells has not been reported. To determine if CPE does either, micromass cultures of mouse mesenchymal cells with various concentrations of CPE were established.

Briefly, limb buds from embryonic stage 19 Balb/c mouse fetuses were dissected and digested with a mixture of 0.1% porcine trypsin and 0.1% type II collagenase for 30 min or until a single mesenchymal cell suspension was obtained. Cells were resuspended at a density of  $2 \times 10^7/\text{ml}$  in DMEM supplemented with 10% FBS. To obtain micromass cultures drops of 10  $\mu\text{l}$  were plated in 48 multiwell Costar plates and allowed to attach for 2 h at 37°C. The micromass cultures were incubated with 1, 5 and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CPE for 7 d in DMEM supplemented with 10% FBS. The cultures were fed on each subsequent day by medium replacement with

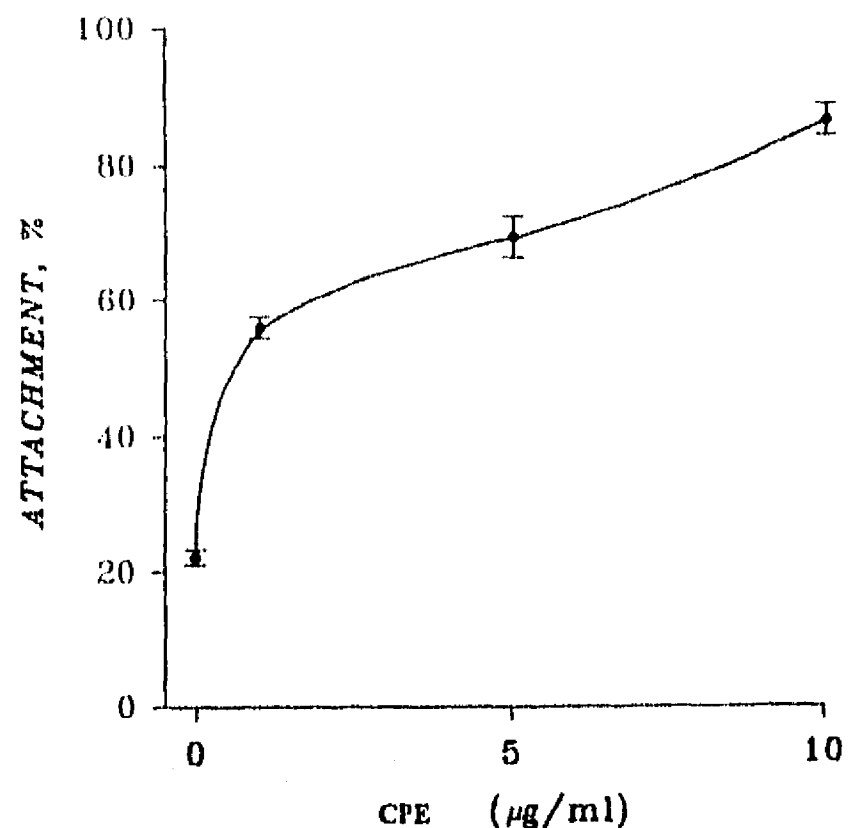


Fig. 1. Chondrocyte attachment promoted by CPE. The results are expressed as percentages of 3 different experiments.

1 ml of fresh medium with CPE. The number of cartilage nodules were increased by 40.8% and 60% with 1 and 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CPE as shown in Fig. 2A, ( $p < 0.05$ ). CPE at 1 and 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  also stimulated accumulation of alcian blue positive ECM by 30% and 33% over the controls (Fig. 2B).

To determine whether the increase in the number of cartilage nodules and accumulation of alcian blue were due to mitogenic activity of CPE, embryonic limb bud mesenchymal cells were cultured under micromass conditions in the presence of 0.2% FBS. Briefly,  $2 \times 10^5$  fetal limb bud cells were resuspended in 10  $\mu\text{l}$  of DMEM supplemented with 10% FBS, plated and allowed to attach for 2 h. The cultures were made quiescent by incubation with serum free media for 48 h. The media was replaced with fresh serum free media containing different concentrations of CPE. After 22 h of incubation, new serum free media with 5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  [ $^3\text{H}$ ] thymidine was added. Six h later the micromass cultures were washed with ice cold PBS, fixed with 10% TCA, picked up in 1.0 N NaOH and the radioactivity counted. CPE was mitogenic to the embryonic cells at 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (89.88%). The activity decreased at 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (61.46%) and had no effect at 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  when compared to 10% FBS used as a positive control (table 1).

When it was determined that CPE was mitogenic for the mesenchymal cells, the CPE was evaluated to determine whether it stimulated proteoglycan synthesis per cell or whether the increase of accumulation of alcian blue positive ECM was due to a larger number of colonies. To determine sulfated proteoglycan synthesis and glycosaminoglycan

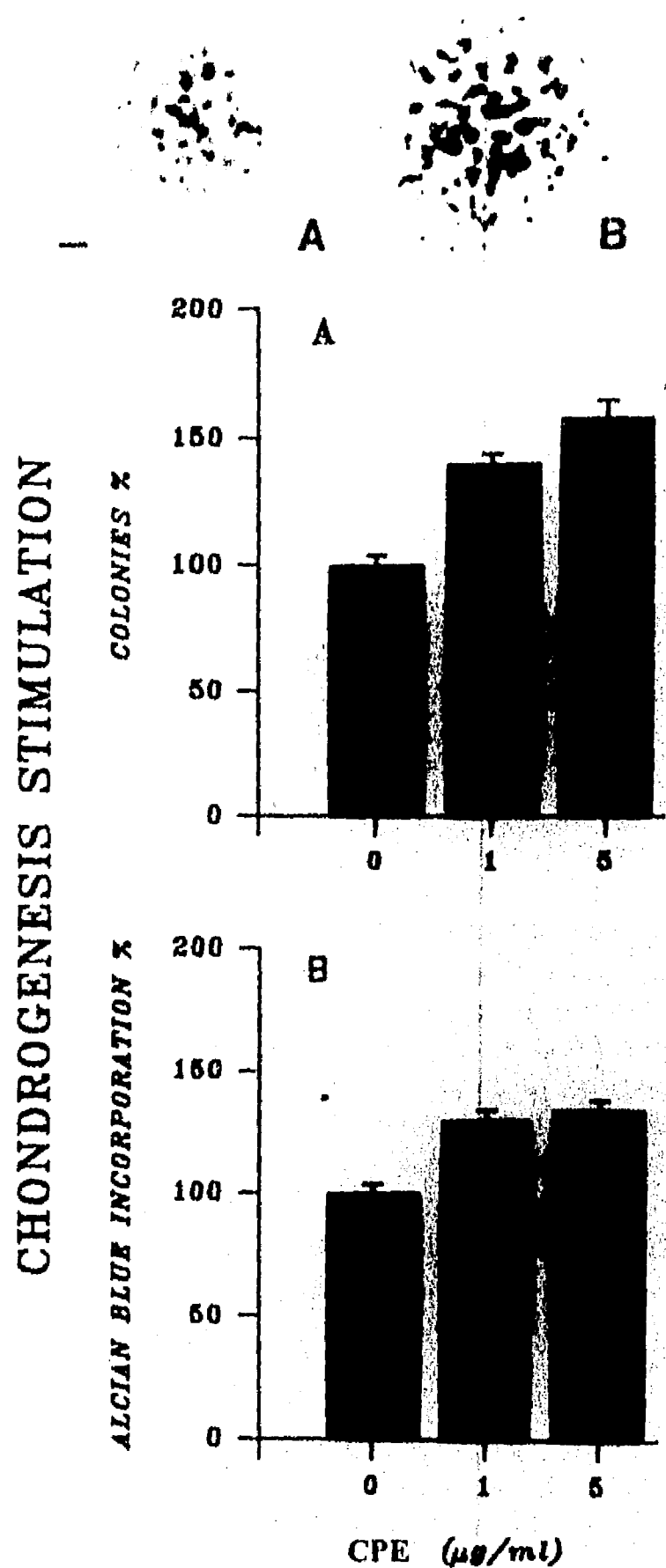


Fig. 2A. CPE enhanced the number of cartilage nodules representing cartilage. Fig. 2B. CPE promoted chondrogenesis based on accumulation of alcian blue into ECM. Results are expressed as percentages of triplicates. Inset: Photomicrograph of: A) 10% FBS. B) 5 µg/ml CPE showing the number of modules and accumulation of alcian blue promoted by CPE in relation to the control. Bar=0.5 mm.

(GAGs) composition, micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells were incubated with 5 µg/ml CPE and the cultures were isotopically labeled with 5 µCi/ml  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  for 6 h in DMEM. Purification of GAGs was achieved according to Oohira et al. (17). Digestion of radiolabeled material was performed with specific enzymes. Heparinase III (Sigma Chemical CO.) was used to evalu-

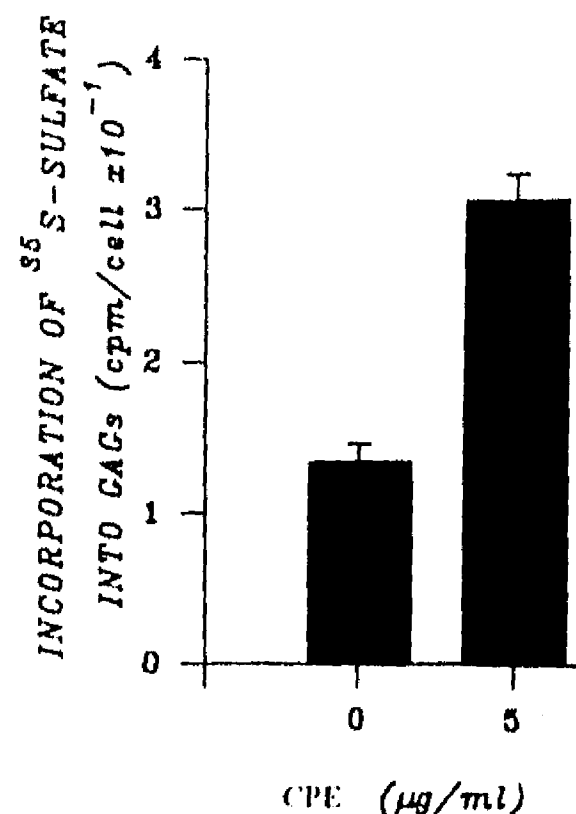


Fig. 3. 5 µg/ml CPE significantly stimulated the incorporation of sulfate into the ECM of the micromass culture.

Table 1. Mitogenic activity of CPE on limb bud mesenchymal cells

Mitogen	CPM $\times 10^{-3(a)}$	%
10% FBS	20.2 $\pm$ 2.3	100.00
CPE 1 µg/ml	18.1 $\pm$ 0.7	89.88
CPE 5 µg/ml	12.4 $\pm$ 1.0	61.46
CPE 10 µg/ml	3.2 $\pm$ 0.8	15.97
0.2% FBS	2.6 $\pm$ 0.3	-

(a) Mean  $\pm$  SD of triplicates of [ $^3\text{H}$ ] thymidine uptake.

ate heparan sulfate biosynthesis. This enzyme was prepared at 0.1 mg/ml in acetate buffer pH 7.0. Ten µl of the sample and 30 µl of enzyme solution were then incubated at 37°C for 15 h. Digestion of chondroitin sulfate was achieved with testicular hyaluronidase at 10,000 U/ml in 0.1M NaCl/0.5M sodium acetate buffer pH 5.4. The samples were incubated as described above. Dermatan sulfate was digested with 2.5 U/ml chondroitinase ABC prepared in Tris-HCl buffer, pH 8.0 and incubated for 1.5 h at 37°C. After the digestions were performed, the GAGs resistant to each enzyme were precipitated according to Kao et al. (18) and resuspended in 10 µl of deionized water. Incorporated radioactivity for each GAG was measured in Bray's solution in a scintillation counter. Sulfate incorporation was shown to be stimulated by 126.31% with 5 µg/ml CPE over 10% FBS used as control ( $p < 0.01$ ), see Fig. 3. In addition, the relative proportion of the different types of GAGs was determined by enzymatic degradation. However, heparan sulfate, chondroitin sulfate, dermatan sulfate and keratan sulfate were not affected by CPE. These findings suggest that CPE promotes total proteoglycan synthesis but not specific GAG synthesis.

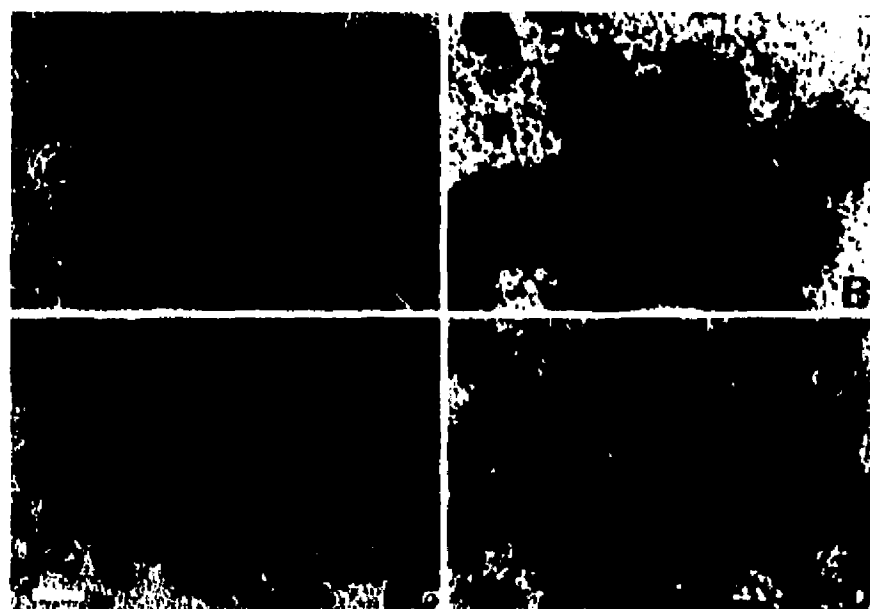


Fig. 4. Histochemical staining for AP of limb bud mesenchymal cells E19. A) control 10% FBS, B) 5 µg/ml CPE. Nodule mineralization of cultured micromass in 10% FBS supplemented with 50 µg/ml ascorbic acid and  $10^{-7}$  M dexamethasone and stained with alizarin red S. C) control 10% FBS, D) 5 µg/ml CPE. Bar=20 µm.

Since bone derived ECM molecules have shown osteogenic inductive properties, an examination was made to determine whether CPE promoted the expression of alkaline phosphatase (AP) and nodule mineralization in limb bud mesenchymal cells. Micromass cultures of mesenchymal cells were incubated for 7 d with the concentrations of CPE mentioned above and histochemically stained for AP. The results evaluated by light microscopy indicated that CPE increased the expression of AP in a greater number of cells than in the controls (Fig. 4A, B). The cells were also incubated in the absence of  $\beta$ -glycerophosphate for a longer period of time (28 d). The cultures were stained with alizarin red S and evaluated by light microscopy. CPE at 5 µg/ml increased the formation of mineralized nodules over the control (Fig. 4C, D). This study demonstrates for the first time that CPE promotes the formation of cartilage and mineralized nodules *in vitro*.

CPE was shown to promote attachment activity on sternum chondrocytes in a dose-dependent manner. CPE also promoted accumulation of alcian blue into cartilage nodules and increased the biosynthesis of sulfated proteoglycans. These parameters have been used previously to determine chondrocyte differentiation (19-23). Thus, our data indicate that CPE highly promotes differentiation in mesenchymal cells. The radiolabeling experiments indicated that CPE promoted total proteoglycan synthesis but it did not affect the kind of GAGs secreted into the ECM in E19 cells. However, in mesenchymal cells from stage 20 mouse embryos, CPE had a reverse effect and stimulated the synthesis of chondroitin sulfate by 50% over other GAGs. Proteoglycan synthesis was

increased by 30% (data not shown), suggesting that CPE enhanced the expression of the cartilage phenotype. The synthesis of proteoglycans rich in chondroitin sulfate indicates that CPE exerts a regulatory role on the expression of the cartilage phenotype, depending on the embryonic developmental stage. The extract also stimulated a mitogenic response in limb bud mesenchymal cells.

It is important to point out that the protein fraction extracted from cementum used in these experiments was only partially purified. It could contain several proteins. It is possible that one of the components of the CPE promoted the mitogenic response in mesenchymal cells and represents a minor component of the extract, which might also explain why the maximal response was obtained in the range of µg/ml instead of ng/ml. Both alkaline phosphatase and mineralization were maximal in the presence of 5 µg/ml CPE while proliferation was maximal at a concentration of 1 µg/ml and chondrocyte attachment at 10 µg/ml CPE. These findings suggest that CPE may promote attachment of chondrocytes, as well as the proliferation and differentiation of mesenchymal cells in culture through separate pathways, each of which require different CPE concentrations. Although it is well known that extracts from other mineralized tissues promote chondrogenesis and mineralization both *in vivo* and *in vitro*, this is the first evidence that cementum components also have the capacity to regulate these processes.

The processes of attachment, enhancement of proliferation and stimulation of mesenchymal cells to express first chondrocyte and then osteoblast-like phenotypes are of critical importance for periodontal regeneration, since there is evidence that progenitor cells of the periodontal tissues reside in paravascular areas of the periodontal ligament and endosteal spaces of the alveolar bone as undifferentiated mesenchymal cells (24, 25). The findings add to the possible role of CPE in periodontal regeneration. Although CPE needs further purification, there is evidence suggesting that cementum proteins act as regulators or key factors in chemoattraction, attachment and cell differentiation during the process of periodontogenesis.

## References

1. McNeil RL, Somerman MJ. Molecular factors regulating development and regeneration of cementum. *J Periodont Res* 1993; 28: 550-559.
2. Schroeder HE. Biological problems of regenerative cementogenesis: synthesis and attachment of collagenous matrices on growing and established root surfaces. In: Jean, Friedman, eds. *Int Rev of Cytology*, 1993; 142: 1-59.
3. McAllister B, Narayanan AS, Miki Y, Page RC. Isolation of a fibroblast attachment protein from cementum. *J Periodont Res* 1990; 25: 99-105.

4. Miki Y, Narayanan AS, Page RC. Mitogenic activity of cementum components to gingival fibroblasts. *J Dent Res* 1987; **66**: 1399-1403.
5. Nishimura K, Hayashi M, Matsuda K, Shigeyama Y, Yamasaki A, Yamaoka AJ. The chemoattractive potency of periodontal ligament, cementum and dentin for human gingival fibroblasts. *J Periodont Res* 1989; **24**: 146-148.
6. Somerman MJ, Foster RA, Imm GM, Sauk JJ, Archer SY. Periodontal ligament cells and gingival fibroblasts respond differently to attachment factors *in vitro*. *J Periodontol* 1989; **60**: 73-77.
7. Somerman MJ, Archer SY, Shteyer A, Foster RA. Protein production by human gingival fibroblasts is enhanced by guanidine extracts of cementum. *J Periodont Res* 1987; **22**: 75-77.
8. Nakae H, Narayanan AS, Raines E, Page RC. Isolation and partial characterization of mitogenic factors from cementum. *Biochem* 1991; **30**: 7047-7052.
9. Swanson JS, McAllister B, Narayanan AS. Isolation and characterization of fibroblast attachment protein from cementum. *J Dent Res* 1989; **68**: 361, Abstr No. 1440.
10. Somerman MJ, Archer SY, Hassel TM, Shteyer A, Foster RA. Enhancement by extracts of mineralized tissues of protein production by human gingival fibroblasts *in vitro*. *Archs Oral Biol* 1987; **12**: 879-883.
11. Arzate H, Olson S, Page RC, Gown AM, Narayanan AS. Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum. *FASEB J* 1992; **6**: 2990-2995.
12. Somerman MJ, Argraves WS, Foster RA, Dickerson K, Norris K, Sauk JJ. Cell attachment activity of cementum: bone sialoprotein II identified in cementum. *J Periodont Res* 1991; **26**: 10-16.
13. Somerman MJ, Schroff B, Argraves WS, et al. Expression of attachment proteins during cementogenesis. *J Biol Buccale* 1990; **18**: 207-214.
14. Olson S, Arzate H, Narayanan AS, Page RC. Attachment activity of cementum proteins and mechanism of endotoxin inhibition. *J Dent Res* 1991; **70**: 1262-1277.
15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248-254.
16. Hayman EG, Engvall E, A'Hearn E, Barnes D, Pierschbacher M, Ruoslahti E. Cell attachment on replicas of SDS polyacrilamide gels reveals two adhesive plasma proteins. *J Cell Biol* 1982; **95**: 20-23.
17. Oohira K, Tamki Y, Chiba A, Nogami H. Glycosaminoglycans in congenital pseudoarthrosis. *Calcif Tiss Res* 1977; **23**: 271-275.
18. Kao J, Huey G, Kao R, Stern R. Ascorbic acid stimulates production of glycosaminoglycans in culture fibroblasts. *Exp Mol Pathol* 1990; **53**: 1-10.
19. Panagiotis AT, Del Rio TK, Millan JL, Wheelock MJ. Expression of N-Cadherin and alkaline phosphatase in chick limb bud mesenchymal cells: regulation by 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> or TGF- $\beta$ 1. *Exp Cell Res* 1994; **213**: 433-437.
20. Downie SA, Newman SA. Morphogenetic differences between fore and hind limb precartilaginous mesenchyme: relation to mechanisms of skeletal pattern formation. *Dev Biol* 1994; **162**: 195-208.
21. Vukicevic S, Luyten FP, Reddi AH. Stimulation of the expression of osteogenic and chondrogenic phenotypes *in vitro* by osteogenin. *Proc Natl Acad Sci* 1989; **86**: 8793-8797.
22. Carrington JL, Reddi AH. Temporal changes in the response of chick limb bud mesodermal cells to transforming growth factor  $\beta$ -type 1. *Exp Cell Res* 1990; **186**: 368-373.
23. Schönfeld HJ, Pöschl B, Wessner B, Kistler A. Altered differentiation of limb bud cells by transforming growth factors- $\beta$  isolated from bone matrix and from platelets. *Bone Mineral* 1991; **13**: 171-189.
24. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol* 1976; **47**: 256-260.
25. McCulloch CAG, Nemeth B, Lowenberg B, Melcher AH. Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. *Anat Rec* 1987; **219**: 233-242.

Regulation of chondrocyte  
differentiation by trans-  
forming growth factors  $\beta 1$ ,  
 $\beta 2$ ,  $\beta 3$  and  $\beta 5$



## Regulation of Chondrocyte Differentiation by Transforming Growth Factors $\beta 1$ , $\beta 2$ , $\beta 3$ , and $\beta 5^a$

JESÚS CHIMAL-MONROY,<sup>b</sup> MARIA TERESA BRAVO-RUIZ,  
AND LINO DIAZ DE LEÓN<sup>b</sup>

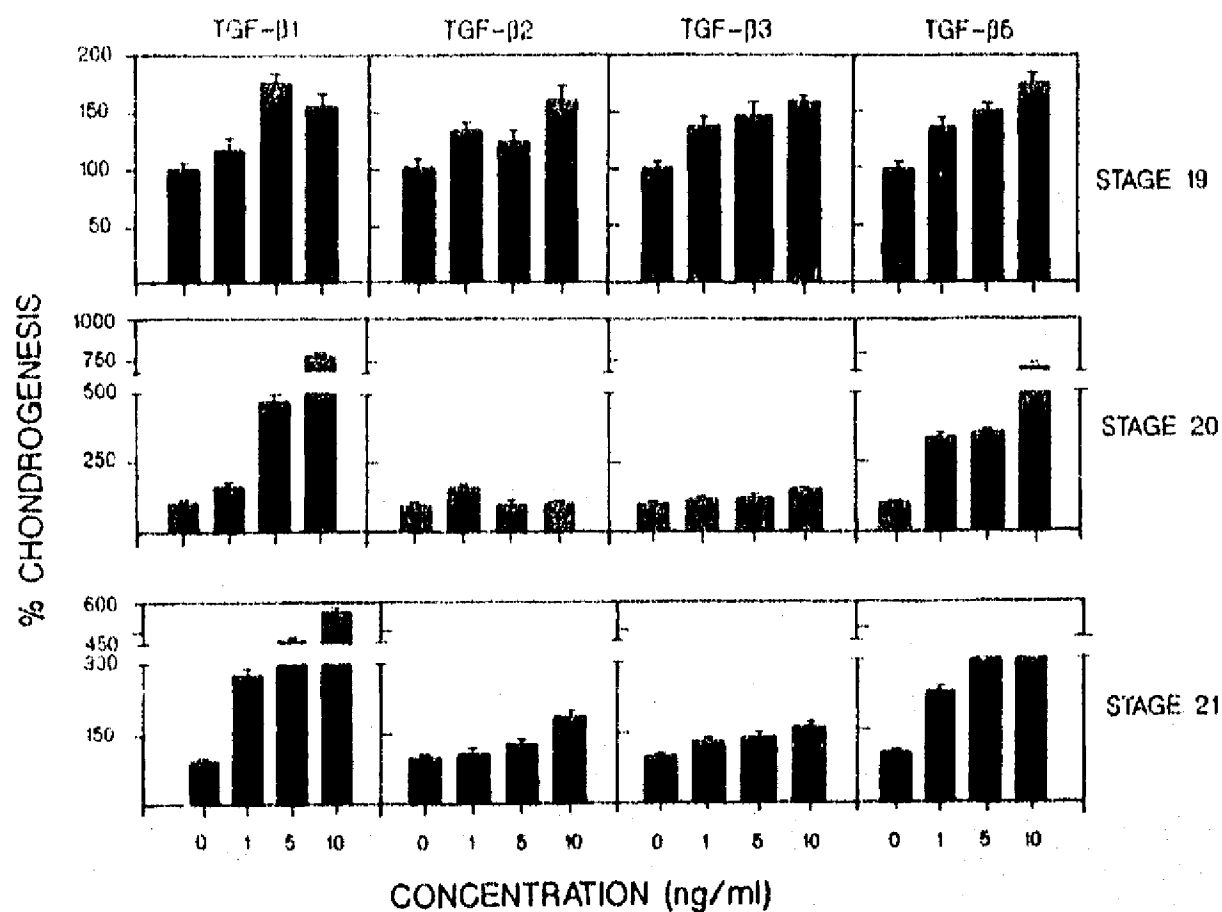
*Department of Cell Biology  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
UNAM, Ciudad Universitaria  
Apartado Postal 70-228  
México D.F. 04510, MEXICO*

Several reports have suggested a key role of mammalian TGF- $\beta 1$ , TGF- $\beta 2$ , and TGF- $\beta 3$  on chondrogenic differentiation of chick embryonic limb bud mesenchymal cells. However, in the chick embryo system it is not possible to differentiate the effects of distinct TGF- $\beta$  isoforms because they promote chondrogenesis in the presence of serum at chick embryo stages 22/23, 23/24, and 24/25. Also they have an inhibitory effect when mesenchymal cells are seeded without serum.<sup>1-5</sup> The present study was performed to determine whether mammalian TGF- $\beta$  isoforms and *Xenopus* TGF- $\beta 5$  were able to stimulate chondrogenesis in a differential manner according to developmental stage in limb bud mesenchymal cells from mouse embryonic stages 19, 20, and 21.

Our results showed that mesenchymal cells, cultured in micromass conditions, evoked a differential response to all four TGF- $\beta$  isoforms depending of the embryonic stage. The regulation of chondrogenic differentiation was evaluated by the accumulation of cartilage extracellular matrix in micromass cultures during 5 days of culture. At stage 19 the three mammalian TGF- $\beta$  isoforms and an amphibian TGF- $\beta$  isoform increased the accumulation of cartilage matrix (FIG. 1) and formed a uniform sheet of chondrogenic cells, instead of a nodular pattern as observed in the controls. At stages 20 and 21 all four TGF- $\beta$  isoforms elicited a different response than that obtained in stage 19, TGF- $\beta 1$  and TGF- $\beta 5$  stimulated the accumulation of cartilage matrix to levels above those elicited by controls and treated cultures during stage 19 (FIG. 1). This increase in cartilage matrix production was accompanied by the formation of an entire cell layer of chondrogenic cells. In contrast, mesenchymal cells evoked a different response to TGF- $\beta 2$  and TGF- $\beta 3$  compared with the response to TGF- $\beta 1$  and TGF- $\beta 5$ . The production of cartilage matrix at stages 20 and 21 was maintained at levels similar to those of stage 19, but presented a nodular pattern of chondrogenic cells instead of a uniform sheet in stage 19 under equal experimental conditions. These data suggest that limb bud mesenchymal cells changed their com-

<sup>a</sup>This work was supported by PAPIID Grant IN205293 and PADEP Grant 030318 from UNAM and ASPID, S.A. de C.V. grant.

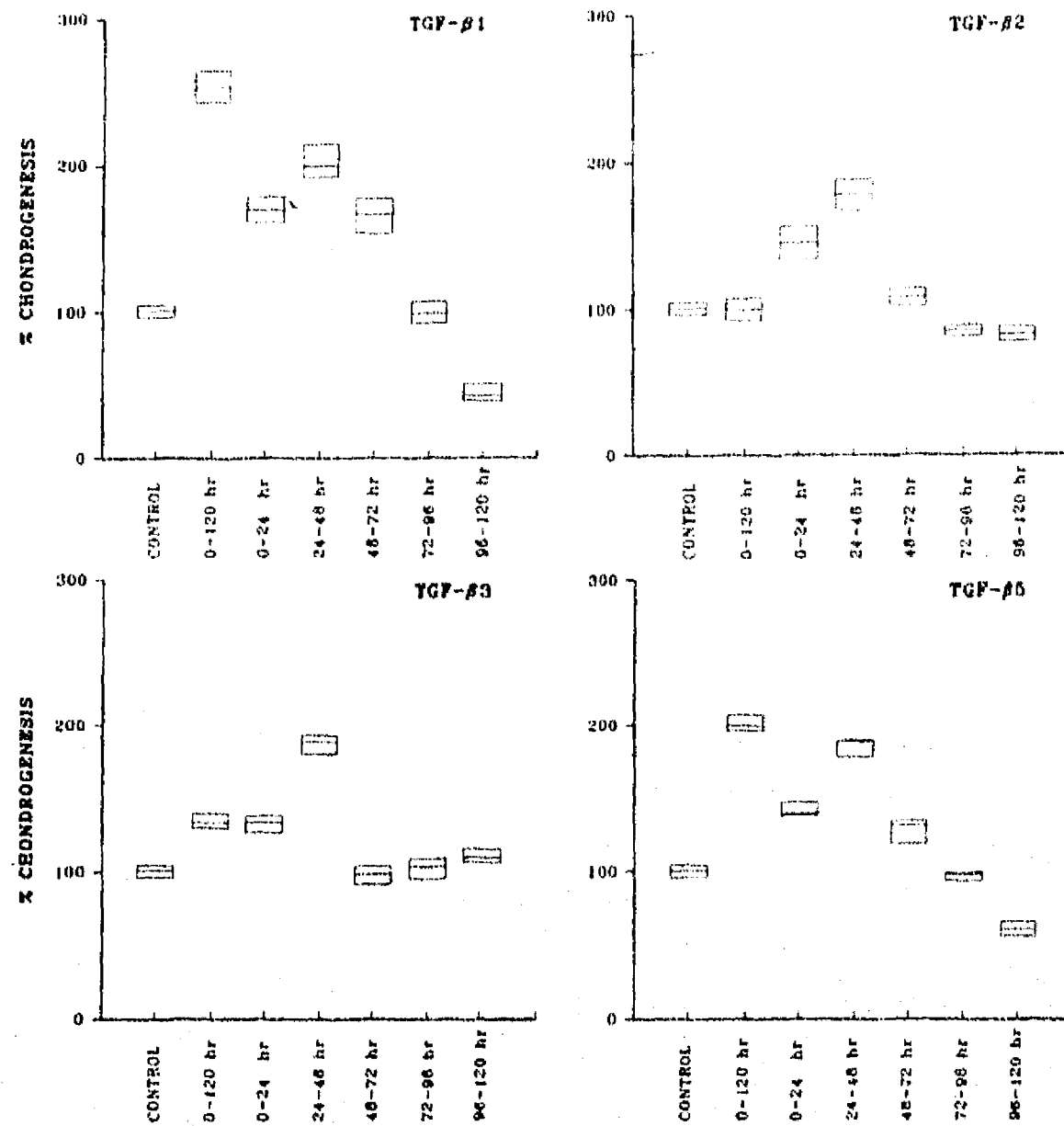
<sup>b</sup>To whom correspondence should be addressed.



**Figure 1.** The effect of TGF- $\beta$  isoforms on the accumulation of cartilage extracellular matrix on limb bud mesenchymal cells at embryonic stages 19, 20, and 21. Micromass cultures at day 5 of culture were stained overnight in 1% Alcian blue in 3% acetic acid, pH 1.0. Cultures were rinsed in 3% acetic acid and distilled water. Bound stain was extracted overnight with 0.3-mL 4-M guanidine hydrochloride with agitation and quantitated using an ELISA reader at a wavelength of 600 nm. Data are in percentage of stimulation in relation to controls and represent the means  $\pm$  the standard deviation from 4-5 cultures of three separate experiments. All values have a  $P < 0.01$  (vs. controls).

petence for TGF- $\beta$  isoforms during mouse development. It is interesting to study whether the decrease in the responsiveness to TGF- $\beta$ 2 by mesenchymal cells during limb mouse development can be explained by the absence of betaglycan in the cellular membrane, as suggested in other systems.<sup>6</sup>

On the basis of higher responsiveness to TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 5 than to TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 by mesenchymal cells at stage 20, we conducted this study at this stage, by evaluating proteoglycan metabolism, the expression of collagen II, and alkaline phosphatase activity. Regarding proteoglycan metabolism we found that the production of sulfated proteoglycans on day 5 of culture was enhanced by 1.54-, 1.0-, and 0.34-fold above controls as an effect of TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 5, and TGF- $\beta$ 3, while TGF- $\beta$ 2 was not able to stimulate them. On the other hand, the rate of catabolism of proteoglycans as effect of all TGF- $\beta$  isoforms was very similar under all conditions assayed. These results suggest that accumulation of the cartilage matrix and formation of a uniform sheet of chondrogenic cells in mesenchymal cells by effects of TGF- $\beta$ 1



**Figure 2.** TGF- $\beta$  isoforms regulate the synthesis of sulfated proteoglycans, depending on the time of addition to the cultures. Growth factors were added to micromass cultures at those concentrations in which a maximal response of cartilage extracellular matrix accumulation was obtained. Addition was at times 0-120 h, 0-24 h, 24-48 h, 48-72 h, 72-96 h, and 96-120 h. All cultures were incubated with  $^{35}\text{S}$ -sulfate during 6 h at day 5 of culture. Cultures were then washed six times with PBS. Washed micromasses were solubilized in 1-N NaOH and neutralized with 1-N HCl before counting in a liquid scintillation counter for the determination of  $^{35}\text{S}$  incorporated radioactivity. Data represent the mean  $\pm$  standard deviation from three cultures for each time point treatment of two separate experiments.  $P < 0.01$  (vs. controls).

and TGF- $\beta$ 5, can be explained by a higher synthesis and a lower catabolism of proteoglycans. Instead, for TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 the decrease in the accumulation of cartilage matrix and formation of a nodular pattern may be explained by decreased synthesis and lower catabolism of proteoglycans.

In addition to the regulation of proteoglycans metabolism by TGF- $\beta$  isoforms, we observed differential regulation of collagen II. In the control cultures, collagen II was

evident only in the nodular regions, while TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 5 increased the production of collagen II, showing a pattern of immunoreactivity in the entire cell layer. TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 showed a light increase in the production of collagen II above controls, showing immunoreactivity in the internodular region, in addition to cartilage nodules, suggesting that TGF- $\beta$  isoforms regulate cartilage-specific molecules. Regarding alkaline phosphatase activity the production and pattern were very similar to that observed for collagen II, except that TGF- $\beta$ 2 produced a higher increase than TGF- $\beta$ 3. Finally, to determine the period of action of TGF- $\beta$  isoforms, these were added to the culture at intervals of 24 h. FIGURE 2 shows that all four TGF- $\beta$  isoforms enhanced the higher production of proteoglycans when they were applied during the first 2 days of culture, suggesting that TGF- $\beta$  isoforms may regulate chondrocyte differentiation at early stages of differentiation.

In conclusion, this work provides evidence that TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 5, in addition to a high aminoacid sequence homology, present similar biological activities, suggesting that TGF- $\beta$ 5 may be the equivalent of mammalian TGF- $\beta$ 1.

#### ACKNOWLEDGMENT

We thank Isabel Pérez Monfort for her English help and M. V. Z. Georgina Diaz Herrera for her technical assistance.

#### REFERENCES

1. ROARK, E. F. & K. GREER. 1994. *Dev. Dyn.* **200**(2): 103-116.
2. CARRINGTON, J. L. & A. H. REDDI. 1990. *Exp. Cell Res.* **186**(2): 368-373.
3. CHEN, P., J. L. CARRINGTON, R. G. HAMMONDS & A. H. REDDI. 1991. *Exp. Cell Res.* **195**(2): 509-515.
4. KULYK, W. M., B. J. RODGERS, K. GREER & R. A. KOSHER. 1989. *Dev. Biol.* **135**(2): 424-430.
5. LEONARD, C. M., H. M. FULD, D. A. FRENZ, J. MASSAGUÉ & S. A. NEWMAN. 1991. *Dev. Biol.* **145**(1): 99-109.
6. LOPEZ CASILLAS, F., H. M. PAYNE, J. L. ANDRÉS & J. MASSAGUÉ. 1994. *J. Cell Biol.* **124**(4): 557-568.

Differential effects of  
transforming growth factors  
 $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 and  $\beta$ 5 on  
chondrogenesis in mouse  
limb bud mesenchymal cells

# Differential effects of transforming growth factors $\beta$ 1, $\beta$ 2, $\beta$ 3 and $\beta$ 5 on chondrogenesis in mouse limb mesenchymal cells

JESÚS CHIMAL-MONROY\* and LINO DÍAZ DE LEÓN\* <sup>bud</sup> <sup>i</sup>

Department of Cell Biology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Mexico D.F., Mexico

# bud #

**ABSTRACT** The present study was performed to determine whether mammalian TGF- $\beta$  isoforms and *Xenopus* TGF- $\beta$ 5 elicit a differential chondrogenic response on mesenchymal cells during mouse limb development. Results showed that TGF- $\beta$  isoforms produced a distinct chondrogenic pattern depending on embryonic stage. When they were applied to 5 day micromass cultures of limb mesenchymal cells from embryonic stages 19, 20 and 21, a differential response to all four TGF- $\beta$  isoforms assayed was observed. By stage 19 the cells formed a uniform sheet of cartilage cells; by stage 20, mesenchymal cells were more responsive to TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 5 than at stages 19 and 21, showing an entire cell layer of chondrogenic cells with higher accumulation of extracellular matrix. The diminished effect of TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 at stages 20 and 21 was accompanied by a nodular pattern of chondrogenic cells rather than by a uniform sheet, as seen at stage 19. At stage 20 TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 5 enhanced the expression of sulfated proteoglycans, type II collagen, cartilage link protein and alkaline phosphatase activity. In contrast, TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 caused less expression in the same parameters. Only a transient exposure to TGF- $\beta$  isoforms at days 1 and 2 of culture stimulate chondrogenesis, indicating that TGF- $\beta$  isoforms could regulate chondrogenesis at early stages of chondrocyte differentiation. However, when TGF- $\beta$  isoforms were applied to low density cultures of mesenchymal cells, chondrogenesis was enhanced only by 25%, suggesting that TGF- $\beta$  isoforms enhanced cartilage differentiation to higher levels in micromass cultures than in situations in which little or no chondrogenic differentiation normally occurs.

**KEY WORDS:** cartilage, chondrogenesis, limb development, mesenchymal cells, TGF- $\beta$  isoforms

## Introduction

During limb embryogenesis, undifferentiated mesenchymal cells migrate to the limb bud from the lateral plate mesoderm; later they condense to give rise to chondrogenic blastema and begin to synthesize and deposit extracellular matrix (ECM) components characteristic of cartilage. Condensing mesenchyme differentiates further into chondrocytes, which gradually undergo a process of hypertrophy, mineralization and vascular invasion. Then, osteoclasts and osteoblasts invade the cartilage zone forming a bone matrix with a functional bone marrow and a periosteum around the bone. A broad variety of growth factors influence the formation of cartilage during early embryogenesis, such as members of the transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) family among others (Solursh, 1989; Carrington and Reddi, 1991; Reddi, 1992, 1994; Elima, 1993; Cancedda *et al.*, 1995).

The TGF- $\beta$  family consists of five proteins with wide-ranging and opposite effects on many cellular processes such as control of cell proliferation and differentiation. The amino acid sequences of TGF- $\beta$  isoforms show approximately 70% homology among different mammalian species. Chicken TGF- $\beta$ 4 and frog TGF- $\beta$ 5 present

homologies with mammalian TGF- $\beta$ 1 of 82% and 76%, respectively, suggesting that TGF- $\beta$ 4 and TGF- $\beta$ 5 are the chick and frog homologs of mammalian TGF- $\beta$ 1 (Kondaiah *et al.*, 1990; Burt and Paton, 1992).

Among the diverse roles of TGF- $\beta$  isoforms in cell differentiation are those related to chondrocyte differentiation. They exert both stimulatory and inhibitory effects on cartilage cells *in vitro*, depending on their developmental origin and stage, as well as culture conditions. In micromass cultures of chick limb mesenchymal cells, many growth factors elicit different responses when added exogenously. Exposure to TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 in the presence of serum stimulate chondrocyte differentiation on mesenchymal cells obtained from chick embryos at stages 22/23 and 23/24 (Kulyk *et al.*, 1989; Carrington and Reddi, 1990; Schofield and Wolpert, 1990; Leonard *et al.*, 1991; Roark and Greer, 1994; Tsonis *et al.*, 1994). In the presence of 5% serum, TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 decrease chondrocyte differentiation at embryonic stages 23/24 and 24/25, but this inhibition is avoided by BMP-3 and BMP-

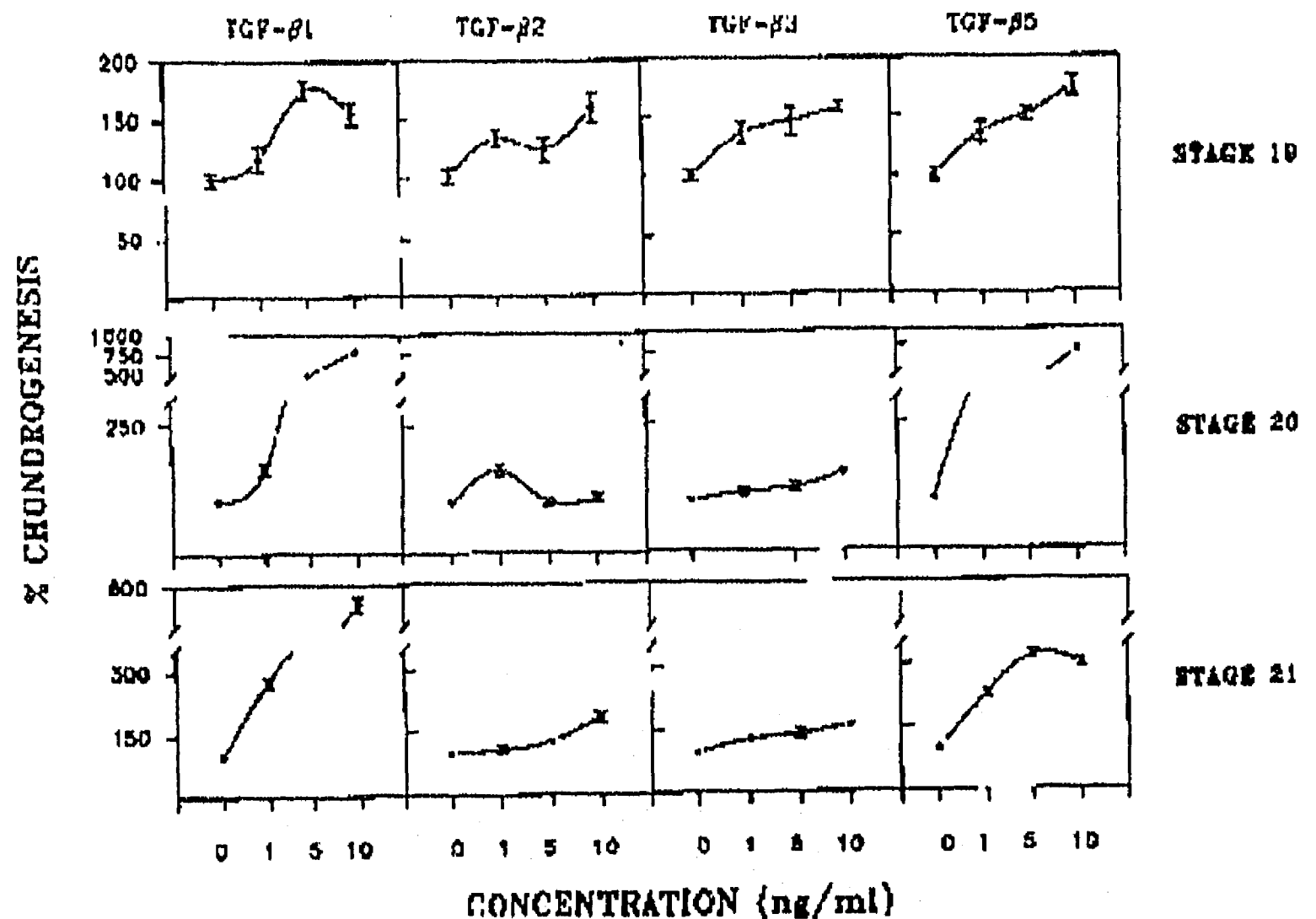
*Abbreviations used in this paper:*

\*Address for reprints: Connective Tissue Laboratory, Department of Cell Biology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad Universitaria, Apartado Postal 70-228, México D.F. 04510, Mexico. FAX: 525.622-3897.

0214-6282/97/\$05.00

© UBC Press  
Printed in Spain

Fig. 1. Dose response effect of TGF- $\beta$  isoforms on cartilage matrix production as measured by Alcian blue extraction from micromass cultures of limb bud mesenchymal cells at embryonic stages 19, 20 and 21. Data are means  $\pm$  standard deviation from 4-5 cultures of 3 separate experiments. All values have a  $P < 0.01$  (vs controls). % chondrogenesis means percentage of chondrogenesis stimulation as compared to controls. For stage 19 controls had an optical density ( $OD_{600}$ ) of  $0.550 \pm 0.038$ ; stage 20,  $0.437 \pm 0.025$ ; stage 21,  $0.358 \pm 0.031$ . Data were represented as % chondrogenesis to make comparable chondrogenesis stimulation among the three different stages.



4 (Carrington and Reddi, 1991; Carrington *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1991). These reports suggest that TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 are key regulators of the chondrocyte differentiation of chick embryonic limb bud mesenchymal cells *in vitro* as are BMPs (Carrington *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1991; Roark and Greer 1994). However, TGF- $\beta$  isoforms do not induce cartilage and bone in ectopic sites as do BMPs (Wozney *et al.*, 1988).

5  
50  
Other molecules that regulate chondrocyte differentiation of chick embryonic limb bud mesenchymal cells are activin and inhibin (Chen *et al.*, 1993; Jiang *et al.*, 1993). An increase in the size of precartilaginous nodules and in the expression of N-CAM and tenascin occurs as a consequence of activin administration (Jiang *et al.*, 1993). Similarly, vitamin D enhances chondrogenesis (Tsonis, 1991) and the expression of N-cadherin and alkaline phosphatase in chick limb bud cells (Tsonis *et al.*, 1994); it also downregulates TGF- $\beta$ 2 expression, suggesting that vitamin D upregulates cell adhesion molecules which, in turn, downregulate TGF- $\beta$  (Del Rio-Tsonis *et al.*, 1994). Finally, retinoic acid (RA) is a multifunctional factor with important activities on chondrocyte differentiation. Chondrogenesis in embryonic chick limb mesenchymal cells is stimulated at a concentration of 10 ng/ml, whereas at concentrations up to 100 ng/ml it is inhibited (Paulsen *et al.*, 1988). Its effects in mouse limb bud mesenchymal cells is mediated by RA receptor- $\beta$ 2 (Jiang *et al.*, 1995). In chick craniofacial mesenchyme the inhibition or stimulation of chondrogenesis by RA depends on the developmental stage and origin of tissue (Langille *et al.*, 1989).

In the current study, we have evaluated the effects of mammalian TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 on the chondrogenic differentiation of mouse embryonic limb bud mesenchymal cells and determined whether these effects could be different in embryonic stages 19, 20 and 21. In addition, we evaluated the effects of another TGF- $\beta$  isoform (*Xenopus* TGF- $\beta$ 5) on the same model. The high homol-

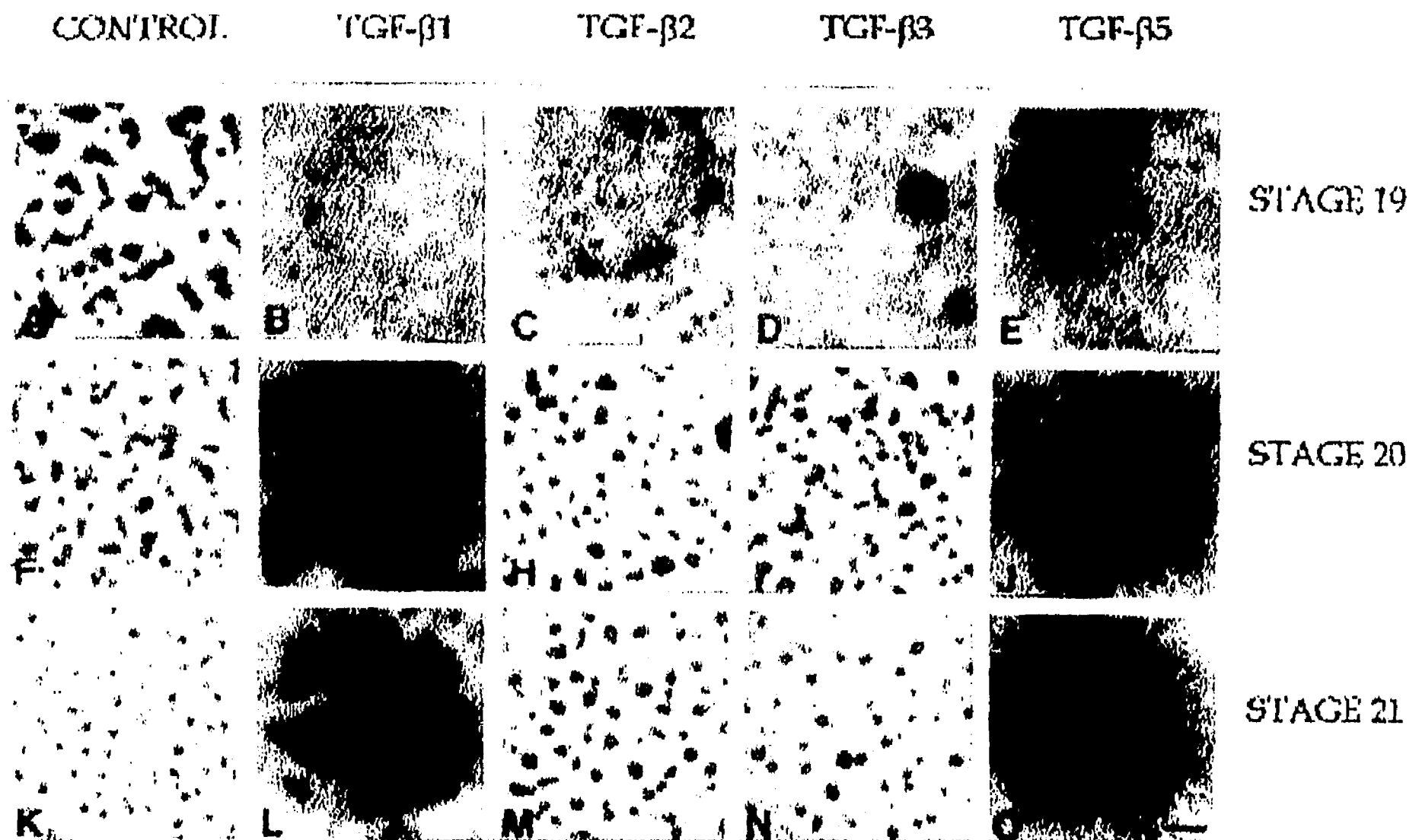
ogy between TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 5 led us to investigate whether or not TGF- $\beta$ 5 could regulate chondrocyte differentiation in mouse limb bud cells.

Our results showed that all four TGF- $\beta$  isoforms elicited a differential response on mouse limb bud mesenchymal cells depending on the embryonic stage. At stage 20, they differentially regulated the expression of specific cartilage matrix components. When all four TGF- $\beta$  isoforms were administered during the first two days of culture chondrogenesis was enhanced, while at day 5 of culture it was inhibited, and TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 had no effect. In low density cultures, all four TGF- $\beta$  isoforms slightly promoted chondrogenesis, suggesting that they stimulate cartilage differentiation to higher levels in micromass conditions rather than in situations in which little or no chondrogenic differentiation normally occurs. Based on the reported homologies between TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 5 (Kondaiah *et al.*, 1990; Burt and Paton, 1992), and on the biological activities reported in this work, we support the suggestion that *Xenopus* TGF- $\beta$ 5 is equivalent to mammalian TGF- $\beta$ 1.

## Results

### Effects of TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 and TGF- $\beta$ 5 on *in vitro* chondrogenesis

To test the functionality of the TGF- $\beta$  isoforms used in this work, we evaluated them in chick embryo limb bud mesenchymal cells at stages 23/24 seeded at micromass cultures in the presence of 10% FBS during 5 days. The results obtained indicate that all four TGF- $\beta$  isoforms stimulated the accumulation of cartilage matrix and  $^{35}$ S-sulfate incorporation into proteoglycans. TGF- $\beta$ 1 showed an increase on synthesis of proteoglycans by 250%; TGF- $\beta$ 2 by 230%; TGF- $\beta$ 3 by 220% and TGF- $\beta$ 5 by 240% above controls ( $P < 0.01$ ). These results are comparable with those obtained by Kulyk *et al.*



**Fig. 2.** Influence of TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 and TGF- $\beta$ 5 on chondrogenesis pattern. Micromass cultures at day 5 of culture were stained with Alcian blue, cells from stage 19 (A-E), stage 20 (F-J), and stage 21 (K-O) were cultured as micromass cultures without TGF- $\beta$  isoforms (A, F and K) or with 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 (B, G and L), 1 ng/ml TGF- $\beta$ 2 (C, H and M), 10 ng/ml TGF- $\beta$ 3 (D, I and N) and 10 ng/ml TGF- $\beta$ 5 (E, J and O). Bar, 0.5 mm

(1989), Leonard *et al.* (1991), Roark and Greer (1994) and Schofield and Wolpert (1990).

Once the functionality of TGF- $\beta$  isoforms was established, we examined the possible role of TGF- $\beta$  isoforms in the regulation of chondrogenic differentiation on the accumulation of cartilage matrix in mouse limb bud mesenchymal cells, plated in micromass culture conditions. Micromass cultures were prepared from the cells comprising stages 19, 20 and 21 mouse limb buds. All four TGF- $\beta$  isoforms elicited a differential response on chondrogenesis, depending on the developmental embryonic stage (Figs. 1 and 2). At stage 19 we added different concentrations of TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 and TGF- $\beta$ 5 to micromass cultures. A gradual increase in the accumulation of Alcian blue, pH 1.0-positive ECM, became apparent after 5 days of culture in a dose-dependent fashion. In the presence of 5 ng/ml TGF- $\beta$ 1 and 10 ng/ml TGF- $\beta$ 5 the accumulation of Alcian blue-positive ECM was enhanced by 75% above controls, whereas 10 ng/ml TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 increased the accumulation of Alcian blue-positive ECM by 55% above controls (Fig. 1). At stage 20, the response of mesenchymal cells to different TGF- $\beta$  isoforms was dose-dependent, except for TGF- $\beta$ 2. The accumulation of Alcian blue-positive ECM was different for each growth factor; the stimulation was 675% for 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 and 590% for 10 ng/ml TGF- $\beta$ 5 above controls, while for 1 ng/ml TGF- $\beta$ 2 and 10 ng/ml TGF- $\beta$ 3 the stimulation was 55% above controls (Fig. 1). Finally, the dose-dependent effect of TGF- $\beta$  isoforms was maintained at embryonic stage 21, although the accumulation of Alcian blue-positive ECM was decreased when compared to stage

20. In the presence of 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 and 5 ng/ml TGF- $\beta$ 5, the accumulation corresponded to 455% and 211% above controls, respectively. Regarding TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3, 10 ng/ml of both factors enhanced accumulation of Alcian blue-positive ECM by 75% above controls (Fig. 1).

By morphological analysis we observed that TGF- $\beta$  isoforms regulate the pattern formation of Alcian blue-positive nodules (Fig. 2). At embryonic stage 19 TGF- $\beta$ -treated cultures promoted the formation of a uniform sheet of Alcian blue stained cartilage matrix (Fig. 2A-E). At embryonic stage 20 mesenchymal cells showed a strong decrease in their response to TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3, exhibiting Alcian blue positive cartilage nodules separated by much non-chondrogenic tissue (Fig. 2H and I). Also, TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 5 promoted a striking increase in the uniform mass of staining cartilage matrix and decreased non-chondrogenic areas in the micromass cultures (Fig. 2G and J). For embryonic stage 21, the fusion of cartilage nodules was still present at 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 5 (Fig. 2L and O), while TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 did not increase the fusion of cartilage nodules (Fig. 2M and N).

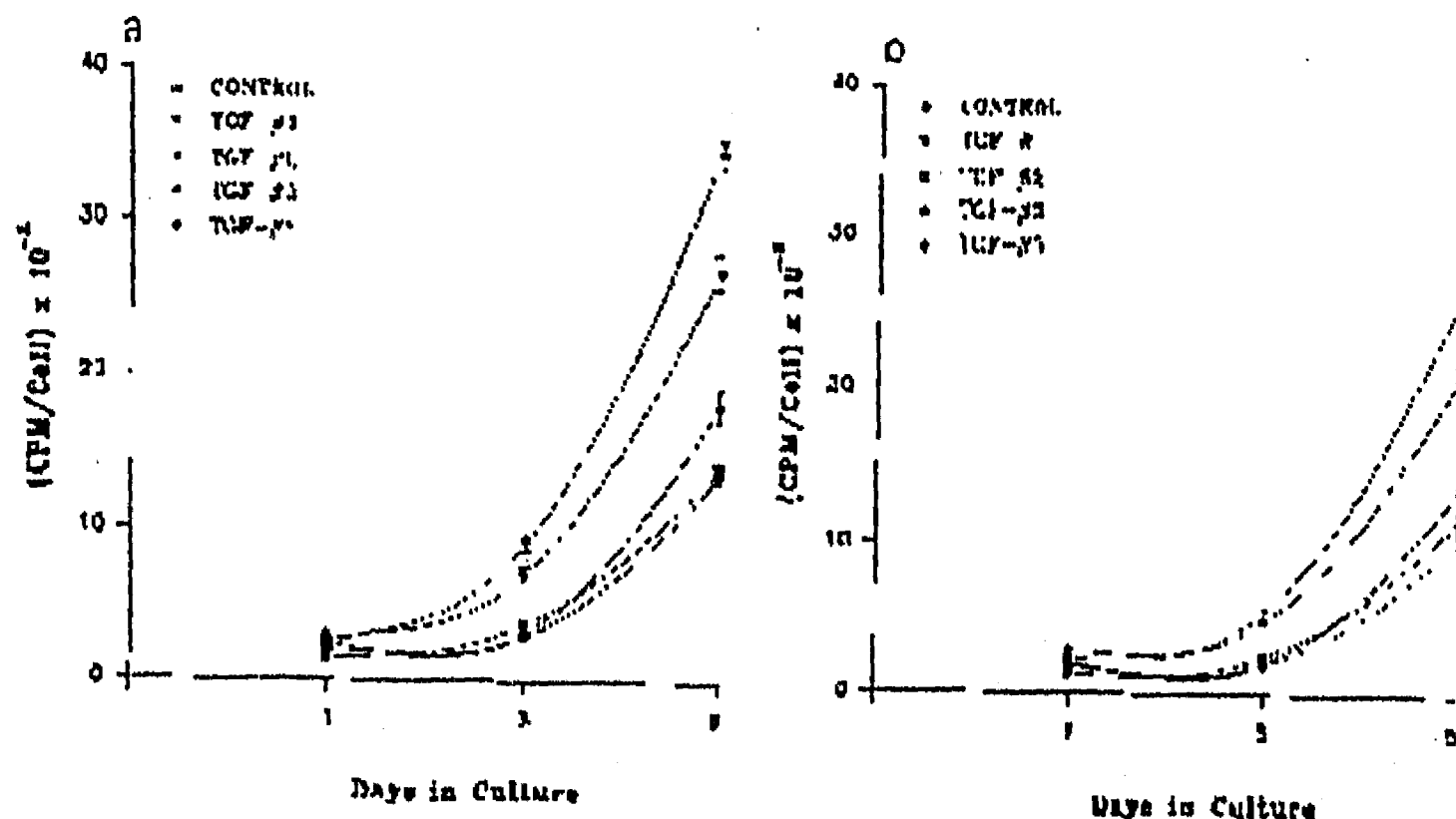
Since TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 5 regulate the fusion of Alcian blue-positive cartilage nodules and promote the accumulation of Alcian blue-positive ECM much better than TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 at embryonic stages 19 and 21, we further analyzed the effects of TGF- $\beta$  isoforms on mesenchymal cells from embryonic stage 20.

#### **Metabolism of proteoglycans**

TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 5 enhanced the synthesis of proteoglycans



Fig. 3. Effects of TGF- $\beta$  isoforms on the synthesis of glycosaminoglycans by stage 20 mouse limb bud mesenchymal cells. (a) Time course incorporation of  $^{35}\text{S}$ -sulfate; (b) incorporation of  $^3\text{H}$ -glucosamine. Data represent means  $\pm$  standard deviation from 3 cultures for each time point of 2 separate experiments.  $P < 0.01$  (vs controls) except for TGF- $\beta$ 2 treated cultures.



At in micromass cultures to higher levels from the third day of culture, compared to TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3. And by day 5 of culture TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 5 and TGF- $\beta$ 3 at a concentration of 10 ng/ml enhanced the synthesis of proteoglycans by 1.54-, 1.0- and 0.34-fold respectively above controls, while TGF- $\beta$ 2 did not stimulate proteoglycan synthesis (Fig. 3a). The increase in the accumulation of sulfated glycosaminoglycans (GAG) into proteoglycans was not due to oversulfation of GAG chains, since the incorporation of  $^3\text{H}$ -glucosamine into GAG, which occurred in the presence of TGF- $\beta$  isoforms, resembled the incorporation of  $^{35}\text{S}$ -sulfate (Fig. 3b). TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 5 and TGF- $\beta$ 3 enhanced  $^3\text{H}$ -glucosamine incorporation by 1.57-, 1.05- and 0.34-fold respectively above controls. However, TGF- $\beta$ 2 did not promote the incorporation of  $^3\text{H}$ -glucosamine into GAG (Fig. 3b).

#### $^3\text{H}$ -thymidine incorporation

The incorporation of  $^3\text{H}$ -thymidine by mesenchymal cells was measured in micromass cultures at days 1, 3 and 5 of culture (Table 1). At day 1 of culture only TGF- $\beta$ 3 decreased  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation, whereas TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 5 had no effect. At day 3 of culture TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 5 presented no significant differences as compared with controls, TGF- $\beta$ 2 increased  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation and TGF- $\beta$ 3 showed a slight decrease. Finally at day 5 of culture there were no significant differences between controls and TGF- $\beta$  treated cultures.

#### Regulation of type II collagen, cartilage link protein and alkaline phosphatase activity

To determine the specificity of the effects of TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 and TGF- $\beta$ 5 on chondrogenic differentiation, the expression of type II collagen and cartilage link protein was evaluated (Figs. 4 and 5). By immunofluorescence staining all four TGF- $\beta$  isoforms stimulated the expression of type II collagen above controls (Fig. 4a). Nevertheless, with TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 5, an entire cell layer of chondrogenic cells expressing type II collagen was observed, instead of a nodular pattern as seen with TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 (Fig. 4a). Western-blot analysis showed that all four TGF- $\beta$  isoforms increased type II collagen expression. However,

such increase was more pronounced with TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 5 (Fig. 4b). Scanning densitometry of western-blot showed that TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 and TGF- $\beta$ 5 enhanced type II collagen expression by 2.57-, 1.34-, 1.59- and 1.86-fold, respectively (Fig. 4c).

The immunofluorescence staining for cartilage link protein showed a pattern similar to that obtained for type II collagen. TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 5 showed immunoreactivity on the entire cell layer, while in TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 treated cultures a nodular pattern was observed (Fig. 5a). Western-blot analysis showed that all four TGF- $\beta$  isoforms increased cartilage link protein expression (Fig. 5b). Scanning densitometry of western-blot showed that TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 and TGF- $\beta$ 5 enhanced cartilage link protein expression by 2.40-, 1.21-, 1.48- and 1.93-fold respectively (Fig. 5c).

Alkaline phosphatase activity was differentially stimulated by TGF- $\beta$  isoforms. TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 promoted alkaline phosphatase activity in intermodular regions, while in control cultures it was only seen in nodular regions. TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 5 enhanced the activity by forming a uniform sheet of alkaline phosphatase-

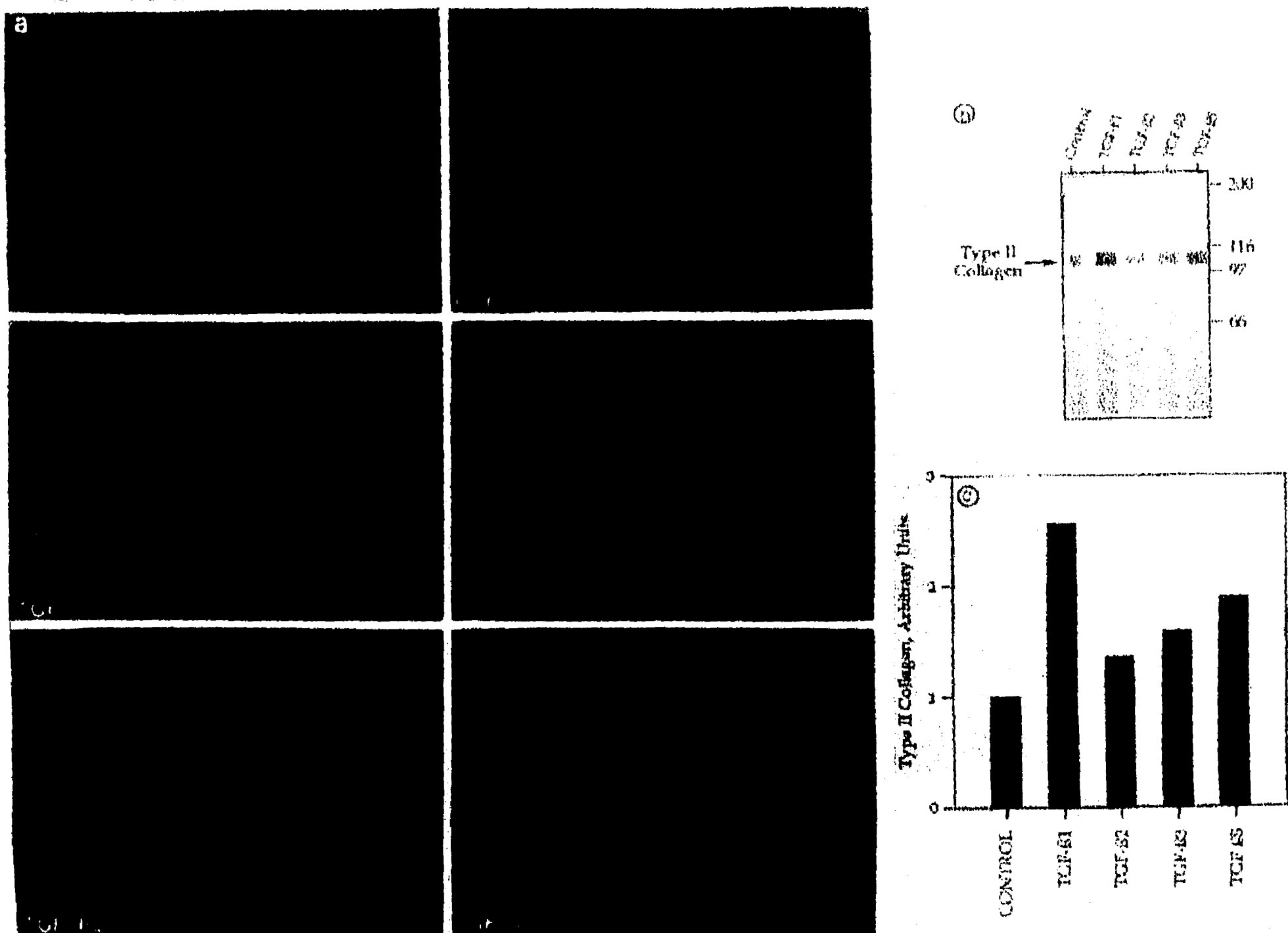
TABLE 1

#### EFFECTS OF TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, AND TGF- $\beta$ 5 ON INCORPORATION OF $^3\text{H}$ -THYMIDINE BY MOUSE LIMB BUD MESENCHYMAL CELLS IN MICROMASS CULTURES

	Day $^3\text{H}$ -thymidine incorporation (CPM/ $\mu\text{g}$ DNA) $\checkmark$		
	1	3	5
Control	6958 $\pm$ 550*	8725 $\pm$ 747	7917 $\pm$ 346
TGF- $\beta$ 1	6458 $\pm$ 651	8026 $\pm$ 945	7911 $\pm$ 508
TGF- $\beta$ 2	8098 $\pm$ 788	11578 $\pm$ 559*	8520 $\pm$ 530
TGF- $\beta$ 3	4820 $\pm$ 859*	6570 $\pm$ 775*	7053 $\pm$ 802
TGF- $\beta$ 5	6924 $\pm$ 866	7489 $\pm$ 566	7074 $\pm$ 759

\*Data are given as average CPM  $\pm$  standard deviation of triplicates. \* $P < 0.05$  vs controls.

align columns 1 and 3



**Fig. 4. Influence of TGF- $\beta$  isoforms on type II collagen expression.** (a) Indirect immunofluorescence for type II collagen in the presence of TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 and TGF- $\beta$ 5, viewed under confocal microscopy. Mesenchymal cells were cultured as micromass cultures without TGF- $\beta$  isoforms or with 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1, 1 ng/ml TGF- $\beta$ 2, 10 ng/ml TGF- $\beta$ 3 and 10 ng/ml TGF- $\beta$ 5 to determine the presence of type II collagen. Bar, 100  $\mu$ m. (b) Immunoblot analysis of type II collagen was obtained from control cultures and TGF- $\beta$  treated cultures at day 5 of culture. Protein load was 40  $\mu$ g/lane in the SDS-PAGE. (c) The expression of type II collagen was used as cartilage marker and is given in arbitrary units, as measured by scanning densitometry of western blots.

positive cells (Fig. 6a). Moreover, the activity was lower and similar under all experimental conditions at day 2 of culture (data not shown). A detergent extraction was performed to quantitate alkaline phosphatase activity. TGF- $\beta$ 1 increased alkaline phosphatase activity by 100% above controls, while TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 and TGF- $\beta$ 5 by 35%, 35% and 60% respectively (Fig. 6b).

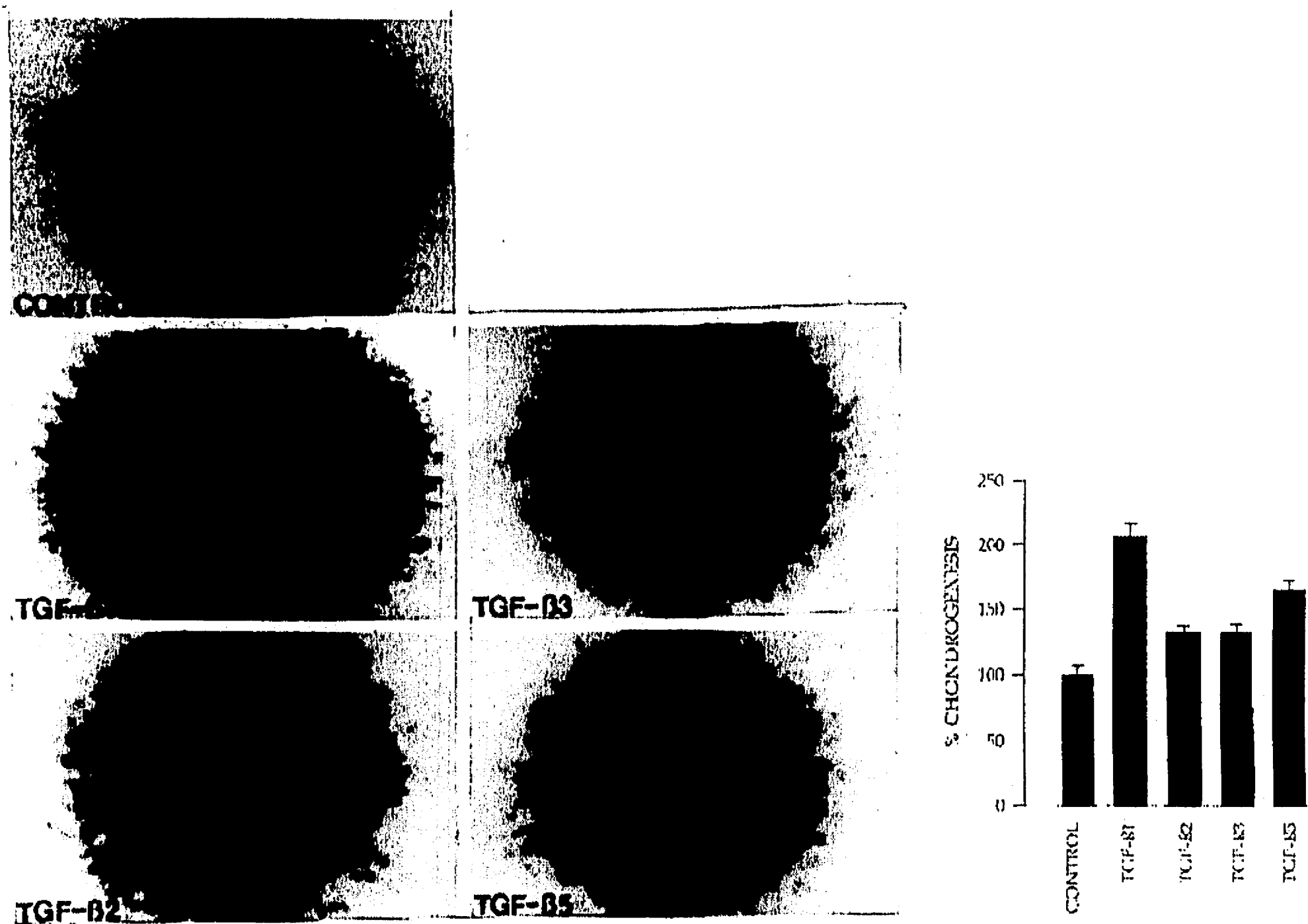
#### **TGF- $\beta$ Isoforms regulate chondrogenesis depending on the stage of cartilage differentiation**

To determine the time when TGF- $\beta$  isoforms affect cell differentiation of limb mesenchymal cells, we exposed stage 20 micromass cultures to growth factors for a 24 h-period at different days of culture. The effects on the accumulation of Alcian blue-positive ECM and synthesis of sulfated proteoglycans were evaluated on the fifth day of culture (Fig. 7). Exposure to TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 5 for 0-24, 24-48 and 48-72 h periods had an enhancing effect on the accumulation of Alcian blue-positive ECM (Fig. 7B-D and Q-S). However, no uniform staining of cartilage matrix was observed, but

nodules were seen and a diffuse mass of staining was present in the internodular regions (Fig. 7B-D and Q-S). When TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 5 were added after 72-96 and 96-120 h a decrease in the stimulation of chondrogenesis was observed (Fig. 7E-F and T-U). Exposure to TGF- $\beta$ 2 during 0-24 and 24-48 h produced a slightly diffuse mass staining of cartilage matrix (Fig. 7G-H). For TGF- $\beta$ 3 the enhancement effect on cartilage matrix was at the pulse of 24-48 h (Fig. 7L-M). When TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 were added at 48-72, 72-96 and 96-120 h there was no effect on the stimulation of cartilage matrix formation (Fig. 7I-K and N-P).

To quantitate chondrogenesis enhancement by growth factors we determined the synthesis of sulfated proteoglycans at day 5 of culture. Cultures without growth factors were considered as controls. Exposure to TGF- $\beta$ 1 for 0-24, 24-48, and 48-72 h promoted 70%, 80% and 70% respectively as compared to cultures exposed along a 5 day period. When cultures of 72-96 h were exposed to TGF- $\beta$ 1, the incorporation of  $^{35}$ S-sulfate on proteoglycans was very similar to controls, while at 96-120 h period the incorporation





**Fig. 6.** Effect of TGF- $\beta$  isoforms on alkaline phosphatase activity. (a) Mesenchymal cells were cultured as micromass cultures without TGF- $\beta$  isoforms or with 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1, 1 ng/ml TGF- $\beta$ 2, 10 ng/ml TGF- $\beta$ 3 and 10 ng/ml TGF- $\beta$ 5 to determine alkaline phosphatase activity. Bar, 0.5 mm. (b) Quantitation of alkaline phosphatase activity was achieved in 3 cultures of 2 separate experiments after extraction with 10% SDS. Data are represented as % chondrogenesis to indicate the proportion of chondrogenesis stimulation; control cultures had an  $OD_{400}$  of  $0.230 \pm 0.015$ ; TGF- $\beta$ 1,  $0.468 \pm 0.032$ ; TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3,  $0.352 \pm 0.029$  and  $0.360 \pm 0.037$ ; TGF- $\beta$ 5,  $0.372 \pm 0.031$ .

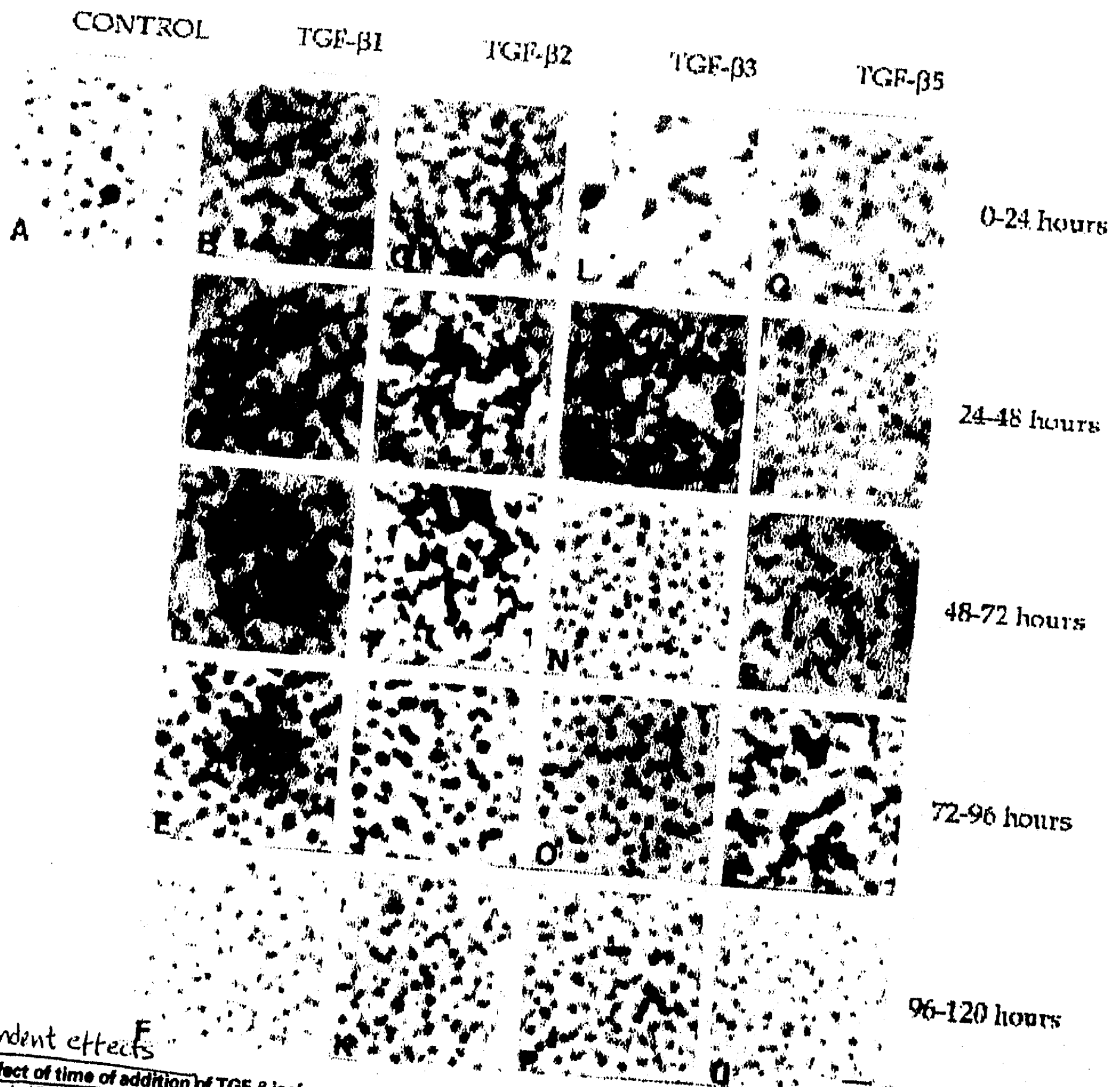
and Ahrens *et al.* (1977)

21 in the absence of growth factors occurs in a similar way to that described by Owens and Solursh (1981). The histogenic potential of mesenchymal cells to originate chondrogenic nodules is lost as developmental stages progress. In contrast, equivalent stages of chick embryo to those of mouse embryo do not show differences in the chondrogenic potential throughout development. (Ahrens *et al.*, 1977)

In this study mouse whole limb cells showed differential responses to TGF- $\beta$  isoforms, according to their developmental stages, suggesting that competence for TGF- $\beta$  isoforms by mesenchymal cells changed during development. There are three types of receptors which bind TGF- $\beta$  with different affinities; TGF- $\beta$  receptors I and II are involved in the binding and signal transduction (Lin *et al.*, 1992; Wrana *et al.*, 1992). Receptor III modulates the binding of TGF- $\beta$  to receptors I and II (López-Casillas *et al.*, 1993, 1994) and the affinity of receptors I and II for TGF- $\beta$ 2 is reduced when receptor III is absent from the cellular membrane (Ohta *et al.*, 1987; Cheifetz *et al.*, 1990; López-Casillas *et al.*, 1993, 1994).

The low response of limb bud mesenchymal cells at stages 20

and 21 to TGF- $\beta$ 2, compared with stage 19, could be explained by the absence of receptor III, as suggested in other systems (Ohta *et al.*, 1987; Cheifetz *et al.*, 1990; López-Casillas *et al.*, 1993, 1994; Chai *et al.*, 1994). A second possibility is that the expression of both TGF- $\beta$  receptors I and II would not occur at same time, since coexpression of both receptors is required for TGF- $\beta$ 2 binding (Rodríguez *et al.*, 1995). Another molecule with ability to bind TGF- $\beta$ 2 is the  $\alpha$ 2-macroglobulin present in serum, which binds to TGF- $\beta$ 2 better than to TGF- $\beta$ 1 or TGF- $\beta$ 3. The experiments performed in this study were performed in the presence of serum, showing that mesenchymal cells at stage 19, even in the presence of serum, are far more sensitive to chondrogenesis enhancement by TGF- $\beta$ 2 than at stages 20 and 21, suggesting that responsiveness to distinct TGF- $\beta$  isoforms is strongly influenced by cell-specific receptors. The levels of enhancement of cartilage matrix by TGF- $\beta$ 3 were very similar in the three stages as compared to controls. However, the chondrogenesis pattern is different since fusion of cartilage nodules observed at stage 19 was not seen at stages 20 and 21. Similar observations have been found in other experimen-



**Fig. 7. Effect of time of addition of TGF- $\beta$  isoforms on chondrogenic pattern formation.** Mesenchymal cells were cultured as micromass cultures with 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 (B-F), 1 ng/ml TGF- $\beta$ 2 (G-K), 10 ng/ml TGF- $\beta$ 3 (L-P) and 10 ng/ml TGF- $\beta$ 5 (Q-U). Growth factors were added to micromass cultures at the following times of culture: 0-24 h (B,G,L and O), 24-48 h (C,H,M and R), 48-72 h (D,I,N and S), 72-96 h (E,J,O and T) and 96-120 h (F,K,P and U). A representative culture without growth factors is shown in A. All cultures were fixed and stained at 120 h. Bar, 0.5 mm.

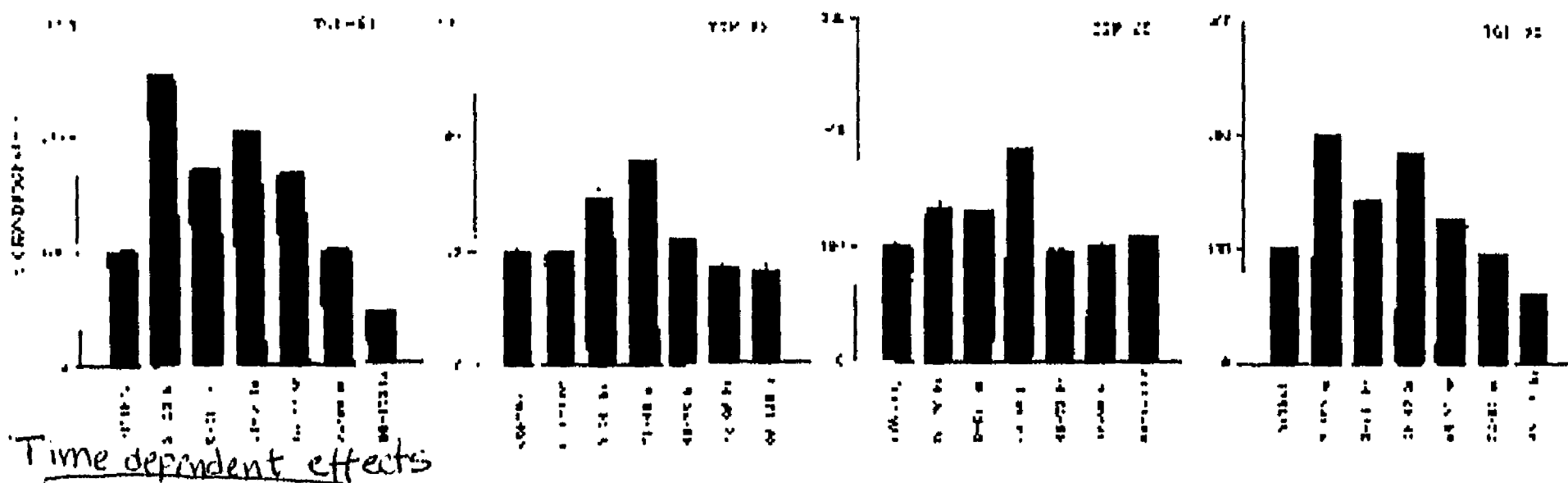
Time dependent effects

tal systems and this depends on different affinities of TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3 to TGF- $\beta$  receptors (Chiffetz *et al.*, 1990; ten Dijke *et al.*, 1990; Graycar *et al.*, 1996). The responsiveness of mouse mesenchymal cells to TGF- $\beta$ 5 is important because it demonstrates that TGF- $\beta$ 5 influences mammalian cells as mammalian TGF- $\beta$  isoforms affect amphibian cells (Rosa *et al.*, 1988), suggesting that TGF- $\beta$  isoforms are functionally conserved through evolution.

In other experimental systems it is clear that cells respond in a distinct way to different amounts of TGF- $\beta$  isoforms; TGF- $\beta$ 1 is a more potent inhibitor than TGF- $\beta$ 2 for endothelial cell growth. This difference may be due to a central region of TGF- $\beta$ 1 not present in TGF- $\beta$ 2 (Qian *et al.*, 1992). Also, receptor II presents an extracel-

lular domain with binding affinity for TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3, but not TGF- $\beta$ 2 (Lin *et al.*, 1995). Consequently, the presence of receptor III is necessary to allow the availability of TGF- $\beta$ 2 to receptor II, since this molecule can be found in a soluble form inhibiting cell signaling or in a membrane-anchorage form that enhances TGF- $\beta$ 2 binding to type II receptor, eliciting a signaling response (López-Casillas *et al.*, 1993). For that reason, further experiments are necessary to determine whether TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3 present different affinities to TGF- $\beta$  receptors and to determine whether receptor III regulates the availability of TGF- $\beta$ 2 to TGF- $\beta$  receptors during mouse limb bud development. Likewise, there are other molecules that can bind TGF- $\beta$ s, like decorin and biglycan

Qian



**Fig. 8** Effect of time of addition of TGF- $\beta$  isoforms on the synthesis of sulfated proteoglycans. Growth factors were added to micromass cultures at the following times of culture: 0-24 h, 24-48 h, 48-72 h, 72-96 h and 96-120 h. All cultures were incubated with  $^{35}\text{S}$ -sulfate during 6 h at day 5 of culture. Data represent the means  $\pm$  standard deviation of 3 cultures for each time point treatment of 2 separate experiments.  $P < 0.01$  (vs controls). Data are represented as % chondrogenesis to compare the proportion of stimulation or inhibition in the TGF- $\beta$  treated cultures in relation to controls for each TGF- $\beta$  isoform. The values for control cultures and TGF- $\beta$  treated cultures during 5 days were very similar to those obtained and represented in Figure 2.

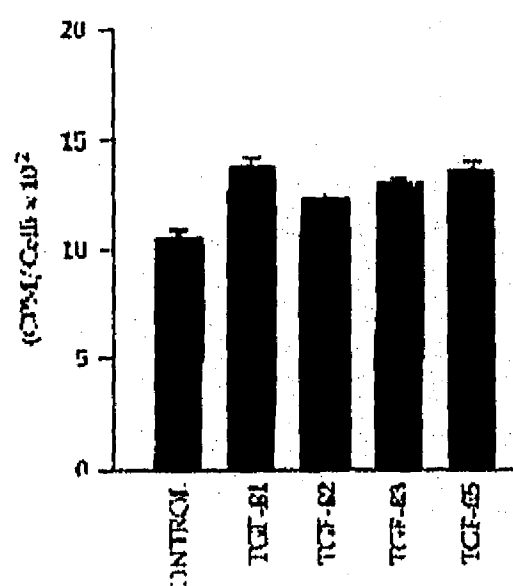
(Yamaguchi *et al.*, 1990; Fosang and Hardingham, 1992; Kresse *et al.*, 1994). We speculate that downregulation of decorin and biglycan levels may enhance the effects of TGF- $\beta$ s, or that upregulation of both molecules may decrease the effects of TGF- $\beta$ s, since they may inhibit TGF- $\beta$ s action. So, the increased expression of these ECM molecules during mouse limb bud development at stages 20 and 21 may therefore cause a reduction in the pool of active TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 in mesenchymal cells, thus producing a distinct pattern formation or a differential response in the stimulation of specific cartilage molecules as compared with TGF- $\beta$ 1 actions.

Here we showed morphogenetic differences between stages 19, 20 and 21 in response to TGF- $\beta$  isoforms. By stage 19 all four TGF- $\beta$  isoforms promote the formation of a continuous sheet of cartilage cells, while in mesenchymal cells from limb stage 20, only TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 5 produce a continuous sheet of cartilage cells, and TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 produce a nodular pattern of cartilage. This suggests that mesenchymal cells from stage 19 and 20 present different signals that stimulate or inhibit chondrogenesis pattern. We demonstrated that TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 promoted the expression of proteoglycans, type II collagen, cartilage link protein and alkaline phosphatase activity at significant levels as compared to controls during chondrogenesis at stage 20. However, they did not promote a continuous sheet of cartilage cells, suggesting that TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 may regulate morphogenesis and cell differentiation through different pathways, depending on the developmental stage.

On the other hand, in developing chick embryos the cartilage pattern in leg mesenchyme is different from that obtained with wing mesenchyme, switching from a continuous sheet of cartilage cells to a nodular pattern at stage 24. This suggests that intrinsic morphogenetic differences are present in leg and wing mesenchymal cells from stage 24 chick embryos (Downie and Newman, 1994). The production of fibronectin in leg mesenchyme is higher than in wing mesenchyme both *in vivo* and *in vitro*. Also, the interaction between cells and fibronectin in wing mesenchymal cells but not in leg mesenchymal cells, is mediated by the amino-terminal domain of fibronectin (Downie and Newman, 1995).

Taking together the results from Downie and Newman (1994, 1995) and ours we suggest that mesenchyme from distinct stages express differentially TGF- $\beta$  receptors, including the ECM molecules decorin and biglycan (Yamaguchi *et al.*, 1990; Fosang and Hardingham, 1992; Kresse *et al.*, 1994). Likewise, it is possible that signal transduction elicited by TGF- $\beta$  isoforms could be different, evoking regulation of the ECM molecules involved in cartilage formation, causing distinct morphogenetic patterns.

On the basis of the differential responsiveness of mesenchymal cells from stage 20 to TGF- $\beta$  isoforms, we evaluated the action of all four TGF- $\beta$  isoforms on the metabolism of proteoglycans, expression of type II collagen and link protein and alkaline phosphatase activity during chondrogenesis. TGF- $\beta$  isoforms elicited a differential regulation of them. This effect was not mediated by cell proliferation, because the quantity of DNA,  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation and cell number in all conditions assayed were similar. However, TGF- $\beta$ 3 at days 1 and 3 decreased  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation and TGF- $\beta$ 2 increased  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation at day 3. Hence, the TGF- $\beta$  isoforms regulate specific-cartilage matrix molecules as suggested by Kulyk *et al.* (1989), Carrington and Reddi (1990), Leonard *et al.* (1991), Schönfeld *et al.* (1991) and Roark and Greer (1994). Nevertheless, in micromass cultures from chick embryo mesenchymal cells, the three mammalian TGF- $\beta$



**Fig. 9.** Influence of TGF- $\beta$  isoforms on the synthesis of proteoglycans by low density cultures from stage 20 mouse limb mesenchymal cells. Growth factors were added to low density cultures for 5 days. All cultures were incubated with  $^{35}\text{S}$ -sulfate during 6 h at day 5 of culture. Data represent the means  $\pm$  standard deviation of 3 cultures of 2 separate experiments.  $P < 0.01$  (vs. controls).

isoforms enhance chondrogenesis at similar levels for all parameters examined. In the current study, we found that in mouse mesenchymal cells cultured in similar conditions to chick cells, TGF- $\beta$  isoforms regulate the expression of specific-cartilage matrix components in a distinct manner for each factor, showing that TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 5 are more potent than TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3. Therefore, mouse limb cells provide a suitable experimental system to evaluate the effects of different TGF- $\beta$  isoforms on mouse chondrogenesis.

The activity of TGF- $\beta$  on ECM production in different systems is well known since it increases the synthesis of ECM components and diminishes matrix degradation. Furthermore, it stimulates the expression of specific receptors for ECM components (Massagué, 1990). However, the mechanisms by which TGF- $\beta$  isoforms regulate chondrogenesis of mouse limb bud mesenchymal cells is unknown. The fact that all four TGF- $\beta$  isoforms promoted chondrogenesis when added during the first two days of culture, suggests that TGF- $\beta$  isoforms action occurs at early stages during the process of chondrogenesis, as suggested by Kulyk *et al.* (1989), Carrington and Reddi (1990), Leonard *et al.* (1991) and Roark and Greer (1994). However, TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 5 inhibit chondrogenesis when administered on day 5 of culture, suggesting that TGF- $\beta$  isoforms may be acting in a sequential way to control the process of cartilage differentiation.

This study showed that TGF- $\beta$  isoforms are better promoters of the chondrogenic differentiation in micromass cultures than in low density cultures. Kulyk *et al.* (1989) demonstrated that TGF- $\beta$  increased by two to three times  $^{35}\text{S}$ -sulfate incorporation in low density cultures, while in our study we obtained only 25% increase in  $^{35}\text{S}$ -sulfate incorporation. This could be explained perhaps by species differences between chick and mouse embryos or because we used whole limb bud mesenchymal cell whereas Kulyk *et al.* (1989) used distal subridge mesenchymal cells.

We conclude that the action of each member of the TGF- $\beta$  family may be somewhat different, as occurs with the BMP family. The fact that mouse limb bud mesenchymal cells differentially respond to TGF- $\beta$  isoforms indicates that these factors play a critical role in chondrocyte differentiation during limb morphogenesis. TGF- $\beta$  isoforms may have a direct effect on chondrogenic cells; however, an indirect effect mediated by other cell types cannot be excluded. Finally, based on the reported homologues between TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 5 (Kondaiah *et al.*, 1990; Burt and Paton, 1992), and on the biological activities observed in the current study, we support the suggestion that *Xenopus* TGF- $\beta$ 5 is equivalent to mammalian TGF- $\beta$ 1.

## Materials and Methods

### Cell cultures

Balb/c mice were mated overnight and females with a vaginal plug the following morning were considered to be at day 0 of gestation. Pregnant mice were killed by cervical dislocation and the uteri were dissected out and placed in Petri dishes. The embryos were removed and staged according to Theller (1972). Mesenchymal cells were obtained by dissociating forelimb buds of stages 19, 20 and 21 according to Ahrens *et al.* (1977). Cell suspension was adjusted to a concentration of  $2 \times 10^7$  cells/ml for micromass cultures, and a concentration of  $2.5 \times 10^6$  cell/ml of DMEM (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone Laboratories Inc.) for low density cultures. A drop of 10  $\mu\text{l}$  was plated in the center of each of the 24 central wells of a 48 well-plate (Costar) and these were left for cellular attachment during 1 h in a 37°C humidified incubator, and then flooded with

1.0 ml culture medium with 10% FBS for micromasses and 2% for low density cultures, and cultured at 37°C and 5%  $\text{CO}_2/95\%$  air during 5 days. Human TGF- $\beta$ 1, porcine TGF- $\beta$ 2, recombinant human TGF- $\beta$ 3 and recombinant amphibian TGF- $\beta$ 5 (R&D Systems) were added to the medium at concentrations of 1, 5 and 10 ng/ml.

### Alcian blue staining

To obtain a quantitative measurement of differentiated cartilage matrix, 5-day cultures were stained overnight with 1% Alcian blue in 3% acetic acid, pH 1.0. Cultures were rinsed in 3% acetic acid and distilled water. Bound stain was extracted overnight with 0.3 ml 4.0 M guanidine hydrochloride in agitation and quantitated using an ELISA reader at a wavelength of 600 nm.

### Biosynthesis of glycosaminoglycans

Synthesis of proteoglycans and glycosaminoglycans (GAGS) by differentiating limb bud mesenchymal cells was evaluated by  $^{35}\text{S}$ -sulfate and  $^3\text{H}$ -glucosamine incorporation, respectively. Cells were double labeled with 5  $\mu\text{Ci/ml}$   $^{35}\text{S}$ -sulfate and 10  $\mu\text{Ci/ml}$   $^3\text{H}$ -glucosamine (carrier free; Amersham, UK) at days 1, 3 and 5 of culture for 6 h in serum free medium and in the presence of growth factors. Cultures were then washed 6 times with PBS. Cells were resuspended in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, with 3% ethanol. Pronase (1 mg/ml; Sigma) was added and incubated at 50°C for 48 h. The pronase-digested material was centrifuged for 20 min at 13000xg. The supernatant was adjusted to a final 3N NaOH and incubated overnight at room temperature. Thereafter, 5% TCA final concentration was added and overnight incubation performed at 4°C. The mixture was centrifuged for 20 min at 13000xg and the supernatant was dialyzed against distilled water. Glycosaminoglycans were precipitated with 3 volumes 96% ethanol/1.3% potassium acetate and by overnight incubation at -20°C and centrifuged at 10000xg. Precipitate was vacuum dried and resuspended in 200  $\mu\text{l}$  distilled water (Oohira *et al.*, 1977). Aliquots were taken and  $^{35}\text{S}$ -sulfate and  $^3\text{H}$ -glucosamine incorporated into GAGs were counted in a liquid scintillation counter.

### $^3\text{H}$ -thymidine incorporation

Cultures were rinsed with medium without serum and  $^3\text{H}$ -thymidine (Amersham, UK) was added at 10  $\mu\text{Ci/ml}$  and incubated at 37°C for 2 h at days 1, 3 and 5 of culture. Cultures were washed 6 times with PBS, and incorporated radioactivity was measured by the method of Stein and Stein (1989).

### DNA quantitation

The method of Labarca and Paigen (1980) was used to determine the amount of DNA in micromass cultures. The assay was performed using duplicate 50  $\mu\text{l}$  aliquots of each sample in a total volume of 4 ml of reaction mixture. The resulting fluorescence was measured and the quantity of DNA was determined by comparison to a standard curve.

### Immunofluorescence staining

To evaluate the presence of type II collagen and cartilage link protein, immunostaining was performed as described in Jiang *et al.* (1993). Micromass cultures were fixed in 2.5% paraformaldehyde in PBS for 30 min. Micromass cultures were incubated overnight with anti-type II collagen (Chemicon) and anti-cartilage link protein (Gift of Dr. Koji Kimata). Micromass cultures were visualized under a Bio-Rad Model MRC 600 confocal microscope using the krypton-argon laser and COMOS program for image analysis. Controls were incubated without primary antibodies.

### Western-blot analysis

To obtain collagen, proteins were precipitated with 35%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , redissolved in 0.5 M acetic acid and digested with pepsin (1 mg/ml; Sigma) for 24 h at 4°C. Pepsin insoluble material was centrifuged at 500xg for 1 h. Then, the supernatant was lyophilized and dissolved in electrophoresis sample buffer. For cartilage link protein, micromass cultures were washed with PBS and treated with a lysis buffer consisting of 150 mM NaCl, 50 mM

Tris-HCl, pH 7.5, 1% Triton X-100, 1% deoxycholate, 1% SDS, and 2 mM EDTA containing a cocktail of phosphatase inhibitors (2 mM PMSF, 0.2 TIU/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 50  $\mu$ g/ml soybean trypsin inhibitor and 30 mM sodium phosphate) according to Lightner *et al.* (1994). After treatment the extract was also mixed with electrophoresis sample buffer. Samples of type II collagen and cartilage link protein were loaded onto 7.5% and 10% SDS-polyacrylamide gels respectively and electrophoresed for 1 h (Laemmli, 1970). Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (BIORAD) by overnight electroblotting (Burnette, 1981). Blots were developed for chemiluminescence (Amersham) according to the manufacturers' protocol.

#### Alkaline phosphatase activity

To determine alkaline phosphatase activity by histochemical analysis, micromass cultures were fixed for 10 min with 3.7% formaldehyde at room temperature. Cells were washed with PBS several times and incubated for 20 min with a mixture of 0.1 mg/ml naphthol AS-MX phosphate (Sigma), 0.5% *N,N*-dimethylformamide, 2 mM  $MgCl_2$ , and 0.6 mg/ml of fast blue BB salt (Sigma) in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5, at room temperature. To quantitate alkaline phosphatase activity, samples were extracted with 10% SDS dissolved in PBS by overnight incubation and read on a spectrophotometer at 400 nm.

#### Statistical analysis

Data are presented as the mean  $\pm$  standard deviation. Comparisons of experimental groups with controls were carried out by one-way analysis of variance, and statistical differences between groups were assessed by Student's *t* test (SigmaStat Statistical Analysis System, Jandel Corporation). Significant differences were accepted at the  $P < 0.05$  level.

#### Acknowledgments

The authors thank Dr. Horacio Merchant-Larios, Dr. Alejandro Zentella and Dr. Fernando López-Casillas for their critical reading of the manuscript, Dr. Raul Mena and José Luna for their help with confocal microscopy and Dr. Koji Kimata for anti-cartilage link protein gift. Also, we thank Teresa Bravo Ruiz and Iviz, Georgina Diaz Herrera for their technical assistance, Isabel Pérez Montfort for English assistance and José Avilés for art work. This study was supported by PAPIID grant IN205293 and PADEP grant 030318 from Universidad Nacional Autónoma de México.

#### References

- AHRENS, P.B., SOLURSH, M. and REITER, R.S. (1977). Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture. *Dev. Biol.* 60: 69-82.
- BURNETTE, W.N. (1981). Western Blotting. Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radiolabeled protein A. *Anal. Biochem.* 112: 195-203.
- BURT, D.W. and PATON, I.R. (1992). Evolutionary origins of the transforming growth factor- $\beta$  gene family. *DNA Cell Biol.* 11: 497-510.
- CANCEDDA R., DESCALZI CANCEDDA F. and CASTAGNOLA P. (1995). Chondrocyte differentiation. *Int. Rev. Cytol.* 159: 265-358.
- CARRINGTON, J.L. and REDDI, A.H. (1990). Temporal changes in the response of chick limb bud mesodermal cells to transforming growth factor  $\beta$ -type 1. *Exp. Cell Res.* 186: 368-373.
- CARRINGTON, J.L. and REDDI, A.H. (1991). *Parallels* between development of embryonic and matrix-induced endochondral bone. *BioEssays* 13: 403-408.
- CARRINGTON, J.L., CHEN, P., YANAGISHITA, M. and REDDI, A.H. (1991). Osteogenin (bone morphogenetic protein-3) stimulates cartilage formation by chick limb bud cells *in vitro*. *Dev. Biol.* 146: 406-415.
- CHAI, Y., MAH, A., CROHIN, C., GROFF, S., BRINGAS, P., LE, T., SANTOS, V. and SLAVKIN, H.C. (1994). Specific transforming growth factor- $\beta$  subtypes regulate embryonic mouse Meckel's cartilage and tooth development. *Dev. Biol.* 162: 85-103.
- CHEIFETZ, S., HERNANDEZ, H., LAIHO, M., TEN DIJKE, P., IWATA, K.K. and MASSAGUÉ, J. (1990). Distinct transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) receptor

subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF- $\beta$  isoforms. *J. Biol. Chem.* 265: 20533-20538.

- CHEN, P., CARRINGTON, J.L., HAMMONDS, R.G. and REDDI, A.H. (1991). Stimulation of chondrogenesis in limb bud mesoderm cells by recombinant human bone morphogenetic protein 2B (BMP-2B) and modulation by transforming growth factor  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2. *Exp. Cell Res.* 185: 509-515.
- CHEN, P., YU, Y.M. and REDDI, A.H. (1993). Chondrogenesis in chick limb bud mesodermal cells: Reciprocal modulation by activin and inhibin. *Exp. Cell Res.* 206: 119-127.
- DEL RIO-TSONIS, K. and TSONIS, P.A. (1994). Expression of transforming growth factor- $\beta$  1-4 in the chick limb bud mesenchymal cells: Regulation by 1,25-Dihydroxyvitamin  $D_3$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204: 975-982.
- DOWNIE, S.A. and NEWMAN, S.A. (1994). Morphogenetic differences between fore and hind limb precartilaginous mesenchyme: relation to mechanisms of skeletal pattern formation. *Dev. Biol.* 162: 195-208.
- DOWNIE S.A. and NEWMAN, S.A. (1994). Different roles for fibronectin in the generation of fore and hind limb precartilaginous condensations. *Dev. Biol.* 172: 519-530.
- ELIMA, K. (1993). Osteoinductive proteins. *Ann. Med.* 25: 395-402.
- FOSANG, A.J. and HARDINGHAM, T.E. (1992). Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.* 6: 861-870.
- GRAYCAR, J., MILLER, D.A., ARRICK, B.A., LYONS, R.M., MOSES, H.L. and DERYNCK, R. (1989). Human transforming growth factor- $\beta$ 3: Recombinant expression, purification and biological activities in comparison with transforming growth factors- $\beta$ 1 and - $\beta$ 2. *Mol. Endocrinol.* 3: 1977-1986.
- JIANG, H., SOPRANO, D.R. LI, S-W., SOPRANO, K.J., PENNER, J.D. GYDA III, M. and KOCHHAR, D. (1995). Modulation of limb bud chondrogenesis by retinoic acid and retinoic acid receptors. *Int. J. Dev. Biol.* 39: 617-627.
- JIANG, T-X., YI, J-R., YING, S-Y. and CHUONG, C-M. (1993). Activin enhances chondrogenesis of limb bud cells: stimulation of precartilaginous mesenchymal condensations and expression of N-CAM. *Dev. Biol.* 155: 545-557.
- KONDAIAH, P., SANDS, M.J., SMITH, J.M., FIELDS, A., ROBERTS, A.B., SPORN, M.B. and MELTON D.A. (1990). Identification of a novel transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ 5) mRNA in *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 265: 1089-1093.
- KRESSE, H., HAUSSEER, H., SCHONHERR, H. and BITTNER, K. (1994). Biosynthesis and incorporation of small chondroitin/dermatan sulphate proteoglycans. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 32: 259-264.
- KULYK, W.M., RODGERS, B.J., GREER, K. and KOSHER, R.A. (1989). Promotion of embryonic chick limb cartilage differentiation by transforming growth factor- $\beta$ . *Dev. Biol.* 135: 424-430.
- LABARCA, C., and PAIGEN, K. (1980). A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.* 102: 344-352.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- LANGILLE, R.M., PAULSEN, D. and SOLURSH, M. (1989). Differential effects of physiological concentrations of retinoic acid *in vitro* on chondrogenesis and myogenesis in chick craniofacial mesenchyme. *Differentiation* 40: 84-92.
- LEONARD, C.M., FULD, H.M., FRENZ, D.A., DOWNIE, S.A., MASSAGUÉ J. and NEWMAN S.A. (1991). Role of transforming growth factor- $\beta$  in chondrogenic pattern formation in the embryonic limb: stimulation of mesenchymal condensation and fibronectin gene expression by exogenous TGF- $\beta$  and evidence for endogenous TGF- $\beta$ -like activity. *Dev. Biol.* 145: 99-109.
- LIGHTNER V.A., MARKS, J.R. and MCCACHREN, S. (1994). Epithelial cells are an important source of tenascin in normal and malignant human breast tissue. *Exp. Cell Res.* 210: 177-184.
- LIN, H.F., WANG, X.F., NG, E.E., WEINBERG, R.A. and LODISH, H.F. (1992). Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell.* 68: 775-785.
- LIN, H.Y., MOUSTAKAS, A., KNAUS, P., WELLS, R.G., HENIS, Y.I. and LODISH, H.F. (1995). The soluble extracellular domain of the type II transforming growth factor (TGF)- $\beta$  receptor. *J. Biol. Chem.* 270: 2747-2754.
- LÓPEZ-CASILLAS, F., PAYNE, H.M., ANDRES, J.L. and MASSAGUÉ, J. (1993). Betaglycan can act as a dual modulator of TGF- $\beta$  access to signalling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J. Cell Biol.* 124: 557-568.
- LÓPEZ-CASILLAS, F., WRANA, J.L. and MASSAGUÉ, J. (1993). Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* 73: 1435-1444



- MASSAGUÉ, J. (1990). The transforming growth factor- $\beta$  family. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6: 597-641.
- OHTA, M., GREENBERGER, J.S., ANKLESARIA P., BASSOLS, A. and MASSAGUÉ, J. (1987). Two forms of transforming growth factor- $\beta$  distinguished by multipotential haematopoietic progenitor cells. *Nature* 329: 539-541.
- OOHIRA, K., TAMAKI, Y., CHIBA, A. and NOGAMI, H. (1977). Glycosaminoglycans in congenital pseudoarthrosis. *Calcif. Tissue Res.* 23: 271-275.
- OWENS, E.M. and SOLURSH, M. (1981). *In vitro* histogenic capacities of limb mesenchyme from various stage mouse embryos. *Dev. Biol.* 89: 297-311.
- PAULSEN, D.F., LANGUILLE R.M., DRESS, V. and SOLURSH, M. (1988). Selective stimulation of *in vitro* limb-bud chondrogenesis by retinoic acid. *Differentiation* 39: 123-130.
- QIAN, S.W., BURMESTER, J.K., MERWIN, J.R., MADRI, J.A. SPORN, M.B. and ROBERTS, A.B. (1992). Identification of a structural domain that distinguishes the actions of type 1 and 2 isoforms of transforming growth factor  $\beta$  on endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6290-6294.
- REDDI, A.H. (1992). Regulation of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4: 850-855.
- REDDI, A.H. (1994). Bone and cartilage differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4: 737-744.
- ROARK, E.F. and GREER, K. (1994) Transforming growth factor  $\beta$  and bone morphogenetic protein-2 act by distinct mechanisms to promote chick limb cartilage differentiation *in vitro*. *Dev. Dynamics* 200: 130-118.
- RODRIGUEZ, C., CHEN, F. WEINBERG, R.A. and LODISH, H.F. (1995). Cooperative binding of transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 2 to types I and II TGF- $\beta$  receptors. *J. Biol. Chem.* 27: 15919-15922.
- ROSA, F., ROBERTS, A.B., DANIELPOUR, D., DART, L.L., SPORN, M.B. and DAWID, I.B. (1988) Mesoderm induction in amphibians: the role of TGF- $\beta$ 2-like factors. *Science* 239: 782-785.
- SCHOFIELD, J.N. and WOLPERT, L. (1990). Effect of TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 and bFGF on chick cartilage and muscle cell differentiation. *Exp. Cell Res.* 191: 144-148.
- SCHÖNFELD, H.J., PÖSCHL, B., WESSNER, B. and KISTLER, A. (1991). Altered differentiation of limb bud cells by transforming growth factors- $\beta$  isolated from bone matrix and from platelets. *Bone Miner.* 13: 171-189.
- SOLURSH, M. (1989). Differentiation of cartilage and bone. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1: 989-994.
- STEIN, G.S. and STEIN, J.L. (1984). Cell synchronization. In *Cell Growth and Division. A Practical Approach* (Ed. R. Baserga) Oxford University Press, Oxford, pp. 133-137.
- TENDIJE, P., IWATA, K.K., GODDARD, C., PIELER, C., CANALIS, E., MCCARTHY, T.L. and CENTRELLA, M. (1990). Recombinant transforming growth factor type  $\beta$ 3: Biological activities and receptor-binding properties in isolated bone cells. *Mol. Cell. Biol.* 10: 4473-4479.
- THEILER, K. (1972). *The House Mouse. Development and Normal Stages from Fertilization to 4 week of Age.* Springer-Verlag, New York.
- TSONIS, P.A. (1991). 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> stimulates chondrogenesis of the chick limb bud mesenchymal cells. *Exp. Cell Res.* 143: 130-134.
- TSONIS, P.A., DEL RIO-TSONIS K., MILLAN J.L., and WHEELLOCK M.J. (1994). Expression of N-Cadherin and alkaline phosphatase in chick limb bud mesenchymal cells: regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> or TGF- $\beta$ 1. *Exp. Cell Res.* 213: 433-437.
- WOZNEY, J.M., ROSEN, V., CELESTE, A.J., MITSOCK, L.M., WITTERS, M.J., KRIZ, R.W., HEWICK, R.M. and WANG, E.A. (1988). Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science* 242: 1528-1534.
- WRANA, J.L., ATTISANO, L., CÁRCAMO, J., ZENTELLA, A., DOODY, J., LAIHO, M., WANG, X-F. and MASSAGUÉ, J. (1992). TGF- $\beta$  signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71: 1003-1014.
- YAMAGUCHI, Y., MANN, D.M. and RUOSLAHTI, E. (1990). Negative regulation of transforming growth factor- $\beta$  by the proteoglycan decorin. *Nature* 346: 281-284.

Received: September 1996

Accepted for publication: October 1996

Regulación de la N-  
cadherina, N-CAM, tenas-  
cina y fibronectina por los  
TGF- $\beta$

### Regulación de la N-cadherina, N-CAM, tenascina y fibronectina por los TGF- $\beta$

En el día dos de cultivo se forman las condensaciones celulares que dan lugar a los nódulos de cartilago. En las mismas condiciones experimentales los controles presentan un patrón nodular, mientras que los cultivos tratados con TGF- $\beta$  presentan condensaciones celulares anchas y planas, que forman una capa continua de cartilago al día 5 de cultivo.

Al evaluar la expresión de la N-cadherina, la N-CAM y la tenascina en los cultivos controles se observó su presencia alrededor de las células en

las condensaciones celulares. En contraste la fibronectina se distribuye en toda la micromasa en forma de red, observándose en mayor proporción en las zonas de condensaciones celulares. En los cultivos tratados con las isoformas del TGF- $\beta$  se observó que las cuatro moléculas se expresan en mayor proporción que en los controles y su distribución también se observó en las condensaciones celulares (datos no mostrados).

El análisis por inmunotransferencia y densitometría se observa en las figuras 7 y 8.

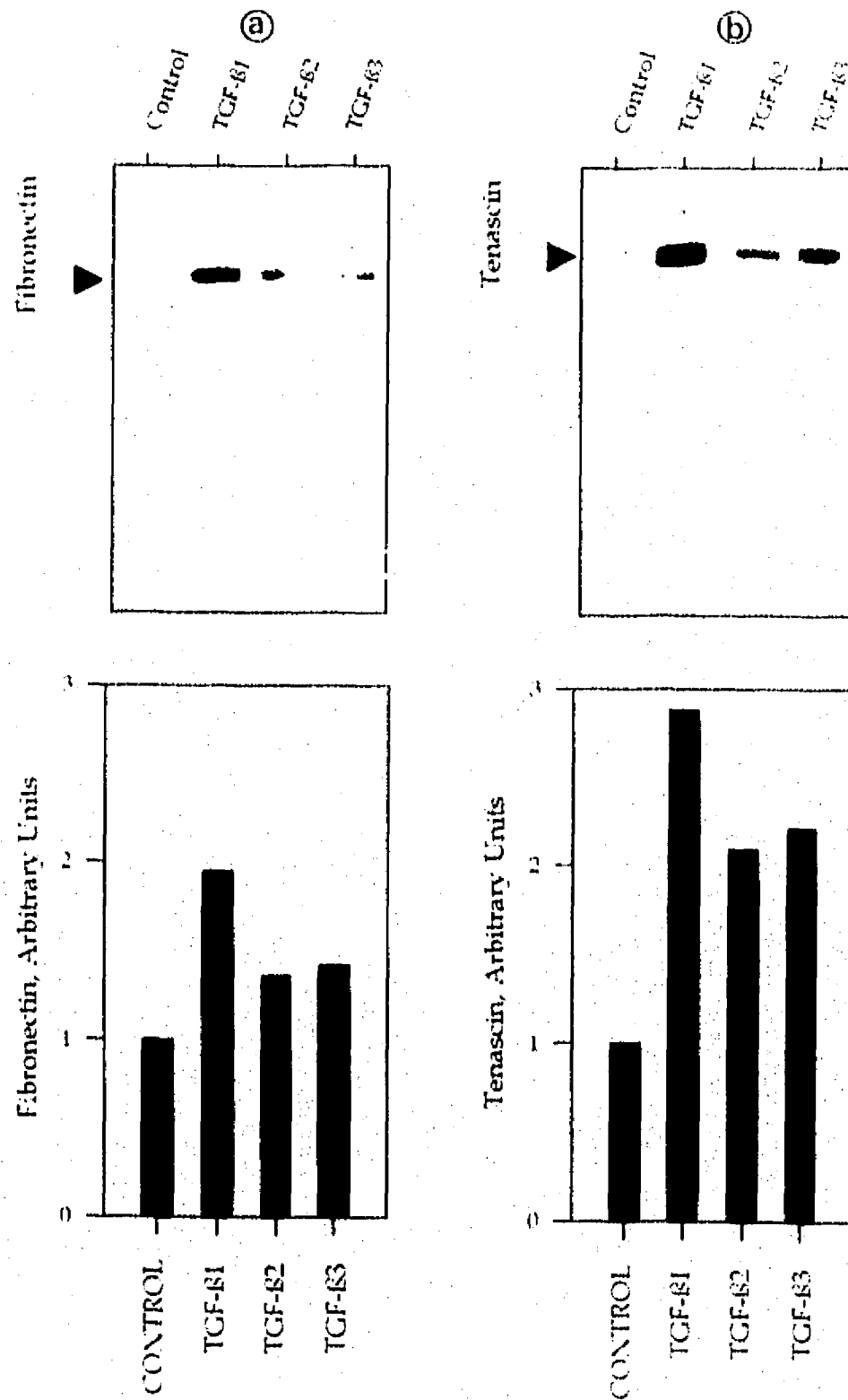


Figura 7. Análisis por inmunotransferencia de la fibronectina (a) y tenascina (b) en cultivos controles y tratados con TGF- $\beta$  a los 2 días de cultivo. Se cargaron 40  $\mu$ g/carril en geles de poliacrilamida. La expresión de la fibronectina y la tenascina se evaluó por análisis de densitometría de las inmunotransferencias.

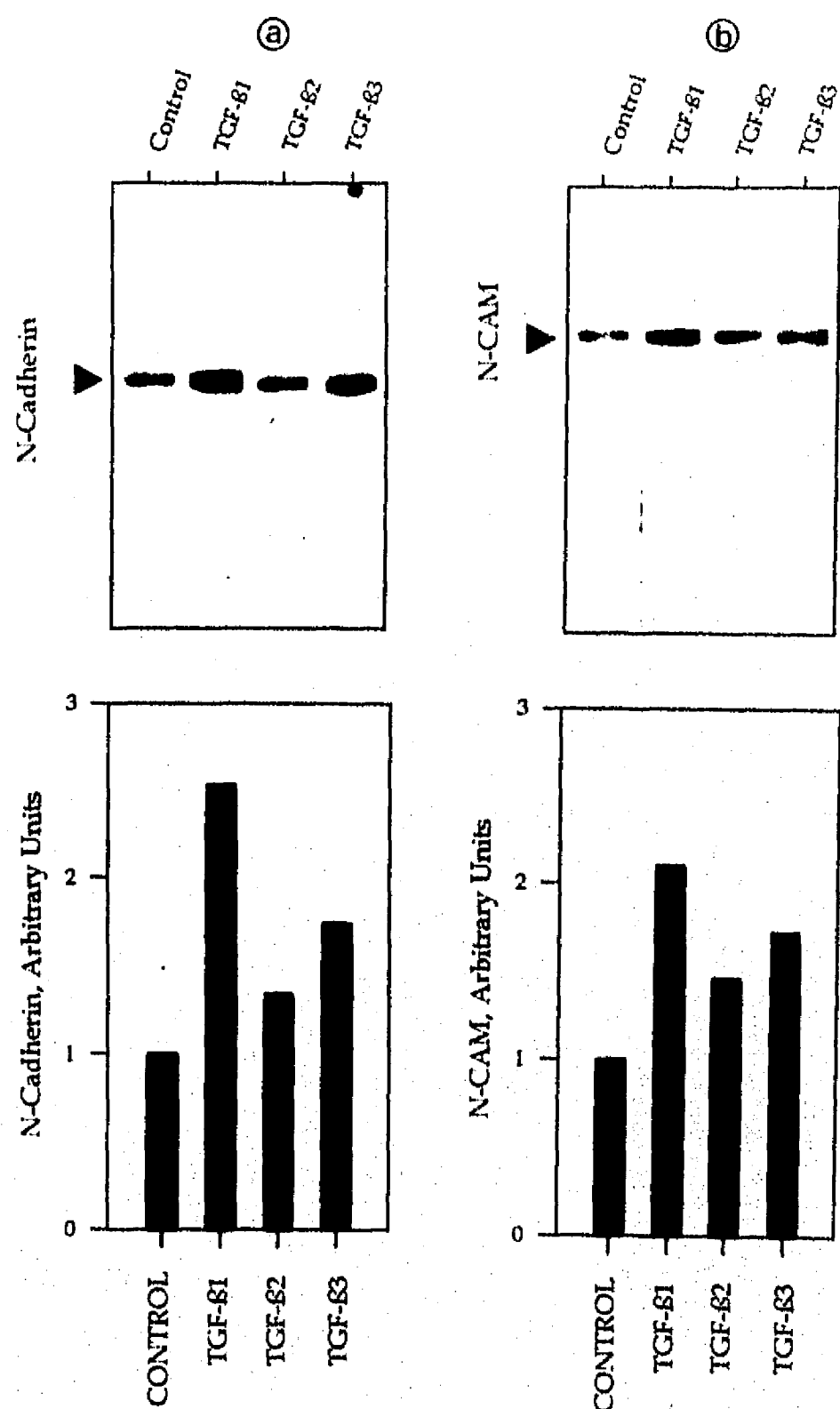


Figura 8. Análisis por inmunotransferencia de la N-cadherina (a) y N-CAM (b) en cultivos controles y tratados con TGF- $\beta$  a los 2 días de cultivo. Se cargaron 40  $\mu$ g/carril en geles de poliacrilamida. La expresión de la N-cadherina y la N-CAM se evaluó por análisis de densitometría de las inmunotransferencias.

# DISCUSIÓN

## DISCUSIÓN

En el presente estudio se observa que la diferenciación celular del cartílago en el ratón, en condiciones de micromasa y en ausencia de factores de crecimiento, es muy semejante a la descrita previamente en pollo y en ratón.<sup>132,134</sup> En estas condiciones de cultivo, las células desarrollan numerosos nódulos de cartílago, a partir de las células condrogénicas con capacidad para agregarse entre ellas, y para segregarse de las células no condrogénicas.<sup>165</sup> Los nódulos de cartílago inician la expresión de genes específicos de cartílago y elaboran una MEC positiva al azul de Alciano y compuesta por la colágena tipo II, la proteína de unión y el agregano. Esta secuencia de procesos celulares que se llevan a cabo dentro de la micromasa asemejan la secuencia observada *in vivo*.<sup>133</sup>

### *Efectos diferenciales de las isoformas de los TGF- $\beta$ en el patrón morfo genético del cartílago*

Antes de discutir los efectos de las isoformas del TGF- $\beta$  en la diferenciación del cartílago en el ratón, es necesario indicar que la funcionalidad de los factores de crecimiento se evaluó en el sistema de pollo en los estadios 23/24 del desarrollo. Los resultados se muestran en la tabla 2 y sugieren que los cuatro factores eran funcionales al iniciar este estudio y que los efectos de los TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 observados en el sistema de ratón en los estadios 20 y 21 no fueron debidos a que los factores hubiesen perdido su actividad biológica.

Por otro lado, en los experimentos de dosis-respuesta en los estadios 19, 20 y 21 del embrión del ratón, se observó que en el estadio 20 el TGF- $\beta$ 2 tuvo su mejor efecto a la concentración de 1 ng/ml, mientras que con los otros tres factores de crecimiento su efecto se observaron a la concentración de 10 ng/ml. De manera que los experimentos posteriores con el TGF- $\beta$ 2 se realizaron a la concentración de 1 ng/ml. Sin embargo, en las tablas 3 y 4 se muestran la biosíntesis de proteoglicanos y la actividad de la fosfatasa alcalina, respectivamente en respuesta al TGF- $\beta$ 2 a las concentraciones de 1, 5 y 10 ng/ml, para descartar que la baja respuesta de las células al TGF- $\beta$ 2 no se debiera a que el sistema experimental no tuviera la dosis óptima y por lo tanto que los resultados pudieran ser considerados como una respuesta subóptima.

Los resultados obtenidos en el presente estudio apoyan la idea de que el mesénquima de extremidades anteriores interpreta de manera diferencial la señal dada por las isoformas del TGF- $\beta$ .

Lo que sugiere, que existen diferentes componentes y tal vez distintos mecanismos de acción que regulan la respuesta del mesénquima a los TGF- $\beta$  durante el desarrollo de las extremidades. Bajo las condiciones experimentales desarrolladas, el mesénquima del estadio 19 respondió a las cuatro isoformas del TGF- $\beta$  de igual manera. Sin embargo, en el estadio 20, se presentaron respuestas diferenciales del mesénquima a las isoformas del TGF- $\beta$ ; donde los TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 5 fueron los que promovieron la *condrogénesis* en mayor proporción que los TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3. Esta respuesta a los TGF- $\beta$  se mantuvo en el estadio 21, pero en menor proporción. Los resultados mostraron la acción de los TGF- $\beta$  a dos niveles distintos; el primero y el más evidente, es el que se observó en el patrón morfo genético del cartílago, y el segundo en la acumulación de la MEC positiva al azul de Alciano.

En el estadio 19 las cuatro isoformas del TGF- $\beta$  promovieron la formación de una capa continua de condrocitos, mientras que en el mesénquima de los estadios 20 y 21, sólo los TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 5 promovieron la formación de una capa continua de condrocitos y los TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 produjeron un patrón nodular de cartílago. Este cambio morfo genético de un patrón de capa continua a un patrón nodular se observó también en cultivos de mesénquima de extremidades de embrión de pollo, pero en ausencia de factores de crecimiento. El mesénquima de la pata y el ala en los estadios 21 y 23 presenta un patrón de capa continua de condrocitos. Para el estadio 24 de desarrollo, la pata cambia su patrón de capa continua a nodular, mientras el mesénquima del ala mantiene el patrón de capa continua de condrocitos.<sup>148</sup> Esto sugiere que el ala y la pata presentan diferencias morfo genéticas intrínsecas. En este sentido, la producción de fibronectina en el mesénquima de la pata es mayor que en el mesénquima del ala, tanto *in vivo* como *in vitro*. Además, el mecanismo de interacción entre las células y la fibronectina es distinto en ambas extremidades, ya que en el ala esa interacción es mediada por el dominio amino terminal de la fibronectina, pero no en las células de la pata.<sup>149</sup>

En nuestro estudio, para determinar si la respuesta diferencial del mesénquima a los TGF- $\beta$  en los estadios 19, 20 y 21 del desarrollo del ratón era debido a una mayor expresión de la fibronectina, evaluamos los niveles de expresión de la fibronectina y su patrón morfo genético de distribución, al momento en que ocurren las condensaciones celulares. Los TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 5 provocaron una distri-

TABLA 2. EVALUACIÓN DE LOS TGF- $\beta$  SOBRE MESÉNQUIMA DE EXTREMIDAD EMBRIONARIA DE POLLO EN ESTADIOS 23/24

	TGF- $\beta$ 1	TGF- $\beta$ 2	TGF- $\beta$ 3	TGF- $\beta$ 5
1*	180%*	180%	170%	175%
5	220%	195%	180%	200%
10	250%	230%	220%	240%

\* Concentración dada en  $\mu\text{g/ml}$ .

\* Porcentaje de estimulación de incorporación de azul de Alciano sobre los controles.

TABLA 3. BIOSÍNTESIS DE PROTEOGLICANOS A DIFERENTES DOSIS DE TGF- $\beta$ 2 EN CULTIVOS DE MICROMASA DE MESÉNQUIMA DE EXTREMIDADES EMBRIONARIAS DE RATÓN

DIAS DE CULTIVO	CONTROL	TGF- $\beta$ 2 (1ng/ml)	TGF- $\beta$ 2 (5ng/ml)	TGF- $\beta$ 2 (10ng/ml)
1	2.13 $\pm$ 0.32*	2.20 $\pm$ 0.36	2.30 $\pm$ 0.27	2.17 $\pm$ 0.32
3	3.50 $\pm$ 0.30	3.77 $\pm$ 0.21	3.53 $\pm$ 0.16	3.33 $\pm$ 0.28
5	13.00 $\pm$ 1.00	13.00 $\pm$ 2.00	12.30 $\pm$ 2.10	13.33 $\pm$ 1.53

\* Los datos están dados en CPM  $\times 10^{-2}$ /Célula de sulfato de sodio  $S^{35}$  incorporado en proteoglicanos

TABLA 4. ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ALCALINA A DIFERENTES DOSIS DE TGF- $\beta$ 2 EN CULTIVOS DE MICROMASA DE MESÉNQUIMA DE EXTREMIDADES EMBRIONARIAS DE RATÓN

DIAS DE CULTIVO	CONTROL	TGF- $\beta$ 2 (1ng/ml)	TGF- $\beta$ 2 (5ng/ml)	TGF- $\beta$ 2 (10ng/ml)
5	0.230 $\pm$ 0.015	0.352 $\pm$ 0.029	0.298 $\pm$ 0.018	0.290 $\pm$ 0.16

\* Los datos representan la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina en cultivos de micromasa. Para cuantificar esa actividad los cultivos fueron tratados con 10% de SDS y leídos en un espectrofotómetro a 400nm.

bución homogénea de la fibronectina en el cultivo y una mayor expresión de la proteína. A diferencia de la respuesta obtenida con los TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 en que la distribución de la fibronectina no fue homogénea y la expresión de la proteína fue menor. De manera similar, el mesénquima de la pata en el estadio 24 del embrión de pollo, en presencia del TGF- $\beta$ 1, cambia su patrón morfológico de nodular a una capa continua de condrocitos. Esta respuesta, al igual que la observada por nosotros en ratón, está asociada con un incremento en la producción de la fibronectina.<sup>148</sup> De manera conjunta los resultados obtenidos en pollo y en ratón sugieren que la respuesta del mesénquima a los TGF- $\beta$ , en los distintos estadios de desarrollo del ratón, pueda deberse a una expresión diferencial de los receptores del TGF- $\beta$  y de moléculas de la MEC con capacidad de unir los TGF- $\beta$ , tales como la decorina<sup>166</sup> y el biglicano.<sup>167</sup> Otra posibilidad es que las afinidades de los receptores por los TGF- $\beta$  cambien durante la diferenciación del cartílago y/o que la transducción de la señal generada por

las isoformas del TGF- $\beta$  sea diferente. El segundo nivel de acción de los TGF- $\beta$  en el mesénquima de las extremidades en los estadios 19, 20 y 21 correspondió a la acumulación de azul de Alciano en la MEC en respuesta a los TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3. En el estadio 19 las células en cultivo acumularon niveles semejantes de azul de Alciano en la MEC, en respuesta a los cuatro factores de crecimiento. Sin embargo, en los estadios 20 y 21 los cultivos, en respuesta a los TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3, presentaron una acumulación de azul de Alciano semejante a la obtenida con las cuatro isoformas en el estadio 19, aunque con un patrón morfológico diferente. Esto sugiere, que la morfogénesis y la diferenciación celular del cartílago son dos fenómenos distintos, que pueden ser regulados de manera independiente por los TGF- $\beta$ .

Como se mencionó anteriormente, podría haber diferentes componentes y tal vez distintos mecanismos de acción que regulen la respuesta del mesénquima a los TGF- $\beta$  durante el desarrollo de la extremidad. En esta sección se mencionarán

tres posibilidades a nivel de los receptores de los TGF- $\beta$ . Como sabemos hay tres tipos de receptores con capacidad de unir a los TGF- $\beta$ ;<sup>109-111</sup> los receptores tipo I y II participan en la unión del ligando y en la transducción de la señal, el receptor tipo III (*betaglicano*) modula la unión de los TGF- $\beta$  a los receptores I y II, pero presenta mayor afinidad por el TGF- $\beta$ 2, de manera que si el receptor III no se encuentra en la membrana, la afinidad del TGF- $\beta$ 2 por los receptores I y II se reduce.<sup>112-114,116-118</sup>

El cambio en el patrón morfogénico de capa continua a nodular en los cultivos de mesénquima de los estadios 20 y 21 y la misma producción de MEC positiva al azul de alciano, como respuesta al TGF- $\beta$ 2 puede explicarse por la ausencia del receptor III y que por lo tanto, la afinidad del receptor II por el TGF- $\beta$ 2 se reduzca, como se ha sugerido en otros sistemas.<sup>168</sup> Una segunda posibilidad es que la expresión de los receptores I y II no ocurra al mismo tiempo, ya que se requiere de la coexpresión de ambos receptores para la unión del TGF- $\beta$ 2.<sup>169</sup> Otra molécula con capacidad para unir al TGF- $\beta$ 2 es la  $\alpha$ 2-macroglobulina presente en el suero, esta molécula presenta mayor afinidad por el TGF- $\beta$ 2 que por el TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3.<sup>170</sup> Todos los experimentos desarrollados en el presente estudio se llevaron a cabo en presencia de suero, lo que muestra que en el estadio 20 las bajas respuestas del mesénquima al TGF- $\beta$ 2 están dirigidas por receptores específicos y que no se deben a la presencia de la  $\alpha$ 2-macroglobulina en el suero o que el sistema responde a concentraciones subóptimas del factor (ver tablas 3 y 4). Para el caso del TGF- $\beta$ 3 la diferencia en la respuesta podría deberse a que las afinidades de los receptores por el ligando sean diferentes durante el desarrollo, como se ha observado en otros sistemas experimentales en que los TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3 presentan diferentes afinidades por sus receptores.<sup>171</sup>

Otro grupo de moléculas que presentan afinidad por los TGF- $\beta$  son la decorina<sup>166</sup> y el biglicano.<sup>167</sup> La regulación de los TGF- $\beta$  por estas moléculas podría dar otra alternativa para explicar los resultados observados en este estudio. Probablemente, y a manera de especulación, una baja expresión de la decorina y el biglicano incrementaría los efectos de los TGF- $\beta$ , o bien una alta expresión de la decorina y el biglicano inhibiría los efectos de los TGF- $\beta$ . De manera que una expresión elevada de estas moléculas de la MEC en el mesénquima, durante el desarrollo de las extremidades en los estadios 20 y 21, podría tener como efecto una reducción en la poza de TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 en

el mesénquima. Lo anterior generaría un patrón morfogénico distinto o una respuesta diferencial de moléculas específicas del cartilago en comparación a las acciones del TGF- $\beta$ 1.

#### *Efectos de los TGF- $\beta$ en la expresión de marcadores específicos del cartilago*

Con base en que el mesénquima del estadio 20 respondió diferencialmente a las isoformas del TGF- $\beta$  en la formación del patrón morfogénico del cartilago, decidimos evaluar la acción de cada isoforma del TGF- $\beta$  en la expresión de algunos marcadores específicos de la diferenciación del cartilago. Con este propósito se evaluaron el metabolismo de los proteoglicanos, la expresión de la colágena tipo II, la proteína de unión y la actividad de la fosfatasa alcalina durante la *condrogénesis*. Los resultados obtenidos mostraron que las isoformas del TGF- $\beta$  no sólo afectan la morfogénesis del cartilago, sino que además tienen efecto sobre la diferenciación del mismo y también de manera diferencial. Los efectos no dependieron de la proliferación celular, ya que los efectos de los TGF- $\beta$  son específicos sobre los componentes del cartilago, como lo han sugerido otros autores para el embrión de pollo.<sup>135,144-147,153,154</sup> Sin embargo, en el mesénquima de la extremidad del embrión de pollo, las tres isoformas del TGF- $\beta$  estimulan la *condrogénesis* a niveles similares en todos los parámetros examinados.<sup>135,144-147</sup> Por el contrario, en el presente estudio, encontramos que las células del ratón distinguen entre cada isoforma del TGF- $\beta$ . Por lo tanto, el sistema experimental de micromasas del mesénquima de la extremidad del ratón, estudiado aquí, es un buen modelo para evaluar los efectos de los diferentes TGF- $\beta$  en la morfogénesis y la diferenciación del cartilago.

Para determinar si la formación de una capa continua de cartilago en respuesta a los TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 5 era una consecuencia de una biosíntesis elevada de proteoglicanos o a un catabolismo disminuido de los mismos, evaluamos la tasa de catabolismo de material marcado con Na<sup>35</sup>SO<sub>4</sub> y con <sup>3</sup>H-glucosamina, durante el tratamiento con las cuatro isoformas del TGF- $\beta$ . Los resultados mostraron que la tasa de catabolismo de los proteoglicanos, en respuesta al tratamiento de las isoformas del TGF- $\beta$  fue similar bajo todas las condiciones ensayadas. Esto sugiere que la acumulación de la matriz del cartilago y la formación de una capa continua de células condrogénicas, en los cultivos de mesénquima, en respuesta al tratamiento con TGF- $\beta$ 1 y con TGF- $\beta$ 5 podría deberse a



una síntesis alta y a un catabolismo bajo de los proteoglicanos. Mientras que, para el caso de los TGF- $\beta$ 2 y el TGF- $\beta$ 3 la menor acumulación de matriz de cartilago y la formación de un patrón nodular, puede explicarse por una síntesis y un catabolismo disminuidos de los proteoglicanos. Esto nos lleva entonces a sugerir que los TGF- $\beta$ 1 y el TGF- $\beta$ 5 pueden tener un papel fisiológico en el mantenimiento de la homeostasis del cartilago para el metabolismo de los proteoglicanos. En nuestros resultados no encontramos diferencias con los obtenidos en cultivos de células de extremidad embrionaria de pollo, en los que se midió el catabolismo de los proteoglicanos.<sup>135</sup> Asimismo, en otro estudio, se demostró que los factores de crecimiento PDGF AB, BMP4, IGF-I y TGF- $\beta$ 1 disminuyen la tasa de catabolismo de los proteoglicanos en cultivos de explantes de cartilago articular de bovino de diferentes edades.<sup>172-174</sup> Es importante destacar que las vidas medias de los proteoglicanos estimadas en el cartilago articular son del orden de días, mientras que en el presente estudio fueron de alrededor de 7 horas. Esto puede deberse a que ambos sistemas de cultivo son totalmente diferentes, porque ambos sistemas representan a células en diferentes estadios de diferenciación o bien porque las diferencias en las vidas medias reflejan el recambio de la MEC territorial, es decir, los proteoglicanos de membrana presentan un recambio mayor al que presentan los proteoglicanos presentes en la MEC intersticial.<sup>175</sup>

Además, el presente estudio muestra que las isoformas del TGF- $\beta$  regulan de manera diferencial la expresión de la colágena tipo II, la proteína de unión y la actividad de la fosfatasa alcalina. Los resultados obtenidos difieren con los obtenidos con mesénquima de extremidad embrionaria de pollo, ya que en este último sistema las tres isoformas del TGF- $\beta$  de mamífero, regulan por igual la expresión de marcadores específicos del cartilago.<sup>135,144-147,153,154</sup> Por lo tanto, se confirma que el sistema experimental desarrollado en ratón permite estudiar la regulación de la *condrogénesis* por los TGF- $\beta$ , de manera que se aborden los diferentes mecanismos moleculares que regulan la expresión de los genes específicos del cartilago en respuesta a los TGF- $\beta$ .

#### **Participación de los TGF- $\beta$ en la formación de las condensaciones celulares**

Es bien conocida la actividad del TGF- $\beta$  sobre la producción de la MEC en distintos sistemas experimentales y que éste es capaz de regular la homeostasis de la MEC, al incrementar la síntesis

de componentes de la matriz y disminuir la degradación de la misma. Además de estimular la expresión de receptores específicos para componentes de la MEC.<sup>89,108</sup> Sin embargo, se desconocen los mecanismos por los cuales las isoformas del TGF- $\beta$  regulan la *condrogénesis* en el mesénquima de las extremidades del ratón. El hecho de que las cuatro isoformas del TGF- $\beta$  estimulen la *condrogénesis* cuando se adicionan al medio de cultivo durante los dos primeros días del cultivo, sugiere que las isoformas tienen efecto en los primeros estadios de la *condrogénesis*, donde ocurren los procesos celulares que llevan a la condensación celular. En cambio, cuando los TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 5 se adicionan al día 5 de cultivo, se inhibe la *condrogénesis*. Esto nos lleva a concluir que las isoformas del TGF- $\beta$  actúan de manera secuencial y coordinada en el proceso de la diferenciación del cartilago en el ratón.

Antes de discutir el efecto estimulador de los TGF- $\beta$  en las etapas tempranas de la diferenciación del cartilago se discutirá el efecto inhibitorio de los TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 5 en las etapas tardías de la *condrogénesis*.

En nuestro estudio observamos que la adición de los TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 5 a las micromasas al día 5 de cultivo inhibe la biosíntesis de los proteoglicanos sulfatados. El día 5 de cultivo representa la etapa de cartilago maduro, en la que la expresión de la colágena tipo II, la proteína de unión, el agregano y la biosíntesis de los proteoglicanos están en sus máximos niveles. Se sabe que la adición del TGF- $\beta$ 1 a cultivos de condrocitos maduros inhibe la expresión de moléculas características del cartilago,<sup>176</sup> tal vez a través de la inducción de cambios en la morfología celular.<sup>177</sup> El efecto inhibitorio del TGF- $\beta$ 1 puede ser mimetizado, en parte, por la adición de fibronectina al medio de cultivo y ese efecto inhibitorio puede ser bloqueado por la adición de dihidrocitocalasina B, que se sabe es un desestabilizador de los microfilamentos de actina.<sup>177</sup> Por lo tanto, en los resultados obtenidos en el presente trabajo, los TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 5 adicionados al día 5 de cultivo, tal vez induzcan la expresión de la fibronectina en los condrocitos, que entonces interaccionaría de manera directa con receptores de membrana lo que provocaría cambios en la morfología celular a través de alteraciones del citoesqueleto. Estos cambios llevarían a la inhibición de la biosíntesis de proteoglicanos y otros marcadores específicos del cartilago.<sup>176,177</sup>

La condensación celular es un proceso clave en la diferenciación del cartilago, ya que en este es-

tadio de diferenciación se incrementan las interacciones célula-célula y célula-MEC que llevan a la expresión de los genes específicos del cartílago.<sup>47</sup> En el mesénquima de pollo, el tratamiento con los  $TGF-\beta 1$  y  $TGF-\beta 3$ , al inicio del cultivo, incrementa la expresión de la fibronectina y la N-cadherina en las condensaciones celulares y el número de éstas.<sup>135,145-149</sup> En el presente estudio encontramos que las cuatro isoformas del  $TGF-\beta$  fueron capaces de estimular la expresión de la fibronectina, la tenascina, la N-CAM y la N-cadherina, que como se mencionó en la introducción son moléculas reguladoras de la formación de las condensaciones celulares (Fig. 9). Nuevamente, los  $TGF-\beta 1$  y  $TGF-\beta 5$  estimularon en mayor proporción que los  $TGF-\beta 2$  y  $TGF-\beta 3$ , y éstos estimularon la expresión por arriba de los controles. Lo anterior apoya la hipótesis de que los  $TGF-\beta$  pueden ser los responsables de regular las condensaciones celulares,<sup>147-149</sup> no sólo en las extremidades embrionarias sino también en el mesénquima periótico, ya que la adición del  $TGF-\beta 1$  antes de que se formen las condensaciones celulares incrementa el número de ellas y la producción de matriz de cartílago *in vitro*.<sup>151,152</sup> Es importante aclarar que la fibronectina pudiera inhibir la etapa de condensación celular durante la condro-

génesis. Sin embargo, la posible inhibición puede ser bloqueada por la interacción de la tenascina, sindecanos y otros proteoglicanos ricos en sulfato de heparán con la fibronectina, lo que evitaría la unión de esa proteína con los receptores de las células (Fig. 6).

El otro grupo de moléculas que regulan la *condrogénesis* son las *BMP*; las *BMP2*, *BMP3* y *BMP4* estimulan la expresión de genes específicos del cartílago.<sup>147,154-156</sup> Sin embargo, los datos muestran que las *BMP* estimulan la *condrogénesis* cuando se adicionan al cultivo de mesénquima de extremidades de pollo, en etapas posteriores a la formación de las condensaciones celulares.<sup>147,154,155</sup> Mientras que si se adicionan antes de esas etapas, los niveles de expresión de los genes específicos del cartílago y de la fibronectina son muy similares a los controles. Estos datos sugieren que durante la *condrogénesis* del mesénquima de extremidad embrionaria de pollo, los  $TGF-\beta$  regulan la formación de las condensaciones celulares, mientras que las *BMP* la expresión de los genes específicos del cartílago en los condrocitos maduros (Fig. 9). La estimulación de los marcadores de diferenciación del cartílago en respuesta a los  $TGF-\beta$  en las etapas tempranas de la diferenciación podría ser una consecuencia lógica, de que al activar la formación de las condensaciones celulares se incrementen también la expresión de esos genes o bien que la administración de los  $TGF-\beta$  promueva la expresión de las *BMP*.

Esta hipótesis nos plantea una pregunta, porqué las *BMP* son capaces de formar cartílago y hueso, en sitios ectópicos, y los  $TGF-\beta$  no? Si de acuerdo a la hipótesis anterior los  $TGF-\beta$  tienen efecto en las células que aún no expresan los genes específicos del cartílago y las *BMP* en las células que si los expresan (Fig. 9). Esto podría resolverse si suponemos que las células competentes para el efecto de las *BMP*, cuando se inyectan en sitios intramusculares, pudieran ser las células satélite, precursoras del tejido muscular en adultos. Se sabe que la *BMP2* es capaz de convertir a una línea celular mioblástica y a cultivos primarios de músculo en una línea osteoblástica.<sup>177</sup> Sin embargo, en células provenientes del miotomo la *BMP2* no recluta a esas células al linaje condrogénico y sólo inhibe su diferenciación hacia músculo.<sup>156</sup> Mientras que el  $TGF-\beta 1$  inhibe la expresión de los genes específicos del músculo, pero no tiene efecto en los mioblastos tempranos.<sup>178</sup> De manera que en el linaje muscular las *BMP* actúan en etapas tempranas y los  $TGF-\beta$  en etapas posteriores, contrario a lo observado en el cartílago. Por lo tanto, si las

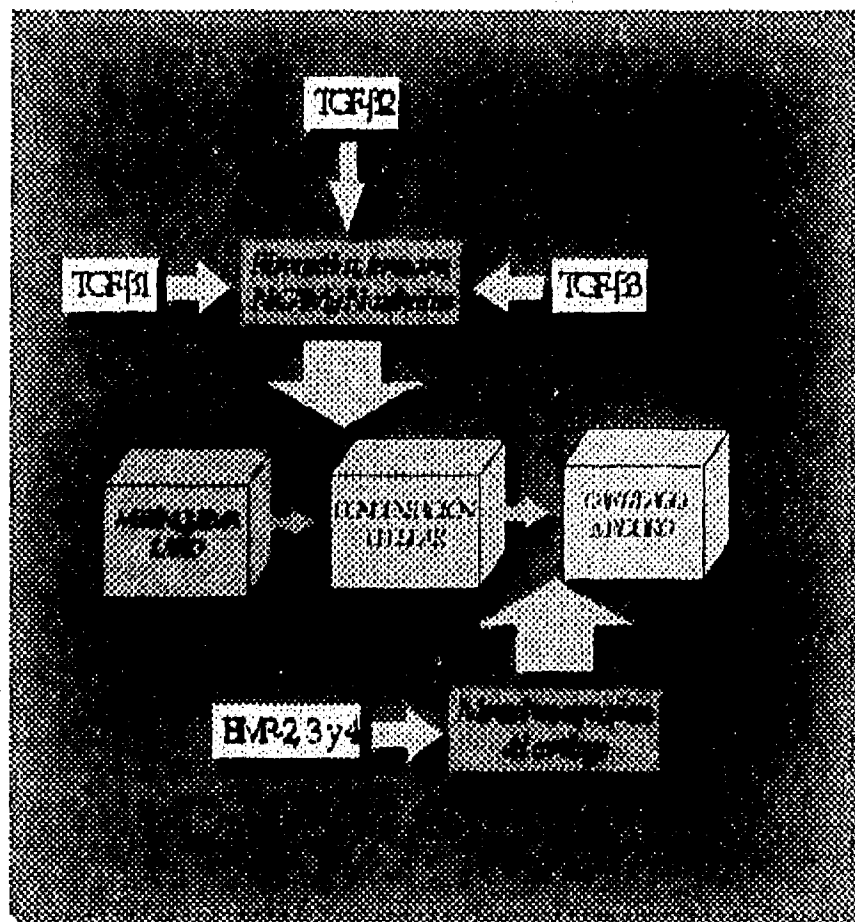


Figura 9. Esta figura muestra que los  $TGF-\beta$  actúan en etapas anteriores a la condensación celular, al promover la expresión de la fibronectina, tenascina, N-cadherina y N-CAM. Mientras que las *BMP* promueven la expresión de moléculas específicas de cartílago diferenciado.

*BMP* inducen la formación ectópica en sitios musculares podría deberse a que las células satélite son convertidas en cartilago al inyectarse intramuscularmente, mientras que la aplicación de los *TGF- $\beta$*  no tienen efecto. La manera en que las *BMP* inducen la formación de cartilago y hueso en sitios subcutáneos, es más difícil de explicar, pero se sabe que durante el proceso de inducción hay gran participación de los *TGF- $\beta$* .

La explicación anterior sugiere que durante la diferenciación del cartilago, las respuestas celulares a los factores de crecimiento dependen de su competencia y de su estado de diferenciación. En la extremidad embrionaria del pollo y del ratón el mesénquima es competente para los *TGF- $\beta$*  en la formación de las condensaciones celulares, y a las *BMP* en la estabilización del estado diferenciado del cartilago (Fig. 9). Esta hipótesis es reforzada aun más, por las observaciones de que esferas recubiertas con *TGF- $\beta$ 1* o con *TGF- $\beta$ 2* implantadas en el mesénquima interdigital, que se sabe que es competente para formar cartilago ectópico, inducen la formación del cartilago y la expresión del factor de transcripción *ck-erg* en las condensaciones celulares. Mientras que la *BMP2* acelera la apoptosis interdigital. Estos experimentos muestran por primera vez que un factor de transcripción, expresado en el *blastema condrogénico*, es regulado por un factor de crecimiento.<sup>86</sup>

Como conclusión los resultados del presente estudio muestran que las cuatro isoformas del *TGF- $\beta$*  regulan diferencialmente la *condrogénesis*. Por un lado son capaces de afectar el patrón morfológico del cartilago y por otro la expresión de la colágena tipo II, la proteína de unión, la actividad de la fosfatasa alcalina y la biosíntesis de proteoglicanos. La diferenciación del cartilago se estimula cuando los *TGF- $\beta$*  se administran durante los dos primeros días de cultivo. Esto indica que los *TGF- $\beta$*  actúan en las primeras fases de la diferenciación del cartilago, durante las fases que llevan a la formación de las condensaciones celulares. Al evaluar la expresión de la fibronectina, la tenascina, la N-CAM y la N-cadherina se encontró que las cuatro isoformas del *TGF- $\beta$*  también regulan diferencialmente la expresión de esas moléculas, lo que sugiere la participación activa de los *TGF- $\beta$*  en el establecimiento del *blastema condrogénico*. Por otro lado, existe una diferencia importante entre el modelo del ratón y el de pollo; las isoformas del *TGF- $\beta$*  regulan la *condrogénesis* por igual, en el pollo, mientras que en el ratón lo hacen de manera distinta. Esto favorece el estudio mecanístico de los efectos de los *TGF- $\beta$*  sobre la con-

drogénesis en murinos. Además se necesitan estudios adicionales para distinguir el papel regulador de los *TGF- $\beta$*  sobre la formación de las condensaciones celulares y la maduración del cartilago, tanto en condiciones normales como en condiciones de reparación. Finalmente, el presente estudio muestra la actividad biológica del *TGF- $\beta$ 5* de *Xenopus* sobre la *condrogénesis* en células de mesénquima de extremidades del embrión de ratón. Sus efectos sobre este sistema son comparables a los observados con el *TGF- $\beta$ 1*. Lo que apoya que el *TGF- $\beta$ 1* y el *TGF- $\beta$ 5*, además de presentar homología, en su secuencia genética, también presentan equivalencia funcional, al menos en el sistema descrito en este trabajo.

# PERSPECTIVAS

### PERSPECTIVAS.

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo se sugiere abordar experimentalmente los siguientes puntos para tratar de establecer los mecanismos de acción de los TGF- $\beta$  en la diferenciación del cartílago.

En primer lugar es importante determinar la expresión espacio-temporal de los TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 y sus receptores, durante el desarrollo embrionario de las extremidades del ratón. No se ha reportado un estudio sistemático de la expresión de estos factores y sus receptores en esta especie. Una vez que se conozca la expresión de las isoformas del TGF- $\beta$  sería importante inhibir su función por medio de anticuerpos neutralizantes y/o oligonucleótidos antisentido en cultivos de órganos *in vitro*. Esto nos permitiría entender las posibles funciones endógenas de esos factores durante el desarrollo de la extremidad y la diferenciación del cartílago.

En segundo lugar se determinaría la expresión de los TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 y sus receptores durante la *condrogénesis*, obtenida en los cultivos de micromasa de extremidades del estadio 20. Este sistema *in vitro* permite elaborar ensayos de afinidad de ligandos por sus receptores, neutralizar la función de los TGF- $\beta$  y tratar de establecer más directamente su papel en la *condrogénesis*. Además, permite determinar los niveles de los TGF- $\beta$  latentes y activos.

En tercer lugar se determinaría la expresión de la decorina y el biglicano durante la *condrogénesis in vitro* y se intentaría correlacionarla con la funcionalidad de los TGF- $\beta$ . En este último ensayo, es necesario tener decorina y biglicano purificados para adicionarlos al medio de cultivo en presencia y ausencia de cada factor, para establecer si estas moléculas presentan afinidad por los TGF- $\beta$  y alteran su funcionalidad.

Esos tres grupos de experimentos nos ayudarían a entender de que manera los TGF- $\beta$  regulan la diferenciación y la morfogénesis del cartílago durante distintos estadios de desarrollo en el ratón.

Para probar la hipótesis planteada líneas arriba (Fig. 9) se sugiere el siguiente ensayo; agregar a cultivos de micromasas de mesénquima, de extremidades de embrión de ratón en distintos estadios de desarrollo, las BMP2, BMP4 y BMP7 a diferentes tiempos de cultivo. El efecto se evaluaría a través de la expresión de moléculas específicas del cartílago, moléculas específicas del *blastema condrogénico* y de la formación del patrón morfológico del cartílago. Se evaluarían esas BMP porque son las que se expresan durante el desarrollo de la extremidad del ratón.

Se determinaría la expresión de las BMP mencionadas antes, en respuesta a la administración de las diferentes isoformas de los TGF- $\beta$  a cultivos de micromasas y viceversa.

Estos experimentos ayudarían a establecer la secuencia en la que participan los TGF- $\beta$  y las BMP. Aunque para estos experimentos dependemos de que los investigadores que tienen las BMP quieran donarlas o bien quieran colaborar.

Para establecer el porqué cada isoforma del TGF- $\beta$  regula de manera diferente la expresión de la colágena tipo II y la proteína de unión así como de las diferentes moléculas que se expresan en las condensaciones celulares, sería importante determinar si cada isoforma afecta directamente la transcripción de esos genes. O bien si lo hacen a través de la expresión de diferentes factores de transcripción que actuarían en cascada.

Finalmente, sería importante continuar con el estudio del TGF- $\beta$ 5, pero directamente en embriones de *Xenopus*. Con la ventaja de que existe un anticuerpo neutralizante comercial contra el TGF- $\beta$ 5, se puede determinar su patrón de expresión durante la embriogénesis y después intentar bloquear su función para establecer el posible papel de ese factor durante el desarrollo de *Xenopus*.

# REFERENCIAS

## Referencias.

- 1) Horton WA 1993. *Connective Tissue and Its Heritable Disorders*. 73-84.
- 2) Erlebacher A., EH Filvaroff, SE Gitelman y R Derynck. 1995. *Cell*. 80: 371-378.
- 3) Carrington JL y AH Reddi. 1991. *Bioessays*. 13: 403-408.
- 4) Pacifici M. 1995. *Matrix Biology*. 14: 689-698.
- 5) Maini PK. y M Solursh. 1991. *Int. Rev. Cytol.* 129: 91-133.
- 6) Tabin CJ. 1991. *Cell*. 66: 199-217.
- 7) Smith SM., K Pang, O Sundin, SE Wedden, C Thaller y G Eichele. 1989. *Development. Suppl.* 121-131.
- 8) Paulsen D. 1994. *Anat. Embryol.* 190: 399-415.
- 9) Tabin CJ. 1995. *Cell*. 80: 671-674.
- 10) Niswander L. 1996. *Ann. N Y Acad Sci.* 785: 23-26.
- 11) Harrison RG. 1918. *J. Exp. Zool.* 25: 413-461.
- 12) Balinsky BI. 1933. *Wilhelm Roux Arch. EntwMech. Org.* 130: 704-746.
- 13) Stephens TD y TR Mc Nulty. 1981. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 61: 191-205.
- 14) Geduspan JS y M Solursh. 1992. *Dev. Biol.* 151: 212-220.
- 15) Geduspan JS., BJ Padanilam y M Solursh. 1992. *Dev. Dyn.* 195: 67-76.
- 16) Crossley PH y Martin GR. 1995. *Development*. 121: 439-451.
- 17) Grieshammer U., G Minowada, JM Pisenti, UK Abbott y GR Martin. 1996 *Development* 122: 3851-3861.
- 18) Ros MA., A López-Martínez, BK Simandl, C Rodríguez, JC Izpisúa-Belmonte, Dahn R y JF Fallon. 1996. *Development*. 122: 2319-2330.
- 19) Kuhlman J y L Niswander. 1997. *Development*. 124: 133-139.
- 20) Cohn MJ., JC Izpisúa-Belmonte, H Abud, JK Heath y C Tickle. 1995. *Cell*. 80: 739-746.
- 21) Fallon JF., López A, MA Ros, MP Savage, BB Olwin y BK Simandl. 1994. *Science*. 264: 104-107.
- 22) Niswander L y GR Martin. 1992. *Development* 114: 755-768.
- 23) Riley BR., MP Savage, BK Simandl, BB Olwin y Fallon JF. 1993. *Development* 118: 95-104.
- 24) Crossley PH., G Minowada, CA MacArthur y GR Martin. 1996. *Cell*. 84: 127-136.
- 25) Vogel A y C Tickle. 1993. *Development*. 119: 199-206.
- 26) Niswander L., C Tickle, A Vogel, I Booth y GR Martin. 1993. *Cell* 75: 579-587.
- 27) Niswander L y GR Martin. 1993. *Development*. 119: 287-294.
- 28) Dealy CN y R Kosher. 1996. *Development*. 122: 1323-1330.
- 29) Riddle RD., RL Johnson, E Laufer y C Tabin. 1993. *Cell*. 75: 1401-1416.
- 30) Tickle C. 1991. *Development. Suppl.* 1: 113-121.
- 31) Wanek N., DM Gardiner, K Muenoka y SV Bryant. 1991. *Nature*. 350: 81-83.
- 32) Noji S., T Nohno, E Koyama, K Muto, K Ohyama, Y Aoki, K Tamura, K Ohsugi, H Ide, S Taniguchi y T Saito. *Nature*. 350: 83-86.
- 33) Niswander L., S Jeffrey, GR Martin y C Tickle. 1994. *Nature*. 371: 609-612.
- 34) Laufer E., CE Nelson, R Johnson, BA Morgan y C Tabin. 1994. *Cell*. 79: 993-1003.
- 35) Charité J., W de Graaff, S Shen y J Deschamps. 1994. *Cell* 78: 589-601.
- 36) Morigo V., RL Johnson, A Vortkamp y C Tabin. 1996. *Dev. Biol.* 180: 273-283.
- 37) Goodrich LV., RL Johnson, L Milenkovic, JA McMahon y MP Scott. 1996. *Genes & Dev.* 10: 3101-3112.
- 38) Duprez DM., K Kostakopoulou, PH Francis-West y C Tickle. 1996. *Development* 122: 1821-1828.
- 39) Francis PH., M Richardson, PM Brickell y C Tickle. 1994. *Development*. 120: 209-218.
- 40) Niswander L y GR Martin. 1993. *Nature*. 361: 68-71.
- 41) Dealy CN., A Roth, D Ferrari. AMC Brown y RA Kosher. 1993. *Mech. Dev.* 43: 175-186.
- 42) Parr BA., MJ Shea, G Vassileva y AP McMahon. 1993. *Development*. 119: 247-261.
- 43) Parr BA y AP McMahon. 1995. *Nature*. 374: 350-353.
- 44) Yang Y y Niswander L. 1995. *Cell*. 80: 939-947.
- 45) Riddle RD., M Ensini, C Nelson, T Tsuchida, TM Jessell y C Tabin. 1995. *Cell* 83: 631-640.
- 46) Christ B y J Wilting. 1992. *Ann. Anat.* 174: 23-32.
- 47) Hall BK y T Miyake. 1995. *Int. J. Dev. Biol.* 39: 881-893.
- 48) Solursh M. 1989. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1: 989-994.
- 49) Dessau W., H von der Mark, K von der Mark y S Fisher. 1980. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 57: 51-60.
- 50) Silver MH., J-M Foidart y RM Pratt. 1981. *Differentiation*. 18: 141-149.
- 51) Kosher RA., W Kulyk y SW Gay. 1986. *J. Cell Biol.* 102: 1151-1156.

- 52) Kulyk W., WB Upholt y RA Kosher. 1989. *Development*. 106: 449-455.
- 53) Kimata K., Y Oike, K Tani, T Shinomura, M Yamagata, M Uritani y S Susuki. 1986. *J. Biol. Chem.* 261: 13517-13525.
- 54) Oberlanser SA y RS Tuan. 1994. *Development*. 120: 177-187.
- 55) Widelitz RB., TX Jiang, BJ Murray y CM Chuong. 1993. *J. Cell Physiol.* 156: 399-411.
- 56) Jiang TX, JR Yi, SY Ying y CM Chuong. 1993. *Dev. Biol.* 155: 545-557.
- 57) Solursh M., R Reiter, KL Jensen, M Kato y M Bernfield. 1990. *Dev. Biol.* 140: 83-92.
- 58) David G., XM Bai, B van der Schueren, P Marynen, JJ Cassiman y H van der Berghe. 1993. *Development*. 119: 841-854.
- 59) Gould SE., W Upholt y RA Kosher. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 3271-3275.
- 60) Seghatosleslami MR y RA Kosher 1996. *Dev. Dyn.* 207: 114-119
- 61) Frenz DA., S Akiyama, DF Paulsen y SA Newman. 1989. *Dev. Biol.* 136: 87-96.
- 62) Frenz DA., NS Jaikaria y SA Newman. 1989. *Dev. Biol.* 136: 97-103.
- 63) Elmer WA., S Pollard y JD Cochran. 1991. *Exp. Cell. Res.* 195: 154-163.
- 64) Aulthouse AL y M Solursh. 1987. *Dev. Biol.* 120: 377-384.
- 65) Cheah KS., ET Lan, PK Au y PP Tam. 1991. *Development*. 111: 945-953.
- 66) Thomas JT., S Ayad y ME Grant. 1994. *Ann Rheum. Diseases.* 53: 488-496.
- 67) Upholt WB., L Chandrasekaran y ML Tanzer. 1993. *Experientia.* 49: 384-392.
- 68) Chen Q., DM Johnson, DR Haudenschild y PF Goetinck. 1995. *Dev. Biol.* 172: 293-306.
- 69) Luo G., R D'Souza, D Hogue y G Karsenty. 1995. *J. Bone Min. Res.* 10: 325-334.
- 70) Marriot A., S Ayad y ME Grant. 1991. *J. Cell Sci.* 99: 641-649.
- 71) Mackie EJ., I Thesleff y R Chiquet-Ehrismann. 1987. *J. Cell Biol.* 105: 2569-2579.
- 72) Tavella S., P Raffo, C Tachetti, R Cancedda y P Castagnola. 1994. *Exp. Cell Res.* 215: 354-362.
- 73) Yokouchi Y., S Nakasato, M Yamamoto, Y Goto, T Kameda, H Iba y A Kuroiwa. 1995. *Genes & Dev.* 9: 2509-2522.
- 74) Cserjesi P., D Brown, KL Ligon, GE Lyons, NG Copeland, DJ Gilbert, NA Jenkins y EN Olson. 1995. *Development*. 121: 1099-1110.
- 75) Burgess R., P Cserjesi, KL Ligon y EN Olson. 1995. *Dev. Biol.* 168: 296-306.
- 76) Olson EN y WH Klein. 1994. *Genes & Dev.* 8: 1-8.
- 77) Lee JE., S Hollenberg, L Snider, D Turner, N Lipnick y H Weintraub. 1995. *Science.* 268: 836-844.
- 78) Jan YN y LJ Yan. 1993. *Cell.* 75: 827-830.
- 79) Rudnicki MA., PNJ Schnegelsberg, RH Stead, T Braun, HH Arnold y R Jaenisch. 1993. *Cell.* 75: 1351-1359.
- 80) Koseki H., J Wallin, J Wilting, Y Mizutani, A Kispert, C Ebersperger, BG Herrmann, B Christ y R Balling. 1993. *Development.* 119: 649-660.
- 81) Zhao GQ., X Zhou., H Eberspaecher, M Solursh y B de Crombrugghe. 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 8633-8637.
- 82) Dhordain P., F Dewitte, X Desbiens, D Stehelin y M Duterque-Coquillaud. 1995. *Mech. Dev.* 50: 17-28.
- 83) Castagnola P., M Gennari, A Gaggero, F Rossi, A Daga, MT Corsetti, F Calabi y R Cancedda. 1996. *Exp. Cell Res.* 223: 215-226.
- 84) Wright E., S Wheatley, Y Jeske y A McCormack. 1995. *Nature Genet.* 9: 15-20.
- 85) Hoang B., M Moss Jr, S Vukicevic y FP Luyten. 1996. *J. Biol. Chem.* 271: 26131-26137.
- 86) Gañan Y., D Macias, M Duterque-Coquillaud, MA Ros y JM Hurle. 1996. *Development* 122: 2349-2357.
- 87) Moses H y R Serra. 1996. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6: 581-586.
- 88) Kingsley DM. 1994. *Genes & Dev.* 8: 133-146.
- 89) Massagué J. 1990. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 6: 597-641.
- 90) Sporn MB y AB Roberts. 1992. *J. Cell. Biol.* 119: 1017-1021.
- 91) Wozney JM., V Rosen, AJ Celeste, LM Mitsock, MJ Whitters, RW Kriz, RM Hewick y EA Wang. 1988. *Science.* 242: 1528-1534.
- 92) Wozney JM y V Rosen. 1993. *Handbook of Experimental Pharmacology.* 107: 725-748.
- 93) Elima K. 1993. *Ann. Med.* 25: 395-402.
- 94) Hogan BLM. 1996. *Genes & Dev.* 10: 1580-1594.
- 95) Hogan BLM. 1996. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6: 432-438.
- 96) Thomsen G., T Woolf, S Sokol, J Vaughan, W Vale y D Melton. 1990. *Cell.* 63: 485-493.
- 97) Murata M., Y Eto, H Shibai, M Sakai y M Muramatsu. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 2434-2438.
- 98) Vale W., A Hsueh, C River y J Yu. 1990. *Peptide Growth Factors and Their Receptors.* (Eds Sporn MB y AB Roberts). Springer, Berlin. 211-248.



- 99) Matzuk MM., TR Kumar, Vassalli, JR Bickenbach, DR Roop, R Jaenisch y A Bradley. 1995. *Nature*. 374: 354-356.
- 100) Matzuk MM., TR Kumar y A Bradley. 1995. *Nature* 374: 356-360.
- 101) King JA., EE Storm, PC Marker, DJ Dileone y DM Kingsley. 1996. *Ann. N Y Acad. Sci.* 785: 70-79.
- 102) Storm EE., TV Huynh, NG Copeland, NA Jenkins, DM Kingsley y SL Lee. 1994. *Nature*. 368: 639-643.
- 103) Chang SC., B Honag, JT Thomas, S Vukicevic, FP Luyten, NJP Ryba, CA Kozak, AH Reddi y M Moos Jr. 1994. *J. Biol. Chem.* 269: 28227-28234.
- 104) Thomas JT., K Lin, M Nandedkar, M Cargamo, J Cervenka y FP Luyten. 1996. *Nature Genet.* 12: 315-317.
- 105) Padgett RW., RDS Johnston y WM Gelbart. 1987. *Nature*. 325: 81-84.
- 106) Arora K., M Levin y M O'Connor. 1994. *Genes & Dev.* 8: 2588-2601.
- 107) Wharton KA., GH Thomsen y WM Gelbart. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 9214-9218.
- 108) Rizzino A. 1988. *Dev. Biol.* 130: 411-422.
- 109) Massagué J. 1992. *Cell.* 69: 1067-1070.
- 110) Attisano L., JL Wrana, F López-Casillas y J Massagué. 1994. *Biochem. Biophys. Acta.* 1222: 71-80.
- 111) Kolodziejczyk SM y BK Hall. 1996. *Biochem. Cell Biol.* 74: 299-314.
- 112) Wrana JL., Attisano L., J Cárcamo, A Zentella, J Doody, M Laiho, XF Wang y J Massagué. 1992. *Cell.* 71: 1003-1014.
- 113) Attisano L., J Cárcamo, F Ventura, FMB Weis y J Massagué. 1993. *Cell.* 75: 671-680.
- 114) Lin HY., A Moustakas, P Knaus, RG Wells, YI Henis y HF Lodish. 1995. *J. Biol. Chem.* 270: 2747-2754.
- 114a) Wrana JL y Attisano L. 1996. *TIG*, 12:493-6.
- 115) Matzuk MM., N Lu, H Vogel, K Sellheyer, DR Roop y A Bradley. 1995. *Nature*. 374: 360-363.
- 116) López-Casillas F., S Cheifetz, J Doody, JL Andres, WS Lane y J Massagué. 1991. *Cell.* 67: 785-795.
- 117) López-Casillas F., JL Wrana y J Massagué. 1993. *Cell.* 73: 1435-1444.
- 118) López-Casillas F., HM Payne, JL Andres y J Massagué. 1994. *J. Cell Biol.* 124: 557-568.
- 119) Cheifetz S., T Bellón, C Calés, S Vera, C Bernabeau, J Massagué y M Letaarte. 1992. *J. Biol. Chem.* 267: 19027-19030.
- 120) Lyons KM., BLM Hogan y EJ Robertson. 1995. *Mech. Dev.* 50: 71-83.
- 121) Lyons KM., RW Pelton y BLM Hogan. 1989. *Genes & Dev.* 3: 1657-1668.
- 122) Lyons KM., RW Pelton y BLM Hogan. 1990. *Development.* 109: 833-844.
- 123) Vortkamp A., K Lee, B Lanske, GV Segre, HM Kronenberg y CT Tabin. 1996. *Science.* 273: 613-622.
- 124) Kingsley DM. 1994. *Trends Genet.* 10: 16-21.
- 125) Kingsley DM., AE Bland, JM Grubber, PC Marker, LB Russell, NG Copeland y NA Jenkins. 1992. *Cell.* 71: 399-410.
- 126) Luo G., C Hofmann, Aljj Bronckers, M Sohocki, A Bradley y G Karsenty. *Genes & Dev.* 9: 2808-2820.
- 127) Owens EM y M Solursh. 1983. *Differentiation.* 24: 145-148.
- 128) Hotten GC., T Matsumoto, M Kimura, RF Bechtold, R Kron, T Ohara, H Tanaka, Y Satoh, M Okasaki, T Shirai, H Pan, S Kawai, JS Pohl y A Kudo. 1996. *Growth Factors.* 13: 65.
- 129) Millan FA., F Denhez, P Kondaiyah y RJ Akhurst. 1991. *Development* 111: 131-144.
- 130) Schid P., D Cox, G Bilbe, R Maier y GK McMaster. 1991. *Development.* 111: 117-130.
- 131) Thorp BH., I Anderson y S Jakowlew. 1992. *Development.* 114: 907-911.
- 132) Ahrens PA., M Solursh y RS Reiter. 1977. *Dev. Biol.* 60: 69-82.
- 133) Franzen A., D Heinegard y M Solursh. 1987. *Differentiation.* 36: 199-210.
- 134) Owens EM y M Solursh. 1981. *Dev. Biol.* 88: 297-311.
- 135) Kulyk WM., BJ Rodgers, K Greer y RA Kosher. 1989. *Dev. Biol.* 135: 424-430.
- 136) Paulsen DF., RM Langille, V Dress y M Solursh. 1988. *Differentiation.* 39: 123-130.
- 137) Swalla BJ y M Solursh. 1984. *Differentiation.* 26: 42-48.
- 138) Arzate H., J Chimal-Monroy, L Hernández-Lagunas y L Diaz de León. 1996. *J. Periodont. Res.* 31: 144-148.
- 139) Urist M. 1965. *Science.* 150: 893-899.
- 140) Seyedin SM., TC Thomas, AY Thompson, DM Rosen y KA Piez. 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 2267-2271.
- 141) Seyedin SM., AY Thompson, H Bentz, DM Rosen, JM McPherson, A Conti, NR Siegel, GR

- Galluppi y KA Piez. 1986. *J. Biol. Chem.* 261: 5693-5695.
- 142) Seyedin SM., PR Segarini, DM Rosen, AY Thompson, H Bentz y J Graycar. 1987. *J. Biol. Chem.* 262: 1946-1949.
- 143) Kessler E., K Takahara, L Biniaminov, M Brusel y DS Greenspan. 1996. *Science.* 271: 360-362.
- 144) Schofield JN y L Wolpert 1990. *Exp. Cell Res.* 191: 144-148.
- 145) Leonard CM., HM Fuld, DA Frenz, SA Downie, J Massagué y SA Newman. 1991. *Dev. Biol.* 145: 99-109.
- 146) Tsonis PA., K Del Rio-Tsonis, JL Millan y MJ Wheelock. 1994. *Exp. Cell Res.* 213: 433-437.
- 147) Roark EF y K Greer. 1994. *Dev. Dynam.* 200: 130-116.
- 148) Downie SA y SA Newman. 1994. *Dev. Biol.* 162: 195-208.
- 149) Downie SA y SA Newman. 1994. *Dev. Biol.* 172: 519-530.
- 150) Frenz DA y TR Van de Water. 1991. *Dev. Biol.* 144: 38-46.
- 151) Frenz DA., V Galinovic-Schwartz, W Liu, KC Flanders y TR Van de Water. 1992. *Dev. Biol.* 153: 519-530.
- 152) Frenz DA., W Liu, JD Williams, V Hatcher, V Galinovic-Schwartz, KC Flanders y TR Van de Water. 1994. *Development.* 120: 415-424.
- 153) Carrington JL y AH Reddi. 1990. *Exp. Cell Res.* 186: 368-373.
- 154) Chen P., Carrington JL, RG Hammonds y AH Reddi. 1991. *Exp. Cell Res.* 195: 509-515.
- 155) Carrington JL., P Chen, M Yanagishita y AH Reddi. 1991. *Dev. Biol.* 146: 406-415.
- 156) Duprez DM., M Coltey, H Amthor, PM Brickell y C Tickle. 1996. *Dev. Biol.* 174: 448-452.
- 157) Chen P., YM Yu y AH Reddi. 1993. *Dev. Biol.* 206: 119-127.
- 158) Tsonis PA. 1991. *Dev. Biol.* 143: 130-134.
- 159) Del Rio-Tsonis K y PA Tsonis. 1994. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 204: 975-982.
- 160) Paulsen DF., M Solorsh, RM Langille, L Pang y WD Chen. 1994. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 30A: 181-186.
- 161) Paulsen DF, DW Chen, D Okello y B Johnson. 1994. *Dev. Dyn.* 201: 310-323.
- 162) Jiang H., DR Soprano, SW Li, KJ Soprano, JD Penner, M Gyda, M Iii y D Kochhar. 1995. *Int. J. Dev. Biol.* 39: 617-627.
- 163) Tsonis PA., MT Sargent, K Del Rio-Tsonis y JC Jung. 1996. *Int. J. Dev. Biol.* 40: 1053-1059.
- 164) Kondaiah P., MJ Sands, JM Smith, A Fields, AB Roberts, MB Sporn y DA Melton. 1990. *J. Biol. Chem.* 265: 1089-1093.
- 165) Schramm CA., RS Reiter y M Solorsh. 1994. *Dev. Biol.* 163: 467-479.
- 166) Yamaguchi Y., DM Mann y E Ruosathi. 1990. *Nature.* 346: 281-284.
- 167) Fosang AJ y Hardingham TE 1992. *FASEB J.* 6: 961-870.
- 168) Ohta M., JS Greenberger, P Anklesaria, A Bassols y J Massagué. 1992. *Nature.* 329: 539-541.
- 169) Rodriguez C., F Chen, RA Weinberg y HF Lodish. 1995. *J. Biol. Chem.* 270: 15919-15922.
- 170) Cheifetz S., H Hernández, M Laiho, P ten Dijke, KK Iwata y J Massagué. 1991. *J. Biol. Chem.* 266: 20533-20538.
- 171) Graycar J., DA Miller, BA Arrick, RM Lyons, HL Moses y R Derynck. 1989. *Mol. Endocrinol.* 3: 1977-1986.
- 172) Luyten FP., MY Yu, M Yanagishita, S Vukicevic, RG Hammonds y AH Reddi. 1992. *J. Biol. Chem.* 267: 3691-3695.
- 173) Schafer SJ., FP Luyten, M Yanagishita y AH Reddi. 1993. *Arch. Biochem. Biophys.* 302: 431-438.
- 174) Luyten FP., P Chen, V Paralkar y AH Reddi. 1994. *Exp. Cell Res.* 210: 224-229.
- 175) Hascall VC., D Heinegard y TN Wight. 1991. *Cell Biology of Extracellular matrix, Second Edition (Ed. ED Hay) Plenum Press, New York.* 149-175
- 176) Galéra P., F Rédini, D Vivien, J Bonaventure, H Penfornis, G Loyau y J-P Pujol. 1992. *Exp. Cell Res.* 200: 379-392.
- 177) Rosen DM., SA Stempien, AY Thompson y SM Seyedin. 1988. *J. Cell. Physiol.* 134: 337-346.
- 178) Katagiri T., A Yamaguchi, M Komaki, E Abe, N Takahashi, T Ikeda, V Rosen, JM Wozney, A Fujisawa-Sehara y T Suda. 1994. *J. Cell. Biol.* 127: 1755-1766.
- 179) Cusella-De Angelis MG., S Molinari, A Le Donne, A Coletta, E Vivarelli, M Bouche, M Molinaro, S Ferrari y G Cossu. 1994. *Development.* 120: 925-933.

Nuestra vida y nuestra  
muerte son la misma cosa.  
Cuando nos damos cuenta  
cabal de ello, le perdemos el  
miedo a la muerte y a las  
verdaderas dificultades de la  
vida.

*Shunryu Suzuki.*