

11281



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**LA INTEGRINA $\alpha 5 \beta 1$ COORDINA LA DIFERENCIACIÓN
DEL CARTÍLAGO Y LA FORMACIÓN DE
ARTICULACIONES DURANTE EL DESARROLLO DEL
ESQUELETO**

**El presente trabajo se realizo bajo la dirección del
DR. JESÚS CHIMAL MONROY
en el laboratorio de Biología del Desarrollo del
departamento de Biología Celular y Fisiología del
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.**

**QUE PARA OPTENER EL TÍTULO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIÓMICAS**

**PRESENTA:
GARCIADIEGO CAZARES DAVID**



BIOMÉDICAS

2005

m344099



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó con el financiamiento a los proyectos 34334-N y 42568-Q auspiciados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, y con el apoyo a los proyectos IN216701 y IN218104 de la DGAPA, UNAM.

Agradezco las becas para realizar estudios de Posgrado otorgadas por el CONACYT y la DEGEP de la UNAM.

Agradezco a la M en C. Marcia Bustamante Zepeda el apoyo técnico durante la realización del trabajo experimental; a Gerardo Arellín Rosas y Georgina Díaz Herrera el apoyo con el manejo de animales del bioterio y a Lucía Brito por el apoyo en la biblioteca.

A los integrantes del jurado por sus comentarios, sugerencias y correcciones a esta tesis: Dr. Luís F. Covarrubias Robles, Dr. Jesús Chimal Monroy, Dr. Alfredo Varela Echavarría, Dr. Mario Zurita Ortega, Dr. Jaime Martínez Salazar, Dr. Jaime Iván Velasco Velásquez y Dra. Diana María Escalante Alcalde.

Agradezco especialmente al Dr. Jesús Chimal, por la confianza que siempre tuvo en mí y la libertad con la que me permitió trabajar y desarrollar mis ideas.

A la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**, por que desde mi adolescencia es parte de mi vida, en ella he crecido y desarrollado personal y profesionalmente.

A tantos amigos y compañeros, profesores y alumnos que conocí en el CCH Oriente, Vallejo y Naucalpan, la Escuela Nacional Preparatoria 2, la FES Zaragoza e Iztacala, la Facultad de Ciencias, la Facultad de Medicina y el Instituto de Investigaciones Biomédicas; también a los amigos y amigas que conocí durante el movimiento estudiantil de 1999-2000. Todos ellos tuvieron y/o tienen gran influencia sobre mi, compartimos sueños y son parte de mi historia evolutiva y mi criterio biológico.

A mis amigos y compañeros del laboratorio: Jesús, René, Gina, Alberto, Karla, Karina, Sinué, Simona, Ricardo, David; a Doña Chayo y el Dr. Lino (que ya nos dejaron). ¡Ah! claro, a la mesa chacotera (la vieja y la renovada), a Marcia (que se fue a los iu-es-ei), el "Men" (otra vez), Émeli (¿así se escribe?), Gin (también otra vez)...y por supuesto a Mine (¡gracias amiguita!). Es muy agradable trabajar, discutir, platicar y chacotear con ustedes.

A todos mis amigos y amigas:

En especial a:

Gaby y Alejandra (son muchos años de conocernos y ayudarnos), a Paula, Elia y Pancho.

A mi familia:

Abraham Garciadiego A. (siempre me acuerdo de ti papá).

Isaac Garciadiego C. (también de ti hermano).

A mi hermana Sara, mi hermano Daniel, mi cuñada Bety y mi sobrina Lili, que me quieren y comprenden muy bien.

A Olga y Brenda, por que son una muy bonita compañía.

Para los Chinos “aprender es como remar a contracorriente, si no se avanza se retrocede”.

La “ciencia” es un privilegio de Dios y que el hombre usurpará: la idea del “pecado” surge de esa usurpación .

Así pues, la mano no es sólo el órgano del trabajo: *es también su producto*. Sólo por el trabajo, por la adaptación a nuevas y nuevas funciones, por la transmisión hereditaria del perfeccionamiento así adquirido por los músculos, los ligamentos y, en un periodo más largo, también por los huesos; y por la aplicación de estas habilidades heredadas a funciones cada vez más completas, ha sido que la mano del hombre ha alcanzado ese grado de perfección capaz de dar vida, como por arte de magia, a los cuadros de Rafael, a las estatuas de Thorwaldsen y a la música de Paganini.

Federico Engels. El papel del trabajo en la transformación del mono en hombre. 1876.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
El patrón estructural del esqueleto de la extremidad.....	3
Establecimiento y crecimiento del primordio de la extremidad.....	5
La formación del esqueleto apendicular.....	9
<i>Condensaciones precartilaginosas.....</i>	9
<i>Osificación endocondral.....</i>	10
El desarrollo de las articulaciones.....	14
<i>Formación de la interzona.....</i>	17
<i>La cavitación.....</i>	21
La diferenciación del condrocito.....	23
Vías de señalización que controlan la diferenciación de los condrocitos.....	24
<i>La señalización de IHH/PTHrP promueve la proliferación y retrasa la hipertrofia.....</i>	24
<i>El doble juego de IHH.....</i>	25
<i>La señalización del FGF reprime la proliferación y promueve la hipertrofia.....</i>	26
<i>La señal de relevo, Cbfa1 induce la hipertrofia del condrocito.....</i>	27
<i>Diferentes formas de Wnt controlan en varios pasos la diferenciación de los condrocitos.....</i>	28
<i>Efectos paradójicos de la señalización de BMPs.....</i>	30
Importancia de la Matriz Extracelular en la diferenciación de los condrocitos y la formación del esqueleto.....	31
Las Integrinas permiten la comunicación de los condrocitos con su entorno durante la diferenciación.....	35

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
OBJETIVO GENERAL.....	39
OBJETIVOS PARTICULARES.....	39
MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
Reactivos.....	40
Material biológico.....	40
Aislamiento de extremidades y microinyección.....	41
Cultivo de órganos.....	41
Preparación del esqueleto.....	42
Cortes y tinciones histológicas.....	42
Detección de marcadores de diferenciación	43
Inmunofluorescencias.....	43
Preparación de las sondas.....	43
Hibridación <i>in situ</i>.....	44
Muerte celular.....	45
Electroporación del cDNA de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ en los embriones de pollo....	45
RESULTADOS.....	46
El bloqueo de las Integrinas $\beta 1$ induce la formación de una articulación ectópica.....	46
El bloqueo de las Integrinas $\beta 1$ modifica la estructura del cartílago prehipertrófico de la placa de crecimiento.....	47
<i>Wnt-14</i> y <i>GDF-5</i> se expresan en la articulación ectópica.....	47
La muerte celular en la articulación ectópica.....	48
La interacción de las secuencias RGD del ligando con las Integrinas mantienen la estructura del cartílago prehipertrófico.....	49

El bloqueo de las Integrinas $\alpha5\beta1$ induce cambios moleculares característicos de la formación de articulaciones.....	51
El bloqueo de la Integrina $\alpha5\beta1$ inhibe la diferenciación de los condrocitos.....	52
Regulación de la Integrina $\alpha5\beta1$ durante la formación de articulaciones.....	54
Las BMP potencian la formación de articulaciones ectópicas inducidas por la inhibición de la Integrina $\alpha5\beta1$.....	55
La sobreexpresión de Integrina $\alpha5\beta1$ inhibe la formación de articulaciones y promueve la diferenciación de las células prehipertróficas.....	58
Indian hedgehog inhibe la formación de la articulación ectópica.....	60
DISCUSIÓN.....	62
La Integrina $\alpha5\beta1$ coordina la diferenciación de los condrocitos y la formación de articulaciones durante el desarrollo del esqueleto.....	62
Los condrocitos en proliferación son un tipo celular que puede diferenciarse hacia dos destinos celulares en función de las Integrinas.....	65
El pericondrio podría ser el tipo celular que dirige la formación de las articulaciones.....	68
El papel de las BMP durante la formación de las articulaciones.....	70
CONCLUSIONES.....	72
PERSPECTIVAS.....	73
REFERENCIAS.....	74

ABREVIATURAS

AER	Cresta del Ectodermo Apical
AR	Ácido retinoico
BMP	Proteína Morfogenética de Hueso
BMPR	Receptor de la BMP
DEPC	Dietil pirocarbonato
En-1	Engrailed-1
FGF	Factor de Crecimiento de Fibroblastos
FGFR	Receptor de FGF
GAG	Glicosaminoglicanos
GDF-5	Factor de Crecimiento y Diferenciación 5
HA	Ácido hialurónico
HMα5	Anticuerpo anti-integrina alfa 5
HMβ1	Anticuerpo anti-integrina beta 1
IHH	Indian Hedgehog
MEC	Matriz Extracelular
N-CAM	Molécula de Adhesión Celular- Neuronal
PTHrP	Péptido relacionado a la Hormona Paratiroide
PPR	Receptor de PTHrP
Ptc-1	Patched-1
PBS	Amortiguador de Fosfatos Salino
RGD	Péptido Arginina-Glicina-A. Aspártico
RGE	Péptido Arginina-Glicina-A. Glutámico
SHH	Sonic Hedgehog
Smo	Smoothened
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante β
Wnt	Wingless-int related protein
ZPA	Zona de Actividad Polarizante

RESUMEN

Durante el desarrollo del esqueleto, cuando el cartílago en crecimiento alcanza cierto tamaño, éste puede segmentarse y formar dos elementos esqueléticos a partir de uno, separados por una articulación. En este trabajo proponemos un mecanismo mediante el cual las Integrinas y las Proteínas morfogenéticas de hueso (BMP) regulan estos procesos durante el desarrollo del esqueleto. El bloqueo de las Integrinas $\alpha 5$ y $\beta 1$ mediante anticuerpos neutralizantes en extremidades de embriones de ratón cultivadas, indujo la expresión de los marcadores de articulaciones *Wnt-14* y *Gdf-5*, así como la formación de articulaciones ectópicas en el zeugopodio (radio y ulna). Las articulaciones ectópicas se formaron entre los condrocitos en proliferación y los hipertróficos; en esta zona la Integrina $\alpha 5$ deja de expresarse durante el desarrollo de las articulaciones normales. Así, el bloqueo de las Integrinas interrumpe la diferenciación de los condrocitos en proliferación a prehipertróficos, de tal forma que dejan de expresarse la Colágena tipo II e Indian hedgehog (IHH), los cuales son marcadores de diferenciación del cartílago. Sorprendentemente, la adición de BMP-7 en el medio de cultivo aceleró la formación de estas articulaciones.

Por otro lado, la sobreexpresión de los genes de las Integrinas $\alpha 5\beta 1$ en la extremidad embrionaria del pollo, indujo la expresión de *Ihh* y la inhibición de *Wnt-14*, es decir, se inhibió la formación de articulaciones como consecuencia del sobrecrecimiento de cartílago, lo que resultó en la fusión los elementos esqueléticos del autopodio.

Estos resultados indican que la decisión de los condrocitos en proliferación para diferenciarse hacia un destino prehipertrófico o prearticular está en función de la presencia o ausencia de la integrina $\alpha 5\beta 1$. Con base en estos hechos, se sugiere que las integrinas $\alpha 5\beta 1$ coordinan la formación de articulaciones y la maduración de los condrocitos durante el desarrollo del esqueleto.

SUMMARY

During skeletal development, when growing cartilage reaches a particular size, segmentation may occur forming two skeletal elements separated by a joint. In this work, we propose a mechanism by which Integrins and Bone Morphogenic Proteins (BMP) regulate this process during skeletal development. Inhibition of $\alpha 5$ and $\beta 1$ Integrins by blocking antibodies in limb mouse cultures produced an ectopic joint in the zeugopod (radius and ulna). Expression of joint markers like *Wnt-14* and *Gdf-5* corroborates this fact. Ectopic joints were formed between proliferating and hypertrophic chondrocytes; in this zone $\alpha 5$ Integrin is not expressed during the development of normal joints. In this way, blocking Integrins stops differentiation of proliferating chondrocytes to prehypertrophic chondrocytes, and reduces expression of markers of cartilage differentiation like collagen type II and Indian hedgehog (IHH). Surprisingly, addition of BMP-7 in the culture medium enhanced the induction of ectopic joints.

On the other hand, misexpression of $\alpha 5 \beta 1$ Integrin in the chicken limbs, results in cartilage growth and inhibition of joints. This was resulted in the presence of more hypertrophic cartilage, over-expression of *Ihh* and inhibition of *Wnt-14*.

These results indicate that fate of proliferating chondrocytes towards to differentiation to a prehypertrophic fate or to prearticular fate depend of the presence or the absence of $\alpha 5 \beta 1$ Integrin. This suggests that $\alpha 5 \beta 1$ Integrins coordinate the joint formation and chondrocyte differentiation during skeleton development.

INTRODUCCIÓN

El patrón estructural del esqueleto de la extremidad

Hace 360 millones de años que los antecesores de los vertebrados abandonaron el medio acuático para desplazarse sobre la tierra con la ayuda de apéndices pareados. Durante el transcurso de la evolución, se han producido extremidades que han hecho posible la locomoción de los vertebrados de diversas maneras como correr, nadar o volar. Aunque son muy diversos los cambios adaptativos de las extremidades entre las diferentes especies de tetrápodos, la organización fundamental del esqueleto se ha conservado (figura 1). Existen tres compartimentos evidentes en el esquema básico del esqueleto de la extremidad de los tetrápodos actuales: el estilopodio es un solo elemento esquelético proximal (húmero o fémur), el zeugopodio presenta dos elementos intermedios (radio y ulna o tibia y fibula), y el autopodio tiene un número variable de elementos esqueléticos en la región distal (carpos o tarsos, y falanges) (Gilbert, 2000). En general, las variaciones del esquema básico entre las diferentes especies de vertebrados se encuentran en el largo, número, forma y organización de los huesos de la extremidad y se define como el patrón del esqueleto (Wolpert, 2002). Estas variaciones del patrón esquelético resultan en las diferentes funciones de la extremidad.

Los mecanismos por los cuales se establece el patrón del esqueleto aún no están bien establecidos, pero se han realizado muchos estudios acerca del desarrollo de la extremidad en embriones de pollo y ratón.

Durante la morfogénesis de la extremidad, el esqueleto se forma a partir de la condensación de células mesenquimales (indiferenciadas). Al momento que esta agregación celular crece, las células se diferencian a cartílago y en última instancia son reemplazadas por hueso (ver adelante). Cuando una condensación cartilaginosa alcanza cierto tamaño, se ramifica y articula para dar origen a los diferentes elementos esqueléticos de la extremidad. De esta forma, la regulación de la diferenciación celular del cartílago y la formación de articulaciones son

fundamentales durante el crecimiento de los huesos largos y la separación de los elementos esqueléticos (figura 2); es decir, estos procesos determinan la forma y el tamaño de cada elemento esquelético durante la morfogénesis de la extremidad embrionaria (Mariani y Martín, 2003).

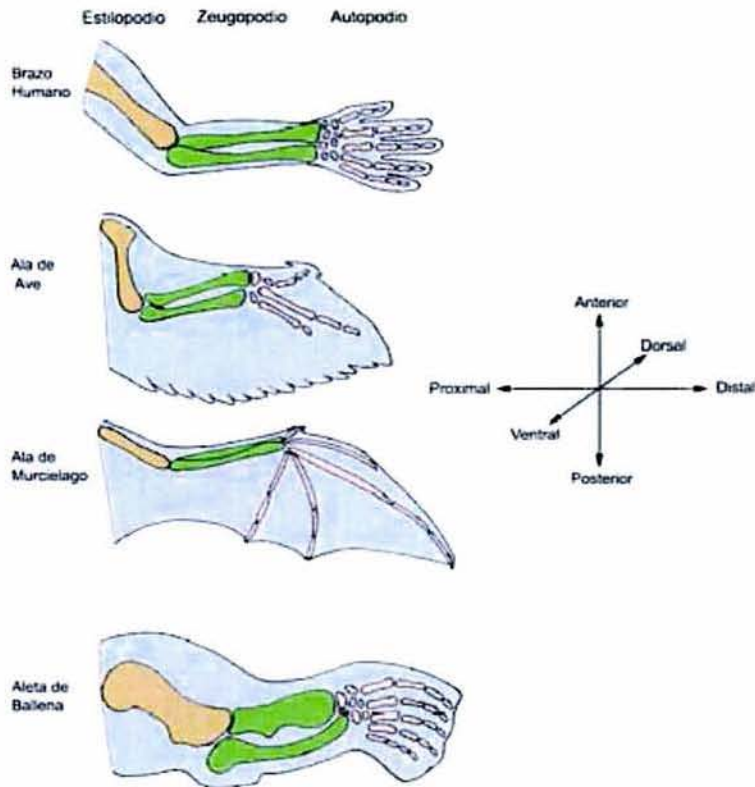


Figura 1. Patrón esquelético de la extremidad en los vertebrados: homología de estructuras de las extremidades anteriores del humano, ave, murciélago y ballena. Todas las extremidades derivan de un antecesor tetrápodo común. Aunque las adaptaciones de las extremidades al trabajo, vuelo y nado evolucionaron independientemente, todas ellas presentan un patrón esquelético básico, conformado por un estilopodio, zeugopodio y autopodio, ubicados similarmente en los ejes antero-posterior, proximal-distal y dorso-ventral de los vertebrados.

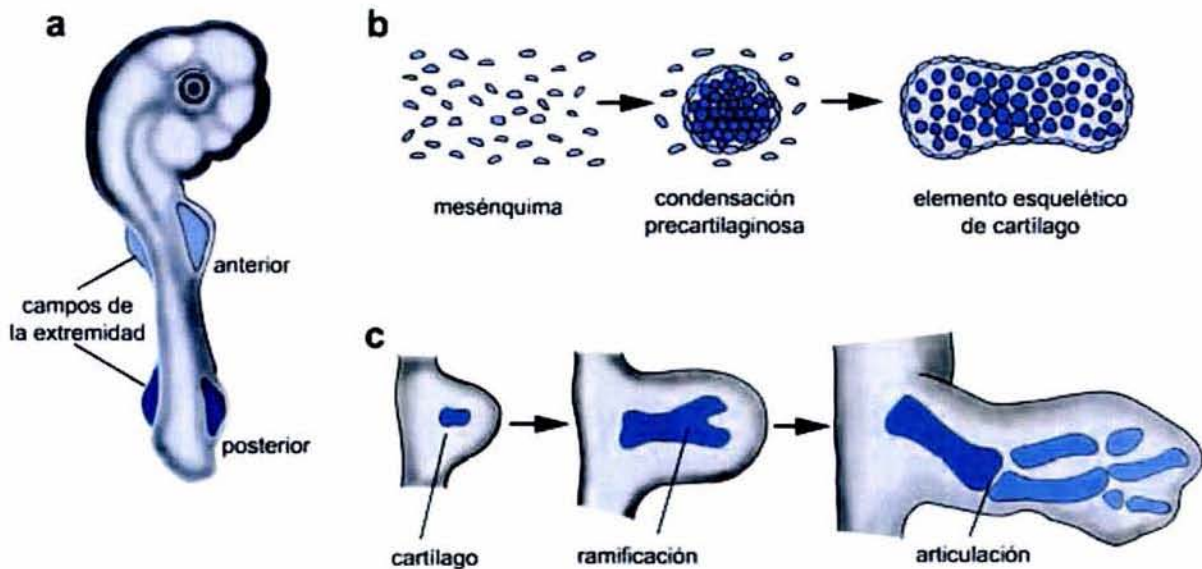


Figura 2. Formación del Esqueleto Apendicular. a.- Las extremidades se desarrollan en puntos muy específicos del eje antero-posterior del cuerpo, a estos sitios se les conoce como campos de la extremidad. b.- La formación del esqueleto inicia con la condensación de células mesenquimales que se diferencian a cartilago dando origen a los moldes del esqueleto cartilaginoso. c.- El cartilago crece y se ramifica. Durante este proceso, se forman las articulaciones que segmentan al molde inicial de cartilago que dará origen a los diversos elementos esqueléticos de la extremidad.

Establecimiento y crecimiento del primordio de la extremidad

Las extremidades se desarrollan en puntos muy específicos del eje antero-posterior del cuerpo, a estos sitios se les conoce como campos de la extremidad. Ahora se sabe que la posición de las extremidades depende del nivel de expresión de los genes *Hox* a lo largo del eje antero-posterior y su posición varía respecto al nivel de las somitas en los diferentes grupos de tetrápodos (Burke et al, 1995).

El desarrollo de la extremidad inicia con la proliferación y migración de células mesenquimales indiferenciadas provenientes del mesodermo de la placa lateral (precursoras del esqueleto) y de las somitas (precursoras de músculo) hacia el campo de la extremidad. Las células mesenquimales del mesodermo

intermedio de la placa lateral producen el Factor de Crecimiento de Fibroblastos 8 (FGF-8), este factor induce la expresión del gen *Wnt-2b* en el área de la futura extremidad anterior y de *Wnt-8c* en el área de la futura extremidad posterior (Kawakami et al, 2001). La expresión de los genes *Wnt-2b* y *Wnt-8c* posiblemente restringen la expresión del Factor de Crecimiento de Fibroblastos-10 (*Fgf-10*) en los campos de la extremidad anterior y posterior respectivamente. Las células que se acumulan bajo el tejido epidérmico crean un brote circular llamado primordio de la extremidad, estas células mesenquimales secretan el FGF-10, el cual es capaz de inducir la formación de la extremidad (Sekine et al, 1999). El FGF-10 induce la expresión de *Fgf-8* en el ectodermo del primordio de la extremidad, el cual se engrosa y forma una estructura llamada Cresta del Ectodermo Apical (AER), esta cresta corre a lo largo del margen distal del primordio y es el principal centro de señalización de la extremidad en desarrollo (Saunders, 1948).

La AER mantiene a las células mesenquimales en un estado de proliferación y el primordio de la extremidad crece. A esta región de células en proliferación se le conoce como "Zona de Progreso" (PZ). El factor que activa la división celular de la zona de progreso es el FGF-8 que se produce en la AER (Crossley et al, 1996; Vogel et al, 1996). La interacción de señales entre el mesodermo y el ectodermo son fundamentales para el establecimiento del eje próximo-distal de la extremidad (estilopodio-zeugopodio-autopodio) (Figura 3).

El eje antero-posterior se distingue por la posición de los dedos, por ejemplo, el dedo pulgar está en la parte anterior y el dedo meñique en la parte posterior. El establecimiento de este eje está dirigido por Sonic Hedgehog (SHH); este factor de crecimiento es producido por un pequeño grupo de células mesenquimales ubicadas en la región posterior del primordio de la extremidad llamada Zona de Actividad Polarizante (ZPA) (Riddle et al, 1993), y se ha propuesto que la señalización de SHH podría determinar la identidad de los dígitos (Litingtung et al, 2002; Harfe et al, 2004).

Por último, existen genes que se expresan en la extremidad y que dictan su posición dorsal o ventral. *Wnt-7a* es uno de los primeros genes que se expresan en el ectodermo de la región dorsal de la extremidad (Delay, 1993; Parr et al, 1993). *Wnt-7a* induce la expresión de *Lmx1* en el mesodermo subyacente y este factor de transcripción induce la dorsalización de la extremidad, la inactivación de *Lmx1* produce una extremidad sin dorso, es decir, con palmas en ambos lados de la extremidad (Parr y McMahon, 1995). Por otro lado, la expresión del gen *Engrailed-1 (En-1)* en el ectodermo ventral del primordio, especifica el destino celular de la región ventral; ya que en los ratones *En-1^{-/-}* presentan el fenotipo de la extremidad con dos dorsos (Loomis et al, 1996).

Una vez establecido el primordio, la extremidad aumenta su tamaño rápidamente. Mediante el mapeo del destino de las células progenitoras del primordio de la extremidad, se ha mostrado que la expansión de estas células hacia los compartimentos proximal, medio y distal se completa a diferentes tiempos, en una secuencia de proximal a distal (Dudley et al, 2002). En primer lugar se forma el cartílago del estilopodio, posteriormente el del zeugopodio y por último los elementos esqueléticos del autopodio. Se ha propuesto que este patrón de formación de la extremidad, se establece debido a que las células adquieren una "información posicional" en relación a cierta frontera o área de referencia. El modelo de la "Zona de Progreso" (PZ) propuesto por Wolpert y colaboradores (Summerbell et al, 1973), postula que las células adquieren progresivamente una información posicional, en una secuencia de proximal a distal en función del tiempo que permanecen en la PZ, la cual abarca unos 300 μm de distancia a partir de la parte más distal del primordio de la extremidad. Entre más tiempo permanezca una célula en la PZ adquiere un valor posicional más distal. Aunque las células de la PZ se dividen el tamaño de la PZ es constante, de tal forma que las células constantemente salen de la PZ al momento que se especifican. Las células que salen inicialmente de la PZ son especificadas para formar estructuras proximales de la extremidad, mientras las que salen al final formaran estructuras más distales.

En contraste, se ha propuesto que la especificación de las estructuras proximales, medias y distales de la extremidad no ocurre progresivamente; proponen que ocurre muy temprano, quizás antes que inicie el crecimiento del primordio de la extremidad (Dudley et al, 2002). De acuerdo a este modelo de "Especificación Temprana", las poblaciones especificadas subsecuentemente se expanden al momento que el primordio de la extremidad crece, y se determinan y forman los elementos esqueléticos en una secuencia próximo-distal. Esto implica que habría un esqueleto en miniatura preespecificado en el primordio de la extremidad el cual posteriormente crece.

Los modelos de la PZ y de "Especificación temprana" son motivo de debate para aceptar a un modelo u otro (o ninguno) como correcto. De cualquier forma, aún se conoce poco cómo se regula el patrón de formación de la extremidad, pero es el reflejo de los tiempos de condensación de las células que darán origen al cartilago.

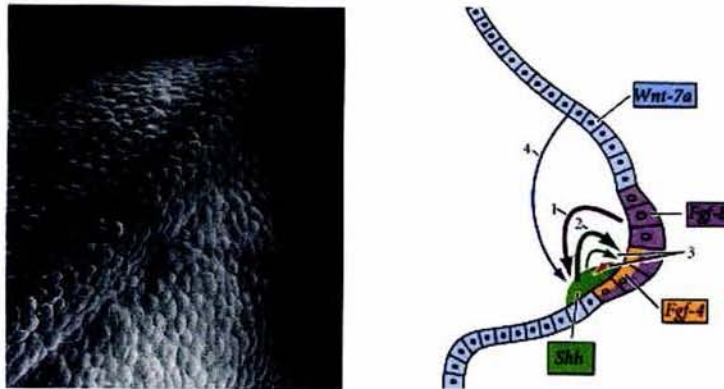


Figura 3. Interacciones moleculares entre los centros de señalamiento durante la formación de la extremidad. Izquierda: Micrografía que muestra el primordio de la extremidad y la Cresta del Ectodermo Apical, AER. (Tomada de Gilbert, 2000). Derecha: 1) El FGF8 producido en AER induce proliferación de las células del mesénquima de la Zona de Progreso e induce la expresión de Sonic hedgehog (Shh) en la región posterior del primordio, la cual representa a Zona de Actividad Polarizante (ZPA). 2) A su vez, Shh induce a FGF4 en la porción posterior del ectodermo. 3) Mantenimiento mutuo de FGF4 y Shh. 4) Mantenimiento de Shh por Wnt-7a que se expresa en el Ectodermo Dorsal. Las flechas gruesas indican inducción y las delgadas mantenimiento de la expresión (Según Paerse y Tabin, 1998).

La formación del esqueleto apendicular

Una característica del tejido esquelético es la gran variedad de formas de cada uno de sus elementos. Aunque aún se desconoce cuáles determinantes genéticos controlan estos patrones de desarrollo, se tiene un panorama general de la Biología del esqueleto (Karsenty, 2002). El esqueleto se compone de dos tipos de tejidos, el cartílago y el hueso, donde los condrocitos y los osteoblastos son el tipo celular respectivo de cada tejido y ambos provienen de células mesenquimales. Inicialmente el esqueleto se compone de cartílago que se forma a partir de condensaciones celulares. Posteriormente, el cartílago es reemplazado por hueso mediante un proceso conocido como osificación endocondral.

Condensaciones precartilaginosas

La formación de las condensaciones precondrogénicas que prefiguran los elementos esqueléticos es un paso crítico durante el establecimiento del patrón del esqueleto. Estas condensaciones se distinguen morfológicamente por regiones de alta densidad celular. Las interacciones célula-célula son cruciales al inicio de la condensación y establecen un “centro de agregación”, el cual es capaz de reclutar células del tejido circundante (Hall y Miyake, 2000).

Previo a la formación de condensaciones, algunas células del mesénquima del primordio de la extremidad son comprometidas a convertirse en células del cartílago. Este compromiso está determinado por la expresión de Sox-9, un gen que codifica para un factor de transcripción que se expresa en las etapas más tempranas de diferenciación del cartílago (Lefebvre y Crombrughe, 1997; Bi et al, 1999). Así, las células comprometidas se condensan en nódulos compactos, donde la N-cadherina facilita la iniciación de estas condensaciones y la N-CAM es necesaria para su mantenimiento, entonces las células inician el proceso de diferenciación a condrocitos. Al inicio de la condensación, las células mesenquimales producen una Matriz Extracelular (MEC) rica en Colágeno tipo I (C1g1), Hialuronato (HA), tenascina y fibronectina (Horton, 1993). Cuando se

consolida la condensación, estas células se diferencian en condrocitos y producen una MEC rica en Colágena tipo II (CII) (Li et al, 1995) cuya expresión es inducida por Sox-9 (Bell et al, 1997). La expresión de Sox-9 y CII, distinguen a los condrocitos de las células mesenquimales indiferenciadas, las cuales permanecen en la periferia del elemento esquelético, producen una MEC rica en CI y forman una estructura llamada pericondrio (Horton, 1993).

Los condrocitos del centro de la condensación prosiguen su diferenciación hacia condrocitos maduros (prehipertróficos), al momento que crece la condensación celular; por último, estas células terminan su maduración hacia condrocitos hipertróficos antes de morir por apoptosis y ser reemplazados por células óseas. De esta forma se reemplaza en tejido cartilaginoso por hueso, a este proceso se le conoce como Osificación endocondral..

Osificación endocondral

Una vez formados los nódulos precartilaginosos, los condrocitos proliferan rápidamente y la condensación se alarga. Con ello se establecen los moldes cartilaginosos de los elementos esqueléticos. Cuando las condensaciones alcanzan cierto tamaño, los condrocitos del centro de la condensación disminuyen la proliferación y secretan una MEC específica del cartílago maduro. Esta matriz se compone principalmente de Colágena II, IX y XI, así como de Proteoglicanos ricos en sulfato de condroitina, Agrecano y la Proteína de unión. En esta fase de diferenciación, las células tienen una forma ovalada característica de los condrocitos prehipertróficos (Horton, 1993).

La hipertrofia es la siguiente fase de diferenciación los condrocitos; durante la hipertrofia los condrocitos dejan de dividirse y aumentan drásticamente su volumen. También recambian la MEC rica en Colágena tipo II por Colágena tipo X, un marcador molecular específico para los condrocitos hipertróficos (Linsenmayer et al, 1991). En el momento que se diferencian los condrocitos hipertróficos, las células del pericondrio adyacentes al cartílago hipertrófico inician su diferenciación a osteoblastos. Estas células expresan el factor de transcripción Cbfa-1 que

promueve la diferenciación de las células mesenquimales a osteoblastos (Stricker et al, 2002) y se forma una estructura mineralizada llamada collar óseo.

Una vez que los condrocitos se han diferenciado, los condrocitos hipertróficos se rodean de una MEC calcificada. Simultáneamente, el molde de cartílago es invadido por vasos sanguíneos a través del collar óseo, lo cual permite la llegada de condroclastos que degradan MEC que rodea a los condrocitos hipertróficos (Vu et al, 1998) y de células precursoras de osteoblastos que derivan del collar óseo (periostio), estas células reemplazan a los condrocitos hipertróficos que mueren por apoptosis. Aunque la mayor parte de las células óseas provienen del periostio, también se ha propuesto que algunos condrocitos hipertróficos cercanos al pericondrio/periostio se transdiferencian en osteoblastos (Bianco, 1998). Los osteoblastos comienzan a producir una matriz ósea rica en Clg I, Osteonectina y Osteopontina. De esta forma el cartílago es reemplazado paulatinamente por tejido óseo.

En los huesos largos la osificación endocondral se extiende desde el centro hacia ambos extremos del hueso, que es como se lleva a cabo la diferenciación del cartílago (figura 4). Si todo el cartílago se convirtiera en hueso antes del nacimiento, no se podría crecer más, y los huesos serían solo del tamaño del molde de cartílago inicial. Esto no ocurre gracias a que a medida que la osificación se aproxima a los extremos del molde de cartílago, los condrocitos cercanos al frente de osificación proliferan antes de alcanzar la hipertrofia, alejando las terminaciones cartilaginosas del hueso. Estas áreas cartilaginosas en los extremos de los huesos largos son las placas de crecimiento epifisiales.

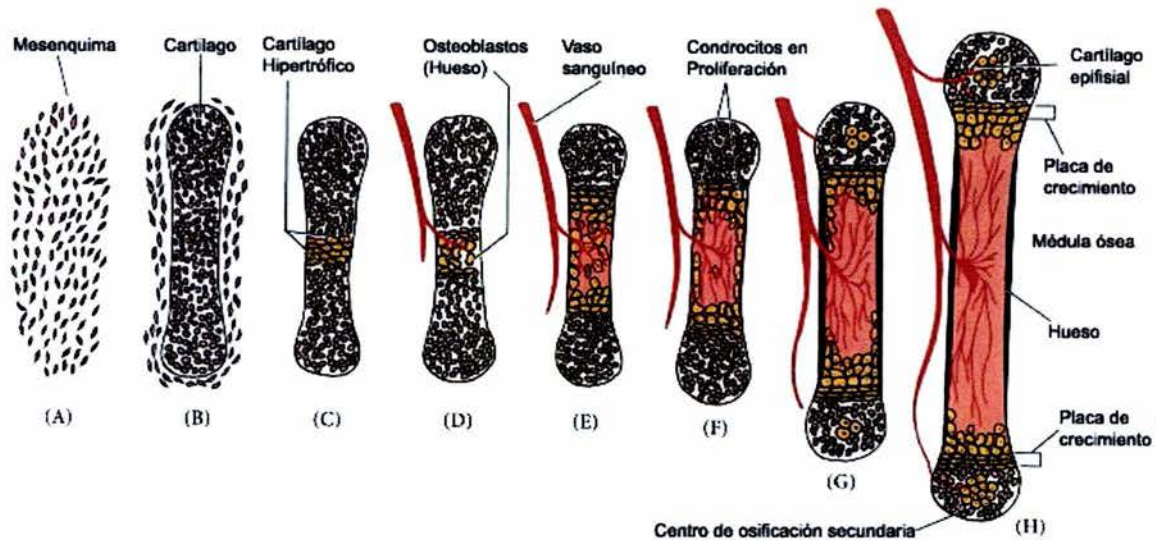


Figura 4. La osificación endocondral. Al inicio de la formación de cada elemento esquelético, las células mesenquimales se condensan y se diferencian en condrocitos, conformando un molde cartilaginoso (A, B). En el centro de este molde los condrocitos maduran (C), se hipertrofian y mueren por apoptosis mientras recambian y mineralizan su MEC (D). Su muerte permite la entrada de vasos sanguíneos y osteoblastos que se unen a la matriz cartilaginosa degradada y depositan su propia matriz de hueso (D, E). La formación y crecimiento del hueso depende del arreglo ordenado de los condrocitos en proliferación, hipertrofos y de la mineralización (F-H) (Tomada de Gilbert, 2000).

Así, durante las etapas iniciales del desarrollo del esqueleto de los vertebrados, el cartilago conforma temporalmente la mayor parte de este. La osificación endocondral ocurre en la mayor parte del esqueleto con algunas excepciones como el cráneo y varios huesos del rostro. En estos casos, el hueso se forma directamente del mesénquima sin pasar por la etapa transitoria de cartilago. El factor de transcripción *Cbfa1* induce a las células del mesénquima a diferenciarse directamente a osteoblastos, y también a que los condrocitos prosigan a su etapa final de diferenciación antes de formar hueso. La diferenciación de las células a osteoblastos depende fuertemente de la expresión de *Cbfa1*; este factor de transcripción activa la expresión de genes específicos de los osteoblastos, mientras que las células que no lo expresan mantienen su fenotipo cartilaginoso (Komori *et al*, 1997; Inada *et al*, 1999; Ueta *et al*, 2001). Incluso, desde un punto de vista evolutivo, la aparición del cartilago precedió a la

aparición del hueso; por ejemplo, los peces más primitivos sólo tienen esqueleto cartilaginoso. Esto puede indicarnos que *Cbfa1* y por lo tanto la aparición de un esqueleto de hueso fueron un evento evolutivo que probablemente favoreció que los animales pudieran desplazarse sobre la tierra con un esqueleto rígido, elástico y a la vez resistente, compuesto de cartílago y hueso.

Aunque eventualmente la mayor parte del esqueleto de cartílago es reemplazado por hueso, el cartílago se mantiene en las placas de crecimiento epifisiales y en las articulaciones (figura 5). La proliferación y diferenciación de los condrocitos de la placa de crecimiento, tiene un papel importante durante el crecimiento de los huesos largos del esqueleto; la actividad de la placa de crecimiento también permite el reemplazo del cartílago por hueso. Cuando un individuo alcanza la edad adulta, algunos factores endócrinos como la hormona del crecimiento dejan de producirse, y con ello termina el crecimiento de los huesos.

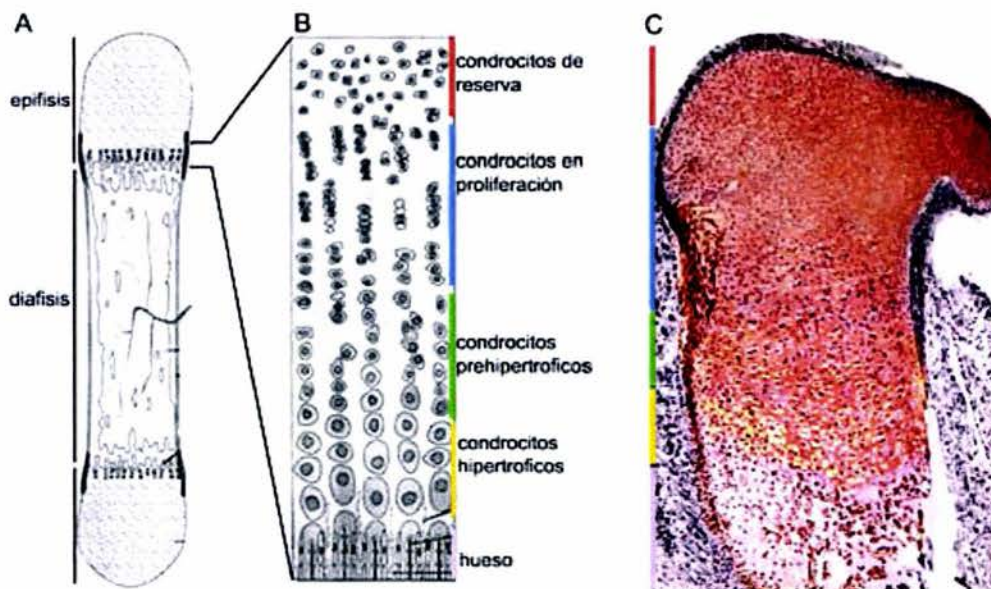


Figura 5. La placa de crecimiento del cartílago. Los huesos (A) crecen debido a la actividad de la placa de crecimiento. En la epifisis (A) se localiza la placa de crecimiento donde se encuentran las zonas de diferenciación de los condrocitos (B). Histología de la placa de crecimiento, con células en distintas etapas de diferenciación (C).

En contraste, el cartílago de las articulaciones no es reemplazado por hueso y presenta una abundante MEC rica en hialuronato y otros proteoglicanos, que la mantiene altamente hidratada. De esta forma, el cartílago de las articulaciones evita la fricción y compresión de los huesos, lo cual facilita la movilidad del esqueleto para un desplazamiento ligero. Existen casos patológicos en donde el cartílago articular prosigue su diferenciación hacia la hipertrofia, lo que resulta en la osificación de las articulaciones, restringiendo el movimiento y causando mucho dolor debido a la falta de amortiguación durante el movimiento. Por lo tanto, en el cartílago articular es de gran importancia que los condrocitos no prosigan su diferenciación hacia la hipertrofia. Aún no se conoce bien que mantiene a los condrocitos articulares sin proseguir su diferenciación, pero el conocimiento sobre la formación de las articulaciones nos podría llevar a dilucidar esta incógnita.

El desarrollo de las articulaciones

Las articulaciones son muy importantes para darle funcionalidad al esqueleto, en buena parte de ellas depende que la extremidad desarrolle sus diversas funciones. La diferenciación celular es un proceso importante durante la morfogénesis del esqueleto y la extremidad (Ducy y Karsenty, 1998). Particularmente, durante la formación de la articulación del esqueleto existe un punto de control a partir del cual las células continúan proliferando para aumentar el tamaño de un elemento esquelético o bien, detienen su proliferación y comienzan la formación de una articulación para segmentar este elemento esquelético.

Esto implica que durante la formación del esqueleto de cartílago, una población celular tiene al menos dos posibles destinos celulares: 1) condrocitos prehipertróficos; 2) condrocitos prearticulares. Este destino está determinado por factores intrínsecos y extrínsecos que se van dando durante el desarrollo del esqueleto (ver adelante).

Durante la formación de la extremidad, los diferentes elementos esqueléticos pueden provenir de múltiples condensaciones precartilagosas, bien localizadas en diferentes sitios a lo largo de la extremidad, como en el caso de los carpos y tarsos de las extremidades (figura 6). En otros casos, la formación inicial de una condensación focal crece, se alarga y en un extremo se ramifica en dos o más puntos para dar origen a los diferentes elementos esqueléticos. Por ejemplo, en la frontera entre el estilopodio y el zeugopodio existe una transición de uno a dos elementos esqueléticos (figura 2c). De cualquier manera, la formación de las articulaciones se tiene que llevar a cabo entre dos condensaciones adyacentes o dentro de una condensación sencilla, como es el caso del autopodio donde los radios digitales se dividen para dar lugar a las falanges de los dedos (figura 6). Con ello, el posicionamiento de las articulaciones dentro de una condensación incide en el tamaño y el número de los elementos esqueléticos.

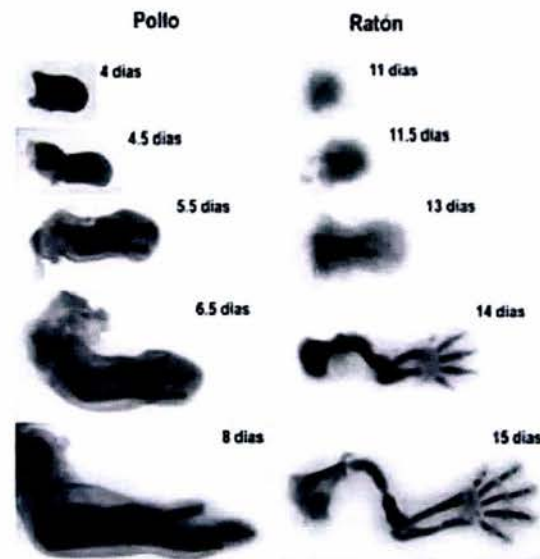


Figura 6. Durante la formación del esqueleto apendicular, las condensaciones de cartilago crecen y se alargan; cuando alcanzan cierto tamaño, se ramifican y articulan para formar los diferentes elementos esqueléticos. En este esquema se muestran estos procesos durante la formación del ala de pollo y la pata de ratón (Wolpert, 2002).

Para el caso de algunas articulaciones (como las de los falanges), con estudios morfológicos se ha mostrado que estas articulaciones provienen de la segmentación de una “barra” continua de cartilago (figura 7a). En los sitios donde se formarán las articulaciones, los condrocitos se vuelven mas aplanados y pierden sus características condrogénicas (figura 7b). A esta región no-condrogénica dentro del molde cartilaginoso se le llama interzona, y su estructura varia entre las diferentes especies (Francis-West et al, 1999; Archer et al, 2003). En la articulación en formación ocurre un proceso de cavitación dentro de la interzona (figura 7c), de esta forma se separan los dos elementos esqueléticos con la formación de un compartimiento de tejido articular muy importante, la cavidad sinovial (figura 7d).

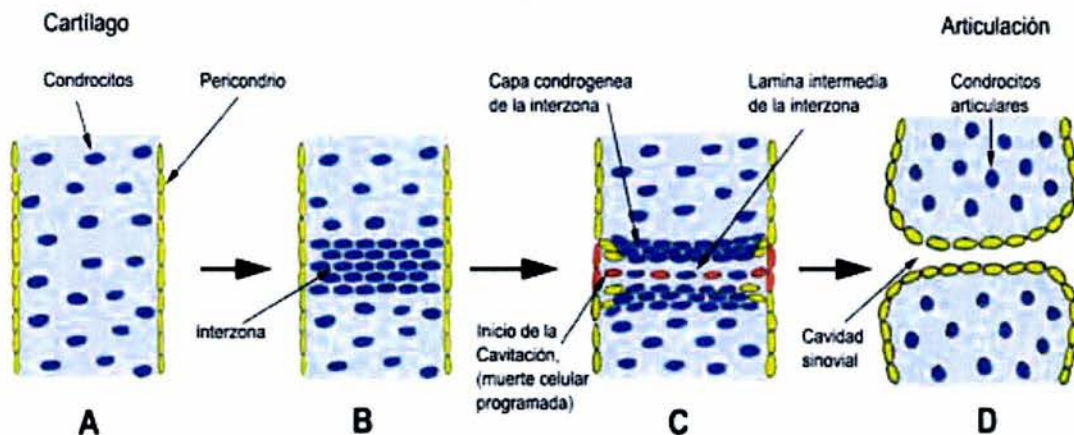


Figura 7. Desarrollo de la articulación sinovial. A partir de un elemento esquelético cartilaginoso precursor (A), se forma la interzona que se identifica por unas capas de células aplanadas y densamente empaquetadas dentro del cartilago (B). Tres capas celulares de la interzona formarán la articulación, una lámina intermedia flanqueada por dos capas condrogénicas que producirán el cartilago hialino articular. La lámina intermedia separará los elementos esqueléticos y desde las orillas comienza la cavitación (por apoptosis) (C). La cavitación se completa separando los elementos esqueléticos y se forma la cavidad sinovial (D).

Formación de la Interzona

La interzona se delimita por un región de alta densidad celular, que pierde las características de las células condrogénicas. Estas células se aplanan y ya no producen los componentes de la MEC típicos de cartílago, como colágena tipo II y agregano y en su lugar expresan colágena tipo I y III (Craig et al, 1987) (figura 7b). En la interzona se forman dos áreas de alta densidad celular, las cuales formarán los cartílagos articulares, y entre estas dos zonas hay una región de baja densidad celular (lámina central) dónde las células mueren por apoptosis dejando una cavidad que será ocupada por el líquido sinovial (Kabanagh et al, 2002) (figura 7c). Las células precondrogénicas que rodean la interzona forman la cápsula articular y los puntos de unión del tendón al músculo adyacente (Francis-West et al, 1999; Archer et al, 2003; Kingsley, 2001).

A inicios del siglo pasado se propuso que los elementos esqueléticos adyacentes son necesarios para la formación de la articulación. La propuesta consistía en el crecimiento diferencial de los elementos esqueléticos adyacentes debido a la proliferación y al incremento de la secreción de MEC resulta en el aplanamiento (tal vez por presión) de las células de la interzona de la articulación (Fell y Canti, 1934). Sin embargo, otros estudios no apoyan esta hipótesis, y proponen que las articulaciones se forman de una población celular preespecificada. De tal forma que cuando se remueve la región donde se forma la interzona, por ejemplo el área de la futura articulación del codo, el radio y la ulna se fusionan con el húmero (Holder, 1977); así, la interzona corresponde a una población de células especificadas para formar articulaciones. Sin embargo, Holder no solo removió la presunta articulación sino también el tejido que la rodea, y es posible que la especificación de la articulación no solo sea intrínseca de los condrocitos mismos, y que sea determinada también por el tejido que los rodea. Esto hace suponer que la interzona y el tejido circundante son centros de señalización durante la formación de articulaciones.

Las diferencias morfológicas entre las articulaciones en formación y los elementos esqueléticos adyacentes es el resultado de una expresión genética

diferente de los tejidos. Por ejemplo, algunos factores de crecimiento se producen en la interzona, y son fundamentales para la formación de las articulaciones, como son las Proteínas morfogenéticas de hueso 2 (BMP-2) y 4 (BMP-4), y el Factor de crecimiento y diferenciación 5 (GDF-5), todos ellos miembros de la familia de las BMP (Duprez et al, 1996), que a su vez pertenecen a la superfamilia de los TGF- β . Además, en la interzona se expresan otras moléculas como CD44, Autotaxina, Cordina y Nogina (Edwards et al, 1994; Bächner et al, 1999), estas dos últimas moléculas antagonizan la acción de las BMP. Sin embargo, ninguna de estas moléculas parece ser la señal preespecificadora de la interzona; puesto que todas estas moléculas forman parte de la cascada molecular que sigue a la inducción de la articulación, o ayudan a su mantenimiento, ninguna es capaz de inducir una articulación.

Ahora se conoce que una de las primeras moléculas que se expresan en las regiones de las articulaciones en formación del pollo, pertenece a la familia de los genes *Wnt*. *Wnt-14* se expresa en la interzona y la sobreexpresión de este gen induce los cambios morfológicos y moleculares característicos de los primeros pasos de la formación de articulaciones (Hartmann y Tabin, 2001). Este hecho indica que *Wnt-14* juega un papel crucial en la iniciación del desarrollo de las articulaciones sinoviales y esta molécula puede ser un marcador que distinguiría a esta hipotética población de células preespecificadas. *Wnt-14* también se expresa en las articulaciones maduras (en la cápsula y membrana sinovial), lo cual podría indicar que la señalización de esta molécula también juega un papel importante en el mantenimiento de las articulaciones sinoviales, y es un buen candidato de estudio para corregir enfermedades de las articulaciones.

La sobreexpresión de *Wnt-14* inhibe la diferenciación de cartílago (Hartmann y Tabin, 2001), hecho que es necesario para que se pueda inducir una articulación. La sobreexpresión de *Wnt-14* en el cartílago, activa una cascada de señales que inducen la expresión de una serie de moléculas como GDF-5, Autotaxina, CD44 y Cordina; las cuales continúan con el proceso de formación de la articulación.

Existen otros miembros de la familia Wnt que se expresan en las articulaciones en desarrollo. El gen *Wnt-4* se expresa en los flancos de la articulación en formación y actúa en los cartílagos adyacentes para promover su maduración (Hartmann y Tabin, 2000); aunque no se conoce cual es su papel en el desarrollo de las articulaciones se piensa que su papel puede ser distinto (Church et al, 2002). También *Wnt-16* se expresa en las articulaciones en desarrollo aunque todavía no está bien definido su papel en estos procesos (Guo et al, 2004).

A su vez, la β -catenina se requiere al inicio de la vía de señalización canónica de los Wnt, y la sobreexpresión de esta molécula también induce articulaciones ectópicas. Además, la inactivación del gen de β -catenina en las etapas tempranas de diferenciación de los condrocitos produce la fusión de elementos esqueléticos al inhibir las articulaciones; así entonces, la vía canónica de los Wnt es suficiente y necesaria para la formación de articulaciones sinoviales (Guo et al, 2004).

Por otra parte, varios miembros de las BMP se han relacionado como parte importante durante la formación de articulaciones. Uno de ellos, el GDF-5 tiene una mutación nula en el ratón con braquipodismo (*bp*), el cual presenta las falanges fusionadas debido a que no se forman las articulaciones (Storm et al, 1994). Además, las mutaciones nulas en el gen *CDMP1* (homólogo de *GDF-5* del ratón), provoca anomalías del esqueleto y defectos en el desarrollo de las articulaciones sinoviales del humano (Thomas et al, 1996). Contrario a lo esperado, la aplicación de GDF-5 en el cartílago o en una articulación en formación (tanto en pollo como en ratón), no induce o acelera la formación de articulaciones sino que fusiona los elementos esqueléticos de cartílago. Es decir, GDF-5 promueve la condrogénesis pero no induce la formación de articulaciones (Merino et al, 1999; Storm y Kingsley, 1999). Entonces, el papel del GDF-5 durante el desarrollo de las articulaciones podría consistir en la inducción de la proliferación de los condrocitos y la diferenciación del cartílago articular, con lo cual regula el espaciamiento entre las regiones donde se formarán las

articulaciones (figura 8), es decir, previene que se forme una articulación muy cercana a otra. Con ello, el papel de GDF-5 es importante en el establecimiento del tamaño de los elementos esqueléticos (Francis-West et al, 1999; Spitz y Duboule, 2001). Ésto puede depender del nivel de expresión de GDF-5 o de sus antagonistas; este es el caso de *Nogina*, puesto que se expresa en el cartílago en formación, incluyendo la región de la presunta articulación. Los ratones con mutaciones nulas para el gen de *Nogina* presentan pérdida de articulaciones (Brunet et al, 1998), esto nos sugiere que *Nogina* tiene un papel importante en la regulación del GDF-5, inhibiendo la proliferación y diferenciación del cartílago durante la formación de las articulaciones.

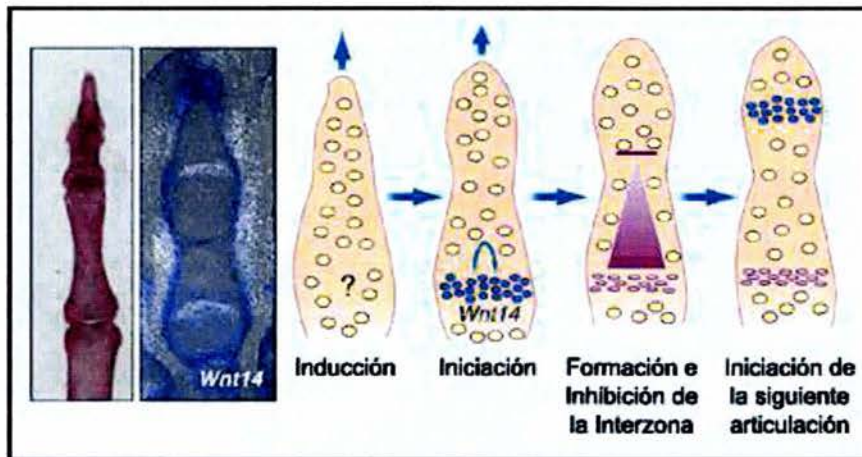


Figura 8. Espaciamiento de las articulaciones. Una señal inductora desconocida determina la posición de la primer interzona, entonces las células precondrogénicas de esa región expresan *Wnt-14* (azul). Esta proteína activa la expresión de genes que codifican para los factores difundibles (púrpura) que bloquean la formación de otra interzona, la siguiente interzona se formara lo suficientemente lejos de los factores inhibidores (Según Spitz y Duboule, 2001).

Durante el establecimiento de la interzona, las células condrogénicas detienen su diferenciación y modifican su destino celular. De esta manera, algunas moléculas que promueven la diferenciación del cartílago también controlan el posicionamiento y la inducción de las articulaciones. Tanto Indian hedgehog (*Ihh*) como los Factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) tienen un papel

importante en estos procesos. Por ejemplo, el síndrome de Apert resulta de una mutación activadora del Receptor-2 de los FGF (*Ffgr2*); en este síndrome, no se desarrollan adecuadamente las articulaciones de los falanges, y en muchos casos se fusionan (Holten et al, 1997). Por otra parte, los ratones transgénicos que sobreexpresan una forma constitutiva activa del FGFR3 bajo el promotor de Colágena II, presentan fusión de las falanges e inhibición de las articulaciones (Wang et al, 2001). Esto es resultado de la expansión de la condricación, debido a que la señalización a través del FGFR3 inhibe la proliferación y promueve la diferenciación de los condrocitos (figura 9). En estos casos, el balance entre las señales anticondrogénicas (Wnt-14) y procondrogénicas (FGFR) se desbalancea, llevando a las células a la diferenciación de los condrocitos y la inhibición de articulaciones. Otros estudios muestran que la actividad de FGFR3 inhibe la expresión de *Bmp-4* en el pericondrio, ésto abre la posibilidad de que estos procesos sean controlados por un balance entre las señales de FGF y BMP del pericondrio, aludiendo al clásico antagonismo entre estas señales (Neubuser et al, 1997; Weaver et al, 2000).

La formación de la articulación se acompaña por una disminución de la cantidad de matriz extracelular y de su composición, en particular cambios en la expresión de colágena y su organización. Esto posiblemente afecta la adhesión celular y puede resultar en el debilitamiento mecánico de la articulación. Este debilitamiento puede hacer a la interzona más sensible a los efectos de la síntesis de hialuronato y al movimiento, lo cual dispara la cavitación.

La cavitación

La separación total de los elementos esqueléticos y la formación de los elementos adicionales a la articulación sinovial se realizan durante la cavitación. La síntesis de ácido hialurónico (HA) y la expresión de su receptor CD44 en la interzona inician la formación de las superficies articulares (Francis-West et al, 1999; Archer et al, 2003). Este hecho inhibe la agregación celular e inhibe la

cohesión entre las células de la interzona; previo a esto, ocurre muerte celular en la interzona.

El movimiento contribuye de manera determinante en la cavitación. Si una articulación en desarrollo se inmoviliza con bloqueadores neuromusculares, la cavitación no ocurre y se fusionan los cartílagos a pesar de que la interzona ya se había formado (Osborne et al, 2002). Este hecho va acompañado con la disminución de la síntesis de HA y de la expresión de CD44. Así, se tienen fuertes evidencias que el estímulo mecánico (movimiento) y la síntesis de HA están interrelacionados y son necesarios para la formación de las cavidades de las articulaciones sinoviales (Dowthwaite et al,2003).

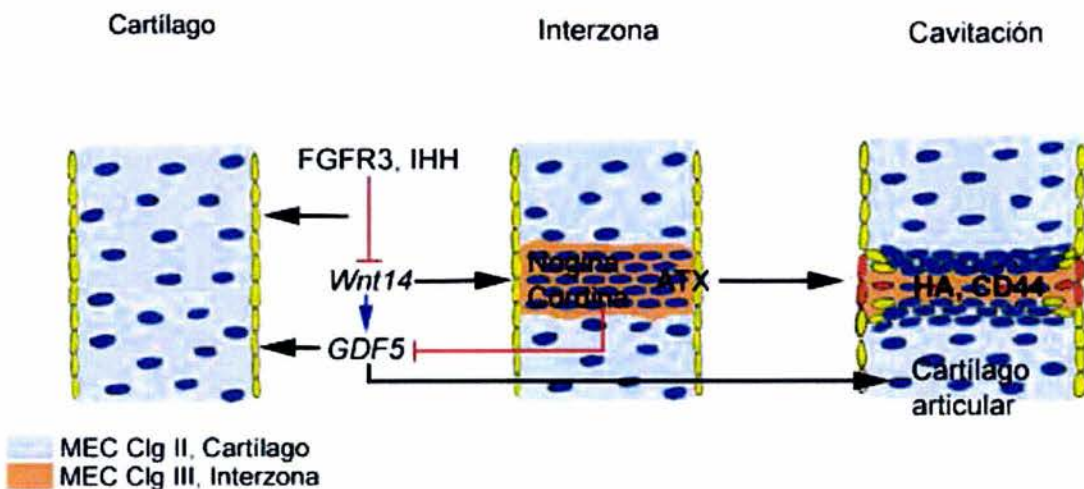


Figura 9. La diferenciación de los condrocitos regula la formación de las articulaciones. La señalización de FGFR3 e IHH promueven la diferenciación de los condrocitos y con ello inhiben la expresión de *Wnt-14* y la formación de la articulación. Cuando se expresa *Wnt14* induce la expresión de *GDF5* en la interzona. La proteína *GDF5* se difunde y promueve la condrogénesis del cartilago articular, pero la acción de *GDF5* se inhibe por sus antagonistas *Nogina* y *Cordina* en la interzona. La expresión de *ATX* en la interzona y el pericondrio podría estar asociada a la migración de células del pericondrio hacia la interzona. Durante la cavitación ocurre muerte celular de algunas células de la interzona y se inicia la formación de la cavidad sinovial con una MEC rica en HA y células que expresan su receptor CD44.

Existen evidencias de que la señalización de algunas moléculas relacionadas con la diferenciación del cartílago puede estar implicada en el desarrollo de las articulaciones. La señalización de FGF y de Indian Hedgehog (IHH), son algunos de los principales reguladores de la diferenciación del cartílago, y tanto la sobreexpresión de FGFs como de IHH/SHH resulta en la inhibición de la formación de articulaciones. Este hecho sugiere que la diferenciación de los condrocitos y la formación de articulaciones son procesos que están mutuamente regulados.

La diferenciación del condrocito

La idea de la prespecificación de las células que darán origen a las articulaciones parte del hecho que estas células son los condrocitos del molde de cartílago. Sin embargo, los condrocitos durante la formación y crecimiento de este molde, pasan por distintos estados de diferenciación. Entonces, ¿en qué momento una población de condrocitos puede formar una interzona y en qué momento no? Por ello, tenemos que revisar como se diferencian los condrocitos dentro de este molde cartilaginoso.

Una vez formada la condensación precartilaginosa, se inicia la maduración de los condrocitos. Como se ha mencionado anteriormente, estas condensaciones están rodeadas de células pequeñas y aplanadas que conforman el pericondrio. Ahora se sabe que el pericondrio es un centro de señalización muy importante durante la diferenciación del cartílago (Vorkamp et al, 1996; Colnot et al, 2004). Los condrocitos dentro de este molde se organizan en columnas y la diferenciación de estas células se realiza desde cada extremo del molde hacia el centro. Dentro de esta organización en columnas (placa de crecimiento) se encuentran varias subpoblaciones de condrocitos en sus distintas etapas de diferenciación: condrocitos en reposo, en proliferación, prehipertróficos e hipertróficos (Horton, 1993).

La diferenciación de los condrocitos de la placa de crecimiento está regulada por varias señales que conforman un complejo circuito (Karsenty y Wagner, 2002; Karsenty, 1998).

Vías de señalización que controlan la diferenciación de los condrocitos

Una vez que el elemento esquelético se ha segmentado, al menos uno de los segmentos resultantes continúa su diferenciación; de manera que los condrocitos en proliferación ahora dan origen a los condrocitos prehipertróficos, los cuales continúan su diferenciación hacia la hipertrofia, con lo cual se impide que este elemento se vuelva a segmentar y así continúe su proceso hacia la formación de hueso.

La señalización de IHH/PTHrP promueve la proliferación y retrasa la hipertrofia.

IHH es el regulador maestro del desarrollo del hueso. Esta molécula coordina la proliferación y diferenciación de los condrocitos. IHH se sintetiza por los condrocitos que abandonan la etapa de proliferación (condrocitos prehipertróficos) y por los condrocitos en la fase temprana de la hipertrofia (Vortkamp et al, 1996; St-Jaques et al, 1999). IHH se une a su receptor Patched-1 (Ptc-1), el cual se expresa en el pericondrio; en ausencia de IHH, Ptc-1 inhibe a la proteína Smoothened (Smo); en presencia de IHH, Smo activa una cascada de señalización que termina cuando Gli-3, un factor de transcripción, activa los genes blanco de la señalización de IHH (Ingham y McMahon, 2001).

Los ratones *Ihh*^{-/-} desarrollan condensaciones cartilagosas normales pero tienen anomalías en el crecimiento de los huesos. Todos los elementos de cartílago son pequeños porque la proliferación de los condrocitos disminuye notablemente y llegan a la hipertrofia prematuramente. Además, los ratones knockout de *Smo* también disminuyen la proliferación de los condrocitos, y cuando se generan las formas constitutivamente activas de *Ihh* o de *Smo* es suficiente para promover la proliferación de los condrocitos (Long et al, 2001). Los ratones

Ihh^{-/-} además no producen la Proteína relacionada a la hormona paratiroide (PTHrP), la cual en condiciones normales es secretada por las células del pericondrio y por los condrocitos de la fase temprana de proliferación (Vortkamp et al, 1996; Lanske et al, 1996).

Por otro lado, el Receptor del PTHrP (PPR) se expresa principalmente en los condrocitos en proliferación y prehipertróficos. El PTHrP actúa principalmente manteniendo a los condrocitos en la fase proliferativa. En los ratones mutantes de *PTHrP*^{-/-} y *PPR*^{-/-}, los condrocitos se vuelven hipertróficos prematuramente (Karaplis et al, 1994); y sin embargo, la adición de hedgehog a los cultivos de extremidades de ratones *PTHrP*^{-/-} y *PPR*^{-/-} no rescata la regulación de la hipertrofia del cartílago (Lanske et al, 1996; Vortkamp et al, 1996). En relación con esto, la acción de la forma constitutivamente activa del *PPR* resulta en el retraso de la aparición de los condrocitos hipertróficos (Schipani et al, 1997). Esto indica claramente que la señalización de PTHrP inhibe la hipertrofia de los condrocitos y demuestra que la señalización por PTHrP es obligatoria para mediar la acción de *Ihh* en el retraso de la hipertrofia de los condrocitos (figura 10).

El doble juego de IHH

Por otro lado, los ratones *Ihh*^{-/-} también presentan alteraciones en el desarrollo de los osteoblastos del hueso endocondral (St-Jacques et al, 1999), lo que hace suponer que IHH podría tener otro papel en el desarrollo del cartílago y hueso de manera independiente de la señalización por PTHrP (Karp et al, 2000). Paradójicamente, otro efecto de IHH es el incremento de la fracción de condrocitos hipertróficos en cultivos de condrocitos (Akiyama et al, 1999) y en nódulos de cartílago (Scout y Chuong, 1997). Estos resultados podrían explicarse de la siguiente forma. Las interacciones de IHH y PTHrP se regulan mutuamente durante el crecimiento de los elementos esqueléticos y en conjunto promueven la proliferación celular y regulan la tasa de diferenciación de condrocitos hipertróficos. El PTHrP se secreta por las células cercanas a los extremos del hueso y actúa sobre su receptor, que se encuentra en los condrocitos en

proliferación y prehipertróficos; los condrocitos prehipertróficos detienen su proliferación y sintetizan IHH. Entonces IHH estimula la producción de PTHrP en las regiones articulares de los huesos. Cuando el elemento esquelético alcanza cierto tamaño, las células que expresan IHH salen de la influencia reguladora del PTHrP, y entonces el señalamiento de IHH promueve la maduración de los condrocitos prehipertróficos a hipertróficos, entonces este tipo celular ya no expresa Ihh (figura 10).

La señalización del FGF reprime la proliferación y promueve la hipertrofia

Mediante estudios de expresión génica y genéticos se ha mostrado que la señalización por FGF regula la proliferación y diferenciación de los condrocitos. Varios de los 22 genes diferentes de FGF y los cuatro receptores de FGF (FGFR) se expresan en cada etapa de la formación del hueso endocondral. En las primeras etapas del desarrollo del esqueleto, el FGFR2 se expresa en las condensaciones mesenquimales y el posible papel de la señalización de FGF en esta etapa inicial es el de estimular la expresión de SOX-9 (Murakamy et al, 2000).

Conforme se forma el cartílago, los condrocitos en proliferación expresan el FGFR3 y los condrocitos prehipertróficos/hipertróficos expresan FGFR1. Las células del pericondrio expresan FGFR2 (Delezoide et al, 1998). Cada uno de estos receptores tiene diferentes papeles en el desarrollo de hueso. El papel de FGFR3 es el mejor conocido. Los ratones “knockout” de *Fgfr3* presentan un aumento en la tasa de proliferación de los condrocitos y la expansión de la columna de condrocitos (Deng et al, 1996). Por el contrario, en la acondrodisplasia de humanos, que es la forma de enanismo más común, se ha encontrado una mutación puntual que activa constitutivamente este receptor, disminuye la tasa de proliferación celular, lleva al acortamiento y desorganización de las columnas de condrocitos y aumenta la cantidad de condrocitos hipertróficos (Wang et al, 1999; Naski et al, 1998; Rousseau et al, 1994; Shiang et al, 1994).

Los FGFs clásicamente están asociados con la actividad mitogénica en una gran variedad de tejidos. Sin embargo, la inhibición de la proliferación celular a

través de FGFR3 parece ser una característica única de los condrocitos de la placa de crecimiento (Wang et al, 2001). En los condrocitos, la señalización de FGFR3 activa la vía JAK-STAT1, que regula negativamente la proliferación celular mediante la acción de p21 (Sahni et al, 1999). El ligando responsable de esta señalización parece ser el FGF18, ya que el ratón “knockout” de *Fgf18* presenta un efecto similar a la inactivación del gen *Fgfr3*; es decir, lleva al incremento de la proliferación de los condrocitos y a la expansión de la columna de condrocitos (Liu et al, 2002; Ohbayashi et al, 2002). El fenotipo del ratón “knockout” de *fgf18* es más severo que el del *fgfr3*, y además la osificación se retrasa considerablemente.

En otros estudios con explantes de hueso de la extremidad de ratón, se demuestra que la señalización de FGFR3, independientemente de los efectos de *Ihh* y PTHrP, acelera la diferenciación terminal de los condrocitos hipertróficos (Naski et al, 1998). En este mismo estudio se sugiere que la señalización de FGF inhibe la expresión de *Bmp-4* y *Patched* con lo que se suprime la señalización de *Ihh*. Así, la señalización de FGFR3 acorta la columna proliferativa inhibiendo directamente la proliferación celular, así como suprimiendo la expresión de *Ihh*. Este último efecto también repercute en la diferenciación de los condrocitos. Posiblemente, cuando un elemento esquelético alcanza cierto tamaño y una población de condrocitos deja de proliferar y sale de la influencia de ciertas señales del pericondrio (vgr. PTHrP, FGF-18) continúa su programa de diferenciación hacia la hipertrofia.

La señal de relevo, Cbfa1 induce la hipertrofia del condrocito

Cbfa1/Runx2, un factor de transcripción de la familia Runt; es capaz de inducir la formación directa de hueso en células mesenquimales y además se requiere para la diferenciación de los condrocitos hacia la hipertrofia, esto indica la importancia de este factor durante la osteogénesis. Los elementos esqueléticos de los ratones deficientes de *Cbfa1* carecen de condrocitos hipertróficos (Inada et al, 1999). *Cbfa1* se expresa en los condrocitos prehipertróficos, hipertróficos y en el pericondrio. La sobreexpresión de este gen en los condrocitos no hipertróficos

induce la diferenciación hacia la hipertrofia, la expresión de *Ihh* y eventualmente la formación de hueso (Ueta et al, 2001). También se sabe que *Ihh* induce la expresión de *Cbfa1* y con ello la hipertrofia, esto nos sugiere que *Cbfa1* no se relaciona con el asa de señalización PTHrP/*Ihh*, pero si es parte de la señalización que desarrolla IHH de manera independiente de PTHrP. Se establece así, una nueva asa de regulación ahora formada por IHH/*Cbfa1*. La presencia de condrocitos hipertróficos en algunos elementos esqueléticos de los ratones deficientes de *Cbfa1*, indica que pueden existir otros factores de transcripción que pueden inducir la hipertrofia.

Diferentes formas Wnt controlan en varios pasos la diferenciación de los condrocitos

Wnt-4 se expresa en la región periarticular, el mediador intracelular de la señalización de varios *Wnt*, la β -catenina, se expresa en el pericondrio y los condrocitos hipertróficos (Kawakami et al, 1999; Hartmann y Tabin, 2000). La sobreexpresión de *Wnt-4* o de la β -catenina constitutivamente activa, acelera la transición de los condrocitos prehipertróficos a hipertróficos, mientras que la sobreexpresión del dominante negativo de *Frizzled-1* (receptor de *Wnt*) tiene el efecto opuesto. Por otro lado, la sobreexpresión de *Wnt-5a*, el cual se expresa normalmente en el pericondrio, retarda la transición a la hipertrofia (Yang et al, 2003; Church et al, 2002). Todas estas manipulaciones genéticas producen acortamiento de los huesos, pero no alteran los niveles normales de expresión de *Pthrp* e *Ihh*, lo que indica que la señalización de *Wnt* es independiente o está por debajo del asa de regulación de PTHrP/IHH.

La sobreexpresión de *Wnt-1* y *Wnt-7a*, al igual que *Wnt-14*, también inhiben la diferenciación de los condrocitos en etapas tempranas del desarrollo del cartílago (Rudnicki y Brown, 1997). De éstos, solo *Wnt-14* induce articulaciones ectópicas (Hartmann y Tabin, 2001), lo que implica que los condrocitos pierden su fenotipo diferenciado; esto indica que los genes *Wnt* pueden redirigir el destino

celular del cartílago. Con esto se propone que varias de las moléculas Wnt controlan el paso entre las diferentes zonas de los condrocitos.

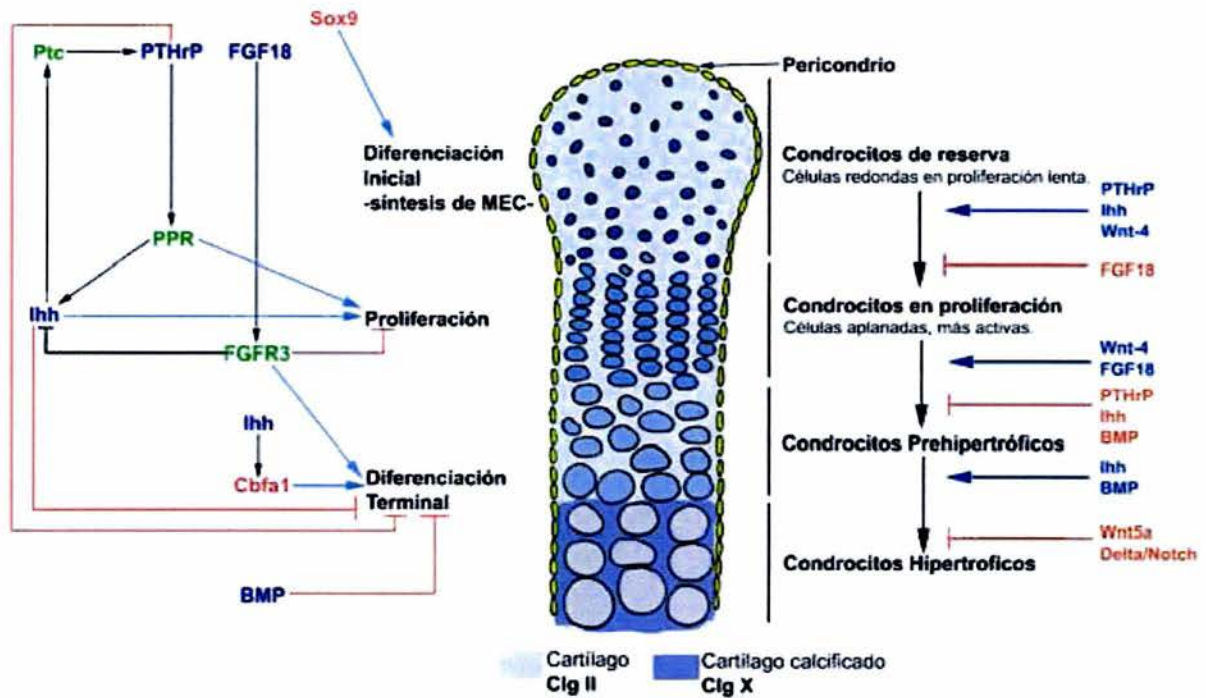


Figura 10. Vías de señalización durante la proliferación y diferenciación celular en la placa de crecimiento del cartílago. En el lado izquierdo se muestran los factores de transcripción en rojo, los factores de crecimiento en azul y los receptores en verde. El circuito de señalización PTHrP/IHH activa la proliferación e inhibe la hipertrofia de los condrocitos. Por el contrario, la señalización de FGFs inhibe la proliferación y promueve la hipertrofia. IHH tiene un segundo papel cuando sale de la influencia de la señal de PTHrP, de tal forma que activa la expresión de Cbfa1 y este a su vez la hipertrofia de los condrocitos.

Del lado derecho se representan los puntos de regulación durante la diferenciación de los condrocitos. Los factores de crecimiento pueden tener efectos diferentes dependiendo del estado de diferenciación de los condrocitos, mientras en algún tipo celular puede activar la diferenciación en otra etapa la inhibe.

Efectos paradójicos de la Señalización de BMPs

Otro grupo de moléculas relevantes en el control de la diferenciación del cartílago son las BMP y GDF. Estos factores de crecimiento son factores parácrinos que activan receptores heterodiméricos con actividad serina/treonina cinasa. Además se caracterizan por su capacidad para inducir la formación de hueso endocondral cuando se inyecta subcutáneamente en ratones (Urist, 1965; Wozney et al, 1988).

La señalización de BMP durante la formación de las condensaciones mesenquimales es fundamental, ya que cuando *Nogina* (un antagonista de BMP) se sobrexprea en la extremidad en formación se suprime la formación de los nódulos cartilaginosos. Por otro lado, en los ratones deficientes de *Nogina* se produce alargamiento de las condensaciones de cartílago y se inhibe la formación de articulaciones (Brunet et al, 1998). Además, los ratones a los que se les inactiva el gen que codifica para *GDF-5* o el *BMPRII* tienen anomalías en la formación de los dígitos por una falla de la extensión de las condensaciones que conducen a la formación de los dígitos (Storm y Kingsley, 1996).

Las BMPs también tienen múltiples papeles importantes durante las etapas tardías del desarrollo del cartílago. Las BMP-2, -3, -4, -5 y -7 se expresan en el pericondrio que flanquea el área de expresión de IHH (Pathi et al, 1999; Zou et al, 1997; Daluiski et al 2001). Las BMP-2 y -6 se expresan en los condrocitos hipertróficos y la BMP-7 en los condrocitos en proliferación (Haaijman et al, 2000). Los GDF-5, -6 y -7 se expresan en las regiones de las articulaciones en formación (Settle Jr. et al, 2003). En muchos casos, la señalización de las BMP incrementa la expresión de IHH en los condrocitos prehipertróficos y de esa forma aumenta tanto la proliferación de los condrocitos y la longitud de la columna de los condrocitos en proliferación y retrasa la hipertrofia. Las BMP modulan la expresión de IHH y la proliferación celular; esta acción contrarresta el efecto de la señalización de los FGF de disminuir la proliferación de los condrocitos y la expresión de IHH (Minina et al, 2001).

Aunque las BMP retrasan la hipertrofia, existen trabajos donde encuentran que la BMP-2 aumenta la proliferación e hipertrofia de los condrocitos (De Luca et al, 2001), y el GDF-5 induce la hipertrofia de los condrocitos que sintetizan una MEC rica en colágena X y fosfatasa alcalina (Coleman y Tuan, 2003). Estos datos paradójicos se pueden explicar en función de que cada tipo celular en cierta etapa de diferenciación responde de manera diferente a las BMP. De tal forma que junto con otros factores de diferenciación, podrían determinar la longitud y la forma de los diferentes elementos esqueléticos. Como antes mencionamos, las BMPs también presentan resultados paradójicos durante la formación de las articulaciones.

Por último, las BMP inducen la expresión de componentes de la MEC y de sus receptores, lo cual posibilita la adhesión celular, que es fundamental para la sobrevivencia, proliferación, migración y diferenciación celular de los condrocitos (Reddi, 1994; Nissien et al, 1997). Cada tipo celular durante la diferenciación del cartílago se rodea de una MEC muy particular. Por ejemplo, en cuanto a Colágenas se refiere, el cartílago maduro presenta Colágena II, el Cartílago hipertrófico Colágena X, el pericondrio Colágena I y las articulaciones Colágena III. Lo anterior sugiere que el entorno celular tiene un papel muy importante durante la diferenciación del cartílago y la formación de las articulaciones. Así, la coordinación de la diferenciación de los condrocitos de la placa de crecimiento junto con el desarrollo de las articulaciones es determinante durante la morfogénesis del esqueleto.

Importancia de la MEC en la diferenciación de los condrocitos y la formación del esqueleto

La MEC tiene una gran importancia por su complejidad estructural y funcional. La MEC no solo provee un soporte para las células y establece la estructura de los tejidos, sino que también proporciona ambientes de unión, activación e inactivación de factores de crecimiento y citocinas reguladoras.

Además, el procesamiento proteolítico de componentes de la MEC, resulta en la producción de fragmentos con efectos biológicos en la migración, proliferación y organización celular. Todas estas funciones de la MEC la ubican como un modulador de la diferenciación celular del condrocito (Blair et al, 2002).

Así, la distribución de la MEC en el cartílago se correlaciona con los distintos estados de diferenciación de los condrocitos (figura 11a). Un ejemplo de ello, es la distribución de los diferentes tipos de Colágena durante la diferenciación del cartílago y la formación de articulaciones. La Colágena tipo I se presenta en etapas más tempranas de diferenciación, como en el mesénquima y en el pericondrio, la Colágena tipo II es secretada por los condrocitos en proliferación y prehipertróficos y la Colágena X es exclusiva de cartílago hipertrófico. Las células de la interzona se rodean de una matriz menos abundante pero que consiste de Colágena tipo I y III.

Cuando algún componente de la MEC del cartílago presenta algún desorden, se generan alteraciones del esqueleto. Las condrodisplasias son alteraciones en el desarrollo y crecimiento del cartílago; estas se producen por diversas mutaciones que afectan genes importantes en el desarrollo del cartílago y en última instancia la formación y crecimiento de los huesos largos.

Diversas mutaciones en el gen de la Colágena II ocasionan alteraciones en la diferenciación de los condrocitos (Vandenberg et al, 1991; Helminen et al, 1993; Barbieri et al, 2003) y generan displasias como la acondrogénesis tipo II, la hipocondrogénesis, la displasia espondiloepifisial congénita y la displasia de Kniest entre otras (Olsen, 1996). Por otro lado, los desórdenes de otros componentes de la matriz tales como las Colágenas IX y XI que interaccionan con la Colágena II para formar estructuras supramoleculares, resultan en fenómenos muy relacionados. La displasia campomélica es una patología asociada a una mutación en el gen SOX9. SOX9 es el inductor de las etapas más tempranas de la condrogénesis en las condensaciones mesenquimales (Akiyama et al, 2002) y es un factor de transcripción que regula directamente los genes de Colágena II y

Agrecano, las principales moléculas de la matriz del cartílago y por tanto de la diferenciación del condrocito (Lefebvre y Crombrughe, 1997).

También se ha encontrado que la osteogénesis imperfecta es debida a defectos moleculares de la Colágena I y la condrodisplasia metafisial del tipo Schmid, a errores en la biosíntesis de la Colágena X (Kwan et al, 1997). Esta última se caracteriza por una reducción de la zona de cartílago de reserva en la placa de crecimiento y el cartílago articular, se altera el contenido de hueso y existe una distribución atípica de los componentes de la matriz de la placa de crecimiento (Chan y Jacenko, 1998).

La matriz del cartílago es rica en proteoglicanos sulfatados. La distorsión del Agrecano, uno de los proteoglicanos del cartílago que une una gran cantidad de Glicosaminoglicanos (GAG) altamente sulfatados, genera una placa de crecimiento completamente desorganizada (figura 11b) y modifica el programa de diferenciación del condrocito (Wai et al, 1998).

El ácido hialurónico es otra molécula presente en el cartílago, que es particularmente es muy abundante en el cartílago articular. Este tipo de matriz está altamente hidratada debido a la gran cantidad de glicosaminoglicanos que se unen al hialuronato. De esa forma, este tipo de tejido soporta grandes presiones y permite una movilidad confortable. En enfermedades como la osteoartritis, este tipo de matriz se osifica como resultado de que los condrocitos se vuelven hipertróficos. El cartílago degenera y su reparación es muy limitada (Piperno et al, 1998). Esto es un ejemplo de la necesidad de la MEC para mantener el estado diferenciado de los condrocitos.

El cartílago requiere de señales moleculares para su desarrollo y mantenimiento. Algunos factores de crecimiento en muchos casos se encuentran regulando la síntesis de la MEC y pueden encontrarse activos o latentes entre la matriz extracelular. Muchos miembros de la familia del TGF- β se secretan al exterior celular de forma latente, y son atrapados por la MEC rica en proteoglicanos, cuando se encuentran las condiciones adecuadas que los activan (v.gr.: Plasmina, Fibrinógeno, Fibrilina, pH) (Charbonneau et al, 2004) se degrada la proteína

latente y se libera la proteína funcional. Existen otras moléculas que antagonizan a estos factores y que también se encuentran en la MEC, como los antagonistas de BMP, Cordina y Nogina.

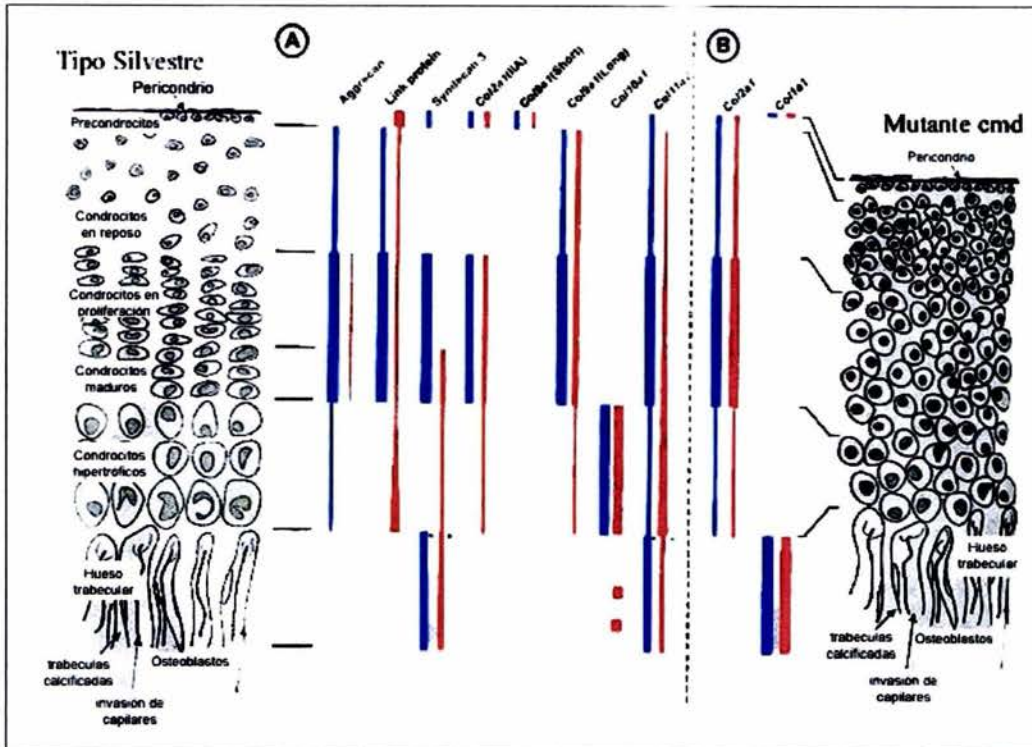


Figura 11. Expresión de moléculas de la MEC durante la diferenciación del cartilago. Patrón de expresión de moléculas de la MEC en la placa de crecimiento normal (A) representado en azul. Cuando ocurre alguna mutación en algún componente de la MEC (B), como es el caso del ratón mutante *cmd* (mutación en el gen del Agrecano), se altera la diferenciación de los condrocitos, la distribución de las moléculas de la MEC (rojo) y la estructura de la placa de crecimiento.

Hemos visto que en el programa de diferenciación del cartilago durante la formación de una articulación, los condrocitos en proliferación en lugar de entrar al camino del fenotipo prehipertrófico, entran al camino del fenotipo prearticular (células de la interzona). Este proceso se acompaña por el cambio en la distribución de la MEC. Así, donde antes había Colágena II y Agrecano, propias

de la MEC del cartílago, con células ovaladas organizadas en columnas, ahora aparecen células más pequeñas y aplanadas, organizadas en capas y con una MEC de Colágena I, Colágena III, Hialuronato (Francis-West et al, 1999). Esta distribución de los componentes de la Matriz Extracelular, nos sugieren que los receptores de estas moléculas de alguna manera también podrían regular los procesos de diferenciación de los condrocitos y la formación de las articulaciones. Estos receptores son de gran importancia durante la formación del esqueleto y la morfogénesis de la extremidad.

Las Integrinas son los principales receptores para las moléculas de la matriz extracelular, y su estudio ha revelado que la adhesión celular mediada por Integrinas es de gran importancia en diferentes procesos del desarrollo como en la proliferación, muerte, migración y diferenciación celular (Bokel y Brown, 2002; Brown y Yamada, 1995; Bouvard et al, 2001).

Las Integrinas permiten la comunicación de los condrocitos con su entorno durante la diferenciación

Las Integrinas son receptores transmembranales que constan de una subunidad α y una β , y sólo son funcionales cuando forman el heterodímero $\alpha\beta$ en la membrana celular (Hynes, 2002). En los mamíferos se conocen 8 subunidades β y 18 subunidades α , con las cuales se pueden ensamblar 24 distintas Integrinas. La familia $\beta 1$ de las Integrinas se compone de 12 subunidades α que forman el heterodímero con la subunidad $\beta 1$; estas Integrinas son los principales receptores de moléculas de la MEC, y tienen la capacidad de permitir la adhesión celular y al mismo tiempo transducir señales a las cuales la célula responde de diversas maneras (Aplin et al, 1999). Cuando las Integrinas interaccionan con la MEC forman agregados en la membrana celular, entonces, la región intracelular de las Integrinas se conecta con el citoesqueleto mediante las proteínas Talina y Paxilina. Por otro lado, la transducción de señales se desarrolla con el reclutamiento de la Cinasa de adhesión focal (FAK), la cual se autofosforila y

forma un sitio de anclaje para miembros de la familia Src. Esta interacción induce la forforilación de otros residuos de tirosina de la FAK, creando sitios de anclaje para una variedad de proteínas de señalización intracelular, relacionadas con la organización del citoesqueleto, la proliferación y diferenciación celular, y la regulación de la expresión génica (Hynes, 2002).

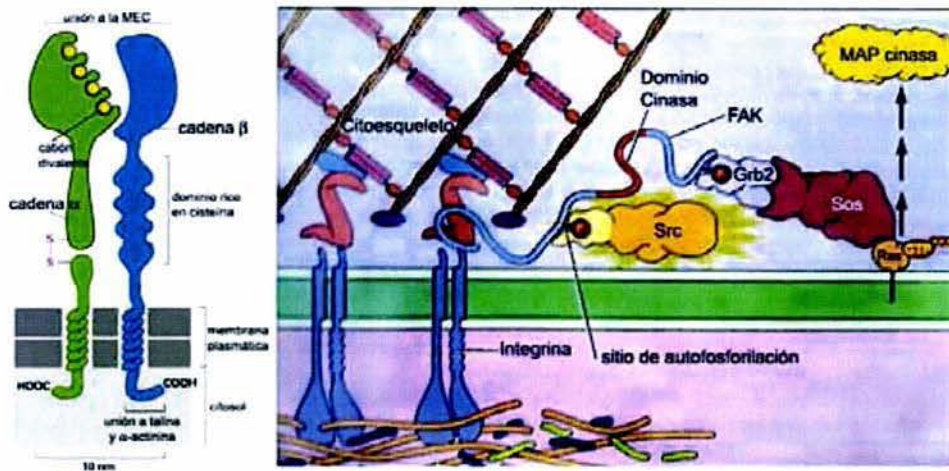


Figura 12. Las Integrinas se componen de dos subunidades (α y β), la familia de las Integrinas $\beta 1$ presentan un sitio de unión extracelular a moléculas de la MEC, esta adhesión depende de cationes divalentes y la subunidad $\beta 1$ interacciona con elementos del citoesqueleto y transduce señales. Este señalamiento activa diversas respuestas celulares como la migración, proliferación y diferenciación.

El papel de las Integrinas durante la diferenciación del cartílago se ha explorado relativamente poco. Cuando en cultivos de micromasas (un modelo *in vitro* que permite estudiar la diferenciación del cartílago) se bloquea la subunidad $\beta 1$ de las Integrinas, se inhibe la formación de nódulos de cartílago y la síntesis de Colágena tipo II (Shakibaei, 1998). Esto sugiere un papel importante de las Integrinas durante la condrogénesis, es decir, en las etapas tempranas de diferenciación del cartílago. En otros estudios se muestra que el bloqueo con anticuerpos de la subunidad $\beta 1$ inhibe el depósito de Colágena X y el crecimiento del cartílago (Hirsch et al, 1997), es decir, se inhibe la hipertrofia de los condrocitos.

El tratamiento de los condrocitos con ácido retinoico (AR) inhibe la expresión de la Colágena II (típica del cartílago) y en su lugar se expresa Colágena tipo I (característica de etapas precondrogénicas); estas células tienen mayor adhesión a Colágena I que a Colágena II, debido al cambio en la expresión de Integrinas $\alpha 3$ por $\alpha 1$ (Hernández-Lagunas et al, 1998). Por otro lado, la BMP-2 regula la adhesión celular mediante la modificación de la expresión de integrinas. BMP-2 reduce la expresión de la integrina $\alpha 3$ pero no tiene efecto sobre la expresión de las demás subunidades en los condrocitos, aunque el efecto de la BMP-2 es muy diferente en otros tipos de células (Nissinen *et al*, 1997). Así, es claro que algunas hormonas y factores de crecimiento tienen efecto sobre la diferenciación de los condrocitos mediante el cambio en el patrón de expresión de las Integrinas.

Al igual que sus ligandos, las Integrinas tienen una distribución muy particular en el cartílago de la placa de crecimiento (Dürr et al, 1993) y en el cartílago articular (Ustoa et al, 1998). La Integrina $\alpha 5\beta 1$ se expresa en el cartílago de la placa de crecimiento y articular y la adhesión a la MEC mediante esta Integrina es importante para la proliferación de los condrocitos y el mantenimiento del cartílago articular (Enomoto-Iwamoto et al, 1997). En una patología degenerativa como la osteoartritis, se presentan cambios en la expresión de los componentes de la MEC del cartílago articular. Los condrocitos disminuyen el depósito de Colágena II y aumentan el de Colágena I, mientras disminuyen la expresión de la Integrina $\alpha 3$ y aumentan la Integrina $\alpha 1$ (Loeser *et al*, 1995), además disminuyen su adhesión a Fibronectina (Piperno et al, 1998). Cabe mencionar que en estos procesos los condrocitos articulares maduran aceleradamente y llegan a la hipertrofia, o sea, modifican su patrón de diferenciación que de alguna manera se debe de mantener sin llegar a la hipertrofia para que la articulación sea funcional .

En otros estudios donde sobreexpresan el gen de con una mutación nula de la Integrina $\beta 1$ bajo el promotor de Colágena II, se observa que la diferenciación de los condrocitos puede ocurrir en ausencia de las Integrinas $\beta 1$; estas células no

son capaces de organizarse en columnas en la placa de crecimiento y disminuyen la actividad proliferativa (Aszodi et al, 2003; Fäsler y Meyer, 1995). No obstante, estos resultados deben observarse con más cuidado, ya que la mutación nula de la Integrina $\beta 1$ tiene efecto sólo en los condrocitos maduros que expresan Colágena tipo II, por ello no hay efecto en las etapas tempranas y tardías de la diferenciación del cartílago y el pericondrio.

Sin embargo, el papel de las Integrinas en la diferenciación del condrocito aún no está bien establecido, y sería de significativa importancia para determinar la relación de la MEC con el condrocito durante la condrogénesis, la diferenciación del cartílago y la formación de las articulaciones, y por lo tanto, durante la morfogénesis del esqueleto.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En este trabajo nos interesamos en el estudio de las Integrinas durante el desarrollo del cartílago y la formación de las articulaciones del esqueleto. Bajo esta perspectiva, se conoce que la sobrevivencia, la condrogénesis y la hipertrofia son mediados por Integrinas (Shakibae, 1998; Hirsch *et al*, 1997). Esto es, las integrinas son necesarias para que los condrocitos avancen a su etapa terminal de diferenciación.

Por otro lado, para que un elemento esquelético pueda segmentarse y formar una articulación, es necesario que los condrocitos detengan y reviertan su fenotipo diferenciado y no progresen hacia la hipertrofia (Hartman y Tabin, 2001).

Es posible que las Integrinas regulen y mantengan el fenotipo diferenciado de los condrocitos, por lo que un cambio en el patrón de expresión de las Integrinas o un bloqueo de la señalización de estas, puede interrumpir la diferenciación del cartílago y desencadenar la segmentación de un elemento esquelético para generar una articulación.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de las Integrinas de la familia $\beta 1$ en la diferenciación de los condrocitos y en la formación de las articulaciones esqueléticas.

OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Observar si el bloqueo con anticuerpos de las Integrinas de la familia $\beta 1$ interfiere con la diferenciación de los condrocitos analizando la morfología celular y la expresión de marcadores de diferenciación de los condrocitos como: Colágena II, Colágena X e IHH.

2.- Determinar cuáles Integrinas de la familia $\beta 1$ regulan la diferenciación de los condrocitos, mediante la expresión de las diferentes subunidades alfa de las Integrinas y comprobaremos que el bloqueo de esta subunidad también interfiere con la diferenciación de los condrocitos.

3.- Conocer si el bloqueo de las Integrinas al inhibir la diferenciación de los condrocitos genera la formación de la interzona características de una articulación en desarrollo, comprobar si se trata de una interzona mediante el análisis morfológico y de la expresión de los marcadores moleculares *GDF-5* y *Wnt-14*.

4.- Sobreexpresar los genes de las Integrinas $\alpha 5$ y $\beta 1$ para generar el efecto contrario al bloqueo; es decir, que resulte en la inhibición de la formación de las articulaciones, la expresión del marcador molecular de cartílago *Ihh* y la inhibición de los marcadores de articulaciones *GDF-5* y *Wnt-14*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos.

Todos los reactivos como sales y ácidos fueron de la más alta pureza comprados a JT Baker (México, D.F.). Los colorantes para las tinciones histológicas, así como la albúmina, Ioduro de propidio y TESPAs fueron de SIGMA (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Los medios de cultivo BGJb, la mezcla de antibióticos y los péptidos RGE (GRGESP) y RGD (GRGDNP) fueron de Gibco BRL (Gran Island, NY). Los anticuerpos monoclonales neutralizantes para la Integrina $\beta 1$ (HM $\beta 1$, Cat. 553837) y la Integrina $\alpha 5$ (HM $\alpha 5$, Cat. 553350) se compraron a Pharmingen (Pharmingen, San Diego, CA). Los anticuerpos para Colágena I (AB765P, Cat. AB765P) y CD44 se obtuvieron de Chemicon (Chemicon, Temacula, CA), para la Colágena II (CIIC1) y Sonic hedgehog (5E1) del Hybridoma Bank (Iowa City, IA), el de la Colágena X de Calbiochem y el de Indian hedgehog (C-15) de Santa Cruz y los anticuerpos fluoresceinados (FITC) de Zymed (San Francisco, CA). La BMP-7 y Shh se compraron a R&D Systems (Minneapolis, MN).

Material Biológico.

Para los cultivos de extremidades se utilizaron ratones de la cepa CD-1 del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Las hembras preñadas de 14.5 días de gestación se mataron por dislocación cervical y se obtuvieron los embriones del E14.5. Los embriones se lavaron con PBS y se mantuvieron en medio de cultivo BGJb mientras se aislaban las extremidades para cultivarlas, a las extremidades se les retiró completamente la piel.

En los experimentos de sobreexpresión de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ se utilizaron huevos fertilizados de pollo White Legorn de la empresa ALPES (Puebla, México). Los huevos se incubaron en un ambiente húmedo a 38.5 °C, y se trabajó con embriones de la etapa 27HH (Hamburguer y Hamilton, 1951) para los ensayos de electroporación.

Aislamiento de extremidades y microinyección.

Las extremidades anteriores de los embriones de ratón se microinyectaron con microagujas fabricadas con tubos capilares calentados y estirados con un "puller". Las microagujas se cargaron por capilaridad con la solución del anticuerpo para las Integrinas $\beta 1$ o $\alpha 5$ ($5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), y se microinyectaron $2 \mu\text{l}$ del anticuerpo en la muñeca de la extremidad derecha con un microinyector neumático PV830 (World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL). Las extremidades izquierdas de cada embrión se inyectaron con una solución de anti IgG de conejo en PBS, que sirvieron como controles. Las extremidades se cortaron con unas pinzas y se depositaron en medio BGJb, para después colocarlas en las condiciones de cultivo.

Cultivo de órganos.

Cada extremidad se aisló y se depositó sobre un filtro nucleopore (Whatman International Ltd, Maidstone, England), a su vez el filtro se colocó sobre una malla de acero inoxidable (Plain weave mesh 0.38 mm , Goodfellow, Huntingdon, England) previamente colocada en cada pozo de una placa de cultivo de 24 pozos, de esa forma el órgano se mantuvo en la interfase líquido/aire. Los cultivos se mantuvieron en 0.5 ml de medio BGJb + 1% de antibiótico y 0.1% de albúmina de suero bovino, bajo condiciones de humedad y 37° C (Vortkamp et al., 1996; Lanske et al., 1996). Algunos cultivos se complementaron con $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ de BMP-7 y $400 \text{ ng}/\text{ml}$ de Shh.

Todos los experimentos se desarrollaron en E14.5 de la extremidad embrionaria del ratón y se mantuvieron durante 4 días de cultivo.

Se tuvieron cinco tipos de cultivos. 1) Grupo control que se inyectó un anticuerpo irrelevante (IgG) en PBS. 2) Grupo que se inyectó con el anticuerpo neutralizante de la Integrina $\beta 1$ o $\alpha 5$. 3) Grupo cultivado con BMP-7 en el medio de cultivo. 4) Grupo con doble tratamiento, inyectado con el anticuerpo neutralizante de la Integrina $\beta 1$ o $\alpha 5$ y con BMP-7 en el medio de cultivo. 5) Grupo inyectado

con el anticuerpo neutralizante de la Integrina $\beta 1$ o $\alpha 5$ y con BMP-7 en el medio de cultivo, mas SHH en el medio.

Cada extremidad experimental (derecha) se comparó con la extremidad control (izquierda) del mismo embrión; la extremidad control también se cultivo pero sin tratamientos.

Preparación del esqueleto.

Para la tinción del esqueleto se utilizó Azul alciano y Alizarina roja S, con lo cual se tiñe específicamente de azul el cartílago y de rojo el hueso (Otto et al, 1997). Brevemente, las extremidades se fijaron en etanol al 96% toda la noche y después se transfirieron a acetona durante 24 h para remover las grasas y solidificar el esqueleto. Después se depositaron en una solución de Azul alciano y Alizarina roja S (1 volumen de azul alciano 0.3% (p/v) en etanol 70 % + 1 volumen de alizarina roja 0.1 % (p/v) en etanol 70 % + 1 volumen de ácido acético + 17 volúmenes de etanol 70%) por 24 h, se lavaron con agua destilada y se aclararon en KOH al 1% por varios días. Por último, se almacenaron en Glicerol 50% en etanol. Las extremidades teñidas se observaron a 25 aumentos en un microscopio estereoscópico Nikon (SMZ1500) y se fotografiaron con una cámara digital Coolpix 995 (Nikon Inc., Tokyo, Japan).

Cortes y tinciones histológicas.

Las muestras se fijaron con Paraformaldehido al 4% durante toda la noche a 4° C, se deshidrataron con alcoholes graduales y xilol, por último se embebieron en Paraplast (parafina) y se incluyeron. Se hicieron cortes histológicos de 5-7 μm de grosor, los cortes se estiraron sobre una gota de agua en una laminilla cubierta con TESPA, en una plancha de calentamiento a 42° C por una hora y se dejaron secar a 37° C toda la noche.

Mediante la tinción con Safranina O, que tiñe proteoglicanos, se analizó la histología de los tejidos esqueléticos. Para ello, las laminillas se tiñeron en hematoxilina por 7 min, después de lavarlas en agua destilada, las laminillas se

tiñeron con verde rápido al 0.2% por 3 min y se enjuagaron rápidamente en ácido acético al 1%. Entonces las laminillas se tiñeron en Safranina O durante 5 min y por último se deshidrataron y montaron en resina.

Detección de marcadores de diferenciación

Inmunofluorescencias

La localización de la Integrina $\alpha 5$, Colágena I, Colágena II, Colágena III, Colágena X, IHH, SHH y CD44 se determinó por inmunofluorescencias. Para esto, los cortes se rehidrataron y se dejaron 5 min en PBS, luego se bloquearon con una solución de albúmina al 1% en PBS por 30 min y después con esta misma solución se diluyó el anticuerpo 50 veces en el que se incubaron las laminillas por toda la noche a 4 °C. Al otro día se lavaron las laminillas con PBS/Tritón 0.1% y se incubaron por 2 h con el anticuerpo anti-IgG fluoresceinado, diluido 100 veces en la solución de bloqueo a 37° C. Después, las laminillas se lavaron tres veces con la solución de PBS/Tritón y se tiñeron los núcleos con una solución de Ioduro de Propidio 10 $\mu\text{g/ml}$ por 30 seg. Por último, las preparaciones se lavaron con PBS y se montaron con el medio de montaje acuoso Cristal Mount (Biomeda).

Las preparaciones se observaron a 200 y 400 aumentos en un microscopio Nikon Eclipse E600 con filtro para fluoresceína y se fotografiaron con una cámara digital Nikon Coolpix 995 (Nikon Inc., Tokyo, Japan).

Preparación de las sondas

Para las hibridaciones *in situ* se utilizaron las siguientes sondas de cDNA de ratón: *Gdf5* (Storm & Kingsley, 1999); *Wnt14* (Kato 2002); *Cordina* (Bachiller et al., 2003). Para embriones de pollo se usaron las siguientes sondas. Los fragmentos de los genes de ratón para *Autotaxina* (Genebank, número de acceso NM015744), *Cd44* (Genebank, número de acceso XM283773) y *Agrecano* (Genebank, número de acceso L070 49) se obtuvieron por RT-PCR. Las cadenas sencillas de cDNA se sintetizaron con el kit firts-strand cDNA (Roche Applied

Science) y un μg de RNA total de embriones de ratón en E12. Se utilizaron los siguientes oligonucleotidos: para *Autotaxina* 5'-CAGCAAGTCGAATTAAGAGG-3' y 5'-GGCCAGCGTATACAGATTAG-3' (correspondientes a la región 127-692); *Cd44* 5'-AAGACDTGAACAGGACAGGA-3' y 5'-AGAGATGCCAAGATGATGAG-3' (correspondientes a la región 1747-22248); *Agrecano* 5'-GAGGAGCCATACACATCTTC-3' y 5'-CACTGAGGTCCTCTACTCCA-3' (correspondientes a la región 2506-3040). Las PCR se desarrollaron en un volumen total de 25 μl usando la Taq-DNA polimerasa (Invitrogen). Las condiciones de los ciclos fueron de 15 seg. a 94°C para desnaturalizar, 30 seg. a 55°C para alinear, 1 min. a 72°C para la elongación y 30 min a 72°C después del último de los 35 ciclos. Los productos de PCR se clonaron en pGEM T-easy (Promega). Mediante secuenciación de los fragmentos se comprobó la identidad del gen.

Los plásmidos con los cDNA de cada gen se linearizaron por digestión con las enzimas de restricción durante 2 h a 37 °C. Después se precipitaron con etanol absoluto 2 h a -20° C. Se centrifugaron a 14000 rpm, se retiró el sobrenadante y se lavó el botón con etanol 70%. Se dejó secar el botón y se resuspendió en agua estéril. La digestión se analizó por electroforesis y después de procedió a transcribir la sonda.

La transcripción se realizó con el plásmido linearizado en una mezcla de ribonucleótidos (rA+rG+rC+rU) y Digoxigenina 11-UTP (nucleótido marcado), con su respectivo buffer, inhibidor de RNAasas y RNA polimerasa. La reacción se incubó por 2 h a 37 °C. La transcripción se precipito y se resuspendió en 30 μl de agua DPEC.

Hibridación *in situ*.

Los cortes se desparafinaron y rehidrataron. Se fijaron 20 min. en paraformaldehído al 4% y se trataron con Proteínasa K 1 μg / ml por 5 min. Se lavó con PBS y se incubó en Buffer de hibridación 15 min a 70 °C y después con la sonda marcado por toda la noche a 55°C. Al otro día se hicieron 15 lavados y se incubó con buffer TBST con 5% de suero de chivo y después con el anticuerpo

para digoxigenina-FITC diluido 100 veces en el mismo buffer durante 2 h a temperatura ambiente. Por último, las preparaciones se lavaron con buffer TBST y se montaron con Crystal Mount. Las muestras se observaron en el microscopio de fluorescencia y se fotografiaron.

Muerte Celular

El patrón de la muerte celular se determinó mediante la prueba de TUNEL en cortes de parafina. Los cortes se tratan según las instrucciones del fabricante del Kit de detección de muerte celular *in situ* (Roche Applied Science), el cual consiste básicamente en detectar por fluorescencia los fragmentos de DNA generados durante la muerte celular.

Electroporación del cDNA de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en los embriones de pollo.

Los plásmidos no linearizados con el cDNA completo de la Integrina $\alpha 5$ ($6\mu\text{g}/\mu\text{l}$; pECE+ $\alpha 5$) y de la Integrina $\beta 1$ ($6\mu\text{g}/\mu\text{l}$; pECE+ $\beta 1$) (Giancotti y Ruoslahti, 1990) se inyectaron con una micro aguja en el autopodio de la extremidad posterior de embriones de pollo en la etapa 27HH. Para ello, el DNA ($1.5\mu\text{l}$ del pECE+ $\alpha 5$ mas $1.5\mu\text{l}$ del pECE+ $\beta 1$) se mezcló con tinta china ($0.5\mu\text{l}$) y aceite mineral ($0.5\mu\text{l}$ de), y se inyectó aproximadamente de 0.5 - $1.0\mu\text{l}$ de la mezcla. La electroporación se desarrollo a 28 volts con 10 pulsos de 70 milisegundos. Después de la electroporación, los embriones se incubaron y se analizaron para tinción de esqueleto, histología, inmunofluorescencia e hibridación *in situ*.

RESULTADOS

En este trabajo se evaluó el papel de las Integrinas de la familia $\beta 1$ en la diferenciación de los condrocitos del esqueleto en desarrollo, y en la formación de las articulaciones de embriones de ratón y pollo. El primer enfoque se realizó mediante el bloqueo con anticuerpos de las Integrinas $\beta 1$, y cual subunidad α de las Integrinas se relaciona con estas funciones. El segundo acercamiento consistió en la sobreexpresión de las Integrinas $\alpha 5\beta 1$ para comprobar el efecto contrario a su bloqueo. Por otra parte, también se plantea el papel de los factores BMP-7 e IHH durante la formación de las articulaciones y la diferenciación de los condrocitos.

El bloqueo de las Integrinas $\beta 1$ induce la formación de una articulación ectópica.

La interacción de las Integrinas con la MEC durante la diferenciación del cartílago y la morfogénesis de la extremidad se evaluó mediante el sistema de cultivos organotípicos de explantes de extremidad embrionaria de ratón en E14.5. Para determinar el papel de las Integrinas de la familia $\beta 1$ en la diferenciación del cartílago, se microinyectó en la muñeca de la extremidad un anticuerpo monoclonal neutralizante específico para la cadena $\beta 1$ de las Integrinas (HM $\beta 1$). A las extremidades testigo se les inyectó un anticuerpo irrelevante (IgG); estas extremidades mostraron una morfología normal en todos los elementos esqueléticos (figura 13a). El análisis de la tinción con azul alciano y alizarina roja, que tiñen específicamente la matriz de cartílago y hueso respectivamente; reveló que el tratamiento de las extremidades con el anticuerpo HM $\beta 1$, resultó en la pérdida de algunos elementos esqueléticos como algunas falanges y carpos (Fig. 13e). Además, se observó un espacio perpendicular al eje del hueso en la región distal del radio y la ulna (figura 13e, recuadro), lo que aparentemente muestra que estos elementos esqueléticos están segmentados. Esto se detectó por la pérdida

de la tinción de azul alciano en esa región; esta pérdida en la tinción parece que divide al elemento esquelético y se observa una estructura similar a una articulación. La frecuencia de formación de articulaciones ectópicas fue de 62% (25 de 40 experimentos).

La pérdida de la tinción de cartílago y la segmentación de los elementos esqueléticos del zeugopodio, indica que el efecto del bloqueo de la Integrinas afecta dos procesos; 1) inhibición de la condrogénesis; 2) la articulación de los elementos esqueléticos.

El bloqueo de las Integrinas $\beta 1$ modifica la estructura del cartílago prehipertrófico de la Placa de Crecimiento

Con el fin de determinar si las alteraciones morfológicas del esqueleto son consecuencia de la arquitectura tisular de la placa de crecimiento, se hicieron cortes histológicos y se tiñeron con Safranina O para la tinción del cartílago.

Los cortes histológicos de los experimentos donde se bloquearon las Integrinas $\beta 1$ en la extremidad de ratón, presentaron modificaciones en la estructura de las placas de crecimiento de ambos elementos esqueléticos del zeugopodio (radio y ulna). Se observó la disminución de los condrocitos prehipertróficos y la aparición de un tipo celular más pequeño y aplanado similar a las células de la interzona. Además, la tinción específica para condromucina empleando safraninaO, revela una MEC más pobre en proteoglicanos, lo que se hace evidente por la disminución de la tinción roja del cartílago (figura 13f). Todo esto muestra que el cartílago presenta alteraciones en su diferenciación.

***Wnt-14* y *GDF-5* se expresan en la articulación ectópica.**

Otra forma para determinar si se está induciendo una articulación ectópica en el lugar de cartílago prehipertrófico; es mediante la detección de marcadores moleculares específicos del proceso celular que ocurre durante la formación de la

articulación. El análisis histológico de los cortes del tejido del zeugopodio, muestra una mayor densidad celular con células más pequeñas y aplanadas; cuya morfología es similar a la de la interzona de una articulación en desarrollo (figura 13f, flecha).

Para determinar si estos cambios morfológicos e histológicos corresponden a la formación de una articulación ectópica, se analizó la expresión de *Wnt-14* y *GDF-5*. El *Wnt-14*, es uno de los genes que se expresan en el campo donde se formarán las articulaciones e inicia su formación; además, la sobreexpresión de este gen induce articulaciones ectópicas en las extremidades de embriones de pollo (Hartmann y Tabin, 2001). Otro marcador, *Gdf-5* se expresa en respuesta a *Wnt-14*. *Gdf-5* se expresa en las articulaciones en desarrollo y las mutaciones en este gen provocan alteraciones en las articulaciones.

La detección de *Wnt-14* y *Gdf-5* se realizó por hibridación *in situ*. Observamos que cuando se bloquea la subunidad $\beta 1$ de las Integrinas con el anticuerpo neutralizante (HM $\beta 1$), el gen *Wnt-14* se expresa en las zonas donde se altera la estructura de la placa de crecimiento (figura 13g), esto es, en la región donde normalmente se desarrolla el cartílago prehipertrófico. En las muestras control tratadas con un anticuerpo irrelevante (IgG) la expresión de *Wnt-14* se observa en la región periarticular, en el pericondrio y alrededor del cartílago (figura 13c).

El *Gdf-5* también se expresa en las articulaciones ectópicas generadas por el bloqueo de las Integrinas (figura 13h). Estos datos sugieren que el efecto del bloqueo de las Integrinas $\beta 1$ no sólo afecta el depósito de la matriz de cartílago o la condrogénesis, sino que también induce la formación de articulaciones ectópicas.

La muerte celular en la articulación ectópica.

Se ha propuesto que durante la segmentación de un elemento esquelético ocurre muerte celular por apoptosis en las células de la capa central de la

interzona, esto genera que el elemento esquelético se separe mediante el proceso conocido como cavitación.

La detección de la muerte celular se realizó por la técnica de TUNEL. Al tratar las extremidades con el anticuerpo HM β 1 se observó muerte celular de algunas células en la región de la articulación ectópica, justo donde se desorganiza la placa de crecimiento y al parecer se forma la interzona de una articulación (figura 13l). Esto sugiere que la separación de los elementos esqueléticos se lleva a cabo en parte por la muerte celular programada. Los cultivos control (IgG) prácticamente no mostraron células muertas (figura 13k).

Esta muerte celular la podemos asociar a la fase de la formación de la articulación conocida como cavitación, que ocurre cuando se empiezan a separar los elementos esqueléticos debido a la muerte de la capa de células intermedia entre las otras dos capas de la interzona conocidas como capas condrogéneas que dan origen a los cartílagos articulares.

La interacción de las secuencias RGD del ligando con las integrinas mantienen la estructura del cartílago prehipertrófico.

Se ha reportado que algunas Integrinas de la familia β 1 median su interacción con la MEC mediante la secuencia de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) en sus ligandos (Hynes, 2002). El efecto producido por el tratamiento de las Integrinas con anticuerpos para la Integrina β 1 podría ser debido al bloqueo de las interacciones ligando-integrina, o de la activación directa por la unión del anticuerpo con la Integrina en un sitio diferente al sitio de unión al ligando. Para probar si este efecto fue causa del bloqueo de la interacción ligando-integrina, se microinyectaron péptidos RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) a la altura de la muñeca de las extremidades en desarrollo en lugar del anticuerpo HM β 1. El tratamiento con el péptido RGD también resultó en la formación de una articulación ectópica (figura 13j), mientras que el control con el péptido RGE (arginina-glicina-ácido glutámico) no tuvo efecto (figura 13i). Además, se observó

la reducción drástica de la tinción del cartilago en los tratamientos, mientras que los tratamientos control con el péptido RGE no tuvieron efecto en la morfología de los elementos del esqueleto. Estos datos sugieren que las Integrinas $\beta 1$ necesitan interactuar con su ligando de la MEC a través de una secuencia RGD, para así mantener la estructura normal del cartilago. En estos experimentos también se detectaron células muertas, posiblemente por apoptosis en la zona media de las aparentes articulaciones ectópicas, de las extremidades tratadas con péptidos RGD.

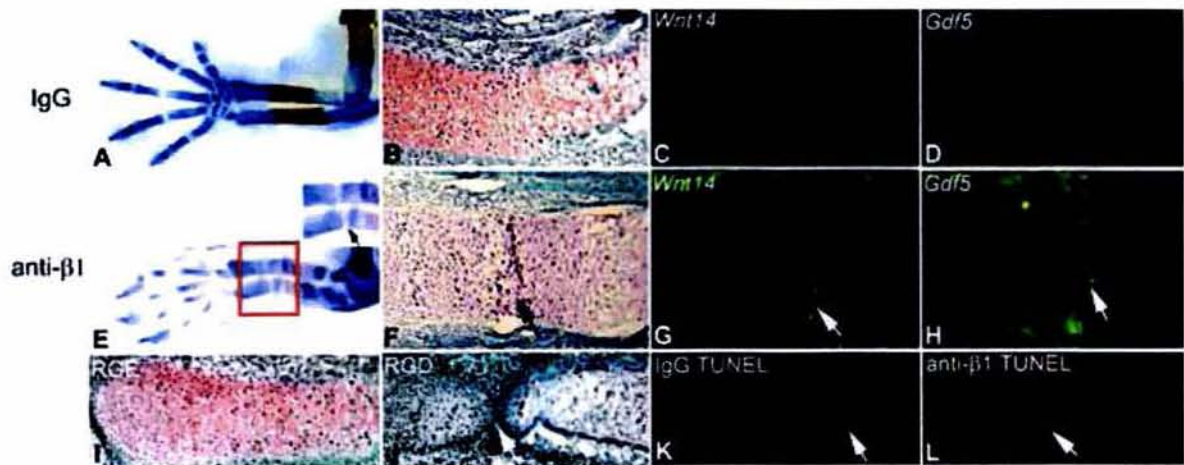


Figura 13 . El bloqueo de la Integrina $\beta 1$ induce la formación de una articulación ectópica. Cultivos de 4 días de extremidades anteriores de embriones de ratón. Al inicio del cultivo se micronyectaron con 10 μg de un anticuerpo IgG irrelevante (A-D) o con 10 μg de un anticuerpo neutralizante para la Integrina $\beta 1$ (E-H). Tinción de azul alciano/alizarina roja para mostrar los elementos esqueléticos de la extremidad completa, el recuadro rojo muestra la articulación ectópica (A y E). Cortes histológicos del área del zeugopodio teñidos con Safranina O y Verde rápido, que muestra al cartilago en rojo, 200 aumentos (B y F). Hibridación *In situ* para *Wnt14* (C y G) y para *Gdf5* (D y H), 400 aumentos. Cortes histológicos de la región del zeugopodio de extremidades inyectadas con 2 μg de péptidos RGE (I) y con RGD (J) teñidos con Safranina O y verde rápido. Ensayo de TUNEL para apoptosis en extremidades inyectadas con 10 μg un anticuerpo IgG irrelevante (K) o con 10 μg de anticuerpo neutralizante para la Integrina $\beta 1$ (L).

El bloqueo de las Integrinas $\alpha 5\beta 1$ induce cambios moleculares característicos de la formación de articulaciones.

Las principales Integrinas de la familia $\beta 1$ que unen ligandos mediante la secuencia RGD son las Integrinas $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$ y $\alpha v\beta 1$ (Hynes, 2002); por ello exploramos si el bloqueo de una de estas Integrinas mediante anticuerpos neutralizantes tienen el mismo efecto que los anticuerpos para la subunidad $\beta 1$ o el péptido RGD. La microinyección de anticuerpos monoclonales para la Integrina $\alpha 5$ (HM $\alpha 5$) también indujo la formación de una articulación ectópica (figura 14a), lo mismo que la aplicación de otro anticuerpo monoclonal para la integrina $\alpha 5$, MFR5 (datos no mostrados). Todos estos datos apoyan la idea de que durante el desarrollo de la extremidad, los condrocitos se adhieren a la MEC mediante las Integrinas $\alpha 5\beta 1$, de esa manera se previene la formación de articulaciones y se promueve la diferenciación del cartílago.

Para confirmar que el bloqueo de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ induce los cambios moleculares característicos de una articulación en desarrollo, se analizó la expresión de los marcadores moleculares de la interzona (figura 14). Debido a que *Wnt-14* es capaz de inducir a las células precondrogénicas hacia el programa de las articulaciones, se evaluó la expresión de otros marcadores moleculares tales como *Gdf-5*, *Cordina*, *Autotaxina*, CD44 y colágena tipo III en la articulación ectópica inducida por el bloqueo de la integrina $\alpha 5\beta 1$. Los resultados muestran que *Wnt-14* (figura 14b), *Gdf-5* (figura 14c), *Autotaxina* (figura 14e), *Cordina* (figura 14d), la proteína CD44 (figura 14f) y la Colágena tipo III (figura 14g) se expresaron en la articulación ectópica.

El bloqueo de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ inhibe la diferenciación de los condrocitos

Para determinar si la formación de articulaciones ectópicas está asociada a la inhibición de la diferenciación de los condrocitos, se evaluó la expresión de los marcadores moleculares de diferenciación del cartílago prehipertrófico, Colágena tipo II, Agrecano e IHH. También se analizó la distribución de Colágena X y Colágena I, que son típicas de cartílago hipertrófico y del pericondrio, respectivamente.

Los cambios observados en los componentes de la MEC de las articulaciones ectópicas inducidas por el bloqueo de las integrinas $\alpha 5\beta 1$ son: La Colágena tipo II, un marcador típico de la MEC del cartílago se inhibió a lo largo de la ulna de la extremidad en desarrollo (figura 14i), mientras que la Colágena tipo I y la Colágena tipo III se indujeron mostrando una expresión más intensa en la articulación nueva (figura 14k, g). Las extremidades control tratadas con un anticuerpo irrelevante, no presentan estos cambios (figura 14h, j). Además, se observó que se inhibió la expresión de Agrecano en la región de la articulación ectópica, mientras que la Colágena tipo X solo se observó en la zona distal de la articulación ectópica (figura 14m), correspondiente al cartílago hipertrófico, como se observa en los controles (figura 14l). Similarmente, el anticuerpo HM $\alpha 5$ inhibió la expresión de Indian hedgehog (figura 14o), mientras que el control con un anticuerpo irrelevante no redujo la expresión de IHH (figura 14n). Estos datos indican que los condrocitos pierden su fenotipo diferenciado y en respuesta de las señales inductoras del programa de articulación cambian su destino celular, lo que permite la formación de una nueva articulación. Mediante el análisis de IHH y Colágena X, observamos que la articulación ectópica se ubica en la frontera de los condrocitos en proliferación y los condrocitos hipertróficos.

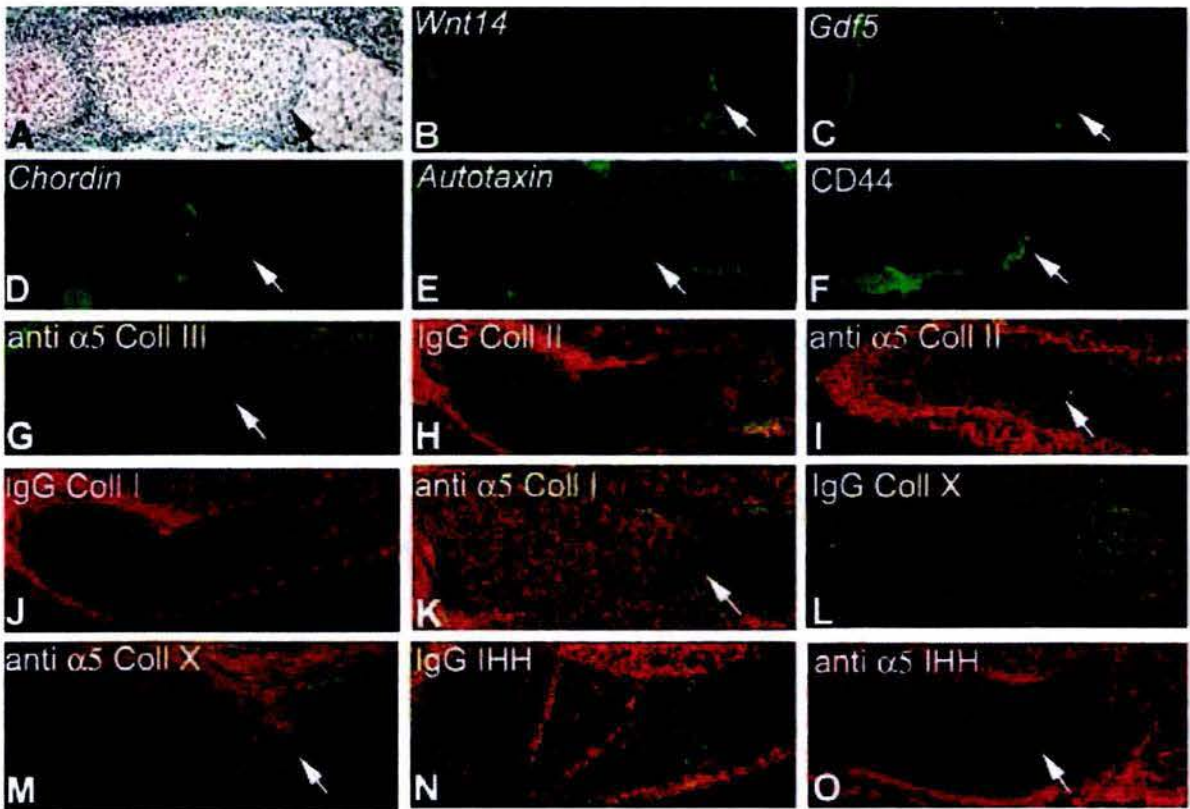


Figura 14 . El bloqueo de la Integrina $\alpha 5$ induce cambios moleculares característicos de una articulación en formación. Cultivos de 4 días de extremidades embrionarias de ratón en E14.5 inyectadas con 10 μ g de anticuerpo neutralizante para la Integrina $\alpha 5$ (A-G, I, K, M y O). Cultivos de extremidades (control) inyectados con 10 μ g de un anti-IgG irrelevante (H, J, L y N). Corte histológico de la región del zeugopodio teñido con Safranina O y Verde rápido para mostrar el cartilago en rojo (A). Hibridación *In situ* para *Wnt14* (B), *Gdf5* (C), *Chordin* (D) y *Autotaxina* (E). Inmunofluorescencias para CD44 (F), Colágena tipo III (G), Colágena tipo II (H-I), Colágena tipo I (J-K), Colágena tipo X (L-M) e Indian Hedgehog (N-O). Las tinciones de las inmunofluorescencias para IHH, Colágena tipo I, II, III y X se hicieron con FITC (verde) y los núcleos se tiñeron con Ioduro de propidio (rojo).

Regulación de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ durante la formación de articulaciones.

Nuestros datos sugieren que la unión de la Integrina a un ligando RGD en la extremidad en desarrollo contribuye a prevenir la aparición de una nueva articulación, por ello decidimos explorar el patrón de expresión de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ durante la formación de articulaciones. El autopodio completo de embriones de ratón de diferentes etapas de desarrollo se tiñeron para mostrar la expresión de la subunidad $\alpha 5$ de la integrina. La Integrina $\alpha 5$ se encuentra en todos los dígitos de la mano en formación. En la zona donde las articulaciones de los dedos empiezan a formarse en E14.5, la Integrina $\alpha 5$ no se expresa (figura 15a). Una vista a mayor aumento de la región de la interzona confirmó que la Integrina $\alpha 5$ no está presente en las articulaciones en desarrollo (figura 15b). Así, *Wnt-14* se expresa en la interzona donde la integrina $\alpha 5$ no se expresa (figura 15c). En los elementos esqueléticos más avanzados, tales como la ulna, la expresión de la Integrina $\alpha 5$ fue muy evidente en los condrocitos prehipertróficos (figura 15d) y colocaliza con IHH, (figura 15f) pero no con la colágena tipo X (figura 15e). Además, la integrina $\alpha 5$ se observa con menor intensidad en los condrocitos en proliferación, y fué evidente en el pericondrio y en las articulaciones ya formadas.

Estos datos apoyan la idea que durante la formación del esqueleto, la Integrina $\alpha 5\beta 1$ correlaciona con el fenotipo diferenciado de los condrocitos prehipertróficos, pero al desaparecer podría permitir la formación de las articulaciones.

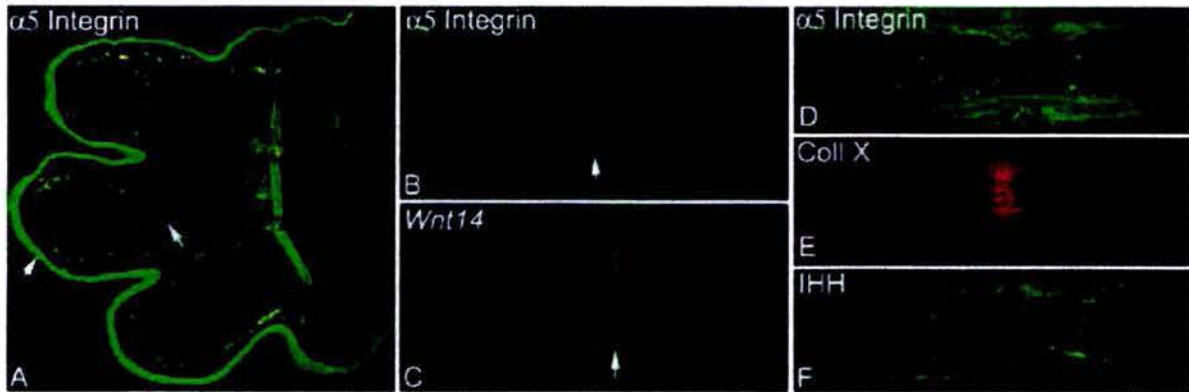


Figura 15 . Patrón de expresión de las Integrinas $\alpha 5$ durante la formación de articulaciones. Cortes histológicos de extremidades de ratón de 14.5 días de desarrollo. Corte del autopodio teñido mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo policlonal para la subunidad $\alpha 5$ de la Integrina, donde se muestran las articulaciones en desarrollo de los dedos (A). Cortes seriados de la zona de una articulación de un dedo en desarrollo, teñidos mediante inmunofluorescencia para la Integrina $\alpha 5$ (B) y mediante hibridación *in situ* para mostrar la expresión de *Wnt-14* (C). Corte seriados de la ulna teñidos por inmunofluorescencia para mostrar la presencia de la Integrina $\alpha 5$ (D), Colágena tipo X (E) e *Ihh* (F).

Las BMP potencian la formación de articulaciones ectópicas inducidas por la inhibición de la integrina $\alpha 5\beta 1$

Se sabe que las BMP inhiben la formación de articulaciones y aumenta la diferenciación del cartilago, por ello evaluamos si la adición de BMP puede prevenir la aparición de articulaciones ectópicas que fueron inducidas por el bloqueo de las Integrinas $\alpha 5\beta 1$. Las extremidades anteriores de embriones de ratón en E14.5, se inyectaron en la muñeca con anticuerpos neutralizantes para la Integrina $\alpha 5$ y entonces se cultivaron en presencia de BMP7 durante 4 días. Las extremidades inyectadas con un anticuerpo irrelevante e incubadas con BMP7 presentaron una distribución normal de los elementos esqueléticos, aunque tienen

una apariencia mas gruesa que en las extremidades control (figura 16a). Inesperadamente, encontramos que la BMP7 en el medio de cultivo no contrarresta los efectos del anticuerpo neutralizante para la Integrina $\alpha 5$ (figura 16d); pero en cambio, la BMP7 aumento a 87% (35 de 40) de los experimentos la formación de las articulaciones ectópicas en la región distal del radio y la ulna (figura 16a, 16d). La combinación de BMP7 y el anti-integrina también resultó en la pérdida de algunos elementos esqueléticos tales como falanges y carpos en comparación con los controles. El análisis histológico de estas secciones muestra dos áreas de tinción de cartílago, una más intensamente teñida más allá de la porción distal y una segunda menos teñida sobre la porción proximal (figura 16e). Esta última área corresponde a los condrocitos hipertróficos. Estas áreas diferentes no se observan en las extremidades control tratadas con BMP7 y con un anticuerpo irrelevante (figura 16b). Además, la expresión de *Wnt-14*, el marcador molecular de las articulaciones se evidenció en el área de esta nueva estructura (figura 16f), mientras que *Wnt-14* no se detectó en las extremidades control (figura 16c). Resultados similares se obtuvieron al utilizar el péptido RGD y BMP7 (figura 16g). También, se observó un incremento de las células apoptóticas en la articulación ectópica tratada con el anti-integrina $\alpha 5$ (figura 16i) comparada con BMP7 solo (figura 16h). Estos resultados muestran que la nueva estructura formada después del tratamiento con la anti-integrina $\alpha 5$ induce una nueva articulación, y la BMP 7 no es capaz de inhibir la formación de esta articulación ectópica después del bloqueo de la Integrina. Por el contrario, la potencia (comparar figura 16e con figura 14a).

Hemos mostrado que la Colágena tipo II se regula negativamente después del tratamiento del bloqueo de la Integrina con anticuerpos monoclonales. Aunque BMP7 no previno la formación de la articulación ectópica, es posible que la distribución de otros marcadores moleculares de cartílago pueda ser diferente. La BMP7 en los cultivos tratados con una IgG control tienen un incremento en la expresión de la Colágena tipo II (figura 16j); sin embargo, el tratamiento con anti-

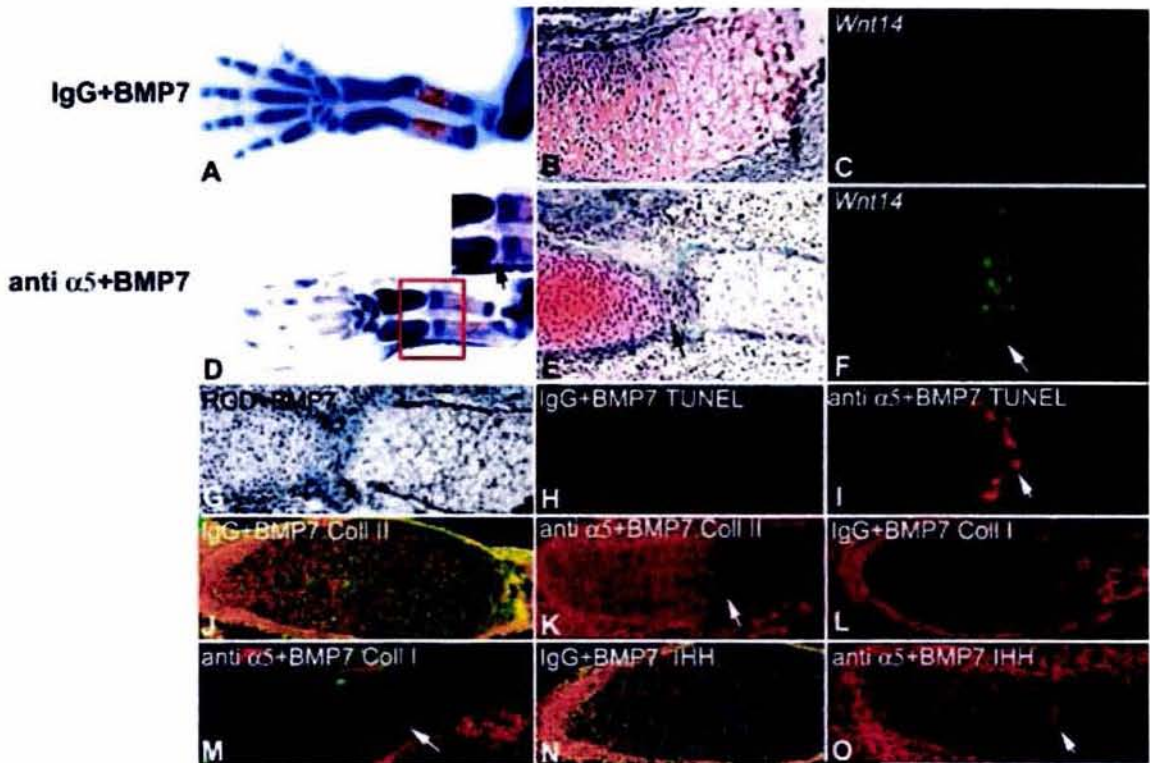


Figura 16. La BMP aumenta la formación de articulaciones inducidas por la inhibición de la Integrina $\alpha 5\beta 1$. Extremidades de embriones de ratón en E14.5 cultivadas por cuatro días en presencia de 1 $\mu\text{g/ml}$ de BMP-7 e inyectadas en la muñeca con 10 μg de un anticuerpo IgG irrelevante como control (A, B, C, H, J, L, N); las extremidades experimentales se inyectaron con 10 μg de anticuerpo neutralizante para la Integrina $\alpha 5$ (D, E, F, I, K, M, O). La tinción con Azul alciano/ Alizarina Roja de la extremidad completa muestra los elementos esqueléticos (A y D). Los cortes histológicos teñidos con Safranina O y Verde rápido muestran el cartílago en rojo. 200 aumentos (B y E). Hibridación *in situ* para *Wnt-14* (C Y F). Cortes histológicos de las extremidades inyectadas con 2 μg de péptido RGD teñidos con Safranina O y Verde Rápido para mostrar el cartílago en rojo (G). Ensayos de TUNEL para apoptosis revelados con rojo texas (H e I). Inmunofluorescencias reveladas con FITC (verde) para Colágena tipo II (J y K), Colágena tipo I (L y M), e Indian Hedgehog (N y O). En todas las inmunofluorescencias los núcleos se tiñeron con ioduro de propidio (rojo).

integrina $\alpha 5$ en presencia de BMP7 también causó la inhibición de Colágena tipo II (figura 16k). Por otro lado, la expresión de Colágena tipo I se encontró después del bloqueo de la Integrina, aún en presencia de la BMP7, comparado con la BMP7 sola (figura 16l, 16m). También, la expresión de IHH se incrementó por la BMP7 sola (figura 16n). Después del tratamiento con anti-integrina $\alpha 5$, también se observó la inhibición de la diferenciación de los condrocitos prehipertróficos, como se determina por la expresión de IHH (figura 16o). Todos estos datos indican que BMP7 acelera la formación de articulaciones ectópicas entre los condrocitos en proliferación y los condrocitos hipertróficos.

La sobreexpresión de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ inhibe la formación de articulaciones y promueve la diferenciación de las células prehipertróficas.

Nuestros resultados muestran que la inhibición de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ induce articulaciones ectópicas, por eso evaluamos si la sobreexpresión de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ de humano inhibe la formación de articulaciones. Los plásmidos conteniendo los genes completos para las cadenas $\alpha 5$ y $\beta 1$ de las Integrinas de humano se electroporaron en el autopodio de embriones de pollo en la etapa HH27, esta etapa es previa a la formación de las articulaciones del autopodio. Después de la incubación de los embriones de pollo durante 5 días, encontramos que la expresión ectópica de la *Integrina $\alpha 5\beta 1$* inhibió la formación de articulaciones (figura 17b). El análisis histológico de los dedos confirmó un tejido continuo de cartílago entre las falanges (figura 17d). Para determinar la expresión de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ de humano en la pata de pollo, la detectamos mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal específico para la Integrina $\alpha 5\beta 1$ de humano, el cual no reconoce las proteínas de pollo. Los resultados muestran la expresión de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ de humano fue detectada, localizándose a lo largo de todo el cartílago (figura 17f). Debido a que la formación de la articulación por la inhibición de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ coincide con la inhibición de

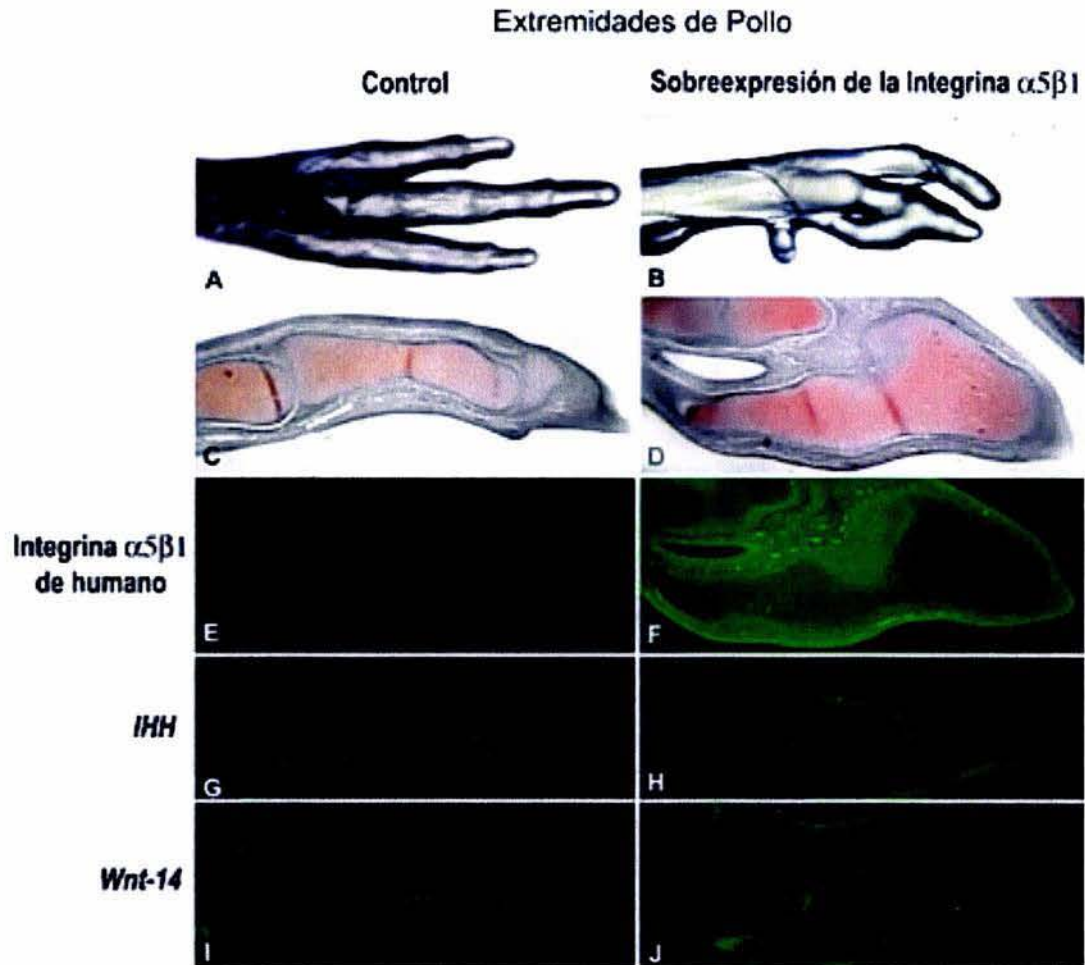


Figura 17 . La sobreexpresión de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ inhibe la formación de articulaciones e induce la diferenciación de células prehipertróficas. Extremidades posteriores de embriones de pollo del estadio 27 HH electroporados con los plásmidos con los genes completos para las cadenas $\alpha 5$ y $\beta 1$ de las Integrinas, en la región del autopodio e incubados durante 5 días (B, D, F, H y J). Las extremidades colaterales se utilizaron como controles (A, C, E, G, e I). Las extremidades se fijaron en paraformaldehído y se fotografiaron para observar el fenotipo inducido por la sobreexpresión de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ para humano (A y B). Cortes histológicos seriados de las extremidades mostradas en A y B teñidos con Safranina O y Verde rápido (C y D), teñidos por inmunofluorescencia para la Integrina $\alpha 5\beta 1$ de humano (E y F) e Indian hedgehog (G y H), y mediante hibridación *in situ* para *Wnt-14* (I y J).

la diferenciación de los condrocitos prehipertróficos, evaluamos que la expresión de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ induce la expresión de IHH (figura 17h), el marcador molecular de los condrocitos prehipertróficos. El resultado muestra que la expresión de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ de humano en los dedos coincide con IHH (figuras 17g, 17h); mientras que *Wnt-14* no se expresó bajo estas condiciones (figura 17j). En conclusión, la sobreexpresión de la *Integrina $\alpha 5\beta 1$* inhibió la expresión de *Wnt-14* y por lo tanto la formación de las articulaciones, este fenotipo correlaciona con el aumento de la diferenciación de los condrocitos prehipertróficos.

Indian hedgehog inhibe la formación de la articulación ectópica.

El tratamiento con el anticuerpo contra la Integrina $\alpha 5$ inhibió la expresión de IHH y la expresión de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ de humano induce la expresión de IHH, por ello evaluamos si el señalamiento de hedgehog se requiere para prevenir la formación de la articulación ectópica. Para hacer esto, las extremidades anteriores de embriones de ratón se inyectaron con el anticuerpo neutralizante para la Integrina $\alpha 5$ y se cultivaron en presencia de SHH, una proteína que actúa de manera similar a IHH. Bajo estas condiciones, la aparición de la articulación ectópica se bloqueó y los condrocitos prehipertróficos se desarrollan (figura 18c), correlacionando con la inhibición de la expresión de *Wnt-14* (figura 18d). Resultados similares se obtuvieron en cultivos con BMP7 en el medio de cultivo.

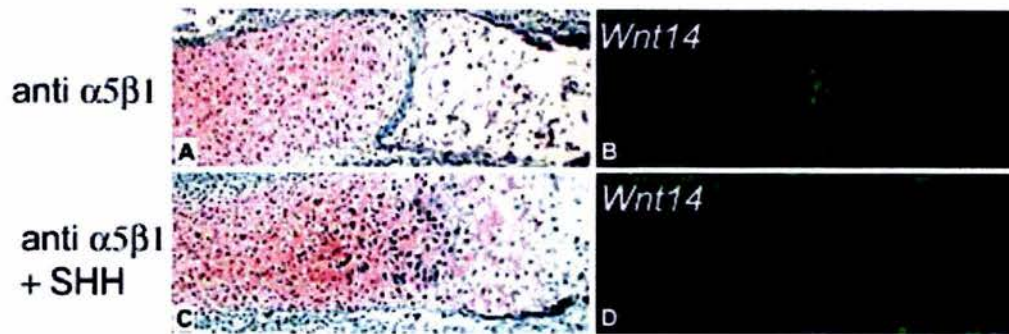


Figura 18 . La señal Hedgehog regula la formación de articulaciones. Cortes histológicos de las extremidades anteriores de embriones de ratón microinyectadas con 10 μ g de anticuerpo neutralizante para la Integrina $\alpha 5$, y cultivadas durante cuatro días. Cultivos sin tratamiento (A-B) y con tratamiento de 400 ng/ml de Sonic Hedgehog (C-D). Los cortes histológicos se tiñeron con Safranina O y Verde rápido (A y C), o se procesaron para hibridación *in situ* para *Wnt-14* (B y D). 200 aumentos.

Estos resultados sugieren que durante la formación de las articulaciones del esqueleto en desarrollo, se requiere de la represión de la expresión de la Integrina $\alpha 5\beta 1$; de esta manera, los condrocitos en proliferación no prosiguen su programa de diferenciación hacia cartílago prehipertrófico y en cambio siguen su destino hacia el programa de cartílago prearticular. De esta forma, el destino de los condrocitos en proliferación hacia el programa de prehipertrofia o de articulaciones depende de la presencia o ausencia de la Integrina $\alpha 5\beta 1$.

DISCUSIÓN

La adhesión celular mediada por Integrinas es un proceso importante durante la diferenciación celular, la arquitectura tisular y la morfogénesis (Gumbiner, 1996). El conocimiento del papel de las diferentes Integrinas en la diferenciación del cartílago es escaso, sin embargo existen estudios del patrón de expresión de algunas Integrinas en el cartílago y durante la formación de condensaciones precartilaginosas (Shakibaei, 1995; Shakibaei, 1998). En otros trabajos se muestra que las Integrinas $\beta 1$ son requeridas para que los condrocitos hipertróficos expresen Colágena X (Hirsch, 1998). Recientemente se encontró que la forma inactiva del gen de la Integrina $\beta 1$ bajo el promotor de la Colágena II, causa la inhibición de la proliferación de los condrocitos, altera el arreglo en columnas de las células y produce condrodisplasias (Aszodi et al, 2003). Sin embargo, no se conoce como participan las Integrinas durante la formación del patrón esquelético y durante la formación de las articulaciones.

La Integrina $\alpha 5\beta 1$ coordina la diferenciación de los condrocitos y la formación de articulaciones durante el desarrollo del esqueleto.

El presente estudio muestra por primera vez que la interacción de las Integrinas $\alpha 5\beta 1$ con sus ligandos mediante el dominio RGD, regula la formación de las articulaciones y la diferenciación del cartílago. El bloquear la Integrina $\alpha 5\beta 1$ resulta en la expresión de *Wnt-14* y la formación de una articulación ectópica. Existen evidencias de que la señalización Wnt/ β -catenina es suficiente y necesaria para la formación de articulaciones sinoviales (Guo et al, 2004), pero hasta el momento, sólo se sabe que *Wnt-14* es el inductor más temprano de las articulaciones (Hartmann y Tabin, 2001). Cuando se expresa ectopicamente *Wnt-14* en condrocitos, las células pierden su fenotipo típico y forman la interzona, una región de capas de células aplanadas y pequeñas que expresan *Gdf-5*, *Autotaxina*, *Cordina*, *CD44* y Colágena tipo III (Edwards et al, 1994; Bächner et al,

1999; Francis-West et al, 1999; Merino et al, 1999; Storm y Kingsley, 1999); estas células darán origen a las diferentes estructuras de la articulación. Al igual que la sobreexpresión de *Wnt-14*, el bloqueo de las Integrinas $\alpha 5\beta 1$ también provoca la pérdida del fenotipo diferenciado de los condrocitos y la aparición de una estructura semejante a la interzona. Estos resultados nos sugieren que las Integrinas podrían regular la señal de *Wnt-14* durante la diferenciación de los condrocitos hacia la prehipertrofia. Cuando los condrocitos disminuyen la expresión de la Integrina $\alpha 5$, entonces los condrocitos en proliferación entrarán al programa de articulaciones y como consecuencia se induce la expresión de *Wnt-14* disparando la cascada molecular que lleva a formación de las articulaciones. Este hecho se ve apoyado por el patrón de expresión de la Integrina $\alpha 5$ y de *Wnt-14*, los cuales son complementarios, es decir, mutuamente excluyentes. Sin embargo, no es claro qué hecho controla la disminución de la expresión de las Integrinas y/o induce la expresión de *Wnt-14* en la región de las futuras articulaciones.

El papel de las Integrinas durante la morfogénesis del esqueleto puede ser el siguiente. Las Integrinas $\alpha 5\beta 1$ participan en la proliferación de los condrocitos durante el crecimiento del elemento esquelético. En determinado momento, cuando cambia el balance entre señales de diferenciación del cartílago como FGFs, PTHrP e IHH, los condrocitos disminuyen su actividad proliferativa y ahora las Integrinas $\alpha 5\beta 1$ contribuyen en la diferenciación de los condrocitos hacia la prehipertrofia e hipertrofia. Por el contrario, en ausencia de las Integrinas $\alpha 5\beta 1$, los condrocitos en proliferación en vez de iniciar la prehipertrofia son susceptibles a cambiar su destino celular.

Los hallazgos de este trabajo indican que las interacciones mediadas por Integrinas entre las células y la matriz extracelular coordinan la diferenciación del cartílago con la formación de articulaciones. Es decir, la formación de las articulaciones y el desarrollo de la placa de crecimiento son procesos altamente

integrados, que establecen de alguna forma el patrón del esqueleto al controlar el tamaño de cada cartílago del esqueleto embrionario.

Existen diversos patrones de señalización que convergen en la placa de crecimiento. En este trabajo se sugiere que la Integrina $\alpha 5\beta 1$ es otra de las moléculas necesarias en la regulación del crecimiento y diferenciación de los condrocitos de la placa de crecimiento. Cuando se bloquean estos receptores de la MEC, se provoca un cambio en el programa de diferenciación de los condrocitos, impidiendo su progresión a la etapa hipertrófica y se modifica su programa de diferenciación hacia cartílago prearticular.

El bloqueo de las Integrinas inhibe la expresión de la Colágena tipo II e IHH que se presentan en la región del cartílago prehipertrófico. Esta zona además presenta la expresión de receptor PPR en lugar del IHH (dato no mostrado), lo cual puede ser una evidencia que estos condrocitos, cuando vuelven a expresar la Integrina $\alpha 5$ después de haberse formado la articulación, se convierten en cartílago articular. Se establece así, una nueva frontera entre dos elementos esqueléticos de cartílago. Está bien establecido que la pérdida de IHH delimita la transición de los condrocitos prehipertróficos a hipertróficos, ya que IHH es necesario para el paso a la hipertrofia de los condrocitos. Así, la disminución de la expresión de IHH cuando se bloquean las Integrinas $\alpha 5\beta 1$, sugiere que las Integrinas inducen la expresión o estabilizan la señalización de IHH para mantener el fenotipo de los condrocitos prehipertróficos y de esa forma progresen a las etapas terminales de diferenciación. Esto concuerda con un trabajo donde se plantea que IHH forma parte de un complejo de mecanotransducción, que depende de la adhesión celular para transducir señales, principalmente de proliferación celular (Wu et al, 2001).

Otro de los factores inhibidos al bloquear la Integrina $\alpha 5$ es el FGR3 (datos no mostrados), lo cual coincide con el hecho de que esta región pierde la capacidad de inhibir la proliferación de los condrocitos y permitir su avance hacia la hipertrofia. La señal de FGFs al parecer, debe inhibirse para que una articulación se forme; ya que cuando se sobreexpresa la forma constitutivamente

activa del gen *Ffgr3* en una articulación en desarrollo, ésta no se forma (Wang et al, 2001). Esta señal puede ser importante no solo para frenar la actividad proliferativa de los condrocitos, sino también para mantener las células comprometidas a la hipertrofia y que no cambien su programa de diferenciación. Así, el bloqueo del programa de diferenciación de los condrocitos prehipertróficos, aparentemente es un requerimiento importante para la formación de las articulaciones de los elementos esqueléticos. Si bien WNT-14 es la señal inductora de la formación de articulaciones, la ausencia de la señalización de las Integrinas $\alpha5\beta1$ es una señal permisiva para el desarrollo de las articulaciones, y con ello se inicia la formación de la interzona. Sin embargo, no es muy claro que señal ocurre primero, pero es muy probable que sean señales simultáneas y coordinadas.

Por último, la expresión del RNAm de *Gdf-5* se restringe a la interzona donde se sintetiza la proteína; a su vez, esta molécula podría difundirse hacia el cartílago prearticular recién formado. Existen trabajos que muestran que las BMPs inducen la expresión de Integrinas, de tal forma que cuando las células prearticulares vuelven a expresar la Integrina $\alpha5$, posiblemente por la acción de GDF-5 se induce la proliferación del cartílago y favorece la consolidación del cartílago articular. Esto además podría prevenir la formación de otra articulación muy cerca de la recientemente formada (Hartmann y Tabin, 2001).

Los condrocitos en proliferación son un tipo celular que puede diferenciarse hacia dos destinos celulares en función de las Integrinas $\alpha5\beta1$.

Un descubrimiento sobresaliente de nuestro estudio y de interés para comprender los mecanismos de la formación de las articulaciones, es la diferencia estructural entre las articulaciones normales y las ectópicas inducidas por el bloqueo de las Integrinas. Las articulaciones normales están flanqueadas por placas de crecimiento con condrocitos en proliferación más cercanos a las terminaciones articulares, y los condrocitos hipertróficos más alejados de las

articulaciones. En contraste, las articulaciones ectópicas se forman entre los condrocitos en proliferación y los condrocitos hipertróficos, debido a la desaparición de los condrocitos prehipertróficos. Posiblemente, cuando las condensaciones cartilagosas (las cuales están formadas completamente de condrocitos en proliferación) alcanzan un tamaño en particular, por alguna razón que aún se desconoce, las células del centro de la condensación del elemento cartilaginoso salen del ciclo celular (Karaplis et al, 1994; Schipani et al, 1997; Rossi et al, 2002). Cuando estas células dejan de proliferar, tienen dos destinos alternativos de diferenciación. Uno de esos destinos es la diferenciación a condrocitos prearticulares, de tal forma que cuando el molde esquelético inicial de cartílago se establece, las condensaciones que alcanzan este tamaño crítico inician la formación de la articulación desde el centro. El otro destino a elegir es la diferenciación hacia condrocitos prehipertróficos, de tal manera que, una vez que los moldes esqueléticos se establecen, cuando los elementos esqueléticos alcanzan de nuevo un tamaño crítico, las células del centro, en vez de convertirse en células prearticulares, adoptan el destino alternativo de convertirse en células prehipertróficas, y finalmente alcanzan la vía hacia la hipertrofia y la eventual osificación. Nuestros datos muestran que la sobreexpresión de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ en extremidades de pollo, inhibe la formación de las articulaciones naturales y promueve la diferenciación de los condrocitos en proliferación hacia la ruta de la prehipertrofia.

Así, la decisión de adoptar tal destino celular cuando salen del ciclo celular, a células prearticulares o prehipertróficas, puede explicarse debido a la presencia o ausencia de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ en los condrocitos postmitóticos y/o del pericondrio.

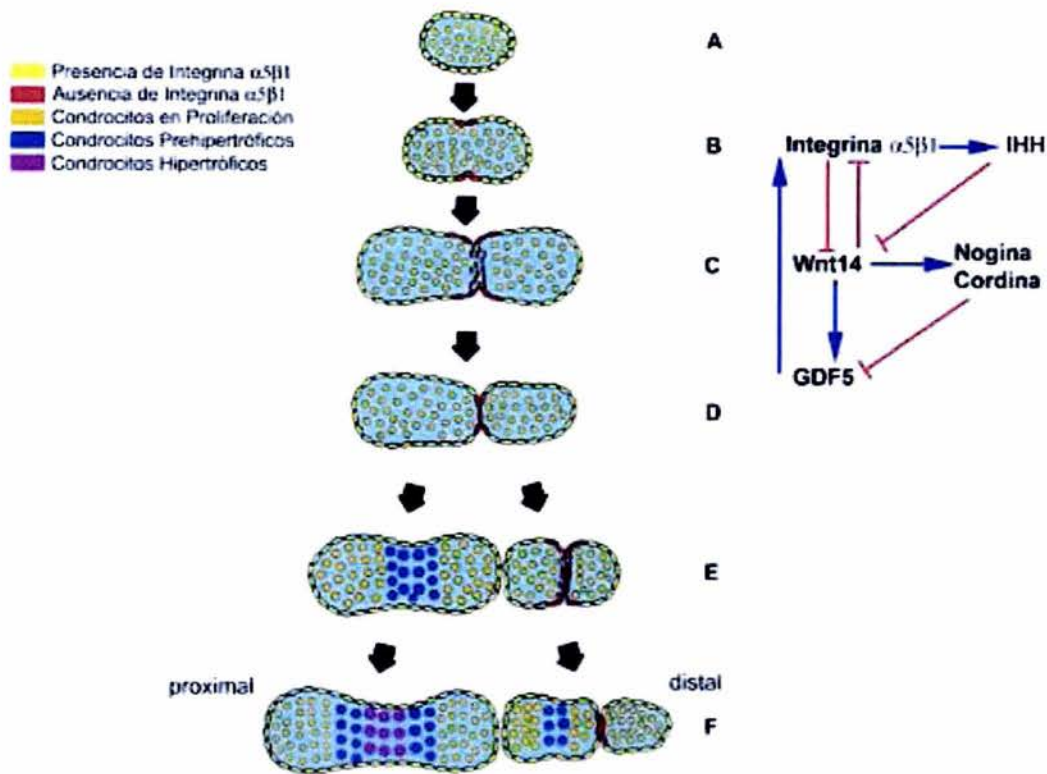


Figura 19. Coordinación de la formación de articulaciones y la diferenciación del cartílago por la Integrina $\alpha 5 \beta 1$ durante el desarrollo del esqueleto apendicular. (A-D) Elementos esqueléticos conformados por condrocitos en proliferación. (A) La diferenciación del Cartílago inicia con la agregación de mesénquima precondrogénico. (B-D) Cuando el elemento esquelético alcanza cierto tamaño los células desde el centro de la condensación salen del ciclo celular, si la Integrina $\alpha 5 \beta 1$ se inhibe en el pericondrio, los condrocitos en proliferación se dirigen hacia el programa de las articulaciones, y delimitan la frontera entre cada elemento esquelético. (E, F) Una vez que se ha segmentado el elemento esquelético, cada nuevo elemento continúa su desarrollo. Entonces el elemento más proximal del esqueleto apendicular mantiene la expresión de la Integrina $\alpha 5 \beta 1$ en el pericondrio y los condrocitos en proliferación se vuelven prehipertrofos, y llegan a la hipertrofia y eventualmente a la osificación. En el elemento más distal, se repiten los pasos (B-D) para generar nuevos elementos de cartílago individuales. La acción de las BMP para promover la formación de articulaciones o la maduración del cartílago depende de la presencia de la presencia de la Integrina $\alpha 5 \beta 1$ en el pericondrio. A la derecha se muestra un esquema que muestra la regulación de la señalización entre las Integrinas y Wnt-14. Donde las integrinas promueven la diferenciación de los condrocitos, mientras que la señalización Wnt induce la formación de articulaciones. Estos procesos son complementarios durante la morfogénesis del esqueleto.

El pericondrio podría ser el tipo celular que dirige la formación de las articulaciones

Los descubrimientos de este estudio sugieren que el pericondrio podría también jugar un papel importante en la formación de articulaciones. En apoyo a esta interpretación, Aszodi y colaboradores observaron que las articulaciones se desarrollan normalmente en ratones deficientes de la Integrina $\beta 1$ bajo el control del promotor de Colágena tipo II (Aszodi et al, 2003). Es importante recalcar que la Colágena tipo II se expresa en todos los condrocitos pero no en el pericondrio. Así, la fuerte expresión que observamos de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ en el pericondrio de los elementos esqueléticos podría controlar la diferenciación de los condrocitos prehipertróficos y esta expresión no se afecta por la ausencia de la Integrina $\beta 1$ en las células que expresen Colágena tipo II en los ratones deficientes de la Integrina $\beta 1$. Con estos fundamentos, el efecto de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ en la formación de las articulaciones ectópicas y la inhibición de las células prehipertróficas podría ser mediada por el pericondrio. Además, los experimentos de rescate de este estudio con la proteína SHH revelaron que la señalización de hedgehog inhibe la formación de articulaciones ectópicas. Dado que el pericondrio expresa *Patched*, el cual es considerado el principal blanco del señalamiento de IHH, podría ser que la inhibición de la articulación ectópica por el efecto del SHH exógeno esté mediado por el pericondrio. Sin embargo, también cabe la posibilidad que sea un efecto directo de SHH sobre los condrocitos prehipertróficos (Long et al, 2001).

De acuerdo con la hipótesis descrita arriba, la articulación ectópica inducida por el bloqueo de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ muestra la morfología de un espacio perpendicular al eje del hueso. Este patrón de articulación difiere del observado por Hartmann y Tabin (2001) en experimentos donde se expresa ectopicamente *Wnt-14*. La articulación inducida por la sobreexpresión de *Wnt-14* se extiende por todo el rudimento de cartílago y muy probablemente sea debido a las señales instructivas emitidas por *Wnt-14* que induce los genes blancos de la vía de articulaciones en todas las células del cartílago que expresan este gen. Está bien

establecido que la misma Integrina es capaz de inducir respuestas celulares muy diferentes dependiendo del tipo celular en el que se expresan. Por ejemplo, la unión de Integrina $\alpha 5\beta 1$ a fibronectina permite la sobrevivencia de fibroblastos (Aplin et al, 1999); en células mamarias, conduce a la producción de leche (Schmidhauser et al, 1990); y en leucocitos permite la migración a través del endotelio y la producción de citocinas (Rosales y Juliano, 1995). Así, aunque el patrón de expresión de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ en el cartílago de las extremidades en desarrollo es muy extendido, nosotros no encontramos un efecto difuso como el descrito con la sobreexpresión de *Wnt-14*, es decir, las células que expresan la Integrina $\alpha 5\beta 1$ responden de manera diferente en función de otras señales que convergen en cierto momento y espacio. Así, la presencia o ausencia de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ en el pericondrio puede influir en la decisión para que una célula adopte un destino prehipertrófico o prearticular. Como se sabe, existe una comunicación de señales muy estrecha entre el pericondrio (PTHrP y FGF-18) y los condrocitos proliferación y prehipertróficos (IHH), con lo cual se regula la longitud de los elementos esqueléticos de cartílago. Así, cuando una población horizontal y local de condrocitos en proliferación salen del ciclo celular, esta población se diferencia en conjunto hacia un destino prehipertrófico cuando expresan la Integrina $\alpha 5\beta 1$, y cuando no la expresan, se diferencian en condrocitos prearticulares. Por ello, el bloqueo de las Integrinas produce articulaciones perpendiculares a lo largo del eje del elemento esquelético. En este sentido, las Integrinas modulan la respuesta a otras señales como lo sugieren Aplin y colaboradores (Aplin et al, 1998).

Por último, es probable que las células del pericondrio migren hacia la región de la interzona, para completar la separación de los elementos esqueléticos. Como hemos visto, la Autotaxina (ATX) se expresa en la interzona por donde posiblemente estén migrando las células. La ATX es la Lisofosfolipasa D, una enzima que interviene en la síntesis extracelular del ácido Lisofosfatídico (LPA); el LPA se une a una proteína G de la membrana celular, la cual activa la

señalización mediada por la GTPasa Rho que promueve la migración celular. Se ha estudiado que factores de la familia Wnt inducen la expresión de ATX, y que la ATX promueve la migración celular y la metástasis (Nam et al, 2001)

El papel de las BMP durante la formación de las articulaciones

Las BMP y otros miembros de la familia del TGF- β pueden tener efectos muy diferentes dependiendo del tipo celular en el que actúan; esto depende tal vez del tipo de receptores que posee la célula. Por ejemplo, la BMP puede inducir muerte celular en los interdígitos y condrogénesis en los dígitos durante la formación de la mano (Merino et al, 1999). La sobreexpresión de varios miembros de la familia de BMPs y la inactivación de su antagonista Nogina producen articulaciones fusionadas (Brunet et al, 1998). Además, se ha propuesto que las BMP-2 y BMP-4 pueden determinar la forma y tamaño de los elementos esqueléticos de la mano (Duprez et al, 1996). Así mismo, se ha asociado a la BMP-7 con la formación de las articulaciones (Macias et al, 1997). Esto podría explicar por qué se potencia la formación de las articulaciones al bloquear las Integrinas $\alpha 5\beta 1$ acompañado de la adición de BMP-7. Durante el desarrollo de una articulación normal, las células del cartílago en proliferación y prehipertrófico (que expresan la Integrina $\alpha 5$) responden a las BMP proliferando y diferenciándose, respectivamente. Tal vez las células de la interzona, que no expresan la integrina $\alpha 5\beta 1$ responden de manera diferente a las BMP que las del cartílago prehipertrófico, esto bloquea la diferenciación celular, induce la muerte celular y la segmentación del cartílago del esqueleto en desarrollo. Por eso, en la articulación ectópica queda un extremo con una mayor parte de cartílago hipertrófico que ya se había diferenciado y respondió de manera diferente a la BMP-7.

En este sentido, un descubrimiento de nuestro estudio es que la respuesta de los condrocitos al señalamiento de las BMP está regulado por las Integrinas. En las extremidades normales, como ya se mencionó, los tratamientos con BMP provocan condrogénesis intensa y la inhibición de la formación de articulaciones.

Por el contrario, en nuestros experimentos, al bloquear las Integrinas y agregar BMP al medio de cultivo, se inhibió la diferenciación de las células prehipertróficas y potenció la formación de articulaciones ectópicas. El que la BMP-7 potencie la formación de las articulaciones correlaciona con la expresión de varios genes de *Bmp* en las articulaciones en desarrollo; sin embargo, es difícil explicar por qué los genes *Bmp* se expresan en las articulaciones si la aplicación directa de BMPs en la articulación en desarrollo bloquea la formación de la articulación. De acuerdo a nuestros resultados en ausencia de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ el señalamiento de BMP puede dirigir a los condrocitos en proliferación al programa de la articulación. Por el contrario, en presencia de la Integrina $\alpha 5\beta 1$, el señalamiento de BMP dirige a los condrocitos en proliferación al programa de la prehipertrofia y expresan *Ihh*. Sin embargo, no es muy claro si esta modulación a la respuesta de BMP es intrínseca de las diferentes etapas de diferenciación de los condrocitos del cartílago, o es mediada a través del pericondrio.

CONCLUSIONES

El bloqueo de las Integrinas $\alpha 5\beta 1$ induce la formación de articulaciones ectópicas; esto es debido a que estas Integrinas mantienen el fenotipo diferenciado del cartílago prehipertrófico, la estructura del cartílago de la placa de crecimiento y el crecimiento de los huesos largos.

Las Integrinas $\alpha 5\beta 1$ permiten el progreso de los condrocitos en proliferación hacia condrocitos prehipertróficos mediante la acción de IHH.

Las células de la interzona no presentan la Integrina $\alpha 5$, este hecho posibilita que estas células que han abandonado el programa de diferenciación a condrocitos prehipertróficos continúen su diferenciación hacia condrocitos prearticulares. Además de la desaparición de la Integrina $\alpha 5$, ocurre la expresión de *Wnt-14*, el cual es el inductor más temprano de las articulaciones.

La acción del BMP-7 tiene efectos diferentes en las células del cartílago y en las células de la interzona. En el primer caso aumenta la diferenciación y en el otro potencia la formación de las articulaciones. Esto está en función de la presencia o ausencia de la integrina $\alpha 5\beta 1$.

La sobreexpresión de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ en el cartílago resulta en la fusión de los elementos esqueléticos, resultado de un marcado aumento de la diferenciación celular de condrocitos prehipertróficos, lo que lleva a la inhibición de la formación de articulaciones. Este hecho sugiere que la diferenciación del cartílago y la formación de articulaciones son procesos que se regulan mutuamente y esta regulación esta coordinada por la Integrina $\alpha 5\beta 1$.

PERSPECTIVAS

Es interesante conocer con más precisión el papel de las BMP en la regulación de la formación de las articulaciones. Por ejemplo, no está muy claro qué tipos celulares responden de manera diferente al señalamiento de las BMP. Inclusive, si es una respuesta directa de las células del cartílago o, por ejemplo, esta respuesta está mediada por las señales del pericondrio.

Por eso, es interesante conocer si la decisión de las células de seguir su destino hacia cartílago prehipertrófico o prearticular es una característica intrínseca de estas células preespecificadas, o es una señal extrínseca la que determina su destino celular. Más aún, tampoco está bien establecido si el origen de las células prearticulares se originan del molde primario de cartílago a partir de células que cambiaron su destino, o bien, si el origen de estas células es de otro tejido, por ejemplo, células del pericondrio que migran hacia la interzona. La expresión de Autotaxina en la interzona, sugiere que la migración podría ser un proceso importante durante la formación de las articulaciones.

De igual manera, se desconoce como se determina la posición de una articulación, aunque sabemos que es un proceso coordinado con la proliferación y diferenciación de los condrocitos. En ese sentido, resulta muy interesante el patrón de expresión de *Wnt-4* en los flancos de las articulaciones y de *Wnt-16* en las articulaciones, es por ello que tenemos que conocer cual es su papel durante la formación de las articulaciones.

De cualquier manera, el proceso de la articulación del esqueleto es un área que tiene muchas interrogantes por responder.

REFERENCIAS

Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A y de Crombrughe B. (2002). The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes & Dev.* 16, 2813-2828.

Akiyama H, Shigeno C, Iyama K, Ito H, Hiraki Y, Konoshi J y Nakamura T. (1999). Indian hedgehog in the late-phase differentiation in mouse chondrogenic EC cells, ATDC5: Upregulation of type X collagen and osteoprotegerin ligand mRNAs. *Biochem Biophys Res Commun.* 257, 814-820.

Aplin AE, Howe A y Juliano RL. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharm. Rev.* 50, 197-263.

Aplin AE, Short SM y Juliano RL. (1999). Anchorage-dependent regulation of the mitogen-activated protein kinase cascade by growth factors is supported by a variety of integrin alpha chains. *J. Biol. Chem.* 274, 31223-31228.

Archer CW, Douthwaite GP y Francis-West P. (2003). Development of synovial joints. *Birth Defects Res (Part C).* 69, 144-155.

Aszodi A, Hunzinker E, Brakebusch C y Fässler R. (2003). β 1 integrins regulate chondrocyte rotation, G1 progression, and cytokinesis. *Genes & Dev.* 17, 2465-2479.

Bachiller D, Klingensmith J, Shneyder N, Tran U, Anderson R, Rossant J y De Robertis EM. (2003) The role of chordin/Bmp signals in mammalian pharyngeal development and DiGeorge syndrome. *Development.* 130, 3567-78.

Bächner D, Ahrens M, Betat N, Schroder D y Gross G. (1999) Developmental expression analysis of murine autotaxin (ATX). *Mech. Dev.* 84, 121-125.

Barbieri O, Astigiano S, Morini M, Tavella S, Schito A, Corsi A, Di Martino D, Bianco P, Cancedda R y Garofalo S. (2003). Depletion of cartilage collagen fibrils in mice carrying a dominant negative Col2a1 transgene affects chondrocyte differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 285, C1504-C1512.

Bell DM, Leung KK, Wheatley SC, Ng LJ, Zhou S, Ling KW, Sham MH, Koopman P, Tam PP y Cheah KS. (1997). SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet.* 16(2), 174-178.

Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR y de Crombrughe B. (1999). Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet.* 22(1), 85-9.

Bianco P, Descalzi Cancedda F, Riminucci M y Cancedda R. (1998). Bone formation via cartilage models: The borderline chondrocyte. *Matrix Biol.* 17, 185-192.

Blair H, Zaidi M y Schlesinger P. (2002). Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation. *Biochem J.* 364, 329-341.

Bokel C y Brown N. (2002). Integrins in development: moving on, responding to, and sticking to the extracellular matrix. *Dev Cell.* 3, 311-21.

Bouvard D, Brakebush C, Gustafsson E, Aszodi A, Bengtsson T, Berna A y Fässler R. (2001). Functional consequences of integrin gene mutations in mice. *Circ Res.* 89, 211-223.

Brown KE y Yamada KM. (1995). The role of integrins during vertebrate development. *Dev Biol.* 6, 69-77.

Brunet L, McMahon J, McMahon A y Harland R. (1998). Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science.* 280, 1455-1457.

Burke AC, Nelson CE, Morgan BA y Tabin C. (1995). Hox genes and evolution of vertebrate axial morphology. *Development.* 121, 333-346.

Chan D y Jacenko D. (1998). Phenotypic and biochemical consequences of collagen X mutation in mice and Human. *Matrix Biol.* 17, 169-184.

Charbonneau N, Ono R, Corson G, Keene D y Sakai L. (2004). Fine tuning of growth factor signal depends on fibrillin microfibril networks. *Birth Defects Res.* 72, 37-50.

Church V, Nohno T, Linker C, Marcelle C y Francis-West P. (2002). Wnt regulation of chondrocyte differentiation. *J Cell Science.* 115, 4809-4818.

Coleman C y Tuan R. (2003). Growth/Differentiation factor 5 enhances chondrocyte maturation. *Dev Dyn.* 228, 208-216.

Colnot C, Lu C, Hu D y Helms JA. (2004). Distinguishing the contributions of the perichondrium, cartilage, and vascular endothelium to skeletal development. *Dev Biol.* 269, 55-69.

Craig FM, Bentley G y Archer CW. (1987). The spatial and temporal pattern of collagens I and II and keratin sulphate in the developing chick metatarsophalangeal joint. *Development.* 99, 383-391.

Crossley PH, Monowada G, McArthur CA y Martin GR. (1996). Roles of FGF-8 in the induction, initiation and maintenance of chick development of the tetrapod limb. *Cell.* 84, 127-136.

Daluisi A, Engstrand T, Bahamonde M, Gamer L, Agius E, Stevenson S, Cox K, Rosen V y Lyons K. (2001). Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nat Genet.* 27, 84-88.

Delay CN, Roth A, Ferrari D, Brown A y Kosher R. (1993). *Wnt-5a* and *Wnt-7a* are expressed in the developing chick limb bud in a manner that suggest roles in pattern formation along the proximodistal and dorsoventral axes. *Mech Dev.* 43, 175-186.

Delezoide A, Bernoist C, Legai L, Le Ferrer M, Munich A, Vekamans M y Bonaventure J. (1998). Spatio-temporal expression of FGFR 1, 2, and 3 genes during human embryo-fetal ossification. *Mech Dev.* 77, 19-30.

De Luca F, Barnes KM, Uyeda JA, De-Levi S, Abad V, Palese T, Mericq V y Baron J. (2001). Regulation of growth plate chondrogenesis by bone morphogenetic protein-2. *Endocrinology.* 142, 430-436.

Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A y Leder P. (1996). Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell.* 84, 911-921.

Dowthwaite G, Flannery C, Flannelly J, Lewthwaite J, Archer C y Pitsillides A. (2003). A mechanism underlying the movement requirement for synovial joint cavitation. *Matrix Biol.* 22, 311-322.

Dudley AT, Ros MA y Tabin CJ. (2002). A re-examination of proximodistal patterning during vertebrate limb development. *Nature.* 418, 539-544.

Ducy P y Karsenty G. (1998). Genetic control of cell differentiation in the skeleton. *Curr Op Cell Biol.* 10, 614-619.

Duprez D, Bell E.J, Richardson MK, Archer CW, Wolpert L, Brickell PM y Francis-West PH. (1996). Overexpression of BMP-2 and BMP-4 alters the size and shape of developing skeletal elements in the chick limb. *Mech Dev.* 57, 145-57.

Dürr J, Goodman S, Potocnik A, Von der Mark H y Von der Mark K. (1993). Localization of β 1-integrins in human cartilage and their role in chondrocyte adhesion to collagen and fibronectin. *Exp Cell Res.* 207, 235-244.

Edwards JC, Wilkinson LS, Jones HM, Soothill P, Henderson KJ, Worrall JG y Pitsillides AA. (1994). The formation of human synovial joint cavities: A possible role for hyaluronan and CD44 in altered interzone cohesion. *J Anat.* 185, 355-367.

Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Nakashima K, Mukudai Y, Boettiger D, Pacifici M, Kurisu K y Suzuki F. (1997). Involvement of α 5 β 1 integrin in matrix interactions and proliferation of chondrocytes. *J Bone Min Res.* 12, 1124-1132.

Fässler R y Meyer M. (1995). Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev.* 9, 1896-908.

Fell HB y Canti RG. (1934). Experiments on development *in vitro* of the avian knee-joint. *Proc. Roy. Soc. B.* 116, 316-351.

Francis-West P, Abdelfattah A, Chen P, Allen C, Parish J, Ladher R, Allen S, MacPherson S, Luyten F y Archer CW. (1999a). Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. *Development* 126, 1305-1315.

Francis-West P, Parish J, Lee K y Archer CW. (1999b). BMP/GDF-signalling interactions during synovial joint development. *Cell. Tissue Res.* 296, 111-119.

Giancotti FG y Ruoslahti E. (1990). Elevated levels of the α 5 β 1 fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells. *Cell* 60, 849-859.

Gilbert SF. (2000). *Development Biology*, 6a ed, Sinauer Associates Inc, Sunderland Massachusetts, USA. 749 pp.

Gumbiner BM. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84, 345-357.

Guo X, Day TF, Jiang X, Garrett-Beal L, Topol L y Yang Y. (2004). Wnt/ β -catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation. *Genes & Dev.* 18, 2404-2417.

Haaijman A, Burger E, Goei S, Nelles L, ten Dijke P, Huylebroeck D y Bonckers A. (2000). Correlation between ALK-6 (BMP-IB) distribution and responsiveness to osteogenic protein-I (BMP-7) in embryonic mouse bone rudiments. *Growth Factors.* 17, 177-192.

Hall BK y Miyake T. (2000). All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *BioEssays* 22,138-147.

Hamburger V y Hamilton HL. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Exp. Morphol.* 88, 49-92.

Harfe B, Scherz P, Nissim S, Tian H, McMahon A y Tabin C. (2004). Evidence for an expansion based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell.* 118, 517-528.

Hartmann C y Tabin C. (2000). Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb. *Development* 127, 3141-3159.

Hartmann C y Tabin C. (2001). Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton. *Cell* 104, 341-351.

Helminen HJ, Kiraly K, Peltari A, Tammi MI, Vandenberg P, Pereira R, Dhulipala R, Khillan JS, Ala-Kokko L, Hume EL, and Prockop DJ. (1993). An inbred line of transgenic mice expressing an internally deleted gene for type II procollagen (C.OL2 α 1). Young mice have a variable phenotype of a chondrodysplasia and older mice have osteoarthritic changes in joints. *J Clin Invest.* 92, 582-595.

Hernández-Lagunas L, Chimal-Monroy J y Díaz de León L. (1998). Retinoic acid modulates the expresión of integrins in rat sternal chondrocytes *in vitro*. En: Morphogenesis: cellular interactions. *Ann NY Acad Sci.* 857, 237-240.

Hirsch MS, Lunsford LE, Trinkaus-Randall V y Svoboda KH. (1997). Chondrocyte survival and differentiation in situ are integrin mediated. *Dev Dynamics*. 210, 249-263.

Holder N. (1977). An experimental investigation into the early development of the chick elbow joint. *J. Embryol Exp. Morph*. 39, 115-127.

Holten I, Smith A, Bourne A y David D. (1997). The apert syndrome hand: pathologic anatomy and clinical manifestations. *Plast Reconstr Surg*. 99, 1681-1687.

Horton WA. (1993). Morphology of connective tissue: Cartilage. En: *Connective Tissue and Its Heritable Disorders*. Ed. Wiley-Liss, Inc. 73-84.

Hynes R. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-87.

Inada M, Yasui T, Nomura S, Miyake S, Deguchi K, Himeno M, Sato M, Yamagiwa H, Kunmura T y Yasui N. (1999). Mutational disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Dev Dyn*. 214, 279-290.

Ingham P y McMahon A. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & Dev*. 15, 3059-3087.

Karaplis AC, Luz A, Glowacki J, Bronson RT, Tybulewicz VL, Kronenberg HM y Mulligan RC. (1994). Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev*. 8, 277-289.

Karp SJ, Schipani E, St-Jacques B, Hunzelman J, Kronenberg H y McMahon AP. (2000). Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and-independent pathways. *Development*. 127, 543-548.

Karsenty G. (1998). Genetics of skeletogenesis. *Dev Genetics*. 23, 301-313.

Karsenty G y Wagner E. (2002). Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell*. 2, 389-406.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Kato M. (2002). Molecular cloning and expression of mouse Wnt14, and structural comparison between mouse Wnt14-Wnt3a gene cluster and human WNT14-WNT3a gene cluster. *Int J Mol Med.* 9, 221-7.

Kavanagh E, Abiri M, Bland YS y Ashhurst DE. (2002). Division and death of cell in developing synovial joints and long bones. *Cell Biol Int.* 26, 679-688.

Kawakami Y, Capdevila J, Büscher D, Itoh T, Esteban CR y Belmonte JC. (2001). WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. *Cell.* 104, 891-900.

Kawakami Y, Nishimatsu N, Ishikawa S, Noji T y Nohno T. (1999). Involvement of Wnt-5a in chondrogenic pattern formation in the chick limb bud. *Dev Growth Differ.* 41, 29-40.

Kingsley D. (2001). Genetic control of bone and joint formation. *Novartis Found Symp.* 232, 213-222.

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Inada et al. (1997). Target disruption of Cbfa1 results in complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell.* 89, 755-764.

Kwang KM, Pang M, Zhou S, Cowan S, Kong R, Pfordte T, Olsen B, Sillence D, Tam P y Cheah K. (1997). Abnormal compartmentalization of cartilage matrix components in mice lacking collagen X: implications for function. *J Cell Biol.* 136, 459-471.

Lanske B, Karaplis A, Lee K, Luz A, Vortkamp A, Pirro A, Karperien M, Defize L, Ho C, Mulligan R, Abou-Samra A, Juppner H, Segre G y Kronenberg H. (1996). PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* 273, 663-666.

Lefebvre V y De Crombrughe B. (1997). Toward understanding SOX9 function in chondrocyte differentiation. *Matrix Biol.* 98, 529-540.

Li S, Prockop D, Helminen H, Fässler R, Lapvetelainen T, Kiraly K, Peltarri A, Arokoski J, Lui H, Arita M, et al. (1995). Transgenic mice with targeted inactivation of the Col2 alpha 1 gene for collagen II develop a skeleton with membranous and periosteal bone but no endochondral bone. *Genes & Dev.* 9, 2821-2830.

Linsenmayer T, Chen Q, Gibney E, Gordon M, Marchant J, Mayne R y Schmid T. (1991). Collagen types IX and X in the developing chick tibiotarsus: analyses of mRNAs and proteins. *Development*. 111, 191-196.

Litingtung Y, Dahn RD, Li Y, Fallon JF y Chiang C. (2002). Shh and Gly3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature* 418, 979-983.

Liu Z, Xu J, Colvin JS y Ornitz DM. (2002). Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by fibroblast growth factor 18. *Genes & Dev*. 16, 859-569.

Loeser RF, Carlson CS y McGee MP. (1995). Expression of $\beta 1$ integrins by cultured articular chondrocytes and in osteoarthritic cartilage. *Exp Cell Res*. 217, 248-257.

Long F, Zhang XM, Karp S, Yang Y y McMahon AP. (2001) Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. *Development*. 128, 5099-108.

Loomis CA, Harris E, Michaud J, Wurst W, Hanks M, Joyner AL. (1996). The mouse Engrailed-1 gene and ventral limb patterning. *Nature*. 382, 360-363.

Macias D, Ganan Y, Sampath TK, Piedra ME, Ros MA y Hurle JM. (1997). Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development*. 124, 1109-17.

Mariani FV y Martin GR. (2003). Deciphering skeletal patterning: clues from the limb. *Nature*. 423, 319-325.

Merino R, Macias D, Gañan Y, Economides A, Wang X, Wu Q, Stahl N, Sampath K, Varona P y Hurle J. (1999). Expression and function of *Gdf-5* during digit skeletogenesis in the embryonic chick leg bud. *Dev Biol*. 206, 33-45.

Minina E, Wenzel HM, Kreschel C, Karp S, Gaffield W, McMahon A y Vortkamp A. (2001). BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* 128, 4523-34.

Murakami S, Kam M, McKeehan W y de Crombrughe B. (2000). Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *PNAS*. USA. 97, 1113-1118.

Nam SW, Clai T, Kim YS, McMarlin A, Schiffmann E, Liotta LA y Stracke ML. (2001). Autotaxin (NPP-2), a metastasis-enhancing motogen, is an angiogenic factor. *Cancer Res*. 61, 6938-6944.

Naski MC, Colvin JS, Coffin JD y Ornitz DM. (1998). Repression of hedgehog signaling and BMP4 expression in growth plate cartilage by fibroblast growth factor receptor 3. *Development* 125, 4977-4988.

Neubuser A, Peters H, Balling R y Martin G. (1997). Antagonistic interactions between FGF and BMP signaling pathways: A mechanism for positioning the sites of tooth formation. *Cell*. 90, 247-255.

Nissinen L, Pirilä L y Heino J. (1997). Bone morphogenetic protein-2 is a regulator of cell adhesion. *Exp Cell Res*. 230, 377-385.

Ohbayashi N, Shibayama M, Kurotaki Y, Imanishi M, Fujimori T, Itoh N y Takada S. (2002). FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. *Genes & Dev*. 16, 870-879.

Olsen BR. (1996). Role of cartilage collagens in formation of skeleton. En: Molecular and developmental biology of cartilage. De Crombrughe B, Horton WA, Olsen BR, Ramirez F. eds. *Ann NY Acad Sci*. 785, 124-130.

Osborne A, Lamb K, Lewthwaite J, ET AL. (2002). Short-term rigid and flaccid paralyses diminish growth of embryonic chick limbs and abrogate joint cavity formation but differentially preserve pre-cavitated joints. *J Musculoskeletal Neuron Interact*. 2, 448-456.

Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp G, Beddington R, Mundlos S, Olsen B, Selby P y Owen M. (1997). *Cbfa1*, a Candidate Gene for Cleidocranial Dysplasia Syndrome, Is Essential for Osteoblast Differentiation and Bone Development. *Cell* 89, 765-771.

Parr B y McMahon A. (1995). Dorsalizing signal *wnt-7a* required for normal polarity of D-V and A-P axes of the Mouse limb. *Nature*. 374, 350-353.

Parr B, Shea M, Vassileva G y McMahon A. (1993). Mouse *Wnt* genes exhibit discrete domains of expression in early embryonic CNS and limb buds. *Development*. 119, 247-261.

Pathi S, Rutenberg J, Johnson R y Vortkamp A, (1999). Interaction of *Ihh* and BMP/Noggin signaling during cartilage differentiation. *Dev Biol*. 209, 239-253.

Pearse R y Tabin C. (1998). The molecular ZPA. *J Exp Zool*. 282, 677-690.

Piperno M, Reboul P, Hellio le Graverand M, Peschard M, Anfeld M, Richard M y Vignon E. (1998). Osteoarthritic cartilage fibrillation is associated with a decrease in chondrocyte adhesion to fibronectin. *Osteoarthritic Cartilage*. 6, 393-399.

Qian J, Jiang Z, Li M, Heaphy P, Liu YH y Shackleford GM. (2003) Mouse *Wnt9b* transforming activity, tissue-specific expression, and evolution. *Genomics*. 81, 34-46.

Reddi AH. (1994). Cartilage morphogenesis: Role of bone and cartilage morphogenetic proteins, homeobox genes and extracellular matrix. *Matrix Biol*. 599-606.

Riddle R, Johnson R, Laufer E y Tabin C. (1993). *Sonic hedgehog* mediates the polarizing activity of ZPA. *Cell*. 75, 1401-1416.

Rosales C y Juliano RL. (1995). Signal transduction by cell adhesion receptors in leukocytes. *J. Leuk. Biol*. 57, 189-198.

Rossi F, MacLean HE, Yuan W, Francis RO, Semenova E, Lin CS, Kronenberg HM y Cobrinik D. (2002). p107 and p130 Coordinately regulate proliferation, *Cbfa1* expression, and hypertrophic differentiation during endochondral bone development. *Dev Biol*. 247, 271-85.

Rousseau F, Bonaventure J, Legeai-Mallet L, Pelet A, Rozet J, Maroteaux P, Le Merrer M y Munnich A. (1994). Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature*. 371, 252-254.

Rudnicki JA y Brown AM. (1997). Inhibition of chondrogenesis by *Wnt* gene expression *in vivo* and *in vitro*. *Dev Biol*. 185, 104-118.

Sahni M, Ambrosetti D, Mansukhani A, Gertner R, Levy D y Basilico C. (1999). FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes & Dev.* 13, 1361-1366.

Saunders JW Jr. (1948). The proximal-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of ectoderm. *J. Exp. Zool.* 108, 363-404.

Schipani E, Lanske B, Hunzelman J, Luz A, Kovacs CS, Lee K, Pirro A, Kronenberg HM y Juppner H. (1997) Targeted expression of constitutively active receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide delays endochondral bone formation and rescues mice that lack parathyroid hormone-related peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 13689-94

Schmidhauser C, Bissell, MJ, Myers, CA y Casperson GF. (1990). Extracellular matrix and hormones transcriptionally regulate bovine b-casein 5' sequences in stably transfected mouse mammary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 9118-9122.

Sekine K y 10 mas. (1999). FGF10 is essential for limb and lung formation. *Nature Genet.* 21,138-141.

Settle S, Rountree R, Sinha A, Thacker A, Higgins K y Kingsley D. (2003). Multiple joint and skeletal patterning defects caused by single and double mutations in the mouse *Gdf6* and *Gdf5* genes. *Dev. Biol.* 254, 116-130.

Shakibaei M. (1998). Inhibition of chondrogenesis by integrin antibody *in vitro*. *Exp. Cell Res.* 240, 95-106.

Shakibaei M. (1995). Integrin expression on epiphyseal mouse chondrocytes in monolayer culture. *Histol Histopathol.* 10, 339-349.

Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, Church DM, Fielder TJ, Bosian M, Winokur ST y Wasmuth JJ. (1994). Mutations in the transmembrane domain of the FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell*; 78, 335-342.

Spitz F y Duboule D. (2001). Development: The art of making a joint. *Science.* 291, 1713-1714.

St-Jacques B, Hammerschmidt M y McMahon A. (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* 13, 2072-86.

Storm E, Huynh T, Copeland N, Jenkins, Kingsley D y Lee S. (1994). Limb alterations in *brachypodism* mice due to mutations in a new member of the TGF β -superfamily. *Nature* 368, 639-642.

Storm E y Kingsley D. (1996). Joint patterning defects caused by a single and double mutations in members of the bone and morphogenetic protein (BMP) family. *Development.* 122, 3969-3979.

Storm E y Kingsley D. (1999). GDF5 Coordinates bone and joint formation during digit development. *Dev. Biol.* 209, 11-27.

Stott N y Chuong C. (1997). Dual action of sonic hedgehog on chondrocytes hypertrophy: retrovirus mediated ectopic sonic hedgehog expression in limb bud micromass culture induces novel cartilage nodules that are positive for alkaline phosphatase and type X collagen. *J Cell Sci.* 110, 2691-2701.

Stricker S, Fundele R, Vortkamp A y Mundlos S. (2002). Role of Runx genes in chondrocyte differentiation. *Dev Biol.* 245, 95-108.

Summerbell D, Lewis JH y Wolpert L. (1973). Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature.* 244, 492-496.

Thomas JT, Lin K, Nandedkar M, Camargo M, Cervenka J y Luyten F. (1996). A human chondrodysplasia due to a mutation in a TGF- β superfamily member. *Nature Genetics* 12, 315-317.

Ueta C, Iwamoto M, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Enomoto-Iwamoto M, Ohmori T, Enomoto H, Nakata K, Takada K, Kurisu K y Komori T. (2001). Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfa1 or its dominant negative form in chondrocytes. *J. Cell Biol.* 153, 87-99.

Urist MR. (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science.* 150, 893-899.

Ustoa MS, Garcíadiego-Cázares D, Vargas C, Chimal-Monroy J y Díaz de León L. (1998). The spatial pattern of integrins during development of mouse articular cartilage. En: Morphogenesis: cellular interactions. *Ann NY Acad Sci.* 857, 241-244.

Vandenberg P, Khillan JS, Prockop DJ, Helminen H, Kontusaari S, and Ala-Kokko L. (1991). Expression of a partially deleted gene of human type II procollagen (COL2 α 1) in transgenic mice produces a chondrodysplasia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88, 7640–7644.

Vogel A, Rodríguez C e Izpisúa-Belmonte JC. (1996). Involvement of FGF-8 in initiation, outgrowth, and patterning of the vertebrate limb. *Development*. 122, 1737-1750.

Vortkamp A, Kaechoong L, Lanske B, Segre G, Kronenberg H y Tabin C. (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian Hedgehog and PTH-Related Protein. *Science* 273, 613-622.

Vu TH, Shipley JM, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM y Werb Z. (1998). MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 93, 411-422.

Wai A, Ling N, Watanabe H, Yamada Y, Tam P y Chea K. (1998). Disrupted expression of matrix genes in the growth plate of mouse cartilage matrix deficiency (cmd) mutant. *Dev Genetics* 22, 349-358.

Wang Q, Spatz MK, Kannan K, Hayk H, Avivi A, Goridovsky M, Pines M, Yayon A, Lonai P y Givol D. (1999). A mouse model for achondroplasia produced by targeting fibroblast growth factor receptor 3. *Exp Biol*. 96, 4455-4460.

Wang Q, Green RP, Zhao G y Ornitz DM. (2001). Differential regulation of endochondral bone growth and joint development by FGFR1 and FGFR3 tyrosine kinase domains. *Development* 128, 3867-3876.

Weaver M, Dunn N y Hogan B. (2000). Bmp4 and Fgf10 play opposing roles during lung bud morphogenesis. *Development*. 127, 2695-2704.

Wolpert L. (2002). *Principles of Development*. 2a ed. Oxford University Press. New York. USA. 542 pp.

Wozney J, Rosen B, Celeste A, Mitsock L, Whitters M, Kriz R, Hewick R y Wang E. (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*. 242, 1528-1534.

Wu Q, Zhang Y y Chen Q. (2001). Indian hedgehog is an essential component of mechanotransduction complex to stimulate chondrocyte proliferation. *J. Biol. Chem.* 276, 35290-35296.

Yang Y, Topol L, Lee H y Wu J. (2003). *Wnt5a* and *Wnt5b* exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* 130, 1003-1015.

Zou H, Weiser R, Massague J y Niswander L. (1997). Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev.* 11, 2191-2203.

Coordination of chondrocyte differentiation and joint formation by $\alpha 5\beta 1$ integrin in the developing appendicular skeleton

David Garcíadiego-Cázares¹, Carlos Rosales², Masaru Katoh³ and Jesús Chimal-Monroy^{1,*}

¹Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

²Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

³Genetics and Cell Biology Section, National Cancer Center Research Institute, Tsukiji 5-chome, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan

*Author for correspondence (e-mail: jchimal@servidor.unam.mx)

Accepted 9 July 2004

Development 131, 4735-4742

Published by The Company of Biologists 2004

doi:10.1242/dev.01345

Summary

The control point by which chondrocytes take the decision between the cartilage differentiation program or the joint formation program is unknown. Here, we have investigated the effect of $\alpha 5\beta 1$ integrin inhibitors and bone morphogenetic protein (BMP) on joint formation. Blocking of $\alpha 5\beta 1$ integrin by specific antibodies or RGD peptide (arginine-glycine-aspartic acid) induced inhibition of pre-hypertrophic chondrocyte differentiation and ectopic joint formation between proliferating chondrocytes and hypertrophic chondrocytes. Ectopic joint expressed *Wnt14*, *Gdf5*, chordin, autotaxin, type I collagen and CD44, while expression of Indian hedgehog and type II collagen was downregulated in cartilage. Expression of these interzone

markers confirmed that the new structure is a new joint being formed. In the presence of BMP7, inhibition of $\alpha 5\beta 1$ integrin function still induced the formation of the ectopic joint between proliferating chondrocytes and hypertrophic chondrocytes. By contrast, misexpression of $\alpha 5\beta 1$ integrin resulted in fusion of joints and formation of pre-hypertrophic chondrocytes. These facts indicate that the decision of which cell fate to make pre-joint or pre-hypertrophic is made on the basis of the presence or absence of $\alpha 5\beta 1$ integrin on chondrocytes.

Key words: Joint formation, Integrin, Hedgehog, BMP, *Wnt14*, Chondrogenesis, Chondrocyte differentiation, Mouse

Introduction

Joint formation constitutes a key step in the morphogenesis of the appendicular skeleton of vertebrates. Long bones are initially formed as an elongated chondrogenic condensation. Next in development, joints are formed at specific regions of the condensing cartilages by a complex process, which involves dedifferentiation of the chondrogenic tissue and apoptosis. The first morphological evidence of joint development is the formation of the interzone, characterized by flattened, fibroblastic-like chondrocytes and apoptosis. Complete separation of skeletal elements occurs through cavitation, thereby forming the joint capsule (Francis-West et al., 1999a). At the molecular level, joint formation correlates with downregulation of type II collagen, and with the appearance of specific regions with the expression of bone morphogenetic protein (BMP) family members, such as *Gdf5*, *Gdf6*, *Bmp7* and *Bmp2* (Francis-West et al., 1999a; Storm and Kingsley, 1999; Merino et al., 1999) and *Wnt14* (*Wnt9a* – Mouse Genome Informatics) (Hartmann and Tabin, 2001). In spite of the specific expression of BMP family members in developing joints, the function of these molecules remains obscure. Overexpression experiments with *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp7*, and *Gdf5* genes or knockout of BMP-antagonist *Noggin* cause intense growth of the cartilage and inhibition of joint formation (Duprez et al., 1996; Storm and Kingsley, 1999; Brunet et al., 1998). By contrast, deletion of *Gdf5* or *Gdf6*

genes in single or double knockout results in fusion of joints (Settle et al., 2003). By contrast to BMPs, *Wnt14* (*Wnt9a* – Mouse Genome Informatics), a member of the *Wnt* gene family (Katoh, 2002; Quian et al., 2003), was identified as a primary inducer of joints (Hartmann and Tabin, 2001). Other signaling molecules may also be involved in joint formation. Indian hedgehog (IHH) is a major regulator of cartilage differentiation (Vortkamp et al., 1996; St-Jacques et al., 1999; Minina et al., 2001); furthermore, sonic hedgehog (*Shh*) or *Ihh* misexpression inhibits joint formation (Merino et al., 1999).

The important structural function of the extracellular matrix (ECM) in the mature cartilage suggests that the components of the ECM and integrins (receptors for ECM proteins) (Bokel and Brown, 2002; Hynes, 2002) exert a major role in cartilage differentiation. However, experimental evidence supporting this idea is scarce. Alterations in ECM components such as collagens (Li et al., 1995; Barbieri et al., 2003), link protein (Wai et al., 1998) or aggrecan (Watanabe and Yamada, 1999) are responsible for some structural changes in cartilage. Also chondrocyte differentiation occurs in the absence of $\beta 1$ integrins, but these cells are unable to form columns in growth plates. These chondrocytes show reduction of proliferation (Aszodi et al., 2003; Fässler and Meyer, 1995). In addition, mutant mice lacking $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 6$, αv , $\beta 3$, or $\beta 5$ integrins do not show skeletal malformations (Bouvard et al., 2001), suggesting

that other integrins control skeletal development or that functional redundancy may occur.

Since the role of integrins on skeletal development is poorly understood, and much less for joint formation, we investigated the effects of $\alpha 5\beta 1$ integrin inhibitors and BMP on joint formation in the embryonic mouse limb culture system. Blocking $\beta 1$ and $\alpha 5$ integrins with specific antibodies or RGD peptides (arginine-glycine-aspartic acid) in the developing mouse zeugopod led to inhibition of pre-hypertrophic chondrocyte differentiation and ectopic joint formation between proliferating chondrocytes and hypertrophic chondrocytes. Moreover, ectopic joint resulted in expression of *Wnt14*, *Gdf5*, chordin, autotaxin and type I collagen and CD44, while expression of IHH and type II collagen was downregulated. Also, misexpression of $\alpha 5\beta 1$ integrin in chick embryos resulted in joint fusion and formation of pre-hypertrophic chondrocytes. In addition, we investigated the effects of BMPs on ectopic joint formation induced by the inhibition of $\alpha 5\beta 1$ integrin. This is the first report on the involvement of $\alpha 5\beta 1$ integrin in the control point by which chondrocytes take the decision between the cartilage differentiation program and the joint formation program.

Materials and methods

Reagents

The following antibodies were used: anti- $\beta 1$ integrin monoclonal antibody (HM $\beta 1$), anti- $\alpha 5$ integrin (HM $\alpha 5$) and anti- $\alpha 5$ integrin (MFR5) from Pharmingen; anti-type I collagen and anti-CD44 from Chemicon; anti-type II collagen (CIIC1) and anti-human $\alpha 5\beta 1$ integrin (BIIG2) from Hybridoma Bank; and anti-type X collagen from Calbiochem. The RGE (GRGESP) and RGD (GRGDNP) peptides were obtained from GIBCO BRL. BMP7 and SHH were from R&D Systems.

Microinjections and mouse limb organ cultures

Complete embryos at embryonic day (E) 14.5 were injected at the wrist with 2 μ l of antibody solution or just with PBS using a pneumatic microinjector model PV830 (World Precision Instruments) equipped with glass microneedles. Then embryonic forelimb organ cultures were prepared as described by Vortkamp et al. (1996) and Lanske et al. (1996). Briefly, limbs were placed on a Nucleopore filter. Filter and limb were then placed on top of a stainless steel grid (Plain weave mesh 0.38 mm; Goodfellow) inside a well of a 24-well tissue culture plate containing BGJb medium with 1% bovine serum albumin. The grid keeps the limb at the liquid/air interface. Limb cultures were then kept for 4 days at 37°C in a 5% CO₂ incubator. For some experiments, cultures were supplemented with 1 μ g/ml BMP7 or 400 ng/ml SHH.

Skeletal preparation and tissue staining

Cultured limbs were fixed overnight in 96% ethanol and stained as previously described (Otto et al., 1997).

For tissue staining, limbs were fixed in 4% paraformaldehyde at 4°C overnight, dehydrated and embedded in Paraplast by standard techniques. Tissue sections were then stained with Weigert's acid iron chloride haematoxylin and then stained with Fast Green. Subsequently, sections were stained with Safranin O.

cDNA probes and in situ hybridization

For in-situ hybridizations the following cDNA probes were used: mouse *Gdf5* (Storm and Kingsley, 1999); *Wnt14* (Kato, 2002); chordin (Bachiller et al., 2003). For chicken embryos *Wnt14*, *Gdf5* and *Ihh* cDNA probes were used. Fragments of autotaxin (accession number NM015744), *Cd44* (accession number XM283773) and

aggrecan (accession number L07049) mouse genes were obtained by RT-PCR. First-strand cDNA was synthesized with a First-strand cDNA Kit (Roche Applied Science) and 1 μ g of RNA of mouse embryo at E12. The following primers (5' to 3') were used: autotaxin 5' primer, 5'-CAGCAAGTCGAATTAAGAGG-3' and 3' primer 5'-GGCCAGCGTATACAGATTAG-3' (corresponding to region 127-692); *Cd44* 5' primer 5'-AAGACTTGAACAGGACAGGA-3' and 3' primer 5'-AGAGATGCCAAGATGATGAG-3' (corresponding to region 1747-2248); *aggrecan* 5' primer 5'-GAGGAGCCATACATCTTC-3' and 3' primer 5'-CACTGAGGTCTCTACTCCA-3' (corresponding to region 2506-3040). PCRs were performed in a total volume of 25 μ l using Taq DNA polymerase (Invitrogen). The cycling conditions were 15 seconds at 94°C for denaturation, 30 seconds at 55°C for annealing, 1 minute at 72°C for elongation, and then 30 minutes at 72°C after the last cycle (35 cycles). The PCR products were cloned into pGEM T-easy (Promega). The authenticity of the fragments was confirmed by dideoxy sequencing.

Digoxigenin 11 UTP-labeled single-stranded RNA probes were prepared using a DIG RNA labeling kit (Roche Applied Science) according to the manufacturer's instructions. Tissue sections on slides were treated with 1 μ g/ml proteinase K (preincubated at 37°C) for 5 minutes at room temperature, then washed with PBT and incubated with hybridization buffer at 65°C for 15 minutes, after which the corresponding Digoxigenin-labeled probe was added and incubated overnight at 65°C. Next morning, sections were washed and incubated with FITC-labeled anti-digoxigenin antibodies at 4°C overnight. Next day, sections were washed and observed under a Nikon Fluorescence Microscope Eclipse E600, and photographed with a Nikon digital camera Coolpix 995 (Nikon Inc.).

Immunofluorescence and TUNEL

For immunohistochemical analysis, slides were incubated overnight with antibodies at 4°C. Next morning, slides were incubated with the corresponding FITC-labeled secondary antibody for 2 hours at 37°C and observed under a Nikon Fluorescence Microscope Eclipse E600, and photographed with a digital camera Nikon Coolpix 995 (Nikon Inc.). Apoptosis was detected by the TUNEL assay using an in-situ cell death detection Kit, TMR (Roche Applied Science) according to the manufacturer's instructions.

Electroporation of $\alpha 5\beta 1$ integrin cDNA into chick embryos.

Fertilized White Leghorn chicken eggs (ALPES, Puebla Mexico) were windowed and staged according to Hamburger and Hamilton (1951). Non-linearized full-length human $\alpha 5$ chain of integrins cDNA clone (6 μ g/ μ l; pECE+ $\alpha 5$) and non-linearized full-length human $\beta 1$ chain of integrins cDNA clone (6 μ g/ μ l; pECE+ β) were injected into the autopod of the hindlimb at HH stage 27 (Hamburger and Hamilton, 1951) with a microneedle. DNA was mixed with Chinese ink and mineral oil (1.5 μ l of pECE+ $\alpha 5$ plus 1.5 μ l of pECE+ β plus 0.5 μ l of Chinese ink and 0.5 μ l of mineral oil) and approximately 0.5-1.0 μ l of mix were microinjected. Electroporation was performed at 28 volts with 10 pulses of 70 mseconds. After electroporation, chick embryos were returned to the incubator and analyzed by skeletal staining, histology, immunofluorescence and in-situ hybridization.

Results

Inhibition of $\beta 1$ integrins induces ectopic joint formation and ectopic expression of *Wnt14* and *Gdf5*

Interaction of integrins with ECM during cartilage differentiation was evaluated by the use of a limb explant culture system (Minina et al., 2001). To determine whether integrins of the $\beta 1$ family play a role on cartilage differentiation, we microinjected a specific blocking monoclonal antibody (HM $\beta 1$) against the $\beta 1$ chain of integrins

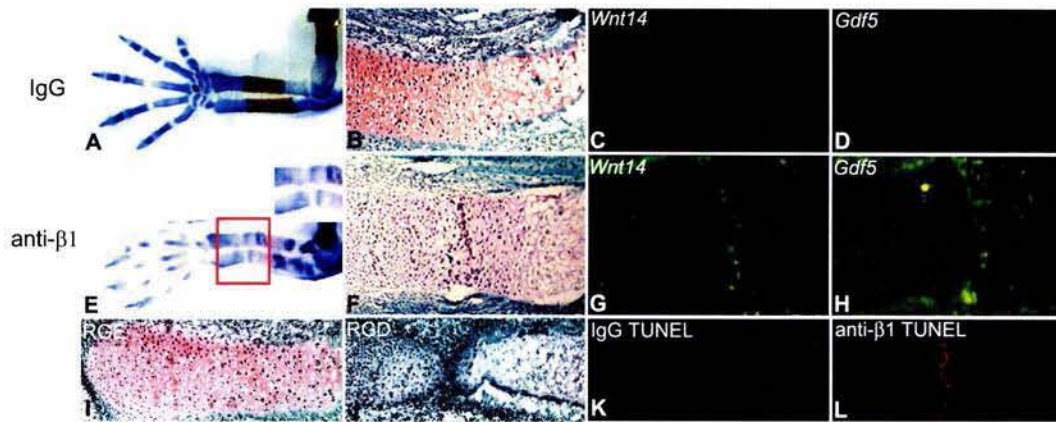


Fig. 1. Blocking $\beta 1$ integrin induces formation of an ectopic joint. Forelimbs of E14.5 mouse embryos cultured for 4 days were injected at the wrist with $10\ \mu\text{g}$ of an irrelevant IgG (A-D) or with $10\ \mu\text{g}$ of an anti- $\beta 1$ integrin mAb (E-H). (A,E) Complete limb stained with Alcian Blue/Alizarin Red to show skeletal elements. Inset shows the area in the red square. (B,F) Histological section of zeugopod region stained with Safranin O and Fast Green to show cartilage in red. (C,G) In-situ hybridizations for *Wnt14*. (D,H) In-situ hybridizations for *Gdf5*. (I) Histological sections of zeugopod region in limbs injected with $2\ \mu\text{g}$ RGE peptide stained with Safranin O and Fast Green. (J) Histological sections of zeugopod region in limbs injected with $2\ \mu\text{g}$ RGD peptide stained with Safranin O and Fast Green. (K,L) TUNEL assay for apoptosis, forelimbs injected at the wrist with $10\ \mu\text{g}$ of an irrelevant IgG (K) or with $10\ \mu\text{g}$ of an anti- $\beta 1$ integrin mAb (L).

into the wrist region of a mouse embryo (E14.5) forelimbs in organotypic cultures. Control limbs treated with an irrelevant IgG showed normal morphology of all skeletal elements (Fig. 1A). By contrast, treatment of the forelimbs with HM $\beta 1$ resulted in the loss of some skeletal elements such as phalanges and carpals (Fig. 1E). A gap perpendicular to the long axis of the bone in the skeletal elements was observed at distal level in radio and ulna, suggesting the formation of an ectopic joint-like element (Fig. 1E, box). This was observed with a frequency of 62% (25 out of 40 experiments). The idea that the new structure was a joint was confirmed by histological analysis of tissue sections at the zeugopod region, which revealed a change in cell morphology similar to that observed in the interzone of developing joints (Fig. 1B,F). To evaluate whether these morphological and histological changes correspond with the formation of an ectopic joint, we analyzed the expression of *Wnt14* and *Gdf5*. Both early molecular markers were expressed in the ectopic joint of treated limbs (Fig. 1C-D,G-H). Tissue sections of zeugopod region in limbs previously treated with anti- $\beta 1$ integrin HM $\beta 1$ showed reduced red staining, suggesting that cartilage was altered (Fig. 1F).

It is well known that several $\beta 1$ integrins mediate their interaction with ECM proteins through the RGD sequence in their ligands (Hynes, 2002). The effect produced by anti- $\beta 1$ integrin antibodies could be due to the blockage of integrin–ligand interactions, or to direct activation by binding of the antibody to the integrin at a site different from the ligand-binding site. To further explore whether this effect was caused by blockage of integrin–ligand binding, we injected RGD peptides in the wrist of developing limbs instead of the HM $\beta 1$. Treatment with the RGD peptide alone also resulted in the formation of an ectopic joint, while the control peptide RGE had no effect (Fig. 1I–J). In addition, a dramatic reduction in cartilage staining was also observed. In contrast, treatment with an RGE control peptide had no effect on the morphology of skeletal elements (not shown). These data suggested that $\beta 1$ integrins needed to interact with a ligand in the extracellular

matrix through an RGD sequence in order to maintain the normal structure of the cartilage. Apoptotic cells were evident in the ectopic joint that appeared in limbs treated with HM $\beta 1$ (Fig. 1K–L) or RGD treatment (data not shown).

Inhibition of $\alpha 5\beta 1$ integrins induces molecular changes characteristic of joint formation

Because one of the main integrins that bind RGD ligands is $\alpha 5\beta 1$, we explore whether inhibition of integrin function by blocking the $\alpha 5$ subunit would have the same effect as the anti- $\beta 1$ antibodies or the RGD peptide. Microinjection of the anti- $\alpha 5$ mAb HM $\alpha 5$ induced the formation of an ectopic joint (Fig. 2A). Another anti-mAb, MFR5, also gave origin to an ectopic joint (data not shown). Together, these data support the idea that $\alpha 5\beta 1$ integrin binds to an RGD-contained ligand in the ECM of a developing limb in order to prevent the appearance of joints.

To confirm that integrin function inhibition by blockage of the $\alpha 5\beta 1$ integrin induces molecular changes characteristic of joint formation, we analyzed molecular markers of the interzone. Since *Wnt14* is able to induce prechondrogenic cells into the joint program (Hartmann and Tabin, 2001), we evaluated the expression of other molecular markers such as *Gdf5*, chordin, autotaxin, CD44 and type III Collagen in the ectopic joint induced by blocking $\alpha 5\beta 1$ integrin (Fig. 2). Results showed that *Wnt14* (Fig. 2B), *Gdf5* (Fig. 2C), autotaxin (Fig. 2D), chordin (Fig. 2E), CD44 protein (Fig. 2F) or Cd44 gene (data not shown) and type III collagen (Fig. 2G) were expressed in the ectopic joint. To determine whether formation of ectopic joints is associated with downregulation of molecular markers of cartilage differentiation, we evaluated type II, I and X collagens, aggrecan and IHH expression. We observed changes in the ECM of the ectopic joint induced by blocking $\alpha 5\beta 1$ integrins. Type II collagen, a typical marker of cartilage ECM, was downregulated (Fig. 2I) along the ulna of developing limbs, while type I collagen was upregulated, showing stronger expression in the newly formed joint (Fig.

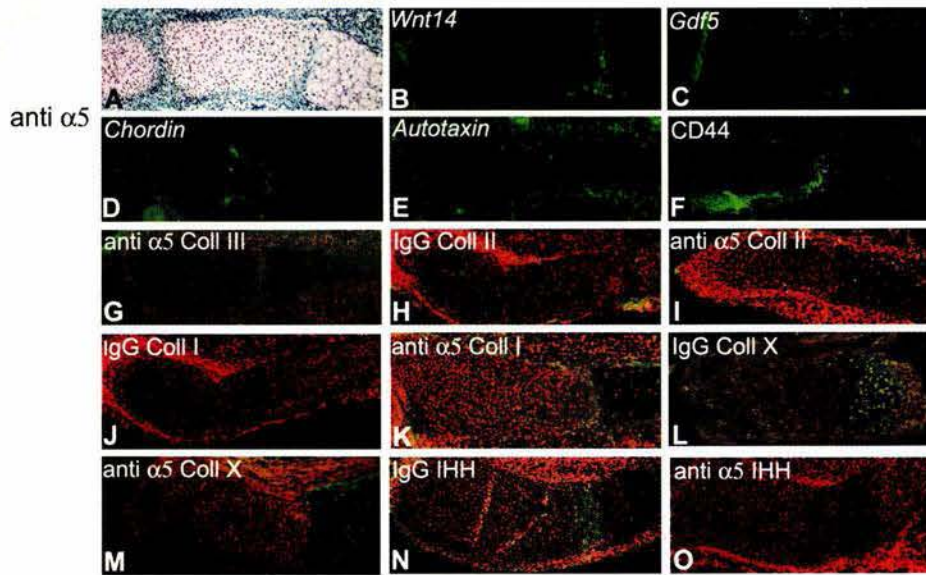


Fig. 2. Blocking $\alpha 5\beta 1$ integrin induces molecular changes characteristic of joint formation. Forelimbs of E14.5 mouse embryos cultured for 4 days were injected at the wrist with $10 \mu\text{g}$ of an anti- $\alpha 5$ integrin mAb (A-G,I,K,M,O). Control injected with $10 \mu\text{g}$ of an irrelevant IgG (H,J,L,N). (A) Histological sections of zeugopod region stained with Safranin O and Fast Green to show cartilage in red. In-situ hybridizations for *Wnt14* (B), *Gdf5* (C), chordin (D), autotaxin (E). Immunofluorescence for CD44 (F), type III collagen (G), type II collagen (H-I), type I collagen (J-K), type X collagen (L-M) and Indian hedgehog (N-O). Immunofluorescence staining for IHH and for type I, II, III and X collagen is green; cell nuclei were stained with propidium iodide (red).

2K). In control limbs treated with an irrelevant antibody, these changes were not observed (Fig. 2H and 2J). Moreover, we observed that aggrecan expression was downregulated at the level of the ectopic joint (data not shown), while type X collagen was observed only at the distal level of the ectopic joint, corresponding to hypertrophic cartilage as observed in controls (Fig. 2L-M). Similarly, the anti- $\alpha 5$ integrin HM $\alpha 5$ induced inhibition of IHH expression (Fig. 2O), while the irrelevant control antibody did not reduce the expression of IHH (Fig. 2N). Together, these data further confirm that the new structure is a new joint, in which chondrocytes dedifferentiate, changing their cellular fate. Likewise, by IHH and type X collagen analysis the ectopic joint was found at the boundary between proliferating chondrocytes and hypertrophic cartilage.

$\alpha 5\beta 1$ integrin is downregulated during joint formation

Because our data suggested that $\alpha 5\beta 1$ integrin ligation to an RGD ligand in the developing limb contributed to prevent the appearance of a new joint, we explored the pattern of expression of $\alpha 5\beta 1$ during joint formation. The whole autopod

of a mouse embryo at E14.5 was stained for the $\alpha 5$ integrin subunit. The $\alpha 5$ integrin was found in the all-forming digits of the hand (Fig. 3A). At the zone where the joints of the fingers are being formed, $\alpha 5$ integrin expression was not observed (Fig. 3A). Closer examination of the interzone confirmed that $\alpha 5$ integrin was not present in the forming joint (Fig. 3B). In addition, *Wnt14* was expressed in the interzone where $\alpha 5$ integrin was not expressed (Fig. 3C). In the more advanced skeletal elements such the ulna, $\alpha 5$ integrin expression was evident in pre-hypertrophic chondrocytes and colocalized with IHH but not with type X collagen (Fig. 3D-F). In addition, $\alpha 5$ integrin was seen in less intensity in proliferating chondrocytes, and was evident in perichondrium and joints formed (Fig. 3D-F).

BMPs enhance formation of the ectopic joint induced by inhibition of $\alpha 5\beta 1$ integrin

BMPs are known to inhibit joint formation and to enhance cartilage differentiation (Duprez et al., 1996; Storm and Kinsley, 1999; Brunet et al., 1998), so we evaluated whether the addition of BMP could rescue the appearance of the ectopic joint that was induced by blocking $\alpha 5\beta 1$ integrins. Mouse

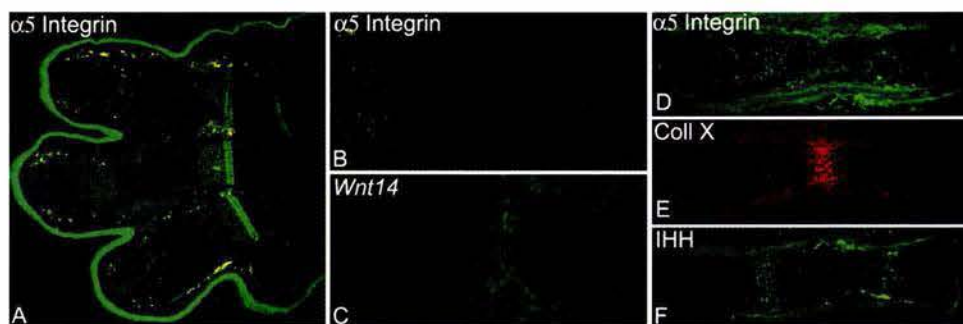


Fig. 3. Pattern expression of integrins during joint formation. Forelimbs of E14 mice were fixed and tissue sections prepared as described in Materials and methods. Sections at the level of autopod were stained for immunofluorescence with polyclonal antibodies against the $\alpha 5$ integrin subunit. (A) Section of the forming fingers stained for $\alpha 5$ integrins. (B,C) Consecutive sections from a joint in the developing fingers showing immunofluorescence staining for $\alpha 5$ integrin (B) and in-situ hybridization for *Wnt14* (C). Serial sections of the ulna stained for $\alpha 5$ integrin (D), type X collagen (E) and IHH (F).

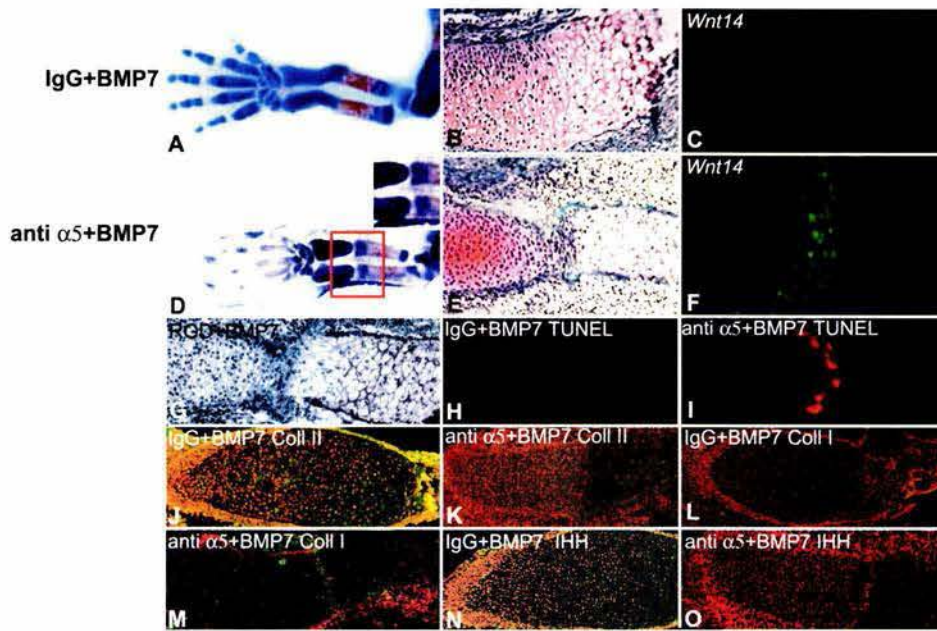


Fig. 4. BMP enhances formation of the ectopic joint induced by inhibition of $\alpha 5 \beta 1$ integrin. Forelimbs of E14.5 mouse embryos cultured for 4 days in the presence of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BMP7 were injected at the wrist with 10 μg of an irrelevant IgG (A,B,C,H,J,L,N) or with 10 μg of an anti- $\alpha 5$ integrin mAb (D,E,F,I,K,M,O). (A,D) Complete limb stained with Alcian Blue/Alizarin Red to show skeletal elements. (B,E) Histological sections stained with Safranin O and Fast Green to show cartilage in red. (C,F) In-situ hybridization for *Wnt14*. (G) Histological sections of limbs injected with 2 μg RGD peptide stained with Safranin O and Fast Green to show cartilage in red. (H,I) TUNEL assay for apoptosis. (J,K) Immunofluorescence staining for type II collagen (green). (L,M) Immunofluorescence staining for type I collagen (green). (N,O) Immunofluorescence staining for Indian hedgehog (green). In all cases cell nuclei are stained with propidium iodide (red).

embryo forelimbs at E14.5 were injected at the wrist with anti-integrin antibodies and then cultured in the presence of BMP7 for 4 days. Limbs injected with an irrelevant antibody and incubated with BMP7 presented a normal distribution of skeletal elements (Fig. 4A), although they seemed thicker than those in control limbs (Fig. 1A). Unexpectedly, we found that BMP7 in the culture milieu did not revert the effect of specific blocking antibody to $\alpha 5 \beta 1$ integrin. Instead, BMP7 enhanced the formation of an ectopic joint at the distal region of radio and ulna in 87% (35 out of 40) of the experiments. BMP7 also led to loss of some skeletal elements such as phalanges and carpals (Fig. 4D) compared with controls (Fig. 4A). Histological analysis of this section showed two areas of cartilage staining, one more intensely stained toward the distal portion and a second one less stained toward the proximal portion (Fig. 4E). The last area resembles hypertrophic chondrocytes. These different areas are not observed in control limbs treated with BMP7 and an irrelevant antibody (Fig. 4B). In addition, the level of expression of *Wnt14*, a molecular marker for joints, was upregulated in the area of this new structure (Fig. 4F), whereas no *Wnt14* could be detected in the control limbs (Fig. 4C). RGD-peptide treatment and BMP7 induced the formation of an ectopic joint (Fig. 4G). Moreover, an increase in apoptotic cells was evident in the ectopic joint treated with HM $\alpha 5$ compared with BMP7 alone (Fig. 4H-I). These results showed that the new structure formed after injection of the anti- $\alpha 5$ mAb was indeed a new joint, and BMP7 was not able to inhibit the formation of this ectopic joint after integrin blockage.

We showed above that type II collagen is downregulated after integrin blockage by monoclonal antibodies. Although BMP7 did not prevent the formation of the ectopic joint, it was possible that the distribution of other molecular markers of cartilage could be different. BMP7 alone caused an increase in type II collagen expression in the cartilage (compare Fig. 2H and Fig. 4J). However, treatment of anti- $\alpha 5$ integrin in the

presence of BMP7 again caused a downregulation of type II collagen (Fig. 4K). In addition, the expression of type I collagen was upregulated after integrin blockage even in the presence of BMP7 (Fig. 4M), compared with BMP7 alone (Fig. 4L). Moreover, expression of IHH was increased by BMP7 alone (compare Fig. 2N and Fig. 4N). After treatment of anti- $\alpha 5$ integrin, inhibition of pre-hypertrophic chondrocyte differentiation was observed, as evaluated by expression of IHH (Fig. 4O). All these data together indicate that BMP7 enhances ectopic joint formation between proliferating chondrocytes and hypertrophic chondrocytes.

$\alpha 5 \beta 1$ integrin induces joint fusion and differentiation of pre-hypertrophic cells

Our results showed that inhibition of integrin $\alpha 5 \beta 1$ induces ectopic joints, so we evaluated whether misexpression of human $\alpha 5 \beta 1$ integrin inhibits joint formation. Full-length cDNA clones for human integrin $\alpha 5$ and $\beta 1$ chain were electroporated into the autopod of embryonic chick legs at HH stage 27. After incubating chick embryos for 5 days, we found that misexpression of $\alpha 5 \beta 1$ integrin inhibited joint formation (Fig. 5A-B). Histological analysis of fingers confirmed continuity in the cartilage tissue between the phalanges (Fig. 5C-D). To determine that misexpression of $\alpha 5 \beta 1$ integrin occurred in the chick leg, we evaluated it by immunofluorescence with a monoclonal antibody specific for human $\alpha 5 \beta 1$ integrin, which does not crossreact with chick. The results showed expression of human $\alpha 5 \beta 1$ integrin (Fig. 5E-F). Since ectopic joint formation by inhibition of $\alpha 5 \beta 1$ integrin coincides with inhibition of pre-hypertrophic chondrocytes, we evaluated whether misexpression of $\alpha 5 \beta 1$ integrin up-regulates IHH, molecular marker of pre-hypertrophic chondrocytes. Results showed that expression of human $\alpha 5 \beta 1$ integrin in the fingers colocalized with IHH (Fig. 5E-H). *Wnt14* was not expressed under these conditions (Fig. 5I-J). In conclusion, misexpression of $\alpha 5 \beta 1$ integrin induces

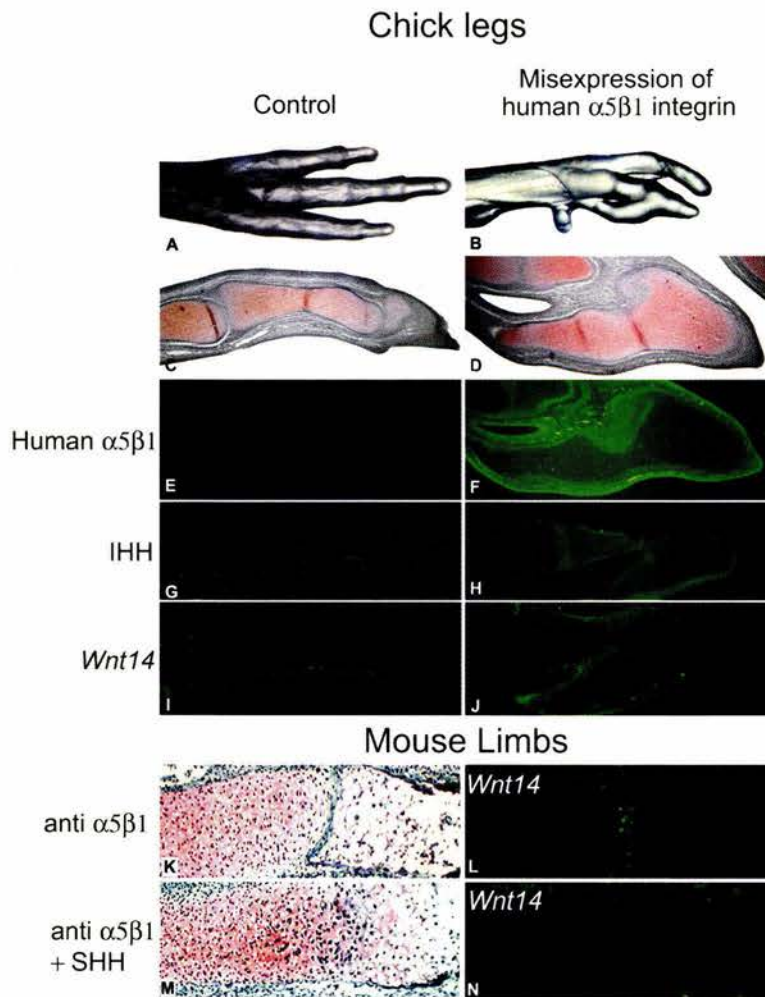


Fig. 5. Misexpression of $\alpha 5\beta 1$ integrins induces fusion of joints and differentiation of pre-hypertrophic cells. Chick legs of HH stage 27 were electroporated with full-length cDNA $\alpha 5\beta 1$ integrins in the region of the autopod and incubated for 5 days (B,D,F,H,J), as controls, contralateral legs were used (A,C,E,G,I). Chick legs were fixed in paraformaldehyde and photographed to observe phenotype induced by misexpression of human $\alpha 5\beta 1$ integrin (A,B). Serial section of the legs shown in A and B were prepared for paraffin inclusion and used for histology (C,D), immunofluorescence for human $\alpha 5\beta 1$ integrin (E,F), IHH (G,H) and in-situ hybridization for *Wnt14* (I,J). (K-N) Forelimbs of E14.5 mouse embryos cultured for 4 days in the presence of 1 $\mu\text{g/ml}$ BMP7 were injected at the wrist with 10 μg of an anti- $\alpha 5$ integrin mAb. Cultures were added with nothing (K,L), or sonic hedgehog 400 ng/ml (M,N). Histological sections were stained with Safranin O and Fast Green (K,M), or processed for in-situ hybridization for *Wnt14* (L,N).

an ectopic joint that expresses *Wnt14*, the earliest joint inducer (Hartmann and Tabin, 2001), and other specific markers of joints such as *Gdf5*, autotaxin, chordin and CD44 (Edwards et al., 1994; Bächner et al., 1999; Francis-West et al., 1999b; Merino et al., 1999; Storm and Kingsley, 1999). This finding indicates that interactions between cells and ECM participate in the control of chondrocyte differentiation and joint formation. Furthermore, our results also suggest that joint formation and growth plate development are highly integrated processes.

A remarkable finding of our study, of interest to the understanding of the joint formation mechanisms, is the structural differences between normal and ectopic joints induced by integrin blockage. Normal joints are flanked by growth plates with proliferating chondrocytes closest to the articular ends, and hypertrophic chondrocytes further from the joints. By contrast, ectopic joints are induced between proliferating chondrocytes and hypertrophic chondrocytes. Possibly, when the cartilage condensations, which are entirely made up of proliferating chondrocytes, reach a particular size, for a reason that is still totally unknown, the cells in the center of the element exit the cell cycle (Karaplis et al., 1994; Schipani et al., 1997; Rossi et al., 2002). When they do, there are two alternative choices they can make. When the skeletal pattern is first being established, the condensations that reach this critical size initiate joint formation in their center. Later, once the skeletal pattern is established, when the skeletal elements again reach a critical size, the cells in the center, instead of becoming pre-joint cells, adopt the alternative fate of becoming pre-hypertrophic cells, leading down the path to hypertrophy and eventual ossification. So, the decision of which cell fate to adopt when exiting the cell cycle, pre-joint or pre-hypertrophic, could be explained on the basis of the presence or absence of $\alpha 5\beta 1$ integrin in the perichondrial cells and/or postmitotic chondrocytes.

Findings of this study suggest that the perichondrium may also exert an important role in joint formation. Supporting this interpretation, Aszodi et al. (Aszodi et al., 2003) have observed that joints develop normally in $\beta 1$ integrin-deficient mice under the control of the type II collagen promoter. It must be taken into account that type II collagen is expressed in all

joint fusion and this phenotype correlates with differentiation of pre-hypertrophic chondrocytes.

Indian hedgehog inhibits the formation of the ectopic joint

Treatment with anti- $\alpha 5$ integrin downregulated expression of Indian hedgehog and misexpression of human $\alpha 5\beta 1$ integrin upregulated IHH, so we evaluated whether Hedgehog signaling was required to prevent the formation of the ectopic joint. To do this, forelimbs injected with the anti- $\alpha 5$ integrin antibody and cultured in the presence of BMP7 were treated with sonic hedgehog (SHH), a protein that acts similarly to IHH (Vortkamp et al., 1996). Under these conditions, the appearance of the ectopic joint was blocked and pre-hypertrophic chondrocytes were present (Fig. 5K,M). In addition, expression of *Wnt14* was inhibited (Fig. 5L,N). Similar results were obtained in cultures without BMP7 (data not shown).

Discussion

In the present study we provide evidence for the first time that $\alpha 5\beta 1$ integrin ligation to an RGD ligand is involved in the control of joint formation and cartilage differentiation. Blocking of $\alpha 5\beta 1$ integrin function resulted in the induction of

chondrocytes but not in perichondrium. So, the strong expression of $\alpha 5 \beta 1$ integrin that we observed in the perichondrium of skeletal elements beginning pre-hypertrophic differentiation is not affected by the absence of $\beta 1$ integrin in type II collagen-expressing cells in $\beta 1$ integrin-deficient mice. On this basis, the effect of $\alpha 5 \beta 1$ integrin on ectopic joint formation and inhibition of pre-hypertrophic cells might be mediated by the perichondrium. Moreover, rescue experiments of this study with SHH protein revealed that hedgehog signaling inhibits ectopic joint formation. Since the perichondrium expressed *Patched*, which is considered a major target of IHH signaling, it is likely that the effect of ectopic SHH was mediated by the perichondrium. Also, a direct effect of SHH on chondrocytes may explain inhibition of the ectopic joint (Long et al., 2001).

In accordance with the above-described hypothesis, the ectopic joint induced by blocking $\alpha 5 \beta 1$ integrin displayed the morphology of a gap perpendicular to the long axis of the bone. This joint pattern differs from that observed by Hartmann and Tabin (2001) in experiments misexpressing *Wnt14*. The joint induced by misexpression of *Wnt14* is extended through the whole cartilage rudiment and is most probably due to instructive signals delivered by *Wnt14* that induce downstream genes of the joint pathway in all cartilage cells misexpressing this gene. It is well established that the same integrin is capable of inducing very different cell responses depending on the cell type that expresses them. For example, $\alpha 5 \beta 1$ integrin binding to fibronectin in fibroblasts leads to cell survival (Aplin et al., 1999); in mammary cells, it leads to milk production (Schmidhauser et al., 1990); and in leukocytes, it leads to endothelial cell migration or cytokine production (Rosales and Juliano, 1995). Thus, although the pattern of $\alpha 5 \beta 1$ integrin expression in the cartilage of the developing limb is rather dispersed, we do not necessarily expect as diffuse an effect as the one described after *Wnt14* misexpression. The presence of $\alpha 5 \beta 1$ integrin in the perichondrium might influence the decision of which cell fate is adopted, either pre-joint or pre-hypertrophic, by proliferating chondrocytes when they exit the cell cycle in a local horizontal population of cells differentiating in concert, since blocking integrins produces joints perpendicular to the long axis of the skeletal element. In this sense, integrins modulate the response to other signals as suggested by Aplin et al. (Aplin et al., 1998).

An additional finding of our study is that the response of chondrocytes to BMP signaling is regulated by integrin. In normal developing limbs, BMP treatments cause intense chondrogenesis and inhibition of joint formation (Duprez et al., 1996; Macias et al., 1997; Brunet et al., 1998; Merino et al., 1999). By contrast, in our experiments, addition of BMP to the culture medium inhibited differentiation of pre-hypertrophic cells and enhanced formation of ectopic joints. This finding is in agreement with the normal expression of several *bmp* genes in the developing joints (Macias et al., 1997), as it would be difficult to explain why *bmp* genes are expressed in the joints if they block joint formation (Duprez et al., 1996; Brunet et al., 1998; Merino et al., 1999; Storm and Kingsley, 1999). According to our results, in the absence of $\alpha 5 \beta 1$ integrin BMP signaling can direct proliferating chondrocytes to the joint program. On the contrary, in the presence of $\alpha 5 \beta 1$ integrin, BMP signaling directs proliferating chondrocytes to the pre-hypertrophic program expressing *Ihh* (Macias et al., 1997).

Whether this modulation of BMP response is mediated through the perichondrium, or whether it is a direct effect of BMPs on the chondrocytes, remains to be clarified.

We thank David Kingsley, Eddy de Robertis, Cliff Tabin and Juan Hurlé for donating the mouse *Gdf5* and chordin and chicken *Wnt14*, *Ihh* and *Gdf5* probes. Full-length human $\alpha 5$ chain of integrins cDNA clone and full-length human $\beta 1$ chain of integrins cDNA clone were donated by Erkki Ruoshlati. The monoclonal antibody CIIC1 developed by R. Holmdahl and K. Rubin, and monoclonal antibody BIIG2 developed by C. Damski, were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank, under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242. We also thank Marcia Bustamante Zepeda, Gerardo Arrellín Rosas, Georgina Diaz Herrera and Lucía Brito for technical assistance, and Marian Ros and Juan Hurlé for their helpful discussions and comments on the manuscript. Also we give thanks to the anonymous referees, because expert comments helped to improve this work. The authors thank Alberto J. Ríos Flores, David Cruz Sánchez and René F. Abarca Buis for their help in the electroporation of chick embryos. Isabel Pérez Montfort corrected the English version of the manuscript. This work was supported by grants 34334-N (to J.C.-M.) and 36407-M (to C.R.) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Mexico, and IN216701 (to J.C.-M.) from DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). D.G.-C. was the recipient of a scholarship from CONACyT and UNAM and was supported by grant 202358 from PAEP, UNAM.

References

- Aplin, A. E., Howe, A. and Juliano, R. L. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharm. Rev.* **50**, 197-263.
- Aplin, A. E., Short, S. M. and Juliano, R. L. (1999). Anchorage-dependent regulation of the mitogen-activated protein kinase cascade by growth factors is supported by a variety of integrin alpha chains. *J. Biol. Chem.* **274**, 31223-31228.
- Aszodi, A., Hunziker, E., Brakebusch, C. and Fässler, R. (2003). $\beta 1$ integrins regulate chondrocyte rotation, G1 progression, and cytokinesis. *Genes Dev.* **17**, 2465-2479.
- Bachiller, D., Klingensmith, J., Shneyder, N., Tran, U., Anderson, R., Rossant, J. and De Robertis, E. M. (2003). The role of chordin/Bmp signals in mammalian pharyngeal development and DiGeorge syndrome. *Development* **130**, 3567-3578.
- Bächner, D., Ahrens, M., Betat, N., Schroder, D. and Gross, G. (1999). Developmental expression analysis of murine autotaxin (ATX). *Mech. Dev.* **84**, 121-125.
- Barbieri, O., Astigiano, S., Morini, M., Tavella, S., Schito, A., Corsi, A., Di Martino, D., Bianco, P., Cancedda, R. and Garofalo, S. (2003). Depletion of cartilage collagen fibrils in mice carrying a dominant negative Col2a1 transgene affects chondrocyte differentiation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **285**, C1504-C1512.
- Bokel, C. and Brown, N. (2002). Integrins in development: moving on, responding to, and sticking to the extracellular matrix. *Dev. Cell* **3**, 311-321.
- Bouvard, D., Brakebusch, C., Gustafsson, E., Aszodi, A., Bengtsson, T., Berna, A. and Fässler, R. (2001). Functional consequences of integrin gene mutations in mice. *Circ. Res.* **89**, 211-223.
- Brunet, L., McMahon, J., McMahon, A. and Harland, R. (1998). Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science* **280**, 1455-1457.
- Duprez, D., Bell, E. J., Richardson, M. K., Archer, C. W., Wolpert, L., Brickell, P. M. and Francis-West, P. H. (1996). Overexpression of BMP-2 and BMP-4 alters the size and shape of developing skeletal elements in the chick limb. *Mech. Dev.* **57**, 145-157.
- Edwards, J. C., Wilkinson, L. S., Jones, H. M., Soothill, P., Henderson, K. J., Worrall, J. G. and Pitsillides, A. A. (1994). The formation of human synovial joint cavities: A possible role for hyaluronan and CD44 in altered interzone cohesion. *J. Anat.* **185**, 355-367.

- Fässler, R. and Meyer, M. (1995). Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev.* **9**, 1896-1908.
- Francis-West, P., Abdelfattah, A., Chen, P., Allen, C., Parish, J., Ladher, R., Allen, S., MacPherson, S., Luyten, F. and Archer, C. (1999a). Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. *Development* **126**, 1305-1315.
- Francis-West, P., Parish, J., Lee, K. and Archer, C. W. (1999b). BMP/GDF-signalling interactions during synovial joint development. *Cell Tissue Res.* **296**, 111-119.
- Hamburger, V. and Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Exp. Morphol.* **88** 49-92.
- Hartmann C. and Tabin C. (2001). Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton. *Cell* **104**, 341-351.
- Hynes, R. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-687.
- Karaplis, A. C., Luz, A., Glowacki, J., Bronson, R. T., Tybulewicz, V. L., Kronenberg, H. M. and Mulligan, R. C. (1994). Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev.* **8**, 277-289.
- Katoh, M. (2002). Molecular cloning and expression of mouse Wnt14, and structural comparison between mouse Wnt14-Wnt3a gene cluster and human WNT14-WNT3A gene cluster. *Int. J. Mol. Med.* **9**, 221-227.
- Lanske, B., Karaplis, A., Lee K., Luz, A., Vortkamp, A., Pirro, A., Karperien, M., Defize, L., Ho, C., Mulligan R. et al. (1996). PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* **273**, 663-666.
- Li, S., Prockop, D., Helminen, H., Fässler, R., Lapvetelainen, T., Kiraly, K., Peltarri, A., Arokoski, J., Lui, H., Arita, M. et al. (1995). Transgenic mice with targeted inactivation of the Col2 alpha 1 gene for collagen II develop a skeleton with membranous and periosteal bone but no endochondral bone. *Genes Dev.* **9**, 2821-2830.
- Long, F., Zhang, X. M., Karp, S., Yang, Y. and McMahon, A. P. (2001). Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. *Development* **128**, 5099-5108.
- Macias, D., Gañan, Y., Sampath, T. K., Piedra, M. E., Ros, M. A. and Hurler, J. M. (1997). Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development* **124**, 1109-1117.
- Merino, R., Macias, D., Gañan Y., Economides, A., Wang, X., Wu, Q., Stahl, N., Sampath, K., Varona, P. and Hurler, J. (1999). Expression and function of *Gdf-5* during digit skeletogenesis in the embryonic chick leg bud. *Dev. Biol.* **206**, 33-45.
- Minina, E., Wenzel, H. M., Kreschel, C., Karp, S., Gaffield, W., McMahon, A. and Vortkamp A. (2001). BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* **128**, 4523-4534.
- Otto, F., Thornell, A. P., Crompton T., Denzel, A., Gilmour, K. C., Rosewell, I. R., Stamp, G., Beddington, R., Mundlos, S., Olsen, B. et al. (1997). *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* **89**, 765-771.
- Qian, J., Jiang, Z., Li, M., Heaphy, P., Liu, Y. H. and Shackleford, G. M. (2003). Mouse Wnt9b transforming activity, tissue-specific expression, and evolution. *Genomics* **81**, 34-46.
- Rosales, C. and Juliano, R. L. (1995). Signal transduction by cell adhesion receptors in leukocytes. *J. Leukocyte Biol.* **57**, 189-198.
- Rossi, F., MacLean, H. E., Yuan, W., Francis, R. O., Semenova, E., Lin, C. S., Kronenberg, H. M. and Cobrinik, D. (2002). p107 and p130 Coordinately regulate proliferation, Cbfa1 expression, and hypertrophic differentiation during endochondral bone development. *Dev. Biol.* **247**, 271-285.
- Schipani, E., Lanske, B., Hunzelman, J., Luz, A., Kovacs, C. S., Lee, K., Pirro, A., Kronenberg, H. M. and Juppner, H. (1997). Targeted expression of constitutively active receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide delays endochondral bone formation and rescues mice that lack parathyroid hormone-related peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 13689-13694.
- Schmidhauser, C., Bissell, M. J., Myers, C. A. and Casperson, G. F. (1990). Extracellular matrix and hormones transcriptionally regulate bovine b-casein 5' sequences in stably transfected mouse mammary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9118-9122.
- Settle, S., Rountree, R., Sinha, A., Thacker, A., Higgins, K. and Kingsley, D. (2003). Multiple joint and skeletal patterning defects caused by single and double mutations in the mouse *Gdf6* and *Gdf5* genes. *Dev. Biol.* **254**, 116-130.
- Shakibaei, M. (1998). Inhibition of chondrogenesis by integrin antibody *in vitro*. *Exp. Cell Res.* **240**, 95-106.
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M. and McMahon, A. (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* **13**, 2072-2086.
- Storm, E. and Kingsley, D. (1999). GDF5 Coordinates bone and joint formation during digit development. *Dev. Biol.* **209**, 11-27.
- Vortkamp, A., Kaechoong, L., Lanske, B., Segre, G., Kronenberg, H. and Tabin, C. (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian Hedgehog and PTH-Related Protein. *Science* **273**, 613-622.
- Wai, A., Ling, N., Watanabe, H., Yamada, Y., Tam, P. and Chea, K. (1998). Disrupted expression of matrix genes in the growth plate of mouse cartilage matrix deficiency (*cmd*) mutant. *Dev. Genet.* **22**, 349-358.
- Watanabe, H. and Yamada, Y. (1999). Mice lacking link protein develop dwarfism and craniofacial abnormalities. *Nat. Genet.* **21**, 225-229.

COORDINATION OF JOINT FORMATION AND CARTILAGE DIFFERENTIATION IN THE APPENDICULAR SKELETON.

Chimal-Monroy Jesús, Garcíadiago-Cázares David, Abarca-Buis René
Fernando and Ríos-Flores Alberto Jesús.*

Departamento de Biología Celular y Fisiología Instituto de Investigaciones
Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City,
MEXICO

Manuscrito aceptado para su publicación en:

Trends in Developmental Biology

COORDINATION OF JOINT FORMATION AND CARTILAGE DIFFERENTIATION IN THE APPENDICULAR SKELETON.

Chimal-Monroy Jesús*, Garciadiego-Cázares David, Abarca-Buis René Fernando and Ríos-Flores Alberto Jesús.

Departamento de Biología Celular y Fisiología Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, MEXICO

Running title; Coordination of joint formation and cartilage differentiation

*To whom correspondence should be addressed:

Jesús Chimal-Monroy, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Apdo. Postal 70228, Ciudad Universitaria, México DF 04510, MÉXICO jchimal@servidor.unam.mx

Telephone. (5255) 5622 3819

Fax. (5255) 5622 3897

Manuscript submitted to Trends in Developmental Biology.

ABSTRACT

Chondrogenic differentiation in the limb bud follows a proximal to distal sequence in developing limb, resulting in cartilage elements only formed by proliferating chondrocytes. When the skeletal pattern is established the cells at specific regions of this cartilaginous primordium exit the cell cycle, initiating joint formation, and delimiting the boundary of each individual skeletal element. Later in development, the cells in the centre of each skeletal element instead of initiating joint formation, they become pre-hypertrophic, leading down the path to hypertrophy and eventual ossification. Although, *Wnt14* is the first gene reported to have the ability to initiate joint formation, it is not known why proliferating chondrocytes become pre-joint cells or pre-hypertrophic cell during development of appendicular skeleton. Recent evidence involves integrin signaling in the decision between two alternative fates by proliferating chondrocytes in the skeletal elements, pre-joint or pre-hypertrophic fate. In this review will summarize our hypothesis on how chondrocyte differentiation and joint formation are coordinated.

Keywords

Cartilage differentiation, joint formation, Wnt, integrin, Ihh, BMP, skeletal development, chondrogenesis.

INTRODUCTION

Cell differentiation is a key event in the development of multicellular organisms. The mechanism of control by which a cell population decides to divert to one cell fate or another is currently an extensively studied problem in developmental biology. During development of the appendicular skeleton, long bones are initially formed as a cartilage scaffold. Cartilage differentiation begins with initial aggregation of prechondrogenic mesenchyme in response to chondrogenic factors, forming blastema that prefigures the future bone skeletal elements. Chondrogenic differentiation in the limb bud follows a proximal to distal sequence forming first the stylopod element (humerus/femur), then the cartilage primordium branches to form the zeugopod (radius-ulna/tibia-fibula) and finally it forms the autopod (fingers/toes) [1-4]. These cartilage elements are only formed by proliferating chondrocytes. When the skeletal pattern is established, the cells at specific regions of the cartilaginous primordium exit the cell cycle, initiating joint formation, and delimiting the boundary of each individual skeletal element. Later, the cells in the centre of each skeletal element instead of becoming pre-joint cells adopt an alternative fate and become pre-hypertrophic, leading down the path to hypertrophy and eventual ossification. Therefore, a major question to understand appendicular skeletogenesis is how proliferating chondrocytes take the decision to become joint or pre-hypertrophic cartilage. Recently, signals able to dedifferentiate the chondrocytes and to trigger the molecular cascade of joint have been identified [5]. Moreover, recent evidence suggests that integrin signaling regulates the decision of chondrocytes to choose between the two alternative fates mentioned above (joints formation vs. pre-hypertrophic differentiation) [6]. Considering these results, it is evident that coordination of joint formation and chondrocyte differentiation is a fundamental process for the control of the length and segmentation of long bones. Here we will summarize our hypothesis on how chondrocyte differentiation and joint formation are coordinated.

JOINT DEVELOPMENT.

Joint formation constitutes a morphogenetic process that occurs during the development of the appendicular skeleton of vertebrates. Joints are formed at specific regions of the continuous precartilaginous condensations by a complex process, which involves loss of chondrogenic markers and apoptosis. The interzone is the first morphological evidence of joint development (Fig 1A). Classical studies by Fell and Canti [7] suggest that joint specification depends of adjacent cartilage elements. However, Holder [8] suggest that cells of the interzone are prespecified, and influence of adjacent skeletal elements is not necessary for normal joint morphogenesis. When the presumptive elbow joint is eliminated before any morphological evidence, the humerus, radius, and ulna will be fused. In addition, if developing radius and ulna are removed, the interzone will still be formed [8]. The interzone is characterized by flattened, fibroblastic-like chondrocytes evolving into three cellular layers, one central intermediate lamina with low cell density flanked by two areas of high cell density. The central layer disappears possibly by apoptosis

leading to the formation of a primary joint cavity (cavitation). The two areas of high-density differentiate into articular cartilage covering the articular surfaces of adjacent bones. Ligaments, synovial lining, and tendons develop from cells located laterally to the skeletal element [9]. During the process of cavitation, the levels of hyaluronan are increased in the extracellular matrix resulting in decreased cellular adhesion and joint cavitation, forming completely separate skeletal elements [10, 11]. Articular cartilage is now formed and covers articular surfaces of the new skeletal elements. Finally, to maintain articular cartilage and joint functionality, different signals are expressed [12]. Any alteration in these signals results in disruption of differentiation of articular cartilage as occurs in osteo-degenerative diseases such as osteoarthritis [13, 14].

JOINT SPECIFICATION.

Joint formation may be related to the regulation of the balance between chondrogenic signals and joint inductive signals. However, the site in which joint formation will occur can be related to patterning signals that occurred when cartilage elements are only constituted by proliferating chondrocytes during early development of long bones. Therefore, we can consider that joint formation and cartilage differentiation are two highly coordinated processes. Interzones are formed when chondrocyte differentiation is inhibited (Fig. 1B and C). To this date *Wnt14* is the first gene reported to have the ability to initiate joint formation [5]. During development of long bones, *Wnt14* is expressed in joint-forming regions (Fig 1B). Misexpression of *Wnt14* induces morphological and molecular changes, characteristic of the first steps of interzone formation in places that would normally not form a joint. *Wnt14* acts on cartilage cells and induces downregulation of *Sox9*, *type II* and *type IX collagens*, *Aggrecan*, and *Noggin* expression and upregulation of the expression of joint markers such as *Gdf5*, *Autotaxin*, *Chordin* and CD44 which were expressed in the cells that resemble an interzone. These results suggest that *Wnt14* acts at two levels, the first blocking chondrogenesis, and the second inducing expression of joint markers in competent chondrogenic cells but not in non-chondrogenic cells [5]. Recently, it has been suggested that WNT14/ β catenin signaling is necessary and sufficient to induce joint formation in the mouse [15]. Historically the growth and differentiation factor-5 (*Gdf5*) a member of the Bone Morphogenetic Protein (BMP) family was considered as a molecule that directed joint development. Both mouse *Gdf5* and its homolog *CDMP1* in humans are mutated in syndromes where development of appendicular skeleton elements and joint morphogenesis is abnormal [16]. In addition to expression of *Gdf5* occurs the expression of *Gdf6* in the interzones. Deletion of *Gdf5* or *Gdf6* genes in single or double KO resulted in fusion of joints [17, 18], suggesting that both *Gdf5* and *Gdf6* are necessary for joint development. However, experiments of gain-of-function show that *Gdf5* is not sufficient to initiate the joint formation process instead GDF5 promotes cartilage overgrowth [19-22].

Other members of the BMP family, such as *Bmp2*, *Bmp4* and *Bmp7* are expressed in the joint-forming regions [23]. However, the function of these molecules remains obscure, since knockout of *Noggin*, an antagonist of BMP signaling or overexpression of BMP results loss of the joints and cartilage overgrowth [23-25], suggesting a role for BMP in the promotion of chondrogenesis. Chordin is another BMP antagonist that is expressed in the interzone [10]. Although the function of Chordin during joint formation is unknown, it is possible that it antagonizes the BMP capacity to induce maturation of cartilage [26]. The participation of autotaxin [27] and CD44 [28] during joint development is principally in the process of cavitation.

Misexpression of *Wnt14* in order to induce joint formation inhibits the formation of the next joint, through *Gdf5* expression [5]. Although *Gdf5* is expressed in the interzone, and mutations in the gene result in joint fusion, it is not necessary for joint formation [16]. In addition, overexpression studies have shown that this factor is a potent promoter of chondrogenesis [19-22]. Considering this role, it has been proposed that WNT14 induces expression of *Gdf5* and then the protein controls chondrogenesis, until other signals antagonize its function allowing joint-inducing signals to promote the formation of the next joint [5].

CHONDROCYTE DIFFERENTIATION

The role of chondrocyte differentiation is evident during the formation of appendicular skeleton. Long bones are formed by endochondral ossification in which transitory cartilaginous templates are subsequently replaced by bone tissue. Chondrogenesis begins when undifferentiated mesenchymal cells aggregate and central cells of the core of aggregations differentiate into chondrocytes, whereas cells at the periphery form a sheath around the cartilage called perichondrium [1-4]. The forming cells of the skeletal elements proliferate allowing elongation of cartilage templates, after chondrocytes of the central region of cartilage elements finish proliferation becoming pre-hypertrophic and later hypertrophic (Fig. 1D) [2]. At this stage of differentiation changes occur in the extracellular matrix (ECM) molecules, allowing invasion of blood vessels, bone marrow cells, and osteoblasts, which results in replacement of cartilage with bone [29]. Later, the cartilage grows only at the end of long bones in a narrow area called the growth plate, resembling embryonic chondrocyte differentiation [2].

Sox9 is a transcription factor with a high-mobility-group (HMG-box) DNA binding domain [30]. When chondrogenesis begins, *Sox9* is expressed in all chondroprogenitor cells [31-33]. Once *Sox9* is expressed, it triggers a molecular cascade in which *Bmpr1b*, *Sox5*, and *Sox6* are expressed leading to formation of cartilage [34, 35]. Then expression of cartilage-specific proteins is initiated, and an extracellular matrix rich in type II collagen, aggrecan, and sulfated proteoglycans surrounds the cells [30]. Haploinsufficiency for *Sox9* or elimination of the gene have revealed *Sox9* as an essential transcription factor in chondrogenesis [36]. In the absence of *Sox9*, cartilage differentiation is blocked at the mesenchymal condensation stage, showing an important function in the commitment of

chondrocyte lineage [35]. On the other hand, haploinsufficiency for *Sox9* reveals an additional role for this transcription factor as inhibitor of hypertrophic differentiation of chondrocytes [36].

During cartilage differentiation, there are different factors that control cell fate and switching of chondrocytes, i.e., from proliferating to prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes [37-44]. In the proliferating chondrocytes, *Sox5* and *Sox6* are needed to control progression of the cell cycle [45]. In addition, these genes delay chondrocyte pre-hypertrophy; at least in part down-regulating the gene *Runx2*. Next, proliferating chondrocytes undergoing pre-hypertrophy activate the expression of *Runx2* [46], *Ppr* (receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide) [43] and *Ihh* (Indian hedgehog) [47] as principal molecular markers. The absence of *Runx2* inhibits development of pre-hypertrophic and hypertrophic cartilage [48], while misexpression of *Runx2* induces development of ectopic hypertrophic cartilage [49]. When hypertrophy begins, *Ppr* and *Ihh* expression is down-regulated, and type X collagen is up-regulated. The switch between proliferating chondrocytes and pre-hypertrophy and hypertrophy is controlled by cyclic GMP-dependent protein kinase II that blocks the *Sox9* function inducing proliferating chondrocytes to enter the pre-hypertrophic program [50]. On the contrary, Histone deacetylase 4 blocks *Runx2* expression, inhibiting the transition between proliferating chondrocytes to hypertrophy [51]. In the control of all these cellular processes, several signaling molecules have been involved in the regulation of the growth plate. They include members of the fibroblast growth factor (*fgf*) gene family [52], *bmp* [39, 40], *Ppr/Pthrp* (parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide) [43, 44], *Indian hedgehog* [47], and *Wnt* [53].

COORDINATION OF JOINT FORMATION AND CARTILAGE DIFFERENTIATION.

The identification of *Wnt14* as joint inducer and as the earliest joint molecular marker has been relevant in the study of signals that control joint positioning [5, 54]. However, the point of control by which proliferating chondrocytes choose the pre-joint or pre-hypertrophic fate is poorly known. Recent evidence involves integrin signaling in the decision between the two alternative fates by proliferating chondrocytes in the skeletal elements, the pre-joint or the pre-hypertrophic fate [6]. The integrins are receptor for ECM proteins [55]. Blocking of $\alpha 5\beta 1$ integrin by specific antibodies or RGD peptide induces inhibition of pre-hypertrophic chondrocyte differentiation and ectopic joint formation between proliferating chondrocytes and hypertrophic chondrocytes with a plane of segmentation perpendicular to the long axis of the bone (Fig. 1E and F). Ectopic joint expressed *Wnt14*, *Gdf5*, *Chordin*, *Autotaxin* and type I collagen and CD44 suggesting that morphological and molecular changes correspond with the formation of a normal joint (Fig. 1G). The pattern expression of *Wnt14* and $\alpha 5\beta 1$ integrin during development of interzones indicates that $\alpha 5\beta 1$ integrin is down-regulated during joint formation (Fig.1 H and I). Moreover, misexpression of human $\alpha 5\beta 1$ integrin into the autopod of embryonic chick legs inhibits joint formation and

promotes pre-hypertrophic differentiation evaluated by expression of IHH (Fig 1 K-M). The conclusion of the work was that integrin signaling regulates the decision between two alternative fates by proliferating chondrocytes. In the presence of integrin, proliferating chondrocytes become pre-hypertrophic cartilage, while in the absence of integrin, proliferating chondrocytes enter the pre-joint program [6] (Fig. 2).

The role of perichondrium in cartilage differentiation has been recognized [56, 57], but its participation in joint formation is unknown. In more advanced skeletal elements, $\alpha 5\beta 1$ integrin is evident in perichondrium (fig. 1), suggesting that the perichondrium may exert an important role in joint formation [6]. Supporting this interpretation, Aszodi et al [58] have observed that joints develop normally in $\beta 1$ -integrin-deficient mice under the control of the type II collagen promoter that is expressed in all chondrocytes but not in perichondrium. Thus, the strong expression of $\alpha 5\beta 1$ integrin observed in the perichondrium of skeletal elements beginning pre-hypertrophic differentiation (Fig. 1 J) is not affected by the absence of $\beta 1$ integrin in type II collagen expressing cells in $\beta 1$ -integrin-deficient mice.

Additionally, in spite of the specific expression and function of BMP family members in developing joints, the function of these molecules remains obscure. Overexpression of BMP results in joint inhibition [23-25]; however, when $\alpha 5\beta 1$ integrin is blocked, BMP enhances joint formation and inhibits pre-hypertrophic cartilage, inducing overgrowth of cartilage and inhibition of joints instead. This finding is in agreement with the normal expression of several *bmp* genes in the developing joints, as it would be difficult to explain why *bmp* genes are expressed in the joints if they block joint formation. Then, in conclusion, in the absence of $\alpha 5\beta 1$ integrin, BMP signaling directs proliferating chondrocytes to the joint program. On the contrary, in the presence of $\alpha 5\beta 1$ integrin, BMP signaling direct proliferating chondrocytes to the prehypertrophic program expressing IHH [6] (Fig. 2).

In summary, progress in the knowledge of molecular mechanisms that control chondrocyte differentiation and joint formation together with the finding that $\alpha 5\beta 1$ integrin controls the fate of chondrocytes, open new perspectives to study the positioning of joints during skeletal morphogenesis as well as the length of each skeletal element.

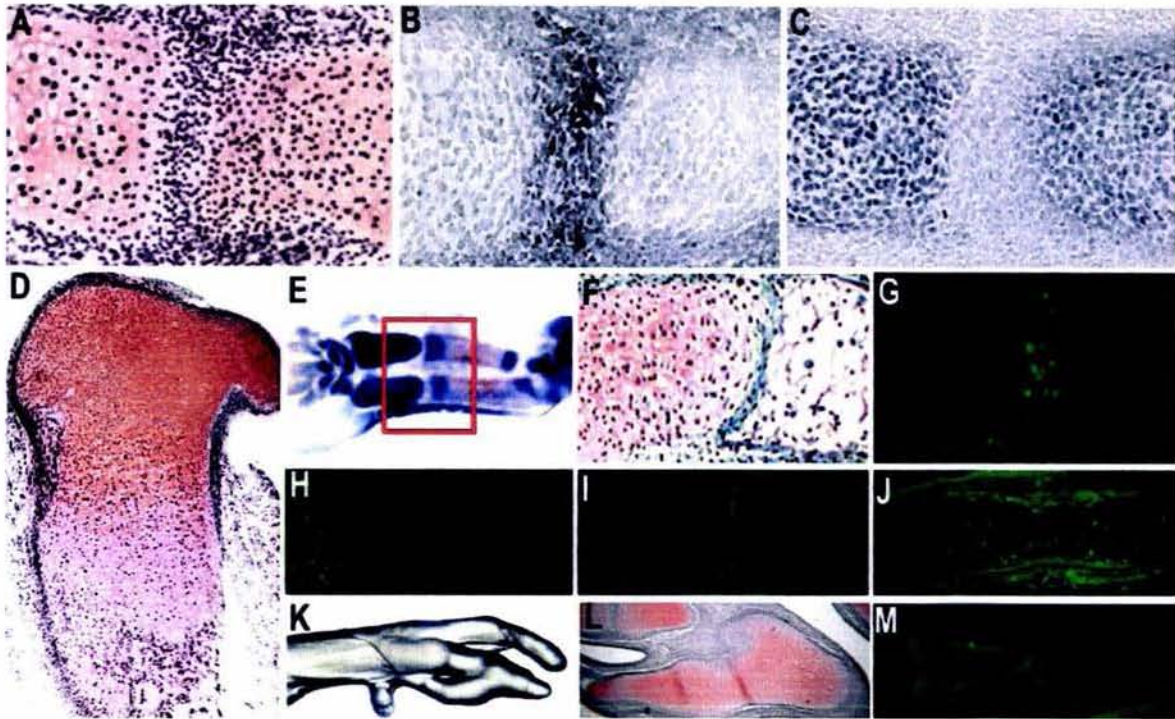


Figure 1. Coordination of joint formation and chondrocyte differentiation. (A-C) Interzones of chick toes in serial sections (A) Histological sections stained with Safranin O and fast green, to show cartilage in red. (B) In situ hybridization for *Wnt14* and (C) for *type II collagen*. *Wnt14* is expressed in the interzone, while *type II collagen* is only present in the cartilage but not in the interzone. (D) Endochondral ossification is evident in the femur of E15 mouse fetus. (E) Forelimb of E14.5 mouse embryo injected with blocking antibody against $\alpha 5$ integrin and cultured for 4 days, showing a gap (inset). (F) Ectopic joint is formed between proliferating chondrocytes and hypertrophic chondrocytes. (G) Ectopic joint is positive to *Wnt 14* expression. (H and I) Consecutive sections from a joint in the developing fingers showing immunofluorescence staining for $\alpha 5$ integrin (H) and in situ hybridization for *Wnt14* (I). (J) Section of the ulna stained for $\alpha 5$ integrin. (K-M). Misexpression of $\alpha 5\beta 1$ integrin induces fusion of joints and differentiation of pre-hypertrophic chondrocytes. Chick legs of HH stage 27 were electroporated with full-length cDNA $\alpha 5\beta 1$ integrins in the region of the autopod and incubated for 5 days. (K) Chick legs were fixed in paraformaldehyde and photographed to observe phenotype induced by misexpression of human $\alpha 5\beta 1$ integrin. (L-M) Consecutive sections of the leg show in (K) to show (L) the absence of joints and the presence of pre-hypertrophic chondrocytes. (M) The expression of IHH is evident under misexpression of $\alpha 5\beta 1$ integrin; IHH is a molecular marker of pre-hypertrophic chondrocytes.

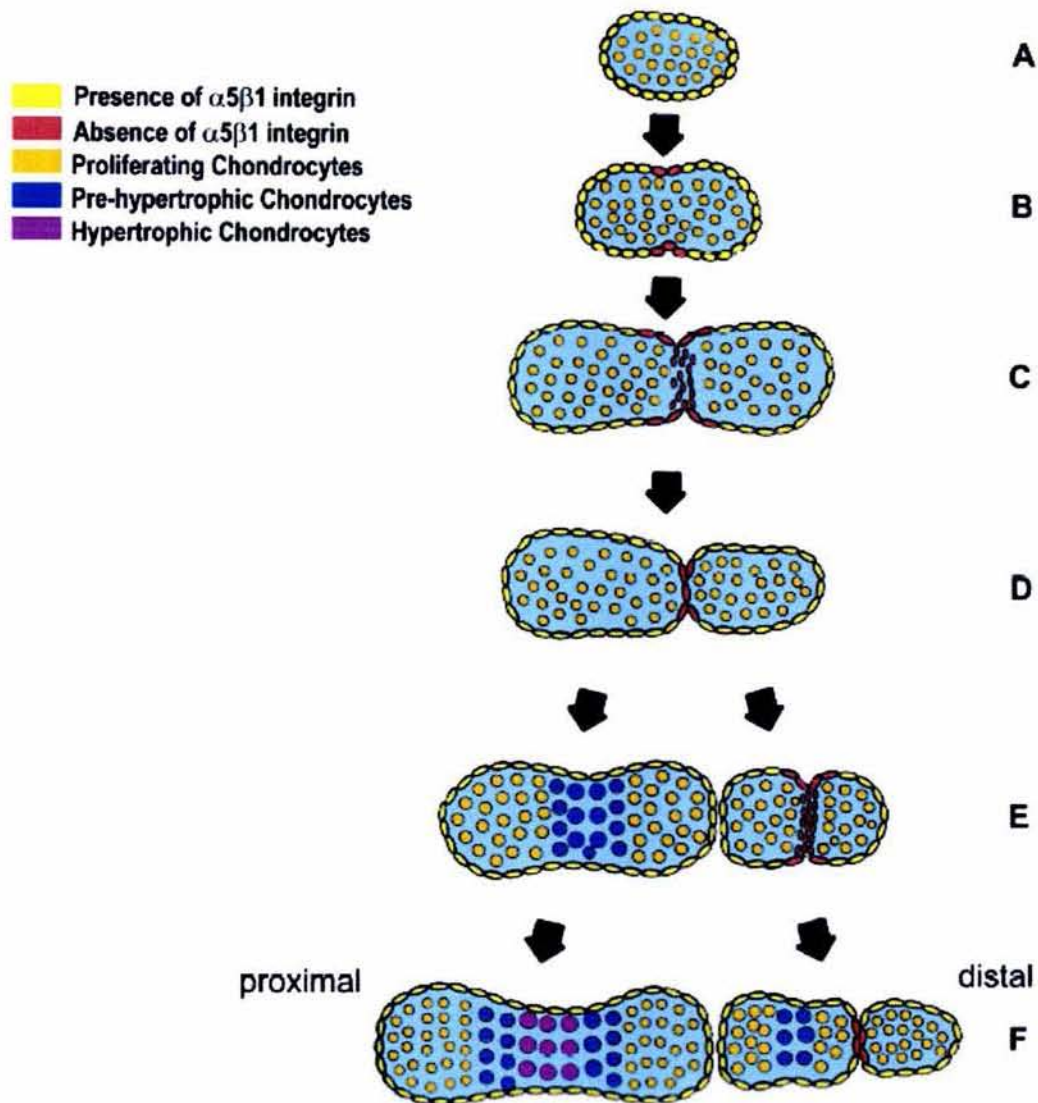


Figure 2. **Model to explain coordination of joint formation and cartilage differentiation by $\alpha 5 \beta 1$ integrin in the appendicular skeleton.** (A-D) Skeletal elements formed by proliferating chondrocytes. (A) Cartilage differentiation begins with initial aggregation of prechondrogenic mesenchyme. (B-D) When the skeletal pattern is established the cells in the centre of the continuous precartilaginous condensations exit the cell cycle, if $\alpha 5 \beta 1$ integrin is down regulated in the perichondrium, proliferating chondrocytes initiates joint program, delimiting the boundary of each individual skeletal element. (E, F) Once skeletal elements are segmented, the new bone continues their development. In the proximal elements of the appendicular skeleton, if $\alpha 5 \beta 1$ integrin expression is maintained in the perichondrium, proliferating chondrocytes become pre-hypertrophic, leading down the path to hypertrophy and eventual ossification. In the distal element, the steps (B-D) are repeated to generate new individual skeletal elements. The actions of BMP to promote joint formation or cartilage maturation depend of the presence of $\alpha 5 \beta 1$ integrin in the perichondrium.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Juan Hurlé for the critical reading of the manuscript, and Marcia Bustamante Zepeda, Gerardo Arrellín Rosas, Georgina Diaz Herrera, and Lucía Brito for technical assistance. Isabel Pérez Montfort corrected the English version of the manuscript. This work was supported by grants 34334-N and 42568-Q (to J C-M) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Mexico, and IN216701 and IN218104 (to J C-M) from DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de Mexico (UNAM). D G-C was the recipient of a scholarship from CONACyT and UNAM and was supported by grant 202358

REFERENCES.

- [1] Karsenty, G. and Wagner, E. 2002, *Dev. Cell.*, 2, 389.
- [2] Kronenberg, H. 2003, *Nature*, 423, 332.
- [3] Karsenty, G. 2003. *Nature*, 423, 316.
- [4] Mariani, F. and Martin, G. 2003, *Nature*, 423, 319.
- [5] Hartmann, C. and Tabin, C. 2001, *Cell*, 104, 341.
- [6] Garciadiego-Cazares, D., Rosales, C., Katoh, M. and Chimal-Monroy, J. 2004, *Development*, 131, 4735.
- [7] Fell, H. and Canti, R. 1934, *Proc. R. Soc. B.*, 116, 316.
- [8] Holder, N. 1977, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 39, 115.
- [9] Mitrovic, D. 1978, *Am. J. Anat.*, 151, 475.
- [10] Francis-West, P., Parish, J., Lee, K. and Archer, C. 1999, *Cell Tissue Res.*, 296, 111.
- [11] Ward, A., Dowthwaite, G. and Pitsillides, A. 1999, *Biochem. Soc. Trans.*, 27, 128.
- [12] Rountree, R., Schoor, M., Chen, H., Marks, M., Harley, V., Mishina, Y. and Kingsley, D. 2004, *PLoS. Biol.*, 2, e355.
- [13] Yang, X., Chen, L., Xu, X., Li, C., Huang, C. and Deng, C. 2001, *J. Cell Biol.*, 153, 35.
- [14] Serra, R., Johnson, M., Filvaroff, E., LaBorde, J., Sheehan, D., Derynck, R. and Moses, H. 1997, *J. Cell Biol.*, 139, 541.
- [15] Guo, X., Day, T., Jiang, X., Garrett-Beal, L., Topol, L. and Yang, Y. 2004, *Genes Dev.*, 18, 2404.
- [16] Storm, E., Huynh, T., Copeland, N., Jenkins, N., Kingsley, D. and Lee, S. 1994, *Nature*, 368, 639.
- [17] Storm, E. and Kingsley, D. 1999, *Dev. Biol.*, 209, 11-27.
- [18] Settle, S., Rountree, R., Sinha, A., Thacker, A., Higgins, K. and Kingsley, D. 2003, *Dev. Biol.*, 254, 116.
- [19] Tsumaki, N., Tanaka, K., Arikawa-Hirasawa, E., Nakase, T., Kimura, T., Thomas, J., Ochi, T., Luyten, F. and Yamada, Y. 1999. *J. Cell Biol.*, 144, 161.
- [20] Merino, R., Macias, D., Ganan, Y., Economides, A., Wang, X., Wu, Q., Stahl, N., Sampath, K., Varona, P. and Hurler, J. 1999, *Dev. Biol.*, 206, 33.
- [21] Francis-West, P., Abdelfattah, A., Chen, P., Allen, C., Parish, J., Ladher, R., Allen, S., MacPherson, S., Luyten, F. and Archer, C. 1999, *Development*, 126, 1305.
- [22] Tsumaki, N., Nakase, T., Miyaji, T., Kakiuchi, M., Kimura, T., Ochi, T. and Yoshikawa, H. 2002, *J. Bone Miner. Res.*, 17, 898.
- [23] Macias, D., Ganan, Y., Sampath, T., Piedra, M., Ros, M. & Hurler, J. 1997, *Development*, 124, 1109.
- [24] Brunet, L., McMahon, J., McMahon, A. and Harland, R. 1998, *Science*, 280, 1455.
- [25] Duprez, D., Bella, E., Richardson, M., Archer, C., Wolpert, L., Brickell, P. and Francis-West, P. 1996, *Mech. Dev.*, 57, 145.
- [26] Zhang, D., Ferguson, C., O'Keefe, R., Puzas, J., Rosier, R. and Reynolds, P. 2002, *J. Bone Miner. Res.*, 17, 293.

- [27] Bachner, D., Ahrens, M., Betat, N., Schroder, D. and Gross, G. 1999, *Mech. Dev.*, 84, 121.
- [28] Edwards, J., Wilkinson, L., Jones, H., Soothill, P., Henderson, K., Worrall, J. and Pitsillides, A. 1994, *J. Anat.*, 185, 355.
- [29] Ortega, N., Behonick, D. and Werb, Z., 2004, *Trends. Cell Biol.*, 14, 86.
- [30] de Crombrughe, B., Lefebvre, V., Behringer, R., Bi, W., Murakami, S. and Huang, W. 2000, *Matrix Biol.*, 19, 389.
- [31] Bi, W., Deng, J., Zhang, Z., Behringer, R. and de Crombrughe, B. 1999, *Nat. Genet.*, 22, 85.
- [32] Yan, Y., Miller, C., Nissen, R., Singer, A., Liu, D., Kirn, A., Draper, B., Willoughby, J., Morcos, P., Amsterdam, A., Chung, B., Westerfield, M., Haffter, P., Hopkins, N., Kimmel, C. and Postlethwait, J. 2002, *Development*, 129, 5065.
- [33] Lefebvre, V., Behringer, R. and de Crombrughe, B. (2001) *Ost. Cart.*, 9, S69.
- [34] Chimal-Monroy, J., Rodriguez-Leon, J., Montero, J., Ganan, Y., Macias, D., Merino, R. & Hurler, J. 2003, *Dev. Biol.*, 257, 292.
- [35] Akiyama, H., Chaboissier, M., Martin, J., Schedl, A. and de Crombrughe, B. 2002, *Genes Dev.*, 16, 2813.
- [36] Bi, W., Huang, W., Whitworth, D., Deng, J., Zhang, Z., Behringer, R. and de Crombrughe, B. 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98, 6698.
- [37] Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G., Kronenberg, H., Tabin, C., 1996, *Science*, 273, 613.
- [38] Lanske, B., Karaplis, A., Lee, K., Luz, A., Vortkamp, A., Pirro, A., Karperien, M., Defize, L., Ho, C., Mulligan, R., AbouSamra, A., Juppner, H., Segre, G. and Kronenberg, H. 1996, *Science*, 273, 663.
- [39] Minina, E., Wenzel, H., Kreschel, C., Karp, S., Gaffield, W., McMahon, A. and Vortkamp, A. 2001, *Development*, 128, 4523.
- [40] Minina, E., Kreschel, C., Naski, M., Ornitz, D. and Vortkamp, A. 2002, *Dev. Cell*, 3, 439.
- [41] Liu, Z., Xu, J., Colvin, J. and Ornitz, D. 2002, *Genes Dev.*, 16, 859.
- [42] Sachdev, S., Dietz, U., Oshima, Y., Lang, M., Knapik, E., Hiraki, Y. and Shukunami, C. 2001, *Mech. Dev.*, 105, 157.
- [43] Karaplis, A., Luz, A., Glowacki, J., Bronson, R., Tybulewicz, V., Kronenberg, H., and Mulligan, R. 1994, *Genes Dev.*, 8, 277.
- [44] Schipani, E., Lanske, B., Hunzelman, J., Luz, A., Kovacs, C., Lee, K., Pirro, A., Kronenberg, H. and Juppner, H. 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94, 13689.
- [45] Smits, P., Dy, P., Mitra, S. and Lefebvre, V. 2004, *J. Cell Biol.*, 164, 747.
- [46] Stricker, S., Fundele, R., Vortkamp, A. and Mundlos, S. 2002, *Dev. Biol.*, 245, 95.
- [47] St-Jacques, B., Hammerschmidt, M., McMahon, A. 1999, *Genes Dev.*, 13, 2072.
- [48] Yoshida, C., Yamamoto, H., Fujita, T., Furuichi, T., Ito, K., Inoue, K., Yamana, K., Zanma, A., Takada, K., Ito, Y. and Komori, T. 2004, *Genes. Dev.*, 18, 952.

- [49] Ueta, C., Iwamoto, M., Kanatani, N., Yoshida, C., Liu, Y., Enomoto-Iwamoto, M., Ohmori, T., Enomoto, H., Nakata, K., Takada, K., Kurisu, K. and Komori, T. 2001., *J. Cell Biol.*, 153, 87.
- [50] Chikuda H., Kugimiya, F., Hoshi, K., Ikeda, T., Ogasawara, T., Shimoaka, T., Kawano, H., Kamekura, S., Tsuchida, A., Yokoi, N., Nakamura, K., Komeda K., Chung U. and Kawaguchi, H. 2004, *Genes Dev.* 18, 2348.
- [51] Vega, R., Oh, J., Barbosa, A., Yang, X., Meadows, E., McAnally, J., Pomajzl, Ch., Shelton, J., Richardson, J., Karsenty, G. and Olson, E. 2004, *Cell*, 119, 555.
- [52] Ornitz D. and Marie, P. 2002, *Genes Dev.*, 16, 1446.
- [53] Hartmann, C. and Tabin, C. 2000, *Development*, 127, 3141.
- [54] Sanz-Ezquerro, J. & Tickle, C. 2003, *Curr. Biol.* 13, 1830.
- [55] Hynes, R. 2002, *Cell*, 110, 673.
- [56] Di Nino, D., Crochiere, M. and Linsenmayer, T. 2002, *Dev. Dyn.*, 225, 250.
- [57] Long, F. and Linsenmayer, T. 1998, *Development*, 125, 1067.
- [58] Aszodi A., Brakebusch, C. and Fassler, R. 2003, *Genes Dev.* 17, 2465.