

S8
2EJ



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EXPRESION DE LOS TGF- β 1, β 2, β 3 Y SUS
RECEPTORES DURANTE LA DIFERENCIACION
DEL CARTILAGO
IN VITRO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A

MARTHA Yolanda GUTIERREZ CHAVEZ

271909

DIRECTOR TESIS: DR. JESUS CHIMAL MONROY



MEXICO, D. F. 1999



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

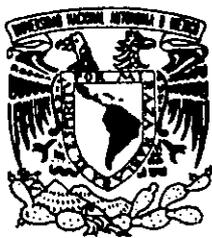


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Expresión de los TGF- β 1, B2, B3 y sus receptores durante
la diferenciación del cartílago in vitro

realizado por Gutiérrez Chávez Martha Yolanda

con número de cuenta 9134301-7 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario / Dr. Jesús Chimal Monroy

Propietario / Dra. Rocío Salceda Sacanelles

Propietario / Dra. María del Carmen Uribe Aránzabal

Suplente / Dr. Emilio Rojas del Castillo

Suplente / Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Consejo Departamental de Biología

Dra. Edna María Suárez Díaz

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Tejido Conjuntivo del Departamento de Biología Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas bajo la dirección del Dr. Jesús Chimal Monroy.

Y fue apoyado por PAPIIT IN215696 de DGAPA UNAM, CONACYT I25818N y por medio del programa beca-tesis de Fundación UNAM.

DEDICATORIA

Con todo mi amor para el más pequeño de mis grandes amores, por la tranquilidad que te robe, por hacerme muy feliz y regalarme tus sonrisas, por todo lo que significas para mi y ser mi más grande motivo para superarme. A Israel por tu amor y paciencia, ayudarme a seguir adelante, y formar parte de mi vida

A mis Padres: María y Abner por su amor incondicional, el apoyo que siempre me han brindado y por ser uno de sus sueños.

A mis hermanos: Abner J., Héctor A. y David E. Por su inmejorable compañía, cuidados y cariño. Y por ser la mejor manera que tengo para agradecer el amor que le tienen a mi hijo.

A Jesús, Guille y Carlitos: Por hacerme sentir parte de un equipo, por su ayuda, por considerar mi trabajo parte del suyo y por el especial interés que pusieron en él. Porque los tres tienen toda mi admiración y respeto por ser unas maravillosas personas.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Lino Díaz de León por aceptar mi ingreso a su laboratorio y por su apoyo A los miembros del laboratorio en especial a Simona, David y al gran ausente Ernesto por la ayuda que en algún momento me brindaron.

Al Dr. Jesús Chmal Monroy por la paciencia y humildad con la que me transmitió su conocimiento, por el tiempo que perdió e invirtió en mí. Por su amistad y sus consejos. A Guille y Sebastian por su cariño.

Ami jurado: Dra: Rocio Salceda Sacanelles
Dra: Ma del Carmen Uribe Aránzabal
Dr: Emilio Rojas del Castillo
Dr: Ignacio Camacho Arroyo

Por aceptar serlo, sus comentarios, sugerencias y por dejarme elegir como desarrollar mi trabajo.

A Isabel, Don José y al personal del bioterio por contribuir en la elaboración de mi trabajo.

A Beatriz y Natalia por su apoyo y los momentos desagradables que pasamos juntas

A todas las personas que forman parte de mi vida y a las que me ayudaron en la realización de mi tesis, que Dios los bendiga, yo sé que si alguno de ustedes hubiera faltado no hubiera culminado mi trabajo tan satisfactoriamente.

GRACIAS, LO LOGRAMOS !

TODO LO PUEDO EN CRISTO QUE ME FORTALECE

Fil 4:13

CONTENIDO

• RESUMEN.....	1
• INTRODUCCIÓN.....	3
Formación de las extremidades embrionarias.....	3
Figura 1.....	5
Cartilago.....	6
Superfamilia de los TGF- β	10
Figura 2.....	16
El papel de los TGF- β en la condrogénesis.....	18
Diferencias en el desarrollo de las extremidades anterior y posterior.....	20
• HIPÓTESIS.....	22
• OBJETIVO.....	22
• MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
• RESULTADOS.....	25
Expresión de los TGF- β 1, β 2, y β 3 en la condrogénesis <i>in vitro</i>	25
Figura 4.....	26
Figura 5.....	27
Expresión de los receptores TGF- β en la condrogénesis <i>in vitro</i>	28
Figura 6.....	29
Figura 7.....	30
Expresión de proteoglicanos en la condrogénesis <i>in vitro</i>	31
Figura 8.....	32

EXPRESIÓN DE LOS TGF- β 1, β 2, β 3 Y SUS RECEPTORES DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DEL CARTÍLAGO *IN VITRO*

RESUMEN

La condensación de células mesenquimáticas de las extremidades embrionarias de ratón, en el estadio 19 de desarrollo es el inicio del proceso de condrogénesis. Se han propuesto algunos mecanismos que activan la estimulación de este proceso. Entre ellos está el establecimiento de contactos célula-célula y la presencia de algunos factores de crecimiento durante el desarrollo de este proceso. El objetivo de este trabajo fue determinar la expresión de los TGF- β 1, β 2, β 3, y sus receptores durante la diferenciación de cartílago *in vitro*. El cultivo de alta densidad a partir de células mesenquimáticas de extremidad embrionaria de ratón y la realización de la técnica inmunohistoquímica fueron utilizados para determinar la expresión de los TGF- β y sus receptores en la condrogénesis, en el mesénquima de la extremidad anterior y en el mesénquima de la extremidad posterior. Esto con el fin de comparar la expresión de los TGF- β y sus receptores en cada uno de los mesénquimas.

Las isoformas de los TGF- β 1, β 2, β 3 y sus receptores muestran un patrón de expresión espacio-temporal diferente. El TGF- β 1 es el factor que se expresa con menor intensidad y el TGF- β 2 el que se expresa con una intensidad mayor durante los cuatro días de cultivo. En lo que se refiere a los receptores, el receptor Act-RI sólo se expresa en los días 2 y 3 de cultivo y los receptores TGF- β RI y TGF- β RII muestran un patrón de expresión similar en cuanto a su intensidad. Por otro lado, el receptor tipo III (betaglicano), la decorina y el biglicano (los tres proteoglicanos) se expresan durante los cuatro días de cultivo, lo que sugiere una participación de estas moléculas en

INTRODUCCIÓN

Las extremidades de los vertebrados son estructuras extremadamente complejas. La información necesaria para construir una extremidad está en función de un sistema tridimensional que es regulado por tres centros de señalamiento que establecen la formación de los tres ejes de la extremidad (1). El eje próximo-distal (hombro-dedos y cadera-dedos) está regulado por la llamada cresta apical del ectodermo (AER); el eje antero-posterior (dedo pulgar-dedo meñique) está regulado por la zona de actividad polarizante (ZPA) y finalmente el eje dorso-ventral (nudillos-palma) está regulado por el ectodermo dorsal (1).

Se sabe que las células que contribuyen a la formación de la extremidad embrionaria tienen dos orígenes distintos, las células que provienen del miotomo de las somitas formarán las células musculares, mientras que las que provienen de la placa lateral del mesodermo darán origen al tejido conjuntivo y al cartilago (2).

La formación de la extremidad se inicia con la migración de las células del mesodermo de la placa lateral hacia una región cercana al ectodermo, éste se engruesa como consecuencia de las interacciones inductivas entre el mesodermo y el ectodermo y da origen a la AER. La AER promueve el crecimiento próximo-distal de la extremidad y la ZPA mantiene la expresión de las moléculas que generan el eje antero-posterior y coordina las proteínas específicas del eje dorso-ventral (1).

La AER se localiza en el límite entre el ectodermo dorsal y ventral. Sólo el ectodermo que está junto al primordio de la extremidad tiene la posibilidad de formar la AER (1). Una vez formada la AER la extremidad se elonga y se establece la polaridad próximo-distal. El crecimiento próximo-distal y diferenciación del primordio de la extremidad es posible por una serie de interacciones

entre el mesénquima del primordio de la extremidad y la AER. Subyacente a la AER existe una zona celular con alta capacidad proliferativa, denominada zona de progreso, si la AER se elimina la proliferación celular de la zona de progreso cesa y se detiene el desarrollo ulterior de la extremidad, y si la AER es transplantada en el primordio de una extremidad ya existente, el resultado es la formación de estructuras supernumerarias. La zona de progreso se extiende 200 micras desde la AER. Las primeras células que dejan la zona de progreso forman estructuras proximales, y las que tienen numerosas divisiones en la zona de progreso contribuyen a la formación de las estructuras más distales (1).

La división de las células mesenquimáticas en la zona de progreso es regulada por el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) (3), FGF-4 (4), y FGF-8 (5). Los FGF-2 y FGF-8 se localizan a todo lo largo de la AER, mientras que el FGF-4 se localiza en la región posterior de la AER. Como ya se menciono la eliminación de la AER interrumpe el crecimiento de la extremidad (2 y 5), pero la aplicación de esferas recubiertas con los FGF-2, FGF-4 y FGF-8 en el mesénquima posterior distal, reemplaza a la AER y dirige el crecimiento y la formación completa de la extremidad (6-8).

Por otro lado, en la parte posterior de la extremidad se localiza una región con capacidad para dirigir la polaridad antero-posterior; esta zona es la llamada ZPA. La polaridad antero-posterior de la extremidad parece estar regulada por el gen *sonic hedgehog (shh)*, este gen se expresa en la ZPA y el implante de células que expresan el *shh* a la región anterior de la misma es capaz de inducir duplicación de estructuras en imagen especular (9). Antes de determinar que el *shh* tuviera actividad polarizante se había considerado al ácido retinoico (AR) como el morfógeno natural de la ZPA, ya que la implantación de esferas recubiertas de AR, en la región anterior, también

induce estructuras duplicadas y en imagen especular como sucede en los implantes de la ZPA (2). No obstante, la distribución y la concentración de los receptores al AR y de las proteínas de unión al AR en la extremidad hacían difícil considerarlo como el morfógeno. En cambio se sugirió que la posible función del AR es la inducción de la ZPA en el mesénquima posterior (10-11), a través de la expresión del gen *shh* (9). La eliminación de la AER suprime la actividad de la ZPA y la expresión de *shh*, la aplicación del FGF-4 restablece la expresión del *shh* y por lo tanto, la actividad polarizante de la ZPA (12).

En lo que se refiere a la polaridad dorso-ventral, el ectodermo no perteneciente a la AER, dirige al mesénquima en el establecimiento de la polaridad, pues la rotación de 180° del ectodermo, con respecto al mesodermo, invierte la polaridad dorso-ventral (7). Esta polaridad dorso-ventral parece estar controlada por el ectodermo dorsal, a través del gen *wnt7A* (13 y 14), la eliminación de éste en ratones provoca que las extremidades tengan un doble patrón ventral (13). Por otro lado, la eliminación del ectodermo dorsal conlleva a la pérdida de los elementos esqueléticos posteriores y a una ausencia en la expresión de *shh* (14 y 15). La pérdida del ectodermo dorsal puede ser sustituida por células que expresan el gen *wnt7A*.

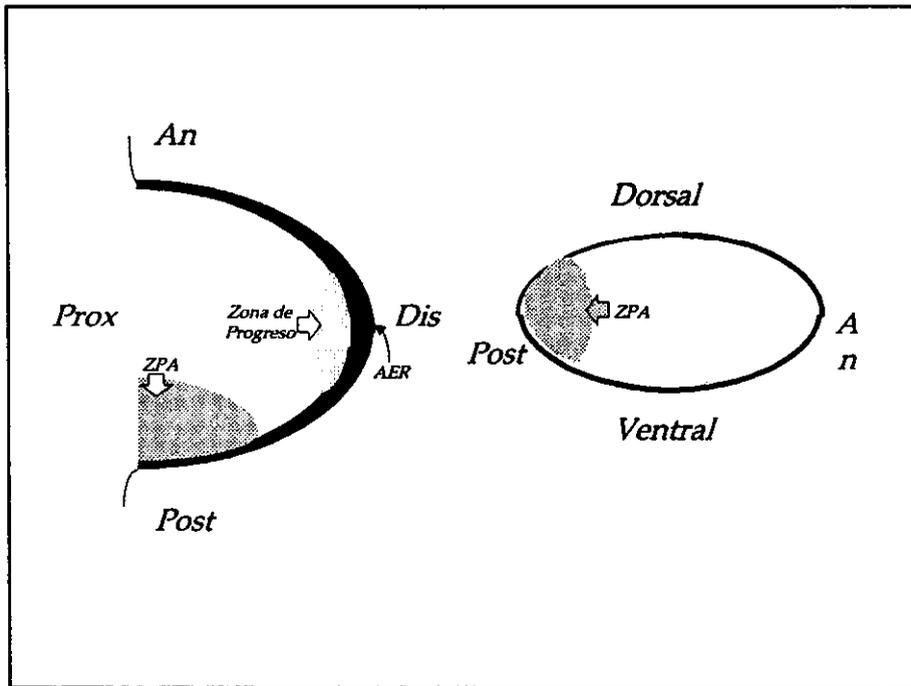


Figura 1. Esta figura muestra los tres centros de polaridad que se establecen durante la formación de las extremidades embrionarias, ZPA significa Zona de Actividad Polarizante; AER significa Apical Ectodermal Ridge.

Hasta ahora se ha tratado a la extremidad anterior y posterior de manera semejante, y aunque estas siguen las mismas reglas de formación tienen un patrón diferente de expresión. Ciertamente un pie no es una mano ni un ala es una pierna por lo que se deberían tratar cada una en particular.

Antes de hacer notar las diferencias entre las extremidades anteriores y posteriores es importante mencionar que uno de los tipos celulares fundamentales de las extremidades es el cartílago.

El cartílago es tejido conjuntivo altamente especializado que se distribuye en todo el cuerpo y lo ayuda a resistir diferentes fuerzas de compresión. Es esencialmente avascular y se caracteriza por su bajo contenido en células y abundante matriz extracelular (MEC). Las células que lo componen son los condrocitos (16 y 17).

Durante el inicio de la vida fetal el cartílago forma temporalmente la mayor parte del esqueleto, y persiste en los mamíferos adultos en las superficies articulares de los huesos y como órgano de sostén en las vías respiratorias y partes del oído. La MEC tiene fibras elásticas y colágenas que aumentan la elasticidad y la fuerza tensil respectivamente, adaptan el tejido a los requerimientos mecánicos de distintas regiones del cuerpo. Las diferencias en tipo y cantidad de fibras incorporadas a la MEC permitieron establecer las bases de la clasificación del cartílago; en cartílago hialino, cartílago articular, cartílago elástico y fibrocartilago (17).

El cartílago hialino tiene aspecto de una masa translúcida, forma las caras de los huesos en las articulaciones, los cartílagos costales y los cartílagos de la nariz, la laringe, la tráquea y los bronquios. En el feto, prácticamente todo el esqueleto está formado por cartílago hialino, que después es substituido por hueso (17).

Los condrocitos son típicamente ovoides, tienden a encontrarse en el centro de la estructura del cartílago. El núcleo es relativamente largo, usualmente colocado en la parte central, y conforme a la forma de la célula. Los condrocitos ocupan pequeñas cavidades llamadas lagunas en la MEC. Dos u ocasionalmente más condrocitos pueden ocupar una sola laguna en el cartílago hialino, especialmente en individuos jóvenes, lo que implica su reciente división (17).

El cartílago articular es un cartílago hialino que juega un papel fundamental en la función normal de todas las articulaciones, de manera que es capaz de soportar las fuerzas de compresión, tensión y fricción a las que está sometido (17).

El cartílago elástico se presenta en los sitios en que se necesita apoyo y flexibilidad, por ejemplo en el oído externo, el conducto auditivo, la epiglotis y los cartílagos de la laringe. Su MEC, además de presentar colágenas presenta una densa red de elastina. La elastina aparece como una mancha irregular asociada con fibrillas periféricas poco diferenciadas. Las células cercanas al pericondrio tienen una forma aplanada y las fibras de colágena presentan bandeado (17).

El fibrocartílago se ubica en los sitios donde se necesita un apoyo firme o fuerza ténsil. Se localiza en los discos intervertebrales, y en algunos discos intraarticulares. Su MEC está formada principalmente por haces densos de colágena. El fibrocartílago nunca se encuentra solo siempre está rodeado de cartílago hialino o fibras densas de tejido (17).

El cartílago juega un papel central en la formación y crecimiento del esqueleto pues durante el desarrollo fetal y posnatal el cartílago sirve como un tejido intermediario en el proceso de la formación del hueso, a través del proceso de osificación endocondral (16). Incluso en los procesos de reparación de fracturas, el cartílago es un intermediario en la formación y consolidación del tejido óseo. El cartílago que participa en la formación del hueso se le llama

cartilago transitorio, éste se encuentra de manera evidente en la placa de crecimiento, en la cual las células del cartilago, los condrocitos, proliferan y maduran para después ser reemplazados por los osteoblastos durante la osificación endocondral. En la placa de crecimiento se pueden observar cuatro estadios de desarrollo; el cartilago en reposo, el cartilago en proliferación, el cartilago maduro y el cartilago hipertrófico (17).

La diferenciación del cartilago al inicio del desarrollo de la extremidad embrionaria es caracterizado por un proceso transitorio de condensación en el cual las células precondrogénicas se unen unas a otras iniciándose el depósito de la matriz del cartilago. Durante este proceso de condensación se inician contactos célula-célula o célula-MEC, que favorecen la diferenciación condrogénica (18 y 19).

El programa de diferenciación del cartilago, durante la condrogénesis *in vivo*, se ha dividido en cuatro fases. La primera fase se denomina mesénquima laxo, y corresponde a las células del mesénquima de la zona de progreso, que se encuentran aisladas unas de otras y rodeadas por una abundante MEC, compuesta principalmente por la colágena tipo I, la fibronectina, y el versicano (19-23). Al elongarse la extremidad, las células mesenquimáticas dejan de recibir las señales de la zona de progreso y se diferencian hacia cartilago. En este proceso ocurren cambios en la MEC, que favorecen los contactos célula-célula y que llevan al establecimiento del blastema condrogénico. En esta segunda etapa se expresan varias moléculas que favorecen esos contactos celulares. Entre las más importantes se encuentran la N-cadherina (24), la N-CAM (25), la tenascina (26), los sindecanos 1, 2 y 3 (23, 27-28), proteoglicanos ricos en sulfato de heparán (29-30), glicoproteínas compuestas principalmente por D-galactosa (β 1-3)-N-acetil-D-galactosamina, y N- acetil-glucosamina (31-32), además de la colágena tipo IIA (33). Al

culminar la formación del blastema condrogénico cesa la expresión de esas moléculas e inicia la diferenciación condrogénica con la formación del cartílago maduro. Éste se caracteriza por la presencia de las colágenas IIB, IX y XI, el agregano, la proteína de unión, y la proteína Gla de la Matriz (34-35). Finalmente, antes de que se lleve a cabo la osificación, existe un cartílago intermediario que favorece la misma, éste es el cartílago hipertrófico. Se caracteriza por la abundante expresión de la colágena tipo X, la fosfatasa alcalina, la osteopontina y la osteonectina (36-37).

El blastema condrogénico es la fase que regula la condrogénesis, ya que la agregación celular coincide con una disminución de la proliferación celular y estimulación de las actividades de los genes específicos de cartílago, su expresión depende en gran medida de factores de crecimiento.

Los diferentes factores de crecimiento existentes juegan un papel central en la diferenciación de cartílago, pero este trabajo solo se enfoca a la importancia de los factores de crecimiento pertenecientes a la familia de los TGF- β (38); que intervienen en la condensación celular siendo esta el inicio de la diferenciación del cartílago y parte del objeto de estudio de este trabajo.

La Superfamilia de los TGF- β

Los miembros que componen a la superfamilia de los TGF- β se caracterizan por la conservación de siete de los nueve residuos de cisteína que cada uno contiene. A la superfamilia de los TGF- β lo integran las Inhibinas/Activinas, la sustancia inhibidora del conducto de Müller (MIS), la familia DPP/BMP/DVR (39-44) y un gen expresado en los ovocitos de rana. En general todos los miembros de esta superfamilia tienen diversas funciones que incluyen, desde efectos en la embriogénesis temprana como en la diferenciación de linajes específicos y en la organogénesis,

tanto en invertebrados como en vertebrados, hasta efectos que llevan al control de la proliferación celular (38).

La MIS induce la regresión del rudimento del conducto de Müller específico de las hembras, en el sistema reproductivo del macho; las inhibinas y activinas regulan la actividad de las gonadotropinas, la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH); la determinación de los ejes embrionarios, en el desarrollo facial de la epidermis, y de las vibrisas del ratón; la familia DPP/BMP/DVR está compuesta por más de 20 miembros entre los que se incluyen a las proteínas morfogénicas de hueso (BMP) (39-44), los factores de crecimiento y diferenciación (GDF) (45-47), también llamadas proteínas morfogénicas derivadas de cartílago (CDMP), en *Drosophila* los genes de decapentaplégico (*dpp*) (48), *screw* (*scw*) (49) y 60A (50). Inicialmente las BMP fueron identificadas por su capacidad de inducir la formación de cartílago y hueso *in vivo* y en sitios ectópicos en roedores (39). Sin embargo, más recientemente, se demostró que las BMP también participan en la especificación de los ejes embrionarios y en una gran variedad de tejidos y órganos durante el desarrollo de los vertebrados (43-44) DPP participa en el desarrollo embrionario de la mosca (1).

Finalmente la familia del TGF- β está compuesta por cinco miembros, TGF- β 1, - β 2 y - β 3 descritas en los mamíferos, TGF- β 4 aislado de pollo y el TGF- β 5 en *Xenopus*. Los TGF- β juegan un papel importante en la migración, crecimiento, y diferenciación celular, regulación de la MEC, y desarrollo embrionario. Los TGF- β tienen un papel multifuncional pero su acción depende de muchos parámetros incluso el tipo celular, el estado de diferenciación, la condición de crecimiento y la presencia de otros factores de crecimiento presentes (51). Los TGF- β activan la transcripción e incrementan la síntesis y secreción de proteínas de la MEC, disminuyen la

síntesis de enzimas proteolíticas que degradan proteínas de la MEC e incrementan la síntesis de inhibidores de proteasas que bloquean la actividad de estas enzimas. El efecto de los TGF- β sobre el incremento en la síntesis de proteínas de la MEC ha sido demostrado tanto *in vivo* como *in vitro*. Además, incrementa la interacción célula-MEC (52); promueven la expresión de receptores de superficie celular y proteínas de adhesión celular, lo que representa la unión transmembranal de la MEC y elementos celulares del citoesqueleto. Asimismo regula la miogénesis *in vitro*, actúan como inmunoreguladores al suprimir la proliferación de linfocitos, etc (53).

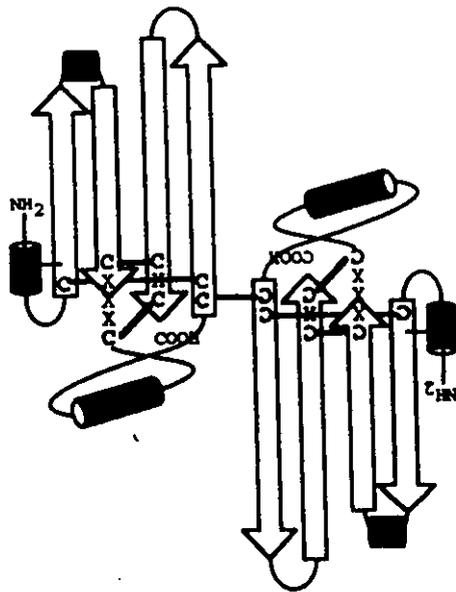


Figura 2. Estructura de la región madura del TGF β . Seis de los residuos de cisteína característicos forman tres puentes disulfuro dentro de cada monomero. Las siete cisteínas forman un puente disulfuro uniendo a los dos monomeros dentro del dímero.

En general todos los miembros de la superfamilia del TGF- β se unen a receptores específicos del tipo de las cinasas de serina-treonina (53-58). Se sabe que la interacción del ligando con su receptor estimula la actividad de la cinasa de serina-treonina en los dominios citoplasmáticos de los receptores y esto induce la formación de complejos de receptores diméricos o multiméricos. Son al menos cinco receptores de superficie celular, pero solo tres tipos I, II, y III, los que se expresan en la mayoría de los tipos celulares examinados (57). Los receptores tipo I y II están relacionados con receptores cinasa de serina/treonina de aproximadamente 55 y 75 kDa, respectivamente (58). El receptor tipo I se caracteriza por presentar 10 residuos de cisteína en su dominio extracelular, un dominio transmembranal único y un dominio intracelular rico en serina/glicina, que precede inmediatamente al dominio de cinasa de serina/treonina. Los receptores tipo II con actividad cinasa de serina-treonina contienen un patrón de cisteínas extracelulares similar al de los receptores tipo I. Presentan también un dominio intracelular único, pero carecen del dominio intracelular rico en serina/glicina, que precede al dominio de cinasa de serina/treonina, presente en los receptores tipo I (56-58). Aunque ambos tipos de receptores contienen dominios extracelulares de unión al ligando y sitios de señalamiento en sus dominios intracelulares, no son suficientes esas características para que ocurra el efecto del ligando (59-60). El receptor tipo II une al TGF- β en ausencia del receptor tipo I. Y la unión del TGF- β al receptor tipo I requiere la presencia del receptor tipo II. Para que ocurra la transducción de la señal el receptor tipo II forma complejos heteroméricos con el receptor tipo I, después de la unión del ligando (59-60). La activación de la transducción de la señal inicia cuando el receptor tipo II transfosforila al receptor tipo I en el dominio GS, activándolo para transducir las señales (59). El

receptor tipo III es llamado betaglicano, tiene una masa de 280 kDa pero no tiene dominio cinasa intracelular. Su dominio extracelular contiene los glicosaminglicanos heparin sulfato y condroitin sulfato (62). El betaglicano consiste de un ectodominio de 15 cisteinas con dos subunidades. Un dominio corto citoplasmático rico en serina y treonina con una estructura de señalización no discernible. El betaglicano puede unir a los TGF- β 1, - β 2 y - β 3, pero el betaglicano anclado a la membrana juega un papel crucial en la acción de unión con los TGF- β . El receptor tipo II es poco capaz de unir al TGF- β , pero esta incapacidad se supera en presencia del betaglicano. El receptor tipo II se une al TGF- β asociado con el betaglicano anclado a la membrana, y tiene una mejor unión en comparación de la unión que se forma cuando el TGF- β está libre en el medio. Además el receptor tipo II forma un complejo ternario estable con el TGF- β y el betaglicano. Como resultado el betaglicano incrementa la unión de los TGF- β con sus receptores, efecto que es particularmente evidente con el TGF- β 2, el cual tiene una baja afinidad por el receptor tipo I y tipo II en ausencia del betaglicano (57). Dos tipos adicionales de receptores se unen a los TGF- β . El receptor tipo IV y V; el receptor tipo IV es una proteína de 60-64 kDa, hasta ahora solo encontrado en células pituitarias de humano, pero que se une a TGF- β , activinas e inhibinas (63). El receptor tipo V fue aislado de hígado de bovino, es una cinasa de serina/treonina de aproximadamente 400 kDa (64).

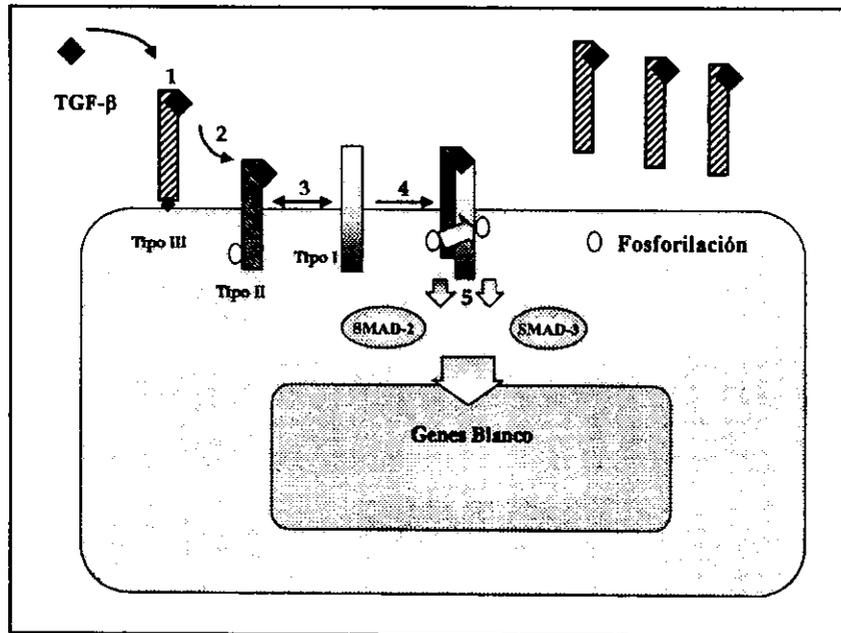


Figura 3. Representación esquemática de la activación de los receptores tipo III (betaglicano), tipo II, tipo I y la unión con su ligando. 1) Cuando el receptor tipo III esta anclado a la membrana (insoluble) presenta su ligando al receptor tipo II. Una vez unido el TGF-b al receptor tipo II 2), se forma un complejo con el receptor tipo I 3) al unirse este con el receptor tipo II se fosforila el receptor tipo I 4) activando a los SMAD para que se muevan dentro del núcleo y formen un complejo específico que se una al DNA de genes blanco para que se transduzca la señal 5).

Existen otro grupo de proteínas que sin ser receptores, tienen la capacidad de unir a algunos miembros de la superfamilia del TGF- β . Estas proteínas pueden enmascarar o estimular la función de los ligandos. Entre estas moléculas tenemos a la folistatina (65) que tiene una gran afinidad por la activina, de manera que regula negativamente los efectos de la activina. La endoglina una glicoproteína que tiene gran afinidad por el TGF- β 1 y - β 3, pero no por el TGF- β 2 (66). Asimismo, la decorina y el biglicano son moléculas que participan en la unión a los TGF- β . La decorina y biglicano son proteoglicanos de bajo peso molecular, son miembros de la familia de proteoglicanos pequeños ricos en leucina y se distribuyen en la mayoría de los tejidos conjuntivos (61). La decorina y biglicano poseen una o dos cadenas de condroitin-dermatan sulfato respectivamente. El gen de la decorina tiene dos copias en el genoma humano, ha sido localizado en el brazo corto o largo del cromosoma 12, y una sola copia del gen biglicano se encuentra en el brazo largo del cromosoma X humano.

La decorina tiene un importante papel en la organización de la MEC, la formación de delgadas fibras es el resultado de la unión con la colágena tipo I y II en ensayos *in vitro*. Así como una transcripción deficiente en el gene de la decorina provoca desordenes en el tejido conjuntivo *in vivo* (67). El biglicano se acumula en la superficie celular y en ambientes pericelulares, tiene localización celular discreta y una función biológica análoga a la del gen de la *Drosophila* que implica a procesos como morfogénesis y diferenciación (68). Ambas moléculas tienen la capacidad de interactuar con los TGF- β (69-71) y mantenerlos unidos a la MEC (72).

Numerosas observaciones indican que los proteoglicanos pueden regular la proliferación celular a través de la unión a varios factores de crecimiento (67). La unión decorina-TGF- β ocurre a través

de la envoltura proteica y no por la cadena de glicosaminglicanos. Las zonas repetidas ricas en leucina que caracterizan a la decorina y biglicano podrían ser el sitio de unión de los TGF- β y los proteoglicanos (73).

Los TGF- β estimulan la síntesis de la decorina y biglicano (68-69) y éstos a su vez tienen la capacidad de neutralizar la actividad de los TGF- β lo que sugiere que los proteoglicanos forman parte de un proceso de regulación negativa con los TGF- β (68, 72-73).

El papel de los TGF- β en la condrogénesis.

Los diferentes factores de crecimiento de la superfamilia de los TGF- β juegan un papel importante en la condrogénesis. Las isoformas del TGF- β ejercen efectos inhibidores o estimuladores sobre la condrogénesis *in vitro*, que dependen del origen embrionario, el estadio de diferenciación de las células, así como de las condiciones de cultivo.

Un modelo experimental que permite el estudio de la diferenciación del cartílago es el cultivo de micromasa y alta densidad a partir de células mesénquimáticas de extremidades embrionarias. Esta técnica se utiliza para obtener una gran cantidad de cultivos celulares a partir de un número reducido de células. El factor importante para que se lleve a cabo la diferenciación del cartílago, *in vitro*; es la densidad celular al momento de sembrar las células. Para que se dé la diferenciación de cartílago *in vitro* es necesario incrementar los contactos celulares, y esto se logra con altas densidades celulares. El cultivo de micromasa consiste en sembrar 2×10^5 células o más en 10 μ l de medio, mientras que en el cultivo de alta densidad se ajusta la densidad celular a 3.5×10^5 en 100 μ l de medio de cultivo, en una superficie de 0.32 cm²; estas condiciones favorecen la

formación de los nódulos de cartílago, mientras que en cultivos similares pero sembrados a bajas densidades no forman cartílago o lo hacen de manera muy reducida (38 y 74).

Un aspecto importante de estos sistemas de cultivo, es que los procesos celulares que llevan a la condrogénesis recapitulan la secuencia de los procesos observados *in vivo*. Esto permite determinar las actividades histogénicas que tiene el mesénquima de extremidad embrionaria para desarrollar la condrogénesis en estadios tempranos de desarrollo.

El modelo de pollo es el que se ha usado con mayor frecuencia para evaluar los factores de crecimiento en la condrogénesis *in vitro*. En este modelo se ha demostrado que la exposición de TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 en presencia de suero inhibe la condrogénesis en células mesenquimáticas de extremidad embrionaria, pero esta inhibición puede ser suprimida por las BMP-3 y 4 o la eliminación del suero (75-76). Estos resultados sugieren que los TGF- β son reguladores clave en la diferenciación de células mesenquimáticas de extremidad embrionaria *in vitro* tanto como las BMP (75). Sin embargo los TGF- β no tienen la capacidad de inducir la formación ectópica de hueso como lo hacen las BMP (39).

Por otro lado, en el modelo de ratón se sabe que la respuesta en la condrogénesis en cultivos de micromasa de los estadios 19, 20 y 21 de células mesenquimáticas de extremidad de ratón es diferencial para las isoformas de los TGF- β dependiendo del estadio de desarrollo.

En el estadio 19 la adición de TGF- β a diferentes concentraciones muestra un incremento gradual en la acumulación de azul Alciano en la MEC.

Por lo tanto, los TGF- β actúan tanto en pollo como en ratón, y este efecto se puede observar a dos niveles; en la formación de las condensaciones celulares y en el cartílago maduro.

En las condensaciones celulares los TGF- β alteran la expresión de las moléculas características de esta fase de la condrogénesis (77-78); como son la N-CAM, N-Cadherina, tenascina y fibronectina (92). En el cartílago maduro afecta a moléculas como proteoglicanos, colágena tipo II, fosfatasa alcalina, proteína de unión etc. Además de promover la incorporación de azul Alciano a la MEC (76, 78-80).

Otras moléculas que regulan la condrogénesis *in vitro* son la vitamina A y D (82). La vitamina D es un estimulador de la condrogénesis en cultivos de células de extremidad de pollo en el estadio 24 de desarrollo, a través de la expresión de la colágena tipo II y el agrecano (81). Además, incrementa la expresión de la N-Cadherina y disminuye la del TGF- β 2 (83). Los autores sugieren que esta hormona, al incrementar la expresión de moléculas de adhesión, regula negativamente la expresión del TGF- β 2. El efecto de la vitamina D sobre la condrogénesis parece estar mediado por los receptores VDR/RXR(*vitamin D receptor/retinoic X receptor*).

La vitamina A (ácido retinoico) (AR) es un factor multifuncional que también presenta actividades biológicas sobre la condrogénesis. El AR estimula la diferenciación del cartilago a bajas concentraciones (5ng/ml) y la inhibe a altas concentraciones (50 ng/ml), en cultivos de mesénquima de extremidad de pollo de los estadios 23/24 de desarrollo (82, 84-85).

Con la información hasta ahora manejada no se han hecho evidentes las diferencias existentes entre el desarrollo de la extremidad anterior y posterior y la importancia de los TGF- β durante la diferenciación de cartílago. En seguida se pretende destacar estas diferencias y su importancia.

Diferencias en el desarrollo de la extremidad anterior y posterior.

Se sabe que las células precartilaginosas de la pierna y el ala de pollo responden diferencialmente a los factores de crecimiento. En cultivos celulares el AR estimula la condrogénesis en mesénquima de ala de pollo e inhibe la condrogénesis en mesénquima de pierna. El TGF- β 1 en mesénquima de extremidad posterior provoca un crecimiento continuo, mientras que en el mesénquima de la extremidad anterior no. El TGF- β 1 sólo afecta el mesénquima de la extremidad anterior para promover la condrogénesis. Las células precartilaginosas de extremidad anterior produce un patrón diferente de la fibronectina con respecto al patrón que presentan las células mesenquimáticas de la extremidad posterior (86).

Las diferencias en el depósito de fibronectina son importantes a considerar. El espacio y arreglo de la fibronectina en cultivo no es el mismo para la extremidad anterior que para la posterior, el cultivo de células mesenquimáticas de extremidad anterior presenta un patrón extenso y liso mientras que el cultivo de células mesenquimáticas de extremidad posterior presenta un patrón compacto y esférico (86).

Por otro lado, en nuestro laboratorio se realizaron experimentos de neutralización de los TGF- β 1, β 2 y β 3 en cultivos de micromasa a partir de células mesenquimáticas de extremidad embrionaria de ratón en estadio 19, encontrando que los TGF- β reducen la formación de nódulos de cartilago en las células mesenquimáticas de extremidades anteriores pero no en las células mesenquimáticas de extremidades posteriores.

Esto nos hace pensar que es de gran importancia el estudio de los TGF- β , su expresión y la participación de estos factores durante el desarrollo de la extremidad.

Por lo tanto la hipótesis que se plantea en este trabajo es la siguiente:

Sí existen diferencias en el desarrollo de los cultivos de células mesenquimáticas de extremidad embrionaria de ratón tanto en extremidad anterior como posterior, la expresión de los TGF- β 1, β 2, β 3 y sus receptores presentaran un patrón espacio temporal diferente.

Por lo tanto el objetivo es:

Determinar la expresión de los TGF- β 1, β 2, β 3 y sus receptores durante la diferenciación de cartilago en cultivo de células mesenquimáticas de extremidad embrionaria de ratón.

MATERIALES Y MÉTODOS

* Cultivo celular

Se mato a ratonas preñadas de 10 días de gestación por dislocación cervical, se realizó una incisión abdominal para extraer el útero que se colocó en una caja Petri. De éste se obtuvieron los embriones que se clasificaron en estadio 19 (87).

Posteriormente se colocó los embriones en una caja con PBS y se lavo el exceso de sangre que presentaron los embriones, y se obtuvieron las extremidades, se lavo en PBS hasta terminar la disección de las extremidades de todos los embriones. Se retiro el PBS y se añadió tripsina al 0.25 % durante 5 min, luego se dejo en colagenasa tipo II al 0.3 % por 15 min se llevo a 10 ml con DMEM (Sigma) suplementado con suero fetal bovino al 10 % (FBS, Hyclone Laboratories Inc) y antibiótico (Ampicilina/Estreptomicina 5 mg/ml). Posteriormente se disgrego las extremidades por un pipeteo suave, se tomo una alicuota de 10 μ l para su cuantificación en un hemocitómetro, se centrifugo el volúmen restante a 1000 r.p.m. por 8 min, se resuspendio el botón y se ajusto la densidad celular a 3.5×10^5 con DMEM/FBS/Antibiótico y se sembro en placas de 96 pozos alicuotas de 100 μ l por pozo, colocando previamente un cubre objetos recortado al tamaño del diámetro de cada pozo, para su posterior procesamiento Inmunohistoquímico. Finalmente se dejo crecer durante 4 días a 37 ° C, 5 % CO₂, y 95 % de humedad, se hizo cambio de medio cada 24 hrs.

* Inmunohistoquímica

Se fijo las células con paraformaldehido al 2.5 % por 30 min se lavo en PBS 3 veces por 5 min, se bloqueo en albúmina al 1 % durante 30 min e incubo con el anticuerpo primario toda la noche a

4 ° C, después se lavo en PBS 3 veces por 5 min cada una e incubo con el anticuerpo secundario 1 hora, al termino se lavo en Tween 20 al 0.3 % durante 20 min y se añadio PBS por 30 min, finalmente se retiro los cubre objetos de cada pozo manteniendo la orientación y se monto sobre porta objetos con DABCO (1.4-diazabicyclo (2.2.2) octano. al 2.5 % en PBS, se observo al microscópio de epifluorescencia.

Se siguió el mismo proceso para cada día de cultivo y para cada anticuerpo utilizado. Los anticuerpos primarios utilizados son anti-TGF- β 1, anti- TGF- β 2, anti-TGF- β 3, los receptores anti-TGF- β RI, anti-Act RI, anti-TGF- β RII, Betaglicano, (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) LF 113 (Decorina) y LF 106 (Biglicano) donados por Larry Fisher (NIH, Bethesda M.D. USA) a una concentración de 200 μ g/ml. Los anticuerpos secundarios utilizados son FITC α -conejo para (TGF- β 1, β 2, β 3, TGF- β RI, Act-RI, TGF- β RII, LF113 y LF106) y FITC α -cabra para (Betaglicano) a una concentración de 1 μ g/ml. ZYMED Laboratories, Inc.

RESULTADOS

Expresión de los TGF- β 1, β 2 y β 3 en la condrogénesis *in vitro*.

La expresión de las tres isoformas de TGF- β estudiadas en el cultivo de mesénquima de extremidad embrionaria de ratón, mostró un patrón diferente, tanto espacial como temporal. El TGF- β 1 tuvo una expresión baja con respecto a la que presentaron los TGF- β 2 y TGF- β 3 durante los cuatro días de cultivo (Fig 4 y 5).

De manera particular el TGF- β 1 presentó una expresión mayor al día 2 en los cultivos de mesénquima de la extremidad anterior y a los días 1 y 2 en los cultivos del mesénquima de la extremidad posterior. En ambos casos la expresión se encuentra mas restringida a los nódulos de cartilago en formación disminuyendo su expresión a los días 3 y 4 de cultivo.

El TGF- β 2 fue en general el que mostró una mayor intensidad en la expresión, a todo lo largo del cultivo. Por otro lado, el patrón de expresión espacial entre el mesénquima de la extremidad anterior y posterior fue muy semejante. Asimismo, la expresión disminuyó al día 3 y se mantuvo en el día 4 de cultivo y fue ligeramente mayor en el mesénquima de la extremidad anterior con respecto a la posterior (Fig 4 y 5).

El patrón de expresión del TGF- β 3 fue muy similar al TGF- β 2, su expresión aumentó a los días 1 y 2 de cultivo, su patrón espacial fue el mismo para el mesénquima anterior y posterior, siendo más intensa la expresión en el mesénquima posterior en comparación con el anterior (Fig 4 y 5).

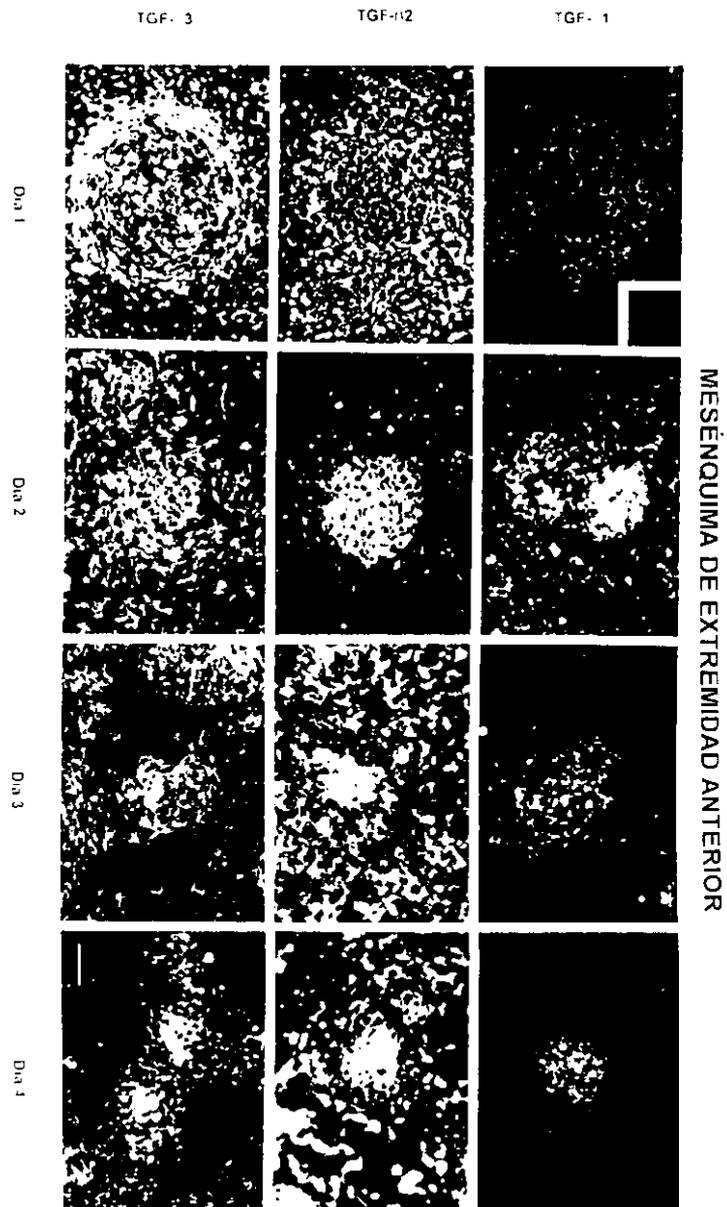


Figura 4. Inmunofluorescencia de TGF- β 1, β 2 y β 3 en cultivo de alta densidad a partir de mesénquima de extremidad anterior de ratón en estadio 19 de desarrollo. Barra=20 μ m.

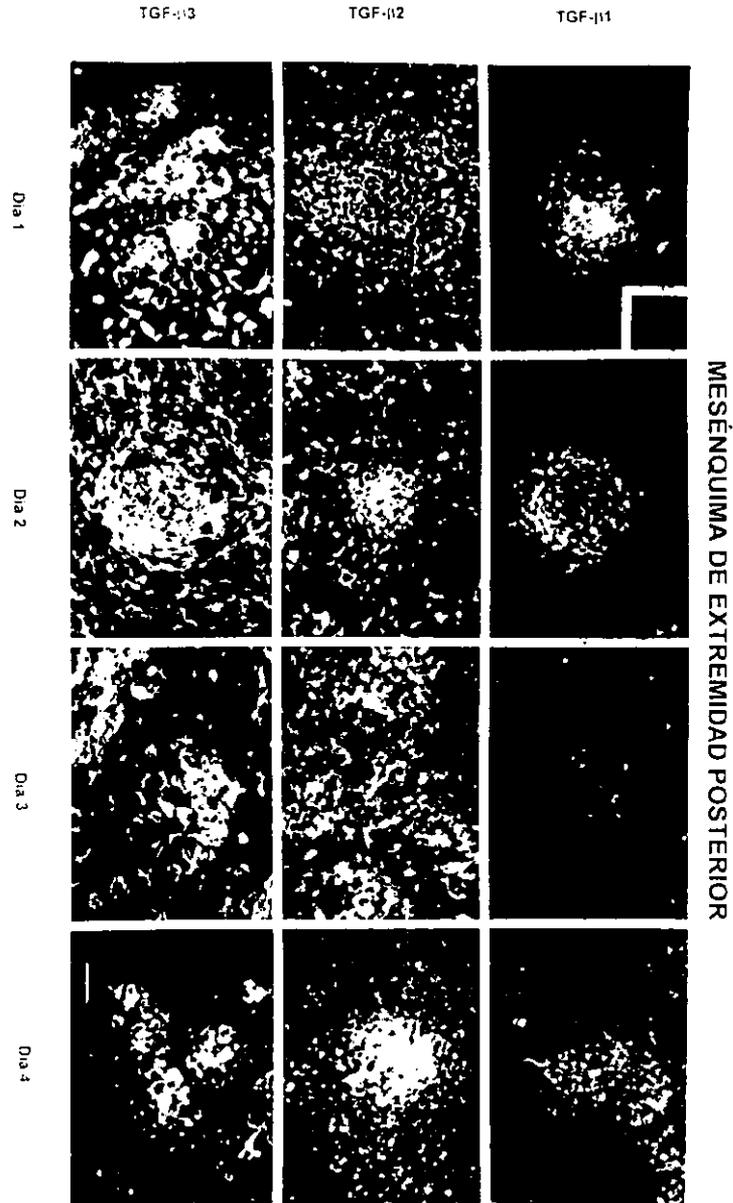


Figura 5. Inmunofluorescencia de TGF- β 1, β 2 y β 3 en cultivo de alta densidad de mesénquima de extremidad posterior de ratón en estadio 19 de desarrollo. Barra=20 μ m.

Expresión de los receptores de TGF- β en la condrogénesis *in vitro*.

El TGF- β RI se expresó homogéneamente en todas las células, pero se mostró mayor intensidad en los nódulos de cartilago en el cultivo de mesénquima de ambas extremidades. En los cultivos de ambas extremidades la expresión pareció aumentar al día 2 de cultivo y disminuyó gradualmente para los días 3 y 4 (Fig 6 y 7).

El receptor Act-RI mostró una expresión baja al día 2 y 3 de cultivo, siendo más evidente en el mesénquima posterior y prácticamente nula para los días 1 y 4 de cultivo tanto en el mesénquima anterior como en el mesénquima posterior (Fig 6 y 7).

El TGF- β RII se expresó más intensamente al día 2 de cultivo, disminuyó su expresión a los días 3 y 4, no se observaron diferencias en la expresión espacio-temporal entre el mesénquima anterior y posterior (Fig 6 y 7).

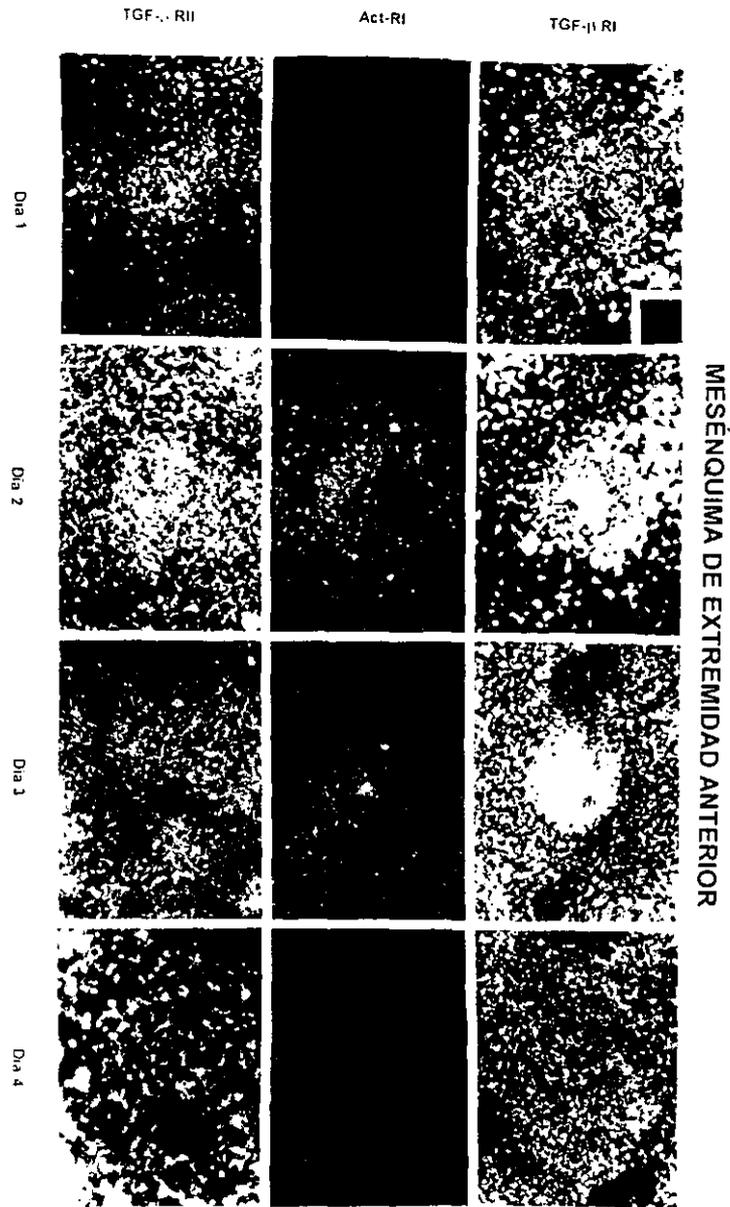


Figura 6. Expresión de los TGF- β receptores en cultivo de células mesenquimáticas de extremidad anterior de ratón en estadio 19 de desarrollo. Nótese la casi nula expresión del receptor Act-RI para los días 1 y 4. Barra=20 μ m.

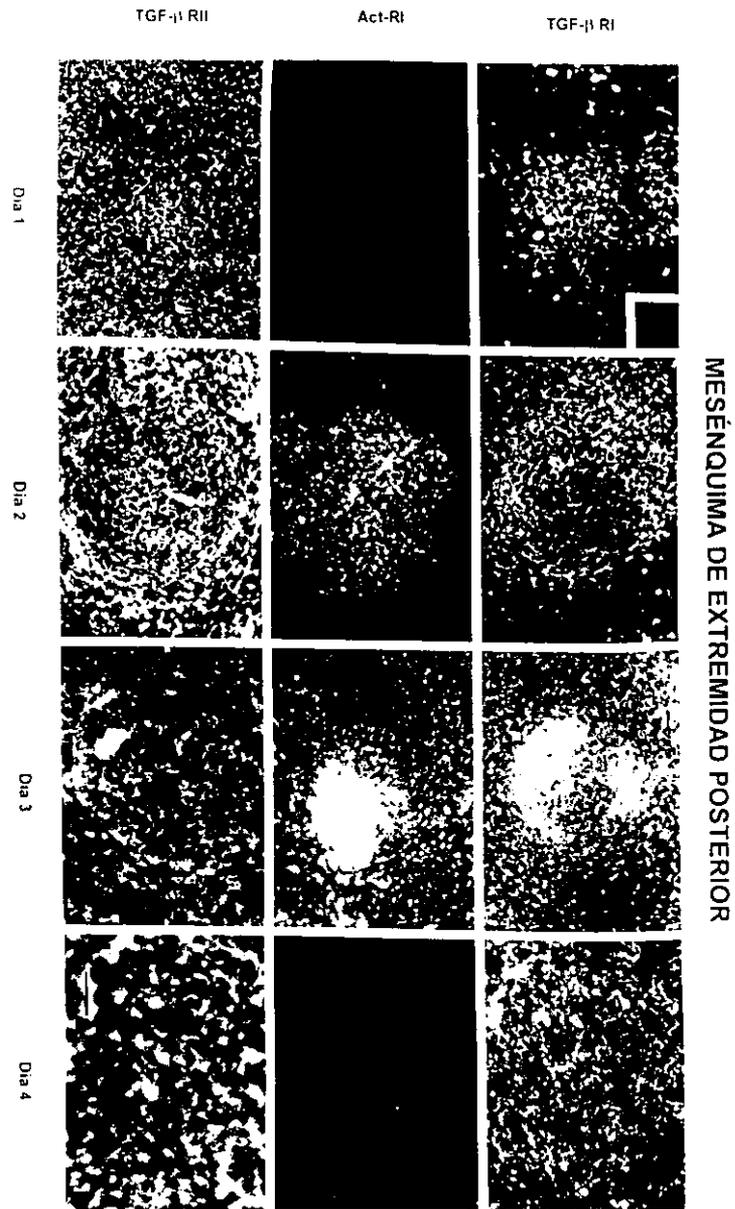


Figura 7. Expresión de los TGF- β receptores en cultivo de células mesenquimáticas de extremidad posterior de ratón en estadio 19 de desarrollo. Nótese la casi nula expresión del receptor Act-RI para los días 1 y 4. Barra=20 μ m.

Expresión de proteoglicanos durante la condrogénesis *in vitro*

La expresión del betaglicano es alta con respecto a la que se observa en la decorina y el biglicano; aumenta en el día 2 y baja a los días 3 y 4 de cultivo, siendo más intensa en el mesénquima posterior que en el anterior (Fig 8 y 9).

La decorina mostró una intensidad y distribución similares que el biglicano, sólo que el biglicano se expresó con mayor intensidad en los cultivos de mesénquima posterior con respecto al mesénquima anterior, siendo el día 2 de cultivo para ambos proteoglicanos el día de cultivo con mayor intensidad, aunque esto no sucedió con el biglicano en los cultivos de extremidad anterior (Fig 8 y 9).

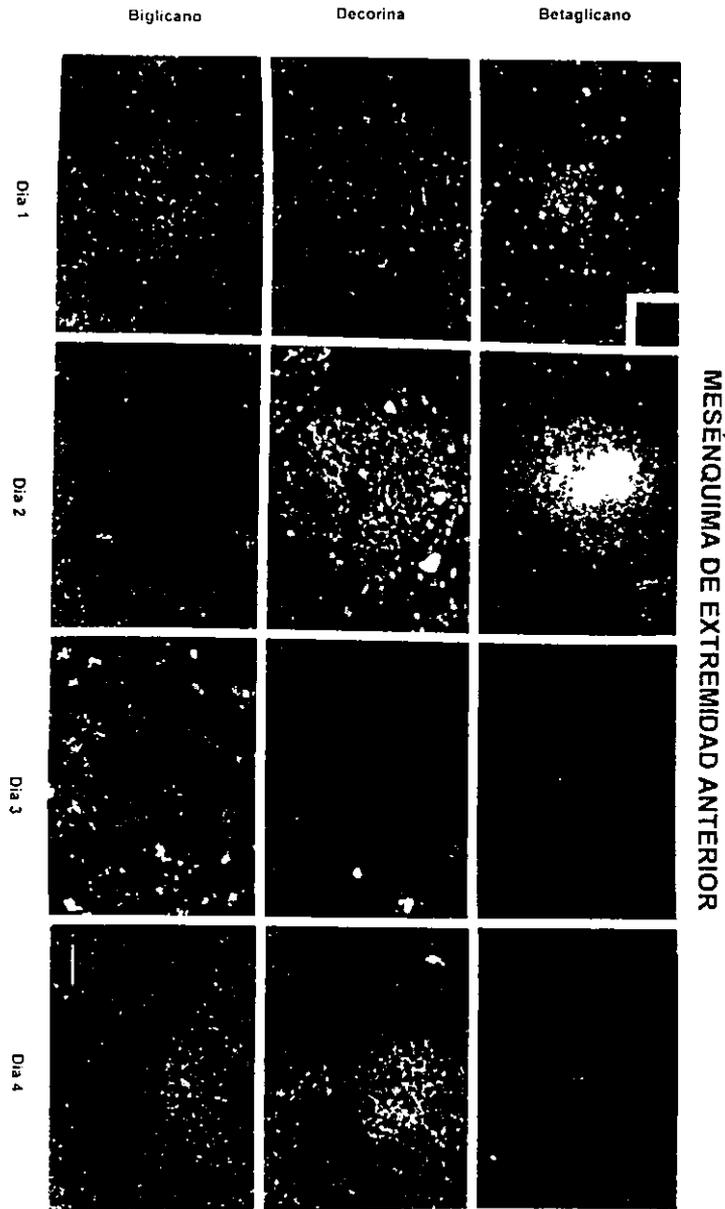


Figura 8. Inmunofluorescencia del patrón de expresión de proteoglicanos en mesénquima de extremidad anterior de ratón estadio 19 *in vitro*. Barra=20 μ m.

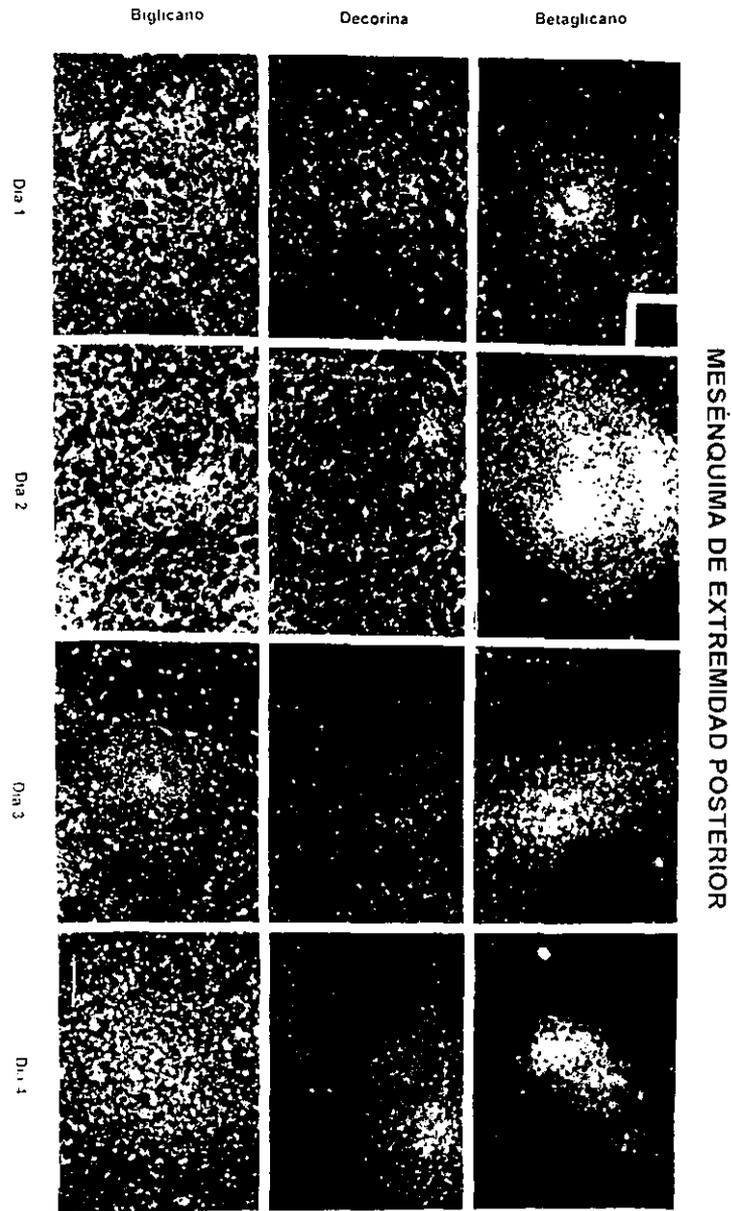


Figura 9. Inmunofluorescencia del patrón de expresión de proteoglicanos en mesénquima posterior de ratón estadio 19 *in vitro*. Barra=20 μ m.

DISCUSIÓN

Este es el primer trabajo en el que se evalúa la expresión de los TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 y sus receptores durante la diferenciación de cartilago *in vitro*, en células mesenquimáticas de extremidad embrionaria de ratón. Por otro lado, existen antecedentes del papel de los TGF- β durante la condrogénesis en mesénquima de extremidad embrionaria de pollo y se sabe que los resultados no son extrapolables a ratón, de ahí la importancia de realizar estudios sobre los TGF- β y sus receptores durante la condrogénesis en un modelo murino.

Nuestros resultados muestran que los TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 y sus receptores tienen un patrón espacio temporal diferente entre ellos, y que además existen pocas diferencias en la expresión de esas moléculas en cultivos del mesénquima de la extremidad anterior y del mesénquima de la extremidad posterior del ratón. De las tres isoformas del TGF- β es evidente que el TGF- β 1 es la isoforma que se expresa con menor intensidad durante los cuatro días de cultivo, en comparación con el TGF- β 2 y TGF- β 3, tanto en mesénquima de extremidad anterior como en mesénquima de extremidad posterior. Estos resultados en principio parecen paradójicos al compararlos con los obtenidos por Chimal-Monroy y Díaz de León (77 y 79), en los que se observa que el TGF- β 1 agregado de manera exógena a cultivos en micromasa tiene mayor efecto estimulador en la condrogénesis que el TGF- β 2 y TGF- β 3. Sin embargo, en la presente tesis observamos una alta expresión del receptor tipo II para los TGF- β que puede explicar este punto. Existen tres tipos de receptores para los TGF- β , y se sabe que el receptor tipo II tiene una mayor afinidad por el TGF- β 1, luego por el TGF- β 3 y por último por el TGF- β 2. El receptor tipo I y II participa en la unión y transducción de la señal (59), y el receptor tipo III modula la unión del

receptor tipo I y II (62, 89-90), la afinidad del TGF- β 2 por el receptor tipo II es reducida cuando el receptor tipo III no se encuentra en la membrana celular (62 y 90-91).

Por lo tanto, la baja intensidad que se observa en la expresión del TGF- β 1 no indica menor efecto ya que al tener una mayor afinidad por el receptor tipo II, no se requiere de una alta concentración del TGF- β 1 para que se lleve a cabo la transducción de la señal al formarse el complejo TGF- β 1/receptor.

Además nuestros resultados muestran que el TGF- β 2 es la isoforma que tiene la más alta intensidad de expresión, lo que puede significar que debido a que es el TGF- β el que tiene la menor afinidad por sus receptores, requiera éste de una concentración mayor para que pueda transducir su señal. El TGF- β 3 presenta una intensidad intermedia de expresión entre el TGF- β 1 y el TGF- β 2, al igual que es su afinidad por los receptores tipo I y II. La expresión de los receptores I y II es similar durante los cuatro días de cultivo, esto se puede deber a que el receptor tipo I requiere la presencia del receptor tipo II para que ocurra la transducción de la señal, el receptor tipo II forma complejos heteroméricos con el receptor tipo I después de la activación del ligando (59 y 73). La activación de la transducción de la señal inicia cuando el receptor tipo II transfosforila al receptor tipo I en el dominio GS activándolo para transducir las señales.

Por lo tanto, es congruente que en la expresión del TGF- β 1 sea baja, esto se compensa con la alta afinidad que presenta el TGF- β RII por el TGF- β 1. Esto a su vez es coincidente con el efecto neutralizante de las tres isoformas del TGF- β , en donde el bloqueo de las tres isoformas tiene efecto muy similar en la formación de las condensaciones precartilaginosas, según resultados obtenidos en nuestro laboratorio.

Por otro lado Roark y Greer (78) sugieren que cada uno de los TGF- β podría ser el responsable de la regulación de otro TGF- β , es decir; que la expresión de un primer TGF- β dispararía la expresión de un segundo y así sucesivamente, durante el desarrollo. Esto implicaría que la concentración de los TGF- β oscila en el tiempo (92) y por lo tanto su expresión no es simultánea. Además Van Obberghen-Schilling (93) demuestra que el TGF- β 1 regula positivamente su propia síntesis, en una gran variedad de sistemas. Sin embargo, en nuestros resultados el patrón de expresión del TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 no cambia significativamente durante los cuatro días de cultivo aunque si hay un incremento al día 2. Estos resultados no apoyan la idea de que un primer TGF- β dispara la expresión de un segundo, ya que las tres isoformas se expresan durante los cuatro días de cultivo.

El receptor Act-RI pertenece al grupo de los TGF- β receptores tipo I, y es nombrado así por su afinidad por la activina y mediar ciertas respuestas de ésta en cultivos celulares (60, 94-98). La identidad y fisiología del ligando del Act-RI aún no se conoce, ya que puede unir a las BMP-3 y 4 (99-100); y su homólogo en el ratón une al TGF- β cuando éste se sobreexpresa (101-102).

El hecho de que nuestros resultados muestren que el Act-RI solo se exprese en los días 2 y 3 de cultivo sugiere que la participación de su ligando durante la diferenciación de cartílago solo ocurre en estos días, y no durante los cuatro días de cultivo como ocurre con los demás receptores.

En el caso del receptor tipo III (betaglicano), es un proteoglicano capaz de presentar a los TGF- β con sus receptores cuando está anclado en la membrana. El betaglicano puede unir a las tres isoformas de TGF- β con alta afinidad formando un complejo betaglicano/TGF- β / receptor (62 y

102). El papel del betaglicano como modulador de la unión entre los TGF- β y sus receptores es más notable en el TGF- β 2 que en el TGF- β 1 ó TGF- β 3.

Nuestros resultados muestran que el betaglicano se expresa de manera constante durante los cuatro días de cultivo, aumentando su expresión al día 2 de cultivo. Esto nos indica que en el modelo de ratón el betaglicano podría estar participando en la presentación de los TGF- β a sus receptores durante la diferenciación de cartilago *in vitro* y tal vez de manera más notable para el TGF- β 2, ya que por un lado, éste es el que presenta menor afinidad por el TGF- β RII y se encuentra en mayor intensidad. Por lo tanto, el betaglicano presentaría al TGF- β 2 a sus receptores y daría respuestas muy semejantes a las generadas por los otros TGF- β .

Como se mencionó con anterioridad el betaglicano es una molécula perteneciente al grupo de los proteoglicanos, y se sabe que otros proteoglicanos también son capaces de unir a los TGF- β como son la decorina y el biglicano (68-69), debido a esto se quiso determinar la expresión de la decorina y el biglicano en la diferenciación del cartilago *in vitro* ya que se sabe que los TGF- β son capaces de estimular la síntesis de la decorina, el biglicano así como regular la síntesis de glicosaminglicanos. Asimismo la unión de la decorina y el biglicano con los TGF- β neutraliza la actividad de los TGF- β , lo que sugiere que la decorina y el biglicano podrían estar jugando un importante papel en un proceso de regulación (68).

Esta idea se apoya con un trabajo realizado en células de ovario de hamster donde la unión de los TGF- β con la decorina neutraliza su actividad, teniendo el biglicano la misma capacidad de neutralización (61 y 68). Sin embargo en nuestros resultados el biglicano y la decorina no muestran un patrón de expresión que nos indique la existencia de un proceso de regulación con los TGF- β ya que la intensidad de la expresión de la decorina y el biglicano es similar en los

cuatro días de cultivo, solo que el biglicano muestra una expresión ligeramente mayor en el mesénquima de la extremidad posterior en comparación con el mesénquima de la extremidad anterior.

Otro de los resultados importantes de este trabajo es el hecho de que sea el día 2 de cultivo el que muestra tanto para el mesénquima de la extremidad anterior como para el mesénquima de la extremidad posterior el día que se expresan todas las moléculas con mayor intensidad, lo que sugiere que durante la diferenciación del cartílago *in vitro* es el día 2 de cultivo el que tiene un papel clave en este proceso por ser el día en el que ocurren con mayor frecuencia la formación de las condensaciones precartilaginosas.

Estos resultados son comparables con los obtenidos con anterioridad en nuestro laboratorio (77 y 79) donde se muestra que la diferenciación de cartílago se estimula cuando las tres isoformas de los TGF- β se administran durante los dos primeros días de cultivo de micromasa de extremidad anterior o cuando la condrogénesis se disminuye cuando los anticuerpos neutralizantes son adicionados en los dos primeros días de cultivo. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que no solo los TGF- β actúan en los primeros días de la diferenciación de cartílago *in vitro*, sino que sus receptores y otras moléculas que se unen a los TGF- β regulan su función. Siendo los primeros días de cultivo para la condrogénesis *in vitro* los más importantes para que se lleve a cabo dicho proceso.

Finalmente nuestros resultados muestran que existen pocas diferencias entre el mesénquima de la extremidad anterior y el mesénquima de la extremidad posterior tanto para la intensidad en la expresión como para el patrón espacial de los TGF- β y sus receptores excepto la decorina y el biglicano.

Las diferencias en el desarrollo de las extremidades también ocurren en el modelo de pollo. En el pollo se observó que el AR estimula la condrogénesis en mesénquima de extremidad anterior, e inhibe la condrogénesis en el mesénquima de la extremidad posterior. Además el patrón de condrogénesis es diferente en cultivos de ambas extremidades. En particular, el TGF- β 1 en mesénquima de extremidad posterior provoca un crecimiento continuo, mientras que en el mesénquima de extremidad anterior forma un patrón nodular. También se observó que para la fibronectina el patrón de crecimiento en el mesénquima de extremidad anterior es extenso y liso y que para el mesénquima de la extremidad posterior es compacto y esférico.

En el modelo de ratón se observó que en experimentos de neutralización de los TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 en cultivo de micromasa a partir de células mesenquimáticas de ratón, los TGF- β reducen la formación de nódulos de cartílago en el mesénquima de extremidad anterior, pero no en el mesénquima de extremidad posterior.

Con base en los resultados, del presente trabajo podemos sugerir que los procesos que se llevan a cabo durante la diferenciación del cartílago no son el mismo para ambas extremidades, sino que cada una maneja de manera independiente la información específica para que ocurra la condrogénesis *in vitro*, tal vez las moléculas que transducen la señal de los TGF- β sea diferente en ambos casos.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

Las conclusiones de los resultados del presente estudio son:

- * Las tres isoformas de los TGF- β y sus receptores se expresan diferencialmente en el mesénquima de la extremidad anterior con respecto al mesénquima de la extremidad posterior.
- * Es el día 2 de cultivo, clave para la formación de condensaciones precartilaginosas.
- * Los proteoglicanos no regulan a los TGF- β durante la diferenciación de cartilago en el mesénquima de extremidad embrionaria de ratón.
- * Existen diferencias en el desarrollo de la extremidad anterior con respecto a la posterior.

PERSPECTIVAS

Con base en los resultados del presente trabajo se sugiere abordar experimentalmente los siguientes puntos para establecer los mecanismos de acción de los TGF- β en la diferenciación de cartilago *in vitro* y poder determinar que tan significativa es la diferencia de expresión entre cada una de las isoformas de TGF- β .

1. Diferenciar entre la expresión de los TGF- β activos y los TGF- β latentes.
2. Cuantificar la expresión de los TGF- β 1, β 2, β 3 , sus receptores y los proteoglicanos aquí estudiados.

Con el fin de que con los resultados del presente trabajo, los obtenidos con anterioridad en el laboratorio, pero que aún no han sido publicados y los que se obtengan de los experimentos propuestos, se tenga un panorama completo y general de la función de los TGF- β en la condrogénesis.

REFERENCIAS

1. Gilbert, S. F. 1997. Developmental Biology. Sinaver Associates Inc. Publishers. Sunderland, Massachusets, 701-726 pp.
2. Tabin, C. J. 1991. *Cell*. 66:199-217.
3. Fallon, J. F., López, A., Ros, M. A., Savage, M.P., Olwin, B.B. y Simandl, B.K. 1994 *Science* 264:104-107.
4. Niswander, L. y Martín, G.M. 1993 *Nature* 361:68-71.
5. Crossley, P.H., Monowada, G., MacArthur, C.A. y Martín, G.R. 1996. *Cell*. 84:127-136.
6. Vogel, A., Rodríguez, C., Izpisúa-Belmonte, J.C. 1996. *Development*. 122:1737-1750.
7. Tabin, C. J. 1995. *Cell*. 80: 671-674.
8. Cohn, M.J., Izpisúa-Belmonte, J.C., Abud, H., Heath, JK y Tickle, C. 1995. *Cell*. 80:739-746.
9. Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E. y Tabin, C. 1993. *Cell*. 75:1401-1416.
10. Wanek, N., Gardiner, D.M., Muenoka, K., y Bryant, S.V. 1991. *Nature*. 350:81-83.
11. Noji, S., T Nohno, E. Koyama, K. Muto, K. Ohshima, Y. Aoki, K. Tamura, K. Ohsugi, H. Ide, S. Taniguchi y T. Saito. *Nature*. 350:83-86.
12. Niswander, L., S. Jeffrey, G.R. Martín y C. Tickle. 1994. *Nature*. 371:609-612.
13. Parr, B.A. y M.J. Shea. 1994. *Nature* 371:609-612.
14. Parr, B.A. y A.P. McMahon. 1995. *Nature*. 374:350-353.
15. Vassileva y A.P. McMahon. 1993. *Development*. 119:247-261.
16. Erlenbacher, A., E.H. Filvaroff, S.E. Gitelman y R. Derynck 1995. *Cell*. 80:371-378.
17. Horton, W.A. 1993. *Connective Tissue and Its Heritable Disorders*. 73-84.

18. Coelho, C.N.A. Kosher, R.A. 1991. *Developmental Biology*. 144:47-53.
19. Solursh, M. 1984. The Role of Extracellular Matrix in Development (Trelstad RL, de) 277-303 pp. Alan R. Liss. New York.
20. Dessau, W. Van der Mark H., von der Mark K, Fisher S. 1980. *J. Embryol Exp Morphol*. 57:51-60.
21. Silver, M.H. Foidart, J.M. Pratt, R.M. 1981. *Differentiation*. 18:141-149.
22. David, G. X.M. Bai, B. van der Schueren, P. Marynen, J.J. Cassiman y H van der Berghe. 1993. *Development*. 119:841-854.
23. Gould, S.E., W. Upholt y R.A. Kosher. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89:3271-3275.
24. Oberlender, S. A. y R.S. Tuan. 1994. *Development*. 120:177-187.
25. Widelitz, R.B., T.X. Jiang, B.J. Murray y C.M. Chuong. 1993. *J. Cell. Physiol*. 156:399-411.
26. Jiang, T.X., J. R. Ti, S.Y. Ying y C.M. Chuong. 1993. *Dev. Biol*. 155:545-557.
27. Solursh, M., R. Reiter, K.L. Jensen, M. Kato y M. Bernfield. 1990. *Dev. Biol*. 140:83-92.
28. Seghatosleslami, M.R. y R.A. Kosher. 1996. *Dev Dyn*. 207:114-119.
29. Frenz, D.A. S. Akiyama, D.F. Paulsen y S.A. Newman. 1989. *Dev. Biol*. 136:87-96.
30. Frenz, D.A. N.S. Jaikaria y S.A. Newman. 1989. *Dev. Biol*. 136:97-103.
31. Elmer, W.A., S. Pollard y J.A. Cochran. 1991. *Exp Cell Res*. 195:154-163.
32. Aulthouse, A.L. y M. Solursh. 1987. *Dev Biol*. 120:377-384.
33. Cheah, K.S., E.T. Lan, R.K. Au y P.P. Tam. 1991. *Development*. 111:945-953.
34. Thomas, J.T., S. Ayad y M.E. Grant. 1994. *Ann Rheum Diseases*. 53:488-496.
35. Upholt, W.B., L. Chandrasekaran y M. L. Tanzer. 1993. *Experientia*. 49:384-392.
36. Marriot, A., S. Ayad y M.E. Grant. 1991. *J. Cell Sci*. 99:641-649.

37. Pacifici, M. 1995. *Matrix Biology*. 14:689-698.
- 38.
39. Wozney, J.M., V. Rosen, A.J. Celeste, L. M. Mitsock, M.J. Whitters, R.W. Kriz, R.M.
40. Hewwick y E.A. Wang. 1988. *Science*. 242:1528-1534.
41. Wozney, J.M. y V. Rosen. 1993. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 107:725-748.
42. Elima, K. 1993. *Ann. Med.* 25:395-402.
43. Hogan, B.L.M. 1996 *Genes & Dev.* 10:1580-1594.
44. Hogan, B.L.M. 1996. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6:432-438.
45. Storm, E.E. T.V. Huynh, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, D.M. Kingsley y S.L. Lee. 1994. *Nature*. 368:639-643.
46. Vukicevic, F.P. Luyten, N.J.P. Ryba, C.A. Kosak, A.H. Reddi y M. Moos. Jr. 1994. *J Biol Chem*. 269:28227-28234.
47. Thomas, J.T., M. Nandedkar, M. Camargo, J. Cervenka y F.P. Luyten. 1996 *Nature Genet.* 12:315-317.
48. Padgett, R.W., R.D.S. Johnston y W. M. Gelbart. 1987. *Nature*. 325:81-84.
49. Arora, K., M. Levin y M o Connor. 1994. *Genes & Dev.* 8:2588-2601.
50. Whartan, K.A., G.H. Thomsen y W. M. Gelbert. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88:9214-9218.
51. Sporn, M.B., Roberts, A.B., Wakefield, L.M., de Croim brugge B. 1987J. *Cell Biol.* 105:1039-1045.
52. Ignatz, R.A. y Massagué, J. 1987. *J. Biol. Chem.* 261:4337-4345.
53. Moses, H. y R. Serra. 1996. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6:581-586.

54. Kingsley, D.M. 1994. *Genes & Dev.* 8:133-146.
55. Sporn, M.B. y A. B. Roberts. 1992. *J. Cell. Biol.* 119:1017-1021.
56. Massagué, J. 1992. *Cell.* 69:1067-1070.
57. Attisano, L., J.L. Wrana, F. López-Casillas y J. Massagué. 1994. *Biochem. Biophys. Acta.* 1222:71-80.
58. Kolodziejczyk, S.M. y B.K. Hall. 1996. *Biochem. Cell. Biol.* 74:299-314.
59. Wrana, J.L., Attisano, L., Cárcamo, A., Zentella, J. Doody, M. Laiho, X.F. Wang y J. Massagué. 1992. *Cell.* 71:1003-1014.
60. Attisano, L., J. Cárcamo, F. Ventura, F.M.B. Weis y J. Massagué. 1993. *Cell.* 75:671-680.
61. Ruoslahti, E., y Yamaguchi, Y. 1991. *Cell.* 64:867-869.
62. López-Casillas, F. Wrana, J.L. y Massagué, J. 1993. *Cell.* 73:1433-1444.
63. Cheifetz, S., Ling, N., Guillermin, R. y Massague, J. 1988. *J. Biol. Chem.* 263:17225-17228.
64. O, Grady, P., Liu, Q. Huang, S.S. 1992. *J. Biol. Chem.* 267:21033-21037.
65. Matzuk, M.M., N. Lu, H. Vogel, K. Sellheyer, D.R. Roop y A. Bradley. 1995. *J. Biol. Nature.* 374:360-363.
66. Cheifetz, T. Bellón, S. Vera, C. Bernabeau, J. Massagué y M. Letaarte. 1992. *J. Biol. Chem.* 267:19027-19030.
67. Ruoslahti, E. 1989. *J. Biol. Chem.* 264:13369-13372.
68. Bassols. A y Massagué J. 1988. *J. Biol. Chem.* 263:3039-3045.
69. Okuda, S., Languino, L.R., Ruoslahti, E y Border, W. A. *J. Clin. Invest.* (En prensa).
70. Fosang, T.A. y Hardingham, T.E. 1992. *FASEB. J.* 6:861-870.
71. Rosenberg, L.C. et al. 1989. *J. Biol. Chem.* 260:6304-6313.

72. Hoppe, W., Panch. U., Kresse, H.J. 1988. *J. Biol. Chem.* 263:5926-5932.
73. Yamaguchi, Yu., Mann, A.M., y Ruoslahti, E. 1990. *Nature.* 346:281-284.
74. Ahrens, P.A., M. Solursh y R.S. Reiter. 1977. *Dev. Biol.* 60:69-82.
75. Kulik, W.M., B.J. Rodgers, K. Greer y R.A. Kosher. 1989. 1989. *Dev. Biol.* 135:424-430.
76. Chen, P. Carrington, J. L. Hammonds, R.G. y Reddi, A.H. 1991. *Exp. Cell. Res.* 206:119-127.
77. Chimal-Monroy. J., y Díaz de León, L. 1997. *Int. J. Dev. Biol.* 41:91-102.
78. Roark, E.F. y Greer, K. 1994. *Dev. Dynamics.* 200:116-130.
79. Chimal-Monroy J. y Díaz de León L. 1999. *I.J.D.B.* (prensa).
80. Schofield, J.N. y Wolpert, L. 1990. *Exp. Cell. Res.* 191:144-148.
81. Tsonis, P. A. 1991. *Dev. Biol.* 143:130-134.
82. Jiang, H. D.R. Soprano, S.W. Li, K.J. Soprano, J.A. Penner, M. Gyda, M. Lii y D. Kochher. 1995. *Int. J. Dev. Biol.* 39:617-627.
83. Del Rio-Tsonis K. y P. A. Tsonis. 1994. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 204:975-982.
84. Paulsen, D. F., D. W. Chen, D. Okello y B. Johnson. 1994. *Dev. Dyn.* 201:310-323.
85. Paulsen, D. F., M. Solursh, R. M. Languille, L. Pang y W.D. Chen 1994. *In vitro Cell Dev Biol.* 30A:181-186.
86. Downie, S.A. 1994. *Dev. Biol.* 162:195-208.
87. (Theiler)
88. Chimal-Monroy .J., Bravo, R.T. y Díaz de León L 1996. *Ann. NY. Acad. Sci.* 785:241-244.
89. Lin, H.Y. Wang, X.-F., NG-Eaton, E., Weinberg, R.A., y Lodish, H.F. 1992. *Cell.* 68:775-785.
90. López-Casillas, F., H.M. Payne, J.L. Andres y J. Massagué. 1994. *J. Cell. Biol.* 124:557-568.

91. Cheifetz, S., Hernández, H., Laiho, M., ten Dijke, P., Iwata, K.K., y Massagué, J. 1990. *J. Biol. Chem.* 265:20533-20538.
92. Sinha, S. y Ramaswamy, R. 1987. *Biosystems.* 20:341-354.
93. Van Obberghrn-Schilling, E., Roche, N. S., Flanders, K.C., Sporn, M.B. y Roberts, A. B. 1988. *J. Biol. Chem.* 263:7741-7746.
94. Yamashita, H. ten Dijke P. Huylebroeck, D. Sampath T.K., Andries M. *et al.* 1995. *J. Cell. Biol.* 130:217-226.
95. Koenig, B.B. Cook, J. S., Wolsing, D.H., Ting, J., Tiesman, J.P., *et al.* 1994. *Mol. Cell Biol.* 14:5961-5974.
96. Tsuchida, K., Sawchenko, P.E., Nishikawa, S., Vale, W.W. 1996. *Mol. Cell. Neurosci.* 7:467-478.
97. Rydén, M., Imamura T., Jörnvall H, Belluardo, N., Neveu I. *et al.* 1996. *J. Biol. Chem.* 271:30603-30609.
98. Mahony,D., Gurdon, J.B. 1995. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6474-6478.
99. Ten Dijke, P., Yamashita, H., Sampath, T.K., Reddi, A.H., Estevez, M., *et al.* 1994. *J. Biol. Chem.* 269:16985-16988.
100. Liu, F., Ventura, F., Doody, J., Massagué, J. 1995. *Mol. Cell. Biol.* 15:3479-3486.
101. Ebner, R., Chen, R-H., Lawler, S., Zioncheck, T., Derynck, R. 1993. *Science* 262:900-902.
102. Wang, X-F., Lin, H.Y., Ng-Eaton, E. Downward, J. Lodish, H.F., *et al.* 1991. *Cell* 67:797-805.

¿NO HAS SABIDO, NO HAS OÍDO QUE
EL DIOS ETERNO ES JEHOVÁ, EL CUAL CREÓ
LOS CONFINES DE LA TIERRA? NO DESFALLECE,
NI SE FATIGA CON CANSANCIO, Y SU ENTEN-
DIMIENTO NO HAY QUIEN LO ALCANCE.
EL DA ESFUERZO AL CANSADO, Y MULTIPLICA
LAS FUERZAS AL QUE NO TIENE NINGUNAS.
LOS MUCHACHOS SE FATIGAN Y SE CANSAN,
LOS JÓVENES FLAQUEAN Y CAEN;
PERO LOS QUE ESPERAN EN JEHOVA
TENDRAN NUEVAS FUERZAS; LEVANTARAN
ALAS COMO ÁGUILAS; CORRERÁN, Y NO
SE CANSARÁN; CAMINARÁN, Y NO SE FATIGARÁN.

Is 40:28-31