



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EXPRESION DE LAS INTEGRINAS DE LA FAMILIA  
 $\beta 1$  DURANTE EL DESARROLLO DE LA  
RODILLA DEL RATON

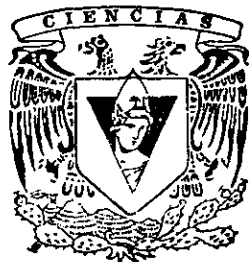
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G O**

**P R E S E N T A :**

**JUAN CARLOS ZAVALA OLALDE**



27/11/99  
DIRECTOR DE TESIS: DR. JESUS CHIMAL MONROY

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES

MEXICO, D. F.

NOVIEMBRE 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  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO**  
**Jefa de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Expresión de las integrinas de la Familia beta 1 durante el desarrollo de la rodilla del ratón.

realizado por Zavala Olalde Juan Carlos

con número de cuenta 92206 34-2 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Jesús Chimal Monroy

Propietario

Dra. María del Carmen Uribe Aranzábal *Ma del Carmen Uribe*

Propietario

Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales *Marcela Aguilar*

Suplente

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza *Norma Moreno*

Suplente

*Rocío Salceda*  
Dra. Rocío Salceda Sacanelles

*Edna M. Suarez D.*

Consejo Departamental de Biología

DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ

**DEDICADA a:**

**Eva Olalde Marquez      y      Salvador Zavala Maldonado**

Tía Teresa

Silvia

Salvador, Sergio, Cesar, Felipe, Angélica y Claudia.

Ana, Adriana, Eva Lizeth, Elizabeth, Rosa, Ricardo, Luis, Daniela, Georgina, Andrea y Leticia.

Y a todas estas grandiosas personas que quisiera aquí hoy (26 nov. 99), pero por la huelga no ha sido posible.

Fabiola, Isaac, Armando, Lourdes, Leticia, Maricruz, Ivonne, Lupita, Erika, Samaria, Judith, Luz, Alejandro, Chan, Araceli, Marcos, Angel, Oscar, Luz María, Thalia, Paco, Mireya, Israel, Cesar, Susana, Ruth, Edith, Yolanda, Gabriela, Mayra, Guillermo, Hugo, Moises, María, Bolivar, Claudia, Nuria, Mary, Zaire, Edith, Enrique, Pati, Rocio, Norma, Miguel Angel, Belinda, Quetzalli, Tamara, Judith, Nereida, Ricardo, Pedro, Catalina, Alejandra, Jesús Manuel, Chucho, Norma, Blas, Carlos, Pablo, Tere, Elia, Guille, Ernesto, Coty, David, Paula, Simona, Simón, Martha, Israel, Ricardo, Janet, Edgar, Saúl, Rosa, René, Diana, Claudia, Claudia María, Pati, Ana Paola, Liliana, Mónica, Pilar, Marcela Aide, Horacio, Verónica, Marisol, Beatriz B., Beatriz H., Martha, Jesús Antonio, Erika, Gerardo, Rocio, Pedro, Rodolfo y Marisol.

*Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas, bajo la dirección del Dr. Jesús Chimal Monroy y con el apoyo de una beca por parte de Fundación UNAM.*

# EXPRESIÓN DE LAS INTEGRINAS DE LA FAMILIA $\beta 1$ DURANTE EL DESARROLLO DE LA RODILLA DEL RATÓN.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	2
GENERALIDADES DE LA RODILLA	2
CARACTERÍSTICAS DE LOS ELEMENTOS DE LA RODILLA	3
DESARROLLO DE LA RODILLA	4
Generalidades	4
Expresión de las moléculas de la MEC	5
Expresión de las moléculas de la MEC, durante el desarrollo de la rodilla	10
<b>LAS INTEGRINAS</b>	11
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	14
<b>OBJETIVO</b>	14
<b>MATERIAL</b>	14
<b>MÉTODO</b>	14
<b>RESULTADOS</b>	16
Características histológicas del desarrollo de la rodilla del ratón	16
Expresión de las subunidades de las integrinas de la familia $\beta 1$ detectadas por inmunofluorescencia	17
Resumen de resultados	18
<b>DISCUSIÓN</b>	19
<b>CONCLUSIONES</b>	22
<b>PERSPECTIVAS</b>	23
<b>REFERENCIAS</b>	23

## RESUMEN

El desarrollo de la rodilla implica la separación del fémur y la tibia que conlleva a la formación de dos meniscos y una rótula característicos de una rodilla funcional. Los mecanismos sugeridos para la generación y mantenimiento de esta articulación son: la pérdida de las propiedades ténsiles por mecanismos enzimáticos y la muerte y migración celulares. Se han observado variaciones en el patrón espacio-temporal de los constituyentes de la matriz extracelular (MEC) lo que indica su importancia durante el proceso de cavitación. Los receptores más importantes a la MEC son las integrinas, heterodímeros protéicos unidos no covalentemente, que en su interacción con la MEC hacen posibles los procesos de morfogénesis como son la migración y muerte celulares. Debido a que la formación de la rodilla implica interacciones célula-MEC, el objetivo de este trabajo fue conocer la distribución espacio-temporal de las integrinas de la familia  $\beta 1$  durante el desarrollo de la rodilla en el ratón.

Los resultados muestran una expresión temprana de varias subunidades en sitios particularmente importantes para el desarrollo de la articulación.

El análisis histológico del desarrollo de la rodilla del ratón permitió distinguir que la etapa más importante de su morfogénesis incluye desde los 13 a los 18 días postcoito (dpc). Durante este intervalo de tiempo las integrinas con una mayor expresión son las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha v$  y  $\beta 1$  distribuidas en la zona de desarrollo de la cavidad articular (interzona). La subunidad  $\alpha 1$  se expresa particularmente en los meniscos pero no en la interzona hasta los 15 dpc,  $\alpha 2$  tiene una expresión baja pero se encuentra en la interzona y a los 17 dpc aumenta en el pericondrio,  $\alpha 3$  presenta una expresión alta en toda la rodilla. La subunidad  $\alpha 4$  se expresa en la interzona y aumenta en toda la rodilla a los 16 dpc y disminuye a los 18 dpc,  $\alpha 5$  tiene una expresión alta en particular en los meniscos,  $\alpha 6$  tiene una expresión baja en los primeros días y aumenta en los meniscos a los 15 dpc. Finalmente la subunidad  $\alpha v$  presenta una expresión baja en los dos primeros días y aumenta a los 15 dpc, es baja en las epífisis. La subunidad  $\beta 1$  se expresa con intensidad, pero disminuye en las epífisis, sin embargo se mantiene en la cavidad articular durante toda la etapa de estudio.

En conclusión, los resultados sugieren que las interacciones célula-MEC participan en las distintas fases del proceso de morfogénesis de la rodilla y que estas interacciones están mediadas por integrinas.

## INTRODUCCIÓN

### GENERALIDADES DE LA RODILLA

En las extremidades posteriores de los vertebrados, a la articulación entre el estilopodo y el zuegopodo se le denomina rodilla. La movilidad y estabilidad de la rodilla está controlada por una interacción compleja entre las superficies articulares y el tejido conjuntivo circundante, incluidos los ligamentos y músculos. La rodilla permite una serie de movimientos, como son el deslizamiento de las superficies de la articulación una sobre otra, la flexión y la extensión. Existen tres formas de realizar la extensión; a través del movimiento de la tibia sobre el fémur; a través del movimiento del fémur sobre la tibia o a través del movimiento simultáneo de ambos. La rotación se realiza en un eje vertical, por ejemplo los dos cóndilos del fémur, uno se dirige hacia adelante cuando el otro lo hace hacia atrás, sucede lo mismo para la tibia. La inclinación lateral está a cargo de los músculos flexores y extensores que hacen posible el reposo y desplazamiento a cargo de las extremidades posteriores en los tetrápodos (Fuss, 1992 y Lu and O'Connor, 1996) .

Una articulación está compuesta de los elementos esqueléticos próximos, los tejidos interpuestos y los que se encuentran en su periferia. Hay tres tipos de articulaciones; las articulaciones móviles o diartrosis como las articulaciones de las extremidades, las articulaciones inmóviles o sinartrosis como en el cráneo y la cara, y las articulaciones con un movimiento intermedio a las dos anteriores, conocidas como anfiartrosis, como en la columna vertebral.

La rodilla, pertenece a las diartrosis, sus superficies articulares son; los dos cóndilos del fémur en su parte inferoposterior y la escotadura intercondílea, las dos cavidades glenoideas y espina de la tibia, y la cara posterior de la rótula. Estos elementos esqueléticos poseen cartílago articular, en su sitio de contacto, dicho cartílago posee un coeficiente de fricción bajo que proporciona una superficie lubricada resistente al desgaste, levemente comprimible y elástica, capaz de distribuir con uniformidad las fuerzas de compresión producto del soporte del peso y la acción muscular.

Interponiéndose en ciertas regiones de la articulación están los meniscos; el menisco lateral y el medial, los cuales aumentan la concordancia entre la tibia y el fémur (Fig.1).



Los meniscos están constituidos de fibrocartilago, su morfología presenta una cara superior curva en contacto con el fémur y una cara inferior plana en contacto con la tibia, poseen una circunferencia externa y una interna. Actúan en la amortiguación de fuerzas y facilitan los movimientos combinados. Los medios de unión de la rodilla son los ligamentos, resistentes y casi inextensibles. Una membrana sinovial se extiende en el interior de la articulación y en contacto con los elementos de la articulación. La lubricación es generada por el líquido que producen sus células, el líquido sinovial (Testuit, 1983 y Romanes, 1987).

### CARACTERÍSTICAS DE LOS ELEMENTOS DE LA RODILLA

El tejido de los meniscos no posee un pericondrio y sus propiedades son intermedias entre un tejido fibroso denso y cartilago hialino. Los meniscos proporcionan una transmisión de carga de 50-70%, estabilidad a la articulación y función sensitiva. Están compuestos en un 72% de agua, 22% de colágena, 0.8% de glicosaminoglicanos. La colágena tipo I representa el 90%, y el resto lo constituyen los tipos II, III y V. Entre los proteoglicanos se encuentra un 40% de condroitín 6-sulfato, 10-20% de condroitín 4-sulfato, 20-30% de dermatán sulfato y 15% de queratán sulfato. El hialuronato (ácido hialurónico) representa entre 4 a 5% (Benjamin and Evans, 1990 y Messner y Gao 1998).

El cartilago articular proporciona una superficie de baja fricción, resistente a la compresión y libre de dolor cubre permanentemente los cóndilos de la articulación y la rótula, está compuesto de una fase líquida de agua y electrolitos, y una sólida compuesta por la MEC (matriz extracelular) y los condrocitos (Mow et al., 1984, Morrison et al., 1993 y Comper, 1996) La tabla 1 muestra la proporción de los componentes del cartilago articular.

Tabla 1

<i>COMPONENTES DEL CARTÍLAGO ARTICULAR.</i>	
Componente	Peso fresco
Agua	60-85%
Colágena tipo II	15-22%
Agrecano	4-7%
	Menos del 5%
Proteína de unión	"

Hialuronato	Menos del 5%
Biglicano	
Colágena I	
" V	
" VI	
" IX	
" XI	
Decorina	
Fibromodulina	

Tomado de Comper, 1996

Los tendones y ligamentos, que unen un elemento esquelético, están constituidos principalmente de fibras de colágena que proporcionan su alta capacidad ténsil. Su utilidad se ve incrementada al poder reparar daños y responder al ejercicio o inmovilización con cambios en sus propiedades ténsiles. Las células constituyentes son capaces de detectar cambios en la carga mecánica y coordinar una respuesta que deriva en un cambio de la composición de la MEC, via la interacción entre el citoesqueleto, las integrinas en la membrana celular y la MEC. Otros constituyentes de los tendones son los glicosaminoglicanos entre los que resalta el hialuronato (Benjamin y Ralphs, 1998).

La sinovia facilita el movimiento en el espacio entre las superficies cartilaginosas y de los tendones esto es debido a la presencia de una presión subatmosférica, del hialuronato producido por las células sinoviales y la presencia de una capa de tejido sinovial ininterrumpida. Este tejido muestra una alta actividad de la UDPGD (uridin difosfo-glucosa deshidrogenasa), enzima que interviene en la reacción limitante de la síntesis del hialuronato. De la misma forma la expresión de VCAM-1 (Molécula de Adesión Celular-1) es prominente (Edwards, 1994).

## DESAROLLO DE LA RODILLA

### Generalidades

Los elementos esqueléticos, el fémur, la tibia y la rótula en el inicio del desarrollo de la rodilla forman un solo elemento de cartilago hialino, donde no se puede observar

una clara diferencia entre la parte distal del fémur, la proximal de la tibia ni el primordio de la rótula. Puede notarse una zona donde hay una mayor densidad celular, llamada interzona, que es el sitio a partir del cual se separan los elementos de la articulación (Figura 2). De igual forma que los elementos mencionados, ni los meniscos, ni los ligamentos pueden distinguirse en la interzona (Andersen, 1961 y Mitrovic et al., 1978).

Antes de la separación de los elementos de la articulación las células de la interzona muestran un cambio en su forma y orientación, estos cambios son cruciales en la morfogénesis, migración y muerte celulares (Craig et al., 1987 y Kheradmand et al., 1998). El proceso por el cual ocurre la separación de los elementos de la articulación (la cavitación) puede estar determinado por la migración y muerte celulares, la ingesión vascular, la pérdida de propiedades ténsiles mediadas por la actividad enzimática o mecánica y los cambios asociados en los componentes de la MEC (Archer et al., 1994, Edwards et al., 1994 y Slater, 1995). Conforme continúa el desarrollo se observa la separación del fémur y la tibia, posteriormente se observan con claridad los meniscos y la rótula (Archer et al., 1994).

### **Expresión de las moléculas de la MEC durante el desarrollo de la rodilla.**

Durante el desarrollo de la articulación, en distintos sitios y momentos, hay variaciones en la morfología y contenido macromolecular del cartílago. La interacción que ocurre en estas etapas entre los receptores celulares y la MEC son importantes en el control de la diferenciación y regulación de la función de los condrocitos, así como durante la morfogénesis de la rodilla, lo cual se muestra adelante (Slater et al., 1995).

En *Monodelphis domestica* (zarigüeya) la colágena tipo I se encuentra, en las epífisis de los elementos en desarrollo, posteriormente en los tendones, los ligamentos, los meniscos, el pericondrio y las diáfisis. Cuando se desarrolla el centro de osificación secundaria se observa ahí la expresión de la colágena tipo I. La colágena tipo II se observa en el inicio del desarrollo de la articulación, cuando ocurre la cavitación se localiza en las epífisis, zona de osificación endocondral y al inicio del centro de osificación secundaria y en la placa de crecimiento. La expresión de la colágena tipo

# Morfogénesis de la rodilla

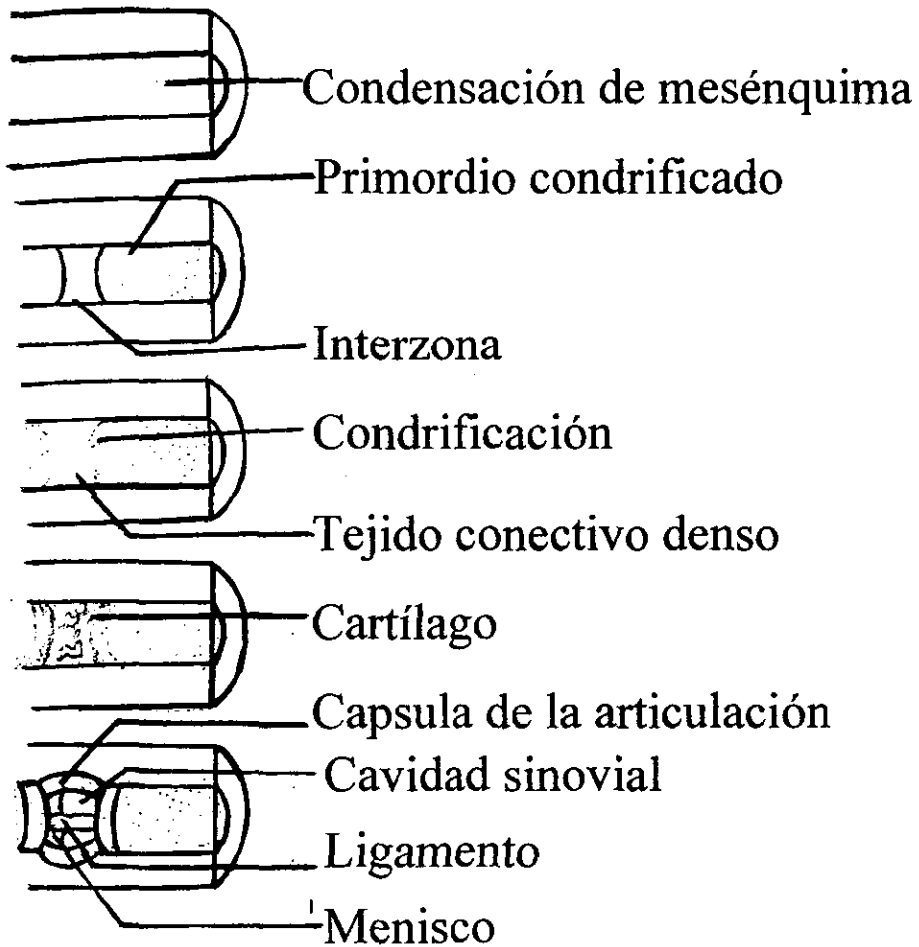


Figura 2

III puede observarse en el presuntivo pericondrio y el periostio antes de la cavitación, una vez ocurrida la cavitación puede observarse en los tendones, los ligamentos y los meniscos, así como en el pericondrio. La colágena tipo VI se detecta en el mesénquima de la extremidad antes de la cavitación. Después de la cavitación se observa en el cartílago articular e hipertrófico y la epífisis de los elementos esqueléticos, posteriormente en los tendones, los ligamentos y los músculos. De igual forma en el centro de osificación secundaria. La colágena tipo X antes de la cavitación se observa en el periostio y la parte hipertrófica de la tibia. Después de la cavitación se localiza en la placa de crecimiento y en el centro de osificación secundaria (Morrison et al., 1996).

La laminina es una proteína trimérica compuesta de tres cadenas, denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ; cada una de estas cadenas está codificada por diferentes genes que traducidos estructuran diferentes trímeros, como la laminina-1 que está compuesta de  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  y  $\gamma 1$ , y la laminina-2 que está compuesta de  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  y  $\gamma 1$ . La laminina promueve el crecimiento, la adhesión, la diferenciación, la migración y la señalización celulares (Keun et al., 1997).

Antes de la cavitación la cadena  $\alpha 1$  de la laminina es la de mayor expresión en la extremidad embrionaria de la ave. En la misma etapa hay una presencia moderada de la laminina-1, la cadena  $\alpha 2$  y  $\beta 2$ , y muy poco la  $\gamma 1$ . En la rodilla del adulto, en el cartílago articular se expresan poco; la cadena  $\alpha 1$ , la laminina-1, la cadena  $\gamma 1$  y la cadena  $\beta 2$  y muy poco la cadena  $\alpha 2$ . En la placa de crecimiento la cadena  $\gamma 1$  y  $\beta 2$  aumentan a una expresión moderada, la cadena  $\alpha 2$  disminuye su expresión y la laminina-1 se mantiene con poca expresión (Keun et al., 1997).

En el cartílago articular humano, la laminina, se expresa con intensidad, de igual forma en la zona de osificación y está ausente en los condrocitos proliferativos, hipertróficos y la placa de crecimiento. En el adulto sólo se localiza en la zona profunda del cartílago articular. Su importancia radica en que la laminina puede inducir la diferenciación celular y posiblemente el desarrollo del cartílago (Dürr et al., 1996).

De igual manera en el humano ocurre la expresión de otros componentes de la MEC con variaciones espacio temporales como son:

La fibromodulina se expresa adyacente a la zona de cavitación cuando aún no ha ocurrido este proceso, pero es negativa en la interzona. Cuando se dividen los elementos de la articulación se observa en la zona media de la epífisis, cartílago hipertrófico y cartílago articular. La decorina se expresa en la matriz de cartílago antes de la cavitación, después se expresa con menor intensidad en la MEC de los condrocitos de la zona articular. Una vez ocurrida la cavitación la decorina es positiva en los ligamentos, los tendones y el cartílago articular y posteriormente en el centro de osificación secundaria. El biglicano se expresa en el presunto cartílago articular, pero no en la interzona, después de la cavitación presenta distribución similar a la que presentan la decorina y fibromodulina. El agregano se expresa en la MEC de la interzona, después de la cavitación en el cartílago articular. Los proteoglicanos ricos en condroitin 4-sulfato no se observan en la interzona, después de la cavitación se expresan en el cartílago hipertrófico y en los condrocitos de la epífisis. Los proteoglicanos ricos en queratán sulfato se observan adyacentes a la interzona y después de la cavitación en el cartílago articular (Archer et al., 1996).

La hialuronato sintetasa, el hialuronato y su receptor el CD44, se han estudiado durante el desarrollo de la articulación. El hialuronato, un polisacárido compuesto de unidades repetidas de N-acetil glicosamina, es el principal componente del líquido sinovial, cuando se asocia a los proteoglicanos forma agregados macromoleculares (Slater et al., 1995), en las aves es evidente en la interzona (en las articulaciones de las falanges), cuando ocurre la cavitación se observa que alcanza su máximo de síntesis. Cuando ha ocurrido la cavitación puede observarse en el cartílago articular y los meniscos (Pitsillides, 1995 y Edwards et al., 1994). En el humano, antes y después de la cavitación, el hialuronato se presenta en la interzona. En el cartílago no se observa la expresión del receptor al hialuronato (Edwards et al., 1994). Esta expresión en el desarrollo de las articulaciones ha conducido a plantearla como una de las moléculas participantes en la cavitación de la articulación (Archer et al., 1994 y Lacy, 1987).

En la interzona de muestras humanas, la VCAM-1 es positiva en la presuntiva superficie sinovial, durante la cavitación aumenta su expresión y se mantiene cuando ha terminado el proceso (Edwards et al., 1994).

La tenascina se expresa en los sitios de condensación mesenquimática, que conducen a la condrogénesis u osificación intramembranosa. De forma general se ha observado que conforme aumenta la diferenciación de los condrocitos, la expresión de la tenascina disminuye (Mackie et al., 1987). Durante el desarrollo embrionario de la rodilla en ratas, a los 18 días se expresa con intensidad en el cartílago articular-epifiseal, meniscos y el periostio, con una intensidad media en el ligamento cruzado, además de manera difusa en la membrana sinovial. En las ratas recién nacidas presentan una disminución en la expresión en el cartílago articular-epifiseal y el periosteo, pero aumenta en la membrana sinovial. Tiempo después (10 semanas de vida) es aún menor su expresión en el cartílago articular-epifiseal. En todas las etapas es negativo en la placa de crecimiento (Mackie and Ramsey, 1996).

Trabajos recientes han demostrado que las moléculas de la MEC interactúan entre sí (Chang et al., 1997). Esta interacción en parte hace posibles los procesos de diferenciación y morfogénesis. La interacción, relevante en el cartílago articular, incluye la que ocurre entre el agregano, la proteína de unión y el hialuronato, y entre las colágenas tipo II, IX y XI y la laminina. También hay una interacción entre la colágena tipo VI con la tipo II, de la decorina y la fibromodulina, el hialuronato y la fibronectina. Estas interacciones, de las integrinas con la MEC y con las células conducen la diferenciación y morfogénesis (Brown and Yamada, 1995 y Chang et al., 1997)

En particular, en la rótula y el fémur (en humanos), antes de la cavitación las células de la interzona expresan las colágenas tipo I, III y V, pero es baja su expresión. Una pequeña región en el cartílago en desarrollo expresa colágena tipo II, en la superficie interior del tendón rotuliano. Una vez ocurrida la cavitación aún se expresan las colágenas tipo I y V, pero no la tipo III. En la rótula antes de la cavitación ocurre la expresión de las colágenas tipo I, II, III y V (Birk et al., 1994 y Bland et al., 1997).

El desarrollo esquelético también depende de una regulación precisa, como son, la degradación y remodelación de los constituyentes de la MEC, así como la síntesis y

depósito de nuevos componentes. Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son capaces de degradar todos los componentes del tejido conectivo a un pH fisiológico (7.2) (Messnerk and Gao, 1998).

Las MMPs incluyen a colagenasas, MMP 1, 8 y 13 (que degradan colágena tipo I, II, III), gelatinasas, MMP2 y 9 (que degradan a la colágena tipo IV y gelatina), estromelisin, MMP 3 y 10 (que son las más generales y degradan proteoglicanos, fibronectina, laminina, gelatina y caseína). La actividad de las MMPs es regulada por sus inhibidores específicos, los TIMPs -1 a -4 (inhibidores de tejido de las metaloproteinasas de matriz). Su distribución espacial en los elementos esqueléticos es diferencial. La colagenasa se localiza en el cartilago y sitios de osificación, la gelatinasa-A en los fibroblastos, la gelatinasa-B en hueso mineralizado, la estromelisin presenta una distribución amplia como la colagenasa al igual que el TIMP-1 (Bord et al., 1997).

Otras moléculas con una distribución asociada al desarrollo de la articulación son los IGF-1, IGF-2 (Factor de Crecimiento semejante a la Insulina) y la proteína de unión a IGF-1, cuya distribución se restringe al avanzar el desarrollo de la articulación, después de una distribución homogénea en la epífisis, sólo se observa en la capa de cartilago articular (Archer et al., 1994). La forma en la que se expresan las moléculas de la MEC antes y después de la cavitación de la rodilla se observa en la tabla II.



Tabla II EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE LA MEC DURANTE EL DESARROLLO DE LA RODILLA

Molécula	Antes de la cavitación	Después de la cavitación		
		Meniscos	Cartilago articular	Epífisis
Colágena tipo I	En las presuntivas epífisis.	presente		presente
Colágena tipo II	En el mesénquima de la extremidad.		presente	presente
Colágena tipo III	En el presuntivo pericondrio y periostio.	presente		
Colágena tipo VI	En el mesénquima de la extremidad.		presente	presente
Colágena tipo X	En el presuntivo periostio.			En la placa de crecimiento.
Cadena $\alpha 1$ de la laminina	expresión alta		poca expresión	
Laminina-1	expresión moderada		poca expresión	
Cadena $\alpha 2$ de la laminina	expresión moderada		poca expresión	
Cadena $\beta 2$ de la laminina	expresión moderada		poca expresión	
Cadena $\gamma 1$ de la laminina	poca expresión		poca expresión	
Fibromodulina			presente	presente
Decorina	presente		presente	
Biglicano			presente	presente
Agrecano	presente		presente	
Proteoglicanos 4-sulfato	presente			presente
Sulfato de queratán	presente		presente	
Hialuronato	presente	presente	presente	
VCAM-1	presente	En la sinovia.	En la sinovia.	En la sinovia.

GF-1, IGF-2 y proteína de unión a IGF-1			Se expresa en segundo lugar y con mayor intensidad.	Se expresa primero y con menor intensidad.
Tenascina	Disminuye en el adulto.	presente	presente	presente

Esta distribución de las moléculas de la MEC estructuran un ambiente para las células, donde éstas adquieren información que modifica su conducta y guía a las células en procesos de diferenciación y morfogénesis. En estas actividades actúan la composición de la MEC, las interacciones entre los factores de crecimiento y la MEC, y los receptores a las moléculas de la MEC. Las integrinas son los receptores más importantes a las distintas moléculas de la MEC, y se han implicado como mediadores y moduladores de estos procesos; la morfogénesis y la diferenciación (Enomoto et al., 1993 y Miyamoto et al., 1998).

## LAS INTEGRINAS

Las integrinas son una familia de receptores de adhesión celular que median la adhesión entre célula y célula, de la célula con su sustrato y regulan las actividades biológicas tales como la migración, la diferenciación y la adhesión celulares durante el desarrollo embrionario.

Las integrinas se componen de un heterodímero, una subunidad  $\alpha$  grande y una  $\beta$  pequeña, unidas no covalentemente. Se conocen 8 diferentes subunidades  $\beta$  y 16 subunidades  $\alpha$ , que en varias combinaciones forman más de 20 heterodímeros. Para que la integrina sea activa se requiere de ambas subunidades y también son necesarios cationes divalentes para los cuales el dominio extracelular posee tres o cuatro sitios de unión.

Las subunidades poseen un dominio extracelular grande, una secuencia transmembranal y una porción citoplásmica corta, que en la subunidad  $\beta$  se sabe que interacciona con componentes del citoesqueleto y de moléculas que participan en la comunicación celular (Ahlén, 1998, Albelda et al., 1990 y Hynes, 1987).

Las integrinas pueden dividirse en grupos según la especificidad al ligando. Dentro de la familia  $\beta 1$  se forman los heterodímeros de la subunidad  $\beta 1$  con las subunidades  $\alpha 1$ - $\alpha 9$  y  $\alpha v$ , las integrinas formadas se unen a distintas moléculas de la MEC. Algunas se unen a una secuencia peptídica lineal (RGD) que se encuentra en la fibronectina, la vitronectina, la laminina y otras moléculas de la MEC (Brown and Yamada, 1995).

La familia  $\beta 1$  tiene como ligandos a:

$\alpha 1\beta 1$	laminina y colágenas
$\alpha 2\beta 1$	colágenas y laminina
$\alpha 3\beta 1$	laminina, colágenas, fibronectina, entactina y epilgrina
$\alpha 4\beta 1$	fibronectina y VCAM-1
$\alpha 5\beta 1$	fibronectina
$\alpha 6\beta 1$	laminina
$\alpha 7\beta 1$	laminina
$\alpha 8\beta 1$	fibronectina, vitronectina y tenascina
$\alpha 9\beta 1$	tenascina
$\alpha v\beta 1$	fibronectina y vitronectina

*Tomado de Brown and Yamada., 1995 y Faull and*

*Ginsberg., 1996.*

El resto de familias de las integrinas,  $\beta 2$ - $\beta 8$ , el número de integrinas que forman es menor que el de la familia  $\beta 1$  y algunas sólo se encuentran en células sanguíneas.

Entre las propiedades de las integrinas la adhesión celular puede considerarse como la principal. Esta adhesión es temporal y espacialmente dinámica, donde tanto la MEC como las integrinas cambian durante el desarrollo. La expresión de las integrinas puede cambiar por señales extracelulares con las citocinas, factores de crecimiento, factores mecánicos, agentes infecciosos como el VIH y el citomegalovirus, o a causa de la MEC (Takada and Kamata, 1995).

Las integrinas también permiten la migración celular, esto es posible por la distribución y capacidad de difusión de las integrinas en la membrana celular. La migración celular está relacionada con la afinidad de las integrinas al sustrato y la adhesión a la MEC, esta afinidad puede modificar las señales de entrada y salida, mediadas por integrinas, en la célula ( Brown et al., 1995, Kim and Yamada., 1995 y Takada and Kamata, 1995).

Así como la adhesión celular es una función primaria de las integrinas, la transmisión de una señal a través de la membrana celular, tiene un papel primario. De esta forma las integrinas también participan como moléculas de señalización. La transducción de una señal a través de las integrinas tiene dos direcciones, de la región extracelular a la citoplasmática (una señal de entrada) y del citoplasma al espacio extracelular (una señal de salida). La señal de salida tiene efectos en la continuidad del ciclo celular, apoptosis, secreción de proteínas de degradación de la matriz, diferenciación celular y expresión genética (Faull and Ginsberg, 1996). La señal de entrada activa un mapa de transducción de señal que puede incluir, influjo de calcio, fosforilación de tirosina, activación de múltiples cinasas, organización del citoesqueleto, actividad a nivel genético, crecimiento, apoptosis y diferenciación (Schawartz, 1995 y Yamada, 1997).

En dos trabajos anteriores se observaron diferencias en la distribución espacial de las subunidades de las integrinas. Salter y cols. (1995) trabajaron con muestras de rodillas de humanos de partos muertos y abortos a la mitad del tercer trimestre, observando diferencias en la expresión de las subunidades de las integrinas de la familia  $\beta 1$ , en los elementos de la articulación en las dos edades estudiadas, así como diferencias en la intensidad. Ustoa y cols. (1998) trabajaron con fetos de ratón de 18 dpc (un día antes de nacer) observando la expresión de las subunidades de las integrinas de la familia  $\beta 1$ , existen diferencias en los sitios de expresión e intensidad para las subunidades probadas. En ambos trabajos la distribución de las integrinas se relacionó con las moléculas de la MEC. Sin embargo, estos trabajos no muestran lo que ocurre con las integrinas durante el desarrollo de la rodilla, sino sólo cuando ya está formada.

Como se ha descrito existe una variación espacio-temporal de las moléculas de la MEC, como las colágenas, la laminina, la tenascina, etc. La interacción que presentan estas moléculas con las integrinas es muy estrecha por lo cual el hacer un análisis de la expresión de las integrinas, en particular de la familia  $\beta 1$  que interactúa con las moléculas de la MEC, sugiere la posible variación y participación de estos receptores durante el desarrollo de la rodilla.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La MEC que estructura un ambiente, al cual las células son sensibles por sus receptores, (las integrinas) varía conforme el desarrollo de la rodilla, las integrinas de la familia  $\beta 1$  son las que reconocen a la mayoría de los componentes de la MEC. La interacción entre las integrinas y la MEC hacen posibles procesos como la diferenciación, la migración y muerte celulares y la morfogénesis, eventos que pueden estar ocurriendo durante la morfogénesis de la rodilla, que en el ratón ocurre de los 13 a los 18 días postcoito (dpc). Debido a la gran importancia de la distribución espacial y temporal de los elementos que participan en la morfogénesis de la rodilla y que la distribución de las integrinas no se han estudiado durante el desarrollo de la rodilla el objetivo de este trabajo es el siguiente.

## **OBJETIVO**

Conocer la distribución espacial y temporal de las integrinas de la familia  $\beta 1$ , durante el desarrollo de la rodilla del ratón.

## **MATERIAL**

Los anticuerpos primarios reconocen las subunidades;  $\alpha 1$  (Santa Cruz Biotechnology)  $\alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 5, \alpha 6$ ,  $\alpha v$  y  $\beta 1$  (fueron donados por el Dr. Erkki Rouslahti, La Jolla Cancer Center Research Foundation) todos los anticuerpos reconocen el dominio citoplasmático.

## **MÉTODO**

### Material Biológico

Los animales utilizados fueron ratones de la cepa CD1. Las hembras se colocan junto con el macho toda la noche y se revisan a la mañana siguiente, el día en que éstas presentan un tapón vaginal se toman como cero días postcoito (dpc) y está incluido el momento de la fertilización.

Los ratones utilizados fueron de 13 a 18 dpc y de 1-5, 10, 15, 20 y 30 días post-parto (dpp) para el análisis histológico y de 13 a 18 dpc para el análisis de la expresión de las integrinas.

Las hembras se sacrificaron por anoxia con CO<sub>2</sub>, se disecaron en la región del abdomen y se extrajo el útero con los embriones. Se extrajeron los embriones cortando el útero y se rompió el saco amniótico para dejar libres a los embriones. Posteriormente se cortó a cada uno una rodilla. Los ratones de 1-30 dpp se sacrificaron por decapitación y se disecó una de sus rodillas.

Las rodillas disecadas se fijaron en Paraformaldehído (Sigma Chemical Co. USA) al 4% por 2 horas, se pasaron a PBS por una hora y luego a Sacarosa (S.T. Baker) al 30% en PBS durante 24 horas. Se congelaron con N<sub>2</sub> líquido, las rodillas se colocaron en una caja petri en la orientación en la cual van a ser cortadas (sagital) se quitó el exceso de sacarosa circundante al órgano con papel absorbente y se vació de forma directa el N<sub>2</sub> líquido. Se almacenaron en congelación a -70 °C hasta su utilización.

Los órganos se incluyeron en Tissue-Tek (Jung), se congelaron y se obtuvieron cortes de 8 µm en un criostato (Cryo-Cut, American Optical) a -20 °C. Los cortes así obtenidos se sumergieron en acetona por 2 minutos a -20 °C.

### Histología

La primera etapa fue hacer un análisis histológico del desarrollo de la rodilla. Aquí se utilizaron animales de 13 a 18 dpc, 1 a 5, 10, 15, 20 y 30 dpp. Los cortes se tiñeron por la técnica de Safranina (Sigma Chemical Co. USA) la cual permite diferenciar el cartilago, en color rojo, de los demás tejidos, en color verde.

Esta técnica consiste en hidratar los cortes con concentraciones de etanol descendentes (100, 90, 80, 70, 60 y 50%) y agua por 5 min. en cada uno. Se tiñeron con hematoxilina férrica de Weigert (Sigma Chemical Co. USA) por 7 min., se lavaron con agua de la llave 10 min., se tiñeron con verde rápido (Sigma Chemical Co. USA) 3 min., se lavaron con ácido acético 1% de 10-15 segundos, se tiñeron con Safranina 0.1% 10 min y se deshidrataron con, etanol 95% y 100% dos cambios de dos minutos cada uno, se colocaron en xileno 2 min y se montaron con resina sintética (Sigma de México S.A.). Las fotografías tomadas se realizaron en película a color, asa 100 a 10X con aproximadamente 0.30 seg. de exposición.

### Inmunofluorescencia.

Los cortes se bloquearon con albúmina (Sigma Chemical Co. USA) al 1% en PBS a temperatura ambiente en una cámara húmeda por 30 min. posteriormente se incubaron con el anticuerpo (Ab) primario (1:50) (el testigo careció del anticuerpo primario, es el control negativo) toda la noche a 4 °C. Una vez hecho esto se lavaron con PBS 3 veces por 5 min. Se incubó con el anticuerpo secundario fluoresceinado (1:50) por 1 hora. En adelante se cubrió la cámara húmeda con papel aluminio ya que el anticuerpo secundario es fotosensible. Se quitó el exceso de Ab con Tween -20 (Sigma Chemical Co. USA) al 0.3%, dos cambios de 5 min. cada uno. Luego se pasó a PBS por 30 min y se montó con DABCO (1,4-Diazabicyclo 2.2.2.) (Aldrich) y se almacenó a 4 °C para observar al microscopio de fluorescencia.

Las fotografías tomadas se realizaron en película asa 400, blanco/negro, con el mismo tiempo de exposición (18 seg. en aumento 10X).

## **RESULTADOS**

### Características histológicas del desarrollo de la rodilla en el ratón

A los 13 dpc en la región de la rodilla se observó sólo un elemento esquelético constituido de cartílago, que forma la unión de lo que después serán el fémur y la tibia (Figura 3). Se observó una zona con una mayor densidad celular y donde las células son de morfología alargada, ésta es la interzona. Para los 14 dpc la interzona fue más evidente, la densidad celular aumentó y la morfología alargada de las células fue clara. Es en la interzona donde a los 15 dpc se comenzó a observar la separación del fémur y la tibia, este proceso fue evidente al disminuir la densidad celular en esta región. La separación completa del fémur y la tibia ocurrió a los 16 dpc mostrando los dos elementos esqueléticos, los meniscos, los tendones y las fibras musculares. También en esta etapa se observó la rótula. En los elementos de cartílago se observaron los condrocitos en reposo y las columnas de condrocitos en proliferación. A los 17 dpc comenzó la osificación endocondral en la diáfisis (datos no mostrados). Antes de nacer los ratones, a los 18 dpc, se observaron los diferentes elementos funcionales de la articulación, incluida la membrana sinovial .

Durante los primeros días post-parto, la osificación endocondral avanza hacia las epífisis. Desde los 10 dpp se localizó el centro de osificación secundaria, la placa de crecimiento y a los 15 dpp este proceso se observó de manera evidente. El centro de osificación secundaria se extendió por toda la epífisis conservándose sólo una franja de cartílago articular desde los 20 a los 30 dpp que muestra la osificación en la rótula y cartílago articular en su articulación con el fémur (resultados no mostrados).

### Expresión de las subunidades de las integrinas de la familia $\beta 1$ detectadas por inmunofluorescencia

Una vez realizado el análisis histológico se observó que en esta etapa, de los 13 a 18 dpc, se desarrollan los elementos de la rodilla, a partir de un elemento de cartílago hialino, luego ocurre la cavitación y se establece una estructura funcional. Por ello es en esta etapa donde se realizó el análisis de la expresión de las integrinas.

La subunidad  $\beta 1$  se expresó con intensidad desde los 13 dpc, de forma particular en la interzona. Esto puede distinguirse con claridad en los meniscos y el cartílago articular 16 dpc en adelante. Cuando comienzan a distinguirse las epífisis de los elementos esqueléticos su expresión se hace más puntual en las superficies celulares (Fig. 5a y 5b).

La subunidad con la menor expresión en la zona de desarrollo de la articulación, refiriendo en particular a los elementos esqueléticos fue la  $\alpha 1$  (Fig. 4a y 4b), también con poca expresión la subunidad  $\alpha 6$  (Fig. 5a) a los 13 y 15 dpc y la subunidad  $\alpha 2$  (Fig. 4a y 4b) con poca expresión, pero se expresa tenuemente en la interzona.

La subunidad  $\alpha 1$  (Fig. 4a) comenzó a expresarse en los meniscos a partir de los 15 dpc a partir de aquí comienza a aumentar su expresión notándose en las epífisis de ambos elementos esqueléticos a los 18 dpc (Fig. 4b). La expresión de la subunidad  $\alpha 2$  (Fig. 4a) se muestra con claridad en la interzona desde los 13 dpc aumenta hasta un máximo a los 17 dpc (Fig. 4b). A los 14 dpc se observó en toda la diáfisis y a los 16 dpc en la zona del cartílago articular (Fig. 4a y 4b).

En general durante todo el desarrollo de la rodilla, en la interzona y los cóndilos las subunidades con mayor expresión fueron  $\alpha 3$  y  $\alpha 5$ . Aun que en algunas etapas las



subunidades con mayor expresión fueron;  $\alpha 4$  y  $\alpha 6$  en la segunda mitad del desarrollo de la articulación, y  $\alpha v$  en la interzona.

La subunidad  $\alpha 3$  (Fig. 4a) se expresó desde los 13 dpc en la interzona y aumentó su expresión en este mismo sitio para los 14 dpc manteniéndose en los 15 dpc y al ocurrir la cavitación se observó con claridad en los meniscos, las epífisis y de éstas en el cartílago articular (fig. 4b). Su expresión disminuyó a los 18 dpc pero continuó su expresión en las mismas zonas. La subunidad  $\alpha 4$  (Fig. 4a) a los 13 dpc presentó una baja expresión en la interzona, pero no así en las presuntivas diáfisis de los elementos esqueléticos. La expresión de  $\alpha 4$  disminuyó a los 14 y 15 dpc. A los 16 dpc (Fig. 4b) se percibió un notable incremento que es máximo a los 17 dpc y vuelve a bajar a los 18 dpc .

La subunidad  $\alpha 5$  mantuvo una expresión constante desde los 13dpc a los 18 dpc (Fig. 5a y 5b). Su expresión en la interzona se mantuvo cuando los elementos articulares se separaron (Fig. 5a), y fue muy claro en el sitio de los meniscos a los 15 dpc y en el cartilago articular a los 17 dpc (Fig. 5b).

La subunidad  $\alpha 6$  (Fig. 5a) mostró una expresión muy baja a los 13 dpc, pero a los 14 dpc aumentó notablemente, sin embargo, disminuyó otra vez su expresión a los 15 dpc en los cóndilos, manteniéndose en la interzona. A los 16 dpc (fig. 5b) aumentó su expresión en toda la rodilla disminuyendo en los cóndilos a los 17 y 18 dpc (Fig. 4a y 4b) pero manteniéndose en los meniscos en los mismos 17 y 18 dpc.

La subunidad  $\alpha v$  (Fig. 5a) tuvo una expresión moderada a los 13 dpc, disminuyó un poco a los 14 dpc y aumentó de forma evidente a los 15 dpc, notándose con claridad en la interzona. En este sitio donde se desarrollan los meniscos (Fig 5b) se mantuvo hasta los 18 dpc, mientras disminuyó en los cóndilos, observándose sólo una delgada franja positiva en el cartílago articular a los 16 y 17 dpc (Fig 4a y 4b) y aumentó en los cóndilos a los 18 dpc.

Un resumen de los resultados de la expresión de las subunidades de las integrinas durante el desarrollo de la rodilla del ratón, dividido en tres etapas se muestra en la tabla III.

Tabla III RESUMEN DE LOS RESULTADOS

	$\beta 1$	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\alpha 6$	$\alpha v$
interzona 13-14 dpc	+++	-	+	+++	++	+++	++	++
cavitac. 15-16 dpc	+++	+	++	+++	++	+++	++	+++
17-18 dpc	+++	++	++	+++	+++	+++	++	+++

Expresión; +++ intensa, ++ moderada, +baja, - nula.

## DISCUSIÓN

El desarrollo de la rodilla es un proceso morfogénético donde la adquisición de la forma incluye procesos a nivel molecular, celular y tisular. Así la cavitación incluye una serie de procesos, cuya interrelación conduce al establecimiento de una rodilla funcional.

En el análisis histológico se observan las mismas características tal como se han descrito para las articulaciones en humanos (Andersen, 1961, 1962a y 1962b), en zarigüeya (Archer, 1994), en rata (Mitrovic, 1978) y en ave (Fell, 1934). Donde a partir de un elemento de cartílago hialino se desarrollan los órganos esqueléticos y las estructuras asociadas. Este punto es de particular interés pues los elementos que van a constituir la articulación del animal adulto poseen características distintas entre ellos. En los resultados puede observarse la diferenciación de cartílago articular en el fémur, la tibia y la rótula, cartílago hialino en las epífisis hasta el primer mes de vida donde ya se observa un centro de osificación secundaria. Los meniscos, constituidos de fibrocartílago, los tendones y la sinovia. Estos cuatro tejidos, adquieren sus características particulares desde la etapa de desarrollo intrauterino (13 a 18 dpc en el ratón) estableciendo una articulación funcional, esta característica y la gran dinámica en la expresión espacio-temporal de los componentes de la MEC condujo a plantear como objetivo realizar el análisis de la expresión de las integrinas de la rodilla en la etapa intrauterina.

La interzona es particularmente interesante, puede distinguirse por un aumento en la densidad celular, en especial a los 14 dpc, y es en este sitio donde para los 15 dpc se observa la cavitación de la articulación. Se ha propuesto que la pérdida de cohesión entre las células, que se observa a los 15 dpc, puede ser el punto de inicio del proceso (Pitsillides, 1995) en asociación directa con la síntesis del hialuronato. Y si

además observamos cambios en los componentes de la MEC, las colágenas (Morrison et al., 1996), la fibromodulina, la decorina, el biglicano, el agregano, el sulfato de queratán (Archer, 1996), la laminina (Dürr et al., 1996) y la tenascina (Mackie, 1996) y moléculas como la VCAM-1 (Edwards et al., 1994) e IGF-2 (Archer et al., 1994), notamos con claridad una dinámica espacio temporal de la MEC y lo que este trabajo muestra es que los receptores más importantes a la matriz extracelular, las integrinas, también presentan una heterogeneidad en su expresión espacio-temporal. Esta es una importancia inmediata de este trabajo, ya que muestra como las integrinas poseen una expresión diferencial espacial y temporalmente.

Esta dinámica en los componentes de la MEC y sus receptores, las integrinas, hace posible el movimiento de las células de un sitio a otro y el rearrreglo de las capas celulares, el cambio en la forma que se observa durante la cavitación puede ser indicativo de que esto está ocurriendo. Debe ser esta dinámica de adhesión y migración celulares la que hace posible la adquisición de la forma en la articulación.

La interacción de la MEC y las integrinas parece ser imprescindible, no solo en el mantener la continuidad del proceso de cavitación, sino desde el momento de permitir su inicio, donde se ha planteado la participación del hialuronato. La interacción del hialuronato y las integrinas no es directa, sin embargo el receptor al hialuronato, el CD44, si interactúa con la integrina  $\alpha 4\beta 1$ .

El receptor al hialuronato, el CD44, es importante en múltiples funciones fisiológicas, incluyendo la adhesión célula-célula y la interacción célula-sustrato. Además el CD44 induce la expresión de VCAM-1 en la superficie celular del tejido sinovial, esta interacción es mediada por la integrina  $\alpha 4\beta 1$  (Fujii et al., 1999). El hialuronato se ha propuesto que interviene en desencadenar el proceso de cavitación (Edwards et al., 1994). En este trabajo ha de resaltarse la expresión de la subunidad  $\alpha 4$  a los 13 dpc, lo que sugiere la posibilidad de mediar la actividad que ejerce el hialuronato en el proceso de cavitación y que es posible se una a su contrarreceptor VCAM-1 que se expresa en la interzona y por lo tanto sería relevante determinar si el hialuronato induce la expresión de la integrina  $\alpha 4\beta 1$ .

La interacción que ocurre entre la MEC y las integrinas es muy estrecha, pero durante el desarrollo de la rodilla no se conoce hasta que grado puede ser importante la

interacción, sin embargo los resultados aquí mostrados pueden sugerir que interacción está ocurriendo en el proceso de cavitación.

Las subunidades de mayor expresión en el desarrollo de la rodilla del ratón son;  $\beta 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha v$  y  $\alpha 6$ . Las subunidades  $\alpha 3$  y  $\alpha 6$  son receptores a laminina,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha v$  son receptores a fibronectina, solo  $\alpha 3$  es receptor a colágena, entactina y epilgrina,  $\alpha 4$  a VCAM-1 y  $\alpha v$  a vitronectina. En estas moléculas de la MEC tenemos: a la fibronectina con un papel en la migración celular mediada por la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , puede mediar la adhesión celular a colágena, en conjunto con proteoglicanos puede unirse al hialuronato, puede ser sitio de unión para TGF- $\beta$ s y puede regular la síntesis de MMPs a través de las integrinas (Brown and Yamada, 1995). La laminina se halla implicada en procesos como la adhesión, migración y diferenciación celulares, puede interactuar con el sulfato de heparán y formar complejos con la ectactina. La vitronectina media la adhesión celular y puede interactuar con la fibronectina (Brown and Yamada, 1995, Huhtala, 1995, Ulla, 1994 y Yamada, 1991). Al darse la interacción de estas moléculas de la MEC con las integrinas, que comunican a la célula de un microambiente particular, puede hablarse de que es posible que ocurra una dinámica entre los tres procesos que se han asociado a la cavitación; la adhesión a la MEC, cambios en la MEC a causa de degradación enzimática por MMPs y la migración celular.

La importancia en la participación de la MEC y las integrinas para hacer posible la cavitación hace necesaria la participación de las metaloproteinasas de matriz.

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son parte indispensable de la remodelación de la MEC durante el desarrollo embrionario. Las integrinas  $\alpha 5\beta 1$  y  $\alpha 4\beta 1$  median la regulación de la expresión génica de las MMPs en fibroblastos adheridos a fibronectina. En la unión a distintas partes de la fibronectina se provoca una disminución en las MMPs secretadas, sin embargo la región central de la fibronectina, constituida de homologías tipo III repetidas, producen la expresión de las MMPs; gelatinasa B (MMP-9) y estromelisina-1 (MMP-3), entre cuyos sustratos están colágena X y fibronectina (Birkendal-Hasen, 1995, Grant et al., 1996, Huhtala et al.,

1995 y Hynes, 1985). Tanto la colágena X como la fibronectina se localizan en el cartilago articular de la rodilla (Slater et al., 1995 y Morrison et al., 1996). De estar ocurriendo esta regulación durante la cavitación es importante resaltar la intensidad con la que se expresa la subunidad  $\alpha 5$  y  $\beta 1$  en la interzona a los 15 dpc, que es cuando se observa la separación de los futuros elementos de la articulación.

La unión de las células a la MEC es necesaria no sólo para la diferenciación celular, también lo es para la sobrevivencia. Cuando se bloquea experimentalmente la interacción mediada por integrinas pueden observarse cambios en los condrocitos; en la forma de las células, en sus núcleos y ocurre un incremento en la apoptosis. Los cambios en la forma pueden estar relacionados con la ruptura del citoesqueleto de actina como resultado directo de bloquear las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\beta 1$  de las integrinas (Hirsch et al., 1997, Loeser et al., 1994, Fukas et al., 1998, Lee et al 1999, Rouslahti and Reed 1994 y Sato et al., 1999). La apoptosis es otro de los eventos que se plantean como parte del proceso de cavitación. Son de particular importancia las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  pues al bloquear su actividad conducen a la apoptosis en condrocitos. Nuestros resultados muestran que estas dos subunidades se expresan, pero muy tenuemente, en particular la subunidad  $\alpha 1$  a los 13 y 14 dpc en la interzona, mientras que la subunidad  $\alpha 2$  tiene su mínimo de expresión a los 15 dpc. Estos resultados pueden ser un indicador de la posible participación de la apoptosis en el proceso de cavitación, a cargo de las integrinas  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 2\beta 1$ .

Podemos observar que la pérdida de componentes de la matriz como la fibronectina, o la regulación por una parte de ésta, puede ocasionar que por intermediación de las integrinas se provoque un mayor aumento en las MMP, que al degradar la MEC conduce a las células a perder su contacto con la MEC y hace posible que ocurra el fenómeno de anosis (la muerte de las células al perder su unión a la MEC) y que en la interzona durante la cavitación se observe el fenómeno de apoptosis (Birkendal-Hasen, 1995 y Rouslahti and Reed, 1994).

De esta forma la distribución espacio-temporal, que varía durante la morfogénesis de la rodilla del ratón, entre las diferentes subunidades de las integrinas observadas en

este trabajo, puede ser un indicador de los distintos eventos que suceden en el proceso de cavitación, debido a que son las integrinas las que comunican a la célula de lo que sucede a su alrededor e indican su papel dentro del proceso morfogénético. Las integrinas hacen posible el puente de interrelaciones entre los elementos que participan en la morfogénesis de la rodilla.

## CONCLUSIONES

Las subunidades de las integrinas de la familia  $\beta 1$  con una mayor expresión en el desarrollo de la rodilla son;  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha v$  y  $\beta 1$ .

Las integrinas  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha v$  y  $\beta 1$  se expresan en una etapa temprana del desarrollo (13 dpc). A los 14 dpc, cuando las células de la interzona cambian de forma se expresan las subunidades  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha v$  y  $\beta 1$ .

Desde los 14 dpc en los sitios donde se desarrollarán los meniscos se expresan las subunidades  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha v$  y  $\beta 1$ .

En el presuntivo cartilago articular a los 14 dpc se expresa la subunidad  $\alpha 3$  y a los 15dpc, cuando está diferenciado el cartilago articular se expresan todas las subunidades de las integrinas excepto  $\alpha 6$  la cual se expresa hasta los 16 dpc.

Se observó una expresión heterogénea espacio-temporal de las diferentes subunidades de las integrinas de la familia  $\beta 1$ . Esto puede ser un indicador de las interacciones célula-MEC que participan en los distintos pasos que llevan a la formación de la articulación.

## PERSPECTIVAS

El proceso que hace posible el desarrollo de la rodilla cuenta con una serie de elementos y relaciones entre ellos que aun se desconocen, la posibilidad de analizar el proceso mediante uno de los elementos participantes, las integrinas, parece muy alentador ya que establecen, las integrinas, un puente de comunicación posiblemente entre la mayoría de los elementos participantes. Si conocemos la forma en la cual interaccionan los diferentes elementos a través de las integrinas ya sea el como la MEC proporciona una señal a la célula, las integrinas hacen posible un paso para que la célula responda a esa señal, por la producción de MMPs que cambien a la MEC, la migración, la apoptosis,... y esto a su vez haga posible la morfogénesis de la rodilla, podremos aplicar los aspectos generales tanto a el análisis del desarrollo de las demás diartrosis y tipos de articulaciones y comparar con los estados patológicos,

para a futuro planear estrategias para reducir daños o mejorar la recuperación después de lesiones.

## REFERENCIAS

- Ahlén K (1998) **Collagen-binding integrin  $\alpha 2\beta 1$  activity *in vivo* and *in vitro*.** Acta Universitatis Upsaliens. Uppsala: 53pp.
- Albelda SM and Buck CA (1990) **Integrins and other cell adhesion molecules.** FASEB J 4: 2868-2880.
- Archer CW, Morrison EH and Pitsillides AA (1994) **Cellular aspects of the development of diarthrodial joints and articular cartilage.** J Anat 184:447-456.
- Archer CW, Morrison EH, Davliss MT and Feret al. (1996) **The development of articular cartilage: II. The spatial and temporal patterns of glycosaminoglycanos and small leucine-rich proteoglycans.** J Anat 189:23-35.
- Andersen H (1961) **Histochemical studies on the histogenesis of the knee joint and superior tibio-fibular joint in human foetus.** Acta Anat 46:273-303.
- Andersen H (1962a) **Histochemical studies of the development of the human hip joint.** Acta anat 48: 258-292.
- Andersen H (1962b) **Histochemical studies of the histogenesis of the human elbow joint.** Acta anat 51: 50-68.
- Andersen H and Bro.Rasmussen F (1961) **Histochemical studies on the histogenesis of the joints in human fetuses with special reference to the development of the joint cavities in the hand and foot.** Am J Anat 108 :11-122.
- Benjamin M and Evans EJ (1990) **Fibrocartilage.** J Anat 171:1-15.
- Benjamin M and Ralphs RJ (1998) **Fibrocartilage in tendons and ligaments-and adaptation to compressive load.** J Anat 193:481-494.
- Birk DE and Zycband E (1994) **Assembly of tendon extracellear matrix during development.** J Anat 184:457-463.
- Birkedal-Hasen H (1995) **Proteolytic remodeling of extracellular matrix.** Curr Op Cell Biol 7 : 728-735.
- Bland Y and Asnhurst D (1997) **Fetal and postnatal development of the patella, patellar tendon and suprapatella in the rabbit; changes in the distribution of the fibrillar collagens.** J Anat 190:327-342.
- Bord S, Horner A, Humbry RM, Reynolds JJ and Compston JE (1997) **Distribution of matrix metalloproteinases and their inhibitor TIMP-1, in developing human osteophytic bone.** J Anat 191:39-48.
- Brown KE and Yamada KM (1995) **The role of integrins during vertebrate development.** Seminars in Dev Biol 6:69-77.
- Chang J, Nskajima and Poole CA (1997) **Structural colocalisation of type VI collagen and fibronectin in agarose culture chondrocytes and isolated chondrons extracted from adult canine tibial cartilage.** J Anat 190:523-532.
- Comper WD (1996) **Extracellular matrix.** Vol 1 Tissue Function HAP Australia.

- Craig FM et al. (1987) **The spatial and temporal pattern of collagens I and II and keratan sulphate in the developing chick metatarsophalangeal joint.** *Development* **99**:383-391.
- Dowthwaite GP, Edwards CW, Pitsillides AA (1998) **An essential role for the interaction between hyaluronan and hyaluronan binding proteins during joint development.** *J Histochem Cytochem* **46** (5): 641-651.
- Dürr J, Goodman S, Potocnik A, von der Mark H and von der Mark K (1993) **Localization of  $\beta$ 1-integrins in human cartilage and their role in chondrocyte adhesion to collagen and fibronectin.** *Exp Cell Res* **207**: 235-244.
- Dürr J, Lammi P, Goodman SL, Aigner T, von der Mark K (1996) **Identification and immunolocalization of laminin in cartilage.** *Exp Cell Res* **22**:225-233.
- Edwards JCW (1994) **The nature and origins of synovium: experimental approaches to the study of synoviocyte differentiation.** *J Anat* **184**: 493-501.
- Edwards JCW, Wilkinson LS, Juno HM, Soothill P, Henderson KJ, Worrall JG and 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.
- Edwards JCW, Wilkinson LS, Soothill P, Hembry RM, Murphy G and Reynolds JJ (1996) **Matrix metalloproteinases in the formation of human synovial joint cavities.** *J Anat* **188**:355-360.
- Enomoto M, Leboy PS, Menko S and Boettiger D(1993)  **$\beta$ 1 integrins mediate chondrocyte interaction with type I collagen, type II collagen, and fibronectin.** *Exp Cell Res* **205**: 276-285.
- Fell HB and Canti RG (1934) **Experiments on the development in vitro of avian knee-joint.** *Pro Royal Soc B* **116** : 316-351.
- Faull RJ and Ginsberg MH (1996) **Inside-out signaling through integrins.** *J Am Soc Nephrol* **7**: 1-8.
- Fujii K, Tanaka Y, Hubcher S, Saito K, Ota T and Eto S (1999) **Cross-linking of CD44 on rheumatoid synovial cells up-regulates VCAM-1.** *J Immunol* **162**: 2391-2398.
- Fukas F, Mashimo M, Akiyama K, Goto T, Tanuma S and Katayama T ( 1998) **Modulation of apoptotic cell death by extracellular matrix proteins and a fibronectin-derived antiadhesive peptide.** *Exp Cell Res* **242** : 92-99.
- Fuss FK (1992) **Principles and mechanisms of automatic rotation during terminal extension in the human knee joint.** *J Anat* **180**: 297-304.
- Grant GM, Cobb JK, Castillo B and Klebe RJ (1996) **Regulation of matrix metalloproteinase following cellular transformation.** *J Cell Physiol* **167** : 177-183.
- Hirsch MS, Lunstord LE, Trinkaus-Randall V and Suobodakk (1997) **Chondrocyte survival and differentiation in situ are integrin mediate.** *Dev Dyn* **210** : 249-263.
- Huhtala P, Humphries MJ, Mc Carthy JB, Tremble PM, Werb Z and Damsk CH (1995) **Cooperative signaling by  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin.** *J Cell Biol* **129** (3) :867-879.



- Hynes R (1985) **Molecular biology of fibronectin.** *Ann Rev Cell Biol* 1 :67-90.
- Hynes RO (1987) **Integrins: A family of cell surface receptors.** *Cell* 48: 549-554.
- Keun LS et al. (1997) **Laminin chain expression by chick chondrocytes and mouse cartilaginous tissues *in vivo* and *in vitro*.** *Exp Cell Res* 236:212-222
- Kheradmand F, Werner E, Tremble P, Symon S and Werb Z (1998) **Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change.** *Science* 8 may: 898-902.
- Kim LT and Yamada KM (1995) **The regulation of expression of integrin receptors.** *Proc Soc Exp Biol Med* 214: 123-131.
- Lacy BE (1987) **The hyaluronate receptor is associated with actin filaments.** *J Cell Biol* 105:1395-1404.
- Larsen W. (1997) **Human Embryology.** Churchill Livington New York 512pp.
- Lee KKH, et al., (1999) **gas2 is a multifunctional gene involved in the regulation of apoptosis and chondrogenesis in the developing mouse limb.** *Dev Biol* 207 :14-25.
- Loeser RF, Carlson and Mc Gee MP (1994) **Expression of  $\beta 1$  integrins by culture articular chondrocytes and in osteoarthritic cartilage.** *Exp Cell Res* 217 (2) : 248-257.
- Lu TW and O'Connor JJ (1996) **Lines of action and moment arms of the major force-bearing structures crossing the human knee joint: comparison between theory and experiment.** *J Anat* 189:575-585.
- Mackie EJ, Thesleff I and Chiquet-Ehrismann R (1987) **Tenascin is associated with chondrogenic and osteogenic differentiation *in vivo* and promotes chondrogenesis *in vitro*.** *J Cell Biol* 105 (6):2569-2579.
- Mackie EJ and Ramsey S (1996) **Expression of tenascin in joint-associated tissue during development and postnatal growth.** *J Anat* 188:157-165.
- Messner K and Gao J (1998) **The menisci of knee joint. Anatomical and functional characteristic, and a rationale for clinical treatment.** *J Anat* 193: 161-178.
- Mitrovic D (1978) **Development of the diarthrodial joints in the rat embryo.** *Am J Anat* 151:475-486.
- Miyamoto S, Katz Bz, Lafrenie RM and Yamada KM (1998) **Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling and morphogenesis.** *Ann N Y Acad Sci* 857: 119-129.
- Morrison EH, Bayliss KM, Ferguson MW and Archer CW (1993) **Novel articular cartilage structure in the south american opossum, *Monodelphis domestica*.** *J Anat* 182: 321-328.
- Morrison EH, Ferguson MWJ, Bayliss MT and Archer CW (1996) **The development of articular cartilage: I. The spatial and temporal patterns of collagen types.** *J Anat* 189:9-22.
- Mow VC, Holmes MH and Lai WM (1984) **Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage.** *J Biomechanics* 17:377-394.
- Murphy et al. (1993) **Extracellular matrix degradation.** In "Connective Tissue and its heritable disorders" Ed Royce P Steinmann B :287-316 NY; Wiley-Liss.

- Pitsillides AA, Archer CW, Prehm P, Baylis MT and Edwards CW (1995) **Alterations in hyaluronan synthesis during developing joint cavitation.** *J Hist & Cytoch* **43** (3):263-273.
- Ralphs JR and Benjamin M (1994) **The joint capsule: structure, composition, age and disease.** *J Anat* **184**:503-509.
- Romanes GJ (1987) **Conningham. Tratado de Anatomía.** 14a edición. Interamericana. Madrid. 1152pp.
- Rouslahti E and Reed J (1994) **Anchorage dependence, integrins, and apoptosis.** *Cell* **77** : 477-478.
- Sato K, Katagiri K, Hattori S, Tsuji T, Irimura T, Irie S and Katagiri T (1999) **Laminin 5 promote activation and apoptosis of the T cell expressing  $\alpha 3\beta 1$  integrin.** *Exp Cell Res* **247** : 451-460.
- Schwartz MA, (1995) **Integrins: Emerging paradigms of signaling transduction.** *Annu Rev Cell Biol* **11**:549-99.
- Salter DM, (1995) **Chondrocyte heterogeneity: Immunologically defined variation of integrin expression at different sites in human fetal knees .** *J Hist & Cytoch.* **43** (4):447-57.
- Takada Y, Kamata T, Ire A, Puzon-McLaughlin W and Zhang X (1997) **Structural basis of integrin-mediated signal transduction.** *Matrix Biology* **16** :143-151.
- Testiut L y Latarjet (1983) **Tratado de anatomía humana.** España. Salvat editores SA. 9a edición. 472pp.
- Ulla MW and Engvall E (1994) **Laminins.** *Methods in enzymology* **245**: 85-104.
- Ustoa S, Garcíadiego-Cazares D, Vargas C, Chimal-Monroy J, and Díaz de León L (1998) **The spatial pattern on integrins during development of mouse articular cartilage.** *Ann N Y Acad Sci* **857**: 241-244.
- Yamada KM (1991) **Fibronectin and other cell interactive glycoproteins.** in *Cell biology of extracellular matrix.* Second Edition. edited by Elizabeth D. Plenum press. Ney York.
- Yamada KM (1997) **Integrin signaling.** *Matrix Biology* **6** :137-141.

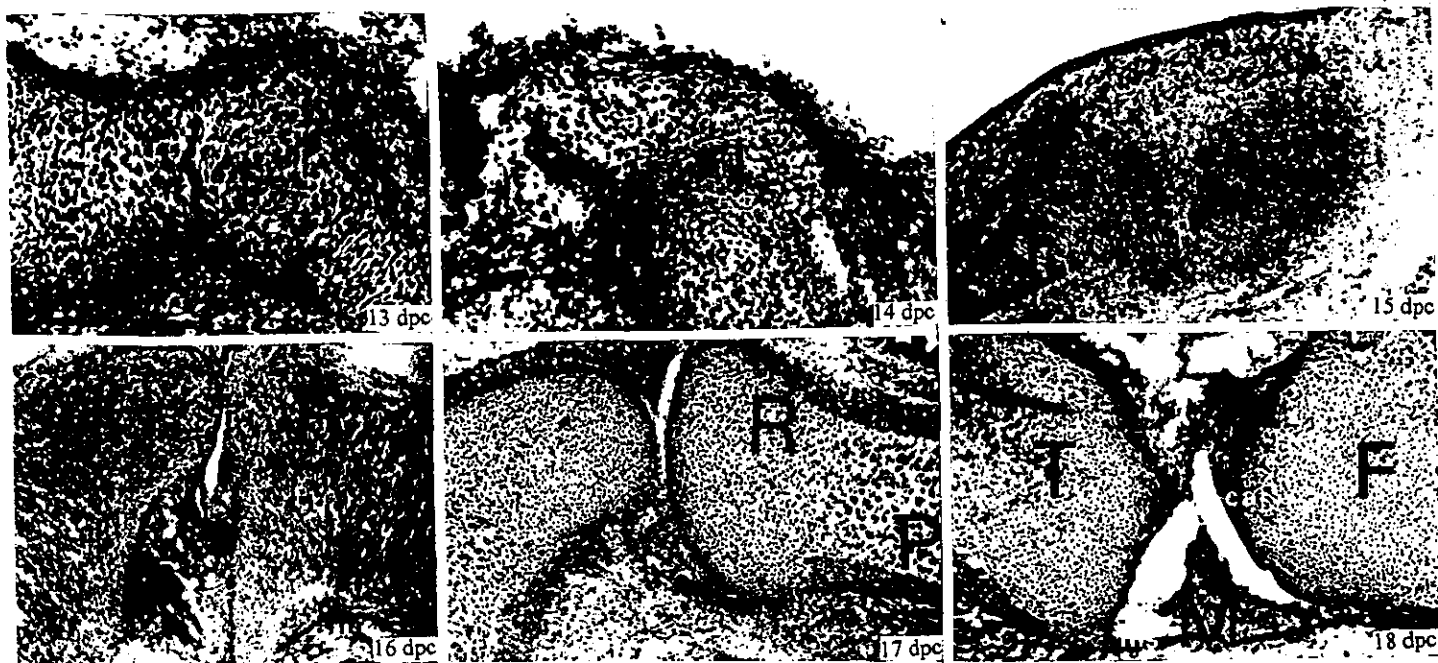


Figura 3

Se observa el desarrollo de la rodilla del ratón en cortes histológicos, a partir de un solo elemento de cartilago (13 dpc) hasta la diferenciación de los elemetos de la rodilla (18 dpc). Interzona (I) a los 14 dpc, presuntivo fémur (F) y presuntiva tibia (T) a los 15 dpc, menisco (M), tendón (t), y fibras musculares (fm) a los 16 dpc, condrocitos en reposo (R) y condrocitos en proliferación (P) a los 16 y 17 dpc y el fémur (F), la tibia (T), menisco (M), membrana sinovial (ms) y cartilago articular (ca) a los 18 dpc. Técnica de Safranina.

**Figura 4a**

**Inmunofluorescencia . Expresión de las subunidades  $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$  y  $\alpha 4$  de los 13, 14 y 15 dpc.  
El recuadro en  $\alpha 1$ , 13 dpc, es el control negativo para las figuras 4a y 4b.**

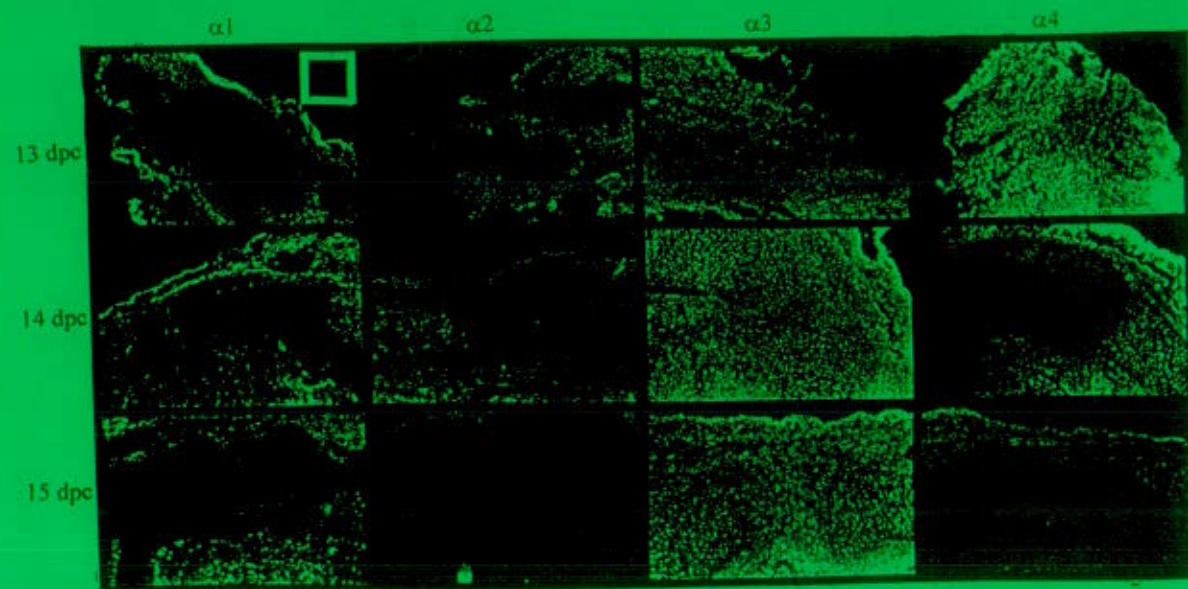
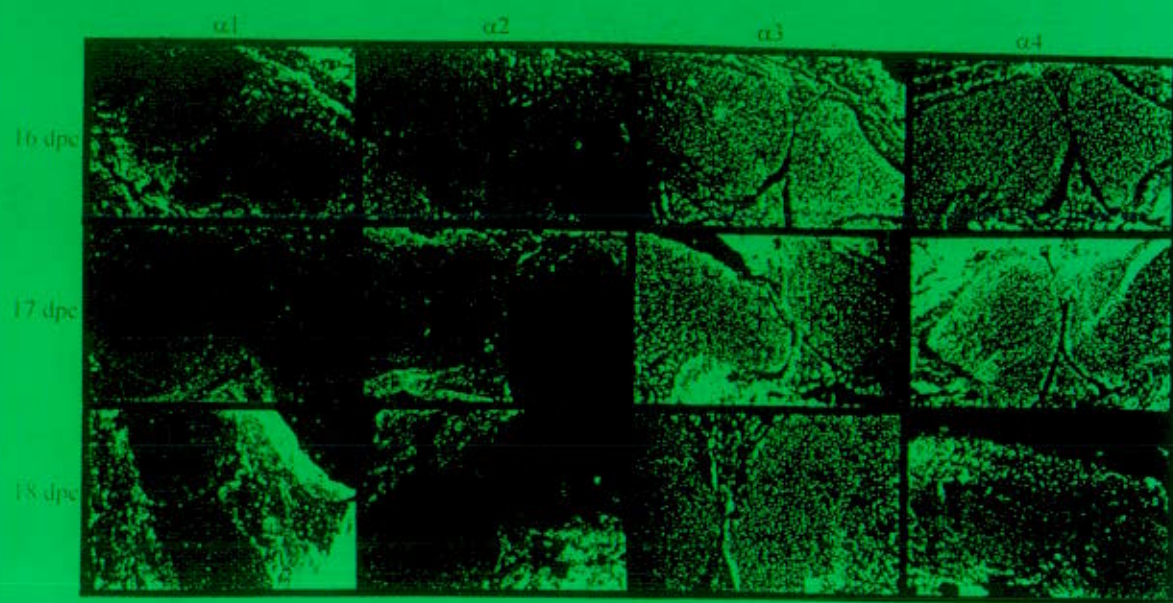


Figura 4b

Inmunofluorescencia. Expresión de las subunidades  $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$  y  $\alpha 4$  a los 16, 17 y 18 dpc.



# Elementos de la rodilla

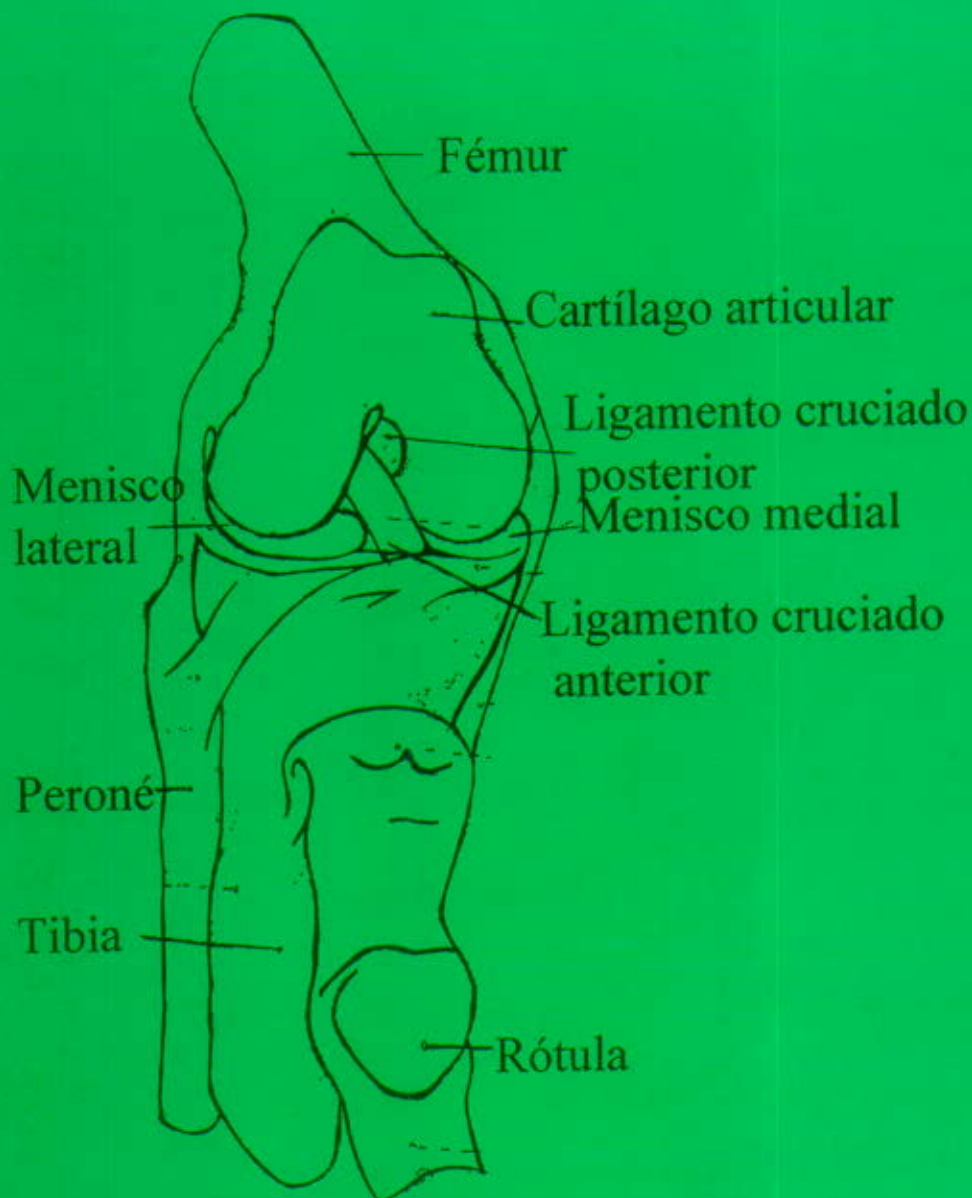
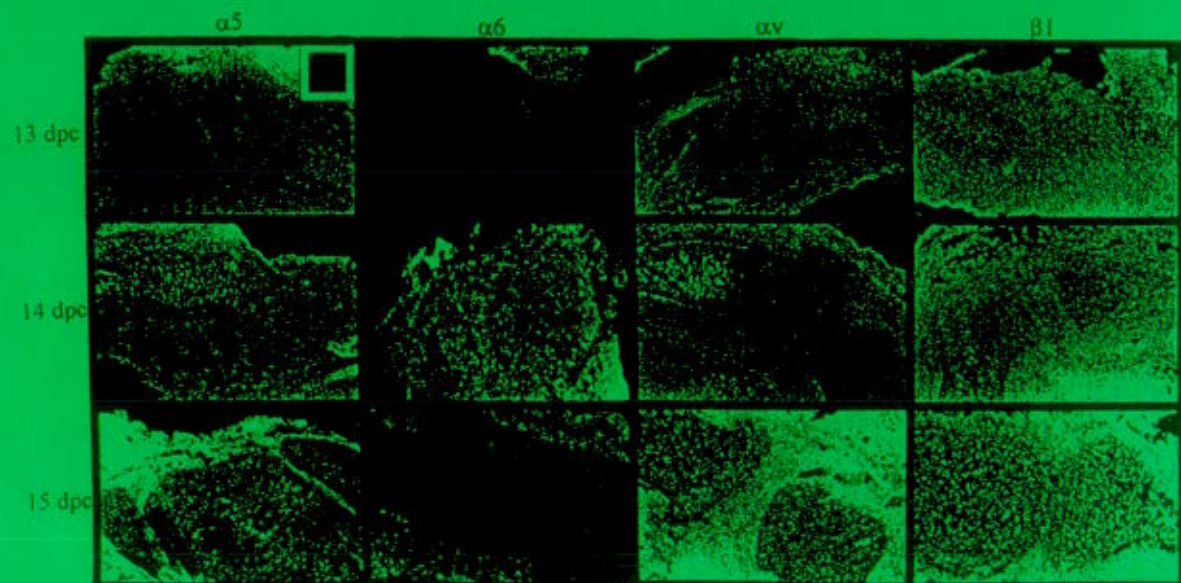


Figura 1



Figura 5a

Inmunofluorescencia. Expresión de las subunidades  $\alpha 5, \alpha 6, \alpha v$  y  $\beta 1$  a los 13, 14 y 15 dpc. El recuadro en  $\alpha 5$ , 13 dpc es el control negativo para las figuras 5a y 5b.



**Figura 5b**

**Imunofluorescencia. Expresión de las subunidades  $\alpha 5, \alpha 6, \alpha v$  y  $\beta 1$  a los 16, 17 y 18 dpc.**

