



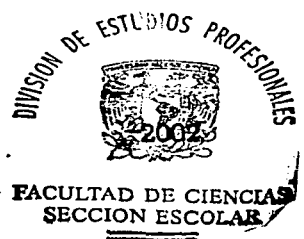
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"FUNCIONES ANTAGONICAS DE FGF8 Y ACIDO RETINOICO EN LA ACTIVACION DE LA MUERTE CELULAR INTERDIGITAL EN LA EXTREMIDAD EN DESARROLLO DEL RATON"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
ROCIO ENRIQUETA HERNANDEZ MARTINEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS FERNANDO COVARRUBIAS ROBLES





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 MEXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Funciones antagonicas de FGF8 y ácido retinoico en la activación de la muerte celular interdigital en la extremidad en desarrollo del ratón"

realizado por

Rocío Enriqueta Hernández Martínez

con número de cuenta 09515028-2 , quién cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles

Luis Covarrubias

Propietario

Propietario Dra. Martha Verónica Vázquez Laslop

Martha Verónica Vázquez Laslop

Propietario Biol. David Garcíadiego Cázares

David Garcíadiego Cázares

Suplente Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo

Patricia Ileana Joseph Bravo

Suplente Dra. Verónica Mercedes Narváez Padilla

Verónica Mercedes Narváez Padilla

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

Eberto Novelo Maldonado

Dr. Eberto Novelo Maldonado



DEPARTAMENTO DE BIOLÓGIA

*La memoria guardará lo que vale la pena. La memoria sabe de mí más que yo; y ella no
pierde lo que merece ser salvado.*

E. Galeano.

Dedicada a

Enrique, porque la cotidumbre de tu vida ha sido mi mejor ejemplo.

Elsy por el cariño, el apoyo y la confianza otorgados.

Julia M. gracias por la gran motivación para seguir, porque tu espíritu decisivo siempre me ha mostrado algo.

José H., por la libertad brindada, símbolo de una gran confianza.

Julia, Erick, Iván porque hemos podido superar las grandes diferencias y tenido grandes momentos.

A Grego, Jocabed y Lucero, sus ocurrencias han sido muy divertidas.

Gregorio H. gracias siempre has mostrado un gran interés y aprecio.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Covarrubias Robles por la dirección y el apoyo otorgado en la realización de este trabajo.

Al comité evaluador por las sugerencias emitidas para mejorar esta tesis.

A la Dra. Patricia Joseph Bravo por el interés mostrado hacia sus alumnos cuando se desempeñó como coordinadora del taller.

Al Biol. Rodrigo Cuervo González por los comentarios, la asesoría teórica y experimental.

A Kasia, Arlene, Argel, Eugenio, Angel, Blanca, Gregorio, Carlos, Ulises, Perla, Evelyn, Christian y Antonio por la confianza, por haber establecido un vínculo afectivo conmigo.

A los compañeros del laboratorio que han hecho más agradable mi estancia en el mismo, en especial a David, Louis, Rodrigo, Manuel, Leoncio, Jesús y Conchita.

A todos los que me ayudaron a solucionar problemas técnicos y conceptuales.

A Elizabeth Mata de la unidad del bioterio por el cuidado y suministro de los animales.

A Carmen Muñoz y Graciela Blancas por el suministro de material y el mantenimiento del lugar de trabajo.

A los programas PAEA y PROBETEL y a DGAPA por el apoyo económico brindado durante la realización de esta tesis.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Biología del Desarrollo del Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología, UNAM. Bajo la dirección del Dr. Luis Covarrubias Robles y con el apoyo de DGAPA/UNAM (IN- 210600) y CONACYT (31730-N).

CONTENIDO

Introducción

1. La muerte celular.....	2
2. El control genético de la apoptosis.....	3
3. Las funciones de la muerte celular en el desarrollo embrionario	5
4. El desarrollo de las extremidades.....	7
4a) La Cresta Ectodérmica Apical (CEA), los Factores de Crecimiento de Fibroblasto y el crecimiento próximo -distal.....	8
4b) El ectodermo y la polaridad dorso-ventral.....	10
4c) La Zona de Actividad Polarizante (ZAP) y la polaridad antero-posterior.....	11
5. El crecimiento de la extremidad.....	13

Antecedentes

1. La muerte celular en el desarrollo de las extremidades.....	15
2. La regulación de la MCP por el epitelio.....	20
3. El ácido retinóico (AR) y su participación en la muerte celular.....	22

<u>Justificación</u>	27
----------------------------	----

<u>Hipótesis</u>	28
------------------------	----

<u>Objetivos generales y particulares</u>	29
---	----

<u>Materiales y Métodos</u>	30
-----------------------------------	----

<u>Resultados</u>	41
-------------------------	----

<u>Discusión</u>	50
------------------------	----

<u>Conclusiones</u>	57
---------------------------	----

<u>Perspectivas</u>	58
---------------------------	----

<u>Referencias</u>	59
--------------------------	----

<u>Apéndice</u>	71
-----------------------	----

INTRODUCCIÓN

La muerte celular.

Los animales multicelulares a menudo necesitan deshacerse de células que están en exceso durante la embriogénesis, la metamorfosis y el recambio de tejidos, así como de células que potencialmente podrían ser peligrosas. Para este fin, utilizan un delicado mecanismo molecular, tan importante como el que controla la división celular, la diferenciación, y la migración celular. La muerte celular permite al organismo tener un fuerte control del número celular, del tamaño de los tejidos y lo utiliza también para protegerse de células que amenazan la homeostasis. Cuando este proceso ocurre de forma predecible en tiempo y lugar definido durante el desarrollo en ambas clases de organismos vertebrados e invertebrados se ha llamado la Muerte Celular Programada (MCP). Además de su papel en el desarrollo embrionario normal, la muerte celular puede ser importante en una gran variedad de procesos normales y patológicos, incluyendo las enfermedades de Alzheimer y de Huntington (Chen y Zhao, 1998).

El término de apoptosis fue originalmente introducido como una forma de MCP (Kerr *et al.*, 1972). Aunque las definiciones originales de los términos MCP y apoptosis son diferentes, anteriormente se les consideró como sinónimas. El proceso apoptótico se refiere a una descripción bioquímica y morfológica de la MCP. La célula que muere por apoptosis se caracteriza inicialmente porque adquiere una forma redondeada y se separa de las células contiguas. A nivel del núcleo, la cromatina se compacta formando "masas", aparentemente de mayor densidad que incrementan en número hasta que el núcleo está totalmente picnótico (Clarke, 1990). La membrana celular presenta numerosas ondulaciones, que se internalizan profundamente en el citoplasma. Eventualmente las células apoptóticas llegan a fragmentarse en piezas rodeadas por membrana que se conocen como los "cuerpos apoptóticos", quienes son engullidos por células fagocíticas vecinas (Steller, 1995). Durante

la muerte por apoptosis, el contenido celular no es vertido al espacio extracelular y no se genera una respuesta de tipo inflamatoria. A niveles bioquímicos y citoquímicos, se ha visto que la fragmentación del DNA, en las células afectadas es una consecuencia de la activación o la síntesis de *ново* de endonucleasas, las cuales causan el rompimiento internucleosomal del DNA. De allí que se observe por electroforesis en geles un patrón característico en "escalera". Esta fragmentación internucleosomal del DNA, ha llegado a ser una marca clave de la apoptosis, distinguiéndola de la necrosis. Sin embargo, recientemente se ha observado que la apoptosis puede ocurrir en ausencia de actividad de endonucleasas y de fragmentación del DNA (Cohen *et al.*, 1992, Schultze-Osthoff *et al.*, 1994).

De forma general se tienden a marcar los límites entre los procesos de apoptosis y necrosis. Una gran diferencia entre ambos es que la apoptosis es un proceso activo, con el control endógeno de muerte celular involucrando la expresión de un conjunto específico de genes, mientras la necrosis es un proceso pasivo e involucra lisis celular causada por agentes externos (Kerr *et al.*, 1972). En condiciones naturales la vía más estudiada de muerte es la apoptosis; solo en casos extremos de daño celular se observa el proceso de necrosis. A pesar de las diferencias establecidas entre éstos dos procesos, otros estudios han identificado la existencia de estados intermedios, por lo que los límites entre ambos no son muy claros y se ha tenido que considerar que no toda la MCP ocurre por apoptosis.

El control genético de la apoptosis.

En años recientes se ha generado una gran cantidad de evidencias que favorecen la idea de la apoptosis como un proceso activo, regulado a nivel genético. Debido a que el control del proceso parece estar ampliamente conservado en la evolución (Martín y Green, 1995) se ha obtenido mucha información en diferentes modelos animales sobre los mecanismos genéticos que la controlan.

La muerte celular se ha dividido en cuatro fases: a) la fase de activación, en donde se determina si la célula va a morir o si seguirá algún otro proceso como proliferar o diferenciarse; b) la fase de ejecución, que lleva a que la célula presente los cambios característicos descritos anteriormente; c) la fase de engullimiento en la que los fragmentos de la célula en proceso de muerte son fagocitados y d) la fase de degradación, en donde los fragmentos son degradados dentro de la célula que los fagocitó (Steller, 1995).

Existen algunos genes cuya expresión se ha asociado a las diferentes etapas del proceso apoptótico. Los primeros genes directamente ligados a la apoptosis fueron identificados en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* y comprenden una ruta de 11 miembros que se agrupan en cuatro categorías: a) genes relacionados con la activación (*ces1* y *ces2*); b) genes involucrados en matar células (*ced-3*, *ced-4* y *ced-9*); c) genes que controlan la fagocitosis de células muertas por células vecinas (*ced-1*, *ced-2*, *ced-5-8* y *ced-10*) y d) un gen que funciona para degradar las células engullidas (*nuc-1*). De éstos *ced-3* y *ced-4* son esenciales para ejecutar la muerte celular, mientras *ced-9* protege a las células de la MCP. Los productos de los genes *ced-3* y *ced-4* son celularmente autónomos, es decir, su expresión causa muerte celular. Las mutaciones que inactivan cualquiera de éstos genes impiden la muerte en células que de otra forma morirían normalmente durante el desarrollo (Ellis y Horvitz, 1986). En los vertebrados, se han identificado tres familias de genes que juegan un papel central en la ruta apoptótica: la familia de las caspasas, la familia del proto-oncogen Bcl-2 y la familia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y sus receptores (Nagata y Golstein, 1995). El producto genético de *ced-3*, es una caspasa e induce apoptosis cuando es transfectada en fibroblastos de rata (Miura *et al.*, 1993). A diferencia de *ced-3*, la sobreexpresión de *Bcl-2* ó *Bcl-xl*, los homólogos en mamífero de *ced-9*, inhiben la muerte celular tanto en células de vertebrados como en *C. elegans* (García *et al.*, 1992, Vaux *et al.*, 1992) lo cual indica que éstas funciones genéticas están altamente conservadas en el control de la muerte celular. Otros genes similares a *Bcl-2*, que inducen muerte celular cuando se sobreexpresan son *Bax* y *Bak*.

Una gran variedad de señales pueden modular la opción de iniciar o reprimir la activación de la MCP. Incluso una misma señal puede tener efectos opuestos dependiendo del tipo celular blanco y de las condiciones ambientales e intracelulares (Zakeri *et al.*, 1994). La ruta que activa la respuesta apoptótica no es la misma en todos los casos. Por ejemplo, en células de mamíferos, el receptor de Fas participa en una ruta que lleva hacia la apoptosis, en cambio, el supresor de tumores p53 y el producto del proto-oncogene *c-myc* parecen inducir apoptosis a partir de distintas rutas intracelulares.

Las funciones de la muerte celular en el desarrollo embrionario.

A mediados del siglo antepasado, poco después del descubrimiento de que los organismos estaban formados por células, se descubrió que la muerte celular se presenta durante el desarrollo de los animales, tanto en vertebrados como en invertebrados (Glucksmann, 1951). Algunos autores de principios del siglo XX encontraron difícil de aceptar la idea de que algunas células mueren normalmente durante la embriogénesis, particularmente en las regiones que proliferan abundantemente.

En la mayoría de los tejidos estudiados se ha observado la presencia de muerte celular en alguna etapa de su desarrollo (Glucksmann, 1951; Ilies, 1969). En embriones de vertebrados, la MCP ocurre en muchos órganos y tejidos en desarrollo, incluyendo el corazón, el riñón, los ojos, la cresta neural, la cola, las somitas, los arcos branquiales y en la extremidad. La muerte celular en la extremidad representa uno de los ejemplos clásicos en donde ocurre MCP y constituye también, uno de los sistemas mejor caracterizados para estudiar las bases moleculares de la morfogénesis en vertebrados. A partir de los estudios desarrollados en la extremidad, está claro que muchos de los mecanismos que regulan su patrón de desarrollo son semejantes a los que se presentan durante la formación de otros órganos y estructuras embrionarias.

La MCP parece tener varias funciones durante el desarrollo embrionario. Algunos autores han clasificado dichas funciones de la siguiente manera:

- 1) Moldeo de estructuras o formas. La MCP es importante para dar forma a diferentes órganos y estructuras en el desarrollo tal como ocurre durante la individualización de los dígitos; la fusión de placas que dan lugar a estructuras como el esternón (Saunders, 1966) y el paladar (Glucksmann, 1951); el proceso de cavitación para la formación de la coquedad preamniótica en los embriones de ratón (Coucovanis y Martín, 1995).
- 2) Eliminación de estructuras transitorias. En el desarrollo de algunos organismos existen estructuras transitorias que no son necesarias en una etapa, por lo que son eliminadas conforme avanza el desarrollo. Por ejemplo, la regresión de la cola y las branquias en la metamorfosis en los anfibios (Tata, 1994) ó la regresión de los túbulos mesonéfricos en los mamíferos (Gilbert, 1998).
- 3) Control del número de células. Existen órganos en los cuales se produce una gran cantidad de células y posteriormente se reduce el número por muerte celular. En el caso del sistema nervioso, aproximadamente el 50% de las células que se producen son eliminadas (Barde, 1989; Oppenheim, 1991).
- 4) Eliminación de células anormales, mal ubicadas, no funcionales o dañinas. Es importante eliminar células que podrían resultar potencialmente peligrosas para el organismo; esto se produce durante el desarrollo del sistema inmune, en donde se eliminan las células que potencialmente podrían generar reacciones auto-inmunes (Golstein, 1989).
- 5) Producción de células diferenciadas sin organelos. Existen algunos tipos celulares en los que las células mueren en la diferenciación terminal, como es el caso de los queratinocitos. En ellos la presencia de *Bcl-2* inhibe su diferenciación terminal *in vitro* (Nataraj *et al.*, 1994).

Se desconocen los mecanismos que seleccionan que células son eliminadas por MCP y cuales sobreviven durante el desarrollo embrionario. Existe una gran variedad de factores que participan en la activación de la MCP (Steller, 1995). Cuando a las células animales incluyendo a las células embrionarias se les aplican inhibidores de proteína-quinasas, calcio/fosfolípido dependientes (estaurosporina) e inhibidores de la síntesis de proteínas (cicloheximida) simultáneamente, se expresa constitutivamente la maquinaria requerida para que se lleve a cabo la muerte celular (Ishizaki *et al.*, 1995; Weil *et al.*, 1996), por lo que en un principio, la muerte parece ser el destino automático de las células. Estos datos sugieren que las células vivas requieren de factores de sobrevivencia que se contrapongan a la maquinaria de muerte, que se encuentra en estado latente. Trabajos recientes indican que la MCP es regulada en la fase de activación del proceso por señales que provienen de otras células. Los tipos de señales propuestas son: a) señales activadoras que inician el programa de muerte, como sería el caso del factor de necrosis tumoral (TNF) (Wong *et al.*, 1989); b) señales supresoras de la MCP, como el factor de crecimiento neural (NGF), que lo secretan las células blanco en cantidades limitantes y sólo las neuronas simpáticas que hacen contacto con sus células blanco pueden sobrevivir (Levi-Montecini, 1987).

Aún se desconocen la mayoría de las señales que regulan la muerte durante el desarrollo de los diferentes tejidos embrionarios. Sin embargo, se propone que la muerte o la sobrevivencia de una célula va a depender probablemente de la concentración y la combinación de las señales que activan y/o reprimen la muerte celular (Jacobson *et al.*, 1997).

El desarrollo de las extremidades.

La extremidad embrionaria del vertebrado se desarrolla en los lugares apropiados a partir de pares de yemas que aparecen en la superficie lateral a lo largo del eje antero-posterior del cuerpo. En los primeros estadios, es una estructura sencilla que consiste de un conjunto de células mesodérmicas indiferenciadas cubiertas por una bolsa ectodérmica. Las

sorprendente encontrar que una sola proteína podía sustituir su función. Cuando se elimina la CEA en estados tempranos de desarrollo y se aplican esferas impregnadas en FGF2, FGF4, FGF6, FGF7 ó FGF10 al mesénquima de la yema de la extremidad, las extremidades que subsecuentemente se forman son esencialmente normales (Niswander *et al.*, 1993, Fallon *et al.*, 1994).

De los diecisiete FGFs conocidos, cuatro (*Fgf2, Fgf4, Fgf8 y Fgf9*) se expresan en la CEA en ratón y en el pollo. Otros dos se expresan en el mesénquima que reside debajo de la CEA (*Fgf2 y Fgf10*) (Martín, 1998). Se cree que todos los FGFs contribuyen a la función de la CEA ya sea directa o indirectamente. Los FGF constituyen una familia de moléculas de señalización que promueven el crecimiento, la diferenciación, la sobrevivencia y la motilidad de células de diversos orígenes. Todos los miembros de esta familia codifican polipéptidos de 155 a 268 aminoácidos y muestran una región conservada de 120 aminoácidos que les confiere una estructura terciaria común que les permite unir heparina o proteoglicanos de heparan sulfato. Sin embargo, difieren en las regiones amino y carboxilo terminal. Muchas de éstas proteínas son ligandos secretables, que al ser liberados por las células que los sintetizan se unen a diferentes proteoglicanos (sindecanos, glipicanos y perlecanos) que se encuentran en la superficie celular y en la matriz extracelular. Esta unión restringe su capacidad para difundir lejos de las células que los producen y también facilita la transducción de señales por oligomerizarlos y presentarlos a receptores de alta afinidad. Los receptores son proteínas transmembranales del tipo tirosina cinasas, que forman parte de la vía de transducción de señales dependiente de RAS. Son cuatro los genes en mamíferos que codifican para la familia de receptores a FGF, cada uno es capaz de producir una variedad de isoformas a través de procesamiento alternativo; también se han identificado receptores de baja afinidad. Por otra parte existe evidencia de que muchos ligandos son capaces de interactuar con más de un receptor a FGF (Martín, 1998).

Aunque todos los genes expresados en la CEA podrían contribuir a su función, estudios recientes muestran que embriones homócigos nulos de *Fgf2* y *Fgf9* tienen extremidades normales. Estos resultados indican que ninguno de los genes anteriores es requerido para la formación normal de la extremidad, pero no excluye la posibilidad de que ambos realicen funciones que son redundantes con aquellas de otros genes de *Fgf* expresados en la yema de la extremidad (Martín, 1998). Los embriones homócigos nulos para *Fgf4* y *Fgf8* mueren antes de que se formen las extremidades, por lo que no se había podido determinar un requerimiento de éstos genes. Sin embargo, el problema de letalidad temprana de los embriones mutantes de *Fgf4* y *Fgf8* se ha solucionado con la creación de mutantes tejido-específicos. Los mutantes tejido-específicos de *Fgf4* presentan extremidades normales, se observa también que el ARN mensajero de este gen se restringe a la parte posterior de la CEA, datos que apuntan a que probablemente *Fgf4* no esté participando en el desarrollo de la extremidad (Moon *et al.*, 2000). En cambio, los mutantes tejido-específicos para *Fgf8* presentan anomalías como la pérdida de los dígitos en las extremidades delanteras y traseras. Por otra parte, el ARN mensajero de *Fgf8* es muy abundante desde que la CEA es morfológicamente distinguible hasta su regresión. Estas evidencias indican que la función de *Fgf8* en la CEA es necesaria y quizá la más importante para el desarrollo normal de la extremidad (Martín, 1998).

b) El ectodermo y la polaridad dorso-ventral.

Los experimentos en que se rota 180° el ectodermo que no constituye la CEA provocan que se revierta la polaridad dorso-ventral. Esto llevó a postular la existencia de señales provenientes del ectodermo que regulan el desarrollo de este eje. Posteriormente se observó que el ectodermo secreta el factor codificado por el gen *Wnt-7a* quien se expresa en el ectodermo dorsal y controla la expresión mesenquimal dorsal del factor, LMX-1. Por otra parte se requiere la expresión del gen *Engrailed (En-1)* en el ectodermo ventral para la

especificación de destinos ventrales en la extremidad (Cygán *et al.*, 1997, Logan *et al.*, 1997, Loomis *et al.*, 1998).

c) La Zona de Actividad Polarizante (ZAP) y la polaridad antero-posterior.

Las extremidades del vertebrado a lo largo del eje antero-posterior no son iguales. Las diferentes longitudes, formas y funciones de los dígitos son claros ejemplos de las implicaciones de la organización antero-posterior. Cuando una ZAP se injerta en la región lateral anterior de una extremidad hospedera se presentan duplicaciones tipo imagen en el espejo. Esto indica que la ZAP genera señales que regulan el patrón de la extremidad a lo largo del eje antero-posterior. La actividad de la ZAP fue inicialmente interpretada en términos de un gradiente de morfógeno que difunde a través de la extremidad para determinar el patrón en una forma dependiente de la concentración. En 1993, se mostró que la actividad polarizante de la ZAP es mediada por Sonic hedgehog (*Shh*) (Riddle *et al.*, 1993, Chang *et al.*, 1994, López-Martínez *et al.*, 1995). Este gen codifica para un factor secretable homólogo al producto del gen *hedgehog* (*hh*) que asigna la polaridad a los segmentos en el embrión de *Drosophila*. En el embrión de pollo, la expresión de *Shh* se detecta poco después de que se ha inducido la yema de la extremidad y colocalizando con la ZAP. En el ratón y otros vertebrados se observa un patrón semejante (Echelard *et al.*, 1993, Krauss *et al.*, 1993, Roelink *et al.*, 1994). Se había observado previamente que el ácido retinoico (AR) era capaz de inducir duplicaciones similares a las producidas por la transplatación de una ZAP al margen anterior de la extremidad (Tickle *et al.*, 1982), sin embargo, este efecto parece ser mediado por *Shh*.

La actividad de *Shh* se requiere para que prosiga el crecimiento y para que se formen correctamente las estructuras intermedias y distales de la extremidad. Los ratones que son nulos para *Shh* tienen extremidades reducidas y el esqueleto óseo se encuentra severamente

perturbado, las estructuras intermedias están completamente fusionadas y el autópodo se halla casi completamente ausente (Chiang *et al.*, 1996, Kraus *et al.*, 2001).

No se conoce en detalle como es que *Shh* funciona en la ZAP y su papel como un morfógeno sigue siendo cuestionado. Aunque el producto genético de *Shh* es capaz de realizar la actividad de la ZAP es poco probable que sea el determinante de la información posicional de las células en la yema de la extremidad. Existen evidencias que indican que SHH no difunde a larga distancia *in vivo* y su forma unida a la membrana es responsable de las respuestas dependientes de la concentración, lo cual sugiere que al menos parte de las actividades organizadoras de *Shh* son mediadas por señales secundarias (Yang *et al.*, 1997). El ARN mensajero de *Bmp-2* se expresa en un patrón que sobrelapa el dominio de expresión de *Shh*. Las células que expresan *Bmp-2* pueden inducir duplicaciones en las regiones medias. Esto sugiere que BMP-2 podría, al menos en parte, mediar la señalización de *Shh* en la extremidad (Cohn y Bright 1999).

La expresión específica de *Shh* en la ZAP está controlada por algunas moléculas. Una de ellas, el producto de *Hoxb8* (un miembro del grupo de los genes Hox), se piensa es el primer gen que responde a AR y que posteriormente induce la expresión de *Shh*. Otras señales provienen de la CEA; los FGFs y el el producto del gen *Wnt-7a* que secreta el ectodermo parecen también delimitar la expresión de *Shh*.

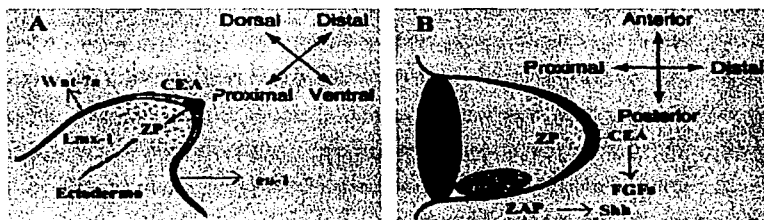


Figura 1. Centros de señalización en el desarrollo de la extremidad. La figura A representa la polaridad dorso-ventral y las moléculas de señalización que secreta el ectodermo para el establecimiento de este eje. En la figura B se observan los otros dos centros de señalización: la ZAP que secreta Shh y la CEA en la que señalizan los FGFs (ver en el texto las siglas). Tomado de Schwabe *et al.*, 1998.

El crecimiento de la extremidad.

Existen interacciones reguladoras entre los diferentes centros de señalización y sus productos trabajan cooperativamente para coordinar y establecer el crecimiento de la extremidad y su patrón a lo largo de los tres ejes. Estas señales actúan sobre la población de células de la ZP, las cuales proliferan produciendo el crecimiento de la extremidad; algunas de las células que quedan detrás o proximales a la ZP no se exponen por mucho tiempo a las señales producidas por la CEA y detienen su proliferación. Al crecer la yema de la extremidad, las células mesenquimales se agregan en la parte proximal de la yema para formar los elementos cartilagosos del futuro esqueleto definitivo, mientras que las células en la parte distal que se encuentran directamente bajo la influencia de la CEA permanecen indiferenciadas (Martín, 1998). Este proceso resulta en una diferenciación secuencial a lo largo del eje próximo-distal de los elementos de la extremidad. El estilópodo (húmero/ fémur) se forma primero, después el zeugópodo (radio-ulna/ tibia-fibula) y al último el autópodo (carpos/ tarsos y falanges) (Chen y Zhao, 1998).

El modelo anterior propone que el tiempo de salida de las células de la ZP determina el destino celular. El tiempo invertido en la ZP puede ser medido en términos del número de divisiones que una célula ha sufrido o quizá en relación a un reloj molecular basado en la cantidad final de señales derivadas de la CEA. Mientras las células están en la ZP reciben las señales que confieren información posicional antero-posterior y dorso-ventral, lo cual ayuda a determinar precisamente que estructuras se forman (Martín, 1998). Sin embargo, otros estudios sugieren que el programa genético completo de distalización no se requiere para el desarrollo proximal, ya que la yema de la extremidad está claramente dividida en territorios proximales y distales bien definidos.

Mercader y colaboradores de forma reciente propusieron un modelo de cómo se podría estar generando el patrón de la extremidad de pollo a lo largo del eje próximo-distal.

Este proceso involucra al FGF8, al AR y a un par de genes que poseen caja homeo denominados *Meis1* y *2*. El modelo propone que antes de que ocurra la inducción de la yema de la extremidad, la placa lateral del mesodermo sintetiza activamente AR e induce la activación de los genes *Meis1* y *Meis2*, encargados de conferir fenotipos proximales. Posteriormente, una vez que ya ha ocurrido la inducción de la yema de la extremidad, la activación de FGF8 en la CEA estimula la proliferación celular en la yema de la extremidad y reprime la activación del AR ya sea vía su señalización o su síntesis. Esto lleva a la inhibición de la expresión de los genes *Meis1* y *Meis2*. La región más proximal de la yema de la extremidad deberá mantener altos los niveles de AR, para mantener la expresión de ambos genes. Conforme la extremidad crece las células se alejan de la fuente de síntesis del AR y se reprime la expresión de los genes *Meis*, lo que permite que las células adquieran fenotipos distales. Cuando se da la transición de zeugópodo a autópedo ya no se requiere de la señalización de AR, pero el autópedo es sensible a las acciones de AR puesto que las células son eliminadas en las regiones en que se aplica. Si bien no se propone directamente, el modelo de Mercader esta de acuerdo con la idea del desarrollo de la extremidad en dominios proximales y distales separados.

ANTECEDENTES

La muerte celular en el desarrollo de las extremidades.

El proceso morfogenético de la extremidad en el cual estamos interesados en este trabajo es la muerte celular. El papel preciso de la MCP observada en diferentes estados del desarrollo de la extremidad permanece sin definirse (Hinchliffe y Johnson, 1980; Jacobson *et al.*, 1997). En los primordios de las alas del pollo, inicialmente hay muerte celular masiva. Aparece en el mesodermo superficial del extremo anterior de la extremidad y la pared lateral del cuerpo (Hamburguer y Hamilton 1951); ésta región ha sido denominada Zona Necrótica Anterior (ZNA). Posteriormente en otro estadio otras dos regiones empiezan a exhibir muerte celular mesenquimal masiva, la Zona Necrótica Posterior (ZNP) y el Parche Opaco (PO). La ZNP se localiza en la unión posterior y la pared del cuerpo. El PO está localizado entre las dos condensaciones condrogénicas y funciona para separar la ulna del radio o la fibula y la tibia. En estadios posteriores, se observa muerte celular en el mesénquima entre los dígitos en formación. Estas áreas de muerte celular se conocen como Zonas Necróticas Interdigitales (ZNI) y son responsables de separar los dígitos condrogénicos del autópodo del ala o de la pata. Las ZNI se encuentran en todos los amniotas, son extensas en las regiones interdigitales en especies con dígitos libres mientras que son reducidas en las regiones interdigitales con membrana en algunas especies como los patos (Hurle y Colvee, 1982).

**PRINCIPALES REGIONES
DE MUERTE CELULAR DE LA
EXTREMIDAD DE POLLO**

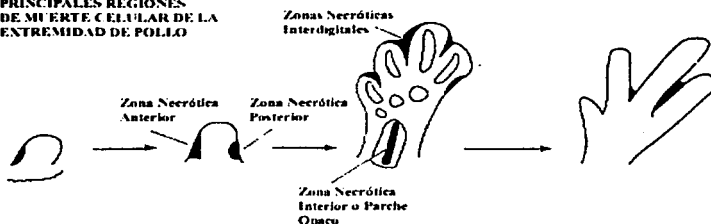


Figura 2. Zonas Necróticas presentes en la extremidad en desarrollo del pollo (tomada de Gilbert, 1998).

Los experimentos clásicos de Saunders y colaboradores demostraron que la muerte celular en la ZNP es indispensable para formar la extremidad del pollo, ya que no se forma un ala normal si se retira este tejido antes de que se produzca la muerte celular; tampoco se desarrolla un ala normal si se impide la muerte celular por la inserción de una pequeña pieza de mesoderma central. Se ha propuesto que la Muerte Celular Interdigital (MCI) es indispensable para el modelamiento de tejidos y para la separación de los dígitos en los amnios (Gilbert, 1997, van der Hoeven *et al.*, 1994); la formación de los dígitos libres también se acompaña de muerte celular masiva en los reptiles (Fallon y Cameron, 1977), las aves (Hinchliffe y Ede, 1973) y los mamíferos (Ballard y Holt, 1968; Zakeri *et al.*, 1994). Además la MCI es menos abundante en especies como el pato que presenta los dígitos unidos por una membrana (Hurle y Colvee, 1982; Pautou, 1973). Sin embargo, Salas-Vidal y colaboradores (2001) reportan que al tiempo en que ocurre la MCI se produce un crecimiento de los dígitos de forma prominente. La contribución que hace el crecimiento de los dígitos a su separación es mayor que la que realiza la MCI. Esta última observación pone en duda el papel que durante tanto tiempo se le ha atribuido a la MCI, por lo que para determinar su importancia se requieren experimentos adicionales. Otros estudios también se requieren para encontrar los mecanismos moleculares que delinean la MCI.

En la yema o primordio de la extremidad del ratón, la MCP puede detectarse en la ZNA en el día 10.5 posterior al coito (*dpc*) y es más obvia en la etapa de 11.5 *dpc* (Lee *et al.*, 1994). Durante esta última etapa también puede observarse muerte celular en la ZNP. Sin embargo, en el ratón, la muerte celular que ocurre en ambas regiones nunca llega a ser tan intensa como en el pollo. La MCI masiva aparece en el estadio 13.5 *dpc* y alcanza un pico a los 14.5*dpc* con la separación de los dígitos. En ambos organismos, la muerte celular en la extremidad presenta características apoptóticas, tales como la presencia de condensación nuclear y fragmentación internucleosomal del DNA en la células muertas, aunque se requieren de más estudios que verifiquen que la MCI es efectivamente un proceso apoptótico. El nombre de zonas necróticas se ha conservado por razones históricas.

El haber observado ratones mutantes con sindactilia y extremidades con interdígitos presentes, en las cuales la muerte celular parece no haber ocurrido, llevaron a suponer la existencia de un control genético de la muerte celular en la extremidades en desarrollo. Esto se ha demostrado al analizar mutantes espontáneos del pollo y del ratón con anomalías en las extremidades. Por ejemplo, el mutante del pollo *Talpid* se caracteriza por poseer extremidades con 8 dígitos ó más (polidactilia). En éstos mutantes no se presentan ni la ZNA ni la ZNP. En contraste, existe muerte celular precoz y anormalmente extensa, en la ZNA del mutante denominado *Wingless*, lo que lleva a la ausencia de los dígitos (Hinchliffe y Ede, 1973). En el ratón mutante *Hammertoe*, la apoptosis interdigital se encuentra suprimida entre los dígitos 2 y 5 lo que produce sindactilia de tejido suave en las extremidades delanteras y traseras (Zakeri *et al*, 1994). Aunque muchas de las mutaciones específicas responsables del fenómeno de la sindactilia están por ser determinadas, recientemente se ha revelado que el ratón con sindactilia *extra-toes* tiene una mutación en el gen *Gli3* que codifica para un factor transcripcional.

Cuando se administran ciertos factores exógenos a embriones de pollo o de ratón se puede inducir sindactilia o polidactilia. Los efectos correlacionan con la ausencia de muerte celular en las regiones interdigitales y/o el mesénquima preaxial, aunque los mecanismos que lo delinean son completamente desconocidos. La 5- Bromodeoxiuridina (Brd-U), un análogo de la timidina, suprime la MCI y causa sindactilia en las extremidades del pollo. La supresión de la MCI por drogas exógenas se acompaña algunas veces de la presencia de cartilagos ectópicos interdigitales (Chen y Zhao, 1998).

El desarrollo de la extremidad se puede describir de acuerdo a los cambios en su morfología. Una definición de los diferentes estadios de acuerdo a la morfología fue propuesta por Wanek (*et al.*, 1989). Salas-Vidal y colaboradores (2001) analizaron la MCI en el ratón en los estadios definidos por Wanek y colaboradores; esto se muestra en la Figura 3. Para los propósitos de este estudio sólo se hará referencia a los cambios morfológicos y la progresión de la MCI en algunos estadios. En el estadio 7 (S7), el contorno de la extremidad de ser homogéneo cambia a una forma irregular, los interdígitos empieza a observarse entre los dígitos 2-3 y 3-4. En el estadio 8 (S8) se pueden distinguir las indentaciones entre los 5 dígitos y las regiones interdigitales son prominentes. Esta morfología es similar a la que se observa en la extremidad en el estadio 9(S9), y presenta un aplanamiento en la parte ventral y un ligero curvamiento en la parte dorsal. En este estadio inicia la MCI de forma ligera en el mesénquima más distal, delineando el ectodermo apical inmediato de las regiones interdigitales. Para el estadio 10 (S10) la MCI se expande y alcanza un pico de intensidad. Los siguientes estadios tales como S11 y S12 marcan la disminución y final de la MCI. Las indentaciones se hacen más prominentes debido a la desaparición de las membranas interdigitales. Un aspecto importante derivado de este estudio es que la MCI se produce en un gradiente distal-proximal.

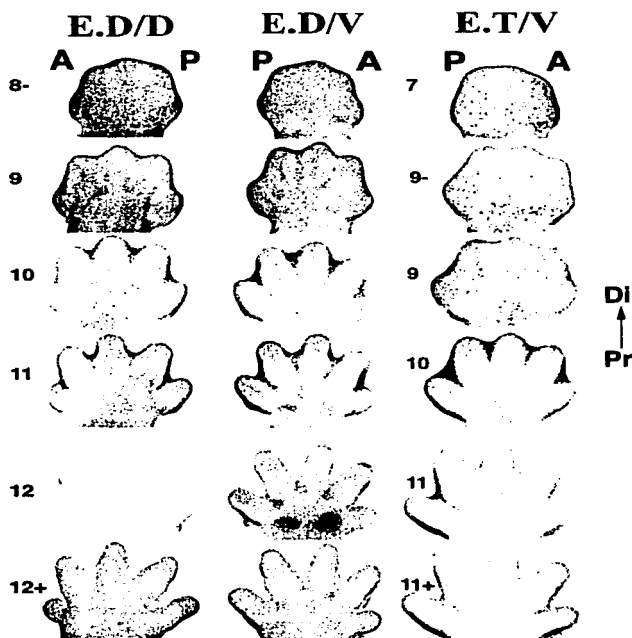


Figura 3. Diferentes estadios de desarrollo de la extremidad y progresión de la MCI. La clasificación en estadios que se presenta fue desarrollada por Wanek y modificada por Salas-Vidal. Los números se refieren al estadio. Las siglas E.D/V, E.D/D, E.T/V hacen referencia a las extremidades delanteras vista ventral, extremidades delanteras vista dorsal y extremidades traseras vista ventral. Di y Pr son las abreviaturas para distal y proximal; A se refiere a la polaridad anterior y P a la región posterior de la extremidad.

La regulación de la MCP por el epitelio.

Un experimento clásico realizado por Saunders y colaboradores en 1962, demuestra que la muerte celular que se produce inicialmente (la de la ZNA) puede ser suprimida si el mesénquima de la futura yema de la extremidad se transplanta a la superficie dorsal de una extremidad hospedera. Lo anterior sugirió que el programa de muerte celular puede reprimirse al cambiar las condiciones ambientales de las células destinadas a morir. Por otra parte, la eliminación de una pequeña pieza de la CEA que delinea las regiones interdigitales inhibe la apoptosis en las células mesenquimales adyacentes e induce la formación de cartilago ectópico en las regiones interdigitales (Hurle y Gañan, 1986, 1987). Estas observaciones han llevado a pensar que éstas interacciones de tejido son cruciales para que ocurra la apoptosis del mesénquima.

Antes de que ocurra la MCI, las células distales y del mesénquima interdigital en condiciones de cultivo en las que se eliminan los dígitos adyacentes, son homogéneamente condrogénicas (Cottril *et al.*, 1987, Hurle *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1993, 1994). Por ello se ha propuesto que todo el autópedo tiene potencial para formar dígitos y que el fenotipo automático de las células mesenquimales es condrogénico. Los mecanismos exactos que dirigen la diferenciación de los tipos celulares presentes en la yema de la extremidad todavía no se conocen. Sin embargo, recientemente se ha propuesto un modelo para explicar como las células salen de la ZP y llegan al autópedo donde pueden adquirir dos identidades opuestas, formar los elementos óseos ó tejido interdigital que puede eventualmente ser eliminado por la MCP. Desde esta perspectiva, el ectodermo que delinea al mesénquima parece proporcionar señales que cambian el programa del mesénquima de condrogénesis a muerte celular (Hurle *et al.*, 1991; Gañan *et al.*, 1994).

Algunas evidencias indican que los miembros de la superfamilia de factores secretables, los TGF- β (Factor de Crecimiento Transformante β), junto con sus receptores,

moduladores extracelulares y transductores intracelulares controlan la localización celular hacia el dígito ó interdígito. Las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs, por sus siglas en inglés), que también son miembros de la familia de TGF- β , parecen tener papeles duales como inductores de la MCP y promotores del crecimiento del cartílago. En la extremidad, a lo largo del desarrollo del autómodo tres miembros de la familia de los BMPs: *Bmp2*, *Bmp4* y *Bmp7*, exhiben dominios precisos de expresión que son las regiones interdigitales, el mesodermo de la ZP y la CEA (Hogan, 1996; Lyons *et al.*, 1990; Francis *et al.*, 1994; Helder *et al.*, 1995). La implantación de esferas de absorción impregnadas con BMP-2, BMP-4 ó BMP-7 en las regiones interdigitales aceleran la MCI e inducen una regresión prematura. Cuando las esferas con éstos factores se implantan en la punta de los dígitos en crecimiento se produce la formación de áreas ectópicas de apoptosis (Gañan *et al.*, 1996, Macías *et al.*, 1997), y cuando son implantadas en zonas cercanas a los dígitos se incrementa el tamaño de los cartílagos. Esto último indica que éstas proteínas son también promotoras del crecimiento del cartílago. Otros experimentos que apoyan el papel dual de los BMPs han usado la activación constitutiva de los receptores a BMP (Zou *et al.*, 1997), el bloqueo de la actividad de los BMPs por receptores dominantes negativos (Kawakami *et al.*, 1996, Yokouchi *et al.*, 1996, Zou y Niswander, 1996), ó por la presencia de antagonistas extracelulares como Noggin (Capdevila y Johnson, 1998, Pizette y Niswander, 1999).

Si a yemas de extremidades en cultivo se adicionan los FGFs en ciertas regiones como la ZNP se rescatan las células destinadas a morir. Cuando se elimina la CEA, la administración local del FGF, particularmente el FGF7 y/ó el FGF10 además de substituir la función de la CEA en la inducción de la yema de la extremidad, inhiben la muerte celular en el mesodermo distal de la extremidad (Fallon *et al.*, 1994). Se propone que la MCI inicia con la degeneración de la CEA (Niswander y Martin, 1992; Suzuki *et al.*, 1992; Crossley y Martin, 1995; Savage y Fallon, 1995, Macías *et al.*, 1996). La aplicación de esferas impregnadas con FGF2 y/ó FGF4 en las regiones interdigitales de pollo inhibe la muerte celular a las 12 horas de su implantación, e induce la formación de extremidades con

membrana en los interdígitos (Macías *et al.*, 1996). Sin embargo, esta no se acompaña de la formación de cartilago ectópico, lo que sugiere la existencia de rutas separadas que llevan a éstos dos destinos que podrían ser regulados de forma coordinada ó desacoplada. La capacidad probada de los FGFs para estimular la proliferación celular interdígital apoya la hipótesis de que quizá estarían regulando este proceso tan importante. Por otra parte el efecto inductor de muerte mediado por los BMPs se inhibe cuando se implantan esferas impregnadas en los FGFs que se expresan en la CEA (Gañan *et al.*, 1996; Buckland *et al.*, 1998). Sin embargo, la aplicación simultánea de los FGFs y los BMPs en la región interdígital de la extremidad del pato, en periodos mayores a las 24 horas, incrementan la MCI comparado a la administración de sólo los BMPs. Los mutantes que tienen alterada la ruta de señalización de los FGFs presentan sindactilia (un fenotipo característico de defectos en la MCI). Estas últimas observaciones sugieren que los FGFs pueden a intervalos de tiempo diferentes, ser factores de sobrevivencia ó señales requeridas para la muerte celular (Montero *et al.*, 2001).

El ácido Retinoico (AR) y su participación en la muerte celular.

La vitamina A juega un papel importante en la regulación del desarrollo embrionario de vertebrados a través de su metabolito activo, el AR. El AR está involucrado en muchos aspectos de la especificación de tejidos y diferenciación celular durante el desarrollo embrionario. Es responsable de determinar el patrón temprano axial de la extremidad y el patrón antero-posterior vía la activación de señales como *Shh* (Tickle *et al.*, 1982, 1985, Eichele, 1989; Helms *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1997; Stratford *et al.*, 1999); además participa en el desarrollo de los elementos esqueléticos al interactuar con diferentes receptores (Kastner *et al.*, 1997). El AR regula el desarrollo al activar la transcripción de genes en muchas localizaciones dentro del embrión. Una célula particular puede responder al AR si: 1) expresa receptores a éste y 2) la concentración de AR se encuentra en un intervalo que es apropiado para su respuesta.

El ligando activo se sintetiza *in vivo* por un complejo sistema metabólico que requiere de varias enzimas. El paso limitante en la síntesis del AR es la oxidación de retinol a retinal en el que participan dos clases de enzimas. La primera comprende algunos miembros de la familia de las alcohol-deshidrogenasas de cadena media (ADH), únicamente los genes ADHI y ADHIV del ratón son buenos candidatos para la oxidación de retinol a retinal. El paso siguiente en la síntesis de AR, es la oxidación de retinal a AR, que puede ser mediado por dos tipos de enzimas: las aldehído deshidrogenasas y las xantina oxidasas (Ang y Duester, 1999; Zhao *et al.*, 1996; Niederreither *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1991). La expresión de los genes activados por AR responde a sus niveles, por lo que la efectividad de éste como regulador del desarrollo involucra el control preciso de su distribución y concentración. La concentración del AR, es modulada por proteínas específicas en los tejidos. Se han identificado cuatro proteínas de unión citoplásmica específicas para el retinol y para el AR: las Proteínas de Unión a Retinol Celular (CRBP), tipo I y II, y las Proteínas de Unión a AR (CRABP) tipo I y II.

Se han descrito un gran número de rutas del catabolismo de AR que pueden ser tejido-específicas ó especie-específicas. Estas rutas incluyen la oxidación, la isomerización y la formación de glucoronoides y conjugados de taurina. Se ha propuesto que la enzima CYP26, miembro de la familia del citocromo P450, es un componente central del catabolismo del AR en el embrión puesto que media específicamente su oxidación.

La mayoría de los estudios sobre el AR se han enfocado en la búsqueda de los sitios de su actividad. Para ello se ha requerido la realización de estudios cromatográficos (HPLC) y de localización de receptores o de las enzimas encargadas de su síntesis, siendo éstos últimos los que más datos han aportado. La principal ADH generadora de AR que se observa en cualquier tejido productor de AR es la retinaldehído deshidrogenasa tipo 2 (RALDH-2). Esta enzima se expresa después de la gastrulación en el mesénquima

embrionario del pollo y del ratón, con un límite anterior delimitado a la primer somita, y posteriormente disminuye su expresión hasta que desaparece de la parte craneal anterior del embrión y del tejido neural (Maden, 1999). La localización general de esta enzima puede usarse como un indicador primario de la síntesis de AR. Los ratones mutantes nulos para *Raldh2* carecen de AR y muestran muchas de las anomalías de los embriones deficientes en vitamina A.

El mecanismo de control de la muerte celular mediada por los retinoides, en particular el AR, ocurre por la interacción de éste con sus receptores. Los receptores pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares a esteroides (factores de transcripción activados por ligando), se dividen en dos tipos: 1) los receptores a AR (RAR, α , β y γ), y 2) los receptores a retinoides X (RXR, α , β y γ), (Evans, 1988; Green y Chambon, 1988). In vivo, los receptores a AR son distintas combinaciones de heterodímeros RAR/RXR. Estos se unen a secuencias reguladoras en el DNA que definen elementos de respuesta de sus genes blanco (RARES). Los receptores RXR pueden también formar homodímeros y unir de forma preferente al 9-cis-ácido retinoico.

Los tres subtipos (α , β y γ) que existen para ambas familias de receptores se expresan en regiones distintivas y sobrelapadas durante el desarrollo de la extremidad. Entre el estadio 9.5 y 11.5 *dpc*, RAR α y RAR γ se expresan a lo largo de todo el mesénquima (Dollé *et al.*, 1989; Ruberte *et al.*, 1990). Posteriormente RAR α desaparece de las regiones cartilaginosas y la expresión de RAR γ se mantiene en éstas áreas. La expresión del ARN mensajero de RAR α llega a restringirse a la región interdigital y sobrelapa con la expresión del receptor RAR β en esta etapa (12.5 *dpc*). El receptor RAR β también se expresa en la ZNA, ZNP y PO justo antes y durante todo el proceso de MCP. Por esta razón, los efectos del AR en la muerte celular se asocian principalmente a la interacción del AR con este receptor (Dollé *et al.*, 1989, Mendelsohn *et al.*, 1992). Además, después de un tratamiento con AR, la expresión de RAR β incrementa dramáticamente en la yema de la extremidad,

incluyendo la CEA y el PO (Noji *et al.*, 1991; Harnish *et al.*, 1992; Shen *et al.*, 1992; Mendelsohn *et al.*, 1992; Konchhar *et al.*, 1993). Sin embargo, los resultados que han aportado los análisis de ratones mutantes no coinciden con esta percepción. Una pequeña fracción de mutantes para los receptores $RXR\alpha^{-/-}$, $RAR\alpha^{-/-}$ y $RAR\gamma^{-/-}$ presentan membranas interdígitalas (Kastner *et al.*, 1997; Lohnes *et al.*, 1994; Lufkin *et al.*, 1993). La penetrancia y expresividad de este fenotipo se incrementa marcadamente en ratones heterocigos compuestos $RXR\alpha^{-/-}/RAR\alpha^{+/-}$ y $RXR\alpha^{-/-}/RAR\gamma^{+/-}$ lo cual indica que probablemente los heterodímeros $RXR\alpha/RAR\alpha$ y $RXR\alpha/RAR\gamma$ están involucrados en la muerte del tejido interdígital (Kastner *et al.*, 1997). En contraste, los ratones $RAR\beta^{-/-}$ tienen extremidades normales (Ghyselinck *et al.*, 1997) y la expresividad de las regiones interdígitalas es idéntica en los mutantes $RXR\alpha^{+/-}$ y $RXR\alpha^{+/-}/RAR\beta^{-/-}$. Ya que las extremidades de los ratones mutantes $RAR\alpha^{-/-}/RAR\beta^{-/-}$ y $RAR\beta^{-/-}$ son también normales (Ghyselinck *et al.*, 1997) se piensa que $RAR\beta^{-/-}$ no es necesario para la separación digital (Dupe *et al.*, 1999). Considerando los análisis anteriores resulta necesario determinar mediante diversos estudios experimentales cual receptor a AR es aquel que media las acciones de este relacionadas con la muerte celular durante el desarrollo, en particular para el proceso de MCI.

La administración de AR a animales preñados ocasiona una variedad de anomalías entre las que se incluyen algunas del tubo neural (Kochhar *et al.*, 1984; Alles y Sulik 1989, Granstrom *et al.*, 1990) y de las extremidades, que es en parte por inducir excesiva muerte. El incremento en la muerte celular causado por AR en la extremidad se observa en la CEA y la ZNI (Sullik y Dehart, 1988; Alles y Sulik, 1989; Lussier *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1994). La implantación de esferas impregnadas con AR en las regiones interdígitalas de la extremidad de pollo inducen MCP prematura (Rodríguez-León *et al.*, 1999). El AR puede revertir parcialmente la supresión de la muerte celular en extremidades del mutante *Hammertoe*. En la extremidad de pollo, las esferas impregnadas en el AR e implantadas en la región interdígital modifican la expresión de los genes que se expresan en ésta región, tales como *Bmp4* y *Bmp7*. Por ello, se ha propuesto que el AR ejerce su efecto

vía la activación de éstos genes, los cuales a su vez, serían capaces de activar más genes con funciones apoptóticas tales como *Msx1* y *Msx2* cuya expresión también se localiza en las regiones interdigitales (Rodríguez-León *et al.*, 1999). No obstante, es necesario indicar que las células que expresan los genes antes mencionados no corresponden con las células que se mueren. Además el inicio su expresión se presenta en la región interdigital proximal y la MCI inicia en las región distal.

Cuando se implantan esferas con el inhibidor del receptor a AR en las regiones interdigitales se detiene el proceso de regresión. Algo semejante ocurre cuando se inhibe la síntesis de AR por el uso de diversos fármacos. Lo anterior y la presencia de membranas interdigitales en ratones que carecen de algunos receptores para AR, han llevado a suponer, que se requiere la presencia de AR endógeno para que se produzca la eliminación de las regiones interdigitales por MCI (Rodríguez-León *et al.*, 1999).

JUSTIFICACIÓN

Es de extrema importancia estudiar el desarrollo de la extremidad de mamíferos, ya que las cascadas moleculares que han sido propuestas para la formación de elementos de la extremidad del pollo difieren en parte, entre el pollo y el ratón. Por otra lado, muchos de los mecanismos operantes en ratón podrían también estar funcionando en el humano. Se han propuesto algunas moléculas que podrían ser partícipes en el proceso de MCI, sin embargo, no se sabe en detalle cómo se produce su activación, como realizan sus acciones, y si todos los elementos hasta el momento reportados son los únicos necesarios para que se lleve a cabo el proceso.

Los antecedentes que hasta el momento se presentaron hablan de la posible existencia de funciones antagónicas entre el AR y el FGF8, uno como factor inductor de muerte y el otro promoviendo la sobrevivencia. Este antagonismo no sólo se observa en el desarrollo de la extremidad. Durante el desarrollo del sistema nervioso la acción del AR y del FGF8 se encuentran restringida una con respecto a la otra, es decir, son excluyentes. Aquí la expresión de *Fgf8* se limita al cerebro medio posterior, en la región conocida como istmo romboencefálico y la actividad del AR se ubica en las regiones más posteriores, particularmente en los rombómeros (Abu-Abed *et al.*, 2000). Lo anterior hace suponer que ambas señales podrían coincidir en un mismo proceso, y el modelo de Mercader, provee un ejemplo de ello, donde la conexión entre ambas moléculas la realizan los genes *Meis1* y *Meis2*.

HIPÓTESIS

Se propone que el FGF8 y el AR presentan un mecanismo de señalización antagónico en las regiones interdigitales de la extremidad en desarrollo. La ausencia de la expresión de *Fgf8* y el incremento en la síntesis y por tanto de los niveles de AR endógeno, llevan a la activación de una ruta de señalización que incluye a genes como los *Meis1* y *Meis2* encargados de ejecutar la MCI.

OBJETIVOS

Objetivo General

Demostrar la existencia de funciones antagónicas entre el factor FGF8 y AR en el control de la activación o del inicio de la MCI. El producto del gen *Fgf8* actuaría como un factor de sobrevivencia y el AR como un promotor de muerte. Evaluar la participación de los genes *Meis1* y *Meis2* dentro de este proceso.

Objetivos Particulares

- a) Probar la participación del FGF8 como un factor de sobrevivencia en las regiones interdigitales de la extremidad en desarrollo del ratón.
- b) Demostrar que la ausencia de FGF8 inicia el proceso de activación de la MCI.
- c) Mostrar que la función del AR es promover la muerte en las extremidades en desarrollo y que su actividad se encuentra regulada por FGF8.
- d) Determinar si la regulación de AR por FGF8 es por controlar los niveles de AR en la extremidad, a través de la inhibición de la expresión de la principal enzima sintetizadora del mismo, la retinaldehído- deshidrogenasa 2 (*Raldh2*).
- e) Determinar la participación de los genes *Meis1* y *Meis2* como parte del proceso de activación de la MCI.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) de la cepa CD-1. Los ratones se mantuvieron en un cuarto con foto-periodo controlado de 10 horas de luz y 14 horas de oscuridad, y recibieron comida y agua *ad libitum*.

Para realizar las cruzas se colocó un ratón hembra con un ratón macho por caja toda la noche. A la mañana siguiente se revisaron las hembras y las que presentaron un tapón de coito fueron separadas en cajas etiquetadas para tener el control de la fecha de cruce. El día en que se encontró un tapón de coito fue tomado como el día 0.5 postcoito (*dpc*).

Disección de las extremidades

Las hembras preñadas fueron sacrificadas por dislocación cervical a los días 12.5*dpc*, 13.5*dpc* y 14.5*dpc*. Los úteros de las hembras fueron disecados y los embriones junto con sus membranas extraembrionarias fueron puestos en una solución salina de fosfatos (PBS, ver apéndice).

Siempre se utilizaron las extremidades traseras. Estas fueron removidas de los embriones bajo un microscopio estereoscópico (Nikon), con el uso de tijeras de disección, cortando en la parte más proximal de la extremidad, y fueron disectadas en medio L15 (Microlab- México). Posteriormente las extremidades se clasificaron de acuerdo al sistema de desarrollo establecido por Wanek (1989) y modificado por Salas-Vidal y colaboradores (2001).

Preparación de las esferas

FGF8

1. Se tomó un volumen aproximado de 50 μ l de esferas de acrílico (Sigma) en solución, activadas con orexina. Se colocaron en un tubo de 1.5ml (Eppendorf).
2. Se adicionó 1ml de solución salina (PBS) estéril.
3. Se centrifugaron por 5 segundos a fin de concentrar las esferas en el fondo del tubo.

4. Se retiró el PBS y se adicionó un volumen igual de PBS limpio.
5. Se repitió este procedimiento 2 veces más.
6. Se preparó una cámara húmeda (una caja Petri) con una cama de papel absorbente.
7. Se colocó sobre la cama humedecida un trozo de papel ahulado (parafilm).
8. Sobre este se colocaron 2 grupos (uno control y el otro experimental) de aproximadamente 20 esferas, las cuales se tomaron con una pinza de disección estéril.
9. Se adicionó al grupo experimental 5 μ l de FGF8 a una concentración de 1 mg/ml.
10. Al grupo control se adicionó 5 μ l de solución salina estéril (PBS).
11. Se incubaron ambos grupos por una hora a temperatura ambiente

SUA5402 (Inhibidor de la señalización de los FGFs).

1. Se tomaron aproximadamente 40 resinas de intercambio iónico AG1-X2 (BioRad) con una pinza de disección estéril. Se colocaron dentro de un tubo de 1.5ml (Eppendorf).
2. Se adicionó 1ml de DMSO (Dimetil-sulfóxido).
3. Se permitió reposar las esferas por 5 minutos a fin de que se impregnaran en ésta solución.
4. Se centrifugó por 5 segundos acumulándose las esferas en el fondo del tubo.
5. Se eliminó la solución anterior y se adicionó 1ml de DMSO limpio.
6. Se repitió este procedimiento en 2 ocasiones más.
7. En una cámara húmeda se colocó una porción de papel ahulado (Parafilm).
8. Se tomaron con las pinzas estériles 2 grupos de 20 esferas cada uno (grupo control y grupo experimental).
9. Se adicionaron 5 μ l de DMSO al grupo control y al grupo experimental 5 μ l de SUA5402 a una concentración de 100mM.
10. Las esferas control y tratadas se incubaron a temperatura ambiente por 1 hora dentro de la cámara con atmósfera húmeda para impedir su desecación.

Implantación de las esferas

Posterior a la disección de las extremidades traseras se realizó la implantación de esferas de absorción o de intercambio iónico sometidas a los tratamientos descritos. Se llevó a cabo de la siguiente forma: la extremidad se colocó en un soporte de caucho con medio de disección L15, con ayuda de una aguja de tungsteno, se realizó una incisión en el epitelio de las regiones interdigitales. Es importante mencionar que nunca se dañó el epitelio distal de las extremidades. Se tomó una esfera con una pinza de disección fina y se colocó sobre la incisión recién realizada, la esfera se introdujo en el interdígito usando una asa de cultivo estéril.

En las 2 regiones interdigitales comprendidas entre los dígitos II-III y III-IV se colocó una esfera. La extremidad trasera derecha siempre portó esferas control, mientras que en la extremidad contralateral (trasera izquierda) se implantaron esferas con los tratamientos antes mencionados.

Cultivo *in vitro* de las extremidades de embrión de ratón

El protocolo de cultivo *in vitro* de extremidades de ratón fue tomado y modificado del protocolo originalmente descrito por Taketo y Koide (1981) para cultivar gónadas embrionarias. Este protocolo también fue estandarizado en el trabajo de Salas-Vidal, *et al.*, 1998. Después de la implantación de las esferas, las extremidades fueron cultivadas *in vitro* sobre filtros durapore (Millipore) con un diámetro de poro de 0.22mm. El filtro flota sobre 2ml de medio Dulbelco Eagle Modificado Medium (D-MEM) sin suero y suplementado con GPS (2mM de glutamina, 200U-ml de penicilina G de sodio y 200mg/ml de estreptomina). Dependiendo del procedimiento experimental, al medio se le adicionaron los reactivos correspondientes, con las siguientes concentraciones finales:

Reactivo	Concentración
Ácido retinoico	10 μ M, 15 μ M y 20 μ M
SUA5402	250 μ M
Citral	150 μ M
Nerol	150 μ M

La elección de las concentraciones a utilizar se basó en reportes previos así como en datos aportados por personal del laboratorio. Los cultivos de extremidades fueron mantenidos en su mayoría por un periodo de 12 horas en incubadoras con humedad saturada, 5% de CO₂, aire al 95% y una temperatura de 37°C.

Tinción vital

Se utilizó la tinción con el fluorógeno anaranjado de acridina (Sigma) para detectar las células en proceso de muerte. Las extremidades a analizar fueron lavadas en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y posteriormente se tificaron con anaranjado de acridina a una concentración de 5mg/ml en PBS por 30 minutos a 37°C. Posteriormente son observadas con microscopía de fluorescencia convencional con un filtro de rodamina para detectar las regiones de muerte.

Hibridaciones en tejido completo.

a) Las ribopuebas de ARN (síntesis de sonda) se prepararon mezclando las siguientes cantidades en el respectivo orden:

- | | |
|--|--------------|
| 1) Agua destilada | 10.0 μ l |
| 2) Buffer de transcripción 5x (Boehringer) | 4.0 μ l |
| 3) 0.1 M DTT (Boehringer) | 2.0 μ l |
| 4) Mezcla de nucleótidos(marcados con digoxigenina) (Boehringer) | 2.0 μ l |
| 5) Plásmido linearizado(1 μ g/ μ l) | 1.0 μ l |

- | | |
|--|--------|
| 6) Inhibidor de RNAsa (RNAsin, 100u/μl) (Boehringer) | 0.5 μl |
| 7) RNA polimerasa SP6, T7 ó T3* | 1.0 μl |
| 8) Se incubó a 37°C durante 2 horas** | |

*Las RNA polimerasas usadas para la transcripción de cada sonda fueron las siguientes:

Fgf8	T3 (Boehringer)	Raldh2	T3 (Boehringer)
Meis1	T7 (Boehringer)		
Meis2	SP6 (Boehringer)		

**En el caso en que se usó SP6 se incubó a una temperatura de 40°C a fin de obtener una mejor actividad de la RNA polimerasa por el mismo periodo de tiempo

Descripción de las sondas

Las sondas que se utilizaron para cada gen tenían las siguientes características:

Fgf8 correspondió a un fragmento de 740pb clonado en los sitios lambda HindIII y EcoRI.

Meis1 se utilizó una sonda de aproximadamente 1000pb, clonada en ClaI.

Meis2 corresponde a un fragmento de 1000pb clonado en los sitios HindIII.

Raldh-2 corresponde a un fragmento de 486pb clonado en los sitios EcoRI y BamHI.

b)Extracción de las sondas

- 1) Se adicionó un volumen de agua DEPC 100μl
- 2) Se precipitó con LiCl 4M 10μl
- 3) Se adicionó un volumen de etanol absoluto frío 300μl
- 4) Se guardó a una temperatura de -20°C durante 30 minutos
- 5) Se centrifugó en una microcentrifuga por 10 minutos a máximas rpm
- 6) Se desechó el sobrenadante con cuidado de no perder la pastilla
- 7) Se lavó la pastilla con 100μl de etanol al 70%

- 8) Se disolvió la pastilla en un volumen de agua DEPC 100µl
- 9) Se tomaron 5 µl de la sonda disuelta en agua DEPC y se adicionó 1µl de colorante (loading buffer)
- 10) Se analizó en un gel de agarosa al 1%, debió observarse la banda de RNA 5 veces más intensa que la banda de DNA

c) Detección de la incorporación de digoxigenina en las ribopuebas

- 1) Se preparó una solución de dilución, agregando 1µl de tRNA de levadura en 500µl de agua DEPC.
- 2) Se colocó una gota de cada serie de diluciones 2x de la sonda en la solución de dilución sobre una membrana de nylon.
- 3) Se secó al aire la membrana.
- 4) Se lavó con 1ml de solución amortiguadora número 1 (ver apéndice) a temperatura ambiente durante 1 minuto en una caja de Petri de 20mm con agitación constante.
- 5) Se eliminó la solución amortiguadora número 1.
- 6) Se realizó un lavado con la solución bloqueadora durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación constante.
- 7) Se eliminó la solución bloqueadora.
- 8) Se diluyó 1µl de anticuerpo ANTI-DIG AP (Boehringer) en 5ml de solución amortiguadora número 1. Se adicionó 1ml sobre la membrana de nylon.
- 9) Se incubó con el anticuerpo durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación constante.
- 10) Se retiró el anticuerpo y se lavó por 15 minutos con solución amortiguadora número 1.
- 11) Se repitió este último paso una vez más.
- 12) Se eliminó la solución amortiguadora y se adicionó 1ml de NTMT, fue incubado durante 5 minutos con agitación
- 13) Se retiró el NTMT y se agregó 1ml de NTMT y el sustrato: 3.5µl de BCIP (Boehringer) + 3.5µl de NBT (Boehringer)

- 14) Se incubó hasta obtener la señal.
- 15) Una vez que se observó la señal de incorporación de color morado a café oscuro se detuvo la reacción con agua. Se comparó el color obtenido con el patrón para determinar si presentó una correcta incorporación de digoxigenina.

d) Preparación de tejidos pre-hibridación *in situ*

Las extremidades de los embriones recién disectadas ó después de que se realizó la detección de muerte celular con anaranjado de acridina, se lavaron en PBS y se fijaron toda la noche en paraformaldehído al 4% disuelto en PBS a una temperatura de 4°C. Al día siguiente se deshidrataron de la siguiente manera:

- 1) 5 minutos en PBT a 4°C
- 2) 5 minutos en PBT a 4°C
- 3) 5 minutos en 25% metanol/PBT
- 4) 5 minutos en 50% metanol/PBT
- 5) 5 minutos en 75% metanol/PBT
- 6) 5 minutos en 100% metanol
- 7) Se guardaron en metanol al 100% a una temperatura de -20°C hasta su procesamiento

e) Hibridación *in situ* en tejido completo

Las hibridaciones *in situ* en tejido completo fueron realizadas de acuerdo a un protocolo establecido de 4 días (Ausubel *et al.*, 1994). En cada paso cada solución anterior se retiró cuidadosamente y se dejó un poco de la misma para evitar el daño y la desecación del tejido. La adición de la siguiente solución se hizo por la paredes del tubo y de forma lenta, siempre manejando el mismo volumen dentro de cada tubo. Durante los 4 días los tejidos se mantuvieron con agitación suave dentro de tubos de 2ml herméticos. Salvo en los casos en que se indica, los pasos del protocolo se realizaron a temperatura ambiente.

Día 1

Los tejidos o extremidades guardados en los tubos herméticos de 2ml con metanol absoluto a una temperatura de -20°C se rehidrataron, se lavaron y se realizó la hibridación con las diferentes soluciones de la siguiente manera:

- 1) 75% metanol/PBT 5 minutos
- 2) 50% metanol/PBT 5 minutos
- 3) 25% metanol/PBT 5 minutos
- 4) PBT 5 minutos
- 5) PBT 5 minutos
- 6) 6% H_2O_2 /PBT 1 hora
- 7) PBT 5 minutos
- 8) PBT 5 minutos
- 9) PBT 5 minutos
- 10) 10 $\mu\text{g/ml}$ de proteinasa K en PBT 3 minutos*
- 11) 2mg/ml de glicina en PBT 5 minutos
- 12) PBT 5 minutos
- 13) PBT 5 minutos
- 14) 8 μl de glutaraldehído+ 5 μl de Tween en 1 ml de Paraformaldehído 20 minutos
- 15) PBT 5 minutos
- 16) PBT 5 minutos
- 17) Solución de Prehibridación 1 hora a 70°C

- 18) Solución de prehibridación
+ 10 μl de la riboprobea específica toda la noche a 70°C

* El tiempo de incubación con la proteínasa K es muy importante y nunca rebasó los 5 minutos para no producir un daño al epitelio.

Día 2

Durante este día se eliminó la sonda unida inespecíficamente y se añadió el anticuerpo antidigoxigenina acoplado a la fosfatasa alcalina.

- 1) Solución 1 30 minutos a 70°C
- 2) Solución 1 30 minutos a 70°C
- 3) Solución 1:1 de la solución 1 y 2 10 minutos a 70°C
- 4) Solución 2 5 minutos
- 5) Solución 2 5 minutos
- 6) Solución 2 5 minutos
- 7) Solución 2 5 minutos
- 8) Solución 3 5 minutos
- 9) Solución 3 30 minutos a 65°C (en este momento se inició el paso 14 al mismo tiempo que los siguientes)
- 10) Solución 3 30 minutos a 65°C
- 11) TBST 5 minutos
- 12) TBST 5 minutos
- 13) TBST 5 minutos
- 14) Se pre-bloqueó el tejido por incubarlo con suero de borrego al 10%/TBST durante 2 ó 3 horas. Se debe inactivar previamente el suero a una temperatura de 70°C por 30 minutos.
- 15) Se pre-absorbió el anticuerpo con polvo de embrión de la siguiente manera:
 - Se pesaron 3 mg de polvo de embrión y se diluyeron en 0.5ml de TBST

- Se incubaron en una temperatura de 70°C con agitación fuerte y constante durante 30 minutos.
- Se colocó en hielo y se permitió enfriar por 5 minutos.
- Se adicionaron 5µl de suero de borrego y 1µl de anticuerpo anti-DIG (Boehringer)
- Se agitó suavemente por 1 hora a 4°C.
- Se centrifugó a máxima rpm en una microcentrífuga por 5 minutos.
- Se tomó el sobrenadante y se diluyó hasta 2ml con suero de borrego 1%/TBST.

16) Se eliminó el suero de borrego 10%/TBST de los tubos.

17) Se adicionó en anticuerpo pre-absorbido.

18) Se incubó toda la noche a una temperatura de 4°C con agitación suave.

Día 3

Los tejidos se lavaron a fin de eliminar el exceso de anticuerpo por 3 periodos de 5 minutos y por 4 periodos de 1 hora con TBST, finalmente se dejó lavando toda la noche con la misma solución.

- | | |
|---------|---------------|
| 1) TSBT | 5 minutos |
| 2) TSBT | 5 minutos |
| 3) TSBT | 5 minutos |
| 4) TSBT | 1 hora |
| 5) TSBT | 1 hora |
| 6) TSBT | 1 hora |
| 7) TSBT | 1 hora |
| 8) TSBT | toda la noche |

Día 4

Este día correspondió con el revelado u obtención de la señal la cual corresponde a la actividad de la fosfatasa alcalina.

- 1) NTMT 10 minutos
- 2) NTMT 10 minutos
- 3) NTMT 10 minutos
- 4) Se transfirieron los tejidos desde los tubos de 2ml a una caja estéril de 12 pozos
- 5) Se agregó 1ml de NTMT y el sustrato: 3.5 μ l de NBT+ 3.5 μ l de BCIP
- 6) Se incubó con agitación suave y protegiéndolo de la luz hasta obtener la señal óptima, la cual se observó entre las 4 y 12 horas.
- 7) Posterior a la detección de señal se retiró el sustrato y se hicieron 3 lavados con PBT por 15 minutos cada uno.
- 8) Se lavó con glicerol 50%/ PBT por 15 minutos.
- 9) Se guardaron en glicerol 80%/ PBT a 4°C hasta el procesamiento de la imagen.

RESULTADOS

Se realizó la caracterización de la expresión de *Fgf8* para corroborar la desaparición de su expresión al tiempo en que la MCI se presenta. Se encontró que efectivamente, la expresión del mensajero de *Fgf8* desaparece de las regiones interdigitales alrededor del estadio S9 que es cuando inicia la MCI en el epitelio más distal del interdígito. Esto concuerda con lo anteriormente reportado en el estudio de Salas-Vidal y colaboradores (2001) (resultados no mostrados).

El cultivo de la extremidad sobre filtros con medio definido ha sido reportado previamente. No obstante, nunca se ha analizado si la MCP que se presenta bajo condiciones fisiológicas, se reproduce *in vitro*. Debido a que el interés en este estudio es analizar *in vitro* el cambio frente a diferentes tratamientos en la MCI y la expresión de algunos genes involucrados en tal evento, fue necesario establecer las condiciones idóneas bajo las cuales la MCI era reproducible o semejante al desarrollo ocurrido *in vivo*. Por ello, se observó el desarrollo de la MCI en la extremidad del ratón, a partir del estadio en que ésta inicia (S9), bajo diferentes medios de cultivo a fin de encontrar el adecuado para nuestros propósitos. Los medios elegidos se basaron en la disponibilidad de los mismos dentro del laboratorio y fueron McCoy, D-MEM, D-MEM/F12. De éstos tres medios, el cultivo de las extremidades en D-MEM conservó intacta la morfología y un patrón temporal de MCI semejante al observado *in vivo*. Por esta razón este medio fue el utilizado en todos los cultivos.

El FGF8 como factor de sobrevivencia.

Con la finalidad de probar el papel del FGF8 como factor de sobrevivencia, se implantaron esferas impregnadas en este factor en las dos regiones interdigitales principales de las extremidades en el estadio S9, que se ha reportado corresponde con el inicio de la

MCI. La inhibición de la muerte por FGF8 se evaluó a las 6, 8 y 12 horas, obteniéndose los resultados más claros después de una incubación de 12 horas o posterior, sin llegar a las 24 horas (Figura 1). Se encontró un pico de MCI alrededor de las 12 horas en las extremidades control, mientras que en las extremidades que portan las esferas con FGF8 la MCI se inhibió. Se observó también que si las esferas con FGF8 se implantan después de la etapa de desarrollo (S9), es decir, posterior al inicio de la MCI, no hay inhibición de la muerte celular, o al menos no es tan evidente, lo cual indica que existe cierta ventana temporal crítica de desarrollo para detener este proceso.

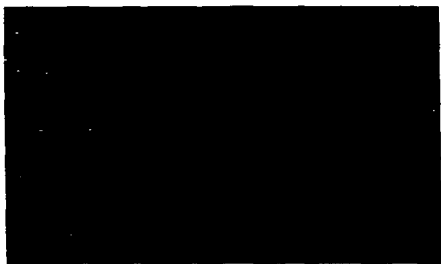


Figura 1. Función de sobrevivencia del FGF8. El FGF8 inhibe la MCI al promover la sobrevivencia de las células de las regiones interdigitales. En el panel A se observa una extremidad que porta las esferas control y por ello la MCI se reproduce de forma semejante a la fisiológica, en cambio en el panel B la extremidad porta las esferas impregnadas con FGF8 y se inhibe el proceso de MCI.

La inhibición de la expresión de *Fgf8* al tiempo en que inicia la MCI se presenta solo en las regiones interdigitales, mientras que dicha expresión se mantiene en el ectodermo más distal de los dígitos donde no ocurre muerte celular. Por esta razón, se supuso que quizá la función de sobrevivencia del *Fgf8* se mantenga durante todo el desarrollo de la extremidad. Para probar esta función del FGF8, se utilizó un compuesto que inhibe la señalización de varios FGFs, ya que antagoniza la función de sus receptores. En el ratón se ha reportado que existen cuatro tipos de receptores. El uso del compuesto, SU5402, se ha reportado que

por lo menos inhibe la acción de tres de ellos: FGFR1, FGFR2 y FGFR3. Se analizaron dos etapas de desarrollo (12.5 y 13.5dpc), que muestran una expresión diferencial de *Fgf8*. El experimento se realizó añadiendo el inhibidor en el medio de cultivo a una concentración final de 250µM, por un periodo de 12 horas a los 12.5dpc (estados de desarrollo S7 y S8). Se observó que después de 12 horas se produce una inducción de muerte celular, que se presenta a todo lo largo de la parte distal del autópodo y penetra un poco en las regiones proximales de la extremidad. También se observan alteraciones morfológicas de la extremidad bajo este tratamiento. Las extremidades cultivadas en presencia del inhibidor se hacen más extendidas, se achatan las puntas de los dígitos y en general la extremidad presenta un aspecto más aplanado (Figura2). Por otro lado se usaron extremidades en la misma etapa de desarrollo que recibieron el inhibidor impregnado en las esferas que se insertaron en las regiones interdigitales. Bajo esta condición también se observa una inducción de muerte celular semejante a cuando el SU5402 se adiciona al medio de cultivo. En este caso, la muerte celular no solo se observa en las regiones interdigitales, sino también en la punta de los dígitos lo que lleva a suponer que la actividad de este compuesto no es localizada.

A



B



Figura2. Efectos de SU5402 en el medio de cultivo. El panel A muestra la extremidad control. El panel B es una extremidad cultivada en presencia de SU5402. Nótese que existe una inducción de muerte celular en el contorno más distal de la extremidad. También es evidente un cambio en la morfología, la extremidad se hace más extendida. Ambas extremidades fueron tomadas de embriones de 12.5dpc, el control corresponde a la extremidad contralateral de la que recibió tratamiento.

En la etapa de 13.5dpc (S9 y S10), la expresión del *Fgf8* se restringe a la punta de los dígitos. En esta etapa se implantaron en la punta de los dígitos, esferas impregnadas en SU5402 a una concentración de 100mM, por un periodo de 12 horas. Posterior a este intervalo, se detectó la inducción de muerte celular abundante en esta región; también se observó un incremento de la MCI respecto al control (Figura 3a y 3b). Durante estos estadios de desarrollo la expresión de *Fgf8* ya no se detecta en los interdígitos. Por ello, a manera de control, se realizó la implantación de esferas con inhibidor bajo las mismas condiciones de concentración y por el mismo tiempo en las regiones interdigitales. Se esperaba que en esta situación, debido a la falta de expresión de *Fgf8* no se detectara muerte celular, lo cual se corroboró. Sin embargo, también se observó que en estas extremidades se produce una disminución o bloqueo absoluto de la MCI (Figura3c y 3d). Si se realiza un seguimiento de las extremidades bajo esta condición pero por un periodo de 24 horas se observa que la MCI se restablece y se observa también en las regiones digitales distales (Figura3E y 3F).

Un aspecto importante derivado de los experimentos anteriores es que la muerte celular que es inducida por el compuesto SU5402 coincide con las regiones en las que se localiza la expresión de *Fgf8*.

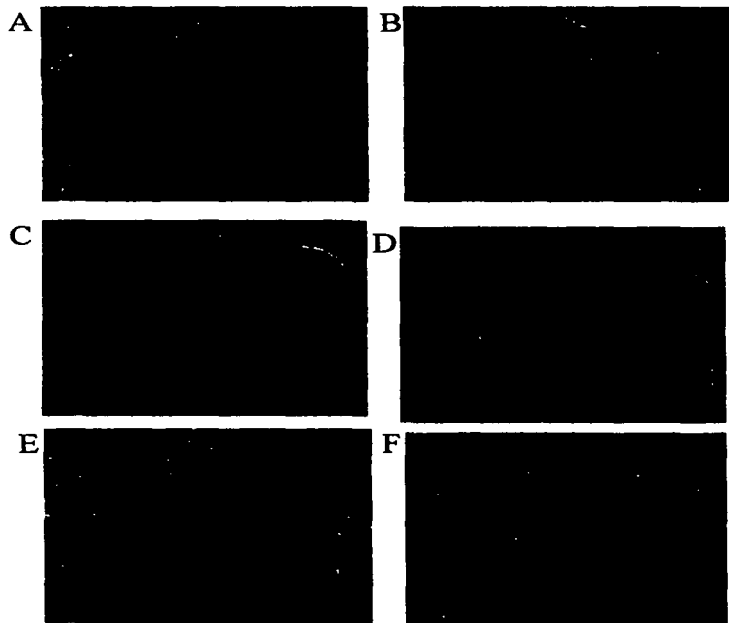


Figura 3. Efectos del SU5402 en el desarrollo de la extremidad. En el estadio de 13.5dpc la implantación de las esferas impregnadas con el SU5402 en la punta de los dígitos induce muerte celular y la incrementa en las regiones interdigitales. Paneles A y B. Las esferas impregnadas con el SU5402 e implantadas en las regiones interdigitales a las 8 horas inhiben la MCI, lo que se observa en el panel D. Bajo esta misma condición pero a las 24 horas se reinicia la MCI, esto se observa en el panel F.

Participación del AR en la MCI.

El modelo que se propone dentro de este estudio, supone que el FGF8 controla negativamente la presencia del AR. Si lo anterior es correcto, elevar los niveles de AR en la extremidad aumentaría la muerte celular. Para probar esto, se cultivaron extremidades de 12.5dpc, en presencia de 10, 15 y 20 μ M de AR en el medio (concentraciones que inducen la muerte celular) por 12 horas. Transcurrido este tiempo se observó un aumento de la muerte celular en el borde distal de la extremidad, la MCI es poca al igual que la muerte celular en las regiones proximales del autópodo. La cantidad de células muriendo fue directamente proporcional a la concentración del AR añadido. Las extremidades así tratadas presentan cambios morfológicos, haciéndose un poco más extendidas y aplanadas (Figura 4). Cabe resaltar que la muerte celular que es inducida por AR es aparentemente semejante a la que se produce en la misma etapa con el uso del SU5402 (Figura5).

Se analizó efecto del AR a una concentración de 20 μ M por 12 horas en extremidades de 13.5dpc. En esta etapa la muerte celular fisiológica sólo se localiza en las regiones interdigitales. Con el tratamiento, la muerte celular se expande hacia otras áreas de la extremidad, como las regiones distales ó las puntas de los dígitos. También se observan algunas perturbaciones morfológicas, como por ejemplo, los bordes de la extremidad se extienden y los dedos se achatan. La muerte celular que se observa en las puntas de los dígitos es semejante a la que ocurre cuando se implantan esferas con el inhibidor en la punta de los dígitos (ver figura 3b).

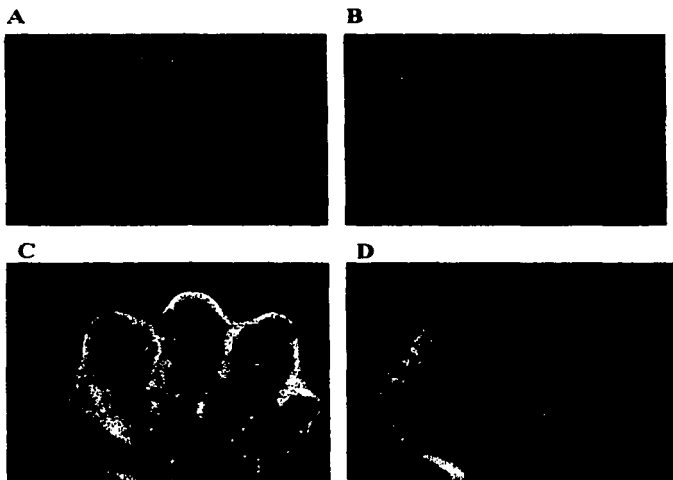


Figura 4. La muerte celular inducida por el AR en extremidades de 12.5 *dpc* y de 13.5*dpc*. En el panel B se observa la muerte celular inducida por el AR en extremidades de 12.5*dpc*. La muerte celular en esta etapa se presenta a lo largo del borde distal de la extremidad y penetra un poco en las regiones interdigitales. En el panel A se observa la extremidad control. El panel C corresponden a una extremidad control de 13.5*dpc* y el panel D a una extremidad tratada con AR de esta misma etapa. La muerte celular al igual que en la etapa anterior se presenta a todo lo largo del borde distal, incluyendo las puntas de los dígitos, sin embargo el incremento de muerte celular en las regiones interdigitales es menor que en la etapa de 12.5*dpc*.

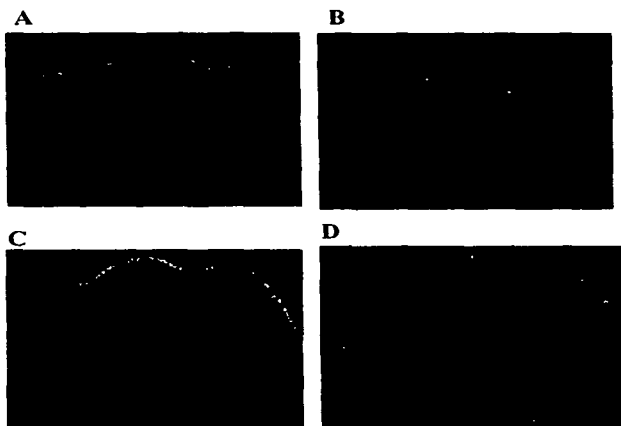


Figura 5. Comparación de patrones de la muerte celular inducida por el AR y por el SU5402. En el panel A se observa la muerte celular inducida por el AR a los 13.5dpc, en el panel B se observa la muerte celular inducida por el SU5402 en la misma etapa de desarrollo. En el panel C se observa la muerte celular inducida por el AR pero a los 12.5dpc, mientras tanto en el panel D se observa en esta misma etapa de desarrollo la muerte celular que induce el SU5402. Nótese que en ambas etapas la muerte celular inducida por ambos compuestos es muy semejante.

La regulación del mensajero de *Fgf8* por AR.

La muerte celular inducida por AR en las regiones interdigitales y en la punta de los dígitos en los tratamientos con AR, pudiera ser producto de la regulación negativa del mensajero de *Fgf8* por el AR. Por ello se determinó si la inducción de la muerte celular por 20 μ M de AR a las 8 y 12 horas eliminaban la expresión de *Fgf8*. En condiciones fisiológicas en esta etapa, el mensajero de *Fgf8* se encuentra restringido a la punta de los dígitos. Las extremidades tratadas con el AR muestran una desaparición de la expresión de este gen respecto a las control (Figura 6). Cabe resaltar la correlación observada entre el incremento de la muerte celular en la punta de los dígitos y la desaparición de la expresión del *Fgf8*.

El FGF8 reprime la expresión de *Raldh-2*.

Una de las enzimas encargada de la síntesis de AR y que frecuentemente se utiliza para monitorear la presencia de este compuesto es la retinaldehído-deshidrogenasa 2 (RALDH-2). Si FGF8 controla la disponibilidad de AR en la extremidad en desarrollo, pudiera regular de alguna manera la actividad de esta enzima. Por ello se determinó si ocurría algún cambio en la expresión de su mensajero, bajo las mismas condiciones de inhibición de la MCI por el FGF8 previamente establecidas. En ésta condición hay un cambio en la expresión de *Raldh-2*, pero no es tan evidente, debido a que la extremidad control se desarrolla más rápido que la tratada con FGF8, por lo que resulta imposible hacer un análisis comparativo. Debido a esto, se decidió probar otra condición. Se colocó una esfera control en un interdígito y en el otro de la misma extremidad una esfera impregnada en FGF8 (1mg/ml). Con el tratamiento anterior, la expresión de *Raldh-2* se ve disminuida o ausente en la región interdigital de las extremidades con la esfera con el FGF8 (Figura 7A y 7B), es decir, el FGF8 regula negativamente la expresión de la *Raldh-2* en los interdígitos.

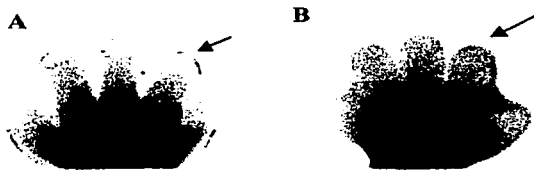


Figura 6. El AR regula negativamente la expresión del *Fgf8*. La expresión del *Fgf8* que en la etapa de desarrollo de 13.5dpf (S9-S10), se restringe a la punta de los dedos desaparece de las extremidades que fueron tratadas con el AR. El panel A muestra una extremidad control, mientras el panel B muestra una extremidad tratada con el AR.

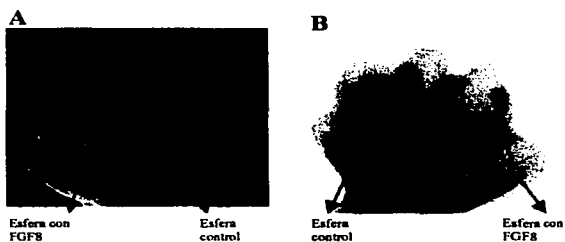


Figura 7. El FGF8 apaga la expresión de *Raldh-2*. En el panel A se observa la inhibición de la MCI por el FGF8, el panel B corresponde a la misma extremidad en donde se observa la inhibición de la expresión de *Raldh-2* por el FGF8 respecto al interdedo que porta la esfera control

Los genes *Meis1* y *Meis2* en la MCI.

Los estudios de Mercader y colaboradores indican que los genes *Meis1* y *Meis2* son blancos del AR. Para determinar si éstos genes podrían estar participando en la regulación de la activación de la MCI, se caracterizó su expresión, alrededor de los estadios en que ocurre la MCI. Las etapas correspondieron a 12.5dpc (representado en su mayoría por S7 y S8), 13.5dpc (S9 y S10) y 14.5dpc (S11 y S12). Los patrones de expresión obtenidos fueron los siguientes: *Meis1* no se expresa en la etapa 12.5dpc (Figura 8a); la expresión de su ARN mensajero se detecta hasta la etapa de 13.5dpc en las regiones laterales de los dígitos y un poco de su expresión se observa en el interdígito (Figura 8b). En la etapa de 14.5dpc todavía hay expresión, pero restringida a las regiones laterales de los dígitos (Figura 8c). En las etapas en que se detectó la expresión de *Meis1* ésta se extiende a lo largo de los dígitos y nunca alcanza el ectodermo más distal o punta del dígito.

La expresión de *Meis2* es muy semejante a la de *Meis1*. En el estadio S7 no hay expresión de *Meis2* (Figura9a). Las extremidades en S8, que muestran una morfología con dígito e interdígito bien diferenciado, tienen expresión de *Meis2* en la región interdigital, lo cual no se observa para *Meis1*. En la etapa de 13.5dpc, la expresión de *Meis2* es muy fuerte en el interdígito, a diferencia de *Meis1*, e incluye el epitelio más distal. En esta misma etapa, la expresión de *Meis2* contrasta con *Meis1*, ya que su expresión no se extiende a las regiones laterales del dígito (Figura9b). Finalmente, en la etapa de desarrollo de 14.5dpc (Figura9c), la expresión se reduce y se observa únicamente en las regiones laterales de los dígitos y en la pequeña región interdigital que aún se encuentra presente. En esta etapa contrasta la fuerte expresión de *Meis2* en las regiones descritas mientras que la expresión de *Meis1* parece haber disminuido en intensidad.



Figura 8. Expresión de *Meis1* alrededor de las etapas en que se presenta la MCI. En el panel A se observa que no hay expresión de *Meis1* en la etapa de 12.5dpc. En el panel B se observa que la expresión de *Meis1* se encuentra en las regiones laterales de los dígitos en la etapa de 13.5dpc. En el panel C, que corresponde a una extremidad de 14.5dpc, la expresión de *Meis1* se restringe a las regiones laterales de los dígitos.



Figura 9. La expresión de *Meis2* en la extremidad alrededor de las etapas en que ocurre la MCI. En extremidades de 12.5dpc no se observa expresión de *Meis2*, representado en el panel A. En los 13.5dpc la expresión de *Meis2* se observa en las regiones interdigitales, que corresponde con el panel B. La expresión de *Meis2* se restringe a las regiones laterales de los dígitos en la etapa de desarrollo de 14.5dpc lo cual se observa en el panel C.

Los genes candidatos que se proponen participan en la MCI tienen una distribución interdigital alrededor de las etapas en que ocurre este proceso. Con la caracterización realizada se encontró que *Meis2* tenía una fuerte expresión y bien definida en la región interdigital a los 13.5dpc, etapa de desarrollo que coincide con la MCI. Considerando esto, se decidió trabajar únicamente con este gen para su análisis posterior en diferentes condiciones experimentales.

Los genes *Meis* son regulados positivamente por AR, es decir, se induce su expresión en células en cultivo y en tejidos completos de forma ectópica. Considerando esto se evaluó la posible inducción de la expresión de *Meis2* por AR en una etapa previa a la MCI. Puesto que las acciones del AR relacionadas con la muerte celular podrían ser mediadas por *Meis2*, se sometieron extremidades de 12.5dpc (S7 y S8) a una concentración de 20µM de AR por un periodo de 12 horas al término del cual se observó abundante muerte celular similar a la descrita anteriormente en esta etapa; sin embargo, no se detectó una inducción de la expresión de *Meis2* en alguna región de la extremidad (resultados no mostrados).

Debido a que no se observó la expresión de *Meis2* en una etapa de desarrollo en la que bajo condiciones fisiológicas no ha ocurrido la MCI, se buscaron cambios en su expresión en otra ventana temporal, la cual corresponde con el inicio y transcurso de la MCI. Se cultivaron extremidades de 13.5dpc, en presencia de AR (a la misma concentración y tiempo previamente utilizados). La expresión de *Meis2* se extendió más allá de las regiones interdigitales, hacia toda la región dorsal y ventral de la extremidad, incluyendo las áreas en las que se produce un incremento de la muerte celular por la actividad del AR (Figura10).

Tratando de complementar la observación anterior, se pensó que si la expresión de *Meis2* depende de la actividad del AR endógeno en la extremidad, la inhibición de la actividad de este debiera disminuir o apagar la expresión de *Meis2*. Se conocen diferentes fármacos que bloquean la síntesis de AR, afectando la actividad de las enzimas que median

su síntesis como las alcohol deshidrogenasas (ADH) y las aldehído deshidrogenasas (ALDH). El citral, es un aldehído que inhibe ambos tipos de enzimas, y el nerol es un compuesto control del citral, ya que tiene la misma estructura pero el grupo aldehído fue modificado por un grupo alcohol y su actividad inhibitora a concentraciones equimolares con respecto al citral es prácticamente despreciable (Schuh *et al.*, 1993). En las extremidades cultivadas en presencia de 100 μ M de citral, la MCI se inhibe, respecto a las extremidades cultivadas con la misma concentración de nerol (Figuras 11A y B). Estas extremidades recibieron un tratamiento similar a los experimentos anteriores, es decir, se determinó si bajo esta condición ocurría un cambio en la expresión del mensajero de *Meis2*. En las extremidades en las que se inhibe la MCI se disminuye la expresión de *Meis2*, lo cual indica que los niveles de AR regulan positivamente la expresión de este gen en la región interdigital (Figura 11 C y D).

Finalmente se analizó si FGF8 pudiera estar regulando la expresión de *Meis2* y poder mencionar su participación en la MCI de forma más sólida. Se determinó si bajo las condiciones de inhibición de la MCI por FGF8 se presentaba un cambio en la expresión de *Meis2*. Bajo este tratamiento se observa una inhibición de la expresión de *Meis2* en el ectodermo más distal de la región interdigital, respecto a la extremidad control. La expresión de *Meis2* en el resto del interdígito no cambia en las extremidades que recibieron tratamiento con FGF8 (Figura 12).

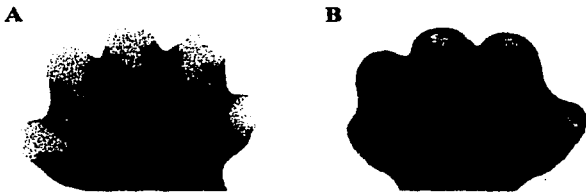


Figura 10. Cambio en la expresión de *Meis2* por el AR en extremidades de 13.5dpc. En las extremidades cultivadas en presencia del AR se expande la expresión del mensajero de *Meis2*, de tener sólo una localización interdigital como se observa en el panel A se extiende en el epitelio dorsal y ventral de la extremidad como se observa en el panel B. Ambas son vistas dorsales.

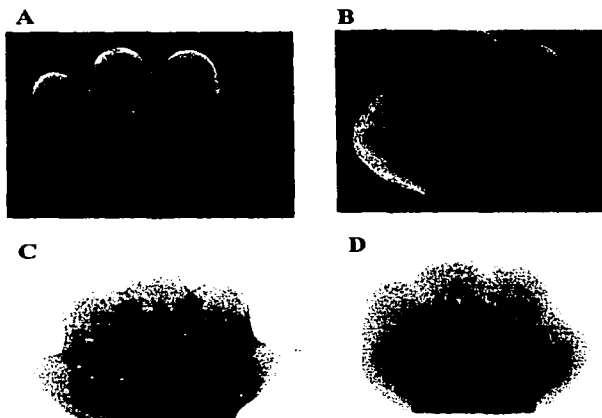


Figura 11. Cambio en la expresión de *Mels2* e inhibición de la MCI por el citral. En el panel B se observa la inhibición de la MCI por el citral en extremidades de 13.5dpc, en el panel A se encuentra la extremidad control. En el panel C se observa la expresión de *Mels2* a los 13.5dpc, en el panel D se observa como se apaga la expresión de *Mels2* por el efecto del citral.

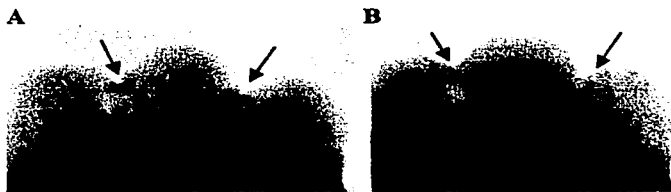


Figura 12. El FGF8 apaga la expresión de *Mets2* en el ectodermo apical. Las esferas impregnadas con el FGF8 implantadas en las regiones interdigitales regulan negativamente la expresión de *Mets2* en las regiones del epitelio distal (flechas). En el panel A se observa una extremidad que porta esferas control.

DISCUSIÓN

La extremidad embrionaria del ratón es un buen modelo para estudiar de forma experimental muchos de los eventos morfogénéticos que ocurren en los vertebrados; además muchos de los mecanismos que en el ratón operan se asume que podrían estar operando en el humano, debido a su cercana relación evolutiva. El evento morfogénético de nuestro interés es la MCP, específicamente la MCI de la extremidad. A pesar de que se ha generado una gran cantidad de información acerca de este proceso e involucrado a numerosas moléculas, no se ha establecido cómo es que este proceso ocurre y cómo es que se encuentra tan bien regulado espacio-temporalmente.

La función del gen *Fgf8* en la CEA es promover el crecimiento de la extremidad a lo largo del eje próximo-distal, se piensa quizá actúa como un factor de proliferación. La existencia de extremidades truncadas en mutantes condicionales para este gen corroboran esta idea. Sin embargo, los patrones de expresión para el *Fgf8* reportados aquí y en el trabajo de Salas-Vidal y colaboradores, muestran que su desaparición coincide de forma temporal con el inicio de la MCI. Esto nos llevó a pensar que quizá el *Fgf8* no sólo induzca la proliferación. Existen antecedentes en donde los FGFs actúan como factores de sobrevivencia inhibiendo la apoptosis interdigital cuando se colocan esferas impregnadas con factores en esta región, en particular el FGF2 y FGF4. Por otra parte se ha reportado la activación de la cascada apoptótica en células que carecen de factores de crecimiento, tal como ocurre en células del sistema nervioso. Por tanto, la posibilidad de que el FGF8 pudiera estar actuando como un factor de sobrevivencia en el tejido mesenquimal que sufrirá apoptosis no es una idea sin fundamentos.

La inhibición de la MCI al implantar esferas con FGFs ya se había reportado en la extremidad de pollo, con otros FGFs, particularmente el FGF2 y el FGF4. Sólo un reporte menciona el uso del FGF8 (Montero *et al.*, 2001). Sin embargo, en este reporte se concluye

que la actividad del FGF8 puede ser substituida por cualquier otro FGF. Nosotros consideramos que es de gran importancia mostrar que en particular el FGF8 presenta esta función de sobrevivencia alrededor de la etapas en que ocurre la MCI, ya que este gen se expresa durante el desarrollo de la extremidad. El haber encontrado que existe una disminución de la MCI en una etapa de desarrollo crítica (previo a S9) nos sugiere que el FGF8 durante esta ventana temporal pudiera ser una señal liberada por la CEA requerida para la sobrevivencia del mesénquima subyacente. La función del FGF8 como un factor de sobrevivencia en la extremidad *in vivo*, se confirma con los experimentos siguientes: 1) El uso del inhibidor de algunos de los receptores a los FGFs (SU5402) que induce abundante muerte celular en la extremidad. De forma notoria la primeras células en morir se localizan en el epitelio más distal de la extremidad, lo cual correlaciona con los gradientes de MCI reportados en extremidades *in vivo* en el trabajo de Salas-Vidal; 2) La inducción de la muerte celular en la punta de los dígitos con el uso del SU5402 en la etapa en que éstas regiones sólo expresan el *Fgf8*; y 3) La expresión del *Fgf8* se regula negativamente en las células que mueren por acción del AR. Los datos anteriores concuerdan con un papel del FGF8 en la sobrevivencia del mesénquima distal.

Dos resultados obtenidos dentro de este estudio parecieran no apoyar la conclusión anterior. Uno es el incremento de la MCI observado cuando se coloca una esfera impregnada con el inhibidor a los receptores a los FGF en la punta de los dígitos siendo que el *Fgf8* ya no está presente en las regiones interdigitales. El otro, es la inhibición de la MCI que se produce cuando se implantan esferas con este mismo inhibidor en las regiones interdigitales en esta misma etapa de desarrollo. Sin embargo, consideramos que ambas acciones no son mediadas por el FGF8, ya que *in vivo* en esta etapa de desarrollo, la expresión de su ARN mensajero no correlaciona con los lugares en donde se observan éstos efectos. Suponemos que posiblemente estas acciones si estén relacionadas a la actividad de algún FGF pero no es la del FGF8.

Este estudio propone la existencia de un antagonismo directo entre dos moléculas mediando la activación de la MCI, el FGF8 y el AR. Los reportes analizados previos a su realización sugerían las funciones contrapuestas ejercidas por éstas 2 moléculas principales, pero nunca se habían involucrado en la MCI. Por ejemplo, se habla de la inducción de la muerte celular por el AR pero de forma teratogénica. Sólo el estudio de Rodríguez-León y colaboradores propone que existe una actividad del AR endógeno y que éste participa en la MCI en la extremidad de pollo. La función de supervivencia de los FGFs se observa al colocar en las regiones interdigitales de la extremidad de pollo esferas impregnadas en cualquiera de éstos factores. Con el tratamiento anterior se logra inhibir la MCI, sin embargo, no se propone sean reguladores de este proceso de forma fisiológica. La señalización contrapuesta entre éstas 2 moléculas también se observa en el desarrollo del sistema nervioso, donde los límites de expresión de *Fgf8* son excluyentes de la actividad del AR. El único antagonismo directo entre el AR y el FGF8 se analiza dentro del modelo de Mercader y la respuesta a ambas señales es medida en términos de la expresión de los genes *Meis1* y *Meis2*. Nuestro modelo supone que los genes *Meis* podrían ser regulados positivamente en respuesta a AR y una disminución de la expresión de éstos genes se observaría frente al FGF8. Debido a que en nuestro estudio observamos la expresión de *Meis1* y *Meis2* en las regiones interdigitales, pensamos al igual que Mercader que su expresión pudiera depender de éstos 2 factores.

Se ha reportado que una expresión ectópica de *Meis2* se produce por el AR en células en cultivo. Esto lo hacía un candidato excelente para formar parte de la ruta de la MCI. La participación de *Meis2* en la activación de la MCI, requería una inducción de su expresión en extremidades en las que se detectara muerte celular inducida por el AR. Una de las etapas de desarrollo en la que observamos abundante muerte celular por la presencia del AR es 12.5dpc (S7 y S8), etapa en la que no observó expresión de *Meis2*. Contrario a lo esperado, en la etapa de 12.5dpc las extremidades tratadas por 12 horas con el AR no muestran indicios de la expresión de *Meis2* en ninguna región. Este resultado nos llevó a

pensar que en nuestro modelo un mecanismo independiente de los genes *Meis* estaría operando. La otra posibilidad es que los genes *Meis* si participen, pero de forma indirecta, es decir, que se requieran en el proceso inicial de activación pero para completar el proceso de la MCI los genes *Meis* activarían genes adicionales.

Para determinar si la expresión de *Meis2* en la etapa de 13.5dpc dependía de la acción del AR se estudió su expresión en extremidades en que se disminuyó la síntesis de AR. El citral impide la producción del AR al inhibir tanto a las alcohol y las aldehído deshidrogenasas; presenta la ventaja de poseer además un compuesto control, el nerol, que a bajas concentraciones no tiene efectos sobre la síntesis del AR. Las extremidades tratadas por 12 horas con 100µM de citral inhiben la MCI debido a la ausencia de AR (hecho que lleva a postular un requerimiento del AR endógeno en la MCI). Bajo este tratamiento también se inhibe la expresión de *Meis2*, en toda la extremidad, incluyendo las regiones interdigitales. Este resultado indicaba que posiblemente si existía una regulación de la expresión de *Meis2* por el AR. Esto, por tanto, contrastaba con nuestra conclusión previa de que dado que no encontramos expresión de *Meis2* este gen no parecía ser crítico en el proceso.

En pruebas iniciales notamos que el desarrollo *in vitro* de las extremidades en la etapa de 12.5dpc no procedía de forma semejante al desarrollo *in vivo*. En cambio, las extremidades de 13.5dpc se desarrollaban normalmente y presentan los eventos morfogénéticos, como la MCI y la individualización de los dígitos en los tiempos y formas esperados. Si en realidad la expresión de *Meis2* respondía al AR endógeno como nos lo sugería el experimento anterior, las extremidades tratadas con el AR en esta etapa mostrarían un incremento en la expresión de este gen. Esta última hipótesis resultó correcta. No se produjo una sobreexpresión de *Meis2* en los sitios en que de forma natural se expresa (interdígitos), pero sí hubo una inducción de la expresión en sitios donde normalmente no se encuentra. En éstas regiones, como las puntas de los dígitos, se indujo la muerte celular por

acción del AR. Esto último sugiere que *Meis2* es un gen que posiblemente participa en la MCI.

Si el gen *Meis2* es un integrante de nuestro modelo debería regularse negativamente por FGF8. Al poner este factor en esferas en las regiones interdigitales, tratamiento que inhibe la muerte celular, se observó que la expresión de *Meis2* se reduce pero no de forma tan marcada como se esperaba. Su expresión desaparece en la región ectodérmica distal de los interdígitos. Al realizar un análisis se observó que los patrones de expresión de *Meis2* son excluyentes con los de *Fgf8* alrededor de las etapas en que ocurre la MCI, es decir, en las áreas y tiempos en que se expresa *Meis2* no se expresa *Fgf8*. Además ya que se observó una regulación negativa de la expresión de *Meis2* frente a *Fgf8*, podemos proponer que quizá exista un circuito regulatorio entre ambos genes. Hasta el momento no podemos asegurar la participación de *Meis2* como activador del proceso de MCI. Si realmente participa lo haría de forma indirecta. Por lo tanto será necesario determinar los efectos en la MCI haciendo estudios de ganancia ó pérdida de función de este gen.

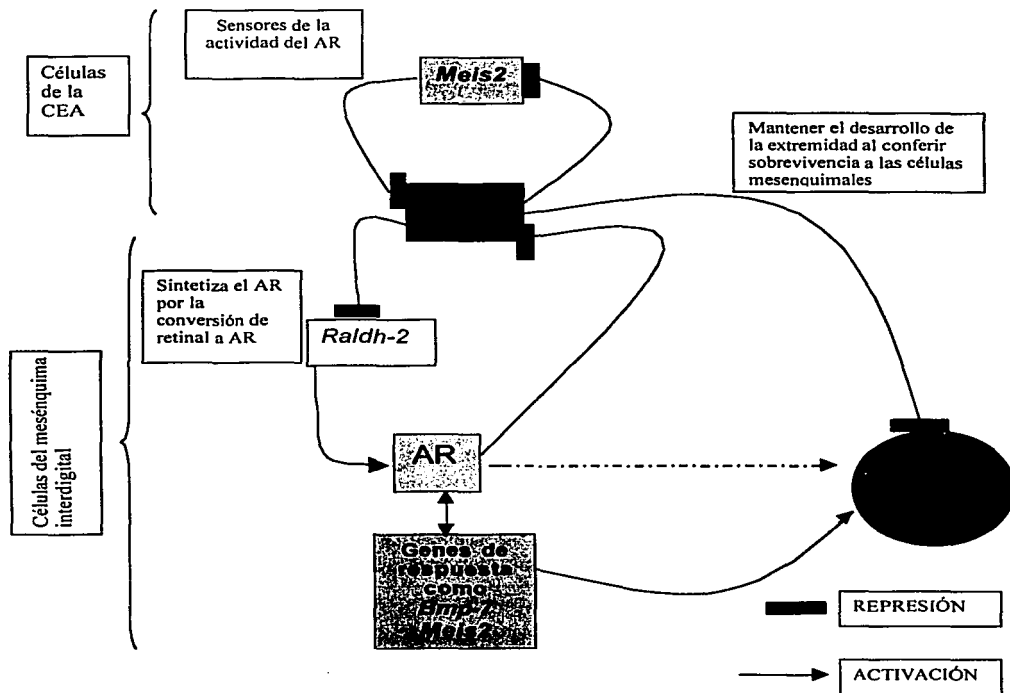
FGF8 podría ejercer su efecto de sobrevivencia indirectamente al regular la síntesis o la acción de AR, postulación que está de acuerdo con el modelo de Meicader y colaboradores (2001). La expresión del ARN mensajero de la enzima *Raldh2* y del receptor *Rarb* se utilizan frecuentemente como reporteros para monitorear la presencia y actividad del AR. En la extremidad en desarrollo del ratón, la expresión de *Raldh-2* se detecta desde estadios tempranos, alcanzando un pico de expresión en el día 13.5dpc en las regiones interdigitales. A partir de éste patrón de expresión se puede inferir la presencia de AR en los interdígitos. El patrón de expresión de ésta enzima en la extremidad es excluyente con el patrón de expresión de *Fgf8*. El tratamiento con FGF8 inhibe su expresión por lo que se puede decir que FGF8 controla los niveles de AR en la extremidad al controlar la expresión de una de las principales enzimas encargadas de su síntesis.

Con los datos generados hasta el momento por este estudio se propone el siguiente mecanismo:

El FGF8 y el AR son reguladores de la MCI fisiológica. EL FGF8 actúa como un factor requerido para el crecimiento y la sobrevivencia de la extremidad en desarrollo. Durante todo el desarrollo de la extremidad, el AR se encuentra presente en niveles bajos, con actividad suficiente para inducir diferenciación de ciertas células y conferir fenotipos proximales. Para que se pueda establecer todo el patrón de desarrollo de la extremidad se requieren diferentes concentraciones del AR. Los niveles del AR en la parte distal de la extremidad son controlados por el FGF8, que inhibe la expresión de la *Raldh-2* y por tanto la síntesis del AR. Al tiempo en que se inicia la MCI se produce una regulación negativa de la expresión del *Fgf8* en las regiones interdigitales, por un mecanismo desconocido pero suponemos involucra la activación de un represor de FGF8 por el AR. La ausencia de la actividad del FGF8 permite la expresión de *Raldh-2* en las áreas interdigitales distales lo cual lleva a incrementar los niveles de AR en en éstas regiones. Cuando el AR se encuentra en un cierto nivel, es capaz de inducir la activación de otros genes blanco, entre los que podrían estar *Meis1*, *Meis2*, *Bmp4*, *Bmp7*, *Msx1* y/o *Msx2*. Finalmente estos genes activarían la maquinaria encargada de efectuar la MCI.

En la extremidad de pollo, existen muchos genes que se localiza en las regiones interdigitales alrededor del tiempo en que ocurre la MCI y parecen ser regulados por el AR. Cuando los productos de éstos genes se administran junto con el AR inducen muerte celular. Por éstas razones, se ha propuesto que forman parte de una cascada para activar el programa de la MCI. Entre éstos tenemos a los miembros de la familia de los Bmps (*Bmp4* y *Bmp7*) y de la familia de los msx (*Msx1* y *Msx2*). Se ha propuesto que la ruta de activación de la MCI inicia con la inducción de la expresión de *Bmp4* ó *7* por el AR y éstos genes a su vez activan a los genes *Msx*. Sin embargo, el análisis detallado de su expresión así como evidencia reciente de colaboradores de este laboratorio indican que quizá éstos genes

no sean los efectores directos de la MCI. Esto se debe a que la expresión de los mismos no coincide con las células del mesénquima que se empiezan a morir. Se ha observado también que *Bmp7* requiere del AR para producir sus efectos inductores de muerte (Covarrubias, resultados no publicados). Por ello resultaría necesario establecer un mecanismo más detallado de la forma en que éstas moléculas interactúan, así como la identificación de los factores iniciadores de la MCI.



Esquema 1. Modelo en el que se integran las moléculas que participan en la ruta de activación de la MCI. Ver el texto para la explicación.

CONCLUSIONES

1. La función del FGF8 a lo largo de todo el desarrollo de la extremidad, pero particularmente en las etapas en que se presenta la MCI, es favorecer la sobrevivencia de las células mesenquimales que se encuentran en las regiones interdigitales y en las puntas de los dígitos.
2. El AR es una molécula que tiene una participación importante en el inicio y regulación de la MCI de forma fisiológica.
3. El FGF8 y el AR presentan funciones antagónicas en la inducción de la MCI en la extremidad embrionaria de ratón. El antagonismo de ambas señales se hace evidente por el hecho de que regula de forma negativa la expresión del mensajero del *Fgf8* en la regiones apicales de las extremidades de 13.5dpc.
4. El FGF8 regula negativamente la expresión de *Raldh-2* en las regiones interdigitales, por lo cual quizá se este inhibiendo la actividad del AR en éstas áreas
5. La expresión de *Meis2* se encuentra regulada por el AR alrededor de las etapas en que se presenta la MCI en la extremidad en desarrollo. Existe también una regulación negativa de este por el FGF8 en el ectodermo más distal de las regiones interdigitales. Sin embargo, hasta el momento, su participación en la activación de la MCI no puede afirmarse.

PERSPECTIVAS

Para completar el circuito de activación de la MCI se deben encontrar los genes que responden tanto al AR como al FGF8 y que inician la MCI cuando se expresan. Existen algunos candidatos a considerar, los cuales podrían evaluarse.

En este estudio sólo se analizó el efecto de sobrevivencia ejercido por el FGF8, sin embargo, es necesario determinar cuales son los receptores mediante los cuales el FGF8 realiza esta función.

Los reportes que hasta el momento se han publicado no concluyen que receptor media las acciones del AR en la muerte celular. La disminución en los niveles de la enzima que sintetiza el AR puede ser acompañada por la disminución en la expresión de ciertos de receptores. Resta entonces determinar cual receptor al AR es el que responde ante esta lógica.

REFERENCIAS

- 1) Abu-Abed, S., Dolle P., Metzger, D., Beckett, B., Chambon., P y Petkovich M. 2000. The retinoic acid metabolizing enzyme, CY26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. *Genes Dev.*, 15:226-240.
- 2) Alles, A., y Sulik, K. 1989. Retinoic acid- induced limb reduction defects: perturbation of zones of programmed cell death as a pathogenic mechanism. *Teratology* 40:163-171.
- 3) Ang H.L, y Duester G.1999. Retinoic acid biosynthetic enzyme ALDH1 localizes in a subset of retinoid-dependent tissues during xenopus development. *Dev Dyn.* 215(3):264-72.
- 4) Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., Struh. (editores). 1994. Current protocols in molecular biology. Wiley Co. U.S.A..
- 5) Ballard K.J,y Holt S.J. 1968. Cytological and cytochemical studies on cell death and digestion in the foetal rat foot: the role of macrophages and hydrolytic enzymes. *J Cell Sci.* 3(2):245-62.
- 6) Barde, Y.A. 1989. Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* 2: 1525-1534
- 7) Buckland RA, Collinson JM, Graham E, Davidson DR, Hill RE. Antagonistic effects of FGF4 on BMP induction of apoptosis and chondrogenesis in the chick limb bud. *Mech Dev.* 71(1-2):143-50.
- 8) Capdevila, J., y Izpisúa- Belmonte, J. 2001. Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.*17: 87-132
- 9) Capdevila, J., y Johnson, R. 1998. Endogenous and ectopic expression of noggin suggests a conserved mechanism for regulation of BMP function during limb and somite patterning. *Dev. Biol.* 197: 205-217.
- 10) Chang, D.T., López, A., Von Kessler, D., Chiang, B.K., Simyl, Zhao, R., Seldin, M., Fallon, J., y Beachy. 1994. Products, genetic linkage and limb patterning activity of a murine hedgehog gene. *Development* 120: 3339-3353

- 11) Chen Y., y Zhao X. 1998. Shaping limbs by apoptosis. *J Exp. Zool.* 282: 691-702.
- 12) Chiang C., Litingtung Y., Lee E., Young K., y Corden, J. 1996. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383:407-13
- 13) Clarke, P.G., 1990. Developmental cell death: morphological diversity and multiples mechanisms. *Anat. Embryol.* 181:195-213.
- 14) Cohen, G.M., Sun, M., Snowden, R., Dinsdale, D., y Skilleter, D. 1992. Key morfological features of apoptosis may occur in the absense of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem.J.*, 286:331-334.
- 15) Cohn MJ, y Bright PE. 1999. Molecular control of vertebrate limb development, evolution and congenital malformations. *Cell Tissue Res.* Apr;296 (1):3-17.
- 16) Cottril, C., Archer, C., Hornbruch, A, y Wolpert, L. 1987. The differentiation of normal and muscle-free distal chick limb-bud mesenchyme in micromass culture. *Dev. Biol.* 119:143-151.
- 17) Coucouvanis, E., y Martin, G.R. 1995. Signals for the death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. *Cell* 83:279-287.
- 18) Crossley, P., y Martin, G. 1995. The mouse Fgf8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth y patterning in the developing embryo. *Development*, 121:434-451.
- 19) Crossley, P., Minowada, G., Mac Arthur, C., y Martin, G. 1996. Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of the chick limb development. *Cell*, 84:127-136.
- 20) Cygan, J.A., Johnson y McMahon, A. 1997. Novel regulatory interactions revealed by studies of murine limb pattern in Wnt7a and En-1 mutants. *Development* 124: 5021-5032.
- 21) Dollé, P., Ruberte, E., Kastner, P., Petkovich, M., Stoner, M., Gudas, L., y Chambon. 1989. Differential expression of the genes encoding the retinoic acid receptors α , β y γ and CRABP in the developing limbs of the mouse. *Nature*, 342:702-705.

- 22) Dupe V, Ghyselinck NB, Wendling O, Chambon P, Mark M. 1999. Key roles of retinoic acid receptors alpha and beta in the patterning of the caudal hindbrain, pharyngeal arches and otocyst in the mouse. *Development*. 126(22):5051-9.
- 23) Echerlard, Y., Epstein, D., Jacques, B., Shen, L., y Mohler. 1993. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75: 1417-1430.
- 24) Eichele G. 1989. Retinoic acid induces a pattern of digits in anterior half wing buds that lack the zone of polarizing activity. *Development*. 107(4):863-7.
- 25) Eichele G, Tickle C, Alberts BM. 1985. Studies on the mechanism of retinoid-induced pattern duplications in the early chick limb bud: temporal and spatial aspects. *J Cell Biol*. 101(5 Pt 1):1913-20.
- 26) Ellis, H.M. y H.R.Horvitz. 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44: 817-829
- 27) Fallon, J., y Cameron, J. 1977. Interdigital cell death during limb development of the turtle and lizard with an interpretation of evolutionary significance. *J. Embryol. Exp. Morphol*. 40:285-289.
- 28) Fallon, J., Lopez, A., Ros, M., Savage, M., Olwin, B., y Simyl, B., 1994. FGF2: Apical ectodermal ridge growth signal for chick development. *Science* 264: 104-107.
- 29) Francis, P., Richardson, M., Brickell, P. y Ticle, C. 1994. Bone morphogenetic proteins and a signaling pathway that controls patterning in the developing chick limb. *Development*, 120: 209-218.
- 30) Gañan, Y., Macías, D., y Hurlé, J. 1994. Pattern regulation in the chick autopodium at advanced stages of embryonic development. *Dev. Dyn*. 199:64-72
- 31) Gañan Y, Macías D, Duterque-Coquillaud M, Ros MA, Hurlé JM 1996. Role of TGF beta s and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development*. 122(8):2349-57.

- 32) García, I., Martinou, I., Tsujimoto, Y., y J.C. Martinou. 1992. Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto-oncogene. *Science*, 258: 302-304.
- 33) Ghyselinek NB, Dupe V, Dierich A, Messaddeq N, Garnier JM, Rochette-Egly C, Chambon P, y Mark M. Role of the retinoic acid receptor beta (RARbeta) during mouse development. *Int J Dev Biol*. 41(3):425-47.
- 34) Gilbert, S.F. 1998. Developmental biology. Sinauer Sunderland. U.S.A.
- 35) Glucksman, A. 1951. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.* 26:59-86.
- 36) Granstrom G, Kullaa-Mikkonen A, y Zellin G. 1990. Malformations of the maxillofacial region induced by retinoids in an experimental system. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 19(3):167-71.
- 37) Green S, y Chambon P. 1988. Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet*. 4(11):309-14.
- 38) Golstein, P. 1989. Morts cellulaires et systeme immunitaire. *Médecine/ sciences* 5: 546-553.
- 39) Hamburguer, V., y Hamilton, H., 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol*. 88:49-92.
- 40) Harnish, D., Jian, H., Soprano, K., Kocchar, D., y Soprano, D., 1992. Retinoic acid receptor $\beta 2$ mRNA is elevated by retinoic acid in vivo in susceptible regions of mid-gestation mouse embryos. *Dev. Dyn*. 194 :239-246
- 41) Helder MN, Ozkaynak E, Sampath KT, Luyten FP, Latin V, Oppermann H, Vukicevic S. 1995. Expression pattern of osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in human and mouse development. *J Histochem Cytochem*. 43(10):1035-44.
- 42) Helms JA, Kim CH, Eichele G, Thaller C. 1996. Retinoic acid signaling is required during early chick limb development. *Development*. 122(5):1385-94.
- 43) Hinchliffe, J. y Ede. D. 1973. Cell death and the development of limb form and skeletal pattern in normal y wingless (ws) chick embryos. *J. Embryol. Exp. Morph*. 30:753-772.

- 44) Hinchliffe, J. y Johnson, D. 1980. The development of the vertebrate development. Oxford:Clarendon Press. 268pp.
- 45) Hogan, B. 1996. Bone morphogenetic proteins: Multifunctional regulators of vertebrate development. *Gene Dev.* 10:1580-1594.
- 46) Hurlle, J., y Colvee, E., 1982. Surface changes in the embryonic interdigital epithelium during the formation of the free digits: a comparative study in the chick and duck. *J. Embryol. Exp. Morph.* 69:
- 47) Hurlle, J. y Gañan, Y., 1986. Interdigital tissue chondrogenesis induced by surgical removal of the ectoderm in the chick embryo leg bud. *J. Embryol. Exp. Morph.* 94:231-244.
- 48) Hurlle, J. y Gañan, Y., 1987. Formation of extra digits induced by surgical removal of the apical ectodermal ridge of the chick embryo leg bud in the stages previous to the onset of interdigital cell death. *Anat. Embryol.* 176:393-399.
- 49) Hurlle, J., Macias, D., Gañan, M., Ros, M., y Fernyez-Teran. 1991. The interdigital spaces of the chick leg bud as model for analyzing limb morphogenesis and cell differentiation. Developmental patterning of the vertebrate limb. Plenum Press, New York, pp 249-259.
- 50) Ishizaki, Y., Cheng, L., Mudge, A.W. y Raff, M.C. 1995. Programmed cell death by default in embryonic cells, fibroblasts, and cancer cells. *Mol. Biol. Cell* 6: 1443-1458.
- 51) Ilies, A., 1969. La topographie et la dynamique des zones necrotiques normales chez l'embryon humain de 11-30mm. II. Systeme nerveux central et peripherique. Etude histologique t histochimie. *Rev. Roum. D'Embryol. Cyt. Serie D.* 6: 31-44.,
- 52) Jacobson, M., Weil, M., y Raff, M.C. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell* 88: 347-354
- 53) Kastner, P. Mark, M., Ghyselinck, Krezel, W., Dupe, V., Grondona, J, y Chambon, P. 1997. Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development* 124:313-326.

- 54) Kawakami Y, Ishikawa T, Shimabara M, Tanda N, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Kuwana T, Ueki A, Noji S, Nohno T. 1996. BMP signaling during bone pattern determination in the developing limb. *Development*. 122(11):3557-66.
- 55) Krauss, S., Concordet, J., y Inghamm, P. 1993. A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell* 75: 1431-1444
- 56) Krauss, P., Fraindenrainch, D., Loomis, C. 2001. Some distal structures develop in mice lacking Sonic hedgehog signaling. *Mech. Dev.* 100:45-58
- 57) Ker, J. Wyllie, A., y Currie, A. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257
- 58) Kochhar DM, Penner JD, Tellone CI.1984. Comparative teratogenic activities of two retinoids: effects on palate and limb development. *Teratog Carcinog Mutagen.* 4(4):377-87.
- 59) Kochhar, D., Jiang, H., Harnish, D., y Soprano, D. 1993. Evidence that retinoic acid-induced apoptosis in the mouse limb bud core mesenchymal is gene-mediated. *Prog. Clin. Biol. Res.* 383:815-825
- 60) Lee, K., Chang, W., y Sze, L.1993. Histogenetic potential of rat hind-limb interdigital tissues prior to y during the onset of programmed cell death. *Anat. Rec.* 236:568-572.
- 61) Lee, K., Li, F., Yung, J., y Cheah. 1994. Influence of digits, ectoderm, and retinoic acid on chondrogenesis by mouse interdigital mesoderm in culture. *Dev. Dyn.* 201:297-309.
- 62) Lee J, y Tickle C.. 1985. Retinoic acid and pattern formation in the developing chick wing: SEM and quantitative studies of early effects on the apical ectodermal ridge and bud outgrowth. *J Embryol Exp Morphol.* 90:139-69.
- 63) Levi- Montecini, R. 1987. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237: 1154-1162.
- 64) Logan C., A. Hornbruch, I., Campell, y Lumsden. 1997. The role of engrailed in establishing the dorsoventral axis of the chick limb. *Development* 124: 2317-2324

- 65) Lohnes D, Mark M, Mendelsohn C, Dolle P, Dierich A, Gorry P, Gansmuller A, y Chambon P. 1994. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development*. 120(10):2723-48.
- 66) Loomis, C., Kimmel, C., Tong, J., Michaud y Joyner. 1998. Analysis of the genetic pathway leading to formation of ectopic apical ectoderm ridges in mouse *Engrailed-1* mutant limbs. *Development* 125: 1137-1148.
- 67) Lopez- Martinez A., Chang D., Chiang C., Porter, J., y Ros, M. 1995. Limb patterning activity and restricted posterior localization of the amino-terminal product of sonic hedgehog cleavage. *Curr. Biol.* 5:791-96.
- 68) Lu, H., Revelli, J., Goering, L., Thaller, C., y Eichele, G. 1997. Retinoid signaling is required for the establishment of a ZPA and for the expression of *Hoxb-8*, a mediator of ZPA formation. *Development*, 124:1643-1651.
- 69) Lufkin T, Lohnes D, Mark M, Dierich A, Gorry P, Gaub MP, LeMeur M, y Chambon P. 1993. High postnatal lethality and testis degeneration in retinoic acid receptor alpha mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(15):7225-9.
- 70) Lussier, M., Canoun, C., Sank, A. y Schuler, C. 1993. Interdigital soft tissue separation induced by retinoic acid in mouse limb cultured in vitro. *Int. L.Dev. Biol.* 37: 555-564.
- 71) Lyons, K., Pelton, R., y Hogan., B. 1990. Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A. *Development* 109: 833-844
- 72) Macías, D., Dañan, M., Ros, M., y Hurle, J. 1996. In vivo inhibition of programmed cell death by local administration of FGF-2 y FGF-4 in the interdigital areas of the embryonic chick leg bud. *Anat. Embryol.* 193:533-541
- 73) Macías D, Ganan Y, Sampath TK, Piedra ME, Ros MA, Hurle JM. 1997. Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development*.124(6):1109-17.
- 74) Maden M. 1999. Heads or tails? Retinoic acid will decide. *Bioessays*. 121(10):809-12.

- 75) Martin, G. 1998. The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Gen. Dev.* 12: 1571-1586.
- 76) Martin, S.J. y Green, D.R. 1995. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?. *Cell* 82:349-352
- 77) Mendelsohn, C., Ruberte, E., y Chambon, P. 1992. Retinoid receptor in vertebrate limb development. *Dev. Biol.* 152:50-61
- 78) Menkes, B., Litvac, B., y Illies, A. 1994. Spontaneous and induced cell degenerescence in relation to teratogenesis. *Rev. Roum D'Embryol. Cyt. Serie D* 1:47-60.
- 79) Mercader, N., Leonardo, E., Piedra, M., Martinez, C., Ros, M., y Torres, M., 2000. Opposing RA y FGF signals control proximo distal vertebrate limb development through regulation of Meis genes. *Development* 127, 3961-3970.
- 80) Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartweg, E. y Yuan, J. 1993. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 β -converting enzyme, a mammalian homologue of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* 75:653-660.
- 81) Montero, J., Gañan, Y., Macías, D., Rodriguez-León, J., Sanz-Ezquerro, J., Merino, R., Chimal, J., Nieto, A., y Hurlle, J. 2001. Role of FGFs in the control of programmed cell death during limb development. *Development* 128:2075-2084.
- 82) Moon, A., Boulet A., y Capecchi, M., 2000. Normal limb development in conditional mutants of Fgf4. *Development* 127:989-96.
- 83) Nagata, S. y Golstein, P. 1995. The Fas death factor. *Science*, 267: 1449-1456.
- 84) Nataraj A., Pathak, S. Hopwood, V., Mc Donell, T y Anasthaswamy, H. 1994. Bcl-2 oncogene blocks differentiation and extends viability but does not immortalize normal human keratinocytes. *Int. J. Oncology* 4:1211-1218.
- 85) Niederreither K, McCaffery P, Drager UC, Chambon P, y Dolle P. 1997. Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mech Dev.* 62(1):67-78.
- 86) Niswander, L., y Martin, G. 1992. FGF4 and BMP-2 have opposite effects on limb growth. *Nature.* 361:68-71

- 87) Niswander, L., Tickle, C., Vogel, A., Booth, I., y Martin, G.R. 1993. FGF4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth y patterning of the limb. *Cell* 75:579-589
- 88) Noji, S., Nohno, S., Koyama, E., Muto, K., Ohshima, K., Aoki, K., Tamura, K., Ohsugi, K., Ide, S., Taniguchi, S., y Saito. 1991. Retinoic acid induces polarizing activity but is unlikely to be a morphogen in the chick limb bud. *Nature* 350: 83-86
- 89) Oppenheim, R.W. 1991. Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neuros.* 14, 453-501.
- 90) Pautou, M. 1973. Morphogenesis of the feet of birds using interspecific cellular mixtures. I. Morphological study. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 29:175-196.
- 91) Pizzette, S., y Niswander, L. 1999. BMPs negatively regulate structure and function of the limb apical ectodermal ridge. *Development* 126: 883-894
- 92) Riddle, R.D. Johnson, E., Laufer, y C. Tabin. 1993. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75: 1401-1416
- 93) Rodriguez- León, L., Merino, R., Macias, D., Gañan, Y., Santiesteban, E., y Hurler, M. 1999. Retinoic acid regulates programmed cell death through BMP signalling. *Nature Cell Biology*. 1: 125-126
- 94) Roelink H., Augsburger A., Heemskerk J., Korzh V. y Norlin, S. 1994. Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homologue of hedgehog expressed by the notocord. *Cell* 76:761-75.
- 95) Ruberte E, Dolle P, Krust A, Zelent A, Morriss-Kay G, y Chambon P. 1990. Specific spatial and temporal distribution of retinoic acid receptor gamma transcripts during mouse embryogenesis. *Development*. 108(2):213-22.
- 96) Salas-Vidal, E. Valencia, C., y Covarrubias, L. 2001. Differential tissue growth and patterns of cell death in the mouse autopod limb morphogenesis. *Dev. Dyn.* 220:295-306.
- 97) Saunders, J., Gasseling, M., Saunders, L. 1962. Cellular death in morphogenesis of the avian wing. *Dev. Biol.* 5:147-178.
- 98) Saunders, J.W. 1966. Death in embryonic systems. *Science* 154: 604-612

- 99) Savage, M., y Fallon. 1995. FGF-2 mRNA and its antisense message are expressed in a developmentally specific manner in the chick limb bud and mesonephros. *Dev. Dyn.* 202:343-353.
- 100) Schuh TJ, Hall BL, Kraft JC, Privalsky ML, y Kimelman D. 1993. v-erbA and cital reduce the teratogenic effects of all-trans retinoic acid and retinol, respectively, in *Xenopus* embryogenesis. *Development.* 119(3):785-98.
- 101) Schultze-Osthoff, K., Walczak, H., Droge, W., Krammer, P. 1994. Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J Cell Biol.* 127:15-20.
- 102) Shen, S., Brink, W., van der Kruijer, y van der Saag. 1992. Embryonic stem cells stably transfected with mRARb2-lacZ exhibit specific expression in chimeric embryos. *Int. J. Dev. Biol.* 36: 465-476
- 103) Steller, H. 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, 267: 1445-1449.
- 104) Stratford, T., Horton, C, y Maden, M. 1996. Retinoic acid is required for the initiation of outgrowth in the chick limb bud. *Current Biol.* 6:1124-1133.
- 105) Stratford T, Logan C, Zile M, Maden M. 1999. Abnormal anteroposterior and dorsoventral patterning of the limb bud in the absence of retinoids. *Mech Dev.* 81(1-2):115-25.
- 106) Sulik, K y Dehart, D. 1988. Retinoic acid-induced limb malformations resulting from apical ectodermal ridge cell death. *Teratology* 37:527-537
- 107) Suzuki, H., Sakamoto, T., Yoshida, T Sugimura, T., Terada, T., y Solursh, M.1992. Localization of Hst1 transcripts to the apical ectodermal ridge in the mouse embryo. *Dev. Biol.* 150: 219-222.
- 108) Taketo T, y Koide SS. 1981. In vitro development of testis and ovary from indifferent fetal mouse gonads. *Dev Biol.* 84(1):61-6.
- 109) Tata, J.R. 1994. Hormonal regulation of programmed cell death during amphibian metamorphosis. *Biochem. Cell Biol.* 72, 581-588
- 110) Tickle, C., Alberts, B., Wolpert L., y Lee, J. 1982. Local aplication of retinoic acid to the limb bord mimics the action of the polarizing region. *Nature* 296:564-66

- 111) Tickle C, Lee J, Eichele G. 1985. A quantitative analysis of the effect of all-trans-retinoic acid on the pattern of chick wing development. *Dev Biol.* May;109(1):82-95.
- 112) Van der Hoeven, F., Schimmang, T., Volkmann, A., Mattei, M., Kyewski, B., y Ruther, U. 1994. Programmed cell death is affected in the novel mouse mutant Fused toes (Ft). *Development* 120, 2601-2607
- 113) Vaux, D.L., Haecker, G., y Stresser A., 1994. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 76:777-779.
- 114) Vaux, D.L. Weissman, I. y Kim, S. 1992. Prevention of programmed cell death in *Caenorhadithis elegans* by human bcl-1. *Science*, 258: 1955-1957.
- 115) Wanek, N., Muneoka, K., Holler-Dinsmore, G., Burton, R. y Bryant, S.1989. A staging system for mouse limb development. *J. Exp. Zool.* 249:41-49
- 116) Weil, M., Jacobson, M.D. Coles, H.S.R., Davies, T.J. Gardener, R. L., Raff, K.D. y Raff, M.C. 1996. Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J. Cell Biol.* 13:1053-1059.
- 117) Wong, G., Elwell, J., Oberley, L., y Goeddel D., 1989. Manganous Superoxide Dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of Tumor Necrosis Factor. *Cell* 58: 923-931.
- 118) Yang, Y., Drossopoulou G., Chuang P., Duprez, D., y Marti, E., 1997. Relationship between dose, distance and time in sonic hedgehog mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb. *Development* 124:4393-404
- 119) Yokouchi, Y., Sakiyama, J., Kameda, T., Iba, H., Suzuki, A., Ueno, N, y Kuroiwa, A., 1996. BMP2/4 mediate programmed cell death in chicken limb buds. *Development* 122:3275-3734
- 120) Zakeri, Z., Quaglino, D. y Ahuja, H., 1994. Apoptotic cell death in the mouse limb and its supression in the hammertoe mutant. *Dev. Biol.* 165 : 294-297.
- 121) Zhao, D., McCaffery, P., Ivins, K., Neve, R., Hogan, P., Chin, W., y Frage, U. 1996. Molecular identification of a major retinoic-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase. *Eur. J. Biochem* 240:15-22.

- 122) Zou, H., y Niswander, L., 1996. Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science* 272: 738-741.
- 123) Zou, H., Wieser, J. Massague, J., y Niswander, L.1997. Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev.* 11:2191-2203.
- 124) Zwilling, E. 1956. Interaction between limb bud ectoderm and mesoderm in the chick embryo. Axis establishment. *J Exp. Zool.* 132:157-171.

APÉNDICE

Agua DEPC

DEPC(Dietil- pirocarbonato) al 0.1% en agua bidestilada

SSC 20x pH= 5 (100ml)

NaCl	17.53grs
Citrato de Na	8.82grs
Agua DEPC	100ml

Ajustar pH con ácido cítrico

SDS 10% (100ml)

SDS	10grs
Agua DEPC	100ml

Tris-HCl 1M (100ml) pH=7.5

Tris ácido	15.76grs
Agua DEPC	100ml

Tris Base 1M pH=9.5 (100ml)

Tris base	18.12grs
Agua DEPC	100ml

MgCl₂ 1M(100ml)

MgCl ₂	9.5grs
Agua DEPC	100ml

NaCl 5M (100ml)

NaCl	29.2grs
Agua DEPC	100ml

PBS 10x pH=7.4 (100ml)

NaCl	8grs
KCl	200grs
Na ₂ HPO ₄	14grs
KH ₂ PO ₄	240mg
Agua	100ml

Solución amortiguadora número 1 (100ml)

NaCl 5M	30ml
Tris-HCl 1M	10ml
Agua bidestilada	60ml

Solución bloqueadora

Reactivo bloqueador (Boehringer) al 0.5% en Solución amortiguadora número 1

NTMT (100ml)

NaCl 5M	2ml
Tris-HCl 1M	10ml
MgCl ₂	5ml
0.1% Tween 20	1ml
2mM levimasole	48mg
Agua DEPC	82.9ml

SOLUCIONES PARA HIBRIDACION**PBT (100ml)**

01.% Tween 20	100µl
PBS 10x	10ml
Agua DEPC	89ml

Solución 1 (100ml)

Formamida 100%	50ml
SSC 20x	25ml
1% SDS	1ml
Agua DEPC	14ml

Solución 2 (100ml)

NaCl 5M	10ml
Tris-HCl pH=7.5 1M	1ml
0.1% Tween 20	0.1ml
Agua DEPC	88.9 ml

Solución 1:1 (100ml)

Solución 1	50ml
Solución2	50ml

Solución 3 (100ml)

Formamida 100%	50ml
SSC 20x	10ml
Agua DEPC	40ml

TBST 10x (100ml)

NaCl	8grs
KCl	0.2grs
Tris-HCl pH=7.5 1M	25ml
Tween 20	10ml
Agua DEPC	65ml

En el día de su uso se diluye a 1x y se agrega 0.48mg de polvo de levimasole por 1 ml de TBST.

Solución de prehibridación (100ml)

Formamida 100%	50ml
SSC 20x	25ml
RNA _t yeast 10µg/µl	0.5ml
SDS 10%	10ml
Heparina 10µg/µl	0.5ml
Agua DEPC	14ml