



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

TGF-BETA REGULA NEGATIVAMENTE LA EXPRESION
DE BMP Y TBX DURANTE EL ESTABLECIMIENTO DE LA
IDENTIDAD DE LOS DEDOS EN EMBRIONES DE POLLO.

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:

KARLA VERONICA GARCIA CRUZ



Tutor: DR. JESUS CHIMAL MONROY

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

División de Estudios Profesionales

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:
TGF-Beta regula negativamente la expresión de Bmp y Tbx durante el
establecimiento de la identidad de los dedos en embriones de pollo.

realizado por García Cruz Karla Verónica

con número de cuenta 09805178-6, quien cubrió los créditos de la licenciatura en
Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Tutor (a)
Propietario

Dr. Jesús Chimal Monroy

Propietario

Dr. Iván Velasco Velázquez

Propietario

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza

Suplente

Dra. Rosa Estela Navarro González

Suplente

Dr David Garciadiego Cázares

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D.F., a 26 de junio
CONSEJO DEPARTAMENTAL DE BIOLOGIA

del 2006.



M. EN C. ~~JUAN MANUEL RODRIGUEZ CHAVEZ~~

TGF-Beta regula negativamente la expresión de Bmp y Tbx durante el establecimiento de la identidad de los dedos en embriones de pollo.

Karla Verónica García Cruz

2006

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó con el financiamiento de los proyectos 34334-N y 42568Q auspiciados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), y con el apoyo a los proyectos IN200205 y INI216701 de DGAPA, UNAM.

Agradezco el apoyo técnico de la M. en C. Marcia Bustamante Zepeda durante la realización del trabajo experimental de dicho proyecto y a Lucia Brito por el respaldo bibliotecario.

Agradezco a los miembros del jurado Dr. Iván Velasco Velásquez, Dra. Norma angélica Moreno Mendoza, Dra. Rosa Estela Navarro González, Dr. David Garcíadiego Cázares por sus recomendaciones sobre este trabajo. De forma muy especial agradezco al Dr. Jesús Chimal Monroy por la dirección de este trabajo de tesis, dedicación, apoyo y por hacer de mi tesis, el trabajo que yo quería que fuera. Gracias.

A Georgina Medina Vázquez por el trabajo en conjunto sobre la realización de esta tesis.

Para Dios mi señor, quien siempre me escuchó y me dio fuerza para seguir adelante en todo momento y lugar, gracias.

Para mis padres, quienes han puesto toda su vida en sus hijas y jamás se rindieron ante nada, gracias fiu,fiu y cruzi por todo.

Para mí querida hermana Azeneth por ser mi compañera en todo, sin ti todo hubiera sido muy difícil y aburrido.

DEDICATORIAS

Quiero dedicar esta tesis a todos los estudiantes que se esfuerzan por ser mejores personas de las que ya son, por ellos, ya que solo un estudiante sabe lo que significa ser mejor a base de sacrificios y esfuerzos.

A mi novio Rodolfo Conde Martínez, por que sin su apoyo, paciencia y amor, mi vida sería un caos, agradezco de todo corazón que seas tú con quien comparta este momento de mi vida.

A mis compañeros y amigos de la Facultad de Ciencias, Nancy Araceli Alvarado Albino, Felipe Rendón, Iris Rosario y Tetis, Cristian Mariscal, José Ásael, Amarantaceae, Gerardo (güero), Gaby y Vane, Pedro David, Fabian, Ileana y a todos los que nos veíamos en el Sitio y en la cafeta (¿recuerdan el Sitio, verdad?).

A mis compas y amigos del Lab, Minerva Rodríguez, Sinué Fonseca, Gina, René, David, Karina Mares, Alberto Ríos, Ricardo García, Marcia, Emelí Cortina (por todo su apoyo y amistad), Martha (gracias por la clase de portugués), y David Chiquito (ni tanto, ya es un men, gracias por las clases de EndNnote); o lo que es lo mismo: Min, Sin, Gin, Men, Rich, Albert, March, Kares, Em y Marth, gracias a ustedes el Lab es un lugar ameno para trabajar.

A mis compañeras de la escuela Claudia y Ana Georgina que siempre van conmigo en mi corazón, gracias por esos hermosos recuerdos.

A mi prepa 5 donde pasé uno de los mejores momentos de mi vida y me decidí por esta hermosa carrera donde nunca terminas de maravillarte.

A mi Alma Mater, la Universidad Nacional Autónoma de México, donde se forjan los mejores profesionistas de este país y en donde el espíritu se enaltece en especial a la Facultad de Ciencias donde tuve los mejores maestros y viví cosas inolvidables.

Muchas Gracias

Tout sera révéleé dés que l'homme Saura De quels Lienux il arive et
dans quels il ira

Todo se ha de saber cuando el hombre conozca de qué lugar procede y a que
lugar irá.

Monte de los Olivos. Alfred de Vigny. 1844

Contenido

LISTA DE ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1.1 Patrón estructural básico de la extremidad de los vertebrados.....	6
1.1.2 Origen de la extremidad de pollo.....	8
1.2.1 Señales que permiten el crecimiento próximo-distal de la extremidad embrionaria.....	10
1.2.2 Señales reguladoras de la Cresta Ectodérmica Apical	12
1.3.1 Establecimiento de señales que permiten la polaridad Dorsal-Ventral durante el desarrollo de la extremidad.....	13
1.4.1 Establecimiento de señales que permiten la polaridad Anterior-Posterior durante el desarrollo de la extremidad.....	14
1.4.2 Regulación de la señalización de SHH	18
1.5.1 Integración de los centros de inducción de la extremidad de pollo.....	18
1.6.1 Identidad Digital. Etapa temprana	20
1.6.2 Identidad Digital. Etapa tardía	25
1.7.1 La superfamilia de los TGF- β	27
1.7.2 Transducción de la señalización de TGF- β	31
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
3. HIPÓTESIS.....	33
4. OBJETIVO GENERAL	33
4.1 Objetivo Particular.....	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1 Material Biológico.....	34
5.2 Reconstitución de TGF- β 1.....	34
5.3 Preparación de las perlas.....	35
5.4 Análisis morfológico.....	36
5.5 Preparación de las ribosondas, <i>Tbx2</i> , <i>Tbx3</i> , <i>Bmp-2</i> , <i>Bmp-4</i> y <i>Bmp-7</i>	36
5.6 Hibridación in situ para <i>Tbx2</i> , <i>Tbx3</i> , <i>Bmp-2</i> , <i>Bmp-4</i> y <i>Bmp-7</i>	38
6. RESULTADOS	41
6.1 El TGF- β 1 induce cambios en la morfología de los elementos esqueléticos del autópodo y cambios en la identidad de los dedos.....	41
6.2 TGF- β 1 inhibe la expresión de <i>Tbx3</i> pero no la de <i>Tbx2</i> durante el establecimiento de la identidad de los dedos.....	43
6.3 TGF- β 1 inhibe la expresión de <i>Bmp-2</i> , <i>Bmp-7</i> y <i>Bmp-4</i> durante el cambio de la identidad de los dedos.....	46

7. DISCUSIÓN	52
7.1 La función de TGF- β en etapas tempranas es regular el número de falanges durante el establecimiento de la identidad de los dedos.	52
7.2 TGF- β 1 induce cambios en la identidad de los dedos posteriores en anteriores.....	52
7.3 La aplicación de TGF- β 1 genera fenotipos similares al Síndrome Mamario Ulnario.	53
7.4 TGF- β inhibe la expresión de <i>Tbx3</i> y <i>Bmp</i> durante el proceso de cambio en la identidad digital.	54
7.5 <i>Tbx2</i> y <i>Tbx3</i> poseen un papel dual durante la morfogénesis de la extremidad.	55
7.6 <i>Tbx2</i> y <i>Shh</i> no participan en el cambio en la identidad de los dedos inducido por TGF- β	55
8. CONCLUSIÓN	56
9. PERSPECTIVAS	57
10. APÉNDICE	58
11. REFERENCIAS	61

RESUMEN

Durante el desarrollo inicial de la extremidad se expresan genes involucrados en el establecimiento de la identidad digital. La identidad digital la definimos por el número de falanges y morfología particular de cada dedo (Dahn y Fallon, 2000). Entre las moléculas encargadas del establecimiento de la identidad digital en etapas tempranas se encuentran *Sonic Hedgehog (Shh)*, *T-box (Tbx)* y las Proteínas Morfogenéticas del Hueso (*Bmp*).

En el presente trabajo se evaluó el papel del Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β), una molécula que se expresa en la región posterior de la extremidad temprana y que desaparece durante el establecimiento de la identidad de los dedos. Además se ha visto que esta molécula regula el número de falanges en etapas tardías (Merino, *et al.* 1999).

Para conocer el papel de TGF- β en el desarrollo de la extremidad, se aplicó la proteína TGF- β en la región posterior de la extremidad, en etapas de especificación de la identidad digital. Esto resultó en el cambio en la identidad de los dedos posteriores hacia anteriores y en la formación de fenotipos similares al Síndrome Mamario Ulnario, el cual es generado por las mutaciones en el gen *Tbx3* en humanos. Para establecer los mecanismos moleculares mediante los cuales TGF- β induce estos fenotipos realizamos hibridaciones *in situ* para conocer la regulación de *Tbx2*, *Tbx3*, *Bmp-2*, *Bmp-4* y *Bmp-7*; encontrando que *Tbx3* y *Bmp* se regulan negativamente durante el cambio en la identidad de los dedos, mientras que *Tbx2* no lo hace. Estos resultados sugieren que la función de TGF- β en la región posterior es inhibir el número de falanges que van a

desarrollarse y a las moléculas que determinan la identidad posterior de los dedos en etapas tempranas.

INTRODUCCIÓN

1.1.1 Patrón estructural básico de la extremidad de los vertebrados.

La extremidad embrionaria de los vertebrados es una estructura simple que consiste en un núcleo de células mesenquimatosas de origen mesodérmico envueltas en una capa de ectodermo. Al avanzar el desarrollo, estas células mesenquimatosas proliferan por acción del ectodermo permitiendo la elongación de la extremidad. Cuando las células mesenquimatosas se diferencian en cartílago, éste se ramifica y articula, formando así los diferentes elementos esqueléticos como por ejemplo, los dedos. Existen señales moleculares emitidas tanto por las células mesenquimatosas como ectodérmicas que interactúan otorgando la morfología y número de falanges que posee cada dedo, lo cual permite diferencias entre cada uno de ellos. El contenido e intensidad de estas señales explican las diferentes morfologías entre las extremidades de los vertebrados, que les ha permitido a lo largo de la evolución desenvolverse exitosamente bajo diferentes ambientes y realizar diversas actividades como correr, nadar, saltar o volar.

A pesar de las diferencias entre las extremidades de los vertebrados, todas siguen un patrón estructural básico en la organización de sus elementos esqueléticos, tanto en las extremidades anteriores como en las extremidades posteriores, ya que todos poseen un **estilópodo** (húmero/fémur), el cual se encuentra adyacente a la pared del cuerpo, el **zeugópodo** (radio-ulna/tibia-fíbula) posicionado en la parte media y finalmente el **autópodo**, (conformado por los tarsos, metatarsos, carpos, metacarpos y dedos), está localizado en la parte más distal de la pared del cuerpo del embrión (Fig. 1).

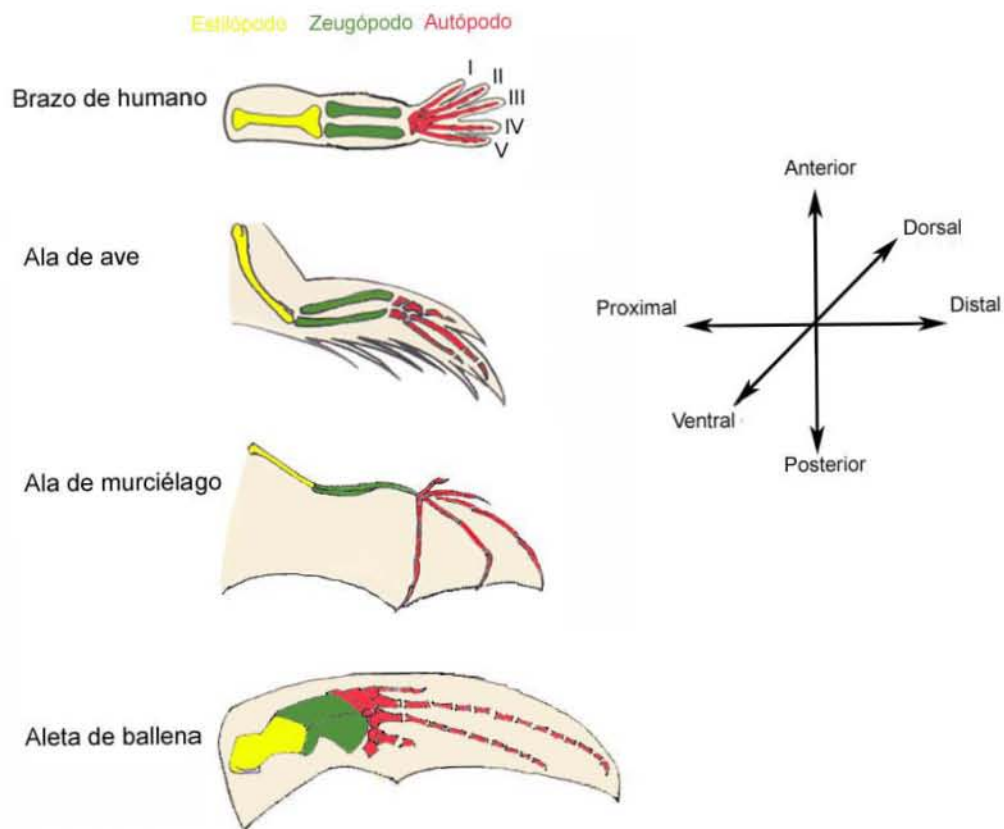


Figura 1. Patrón Estructural Básico de la Extremidad de Vertebrados. **Extremidades anteriores de humano, ave, murciélago y ballena. Todas poseen un patrón esquelético básico conformado por el estilópodo (con un elemento esquelético), un zeugópodo (con dos elementos esqueléticos) y autópodo (varios elementos esqueléticos). En este patrón esquelético se pueden ubicar tres ejes: proximal-distal, anterior-posterior y dorsal-ventral.**

Aunque todas las especies de vertebrados tienen este patrón estructural básico en sus extremidades, el patrón presenta variaciones morfológicas debido a las distintas adaptaciones que ha sufrido los organismos a través de su historia evolutiva.

Los mecanismos por los cuales se establece este patrón básico no están totalmente esclarecidos. En particular, la extremidad embrionaria de pollo representa un buen modelo para el estudio de los patrones de desarrollo de la extremidad de vertebrados,

debido a que su manipulación es sencilla y tiene un periodo de desarrollo de 21 días, el cuál es relativamente más corto en comparación con otros vertebrados.

Para estudiar la extremidad embrionaria de pollo ésta se ha dividido en tres principales ejes, el Próximo-Distal, Anterior-Posterior y Dorsal-Ventral (Fig. 1).

En dirección al eje próximo-distal, se encuentra el estilópodo, el zeugópodo y el autópedo. En dirección del eje anterior-posterior, se ubican el radio y la ulna en la extremidad anterior, la tibia y la fíbula en la extremidad posterior. Mientras que en el autópedo, la dirección del eje anterior-posterior, para el caso del humano, se encuentra del pulgar o dedo I al el dedo meñique o dedo V (Fig. 1).

En la dirección del eje dorsal-ventral, se ubican los nudillos en posición dorsal, en tanto que, las palmas de las manos y las plantas de los pies se localizan en la región ventral.

Todas estas regiones son interdependientes entre sí, cualquier alteración en alguna de las señales que dirige alguno de los tres ejes genera malformaciones en la extremidad.

1.1.2 Origen de la extremidad de pollo.

La extremidad de pollo se origina a partir de la proliferación de las células indiferenciadas mesenquimatosas provenientes de la Placa Lateral del Mesodermo (PLM) y de la migración de células provenientes de los somitas hacia el campo de la extremidad. Las células mesenquimales se acumulan por debajo del tejido epidérmico creando una protuberancia llamada **primordio de la extremidad**.

El primordio de la extremidad embrionaria de pollo crece a lo largo del eje próximo-distal, perpendicularmente al eje anterior-posterior del embrión a nivel de los somitas 15 a 20 para los primordios de las alas y 26 a 32 para los primordios de las patas.

Las propiedades de la PLM para inducir la formación de la extremidad, parecen estar influenciadas por tejidos adyacentes. Por ejemplo, el mesodermo intermedio (MI) es un

tejido que dará origen a los riñones a través de la diferenciación del mesonefros. La importancia del mesonefros radica en que la extremidad se desarrolla adyacente a él y se piensa que puede secretar moléculas hacia la PLM para inducir la extremidad, debido a que la eliminación o el bloqueo del desarrollo del mesonefros de pollo, no permite la formación de extremidades (Geduspan y Solursh. 1992).

Sin embargo, algunos experimentos (Fernandez-Teran, *et al.* 1997), demuestran que cualquier intrusión cercana al campo de la extremidad interfiere con su desarrollo, como es el resultado de los experimentos de Geduspan y Solursh (1992). No obstante, no se descarta que algún otro tejido del MI (cercano al campo de la extremidad) pueda influir en las células de la PLM al inducir la extremidad.

Recientemente, se ha encontrado la naturaleza molecular de las señales involucradas en la inducción de la extremidad, entre estas moléculas se encontró el Factor de Crecimiento Fibroblástico 8 (*Fgf-8*), esta es una molécula que se expresa en el mesodermo intermedio al tiempo en que se induce la extremidad (Crossley, *et al.* 1996). FGF-8 es capaz de generar extremidades ectópicas cuando se administra a través de perlas en la PLM (Cohn, *et al.* 1995). Adicionalmente, la expresión de *Fgf-8* en el mesodermo intermedio induce la expresión de otro *Fgf*, el *Fgf-10*, que se expresa en la PLM (el futuro mesénquima de la extremidad). Una vez que FGF-10 se ha establecido en el mesénquima de la extremidad, induce la expresión de FGF-8 en el futuro ectodermo de la extremidad (Ohuchi, *et al.* 1997). Una vez establecida la interacción ectodermo-mesénquima a través de *Fgf-8* y *Fgf-10*, queda establecido el primordio de la extremidad.

1.2.1 Señales que permiten el crecimiento próximo-distal de la extremidad embrionaria.

Una vez inducida la extremidad ocurre el crecimiento próximo-distal. El crecimiento próximo-distal sucede como consecuencia de una serie de interacciones celulares entre el mesénquima y un epitelio pseudoestratificado de origen ectodérmico, llamado **Cresta Ectodérmica Apical o AER**, (debido a su nominación en inglés Apical Ectodermal Ridge). La AER se posiciona en la región más distal de la extremidad justo en el límite entre el ectodermo dorsal y el ventral (Fig. 2).

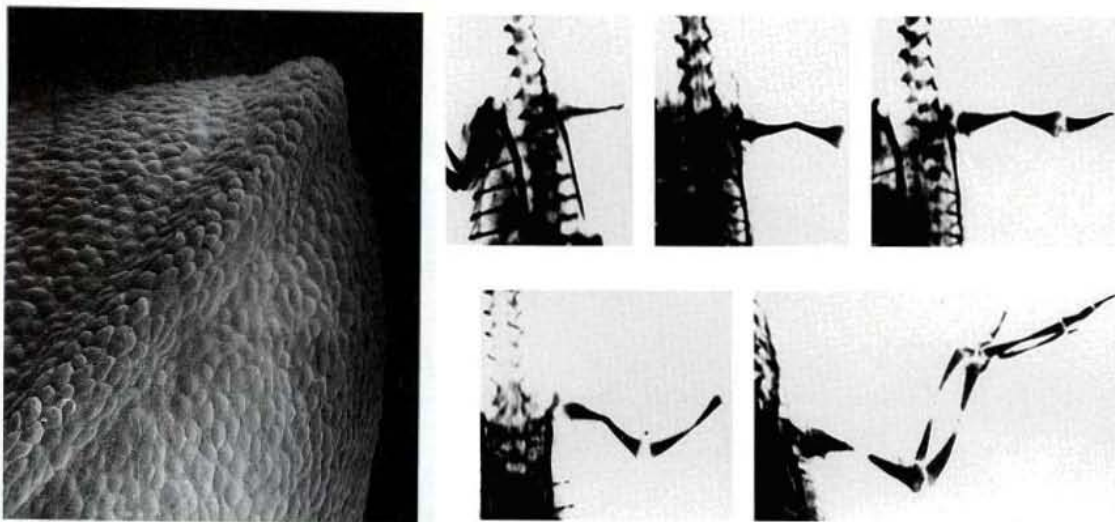


Figura 2. La Cresta Ectodérmica Apical (AER) dirige el Patrón Proximal-Distal. A la izquierda: Microscopia Electrónica de Barrido del primordio de la extremidad de pollo que muestra la AER. Derecha: la eliminación de la AER en diferentes etapas del desarrollo de la extremidad genera extremidades incompletas a diferentes niveles (Iten 1982); (Fotos tomadas de Gilbert. 2003).

La AER principalmente promueve la proliferación, y supervivencia de una región de células mesenquimatosas indiferenciadas, que se distribuyen dentro de aproximadamente 200 μm de distancia con respecto a la AER. A esta región se le conoce como **Zona de Progreso (ZP)**.

Distintos experimentos demuestran la importancia de la AER en el crecimiento de la extremidad. Saunders. (1948), removió la AER en distintas etapas del desarrollo de la extremidad de pollo, descubriendo que la extremidad se trunca dependiendo de la etapa de eliminación de la AER (Fig. 2). Estos experimentos demostraron que las señales de la AER son esenciales y continuamente requeridas para el crecimiento de la extremidad.

Actualmente, se conocen las señales provenientes de la AER que controlan el crecimiento próximo-distal de la extremidad. Estas señales son los FGF, principalmente FGF-8, ya que esta proteína es capaz de sustituir la función de la AER (Lewandoski, *et al.* 2000). Adicionalmente, los ratones knock out para el gen *Fgf-8* generan extremidades pequeñas con la ausencia de los elementos esqueléticos más distales (Lewandoski, *et al.* 2000).

Otro FGF secretado por la AER, es FGF-4, cuya expresión se encuentra en la región posterior de la AER y parece estar involucrado en el establecimiento de los elementos esqueléticos posteriores, ya que el ratón knock out de este gen presenta extremidades con la falta de los elementos posteriores (ulna, fíbula, y los dedos IV y V) (Niswander, *et al.* 1993).

Con la idea de demostrar el papel que juegan FGF-4 y FGF-8 en la AER, se construyó el doble knock out condicional de estos genes, bajo el promotor de un factor de transcripción conocido como MSX-2. Este factor transcripcional se expresa desde etapas muy tempranas durante el desarrollo de las extremidades, siendo la función negativa de *Fgf-8* y *Fgf-4* controlada por la expresión de *Msx-2*. El resultado encontrado por la anulación de *Fgf-8* y *Fgf-4*, fue que la extremidad logra inducirse e incluso se forma la AER, pero algunos elementos del zeugópodo y el autópedo no se forman correctamente. Este resultado es atribuido a la apoptosis que presenta el mesénquima

que se encuentra por debajo de la AER, confirmando así que las señales que envía la AER son indispensables para la sobrevivencia de las células del mesénquima de la zona de progreso de la extremidad (Sun, *et al.* 2002).

1.2.2 Señales reguladoras de la Cresta Ectodérmica Apical

La interacción entre el mesénquima y el ectodermo del primordio de la extremidad es fundamental para el mantenimiento de la AER, debido a que la sobreexpresión de *Fgf-10* en extremidades sin AER induce la expresión ectópica de *Fgf-8* en el mesenquima de la extremidad, recuperando parte del fenotipo normal de la extremidad (Ohuchi, *et al.* 1997). A su vez la eliminación de la AER disminuye significativamente la expresión de *Fgf-10* en el mesénquima de la extremidad, lo que se demuestra que la interacción entre las moléculas del mesénquima y del ectodermo mantiene el crecimiento de la extremidad.

Con el fin de encontrar cuáles son las señales que inducen la formación de la AER se identificaron a los genes *Wnt-3* y *Wnt-3a*. Estas moléculas de señalización pertenecientes a la familia de los Wingless/int (WNT), se expresan en el futuro ectodermo de la extremidad y realizan su función mayoritariamente a través de un mediador intracelular, la β -catenina (Fig. 3). La interrupción de estos WNT por medio del bloqueo de la β -catenina rompe el balance entre FGF-8 y FGF-10, alterando el funcionamiento y estructura de la AER (Barrow, *et al.* 2003). Asimismo, los ratones knock out tanto de *Wnt-3* y *Wnt-3a* presentan truncamientos en las extremidades similares a las obtenidas por la eliminación de la AER, y disminuye el tamaño de esta estructura significativamente. Por lo que *Wnt-3* y *Wnt-3a* son señales requeridas para el establecimiento y mantenimiento de la AER (Fig. 3; Kawakami, *et al.* 2001).

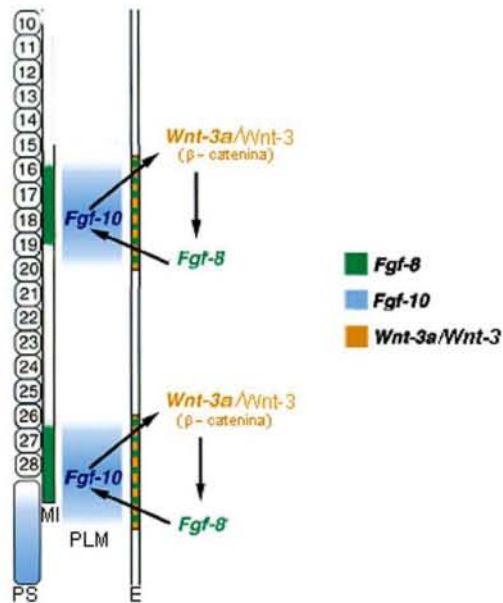


Figura 3 Modelo de las Señales Reguladoras del establecimiento de la AER. La Placa Lateral del Mesodermo (PLM), secreta FGF10 (azul), hacia el ectodermo (E) de la extremidad, esta señal induce a Wnt3a y Wnt3 (amarillo), resultando en la activación de FGF-8 para formación de la AER. (modificada de Kawakami et al. 2001). En números se encuentran las somitas; Placa segmental (PS); Mesodermo intermedio (MI).

1.3.1 Establecimiento de señales que permiten la polaridad Dorsal-Ventral durante el desarrollo de la extremidad.

Al igual que en el crecimiento próximo-distal, las interacciones entre el mesénquima y el ectodermo de la extremidad conllevan al establecimiento de la polaridad dorsal-ventral.

En 1974, Mac Cabe y colaboradores implantaron ectodermo de primordio de la extremidad de pollo rotado 180 grados con respecto al mesénquima de la extremidad. Las extremidades obtenidas muestran reversión dorso-ventral de sus partes más distales, es decir, que los elementos que se encuentran en la región dorsal (las garras y las escamas de la pata de pollo), ahora se encuentran en la región ventral, y los componentes de la región ventral (como los cojinetes), ahora se disponen en la región dorsal. Lo cual sugiere que el ectodermo embrionario ejerce un papel significativo sobre la diferenciación y la organización dorso-ventral del mesénquima en el embrión de pollo.

Actualmente se conocen las moléculas secretadas por el ectodermo dorsal y ventral que regulan dicha polaridad. El gen *Wnt-7a* se expresa en el ectodermo dorsal y regula la expresión del factor transcripcional *Lmx-1*, el cual se expresa en el mesénquima dorsal. Los ratones knock out tanto de *Wnt-7a* como de *Lmx-1* generan extremidades biventrales, lo cual muestra el papel determinante de *Wnt-7a* y *Lmx-1* en la formación de las estructuras dorsales (Parr y McMahon. 1995; Riddle, *et al.* 1995).

Por otro lado, el ectodermo ventral expresa el factor transcripcional *Engrailed-1* (*En-1*), su control en la polaridad ventral se conoció cuando se sobreexpresó en el ectodermo dorsal, encontrando que inhibe a *Wnt-7a* y a *Lmx-1*, lo que tiene como resultado extremidades con doble polaridad ventral (Pizette, *et al.* 2001). Por el contrario, los ratones *En-1^{-/-}*, amplifican la expresión de *Wnt7a* hacia el ectodermo ventral, formando extremidades bidorsales (Loomis, *et al.* 1996). Estos datos establecen claramente que *Engrailed-1* está involucrado en el establecimiento de la polaridad ventral. Es importante señalar que entre los límites de la expresión de *Wnt-7a* y *En-1* ocurre la formación de la AER.

1.4.1 Establecimiento de señales que permiten la polaridad Anterior-Posterior durante el desarrollo de la extremidad.

En la zona posterior del primordio de la extremidad existe un grupo de células mesenquimatosas que dirige la polaridad anterior-posterior de la extremidad; que recibe el nombre de **Zona de Actividad Polarizante** o **ZPA**. La ZPA se encarga de controlar la formación del radio- ulna/tibia-fíbula, en el zeugópodo y los dedos en el autópedo.

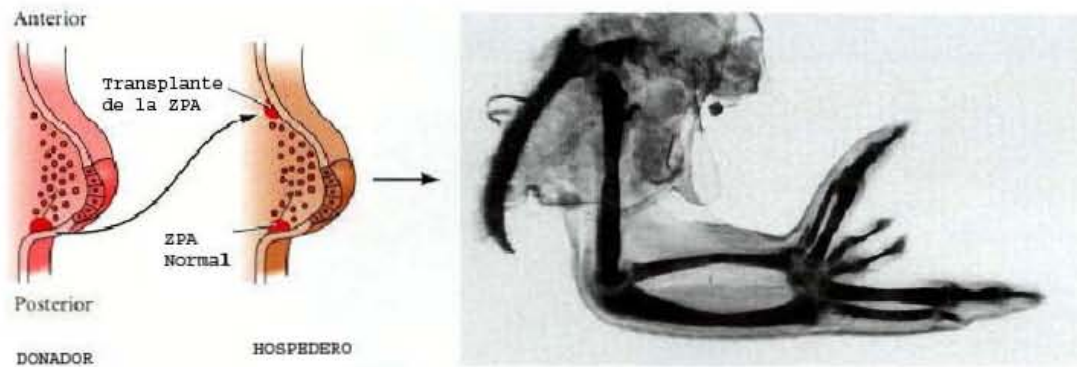


Figura 4. La ZPA regula el eje anterior-posterior de la extremidad. El trasplante de las células de la ZPA en la región anterior del primordio de la extremidad de un embrión hospedero genera duplicaciones digitales en imagen especular. (Honig y Summerbell. 1985); tomada de Gilbert, 2003.

Experimentos clásicos donde se transplantan células de la ZPA hacia la región anterior de una ala de pollo resultaron en la duplicación del patrón digital en imagen especular, es decir, se forman autópodos con un patrón digital, IV, III, II, II, III, IV. Este resultado demuestra que la ZPA dirige el patrón anterior-posterior de la extremidad (Fig. 4; (Saunders y Gasseling. 1963; Tickle, *et al.* 1975).

En otros experimentos, controlaron el número de células de la ZPA que se transplantan en la región anterior del primordio de la extremidad en etapas tempranas, demostrando que el número de dedos ectópicos que se inducen en la región anterior depende del número de células que se colocan en dicha región (Tickle. 1981). Este resultado sugirió la existencia de un gradiente morfogenético secretado por las células de la ZPA hacia las células más anteriores del primordio de la extremidad; en donde los diferentes umbrales del morfógeno dependen de la distancia hacia la fuente de este gradiente (la ZPA) e inducen las diferentes estructuras de la extremidad (Wolpert. 1969).

Con el fin de encontrar las moléculas secretadas por la ZPA y por tanto responsables de la polaridad anterior-posterior, se probaron varias moléculas capaces de imitar los efectos de la ZPA.

La primera molécula encontrada fue un derivado de la vitamina A, conocido como el Ácido Retinoico, el cual reproduce los efectos de la ZPA en la región anterior del primordio de la extremidad de pollo (Tickle, *et al.* 1982). Sin embargo, se descartó como el morfógeno de la ZPA debido a que no es capaz de difundirse a través del primordio de la extremidad (Wanek, *et al.* 1991), además, induce en la región anterior de la extremidad una mayor cantidad de receptores tipo β para Ácido Retinoico, que los expresados endógenamente en la región posterior (Noji, *et al.* 1991). Estos resultados sugieren que el Ácido Retinoico participa en el establecimiento de la ZPA.

Posteriormente, se encontró que el gen *Sonic Hedgehog* (*Shh*), un homólogo del *Hedgehog* en *Drosophila sp.* se expresa en las células de la ZPA (Fig. 5A).

La proteína SHH cuando es aplicada en la región anterior del primordio de la extremidad, reproduce los efectos de la ZPA (Fig. 6; Riddle, *et al.* 1993). Además, la inducción de autópodos en imagen especular con ácido retinoico, mostró que *Shh* se expresa ectópicamente en la región anterior, 24 horas después de la aplicación de ácido retinoico. Estos resultados llevaron a la conclusión de que *Shh* es la molécula secretada por la ZPA y que el ácido retinoico es el inductor de la ZPA y de *Shh*.

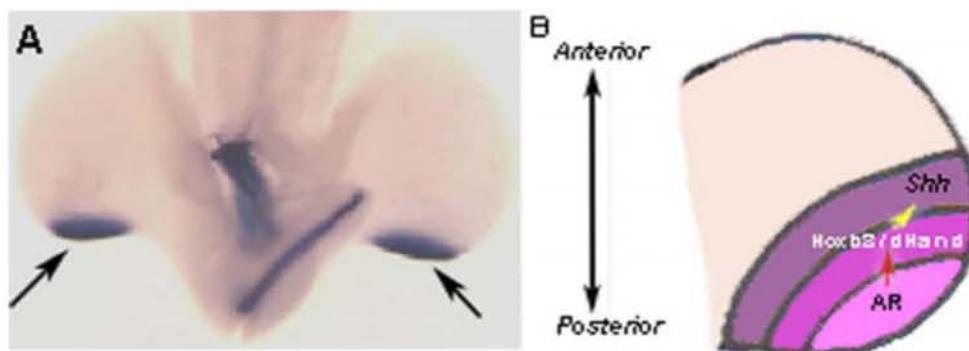


Figura 5. *Shh* es el morfógeno secretado por la ZPA. (A) Hibridación *in situ* de *Shh*, muestra que este gen se expresa en las células de la ZPA (indicada por flechas negras). (B) Moléculas participantes del establecimiento de la ZPA. El ácido retinoico (AR) es la primera molécula secretada por la ZPA e induce a *Hoxb8* y a *dHand* (indicada por flecha roja), los cuales activan el gradiente morfogenético de *Shh* a través de la extremidad (flecha amarilla).

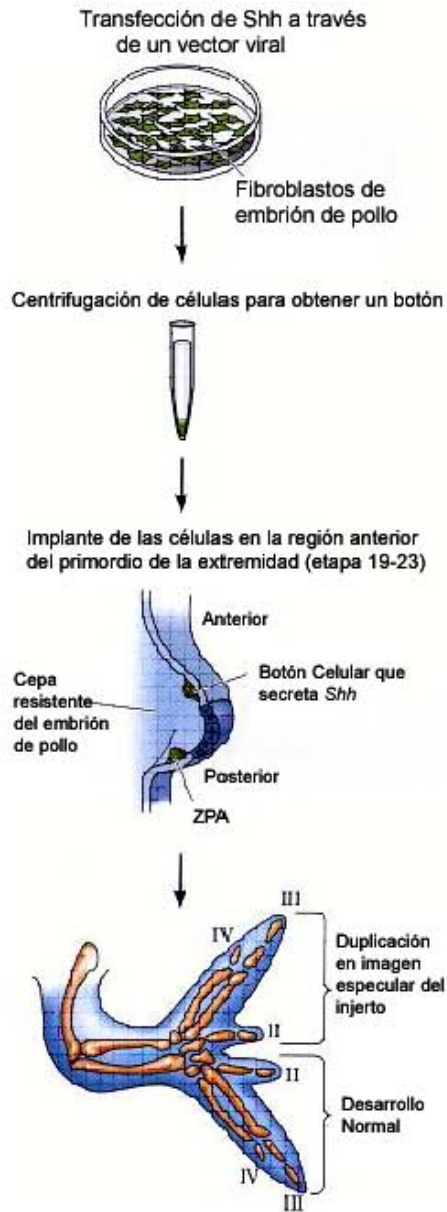


Figura 6. La expresión de *Shh* a través de fibroblastos transfectados con un vector viral, en la región anterior del primordio de la extremidad de pollo, genera duplicaciones en imagen especular. Nótese el patrón esquelético digital IV, III, II, II, III, IV. (Riddle, *et al.* 1993) (Foto tomada de Gilbert, 2003).

En la búsqueda de las moléculas intermediarias entre el Ácido Retinoico y *Shh* se encontró a *Hoxb8* (un gen homeótico perteneciente a la familia de los Homeobox y al

factor transcripcional dHAND (perteneciente a los factores de transcripción bHLH). Estos genes inducen una ZPA ectópica en la región anterior de la extremidad seguido de la expresión de *Shh*. (Fig. 5B). Las mutaciones en *Hoxb8* y *dHand* mostraron extremidades con los elementos posteriores reducidos, así mismo, no expresan *Shh* y otros genes marcadores de la región posterior de la extremidad como *Hoxd11* y *Hoxd13* (Charite, *et al.* 1994; Charite, *et al.* 2000).

1.4.2 Regulación de la señalización de SHH

Para que SHH pueda llevar a cabo su señalización en una célula, es necesario que se una a su receptor Patched (Ptc), situado en la membrana celular. Este receptor se une a la proteína transmembranal Smoothened (Smo), que transduce la señal. Cuando SHH no se une a Ptc, Smo se encuentra inactivado, esto produce la proteólisis de una proteína que se localiza en los microtúbulos conocida como Glioblastoma 3 o GLI3, esta forma proteolítica de Gli3 penetra al núcleo celular y actúa como un represor transcripcional (Gli3R) de los genes blanco de SHH.

Sin embargo, cuando SHH se une a Ptc se activa Smo, el cual a través de fosforilaciones libera a Gli3 de los microtubulos previniendo así su proteólisis, es entonces, cuando Gli3 en su forma proteica completa entra en el núcleo celular y actúa como un activador transcripcional (Gli3A) de los genes blanco de *Shh*.

1.5.1 Integración de los centros de inducción de la extremidad de pollo.

A lo largo de esta introducción hemos visto a los tres ejes de la extremidad de forma independiente uno del otro. Sin embargo, es importante recalcar que la AER, la ZPA y

los ectodermos dorsal y ventral de la extremidad poseen actividades combinadas que cooperan en la regulación del patrón de desarrollo de la extremidad.

Como se mencionó anteriormente, la AER secreta FGF-8, el cual actúa sobre la Zona de Progreso manteniendo a las células en un estado de proliferación e indiferenciación. Estas señales, actúan de otra manera sobre la ZPA para coadyuvar en la formación del eje anterior-posterior. Por ejemplo, la sobreexpresión de *Fgf-4* en la región posterior del primordio de la extremidad de pollo, prolonga la expresión de *Shh* más allá de su tiempo de exposición normal, además es capaz de inducir ectópicamente a *Shh* cuando se aplica en la región anterior (Laufer, *et al.* 1994; Scherz, *et al.* 2004).

Por otro lado, se observó que la expresión ectópica de *Shh* inducida por *Fgf-4*, es mucho más notoria en el mesénquima próximo al ectodermo dorsal que en el mesénquima ventral; esta observación llevó a la sospecha de que existen señales provenientes del ectodermo dorsal que son requeridas para inducir a *Shh*, en este caso la señal es *Wnt-7a* (Fig. 7).

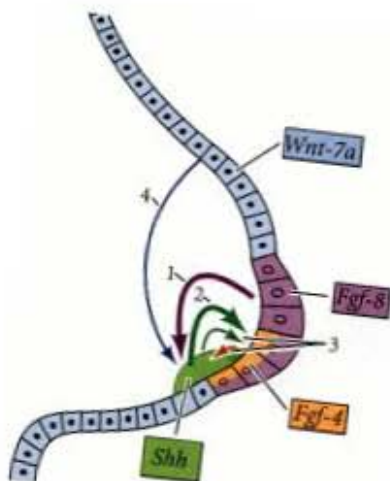


Figura 7. Interacción entre los Centros de Señalización de la Extremidad. (1) El establecimiento de la ZPA y de *Shh*, depende de la secreción de FGF-8 por la AER. (2) *Shh* induce a FGF-4 en la AER y se mantienen mutuamente. (3) La expresión de *Shh* es mantenida por *Wnt-7a* en el ectodermo dorsal (4). Las flechas anchas indican inducción y las delgadas el mantenimiento de la expresión. (Pearse y Tabin. 1998) (Foto tomada de Gilbert, 2003).

Con la idea de encontrar la relación entre *Shh* y *Wnt-7a*, se removió el ectodermo dorsal donde se expresa *Wnt-7a* y se evaluó la expresión de *Shh*; el resultado encontrado fue

una baja expresión de *Shh* y la pérdida de los elementos posteriores (ulna y dedo IV) (Yang y Niswander. 1995). En cambio, experimentos de ganancia de función sobre la remoción del ectodermo dorsal y por tanto de *Wnt-7a* demostraron que la expresión de *Shh* reaparece y se forman elementos posteriores, aunque estos elementos esqueléticos son de menor tamaño al normal. La reducción del tamaño esquelético condujo a la hipótesis sobre la falta de una molécula intermediaria entre *Shh* y *Wnt-7a*, esta molécula es *Fgf-4*, la cual aplicada conjuntamente con *Wnt-7a* en extremidades sin ectodermo dorsal restaura la expresión de *Shh* además del fenotipo y tamaño normal de las extremidades. Con estos experimentos se demuestra que las señales dorso-ventrales y próximo-distales integran la regulación del patrón anterior-posterior, durante el desarrollo normal de la extremidad de vertebrados (Fig. 7; Yang y Niswander 1995).

1.6.1 Identidad Digital. Etapa temprana

Una vez establecida la ZPA y el patrón anterior-posterior, esto desemboca en la asimetría de la extremidad, en la cual se contempla, la identidad de los dedos. La identidad de los dedos es conferida por las características particulares que posee cada dedo en cuanto al número de falanges, tamaño y morfología se refiere (Dahn y Fallon. 2000). En la pata de pollo la identidad digital está bien definida, ya que el dedo I posee dos falanges; el dedo II, tres; el dedo III, cuatro y el dedo IV, cinco falanges, además los dedos tienen distinto tamaño y forma (Fig. 8).

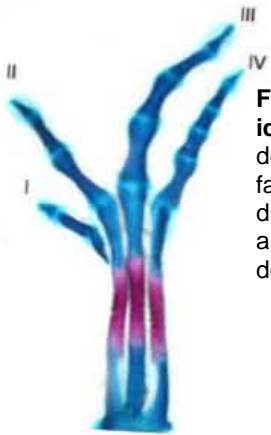


Figura 8. El autópodo de pollo tiene cuatro dedos con diferente identidad digital. Los dedos de pollo se caracterizan por poseer cuatro dedos con distinto tamaño y número de falanges ya que el dedo I tiene 2 falanges; el dedo II, tres; el dedo III, cuatro y el dedo IV, 5 falanges. Estas diferencias en el número de falanges y morfología de los dedos hacen del autópodo de pollo un buen modelo para el estudio de la identidad de los dedos.

El establecimiento de la identidad digital se lleva a cabo en dos etapas, una temprana dirigida por SHH y otra tardía dependiente de las BMP.

La idea de la participación de SHH en la formación de los dedos y su relación con la identidad digital, nació cuando se marcaron las células descendientes de las que expresaron *Shh* y además se determinó el tiempo y concentración necesarios para que el morfógeno lleve a cabo la especificación de cada dedo.

El marcaje del destino de las células que expresan SHH, demostró que estas forman parte de los dedos V y IV del autópodo de ratón (Harfe, *et al.* 2004). Por otro lado, cuando se aplica SHH en la región anterior del primordio de la extremidad de pollo, por un intervalo de 16 horas, se induce la duplicación de todos los dedos en imagen especular, por lo cual se concluyó que la especificación de los dedos posteriores depende del tiempo de exposición a SHH.

Por otra parte, el dedo III no está conformado por las células que expresan SHH, sin embargo, la formación de este dedo es inducida en la región anterior, solo por arriba de las 10 horas de exposición a SHH, esto sugiere que la especificación del dedo III depende tanto de la concentración, como del tiempo de exposición a SHH.

Finalmente, la formación del dedo II en la región anterior del primordio del ala de pollo, puede llevarse en pocas horas de exposición a SHH, por lo que este dedo es especificado independiente del tiempo, pero depende de la concentración y difusión de SHH (Harfe, *et al.* 2004). Estos datos condujeron a la formación de un modelo sobre la especificación digital donde los dedos V y IV de extremidades de ratón son determinados por el tiempo de exposición de SHH en el primordio de la extremidad, el dedo III depende tanto de la concentración como del tiempo de exposición de SHH, mientras que el dedo II solo depende de la difusión de SHH.

Otras funciones dependientes de SHH, son la formación de la ulna, los músculos y la piel de los dedos II, III, IV y V de la extremidad de ratón (Ahn y Joyner, 2004). Por lo cual, las células que responden al morfógeno SHH no solo se encargan del patrón esquelético anterior-posterior, además participan en la formación de la piel y los músculos de los elementos posteriores de la extremidad.

La participación de SHH en la identidad de los dedos quedó demostrada en la construcción de los mutantes nulos de *Shh* y de su regulador *Gli3*, en donde se encontró que los mutantes *Shh*^{-/-}, presentan autópodos faltantes de los dedos posteriores (sólo poseen el dedo I; Fig. 9 b), mientras que los mutantes *Gli3*^{-/-} presentan autópodos con polidactilias sin identidad digital y sindactilias (membranas interdigitales persistentes; Fig. 9 c). La producción de dobles knock out *SHH*^{-/-} *Gli3*^{-/-}, muestran fenotipos similares al de *Gli3*^{-/-} (Fig. 9 d), por lo que se concluyó que SHH solo se encarga de otorgar la identidad de los dedos posteriores pero necesita a *Gli3* para este proceso. Por otro lado el mutante *Shh*^{-/-} *Gli3*^{+/-} produjo únicamente dedos 1 en el autópodo (Fig. 9 e), demostrando que *Gli3* establece la identidad del dedo más anterior (el cual es independiente de la señal de SHH) y parece estar involucrado en regular el número de dedos que van a desarrollarse en el autópodo (Litingtung, *et al.* 2002).

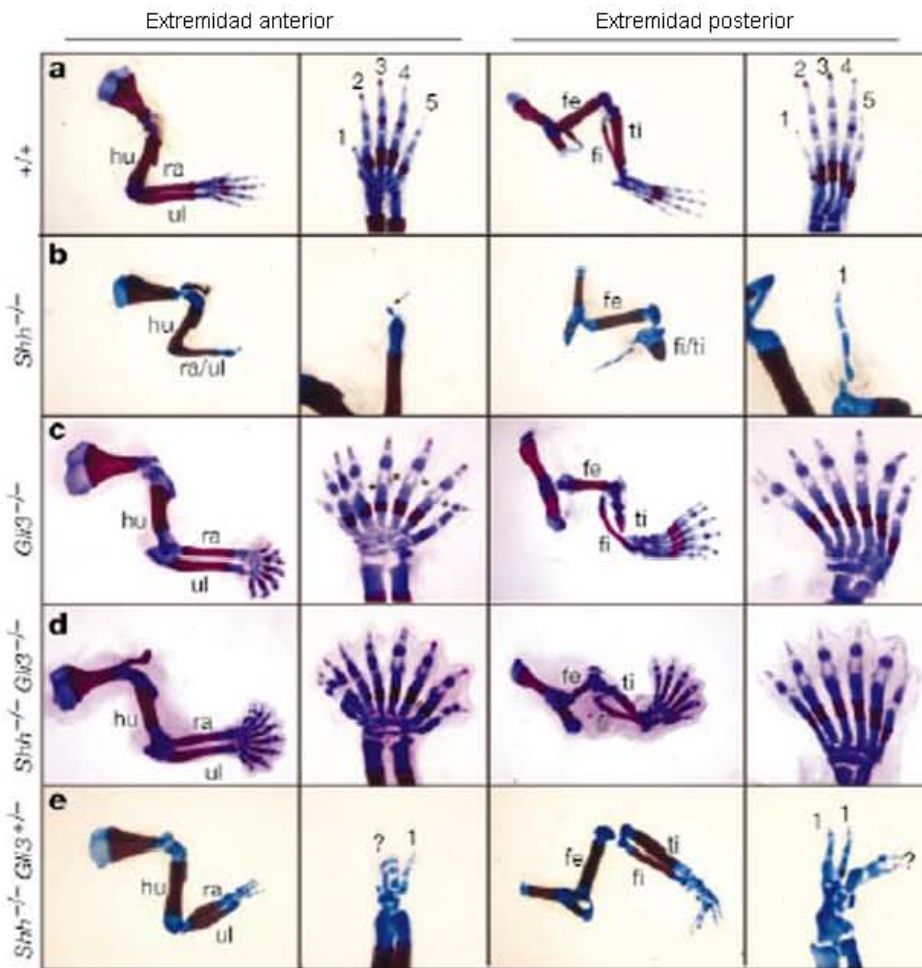


Figura 9. Shh y Gli3 regulan el número y la identidad de los dedos. La figura muestra las extremidades anteriores y posteriores producidas por los mutantes de $Shh^{-/-}$ (b), $Gli3^{-/-}$ (c), $Shh^{-/-} Gli3^{-/-}$ (d) y $Shh^{-/-} Gli3^{+/+}$ (a) Fenotipo normal, (b) $Shh^{-/-}$; estilópodos normales y zeugópodos fusionados o reducidos, los autópodos solo presentan el dedo 1; (c) $Gli3^{-/-}$, los elementos del estilópodo y zeugópodo son normales, con polidactilias en el autópodo y sin identidad digital; (d) $Shh^{-/-} Gli3^{-/-}$, el estilópodo reducido en la extremidad posterior y el zeugópodo normales pero los autópodos presentan sindactilias con polidactilias y sin identidad digital; (e) $Shh^{-/-} Gli3^{+/+}$, los elementos del zeugópodo se fusionan en la extremidades anteriores, los autópodos desarrollan varios elementos esqueléticos reconocidos como dedos 1. Elementos del estilópodo, hu, húmero; fe, fémur. Elementos del zeugópodo, ra, radio; ul, ulna; ti, tibia y fi, fibula. (Litingtung, *et al.* 2002)

Otro grupo de moléculas que colaboran con SHH para establecer la identidad de los dedos posteriores son los factores transcripcionales TBX2 y TBX3 (pertenecientes a la familia de los T-brachiury o T-box). La relación entre estos TBX con SHH se encontró cuando se colocó el morfógeno en la región anterior para inducir dedos extra,

descubriendo que *Tbx2* y *Tbx3* se expresan al poco tiempo en los sitios donde se aplicó SHH (Tumpel, *et al.* 2002).

Estos resultados sugieren que los Tbx juegan un papel importante en el establecimiento de la identidad de los dedos posteriores, esto se demostró cuando al sobreexpresar a *Tbx2* y *Tbx3* en la extremidad, se transforma la identidad de los dedos II y III en dedos III y IV respectivamente. Esto se evaluó por el número de falanges que adquieren, es decir, el dedo II que posee 3 falanges presenta una más, convirtiéndose en dedo III, lo mismo sucede para el dedo III que posee 4 falanges, se transforma en dedo IV con 5 falanges (Suzuki, *et al.* 2004).

En contraste, los dominantes negativos (formas proteicas truncadas) de TBX2 y TBX3, transforman la identidad de los dedos posteriores en anteriores, es decir, los dedos IV y III pierden ahora una falange y se transforman en dedos III y II, respectivamente. Además, se obtienen fenotipos con truncamientos de los elementos posteriores (Fig. 10).

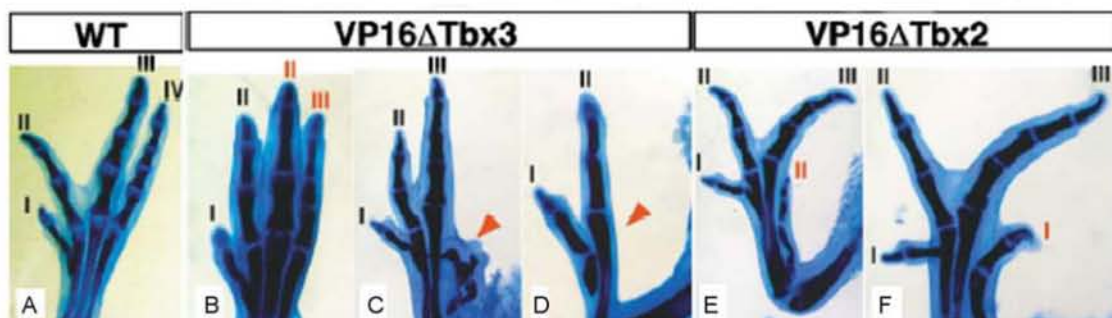


Figura 10. Las formas truncadas de TBX2 y TBX3 alteran el patrón digital. (A) Autópodo de pollo normal. B, la forma truncada de *Tbx3* transforma el dedo III y IV en dedos II y III respectivamente. En otros casos el truncamiento de *Tbx3* genera autópodos sin dedo IV (C), o ausentes de los dedos III y IV (D). La forma truncada de *Tbx2* genera dos fenotipos, transformación de dedo IV a dedo II (E) y la transformación del dedo IV a I (F), en todos los casos el dedo I y II son normales. (Suzuki, *et al.* 2004).

Este resultado se asoció al Síndrome Mamario-Ulnario presente en humanos, que se caracteriza por la pérdida de los dedos III, IV y V de la mano, ausencia de la ulna y reducción en las glándulas mamarias debido a una mutación en el gen *Tbx3*.

El mecanismo molecular por el cual TBX2 y TBX3 cambian la identidad de los dedos es a través de la regulación del gen *Shh* y otro gen involucrado en la identidad de los dedos, *Bmp-2* (Drossopoulou, et al. 2000).

La sobreexpresión de *Tbx2* amplifica la expresión de *Shh* y de *Bmp-2*, mientras que la sobreexpresión de *Tbx3* incrementa únicamente la expresión de *Bmp-2*. Mientras que la aplicación de la forma truncada de *Tbx2* inhibe tanto a *Shh* como a *Bmp-2*, y la forma truncada del gen de *Tbx3* solo inhibe la expresión de *Bmp-2*. Por lo que *Tbx2* cambia la identidad de los dedos a través de *Shh* y *Bmp-2*, entretanto *Tbx3* actúa en este proceso a través de *Bmp-2* (Suzuki, et al. 2004).

1.6.2 Identidad Digital. Etapa tardía

Aunque la identidad de los dedos se establece desde etapas tempranas, se ha observado que las señales presentes en los interdógitos controlan parte de este proceso. El papel del mesénquima interdigital sobre la identidad de los dedos fue esclarecido por Dahn y Fallon (2000). En su trabajo eliminaron las membranas interdigitales 2 y 3 de la pata de embrión de pollo en etapa 27 de desarrollo (Hamburger y Hamilton, 1951), obteniendo transformaciones anteriores del dedo III en dedo II y de dedo II a dedo I (Fig.11 A-C). Dahn y Fallon (2000) concluyeron que los interdógitos envían señales a los dedos para el establecimiento de la identidad digital y esta señal es enviada desde los interdógitos más posteriores hacia los dedos más anteriores, por

ejemplo, el interdígito 3 especifica la identidad del dedo III, el interdígito 2 especifica al dedo II, y así sucesivamente.

Con el fin de encontrar cuales son las moléculas encargadas de especificar la identidad digital en las fases tardías, Dahn y Fallon (2000) postularon a las *Bmp*, las cuales son moléculas expresadas en los interdígitos. Se encontró que la inhibición de *Bmp-2*, *Bmp-4* y *Bmp-7*, por medio de su antagonista Nogina, produce transformaciones anteriores digitales (Fig. 11 D-E). Por lo que se sugiere que las BMP son las moléculas secretadas desde los interdígitos encargadas de la segunda etapa del establecimiento de la identidad de los dedos.

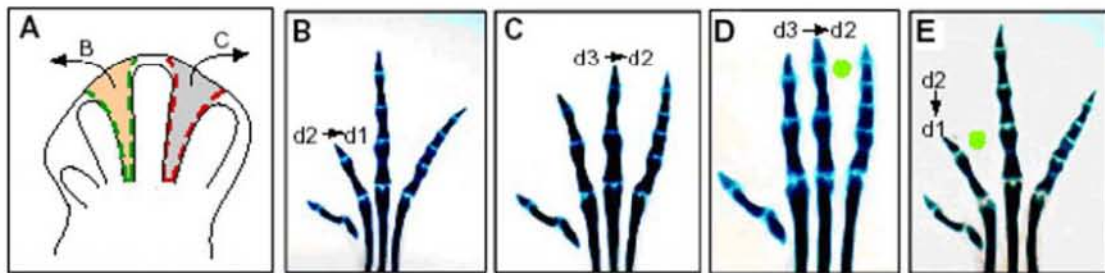


Figura 11. Los interdígitos especifican la etapa tardía de la identidad digital. En A se muestra la eliminación del interdígito 2 (en naranja) y del interdígito 3 (en gris). El resultado de la eliminación del interdígito 2 resulta en cambio en la identidad del dedo II en dedo I (B), mientras que la eliminación del interdígito 3 transforma el dedo III en dedo II (C). La aplicación de Nogina (un antagonista de *Bmp*) en el tercer interdígito transforma la identidad del dedo III a dedo II (D), y su aplicación en el interdígito 2, cambia la identidad del dedo II a dedo I (E). (Dahn y Fallon, 2000)

Finalmente, la formación de la última falange, es la fase final del establecimiento de la identidad de los dedos. La formación de la última falange está correlacionada con la expresión de *Fgf-8* en la AER, ya que cuando desaparece la expresión de *Fgf-8* en esta estructura, el dedo desarrolla la última falange. Además, la aplicación del inhibidor de FGF en la punta del primordio del dedo III, resulta en la formación prematura de la última falange. Por lo que en el dedo III, se formó el número de falanges del dedo II. Por

lo tanto, la inhibición de *Fgf-8* es necesaria para el establecimiento final de la identidad de los dedos (Sanz-Ezquerro y Tickle. 2003).

Se ha reportado que las BMP tienen un efecto negativo sobre la expresión de *Fgf-8* (Montero, *et al.* 2001), generando polémica sobre el papel que juegan en la identidad digital. Debido a que las BMP secretadas desde el interdígito regulan negativamente a *Fgf-8* en la AER (necesario para la formación de la última falange), entonces esta inhibición conllevaría a la formación de dedos con identidad más anterior, lo cual no sucede. Esto último conduce a la hipótesis sobre la existencia de una molécula intermediaria entre el efecto de las FGF en el número de falanges y el efecto antagónico de las BMP (sobre FGF) durante el establecimiento de la identidad final de los dedos.

1.7.1 La superfamilia de los TGF- β

Existe un grupo de moléculas de señalización de naturaleza proteica que juega un papel importante durante el desarrollo de la extremidad, esta molécula es conocida como el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β por sus siglas en inglés, Transforming Growth Factor- β). El TGF- β pertenece a una superfamilia de factores de crecimiento que regula numerosas respuestas celulares, como proliferación, diferenciación, migración y apoptosis (ten Dijke y Hill. 2004).

La superfamilia del TGF- β comprende un gran número de proteínas relacionadas estructuralmente, cada una expresada en espacio y tiempo específicos y que a su vez juegan un papel predominante en el desarrollo, homeostasis y reparación de virtualmente todos los tejidos de organismos que van desde la mosca de la fruta hasta el humano (Massague. 1998).

La superfamilia de los TGF- β está compuesta por varios grupos de factores de crecimiento relacionadas estructuralmente, como las Proteínas Morfogénicas del Hueso (BMP), Nodal, AMH (Hormona Antimülleriana), Vg1, Factor Neurotrófico Derivado de la Glía, Activinas, Inhibinas y la propia TGF- β (Gilbert, 2003).

La familia de los TGF- β , contiene cinco isoformas, que comprenden desde TGF- β 1 hasta TGF- β 5. Cada uno codificado por genes diferentes y fueron descubiertos en distintos tipos celulares. El prototipo de los TGF- β es TGF- β 1, un homodímero de 25-kDa, originalmente encontrado en fibroblastos transformados de mamíferos. Las isoformas TGF- β 1 hasta TGF- β 3, fueron encontrados en células de mamíferos, TGF- β 2 y TGF- β 4 se identificaron en pollo mientras que TGF- β 5 solo ha sido aislado en células de *Xenopus sp.* (Massague. 1987).

En la extremidad embrionaria de pollo se encuentra presente la isoforma TGF- β 2, cuyo patrón de expresión en etapas tempranas se localiza en el mesénquima posterior del primordio de la extremidad, en etapa 20 (Hamburger y Hamilton. 1951; Fig.11). Al avanzar el desarrollo del primordio de la extremidad, *Tgf- β 2* se expresa en los blastemas tendinosos, justo a mitad del mesénquima del primordio de la extremidad (E21 a E25, Fig. 12). Posteriormente el RNA mensajero de *Tgf- β 2* se localiza en el sistema de tendones a la altura del zeugópodo y en los radios digitales (E26 a E28; Fig. 12). Una vez que los dedos se han formado, *Tgf- β 2*, se expresa en las articulaciones, tendones ventrales y además tiene una expresión transitoria en la región más distal del interdígito 2 (E29, Fig. 12). Una vez conformados los dedos, *Tgf- β 2* se expresa en los tendones y en la punta de los dedos (E30 y E33; Fig.12).

Debido a este patrón de expresión, se piensa que TGF- β juega un papel importante en el desarrollo de los dedos. Se conoce que la aplicación de TGF- β en el mesénquima interdigital de la pata de pollo induce la formación de dedos ectópicos (Gañan, *et al.*

1996). Este efecto es llevado a cabo a través de una cascada de señalización que resulta en la expresión de los principales marcadores de cartílago, como los genes *Sox9*, *Sox8*, y los componentes de la matriz extracelular de cartílago como Colágena tipo II y Agrecano (Chimal-Monroy, *et al.* 2003). Por lo que TGF- β es una molécula que involucrada en la cascada molecular de la condrogénesis

El TGF- β , además de ser un factor involucrado en la morfogénesis de los dedos, puede regular otros procesos como la muerte celular programada. Esto se propone debido a que los ratones knock out de *Tgf- β 2^{-/-}* y *Tgf- β 3^{-/-}*, muestran sindactilias (Dunker y Krieglstein. 2002), lo cual sugiere que TGF- β es requerido para la muerte celular programada de las membranas interdigitales.

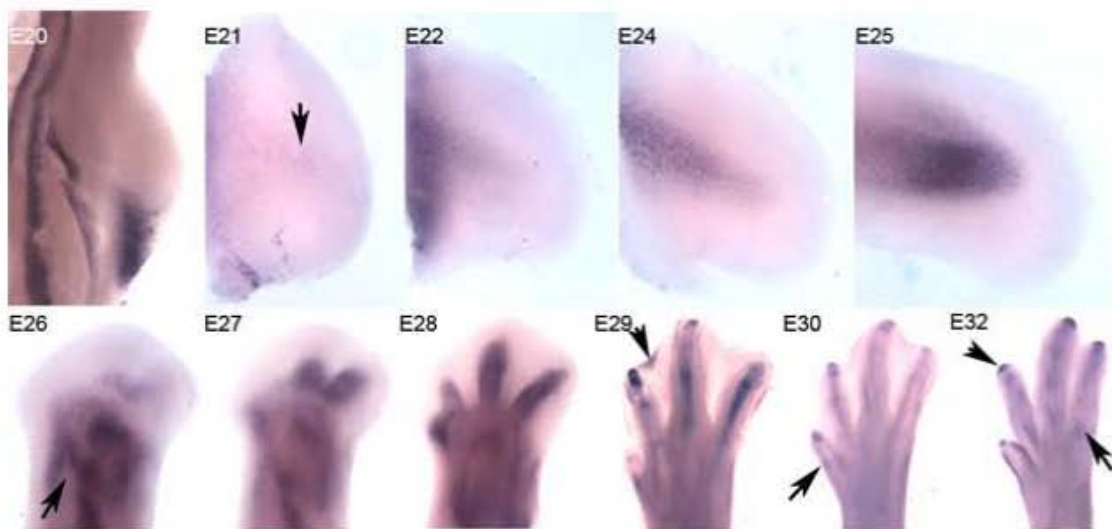


Figura 12. Patrón de expresión de *Tgf- β 2*. El *Tgf- β 2* se expresa en etapas tempranas en la región posterior del primordio de la extremidad (E20). A partir de la etapa 21 hasta la 26, *Tgf- β 2* comienza a expresarse en los blastemas tendinosos (ver flechas); mientras que a partir de la etapa 27 se observa en los primordios digitales, más adelante la expresión del mensajero de *Tgf- β 2* se nota en los radios digitales (E27-E28), interdígito 2 (E29, ver flecha), articulaciones (E30 ver flecha), tendones y punta de dedo (E32 ver flechas).

Por otro lado, TGF- β puede generar distintos fenotipos dependiendo de la etapa y lugar donde se aplique. Como ya se dijo, en etapas más tardías de la extremidad genera dedos ectópicos en los interdígitos; sin embargo, su aplicación en la punta de los dedos

genera acortamiento de los dedos y reducción en el número de falanges, un fenotipo similar al cambio en la identidad de los dedos (Fig. 13; Merino, *et al.* 1999).

Por otra parte, la aplicación de TGF- β etapas tempranas o previas a la formación de los dedos, induce alteraciones en la morfología de la extremidad, principalmente acortamiento en las extremidades (Ferguson, *et al.* 2004; Hayamizu, *et al.* 1991). Los mecanismos por los cuales TGF- β induce este fenotipo en etapas tempranas, son la regulación negativa de los genes *Indian Hedgehog* (molécula perteneciente a la familia de los Hedgehog e involucrada en la maduración del cartílago) y de Colágena X (un componente de matriz extracelular del cartílago hipertrófico (Ferguson, *et al.* 2004). Entre otros papeles desempeñados por TGF- β , cuando se aplica en la región posterior distal de la extremidad en etapas tempranas induce pérdida del número de falanges y cambio en la morfología de los dedos posteriores, lo cual sugiere que TGF- β transforma la identidad de los dedos (García-García, 2005).

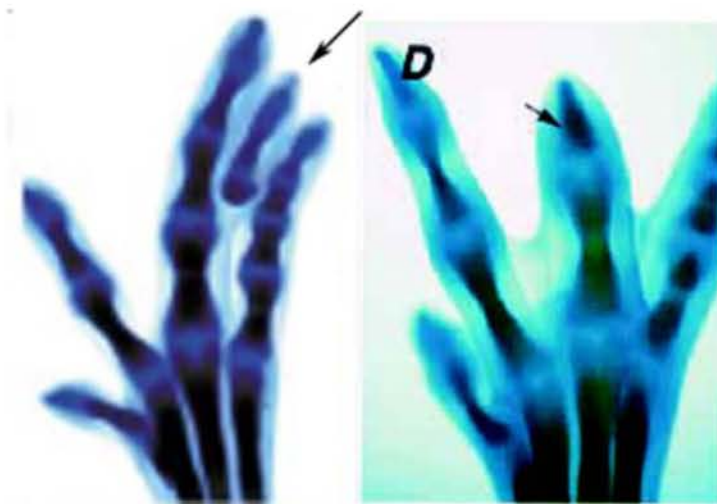


Figura 13. La aplicación de TGF- β en diferentes regiones de la extremidad resulta en la generación de diferentes fenotipos. A la izquierda, se aplicó TGF- β en el mesénquima interdigital, lo cual generó un dedo ectópico (indicado por la flecha); mientras que la aplicación de dicha proteína en la punta del dedo III induce la formación de un fenotipo similar al cambio en la identidad de los dedos (ver flecha).

1.7.2 Transducción de la señalización de TGF- β .

La familia de los TGF- β transducen su señal por medio de receptores transmembranales del tipo serina-treonina cinasa, es decir, fosforilan residuos de serina y treonina. Cuando el ligando de TGF- β se une al receptor tipo II o T β RII, induce el ensamble con el receptor tipo I o Alk5 (activin-like kinase) de TGF- β , este ensamble induce que el receptor tipo II fosforile al tipo I (Fig.14).

Una vez activado el receptor tipo I, éste propaga la señal al interior de la célula a través de la fosforilación de las proteínas reguladoras R-Smads, Smad2 y Smad3. Estas proteínas reguladoras forman un complejo con otra proteína llamada Smad4, dicho complejo se dirige hacia el núcleo celular donde interacciona con distintos factores de transcripción para regular la expresión de los genes blanco (Fig.14; ten Dijke y Hill 2004).

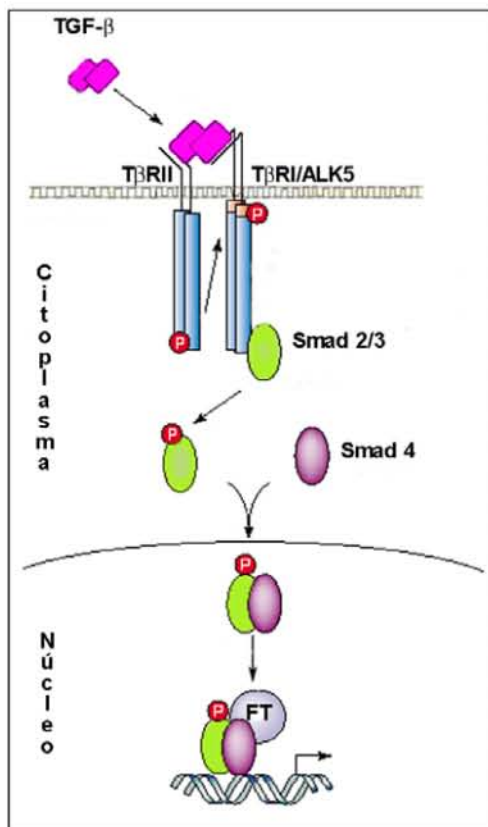


Figura 14. Transducción de la Señal de TGF- β . La molécula de TGF- β se une al receptor transmembranal T β RII, el cual fosforila al receptor tipo I (Alk-5), el cual induce la fosforilación de Smad 2 y de Smad3. Estas moléculas formarán un complejo con Smad 4, el cual llegará hasta el núcleo celular y se unirá a los factores de transcripción (TF), de los genes blanco. El TGF- β está indicado de color rosa; los receptores de azul; Smad 2 y Smad 3 de color verde; Smad-4 de está indicado de color morado y las fosforilaciones están mostradas en círculos rojos. Foto modificada de ten Dijke y Hill, 2004.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se mencionó en la introducción, Merino y colaboradores (1999) mencionan que colocar TGF- β en la punta del tercer dedo genera truncamiento de éste; sin embargo, estos dedos truncados presentan la última falange en forma de punta. El fenotipo obtenido por Merino (1999), pensamos que es, un cambio en la identidad del dedo III hacia una identidad más anterior (observar Fig. 13), debido a que el número de falanges se reduce y la morfología cambia, este resultado es similar a los cambios de identidad obtenidos por Danh y Fallon (2000) y por Suzuki (2004).

Por otro lado, *Tgf- β 2* tiene su patrón de expresión en etapas tempranas en la región posterior de la extremidad, después desaparece de esta zona para localizarse en los blastemas tendinosos. La desaparición de *Tgf- β 2* en esta región está sucedida por la aparición de las moléculas que controlan la identidad digital en la región posterior como *Bmp* y *Tbx*, lo cual sugiere que la desaparición de *Tgf- β* es necesaria para iniciar la expresión de las moléculas que especifican la identidad digital.

Dado que la aplicación de TGF- β en la punta de los dedos en etapas tardías (E-28) transforma la identidad de los dedos y la expresión de *Tgf- β* desaparece del sitio donde se encuentran las moléculas encargadas del establecimiento de la identidad posterior de los dedos, nos preguntamos, ¿que sucedería si la expresión de *Tgf- β* se mantiene durante las etapas tempranas del establecimiento de la identidad digital; es decir durante la etapa 24, (Dudley, *et al.* 2002)? ¿Cuál sería la repercusión sobre el número de falanges? ¿Cuáles serían sus efectos sobre las moléculas encargadas de otorgar identidad posterior a los dedos, en particular, *Bmp* y *Tbx*?

3. HIPÓTESIS

La aplicación de TGF- β en la región posterior de la extremidad, en la etapa del establecimiento de los dedos (etapa 24), inhibe el número de falanges de los dedos posteriores, debido al bloqueo de los genes *Bmp* y *Tbx* que establecen la identidad digital posterior.

4. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto que tiene la administración de TGF- β en la región posterior distal del primordio de la extremidad embrionaria de pollo en etapa 24.

4.1 Objetivo Particular

Determinar sí la regulación de las moléculas que participan en la etapa temprana del establecimiento de la identidad de los dedos, *Tbx2*, *Tbx3*, *Bmp-2*, *Bmp-4* y *Bmp-7*, se ven afectadas durante la expresión de TGF- β en la región posterior-distal del primordio de la extremidad.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material Biológico.

Se emplearon embriones de pollo *Gallus gallus* (ALPES, S.A., Puebla), incubados a 37°C en etapa 24 (según Hamburger y Hamilton, 1951). Cada huevo se abrió donde se encuentra la cápsula de aire, después se retiró la membrana testácea interna y la membrana amniótica para exponer al embrión. Seguido de esto, se descubrió el primordio de la extremidad posterior del embrión y se hizo una perforación con una microaguja de tungsteno en el mesodermo posterior distal. En este sitio se coloca una perla de heparina incubada con TGFβ-1. Una vez realizado el implante de la perla, se volvieron a incubar embriones hasta 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas. (Ver Fig. 15). Finalmente los embriones se procesaron para análisis morfológico con la tinción de Azul Alciano/Alizarina roja y el análisis de regulación genética mediante hibridación *in situ* para *Tbx2*, *Tbx3*, *Bmp-2*, *Bmp-4* y *Bmp-7*.

5.2 Reconstitución de TGF-β1

Para reconstituir la proteína deshidratada de TGFβ-1 (PeproTech, INC presentación de 5 µg, Cat. 100-21R), primero se centrifuga a 12,000 rpm para concentrar la proteína en el fondo del vial, después se reconstituye añadiendo 25 µl de agua estéril. De nuevo, la proteína es centrifugada a la misma velocidad para concentrarla en la solución. Concluido esto, se prepararon alícuotas de 2 µl para obtener concentraciones de 200 ng/µl. Para la obtención de

concentraciones de 100, 50, 25 y 12.5 ng/ μ l, fue necesario diluir las alícuotas originales en Amortiguador de Salino de Fosfatos (PBS). Todo este procedimiento se realizó a 4°C.

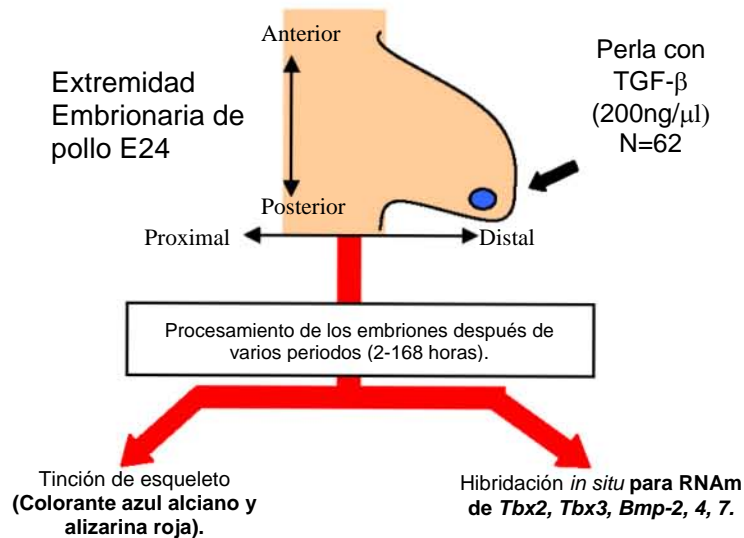


Figura 15. Aplicación de TGF- β 1 en la región posterior distal del primordio de la extremidad en etapa 24. La figura muestra la aplicación de la perla embebida en TGF- β 1 a una concentración de 200 ng/ μ l, en la región posterior-distal del primordio de la extremidad de pollo, en etapa 24 de desarrollo. Los embriones operados son procesados por varias horas y fueron utilizados para la Tinción de Esqueleto e Hibridación *in situ*.

5.3 Preparación de las perlas.

Se emplearon treinta perlas de heparina (SIGMA, Cat. H5263) almacenadas en PBS, a las cuales después de eliminar el exceso de PBS se agregan 200 ng/ μ l TGF- β para finalmente incubarlas en una cámara húmeda para evitar la deshidratación de las perlas, este tratamiento se realiza por un lapso de una hora a 4°C.

5.4 Análisis morfológico.

Para analizar los cambios morfológicos de las extremidades de pollo que ocurrieron por acción de TGF- β 1, se realizó la tinción de azul Alciano y alizarina roja, para teñir específicamente de azul el cartílago y de rojo el hueso (Otto, *et al.* 1997). Primero, las extremidades operadas y su contralateral se fijan en etanol al 96%. Después se añade acetona por 24 horas para permeabilizar el tejido, remover las grasas y solidificar el esqueleto. Posteriormente, las extremidades se tiñen con azul Alciano al 0.3% y Alizarina roja al 0.1% disuelta en 1 volumen de ácido acético más 17 volúmenes de etanol al 70%, por 24 horas, agitando lentamente. Al terminar este tiempo se lavan dos veces con agua destilada por 20 segundos, para eliminar residuos del colorante. El tejido se transparenta con una disolución de KOH al 1% y glicerol al 20% y finalmente se almacena en una mezcla 1:2 de glicerol-PBS. Las muestras procesadas se observaron al microscopio estereoscópico (Nikon SMZ1500) y se fotografiaron con la cámara Axio Cam MRc, bajo el programa Axio Vision (Carl Zeiss).

5.5 Preparación de las ribosondas, *Tbx2*, *Tbx3*, *Bmp-2*, *Bmp-4* y *Bmp-7*.

Los plásmidos de *Tbx2*, *Tbx3* y *Bmp-7* fueron obsequiados por Juan Carlos Izpisua Belmonte, mientras que *Bmp-2* y *Bmp-4*, fueron cortesía de Lee Niswander.

Para preparar las ribosondas primero se lineariza el plásmido que contiene el gen de interés, el cuál debe estar a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Para iniciar la reacción se mezcla el plásmido con 5 μl del amortiguador de la enzima de restricción, 2.5 μl de la enzima de restricción

correspondiente para cada plásmido (ver Tabla I), y 22.5 μ l de agua estéril. Esta reacción se deja por 2 horas a 37°C.

Tabla I . Enzimas de restricción y RNA polimerasas empleadas en la construcción de la ribosonda.

Gen	Enzima de Restricción	RNA polimerasa
Bmp-2	HindIII (New England Biolabs Cat. R0104S)	T3 (Promega Cat. P2083)
Bmp-4	BamHI (New England BiolabsCat. R01365)	T3 (Promega Cat. P2083)
Bmp-7	XhoI (New England Biolabs Cat. R01465)	T3 (Promega Cat. P2083)
<i>Tbx2</i>	Xba I (New England Biolabs Cat. R0145S)	T7 (Promega Cat. P2075)
<i>Tbx3</i>	XhoI (New England Biolabs Cat. R01465)	T3 (Promega Cat. P2083)

Para terminar la reacción de digestión se precipita el plásmido linearizado con 5 μ l acetato de sodio 3M y 150 μ l de etanol absoluto toda la noche a -20° C.

Al día siguiente, el precipitado se centrifuga a 12,000 rpm, por 30 minutos a 4° C, al finalizar, se retira el sobrenadante y se lava etanol al 70% para luego volverlo a centrifugar por 10 minutos a 4°C. Se retira el sobrenadante y se deja secar para añadir 7 μ l de agua.

Para comenzar la reacción de transcripción de la ribosonda se utilizan 7 μ l del plásmido linearizado, 4 μ l de amortiguador de transcripción 5x (Promega Cat. P1181), mezcla de ribonucleótidos 10 mM (todos de Promega), ATP (Cat. P1132), GTP (Cat. P1152), CTP (Cat. P1142), 1.2 μ l por cada ribonucleótido. Posteriormente se colocan 1.6 μ l de UTP (Cat. P1162), 0.8 μ l de Digoxigenina (Roche. Cat.11209256 910), 1 μ l de DTT 10mM (Cat. P1171), 1 μ l de Inhibidor de RNAasa 40U/ μ l (Cat. N2611) y 1 μ l de la enzima de transcripción correspondiente a cada gen (Tabla I). Esta reacción se mantiene a 37° C por 2 horas, finalizando este tiempo se precipita la ribosonda con 3 μ l tRNA (10mg/ml),

amortiguador TE pH=8 (de Marligen) (200µl), 12µl de acetato de Sodio 3M (12µl) y 300µl de etanol absoluto. La reacción se dejó a -70° C por 2 horas.

Para obtener la sonda, se centrifuga a 12,000 rpm por 20 minutos a 4°C, se retira el sobrenadante y se cambia a alcohol al 70% (300µl), se centrifuga de nuevo bajo las mismas condiciones durante 10 minutos se deja secar 5 minutos a 37°C dentro de la campana de flujo laminar. Finalmente, se añaden 30 µl de agua Milli Q estéril para reconstituir la sonda y almacenarla a -20°C.

5.6 Hibridación in situ para *Tbx2*, *Tbx3*, *Bmp-2*, *Bmp-4* y *Bmp-7*.

Para analizar el patrón de expresión de los genes *Tbx2*, *Tbx3*, *Bmp-2*, *Bmp-4* y *Bmp-7*; se realizó hibridación *in situ*.

Todas las soluciones se encuentran descritas en el apéndice.

Primero, se fijan los embriones completos de las primeras 24 horas y las extremidades operadas con su control de 48 y 72 horas de tratamiento con TGFβ-1 en paraformaldehído (PFA 4% en PBS), a una temperatura de 4°C toda la noche, al día siguiente se deshidrataron los embriones y sus extremidades, con concentraciones graduales de metanol al 25%, 50%, 75 % en 0.1% de PBT (PBS más 0.1% de Tween) y metanol absoluto (JT-Baker, USA), para su almacenamiento a -20° C. Al inicio de la hibridación se rehidratan los embriones con metanol usando la secuencia inversa a la deshidratación.

Seguido a esto, se añade peróxido de hidrógeno al 6% en PBT por una hora (en oscuridad). Al finalizar, los embriones se lavan 3 veces con PBT y se incuban con proteinasa K, a una concentración de 60 µg/µl, durante 20 minutos para embriones menores de 24 horas, y 25 minutos para mayores de 48 horas de tratamiento con TGF-β; todo esto a una temperatura de 20°C.

Concluido este tiempo, de nuevo, se fijan los embriones con una mezcla de glutaraldehído 0.2% y paraformaldehído al 4% por 20 minutos, se lavan con PBT dos veces por cinco minutos y se añade 1 ml de amortiguador de hibridación, incubando los embriones por 3 horas a 65 ° C.

Al concluir la incubación, se desnaturalizan 5 µl de la sonda de interés en 455 µl de amortiguador de hibridación a una temperatura de 80°C por dos minutos. Concluido este tiempo se incuban en hielo, luego se extrae el amortiguador de hibridación a los embriones para sustituirlo por la sonda desnaturalizada la cual se quedará hibridando toda la noche a 65° C.

En el segundo día de hibridación *in situ*, se sustrae la sonda y se realizan lavados con distintas soluciones todas a 65°C (ver Apéndice). La solución I se aplica dos veces por 60 minutos, seguido de una mezcla de Solución I-Solución II, por 10 minutos; a continuación se añade la solución II, tres veces por 10 minutos, seguido de dos lavados de esta solución por 30 minutos. Finalmente, se añade la solución III, 3 veces por 10 minutos y 2 veces por 30 minutos.

Al concluir los lavados con las soluciones, nuevamente se lavan los embriones tres veces con TBST y levamisole 2 mM, por diez minutos a temperatura ambiente. Al finalizar estos lavados se añade suero de oveja al 10% en TBST, de 2 a 3 horas en agitación horizontal para posteriormente integrar el anticuerpo anti-Digoxigenina (Roche Cat.11 093 274 910). Una vez aplicado el anticuerpo éste debe permanecer en movimiento horizontal a 4° C por toda la noche.

En el tercer día de hibridación se retira el anticuerpo con 10 series de lavados de TBST+levamisole por una hora durante un día en movimiento lento, para dar lugar a un último lavado con NTMT+Levamisole 1 mM, dos veces por quince minutos.

Al terminar los lavados se aplica el revelador, (en este caso se utilizó el sustrato BM Purple (ROCHE Cat.11 442 074 061) en la oscuridad, el cual indica la marca de la

digoxigenina de la sonda que hibridó, cuando la reacción ha finalizado aparece una marca morada en el sitio donde se expresa el gen de interés.

La reacción se detiene con dos lavados de PBS rápidos (para evitar la precipitación de los residuos de NTMT) y se fijan en PFA al 2% para su almacenamiento.

Finalmente, las hibridaciones fueron fotografiadas en el microscopio Nikon SMZ1500 empleando el programa de fotografía Axio Vision de Carl Zeiss.

6. RESULTADOS

La extremidad posterior de pollo tiene cuatro dedos diferentes, los cuales están caracterizados por poseer distinto número de falanges y morfología (Fig.8), esta ventaja facilita el estudio de la identidad digital. Por lo que empleamos la pata de pollo como modelo para este estudio.

6.1 El TGF- β 1 induce cambios en la morfología de los elementos esqueléticos del autópodo y cambios en la identidad de los dedos.

Se ha reportado que TGF- β reduce el número de falanges y cambia la morfología de los dedos cuando se aplica en la punta del dedo en etapa 28 de desarrollo de pollo. Este fenotipo es muy similar a los cambios en la identidad de los dedos obtenidos por remover los interdígitos (Dahn y Fallon. 2000) y en la aplicación de las formas truncadas de TBX2 y TBX3 (Suzuki, *et al.* 2004).

Por otro lado, *Tgf- β* se expresa en la región posterior de la pata de pollo en etapa 20, y no vuelve a presentarse en ninguna etapa del desarrollo del pollo en este sitio. La función de *Tgf- β* en la región posterior no es clara y mucho menos su relación con la formación de las falanges, las cuales se especifican desde etapas muy tempranas.

Al aplicar *Tgf- β 1* en la región posterior distal del autópodo de embriones en etapa 24, donde se encuentran las moléculas encargadas de otorgar la identidad posterior a los dedos observamos que el TGF- β 1 induce cambios en la morfología de los elementos esqueléticos del autópodo después de 24 horas de aplicación (72.5% de los casos; n=62; Fig.16). Estos cambios morfológicos constan de truncamiento de los dedos posteriores, cambio en el número de falanges, además, fusión de los tarsos (Fig.16).

Los cambios morfológicos han sido clasificados en tres fenotipos principales de acuerdo al fenotipo inducido por TGF- β 1 sobre la extremidad tratada.

El grupo I, representa el 25.8% de la muestra total (17 de 62 casos) y se caracteriza por autópodos con truncamiento de los dedos III y IV (indicados como III' y IV') (14 de 17 casos) (Fig.14-B). Además, ocurrieron cambios en la morfología de los dedos que no permiten distinguir la identidad (indicados como dedos X) (Fig.16 C).

Adicionalmente, se generaron fenotipos en donde el dedo II (que posee tres falanges) perdió una falange, adquiriendo el número de falanges similar al dedo I (con dos falanges), este resultado sugiere que TGF- β 1 reduce el número de falanges en etapas tempranas como en tardías. (Fig. 16 C)

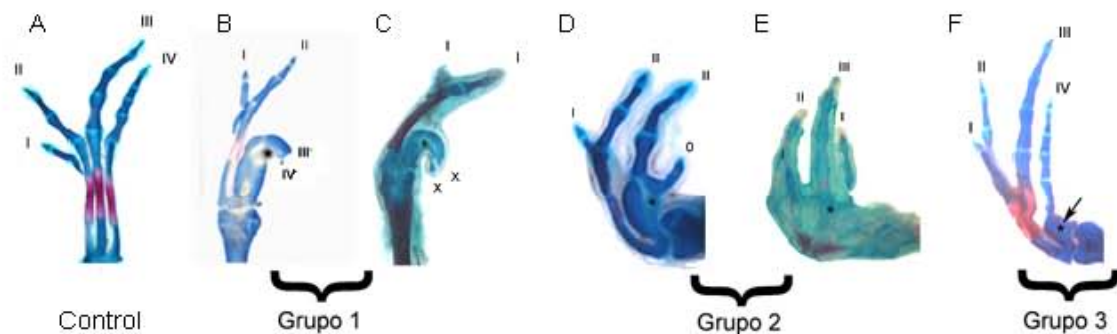


Figura 16. La aplicación de TGF- β 1, transforma el patrón de los elementos posteriores de la extremidad. (A) Control. (B y C) Alteraciones clasificadas dentro del grupo 1, (B) Truncamiento de los dedos III y IV, indicados como (III', IV'). (C) Dedos posteriores con pérdida de la identidad indicada como X. (D y E) Alteraciones Clasificadas dentro del grupo 2, (D) cambio en la identidad del dedo III a II además, el dedo IV cambia su tamaño de forma similar al dedo 1 pero ausente de una falange, indicado como dedo 0 (D), (E) Cambio de dedo IV a dedo 1. (F) Alteración clasificada en el grupo 3. Fusión y reducción de los tarsos 3 y 4, indicado por la flecha.

El grupo 2, está compuesto por dedos que han reducido su número de falanges y tienen morfología similar a dedos más anteriores en el 27.4% de los casos (17 de 62).

Por ejemplo, en el dedo IV (que posee cinco falanges), el TGF- β 1 generó varios dedos con diferente número de falanges y morfología similar a los dedos I (con dos falanges), II (tres falanges) y dedos III (con cuatro falanges). (Fig. 16 D y E).

Por otro lado, se obtuvieron dedos IV que solo poseen una falange pero, con tamaño semejante al dedo I, (5 de 17 casos; Fig.16 D). Estos fenotipos fueron llamados dedos cero (indicados como 0), ya que no son totalmente dedos I por la ausencia de una falange.

En ninguno de los autópodos de este grupo se presentaron alteraciones en los dedos I y II, pero sí se presentaron fusión de tarsos.

Estos cambios en el número de falanges y desarrollo de morfologías similares a dedos más anteriores sugieren que TGF- β 1, cambia la identidad de los dedos posteriores en anteriores.

El grupo 3, lo integran aquellos fenotipos donde la aplicación de TGF- β 1 en la región posterior únicamente generó fusión o acortamiento de los tarsos 3 y 4, en 17 de 62 casos; 19.3%. (Fig. 16 E). En este grupo, la perla embebida en TGF- β 1 aparece más proximal al cuerpo del embrión, por lo cual parece que la posición en donde se coloque la perla es esencial para el cambio en la identidad digital.

6.2 TGF- β 1 inhibe la expresión de *Tbx3* pero no la de *Tbx2* durante el establecimiento de la identidad de los dedos.

Nuestros datos sobre la aplicación de TGF- β 1 en la región posterior distal del primordio de la extremidad en etapa 24 sugieren que esta proteína cambia la identidad de los dedos posteriores en anteriores a través de los genes encargados de otorgar la identidad posterior a los dedos.

Entre los genes involucrados en otorgar la identidad posterior a los dedos se encuentran *Tbx2* y *Tbx3*. Se ha comprobado que la aplicación de las formas truncadas de estos genes inducen cambios en la identidad de los dedos III y IV en dedos II y III, además del

truncamiento de elementos posteriores (Suzuki, *et al.* 2004); de forma similar, TGF- β 1 es capaz de generar estos mismos fenotipos. Por lo que sí TGF- β 1 cambia la identidad de los dedos posteriores en anteriores podría hacerlo al inhibir la expresión de *Tbx2* y *Tbx3*

Con esta idea, analizamos el patrón de expresión de *Tbx2* y *Tbx3* mediante hibridaciones *in situ* a diferentes tiempos de la aplicación de TGF- β 1 en la región posterior-distal del primordio de la extremidad de pollo en etapa 24.

Las extremidades analizadas de 2 hasta 48 horas después de aplicación de TGF- β 1, mostraron que la expresión de *Tbx2* no se regula (6 casos de 6 por cada tiempo; Fig. 17 A-F).

A partir de las 72 horas se obtiene un fenotipo clasificado en el grupo 2 ya que tiene cambio en la identidad del dedo más posterior. Además se observa un mesénquima ectópico entre el tarso más posterior y el dedo que está cambiando de identidad. En este mesénquima se expresa ectópicamente *Tbx2* (5/5 casos; Fig. 17 G). Estos resultados sugieren que TGF- β 1 cambia la identidad de los dedos por un mecanismo independiente de *Tbx2*.

Seguido del análisis del patrón de expresión de *Tbx2* analizamos el de *Tbx3* bajo el efecto de TGF- β 1 en la región posterior del primordio de la extremidad.

Los datos muestran que la expresión de *Tbx3* se inhibe a partir de las 12 horas del tratamiento con TGF- β 1 (en 4/6 casos; Fig. 18 D), mientras que en los tiempos anteriores no existe efecto sobre la expresión de *Tbx3* (Fig. 18 A-C). La inhibición de *Tbx3* en la región posterior es más clara por debajo de la perla de TGF- β 1 después de 24 y hasta 48 horas post tratamiento (9/12 casos; Fig. 18 E y F).

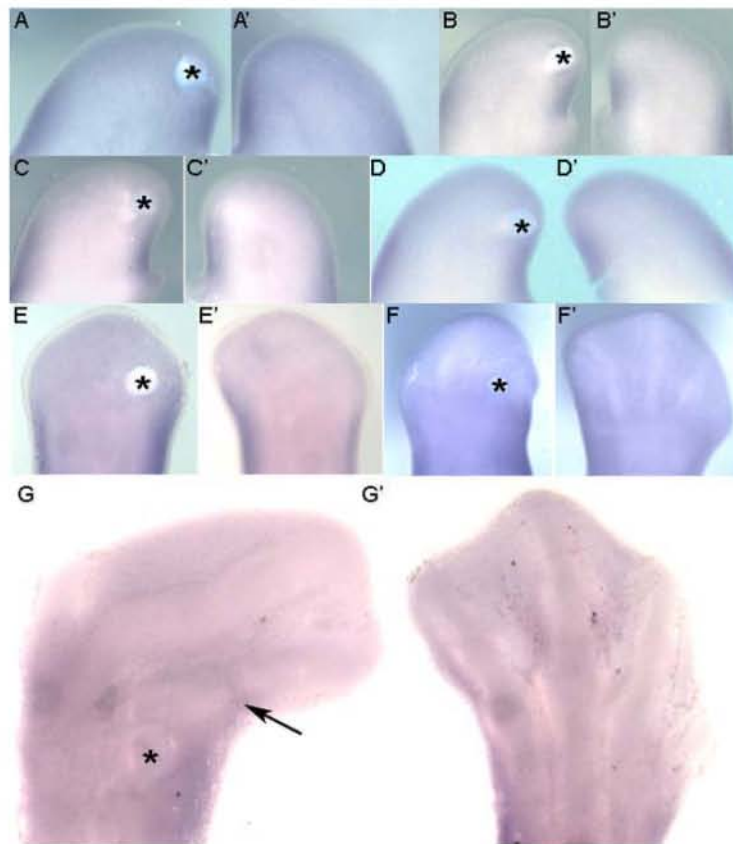


Figura 17. El patrón de expresión de *Tbx2* no se modifica durante las primeras horas de la aplicación de TGF- β 1. La figura muestra que no hay cambio en la expresión de *Tbx2* durante las 2 (A); 4 (B); 8 (C); 12(D); 24(E) y 48 horas (F) después del tratamiento con TGF- β 1(200 ng/ μ l). (G) 72 horas después, se obtiene un fenotipo clasificado en el grupo 2, en cual *Tbx2* se expresa ectópicamente en un mesénquima que se encuentra entre el tarso y el dedo más posterior que está cambiando de identidad (indicado por la flecha negra). Las letras mayúsculas indicadas como ('), indican los controles. La marca de hibridación de *Tbx-2* es color violeta y la perla con TGF- β 1 (200ng/ μ l), está indicada con un asterisco en la región posterior-distal de la extremidad. Fotografías tomadas en vista dorsal.

Después de las 72 horas de tratamiento, se genera cambio en la identidad del dedo más posterior, clasificado dentro del grupo 2. Del mismo modo que *Tbx2*, aparece un mesénquima entre el tarso más posterior y el dedo que está cambiando de identidad, en el cual se expresa ectópicamente el RNA mensajero de *Tbx3* (4/4 casos; Fig 18 G). Estos resultados sugieren que la inhibición de *Tbx3* es necesario para el cambio de la identidad de los dedos posteriores en anteriores como sucede en los mutantes de *Tbx3*.

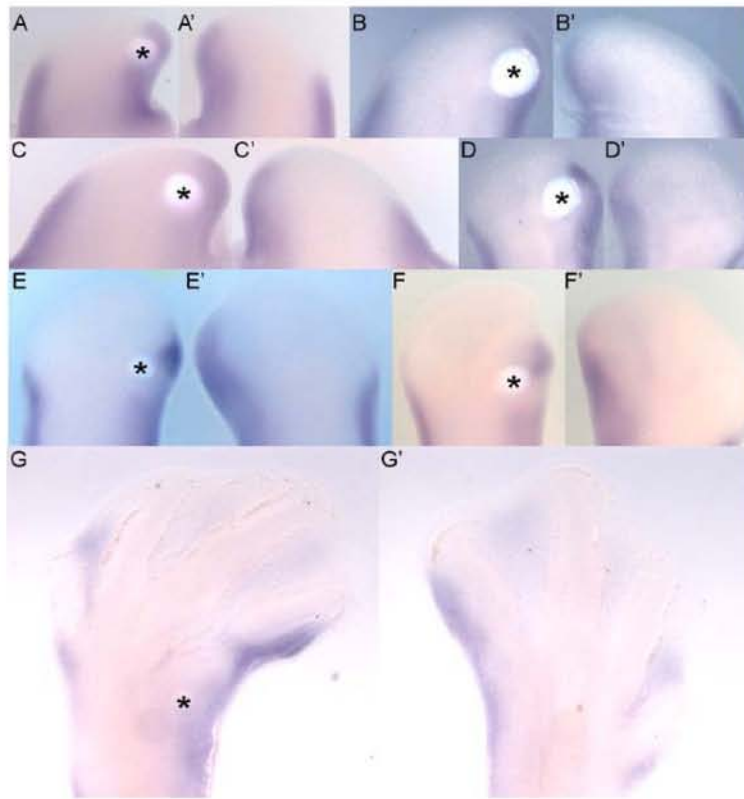


Figura 18. TGF- β 1 inhibe la expresión de *Tbx3*, durante el cambio en la identidad de los dedos. (A-C), El patrón de expresión de *Tbx3* se mantiene en la región posterior después de 2 (A), 4 (B) y 8 (C), horas después del tratamiento con TGF- β 1 (200ng/ μ l). (D-F), Inhibición de *Tbx3* en la región posterior de la extremidad, a partir de las 12 (D), 24 (E) y 48 horas (F), después del tratamiento con TGF- β 1 (200 ng/ μ l). (G) A las 72 horas, el dedo más posterior está cambiando de identidad (fenotipo clasificado en el grupo 2), además se nota una expresión ectópica de *Tbx3* entre el tarso 3 y el dedo que está cambiando de identidad (ver flecha). La señal de hibridación de *Tbx3* es color violeta y la perla con TGF- β 1 (200ng/ μ l), está indicada con un asterisco en la región posterior-distal de la extremidad; mientras que los controles están indicados con las letras ('). Fotos tomadas de vista dorsal.

6.3 TGF- β 1 inhibe la expresión de *Bmp-2*, *Bmp-7* y *Bmp-4* durante el cambio de la identidad de los dedos.

Se sabe que existe una regulación positiva entre *Tbx2*, *Tbx3* y BMP (Suzuki, *et al.* 2004), debido a que la aplicación de BMP induce la sobreexpresión de *Tbx* en la región posterior, mientras que durante el cambio en la identidad de los dedos generado por el

truncamiento de *Tbx2* y *Tbx3* inhibe la expresión de *Bmp-2* en la región posterior de la extremidad.

Con la finalidad de esclarecer el mecanismo por el cual TGF- β 1 inhibe a *Tbx3* decidimos analizar el patrón de expresión de *Bmp-2*, *Bmp-7* y *Bmp-4*, durante el cambio de la identidad de los dedos.

El análisis del patrón de expresión de *Bmp-2* mostró que este gen se inhibe a partir de las 2 horas después de la aplicación de TGF- β 1 (4/5 casos; Fig. 19 A), hasta las 12 horas post tratamiento de TGF- β 1 (Fig. 19 B-D; 10 de 12 casos). A partir de las 24 y 48 horas después del tratamiento se notan cambios en la morfología de la extremidad tratada y reducción en la expresión de *Bmp-2* (en todos los casos n=10; Fig. 19 E-F).

A partir de las 72 horas de la aplicación de TGF- β 1 se observa truncamiento de los dedos III y IV (fenotipo perteneciente al grupo 1), mientras tanto, el patrón de expresión de *Bmp-2* está inhibido en las articulaciones distales del dedo II y en los elementos esqueléticos posteriores (3/3 casos; Fig. 19 G).

El patrón de expresión de *Bmp-7* se observa en la región posterior del primordio de la extremidad. La aplicación de TGF- β 1 en la región posterior-distal inhibe la expresión de *Bmp-7* a partir de las 12 horas (4/6 casos; Fig. 20 D), pero no ocurre a tiempos cortos (Fig. 20 A-C). Durante las 24 y las 48 horas esta inhibición es mantenida alrededor de la perla de TGF- β 1 (9/12 casos; Fig. 20 E-F). A partir de las 72 horas de aplicación de TGF- β 1 se observa un fenotipo perteneciente al grupo 2, cuyo dedo más posterior tiene morfología similar a dedo 0, mientras que la identidad de los dedos más anteriores es normal (Fig. 20 G). Entre tanto, el análisis de expresión de *Bmp-7* muestra la presencia de este gen en los interdígitos y en los pericondrios incluyendo el dedo que está cambiando de identidad (5/5 casos; Fig. 20 G).

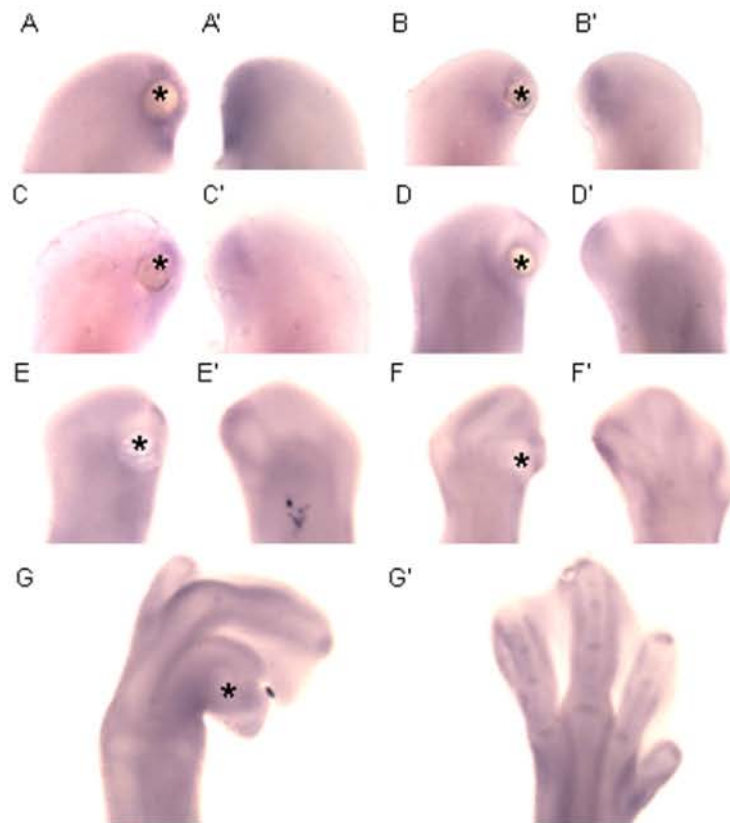


Figura 19. El RNA mensajero de *Bmp-2* se inhibe durante el cambio en la identidad de los dedos inducido por TGF- β 1. La expresión de *Bmp-2* en la región posterior de la extremidad comienza a inhibirse a partir de las 2 horas de tratamiento con TGF- β 1 (200ng/ μ l) (A). Después de 4 (B), 8 (C), 12(D), 24(E) y 48 horas (F), la expresión de *Bmp-2* se mantiene inhibida en la región posterior distal de la extremidad después del tratamiento con TGF- β 1 (200 ng/ μ l). Transcurridas 72 horas del tratamiento con TGF- β 1 se genera un fenotipo perteneciente al grupo 1 que presenta los dedos III y IV truncados, al igual que los tarsos correspondientes a estos dedos (G). Por otra parte, se inhibe la expresión *Bmp-2* en las articulaciones distales del prospectivo dedo 2 y en los elementos esqueléticos adyacentes a la perla de TGF- β 1 (G). La marca de Hibridación de *Bmp-2* se muestra de color púrpura y la posición de la perla con TGF- β 1 está indicada con un asterisco en la región posterior-distal de la extremidad; mientras que las letras indicadas con (') son las extremidades control. Fotos tomadas de vista dorsal.

Estos resultados mostraron que la inhibición de *Bmp-7* comienza a partir de las 12 horas al igual que *Tbx3*, lo que sugiere que *Bmp-7* se encuentra en la cascada molecular del establecimiento de la identidad de los dedos.

Bmp-4 es un gen que se expresa en la región anterior y posterior del primordio de la extremidad en etapas tempranas. Se ha visto que *Bmp-4* regula a *Tbx3* en la región

anterior y posterior del primordio de la extremidad (Tumpel, *et al.* 2002). Sin embargo, no se conoce la relación de ambos genes en el estudio de la identidad de los dedos, en particular los dedos posteriores; por lo que se analizó el patrón de expresión de *Bmp-4* durante el cambio en la identidad de los dedos inducido por TGF- β 1.

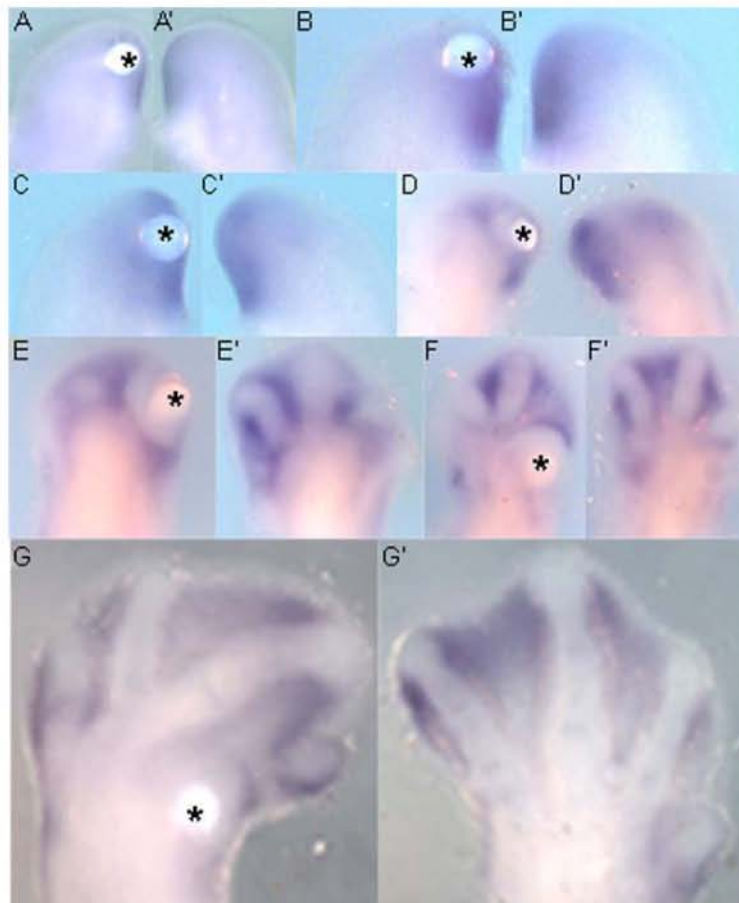


Figura 20. La expresión de *Bmp-7* se inhibe durante el cambio en la identidad de los dedos inducido por TGF- β 1. El patrón de expresión de *Bmp-7* se mantiene en la región posterior del primordio de la extremidad a las 2 (A), 4(B) y 8 horas (C) después de la aplicación de TGF- β 1 (200 ng/ μ l). La inhibición de *Bmp-7* ocurre durante 12 (D), 24 (E) y 48 horas (F). A partir de las 72 horas el dedo IV tiene un fenotipo similar a un dedo 0, mientras tanto, los dedos más anteriores tienen morfologías normales, este fenotipo es clasificado dentro del grupo 2 (G). Por otra parte, el patrón de expresión de *Bmp-7* se observa en los pericondrios y en las zonas interdigitales (G). La marca de hibridación de *Bmp-7* se observa de color violeta y la posición de la perla está indicada con un asterisco en la región posterior distal del primordio de la extremidad; mientras que las extremidades control están indicadas con ('). Fotos tomadas de vista dorsal.

Los resultados mostraron que se inhibe la expresión de *Bmp-4* después de 4 horas de tratamiento con TGF- β 1, en la región posterior de la extremidad cercana a la perla con TGF- β 1, (2/4 casos; Fig. 21 B). En contraste a este resultado, no se observó la regulación de *Bmp-4* a las 8 y 12 horas después de la aplicación de TGF- β 1 (9/9 casos; Fig. 21 C y D). A partir de las 24 horas del tratamiento con TGF- β 1, la expresión de *Bmp-4* se inhibe en la región posterior (3/5 casos; Fig.19 E). Posteriormente, 48 horas después del tratamiento se inhibe *Bmp-4* en el mesénquima posterior (todos los casos, n=5), tendones posteriores y en las zonas interdigitales (Fig. 21 F).

Por último, a las 72 horas del tratamiento con TGF- β 1, se muestran cambios en la morfología de los dedos III y IV similares a dedos más anteriores pertenecientes al grupo 2. En este fenotipo, la expresión de *Bmp-4* se observa en el interdígito posterior adyacente al dedo I y en el pericondrio de los dedos incluyendo los que están cambiando de identidad.

Estos resultados sugieren que *Tbx3* y *Bmp* guardan una relación directa durante el cambio en la identidad de los dedos inducido por TGF- β 1; siendo este resultado muy similar al obtenido por Suzuki y colaboradores (2004), en donde el truncamiento de *Tbx3* inhibe la expresión de *Bmp*.

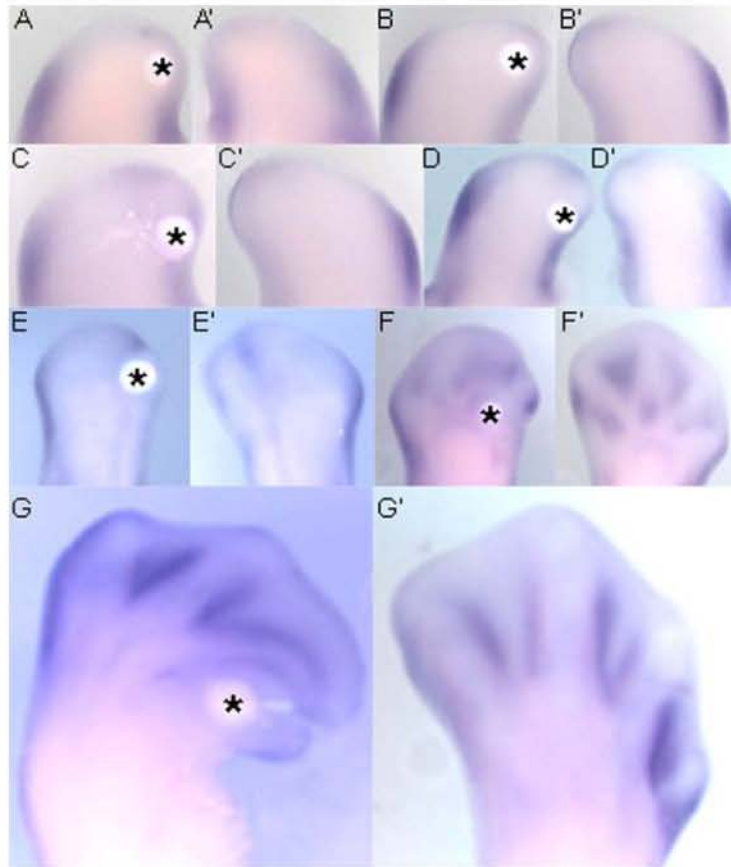


Figura 19. *Bmp-4* se inhibe después de la aplicación de TGF- β 1 en la región posterior de la extremidad de pollo. (A-D) El patrón de expresión de *Bmp-4* no cambia bajo el tratamiento con TGF- β 1 (200 ng/ μ l), en 2 horas (A), 8 horas (C) y 12 horas (D). Sin embargo, a las 4 horas, en el 50% de los casos, se inhibe la expresión de *Bmp-4* en la región posterior (B), al igual que a las 24 (E) y 48 horas (F), en estos tiempos, la inhibición se observó en todos los casos. (G) Después de 72 horas de tratamiento con TGF- β 1 se observa que los dedos III y IV han cambiado su morfología de modo similar a dedos más anteriores (fenotipo perteneciente al grupo 2); además, la expresión de *Bmp-4* se presenta en el pericondrio de todos los dedos e interdígito. La marca de hibridación de *Bmp-4* se muestra de color violeta, en tanto que la posición de la perla se encuentra indicada por un asterisco; mientras que las extremidades control están indicadas con las letras ('). Fotos tomadas en posición dorsal.

7 DISCUSIÓN

7.1 La función de TGF- β en etapas tempranas es regular el número de falanges durante el establecimiento de la identidad de los dedos.

TGF- β juega múltiples procesos durante el desarrollo de la extremidad, entre ellos está cambiar la identidad digital cuando se aplica en la punta de dedo. Por otro lado, se desconoce la función de esta proteína en la región posterior de la extremidad donde se expresa y posteriormente desaparece en las etapas tempranas del establecimiento de la identidad digital. Nuestros resultados sugieren que el mantenimiento en la expresión de *Tgf- β* produce un efecto negativo sobre los genes encargados en otorgar la identidad digital posterior, lo cual tiene como resultado, los distintos fenotipos presentados en este trabajo.

7.2 TGF- β 1 induce cambios en la identidad de los dedos posteriores en anteriores.

La aplicación de TGF- β en la región posterior distal genera una gama de resultados que se clasificaron en tres distintos grupos de fenotipos (Fig. 16). Estos fenotipos pueden ser el resultado de la posición de la perla. Aunque se trató de colocar la perla de TGF- β en la región posterior distal del primordio de la extremidad en etapa 24 la posición de ésta pudo variar en algunas ocasiones por micrómetros, dando como resultado que TGF- β se difunda de manera diferencial sobre la extremidad y por lo tanto genere los distintos fenotipos en el autómodo.

Sin embargo, aunque la posibilidad anterior no se descarta, también podría sugerirse que el efecto diferencial de TGF- β es específico de la etapa de desarrollo por lo que algunas veces esta condición no sea la misma en algunos casos. Debido a que la

aplicación de TGF- β en etapa 22 no genera un efecto sobre la extremidad, mientras que en etapa 25 no hay cambios morfológicos en los dedos (datos no mostrados). Aunque algunas veces se suministró TGF- β 1 en etapa 23, resultó en la generación de cambios en la morfología de los dedos, se presentó mayor frecuencia de fenotipos en la etapa 24. Por lo que los cambios inducidos por TGF- β son dependientes de la etapa 24, en la cual se sabe que se especifican los dedos (Dudley, *et al.* 2002).

Otra posibilidad sobre la gama de fenotipos obtenidos es la concentración de TGF- β que se libera desde la perla de heparina, ya que es desconocida y no se tiene controlada esta variante. Pudiendo ser que los fenotipos más severos recibieron una liberación más prologada de la proteína.

7.3 La aplicación de TGF- β 1 genera fenotipos similares al Síndrome Mamario Ulnario.

En nuestro estudio encontramos que la aplicación de TGF- β 1 en etapa 24, es capaz de transformar la identidad de los dedos y truncar el desarrollo de los elementos posteriores de la extremidad en el 56.2% de los casos. Estas alteraciones son muy similares al Síndrome mamario-ulnario presente en humanos, en donde la carencia de TBX3, genera extremidades sin dedos IV y V. Sin embargo, los mecanismos moleculares partícipes en la pérdida de la función de *Tbx3*, los cuales generan los fenotipos antes mencionados, no están totalmente esclarecidos.

Nuestro estudio muestra que la expresión sostenida de *Tgf- β* disminuye la expresión de *Tbx3*, generando fenotipos similares al síndrome mamario ulnario, lo cual sugiere que la inhibición de *Tgf- β* es importante para la función correcta de *Tbx3* durante el desarrollo de los elementos esqueléticos posteriores de la extremidad.

7.4 TGF- β inhibe la expresión de *Tbx3* y *Bmp* durante el proceso de cambio en la identidad digital.

Durante el cambio en la identidad de los dedos inducido por TGF- β se ha observado que *Bmp-2* deja de expresarse a partir de las 2 horas de tratamiento (Fig. 19 A); consecutivamente *Tbx3* y *Bmp-7* (pero no *Bmp-4*) se inhiben a partir de las 12 horas de exposición a TGF- β . Esta ausencia de la expresión de *Bmp-2* y la sucesiva inhibición de *Tbx3-Bmp-7* nos conduce a la idea sobre la existencia de un asa de regulación entre estos genes. Suzuki y colaboradores (2004), mostraron que la aplicación de la forma truncada de *Tbx3*, inhibe de la expresión de *Bmp-2*, en la región posterior de la extremidad. De forma similar lo ocurrido con TGF- β en este estudio, sugiere que *Bmp-2*, *Tbx3* y *Bmp-7* se regulan positivamente durante el establecimiento en la identidad de los dedos en etapas tempranas (ver Fig. 22).

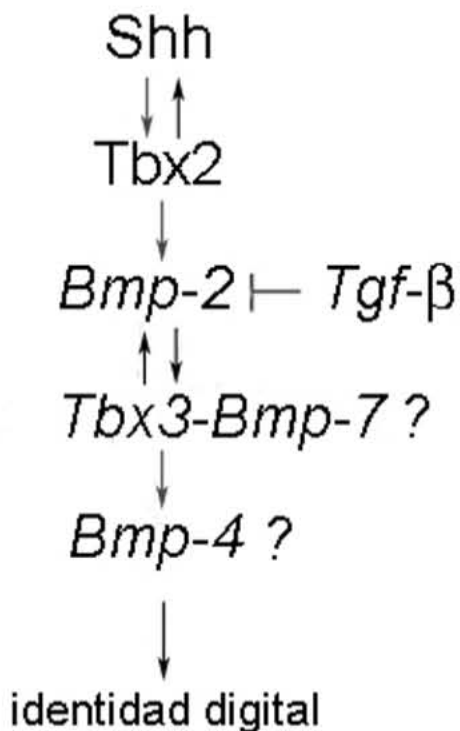


Figura. 22 Modelo propuesto de las interacciones moleculares participantes en el cambio en la identidad de los dedos inducido por TGF- β .

La señal Shh activa a Tbx2 el cual induce al gen *Bmp-2* en la región posterior de la extremidad de pollo. *Bmp-2*, regula positivamente la expresión de *Tbx-3* y *Bmp7* y probablemente a su vez a *Bmp-4*. Después de la aplicación de TGF- β la señal inducida por *Bmp-2* es interrumpida generando los cambios en la identidad digital.

7.5 *Tbx2* y *Tbx3* poseen un papel dual durante la morfogénesis de la extremidad.

Tbx2 y *Tbx3* se expresan en las áreas interdigitales, en etapas tardías del desarrollo de la extremidad; estas zonas expresan *Bmp*, las cuales están involucradas en la muerte celular programada interdigital, en el caso de los vertebrados con dedos libres (Gañan, et al. 1996).

Por otro lado, se ha comprobado la regulación positiva entre *Tbx* y *Bmp* durante el desarrollo de la extremidad. (Suzuki, et al. 2004; Tumpel, et al. 2002), lo cual sugiere que podrían regular procesos de muerte celular.

En este trabajo se observó la expresión de *Tbx2*, *Tbx3*, *Bmp-2* y *Bmp-7*, en un mesénquima ectópico que se forma entre el tarso 3 y el dedo más posterior que está cambiando de identidad. El destino de este mesénquima ectópico es la muerte celular (datos no mostrados). La coincidencia de estas moléculas en este mesénquima ectópico (destinado a morir), sugiere que *Tbx2* y *Tbx3* podrían jugar un papel dual: establecer la identidad digital y regular a las BMP en procesos de muerte celular.

7.6 *Tbx2* y *Shh* no participan en el cambio en la identidad de los dedos inducido por TGF- β .

En este trabajo no encontramos inhibición de *Tbx2* en etapas tempranas durante el proceso de cambio de identidad digital inducido por TGF- β 1. Del mismo modo, tampoco se observó regulación de *Shh* bajo el efecto de TGF- β (Medina-Vázquez, 2006); lo cual sugiere que *Tbx2* y *Shh* se regulan mutuamente. Esta idea está respaldada por los trabajos de Suzuki y colaboradores (2004). En este estudio se muestra que tras aplicar la forma truncada de *Tbx2*, la expresión de *Shh* declina; sin embargo, cuando se introduce la forma truncada de *Tbx3* la expresión de *Shh* no cambia.

Por lo cual, el proceso de cambio en la identidad digital inducido por TGF- β es independiente de la señalización *Shh-Tbx2* y dependiente de *Tbx3* y *Bmp*.

8. CONCLUSIÓN

En este trabajo se ha comprobado que al aplicar TGF- β 1 en etapa 24, en la región posterior se cambia la identidad de los dedos posteriores en anteriores y se regulan negativamente la expresión de *Tbx3* y *Bmp-2, 7 y 4*. Además, este proceso inducido por TGF- β es independiente de la expresión de *Tbx2* y de *Shh*.

Por otra parte, los truncamientos de los elementos posteriores generados por la aplicación de TGF- β en la región posterior y la regulación negativa de *Tbx3*, sugiere que TGF- β puede ser un vehículo para el estudio de anomalías en el desarrollo, en particular en el Síndrome Mamario-Ulnario.

9. PERSPECTIVAS

En este trabajo se encontró que la inhibición de TGF- β es necesaria para la regulación positiva de los genes involucrados en el establecimiento de los elementos esqueléticos posteriores de la extremidad, lo cual invita a encontrar la molécula encargada de la inhibición de TGF- β en etapas tempranas del desarrollo de la extremidad.

Por otra parte para comprender el papel de TGF- β en etapas, menores de 20 se puede administrar una molécula antagónica de TGF- β , esperando obtener dedos con mayor número de falanges ya que su persistencia en etapas posteriores induce la reducción de falanges.

Para comprender los mecanismos moleculares por los cuales TGF- β cambia la identidad de los dedos, es necesario encontrar las moléculas intermedias entre las 2 y 12 horas después de la aplicación de la proteína, ya que solo conocemos la participación de Bmp2 y de Bmp7 en los tiempos antes mencionados, entre los genes considerados se encuentran la forma represora de Gli3, Hox d11. Nuestros resultados muestran que TGF- β cambia la identidad de los dedos a través de la inhibición de BMP-2 a partir de las dos horas y de Bmp7 hasta las 12 horas. En este intervalo de tiempo se desconoce la identidad de otras moléculas que participen durante el cambio en la identidad de los dedos. Por lo que abre la posibilidad de la búsqueda de otras señales que regulen dicho mecanismo.

En trabajos posteriores se pueden realizar experimentos de ganancia de función de BMP, aplicando simultáneamente TGF- β y BMP2 o BMP7, lo cual podría resultar en la anulación del efecto que tiene TGF- β en la identidad de los dedos.

10. Apéndice

Soluciones

PBS 10X para 1 L Amortiguador de Fosfatos Salinos

80 g de NaCl

2 g de KCl

15.4 g de Na₂HPO₄

2.4 g de KH₂PO₄

Aforar a un litro con agua destilada pH=7.4

PBT- PBS-Tween 20 al 0.1% (Tween 20, Research Organics, USA)

Peróxido de Hidrógeno 6% (SIGMA, USA) en PBT para 10 mL

2 mL de H₂O₂ al 30%

8 mL de PBT

Amortiguador de Hibridación para 10 mL

50% Formamida	5 mL
SSC 5X	2.5 mL (20x pH 4.5)
SDS 1%	1 mL (10%)
tRNA 50 µg/mL	50 µL (10mg/mL)
Heparina (pH 4.5) 50 µg/mL	50 µL (10mg/mL)

Agua milli Q estéril	1.4mL
----------------------	-------

Solución I para 100 mL

Formamida	50 mL
SSC 20X pH 4.5	20 mL
SDS 10%	10 mL
H ₂ O Milli Q	20 mL

Solución II para 100 mL

Na Cl 5M	10 mL
Tris 1M pH 7.5	1 mL
Tween-20	100 µL
H ₂ O	89 mL

Solución III para 100mL

Formamida	50 mL
SSC 20X pH 4.5	10 mL
H ₂ O Milli Q	40 mL

Suero 10% de Oveja

Suero de oveja	1 mL
TBST+2mM de Levamisole	9 mL

TBST para 100mL

50 mM Tris HCl pH 7.5	5 mL	
150 mM Na Cl	3 mL	
Triton X-100	1 mL	Bio-Rad Cat 161-0407
KCl 1M	1 mL	
Agua Milli Q	89 mL	
Levamisole 200 mM	1 mL	

NTMT+Levamisole 1mM para 100mL

Tris 1 M pH 9.5	10mL	
MgCl ₂ 1 M	5mL	
NaCl 5 M	2mL	
Tween 20	0.1mL	
Agua Milli Q	82.4mL	
Levamisole 200 mM	0.5mL	

LISTA DE ABREVIATURAS

AER	Cresta Ectodérmica Apical
BMP	Proteína Morfogénica del Hueso
EN-1	Engrailed-1
FGF	Factor de Crecimiento de los Fibroblastos
GLI	Factor Transcripcional del Glioblastoma
MI	Mesodermo Intermedio
PLM	Placa Lateral del Mesodermo
SHH	Sonic Hedgehog
TBX	Factor Transcripcional T-box
TGF- β	Factor de Crecimiento Transformante β
WNT	Wingless
ZP	Zona de Progreso
ZPA	Zona de Actividad Polarizante

11. REFERENCIAS

- Ahn, S., and A. L. Joyner. 2004. Dynamic changes in the response of cells to positive hedgehog signaling during mouse limb patterning. *Cell* 118: 505-16.
- Barrow, J. R., K. R. Thomas, O. Boussadia-Zahui, R. Moore, R. Kemler, M. R. Capecchi, and A. P. McMahon. 2003. Ectodermal Wnt3/beta-catenin signaling is required for the establishment and maintenance of the apical ectodermal ridge. *Genes Dev* 17: 394-409.
- Charite, J., W. de Graaff, S. Shen, and J. Deschamps. 1994. Ectopic expression of Hoxb-8 causes duplication of the ZPA in the forelimb and homeotic transformation of axial structures. *Cell* 78: 589-601.
- Charite, J., D. G. McFadden, and E. N. Olson. 2000. The bHLH transcription factor dHAND controls Sonic hedgehog expression and establishment of the zone of polarizing activity during limb development. *Development* 127: 2461-70.
- Chimal-Monroy, J., J. Rodriguez-Leon, J. A. Montero, Y. Gañan, D. Macias, R. Merino, and J. M. Hurlle. 2003. Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev Biol* 257: 292-301.
- Cohn, M. J., J. C. Izpisua-Belmonte, H. Abud, J. K. Heath, and C. Tickle. 1995. Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell* 80: 739-46.
- Crossley, P. H., G. Minowada, C. A. MacArthur, and G. R. Martin. 1996. Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell* 84: 127-36.
- Dahn, R. D., and J. F. Fallon. 2000. Interdigital regulation of digit identity and homeotic transformation by modulated BMP signaling. *Science* 289: 438-41.
- Drossopoulou, G., K. E. Lewis, J. J. Sanz-Ezquerro, N. Nikbakht, A. P. McMahon, C. Hofmann, and C. Tickle. 2000. A model for anteroposterior patterning of the vertebrate limb based on sequential long- and short-range Shh signalling and Bmp signalling. *Development* 127: 1337-48.
- Dudley, A. T., M. A. Ros, and C. J. Tabin. 2002. A re-examination of proximodistal patterning during vertebrate limb development. *Nature* 418: 539-44.
- Dunker, N., and K. Kriegelstein. 2002. Tgfbeta2 ^{-/-} Tgfbeta3 ^{-/-} double knockout mice display severe midline fusion defects and early embryonic lethality. *Anat Embryol (Berl)* 206: 73-83.
- Ferguson, C. M., E. M. Schwarz, J. E. Puzas, M. J. Zuscik, H. Drissi, and R. J. O'Keefe. 2004. Transforming growth factor-beta1 induced alteration of skeletal morphogenesis in vivo. *J Orthop Res* 22: 687-96.
- Fernandez-Teran, M., M. E. Piedra, B. K. Simandl, J. F. Fallon, and M. A. Ros. 1997. Limb initiation and development is normal in the absence of the mesonephros. *Dev Biol* 189: 246-55.

- Gañan, Y., D. Macias, M. Duterque-Coquillaud, M. A. Ros, and J. M. Hurle. 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: 2349-57.
- García-García Jorge Ricardo. 2005. Evaluación de las funciones del TGF-beta en el desarrollo de la extremidad. Tesis de Licenciatura. Biología, Facultad de Ciencias, UNAM.72pp
- Geduspan, J. S., and M. Solursh. 1992. A growth-promoting influence from the mesonephros during limb outgrowth. *Dev Biol* 151: 242-50.
- Gilbert, S. F. 2003. *Developmental Biology*. Sinauer Associates, USA.
- Hamburger, H., and V. Hamilton. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88: 49-92.
- Harfe, B. D., P. J. Scherz, S. Nissim, H. Tian, A. P. McMahon, and C. J. Tabin. 2004. Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell* 118: 517-28.
- Hayamizu, T. F., S. K. Sessions, N. Wanek, and S. V. Bryant. 1991. Effects of localized application of transforming growth factor beta 1 on developing chick limbs. *Dev Biol* 145: 164-73.
- Honig, L. S., and D. Summerbell. 1985. Maps of strength of positional signalling activity in the developing chick wing bud. *J Embryol Exp Morphol* 87: 163-74.
- Iten, L.E. 1982. Pattern specification and pattern regulation in the embryonic chick limb bud. *Am. Zool.* 22:117-129.
- Kawakami, Y., J. Capdevila, D. Buscher, T. Itoh, C. Rodriguez Esteban, and J. C. Izpisua Belmonte. 2001. WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. *Cell* 104: 891-900.
- Laufer, E., C. E. Nelson, R. L. Johnson, B. A. Morgan, and C. Tabin. 1994. Sonic hedgehog and Fgf-4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell* 79: 993-1003.
- Lewandoski, M., X. Sun, and G. R. Martin. 2000. Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nat Genet* 26: 460-3.
- Litingtung, Y., R. D. Dahn, Y. Li, J. F. Fallon, and C. Chiang. 2002. Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature* 418: 979-83.
- Loomis, C. A., E. Harris, J. Michaud, W. Wurst, M. Hanks, and A. L. Joyner. 1996. The mouse Engrailed-1 gene and ventral limb patterning. *Nature* 382: 360-3.
- Medina-Vázquez Georgina. 2006. Papel del TGF-beta durante el establecimiento de la identidad de los dedos en la extremidad embrionaria de pollo. Tesis de Licenciatura. Investigación Biomédica Básica. Facultad de Medicina, UNAM.
- Massagué, J. 1987. The TGF-beta family of growth and differentiation factors. *Cell* 49: 437-8.
- Massagué, J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67: 753-91.

- Merino, R., Y. Gañan, D. Macias, J. Rodriguez-Leon, and J. M. Hurlle. 1999. Bone morphogenetic proteins regulate interdigital cell death in the avian embryo. *Ann N Y Acad Sci* 887: 120-32.
- Merino, R., D. Macias, Y. Gañan, J. Rodriguez-Leon, A. N. Economides, C. Rodriguez-Esteban, J. C. Izpisua-Belmonte, and J. M. Hurlle. 1999. Control of digit formation by activin signalling. *Development* 126: 2161-70.
- Montero, J. A., Y. Gañan, D. Macias, J. Rodriguez-Leon, J. J. Sanz-Ezquerro, R. Merino, J. Chimal-Monroy, M. A. Nieto, and J. M. Hurlle. 2001. Role of FGFs in the control of programmed cell death during limb development. *Development* 128: 2075-84.
- Niswander, L., C. Tickle, A. Vogel, I. Booth, and G. R. Martin. 1993. FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell* 75: 579-87.
- Noji, S., T. Nohno, E. Koyama, K. Muto, K. Ohyama, Y. Aoki, K. Tamura, K. Ohsugi, H. Ide, S. Taniguchi, and et al. 1991. Retinoic acid induces polarizing activity but is unlikely to be a morphogen in the chick limb bud. *Nature* 350: 83-6.
- Ohuchi, H., T. Nakagawa, A. Yamamoto, A. Araga, T. Ohata, Y. Ishimaru, H. Yoshioka, T. Kuwana, T. Nohno, M. Yamasaki, N. Itoh, and S. Noji. 1997. The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development* 124: 2235-44.
- Otto, F., A. P. Thornell, T. Crompton, A. Denzel, K. C. Gilmour, I. R. Rosewell, G. W. Stamp, R. S. Beddington, S. Mundlos, B. R. Olsen, P. B. Selby, and M. J. Owen. 1997. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89: 765-71.
- Parr, B. A., and A. P. McMahon. 1995. Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature* 374: 350-3.
- Pearse, R. V., 2nd, and C. J. Tabin. 1998. The molecular ZPA. *J Exp Zool* 282: 677-90.
- Pizette, S., C. Abate-Shen, and L. Niswander. 2001. BMP controls proximodistal outgrowth, via induction of the apical ectodermal ridge, and dorsoventral patterning in the vertebrate limb. *Development* 128: 4463-74.
- Riddle, R. D., M. Ensini, C. Nelson, T. Tsuchida, T. M. Jessell, and C. Tabin. 1995. Induction of the LIM homeobox gene Lmx1 by WNT7a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell* 83: 631-40.
- Riddle, R. D., R. L. Johnson, E. Laufer, and C. Tabin. 1993. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75: 1401-16.
- Sanz-Ezquerro, J. J., and C. Tickle. 2003. Fgf signaling controls the number of phalanges and tip formation in developing digits. *Curr Biol* 13: 1830-6.
- Saunders, J. W., Jr., and M. T. Gasseling. 1963. Trans-filter propagation of apical ectoderm maintenance factor in the chick embryo wing bud. *Dev Biol* 7: 64-78.
- Saunders, J. W. J. 1948. The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of ectoderm. *J. Exp. Zool.* 108: 363-403.

- Scherz, P. J., B. D. Harfe, A. P. McMahon, and C. J. Tabin. 2004. The limb bud Shh-Fgf feedback loop is terminated by expansion of former ZPA cells. *Science* 305: 396-9.
- Sun, X., F. V. Mariani, and G. R. Martin. 2002. Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature* 418: 501-8.
- Suzuki, T., J. Takeuchi, K. Koshiba-Takeuchi, and T. Ogura. 2004. Tbx Genes Specify Posterior Digit Identity through Shh and BMP Signaling. *Dev Cell* 6: 43-53.
- ten Dijke, P., and C. S. Hill. 2004. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 29: 265-73.
- Tickle, C. 1981. The number of polarizing region cells required to specify additional digits in the developing chick wing. *Nature* 289: 295-8.
- Tickle, C., B. Alberts, L. Wolpert, and J. Lee. 1982. Local application of retinoic acid to the limb bud mimics the action of the polarizing region. *Nature* 296: 564-6.
- Tickle, C., D. Summerbell, and L. Wolpert. 1975. Positional signalling and specification of digits in chick limb morphogenesis. *Nature* 254: 199-202.
- Tumpel, S., J. J. Sanz-Ezquerro, A. Isaac, M. C. Eblaghie, J. Dobson, and C. Tickle. 2002. Regulation of Tbx3 expression by anteroposterior signalling in vertebrate limb development. *Dev Biol* 250: 251-62.
- Wanek, N., D. M. Gardiner, K. Muneoka, and S. V. Bryant. 1991. Conversion by retinoic acid of anterior cells into ZPA cells in the chick wing bud. *Nature* 350: 81-3.
- Wolpert, L. 1969. Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J Theor Biol* 25: 1-47.
- Yang, Y., and L. Niswander. 1995. Interaction between the signaling molecules WNT7a and SHH during vertebrate limb development: dorsal signals regulate anteroposterior patterning. *Cell* 80: 939-47.