

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA**

**PAPEL DEL TGF- $\beta$  DURANTE EL ESTABLECIMIENTO DE LA IDENTIDAD DE  
LOS DEDOS EN LA EXTREMIDAD EMBRIONARIA DEL POLLO**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADA EN  
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA PRESENTA:**

**GEORGINA MEDINA VAZQUEZ**

**TUTOR DE TESIS: DR. JESÚS CHIMAL MONROY**

**MÉXICO, D.F. 2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó con el financiamiento de los proyectos 34334-N y 42568Q auspiciado por el consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), y con el apoyo de los proyectos IN200205 e IN216701 de DGAPA, UNAM

Al Dr. Jesús Chimal Monroy por su valiosa asesoría y dirección durante mi cuarta rotación y durante el desarrollo de esta tesis.

A los miembros del Jurado Dr. Enrique Pedernera Astegiano, Dra. Marina Macías Silva, Dr. Jaime Iván Velasco Velásquez y a la Dra. Erika Patricia Rendón Huerta por sus críticas y sugerencias a este trabajo.

Agradezco el apoyo técnico de la M. en C. Marcia Bustamante Zepeda durante la realización del trabajo experimental de este proyecto.

A mis tutores de la Licenciatura:

Dr. Jorge Membrillo Hernández  
Dra. Irma Villalpando Fierro  
Dr. Angel Zaráin Herzberg

A la Dra. Emelí Cortina y a Rene Abarca por sus valiosas críticas a este trabajo.

A la Biol. Karla Verónica García Cruz por que parte de este trabajo lo realizamos en conjunto.

Al Ing. Iván Medina Vázquez por su valiosa asesoría y soporte en el área informática y computacional requerida para el desarrollo de esta tesis.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Universidad Nacional Autónoma de México, hermosa institución de valores, ciencia y humanidades, que me brindó las herramientas académicas para mi formación profesional.

Al donativo IN216205 de la DGAPA, por el apoyo recibido durante mi estancia en el laboratorio de la Dra. Irma Villalpando Fierro.

A mis padres, mis grandes maestros de la vida, quienes además de su apoyo económico durante mi formación, recibí educación, valores y cariño. Por ser los mejores padres que me pudieron haber tocado en la vida y porque este esfuerzo también es de ellos.

Juan Medina Villanueva, por su insaciable y contagiante gusto por la ciencia y el conocimiento.

Georgina Vázquez Meza, por quererme tanto, por su preocupación y su gran apoyo para que yo entrara a esta hermosa carrera.

A mis hermanos:

Ivan, por sus sabios consejos, compañía y amistad.

Juan Carlos, por enseñarme a decir "no se"

A mi novio Rubén Maldonado, por su amor y compañía. Porque siempre estuvo aquí para brindarme palabras de aliento. Gracias por compartir conmigo esta importante etapa de mi vida.

A un gran filósofo del conocimiento. Aunque ya no estas aquí, sabes que fuiste un pilar muy importante en mi educación y en mi vida. Fidencio Villanueva Rojas.

A mis estimados Profesores de Biología de la ENP 1, Emilio y Elvira, quienes me permitieron tener el primer acercamiento a un laboratorio de investigación y me hicieron partícipe de él.

A los miembros del laboratorio: Rene Abarca, Emelí Cortina, Karla García, David Garciadiego, Karina Mares, Marcia Bustamante, David Cruz, Alberto Ríos y Martha Díaz, por sus valiosos comentarios y críticas a este trabajo.

A mis estimados amigos y compañeros de la Licenciatura, Genaro y René por la catarsis en el circuito escolar.

**"Hay que soñar, pero a condición de creer seriamente en nuestro sueño, de examinar con atención la vida real, de confrontar nuestras observaciones con nuestro sueño, de realizar escrupulosamente nuestra fantasía."**

Lenin

---

# CONTENIDO

---

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	2
Nomenclatura de genes y proteínas.	3
INTRODUCCIÓN	
Morfogénesis de la extremidad	
Inducción y establecimiento de la extremidad.	5
Transducción de la señalización del FGF.	11
Establecimiento del eje antero-posterior	13
Identidad digital.	18
Etapa temprana del establecimiento de la identidad digital.	19
Etapa tardía del establecimiento de la identidad digital.	22
Establecimiento del eje dorso-vental.	24
Interacción de los centros de señalización.	25
Formación de los elementos esqueléticos.	28
El Factor de Crecimiento Transformante- $\beta$ .	29
Transducción de la Señalización de TGF- $\beta$ .	30
ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
HIPÓTESIS	37
OBJETIVOS	38
DISEÑO EXPERIMENTAL	39
MATERIAL Y MÉTODOS	
Material biológico y soluciones.	41
Preparación de perlas de acrílico-heparina y de intercambio iónico.	41
Manipulación <i>in ovo</i> .	41
Aplicación de TGF- $\beta$ y SB-431542 en la extremidad embrionaria.	42
Tinción de esqueleto.	43
Tinción de rojo neutro.	43
Hibridación <i>in situ</i> en embriones completos.	43

Análisis de imágenes.	46
RESULTADOS	
La aplicación de TGF- $\beta$ 1 en la punta de los dedos E28 Induce cambios anteriorizantes en la Identidad digital.	47
La aplicación de TGF- $\beta$ 1 en la punta de los dedos regula negativamente la expresión de <i>Fgf8</i> .	49
La inhibición de la señalización de TGF- $\beta$ genera dedos truncados.	51
La aplicación de TGF- $\beta$ 1 en la región posterior distal de la extremidad en E24 induce cambios anteriorizantes de la identidad digital.	52
La aplicación de TGF- $\beta$ 1 en la región posterior distal de la extremidad en E24 modifica el dominio de expresión de <i>Fgf8</i> a las 48h post-tratamiento.	54
La aplicación de TGF- $\beta$ 1 en la región posterior distal de la extremidad en E24 no regula la expresión de genes involucrados en el establecimiento de la Identidad digital en etapas tempranas como <i>Shh</i> y <i>Hox</i> .	56
DISCUSIÓN	58
CONCLUSIONES	65
PERSPECTIVAS	66
APÉNDICE A	67
APÉNDICE B	69
APÉNDICE C	71
REFERENCIAS	76

## ABREVIATURAS

AER	Cresta Ectodérmica Apical
bHLH	Motivo hélice asa hélice básico
BMP	Proteína Morfogenética del Hueso
Co-Smad	Smad Cooperadora
dHAND	Factor de Transcripción con motivo bHLH
E	Estadio de desarrollo según Hamburger y Hamilton, 1951
En-1	Engrailed-1
FGF	Factor de Crecimiento Fibroblástico
FGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Fibroblástico
GDF	Factor de Crecimiento y Diferenciación
Gli3	Factor transcripcional del Glioblastoma-3
Hox	Genes Homeobox
ID	Identidad Digital
Lmx1	Factor con homeodominio LIM
MI	Mesodermo Intermedio
mRNA	Ácido Ribonucléico Mensajero
PLM	Placa Lateral del Mesodermo
R-Fng	Radical Fringe
R-Smad	Smad Regulada por Receptor
Shh	Sonic Hedgehog
Sox	Factores de Transcripción con dominio HMG
Sp8/9	Factores de Transcripción tipo <i>Buttonhead</i> 8/9
Tbx2/3	Factor de Transcripción T-box 2/3
TGF- $\beta$	Factor de Crecimiento Transformante Beta
T $\beta$ RI/II	Receptor para TGF- $\beta$ tipo I/II
Wnt	Wingless/ in related
ZPA	Zona de Actividad Polarizante

## Papel del TGF- $\beta$ durante el establecimiento de la identidad de los dedos en la extremidad embrionaria del pollo

Las extremidades de los vertebrados presentan un patrón tridimensional básico que se establece por un crecimiento diferencial hacia tres ejes: próximo-distal, dorso-ventral y antero-posterior. Las moléculas involucradas en el crecimiento próximo-distal de la extremidad son los Factores de Crecimiento Fibroblástico (FGF8 y FGF4), provenientes de una estructura denominada Cresta Ectodérmica Apical (AER), que promueven la elongación de la extremidad. La especificación de las estructuras del eje dorso-ventral está dirigida por la expresión de *Wnt7a* expresado en el ectodermo dorsal, el cual especifica destinos dorsales. Por otro lado, la expresión de *En-1* en el ectodermo ventral especifica los destinos ventrales de la extremidad.

Los elementos esqueléticos como los dedos de nuestra mano están organizados en un patrón antero-posterior, donde el dedo pulgar es el dedo más anterior y el dedo meñique es el más posterior. El dedo pulgar posee dos articulaciones y los demás tres articulaciones pero con diferente tamaño y grosor. Las características que distinguen a cada dedos son denominadas Identidad Digital (ID). El pollo es un buen modelo para el estudio de la ID, ya que todos sus dedos son diferentes. El establecimiento de la ID ocurre en dos etapas, una temprana, en donde las moléculas involucradas son el morfógeno SHH, las citocinas BMP, los factores de transcripción HOX y TBX, y una etapa tardía en donde las moléculas que participan son las BMP y los TBX provenientes del interdígito. FGF8 es importante en esta etapa ya que su mantenimiento en la punta del dedo hace que éste aumente una falange indicando un cambio en la ID, sin embargo, se desconoce el mecanismo que regula la expresión de *Fgf8* en este proceso.

Se ha demostrado que la aplicación de TGF- $\beta$  en la punta del dedo de pollo (estadio 28) trunca su desarrollo, fenotipo que nosotros clasificamos como cambio de ID, ya que el dedo tratado reduce su número de falanges, sugiriendo que TGF- $\beta$  pudiese tener un papel en el establecimiento de la ID en etapas tardías.

Adicionalmente, resultados previos en el laboratorio demostraron que la aplicación de TGF- $\beta$  en la extremidad de pollo en estadio 24 altera el patrón antero-posterior de los dedos modulando la expresión de los genes *Bmp2*, *Tbx2* y *Tbx3*. Pero se desconoce si en la etapa temprana del establecimiento de la ID, TGF- $\beta$  regula la expresión de *Shh*, *Hox* y *Fgf8*.

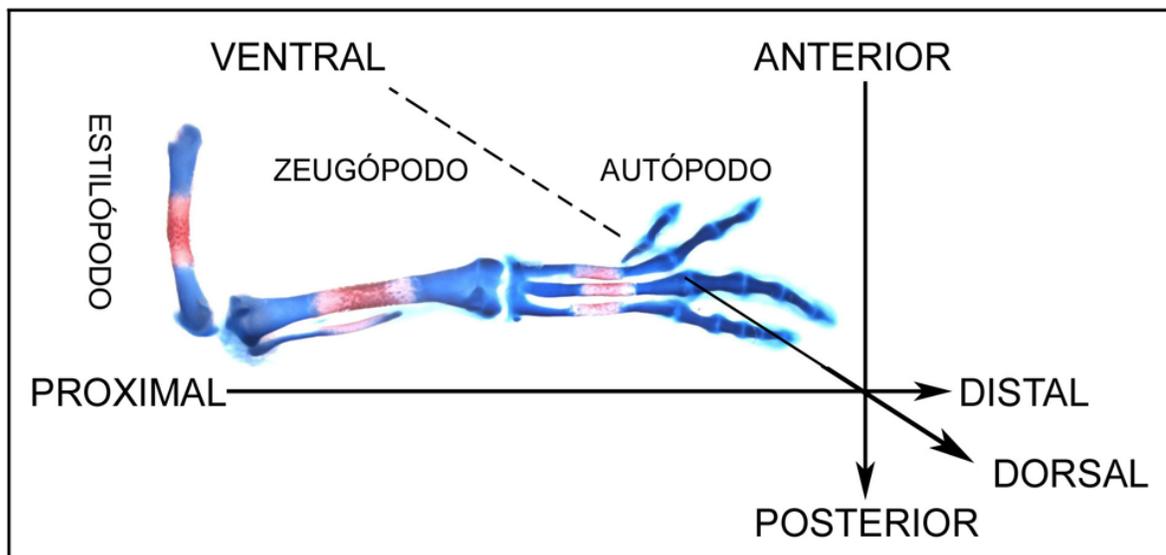
Se conocen los patrones de expresión de *Fgf8* y *Tgf- $\beta$ 2*, sin embargo, al analizarlos y compararlos encontramos que la expresión de *Tgf- $\beta$ 2* en la punta de los dedos precede y coincide con la desaparición de la expresión de *Fgf8* en la AER, sugiriendo que TGF- $\beta$  pudiera estar controlando la ID mediante la regulación negativa de *Fgf8* en la etapa tardía del establecimiento de la ID.

Con la idea de evaluar el papel de TGF- $\beta$  durante el establecimiento de la ID en etapas tardías, se aplicó TGF- $\beta$  en la punta del dedo, encontrando cambios anteriorizantes de la ID (acortamiento del número de falanges). Para evaluar si estos cambios se debían a la regulación negativa de *Fgf8*, se realizaron hibridaciones *in situ* que demostraron que la expresión de *Fgf8* es regulada negativamente por TGF- $\beta$  a las 12 h. Adicionalmente, la aplicación de TGF- $\beta$  en la región posterior distal de la extremidad en la etapa temprana del establecimiento de la ID, también indujo anteriorización digital, pero demostramos que esta alteración no se debe a la regulación de los genes involucrados en el establecimiento de la ID como *Shh*, *Hox* y *Fgf8*.

En este trabajo proponemos que TGF- $\beta$  controla la etapa tardía del establecimiento de la ID mediante la regulación diferencial del crecimiento próximo-distal de los dedos a través de FGF8 y que durante la etapa temprana del establecimiento de la ID, TGF- $\beta$  no regula a *Shh*, *Hox* ni a *Fgf8*.

## INTRODUCCIÓN

Las extremidades de los vertebrados son estructuras especializadas que permiten el desplazamiento, caza y defensa de los organismos. La aparición evolutiva de estas estructuras ha permitido la adaptación de las especies a su medio, adquiriendo diversos tamaños y formas de acuerdo a sus necesidades, especializándose así para desplazarse volando, nadando o corriendo. Aunque estas estructuras muestran especializaciones evolutivas, todas las extremidades de los vertebrados presentan un patrón tridimensional básico que se evidencia durante su formación en el desarrollo embrionario.



**Figura 1.** Esquema representativo de los ejes tridimensionales de la extremidad, así como la clasificación de los segmentos proximo-distales (estilópodo, zeugópodo y autópodo).

Durante la formación de la extremidad embrionaria se establecen centros de señalización que organizan a la extremidad en una estructura tridimensional, mediante la coordinación del crecimiento diferencial hacia los tres ejes dimensionales, próximo-distal, antero-posterior y dorso-ventral.

Las extremidades anteriores (brazos o alas) y posteriores (piernas o patas) se dividen en tres segmentos a lo largo del eje próximo-distal, el estilópodo, el zeugópodo y el autópodo (Fig. 1). El estilópodo es la porción más proximal y

comprende al húmero (extremidad anterior) o al fémur (extremidad posterior). El zeugópodo es la parte media de la extremidad y está compuesto por el radio y la ulna (extremidad anterior) o la tibia y la fíbula (extremidad posterior). El autópedo es la parte más distal de las extremidades y comprende a los dedos, carpos (extremidad anterior) o tarsos (extremidad posterior). Estos elementos esqueléticos están orientados en el eje antero-posterior, siendo el dedo pulgar, el radio y la tibia los elementos más anteriores.

En cuanto al eje dorso-ventral, la región dorsal comprende las uñas, los nudillos y el dorso de la mano o pie, mientras que la porción ventral de las extremidades comprende las palmas y los cojinetes.

## **Morfogénesis de la extremidad**

### **Inducción y establecimiento de la extremidad embrionaria**

Durante el desarrollo embrionario de los tetrápodos, las extremidades comienzan a formarse como primordios o protuberancias pares que sobresalen perpendicularmente al eje antero-posterior del cuerpo embrionario, a nivel de las somitas 15 a 20 para extremidades anteriores y 26 a 32 para extremidades posteriores en el caso del pollo (Wilkins. 2002).

La inducción de la extremidad en el caso del pollo, comienza en el estadio de desarrollo 13 (E13) y se completa en el E15 (clasificación según Hamburger y Hamilton (1951), ver apéndice A) (Pinot. 1970). Evidencias experimentales mostraron que las moléculas involucradas en este proceso son algunos miembros de la familia del Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF), tales como FGF2, FGF4 y FGF8, ya que la implantación de perlas impregnadas con FGF2, 4 y 8 indujeron la formación de extremidades ectópicas en la región lateral del cuerpo del embrión, lo que sugiere que esta región es competente a formar extremidades (Cohn et al. 1995).

En la búsqueda del mecanismo inductor de las extremidades, diversos grupos de investigación aportaron evidencias experimentales que sugirieron que el componente mesonéfrico del Mesodermo Intermedio (MI) es el tejido inductor de las extremidades (Crossley et al. 1996; Vogel et al. 1996), ya que la aplicación de barreras metálicas (Stephens y McNulty. 1981) y la ablación de tejido (Geduspan y Solursh. 1992), que evitan la comunicación entre MI y la placa lateral del mesodermo (PLM) generan extremidades incompletas. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que en los E13-15, la fuente del inductor es el MI (componente nefrogénico y ductos de Wolff). Sin embargo, Fernández-Terán et al. (1997) estudiaron la expresión de *Fgf8* en embriones con bloqueo en la extensión del ducto de Wolff en E9-11, donde la expresión de *Fgf8* es inhibida. Estos resultados llevaron a la conclusión de que la expresión de *Fgf8* es inducida en el mesodermo nefrogénico por señales provenientes del ducto de Wolf.

La expresión de *Fgf8* es detectada en el mesodermo nefrogénico indiferenciado a nivel de las zonas prospectivas de la extremidad aún en ausencia del ducto de Wolf. Sin embargo, esta expresión no se mantiene en estadios posteriores al E15, sugiriendo que FGF8 es inicialmente expresado en el mesodermo nefrogénico independiente a la presencia del ducto de Wolf. Pero el mantenimiento de su expresión puede depender de señales provenientes del ducto (Martin et al. 1998).

La expresión de *Fgf8* en el MI tiene un efecto local en la PLM ya que induce la expresión de *Fgf10* en las regiones correspondientes a los campos de las extremidades (regiones presuntivas de la extremidad). Lo que sugiere que FGF10 es el mediador mesodérmico de la inducción de *Fgf8* en el ectodermo distal (Ohuchi et al. 1997). Por otro lado, la expresión de *Fgf10* en la PLM induce la expresión de *Fgf8* en el ectodermo de la extremidad en desarrollo. Al inducir una extremidad ectópica mediante la implantación de perlas impregnadas con FGF8 en el flanco del embrión, se induce la expresión de *Fgf10* en el

mesénquima antes de que se detecte *Fgf8* en el ectodermo. Por lo que se sugiere que la expresión de *Fgf8* en el MI induce la expresión de *Fgf10* en la PLM y éste a su vez induce la expresión de *Fgf8* en el ectodermo distal.

Una vez inducida la extremidad, las células de la PLM subyacentes al campo de la extremidad comienzan a proliferar, haciendo evidente el primordio de la extremidad. Esta proliferación es inducida por FGF8 proveniente del ectodermo distal, determinando así el papel mitogénico de FGF8 (Aono e Ide. 1988; Niswander et al. 1993). La Cresta Ectodérmica Apical (AER por sus siglas en inglés *Apical Ectodermal Ridge*) es una estructura localizada en la región más distal de la extremidad, y es aquí donde se expresa *Fgf8* (Fig. 2A y C).

En el pollo, la AER es evidente en el E18, pero las células progenitoras de la AER inicialmente se localizan distribuidas en el ectodermo del campo de la extremidad (Altabef et al. 1997). Sin embargo, en el estadio en el que la AER comenzará a formarse, las células pre-AER se localizan principalmente en la superficie ectodérmica distal y ventral del primordio temprano (Michaud et al. 1997). En el ratón, la primera manifestación de la morfogénesis de la AER es el cambio en la forma de las células ectodérmicas, de planas a cuboideas, que posteriormente migran, hasta localizarse en una línea que corre a lo largo del eje antero-posterior y divide a la extremidad en porciones dorsal y ventral. En el ratón, la AER consiste en una capa de células basales pseudoestratificadas y varias capas superficiales de células aplanadas (Milairé et al. 1974; Loomis et al. 1998), y en el pollo, la AER consiste en una capa de células basales pseudoestratificadas y una capa superficial de células aplanadas o peridermo (Todt y Fallon. 1984).

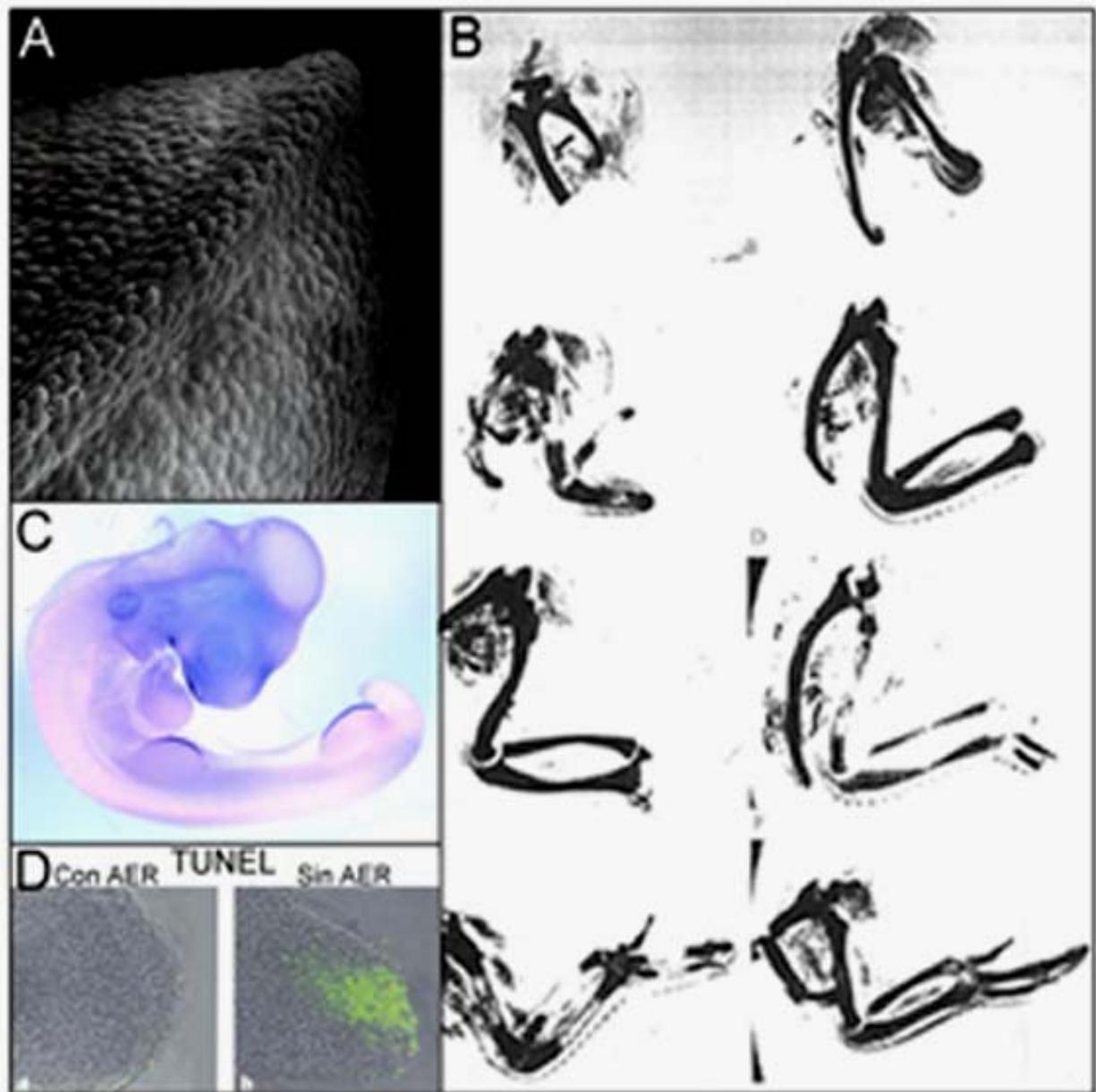
Saunders en 1948 reportó que la AER es importante para el desarrollo de la extremidad, ya que su eliminación genera extremidades truncadas únicamente con elementos proximales. La severidad de este fenotipo, depende del estadio de desarrollo en el que se elimina esta estructura, es decir, la eliminación

temprana de la AER sólo permite la formación de elementos proximales, mientras que en la eliminación tardía únicamente permite la formación de los elementos más distales (Fig. 2B), debido a que la eliminación produce muerte celular en el mesénquima subyacente (Sun et al. 2002) (Fig. 2D).

Una vez establecida la AER, ésta mantiene la expresión de *Fgf8* (Ohuchi et al. 1997) mediante una asa de regulación positiva con el mesodermo subyacente que expresa *Fgf10* (Mahmood et al. 1995). Este mecanismo asegura la proliferación de células mesenquimáticas que generarán la masa celular necesaria para la formación de los elementos esqueléticos.

FGF10 induce la expresión de *Fgf8* en la AER mediante la activación de la vía de señalización WNT/ $\beta$ -catenina (Ver apéndice B), esto se demostró en mutantes nulos de los efectores de la señalización WNT, los cuales no presentan expresión de *Fgf8* en la AER (Galcerán et al. 1999). Adicionalmente, los factores de transcripción tipo *Buttonhead* (con motivo dedos de zinc de unión a DNA) SP8 y SP9 se expresan en la AER y regulan positivamente la expresión de FGF8. SP8 responde a la señalización Wnt para inducir la expresión de FGF8, mientras que SP9 responde directamente a FGF10 para mantener la expresión de FGF8 en la AER (Kawakami et al. 2004).

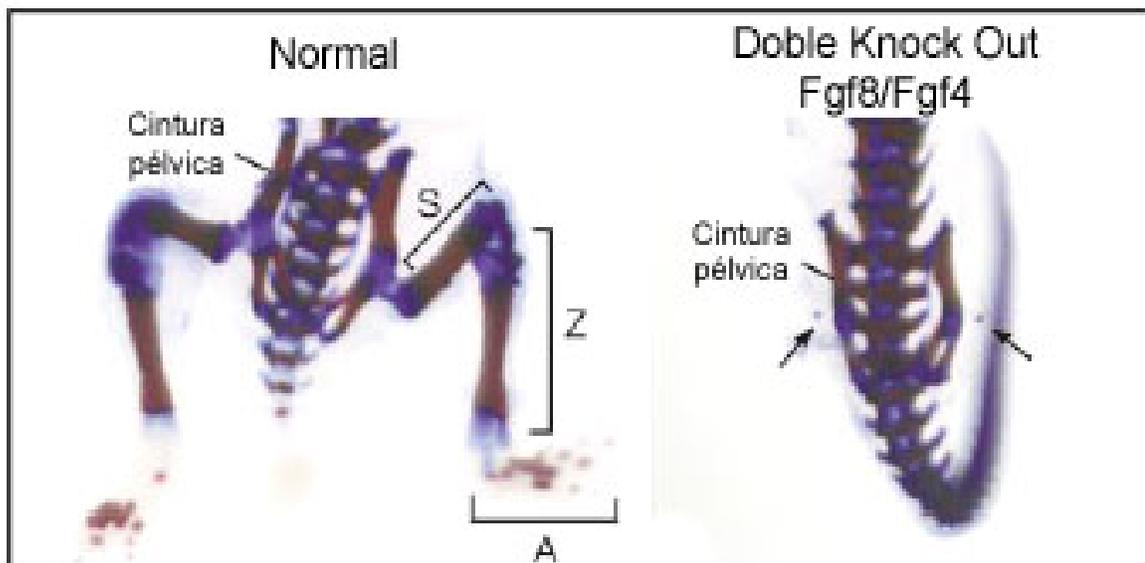
El papel de FGF8 como promotor de la proliferación celular fue confirmado mediante su inactivación local en la AER de ratón, donde los tres segmentos de la extremidad se desarrollaron hipoplásicos, probablemente debido a la disminución de la masa celular necesaria para la formación normal de las extremidades (Lewandowski et al. 2000).



**Figura 2.** La Cresta Ectodérmica Apical (AER) controla el crecimiento proximo-distal de la extremidad. A) Micrografía electrónica de barrido de la AER (ratón E10) (Gilbert. 2003). B) Truncamiento del crecimiento próximo-distal de la extremidad embrionaria del pollo, tras la eliminación a diferentes tiempos de la AER (Saunders. 1948). C) Hibridación *in situ* para el mRNA de *Fgf8*, donde el color púrpura señala que *Fgf8* se expresa en la AER del embrión de pollo E22. D) La eliminación de la AER provoca muerte celular en el mesénquima subyacente detectado (color verde) por la técnica de TUNEL (Sun et al. 2002).

El gen *Fgf4* también se expresa en la AER, pero se restringe a la región posterior de ésta, comenzando a ser evidente un día después del inicio de la expresión de *Fgf8*. El papel de FGF4 se determinó mediante la inactivación local de su función en la AER, encontrando que las extremidades se formaban prácticamente normales en ausencia de FGF4, sugiriendo que la función de FGF4 es compensada con las de otros FGF expresados en la AER (Moon et al. 2000; Sun et al. 2000). De hecho, varios miembros de la familia de los FGF son capaces de rescatar la función de la AER cuando ésta es eliminada, tales como FGF2, -4, -8 y -9 que se sabe son producidas por la AER ( Martin. 1998)

La doble inactivación de *Fgf4* y *Fgf8* (mutante condicional regulado bajo el promotor de *Msx2*, específico de la AER) da como resultado la ausencia de extremidades posteriores (Sun et al, 2002; Fig. 3).



**Figura 3.** La doble inactivación de *Fgf8/Fgf4* en ratón, previene el desarrollo de las extremidades posteriores (flechas; S=estilópodo, Z=zeugópodo, A=autopodo; Sun et al. 2002).

Por lo tanto, la señalización de FGF es necesaria para inducir y mantener el crecimiento próximo-distal de las extremidades. Adicionalmente, también se

sugiere que FGF4 es responsable de la compensación parcial del desarrollo distal de la extremidad en ausencia de FGF8 (Boulet et al. 2004).

Es importante resaltar que la posición y longitud de la AER juega un papel muy importante en la morfogénesis de la extremidad, pues las dimensiones de la AER influyen en el número de dedos que se desarrollarán. Por ejemplo, una AER más larga genera polidactilias (dedos supernumerarios; Goetinck y Abbott. 1964; MacCabe et al. 1974), de igual forma, cuando se sobreexpresa *Fgf4* en el sitio de expresión de *Fgf8* se forman polidactilias (Lu et al. 2005).

Estos resultados permitieron el diseño de un modelo que sugiere que los primeros elementos cartilagosos en formarse son los más proximales. Las células mesenquimáticas indiferenciadas (zona de progreso) subyacentes a la AER (Summerbell et al. 1973), que por proliferación se alejan de ésta, formarán primero las condensaciones cartilagosas del estilópodo, zeugópodo y luego las del autópedo). El modelo de la zona de progreso propone que la posición de las células a lo largo del eje próximo-distal está especificada por un mecanismo temporizador, donde las células “miden” el tiempo que ellas permanecen en la zona de progreso, y su “reloj” se detiene cuando ellas dejan esta zona (Tickle y Wolpert 2002). Adicionalmente Dudley et al. (2002) aportan evidencia experimental y proponen un modelo de preespecificación, donde los elementos esqueléticos de las extremidades se preforman en miniatura dentro del primordio que crecerá con el tiempo. Sin embargo, no se ha explicado el mecanismo molecular que apoye la teoría de la especificación temprana de la extremidad.

### **Transducción de la señalización del FGF**

El Factor de Crecimiento Fibroblástico fue originalmente identificado como un promotor de la proliferación de fibroblastos; sin embargo, esta respuesta proliferativa incluye otros tipos celulares como queratinocitos, osteoblastos

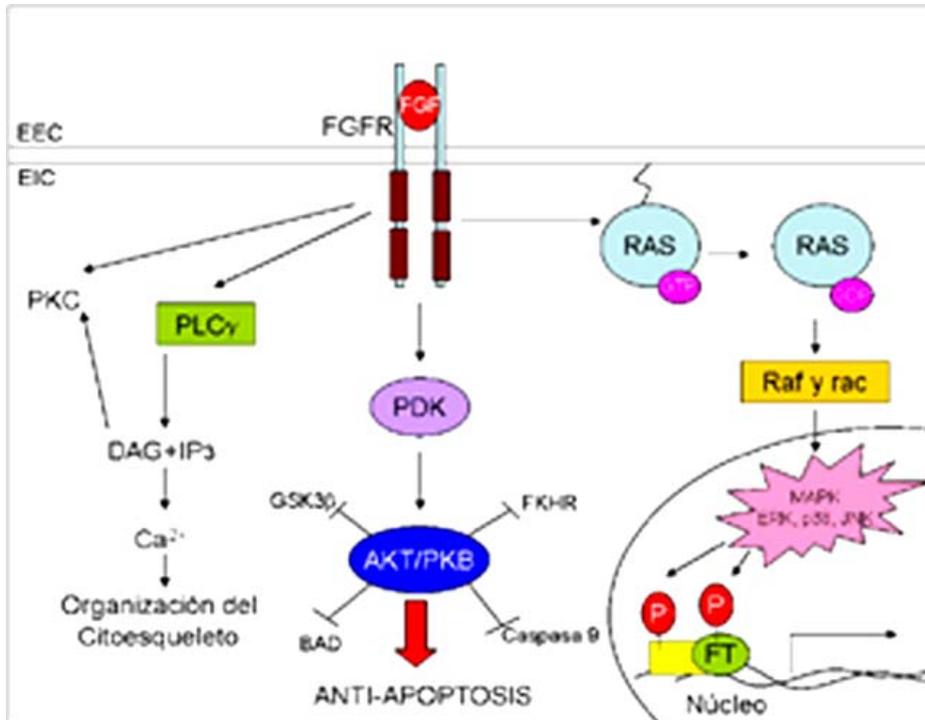
inmaduros, progenitores de oligodendrocitos y células endoteliales (Basilico y Moscatelli. 1992).

Los Factores de Crecimiento fibroblástico y sus receptores específicos transmembranales (FGFR) forman parte de una amplia y compleja familia de moléculas implicadas en una variedad de procesos celulares durante el desarrollo embrionario, tales como el mantenimiento de la proliferación de células indiferenciadas, la diferenciación y/o la organización de diferentes linajes tisulares. Cuando los receptores son mutados o son expresados inapropiadamente, causan diversas patologías que van desde desordenes morfogénéticos hasta cáncer (Dailey et al. 2005).

La familia de los FGF está compuesta de 22 miembros en humanos y en ratón (Ornitz e Itoh. 2001). Estas moléculas señalizan mediante la activación de una familia de receptores de superficie celular, codificados en cuatro genes distintos, que por edición postranscripcional pueden producir numerosas isoformas de FGFR-1, -2, -3, -4 y -5 (Jonson y Williams. 1993).

La señal FGF se transduce al núcleo cuando FGF se une a sus receptores FGFR y activa múltiples vías de transducción, incluyendo aquellas que involucran la activación de Ras, MAPK (Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos), ERK (Cinasas Reguladas por Señales extracelulares), p38, PLC- $\gamma$  (Fosfolipasa C- $\gamma$ ), JNK, (Cinasa del Amino Terminal de JUN) y PKC (Proteína Cinasa-C; Fig. 4).

La activación de las diferentes vías intracelulares depende del tipo celular donde se activen los receptores. Durante el desarrollo de la extremidad, se ha demostrado que MKP3 (MAPK fosfatasa 3) un antagonista de la señalización MAPK, es un regulador positivo de la señalización de FGF8. Adicionalmente, FGF8 es capaz de inducir la expresión de *Mkp3* en el mesénquima utilizando la vía del fosfatidil inositol-3-OH cinasa (Kawakami et al. 2003).



**Figura 4.** Generalidades de la vía de señalización de FGF. La unión de FGF a sus receptores FGFR promueven la activación de RAS promoviendo la activación de la vía Raf1-MEK-MAPK para modular la transcripción génica. FGFR también es capaz de activar a PLC  $\gamma$  (Fosfolipasa C  $\gamma$ ), la cual hidroliza al fosfolípido de membrana PIP2 (Fosfatidil inositol 4, 5-Bifosfato), para generar IP3 (Inositol 1, 4, 5-trifosfato) y DAG (Diacil Glicerol). IP3 es

responsable de la movilización intracelular del almacén de calcio, para influenciar a los factores de transcripción (FT) sensibles a Ca $^{2+}$  o para promover la organización del citoesqueleto, mientras que DAG activa algunas isoformas de PKC. Adicionalmente, FGF activa a AKT para inhibir a las señales apoptóticas.

Se ha demostrado que el receptor FGFR1 está involucrado en el desarrollo embrionario de las extremidades debido a que su inactivación local genera malformación de la AER, disminución de la expresión de *Shh* y la ausencia de la mayor parte de los elementos del autópodo (Li et al. 2005), por otra parte, se ha demostrado que algunas isoformas de FGFR2 obtenidas por *splicing* alternativo median el asa de regulación FGF10-FGF8 (Arman et al. 1999).

### Establecimiento del eje antero-posterior

Las estructuras que componen a la extremidad, están organizadas en un orden espacial, y cada elemento posee características que obedecen al eje antero-posterior (cefálico-caudal) del embrión. El radio y la ulna, la tibia y la fíbula y cada uno de los dedos de la extremidad son diferentes entre sí, aunque las diferencias en número de dedos, longitud, grosor y número de articulaciones dependen de cada especie.

El crecimiento diferencial en el eje antero-posterior que permite evidenciar las características morfológicas de los elementos esqueléticos de las extremidades es coordinado por un centro de señalización denominado Zona de Actividad Polarizante (ZPA).

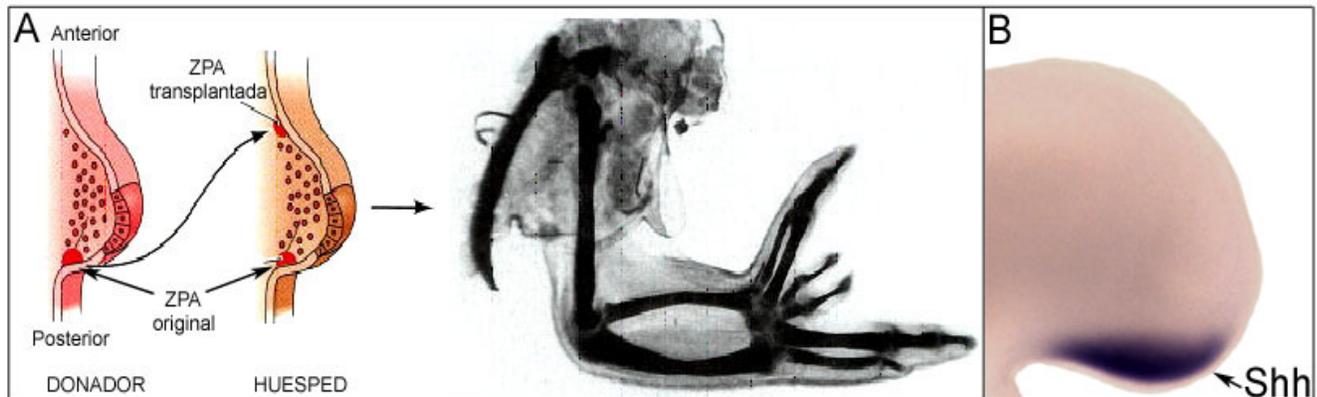
Saunders y Gasseling en 1968, identificaron a la Zona de Actividad Polarizante en la región posterior de la extremidad y determinaron su función mediante la implantación de una segunda ZPA en la región anterior. Esta manipulación indujo la formación de un segundo autópodo pero en imagen especular (Fig. 5A). Sin embargo, el número de dedos formados y su identidad dependieron del número de células transplantadas. Esto permitió formular un modelo que explica que las células de la ZPA secretan un morfógeno en gradiente que dirige los patrones antero-posteriores de la extremidad (Tickle. 1999).

Se demostró que la ZPA es un importante centro de señalización que expresa al gen *Shh* (*Sonic hedgehog*, homólogo a *Hedgehog* en *Drosophila*) (Fig. 5B), cuyo producto es la molécula responsable de la actividad polarizante, ya que al implantar células que sobreexpresan *Shh* en la región anterior de la extremidad se tiene el mismo efecto que la ZPA (Riddle et al. 1993).

Adicionalmente, cuando se implanta una perla embebida en ácido retinoico en la región anterior, se mimetiza el efecto polarizante de SHH (Tickle et al. 1982), ésto se debe a que el ácido retinoico induce la expresión de *Shh* en la ZPA ectópica (Riddle et al. 1993).

El establecimiento de la ZPA inicia cuando el mesodermo de la placa lateral sintetiza ácido retinoico, un derivado de la vitamina A. Las células que se encuentran en la región posterior del primordio de la extremidad poseen la capacidad de responder al ácido retinoico mediante la inducción de la expresión de *dHand* (factor de transcripción con motivo de unión a DNA bHLH)

que induce a su vez, la expresión de *Shh* en el mesénquima posterior (Niederreither et al. 2002).



**Figura 5.** La Zona de Actividad Polarizante es un importante centro de señalización que participa en el establecimiento del eje antero-posterior de la extremidad embrionaria. A) El transplante de una ZPA a la región anterior de una extremidad huésped induce la formación de un autópedo ectópico en la región anterior pero en imagen especular (modificada de Gilbert, 2003). B) Hibridación *in situ* para el mRNA de *Shh*, donde la coloración púrpura indica que *Shh* se expresa en la ZPA en E24.

Evidencia que apoya esto, está dada por la inactivación de *dHand* en ratón, que previene la expresión de *Shh* (Charité et al. 2000), así como la expresión ectópica de *dHand* induce la formación de una ZPA ectópica y dedos supernumerarios en imagen especular (Fernández-Terán et al. 2000).

La expresión ectópica de *Hoxb8*, un factor de transcripción homeobox, en la región anterior de la extremidad, mimetiza el efecto del transplante de la ZPA, lo que sugiere que HOXB8 es importante para la expresión de *Shh* en la ZPA (Charité et al. 1994). Adicionalmente, *Hoxb8* responde a la inducción por ácido retinoico, por lo que se le considera como mediador del establecimiento de la ZPA (Lu et al. 1997). Sin embargo, aunque *Hoxb8* es necesario para la inducción de la ZPA, no lo es para su mantenimiento (Charité et al. 1994).

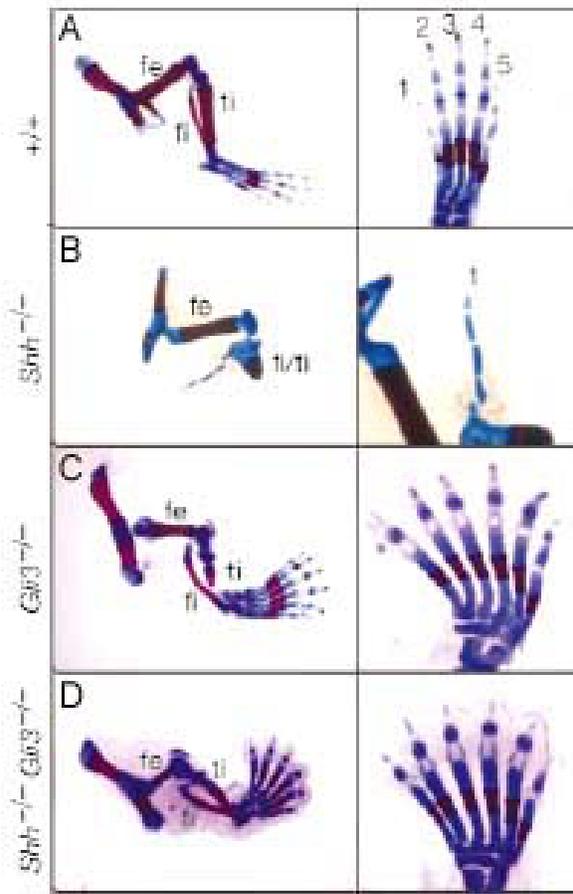
SHH señala intracelularmente uniéndose a un receptor transmembranal llamado Patched (*Ptc*). La actividad de PTC se encuentra abatida en ausencia de SHH y su unión con éste, lo activa. Smoothened (SMO), otra proteína

transmembranal que actúa río abajo de PTC, es un mediador positivo de la señalización SHH, SMO regula la actividad de los factores de transcripción GLI1, 2 y 3. En ausencia de SHH, GLI3 se modifica proteolíticamente a una forma represora (GLI3R), que actúa como represor transcripcional de los genes blanco de SHH. En presencia de SHH, GLI3 se encuentra en su forma activadora (GLI3A) que favorece la transcripción de sus genes blanco (Ver apéndice B; Huangfu y Anderson, 2006).

*Gli3* se expresa en la región distal de la extremidad. GLI3R regula negativamente la expresión de *Shh* así como la de sus genes blanco en la región anterior de la extremidad, mientras que la forma activadora de GLI3 es más abundante en la región posterior de la extremidad y regula positivamente los genes blanco de SHH. Dentro del grupo de los genes blanco de la señalización HH conservados evolutivamente se encuentran algunos miembros de la familia de *Wnt*, *Bmp*, *Ptc* y *Hox*.

Estudios genéticos en ratón (Fig. 6) demuestran que mutantes *Shh*<sup>-/-</sup> sólo desarrollan un dedo en la región anterior con apariencia de dedo 1, mientras que mutantes *Gli3*<sup>-/-</sup> presentan polidactilias sin identidad, sin embargo, la cruce de estos dos mutantes también genera polidactilias, fenotipo muy parecido al de *Gli3*<sup>-/-</sup>. Esto demuestra que *Shh* y *Gli3* no son indispensables para la formación de los dedos, sin embargo, ambas señales son necesarias para regular la identidad digital, ya que las polidactilias carecen de identidad (Litingtung et al. 2002). Esto sugiere que la función de *Shh* y de *Gli3* es delimitar la potencialidad intrínseca de la extremidad para formar polidactilias mediante un balance de las formas GLI3A/GLI3R. Otro dato importante proveniente del mutante *Shh*<sup>-/-</sup> es que la formación e identidad del dedo 1 es independiente de *Shh*.

## Extremidad posterior



**Figura 6.** *Gli3* y *Shh* regulan el número de dedos y la ID. Análisis de esqueleto de ratón E16.5 (fe, fémur; ti, tibia; fi, fíbula y dedos numerados de acuerdo a su ID). A) Ratón silvestre. B) *Shh*<sup>-/-</sup>, el estilópodo es normal y el zeugópodo está reducido y fusionado, el autópodo sólo presenta el dedo 1. C) *Gli3*<sup>-/-</sup>, con acortamiento de fémur y aplasia tibial, el autópodo presenta polidactilias sin ID. D) *Shh*<sup>-/-</sup> *Gli3*<sup>-/-</sup> las extremidades son prácticamente normales pero el autópodo presenta polidactilias sin ID. Note que el fenotipo de los autópodos en C y D son prácticamente indistinguibles (Litingtung et al. 2002).

Otro gen cuya expresión se encuentra polarizada en la extremidad es la de la Proteína Morfogénica del Hueso 2 (*Bmp2*), que es inducida por SHH en la región posterior de la extremidad (Laufer et al. 1994). Sin embargo, aunque BMP2 es inducido por SHH, BMP2 *per se*, no posee efecto polarizante, pues al ser aplicado en la región anterior de la extremidad, no induce duplicación del autópodo en imagen especular, como lo hace la proteína SHH o los transplantes de ZPA (Duprez et al. 1996).

La expresión continua de *Shh* es requerida para potenciar y mantener la expresión de *Bmp2* en el mesénquima, durante la promoción de los dedos, para luego ser independiente de *Shh*. Adicionalmente, la duración e intensidad de la expresión de *Bmp2* correlaciona con las características o identidad de los dedos ectópicos que se formarán en respuesta a SHH. Se propone que SHH

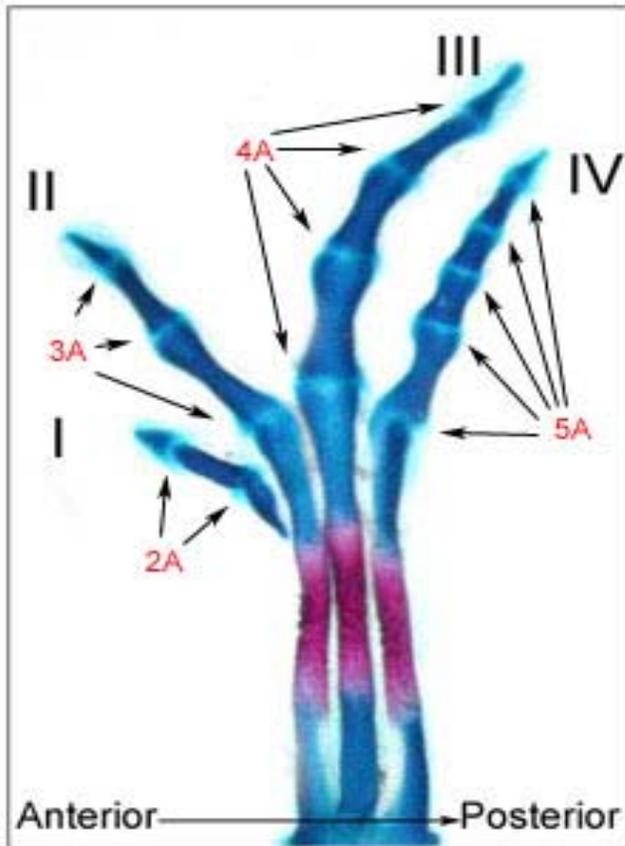
actúa en dos etapas para controlar el patrón digital: en la primera, SHH prepara a las células del mesénquima haciéndolas competentes a formar dedos, y en la segunda etapa, SHH actúa induciendo la expresión de *Bmp2*, para que luego, éste sea independiente de SHH (Drossopoulou et al. 2000).

## **Identidad Digital**

La adaptación de los vertebrados a su medio, se debió en parte a las especializaciones de las extremidades, las cuales les permitieron optimizar sus mecanismos de caza y defensa. Debido a que los dedos adquirieron morfologías específicas que favorecieron la adaptación y uso de herramientas como en el caso de nuestras manos y las de algunos primates.

Cada uno de los dedos de nuestra mano o pie, son diferentes, el dedo pulgar (dedo anterior en la mano) es más corto y posee dos falanges, mientras que los demás dedos poseen tres falanges. De igual forma, el dedo meñique (dedo más posterior) es más delgado y pequeño en comparación con los otros dedos. En el caso de los murciélagos, los dedos anteriores también son cortos en comparación con los dedos posteriores. Sin embargo, estos últimos son muy largos y con amplias membranas interdigitales que les permiten volar a manera de alas. A las diferencias morfológicas entre cada dedo, como número de articulaciones o falanges, longitud y grosor se les denomina Identidad Digital (Danh y Fallon. 2000).

La pata del pollo (*Gallus gallus*) posee cuatro dedos, numerados del I al IV en orden antero-posterior. Cada dedo posee tamaño y número de articulaciones diferentes. El dedo I posee dos articulaciones, el dedo II tres articulaciones, el dedo III cuatro articulaciones y el dedo IV cinco articulaciones (Fig. 7). Debido a que todos los dedos del pollo son diferentes, su extremidad embrionaria es un buen modelo para estudiar el mecanismo molecular que establece la Identidad Digital.



**Figura 7.** El embrión de pollo es un buen modelo para el estudio del establecimiento de la ID, pues todos sus dedos son distintos. La nomenclatura de los dedos comienza en orden ascendente y en dirección antero-posterior. El dedo I tiene dos articulaciones (A) y dos falanges; el dedo II tres; el dedo III, cuatro y el dedo IV, cinco articulaciones y cinco falanges. Nótese que los dedos posteriores tienen mayor número de articulaciones o falanges en comparación con los dedos anteriores.

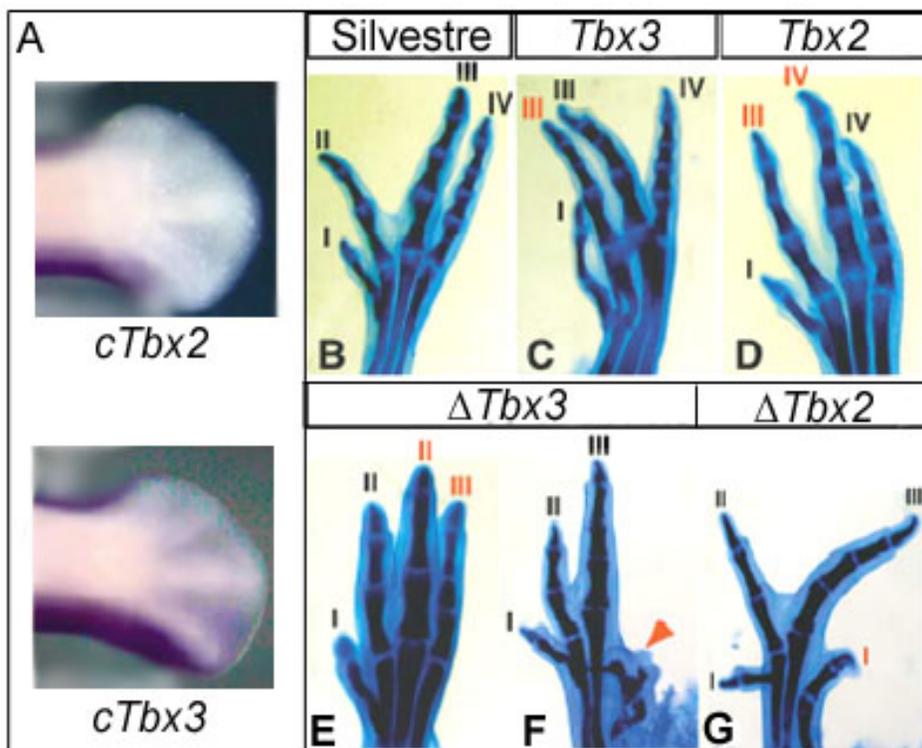
Se ha propuesto que el establecimiento de la ID ocurre en dos etapas, una temprana y otra tardía (Suzuki et al. 2004). El establecimiento del eje antero-posterior da como resultado el crecimiento diferencial o polarizado de los dedos a lo largo de este eje, sugiriendo, que el establecimiento de la ID en un inicio, está coordinado por las moléculas SHH, BMP, HOX y TBX, quienes especifican la ID en la etapa temprana.

### **Etapas tempranas del establecimiento de la ID**

Harfe et al. (2004) sugieren que la formación e identidad de los dedos posteriores depende de la concentración y tiempo de expresión de *Shh* en la ZPA. Estos autores realizaron un mapeo de las células que expresaron *Shh* en la

ZPA, y concluyen que los dedos son especificados no solo por el nivel de exposición a SHH, sino que también por diferencias en el tiempo de exposición a manera de “gradiente temporal”. Por lo tanto, se propuso un modelo murino, en donde los dedos IV y V dependen del tiempo de expresión de *Shh*, el dedo III depende del tiempo de la expresión y de la concentración de SHH, mientras que el dedo II depende únicamente de la concentración, y el dedo I es independiente de *Shh*.

Se ha demostrado que los factores de transcripción de caja-T, *Tbx2* y *Tbx3* que se expresan en la región anterior y posterior de la extremidad en estadios tempranos (Fig. 8A) están involucrados en el crecimiento diferencial del eje antero-posterior.



**Figura 8.** El patrón antero-posterior de los dedos es alterado por la manipulación de la expresión de *Tbx2* y *Tbx3* en la extremidad del pollo. A) Hibridación *in situ* que muestra la expresión de *Tbx2* y *Tbx3* en los bordes anteriores y posteriores de la extremidad en E27, con el dominio de expresión posterior más extendido. B) Patrón esquelético de una extremidad de pollo silvestre en E36 (vista dorsal). Los dedos IV, III, II y I tienen cinco, cuatro, tres y dos falanges respectivamente. C) La sobreexpresión de *Tbx3* transforma el dedo II en dedo III. D) La sobreexpresión de *Tbx2* transforma al dedo II en III y al dedo III en IV. E) La sobreexpresión de la forma truncada de *Tbx3* transforma a los dedos III y IV en dedos II y III, y en algunos casos se pierden elementos posteriores (F). G) La sobreexpresión de la forma truncada de *Tbx2* transforma al dedo IV en I (Suzuki et al. 2004).

cuatro, tres y dos falanges respectivamente. C) La sobreexpresión de *Tbx3* transforma el dedo II en dedo III. D) La sobreexpresión de *Tbx2* transforma al dedo II en III y al dedo III en IV. E) La sobreexpresión de la forma truncada de *Tbx3* transforma a los dedos III y IV en dedos II y III, y en algunos casos se pierden elementos posteriores (F). G) La sobreexpresión de la forma truncada de *Tbx2* transforma al dedo IV en I (Suzuki et al. 2004).

La sobreexpresión de *Tbx3* y *Tbx2* en el pollo en E11 induce transformaciones posteriorizantes, convirtiendo el dedo II a dedo III y dedo III en dedo IV respectivamente. Esta transfección induce la expresión de *Bmp2* y disminuye la de *Gremlin* (antagonista de BMP). La sobreexpresión de *Tbx2* favorece la expansión del dominio de expresión de *Shh* hacia la región anterior y disminuye el de *Gli3*. Adicionalmente, el tratamiento con BMP induce la expresión de *Tbx2* y *Tbx3*, sugiriendo una asa de regulación positiva entre *Tbx2/3* y *Shh*, *Gli3* y *Bmp* (Suzuki et al. 2004).

Durante el desarrollo de la extremidad, varios miembros de la familia de los *Hox* son expresados de manera polarizada, como lo son *Hoxd11*, *Hoxd12* y *Hoxd13*, cuyo patrón de expresión sugiere su participación en la regionalización de los segmentos de la extremidad (Mackem y Knezevic. 1999; Fig. 9).

Una de las evidencias que apoyan la idea de que los *Hox* participan en el establecimiento de eje antero-posterior, es que la expresión ectópica de *Hoxd12* en la región anterior de la extremidad embrionaria de pollo convierte al dedo más anterior (con dos falanges) en un dedo trifalángico característico de un dedo más posterior. En casos más severos, se presenta duplicación parcial de la extremidad en imagen especular, fenotipo parecido al inducido por el transplante de la ZPA a la región anterior (Fig. 5; Knezevic et al. 1997). De hecho, estos fenotipos se deben a que *Hoxd12* induce ectópicamente a *Shh* en la región anterior.

La sobreexpresión de *Hoxd11* en la región anterior de la extremidad embrionaria de pollo también presenta fenotipos afectados en el patrón antero-posterior de los dedos, como son, el cambio del dedo anterior con dos falanges a dedo posterior con tres, los cuales son fenotipos parecidos a los encontrados con *Hoxd12* (Morgan et al. 1992), debido a que *Hoxd11* también es capaz de regular positivamente a *Shh*.



**Figura 9.** Patrón de expresión de los genes *Hox* en la extremidad embrionaria del pollo (E23 a la izquierda y E26 a la derecha). En el E23, los genes *Hoxd11* y *12* se expresan en la región posterior distal de la extremidad (A y B), mientras que *Hoxa13* se restringe a la región distal de la extremidad (C). En E26, *Hoxd11* y *12* cambian su patrón, expresándose ahora en dos regiones separadas, la porción posterior distal y la posterior proximal. C) *Hoxa13* en E26 comienza a expresarse en los radios digitales.

El triple mutante *Hoxd11, 12, y 13 en ratón*, presenta polidactilias similares a las encontradas en el doble mutante *Shh<sup>-/-</sup> Gli3<sup>-/-</sup>*, donde todos los dedos tienen apariencia uniforme, fenotipo interpretado como la pérdida de la polaridad antero-posterior (Zákány y Duboule. 1996). Sin embargo, la aplicación de SHH o su expresión ectópica también induce la expresión de *Hoxd11* y *Hoxd12*, sugiriendo que una vez establecida la ZPA, *Shh* sustenta una asa de regulación positiva con *Hoxd11* y *Hoxd12*, para que éstos actúen río abajo (Riddle et al. 1993; Yang et al. 1997).

### **Etapas tardías del establecimiento de la ID**

Aunque la polaridad de la extremidad se ha establecido desde etapas tempranas (aún sin haberse formado los dedos), la identidad digital no se ha fijado permanentemente y ésta puede ser modificada en etapas posteriores, abriendo así, otra ventana de establecimiento de la ID. Se ha encontrado que la etapa temprana está coordinada por varias moléculas que participan en este proceso, tales como las BMP que se expresan en los interdígitos (E26 en adelante). Las BMP interdigitales están asociadas a la promoción de la muerte celular, ya que cuando se bloquea su señalización con antagonistas, la muerte

celular no ocurre en los interdígitos, y su aplicación la acelera. Se ha puesto de manifiesto la importancia de los interdígitos en el establecimiento de la ID, ya que la eliminación de éstos, genera cambios anteriorizantes en los dedos. Si el segundo interdígito es eliminado, el dedo II se transforma en dedo I, y si el tercer interdígito es eliminado, el dedo III cambia a dedo II, es decir, el interdígito posterior da identidad al dedo anterior contiguo. En acuerdo a estos experimentos, la aplicación de perlas impregnadas con SHH en los interdígitos induce cambios posteriorizantes ya que éste incrementa la expresión de *Bmp7* (Dahn y Fallon. 2000).

Adicionalmente, *Tbx3* y *2* que son expresados en la región posterior del autópodo y en los interdígitos posteriores, también especifican las identidades digitales mediante la regulación interdigital de las BMP, estableciendo un asa de regulación positiva  $Tbx \leftrightarrow Bmp$ . Cuando la señalización BMP es bloqueada con Nogina en E28 y son sobreexpresados *Tbx2* y *Tbx3*, éstos sólo pueden inducir la formación de dedos III y II, respectivamente, en vez de IV y III, esto indica que la señalización interdigital de BMP es importante para que TBX2 y TBX3 induzcan la formación de los dedos IV y III (Suzuki et al. 2004).

Un dato importante es que el ratón Knock out de *Tbx3* presenta deformaciones severas en el autópodo, con la pérdida de la expresión de *Shh* (Davenport et al. 2003). Esto se debe a que en las etapas tempranas del establecimiento de la ID, TBX3 controla la expresión de *Bmp2* y el establecimiento de la comunicación BMP2-SHH (Suzuki et al. 2004). De esta manera, los *Tbx* son el puente entre la etapa temprana y la etapa tardía del establecimiento de la ID.

Adicionalmente, el síndrome humano ulnar-mamario, el cual se debe a mutaciones en *Tbx3*, se caracteriza por ausencia de los dedos posteriores III y IV y/o V, sugiere que *Tbx3* es un factor clave para el desarrollo de los dedos posteriores (Bamshad et al. 1997) y del establecimiento del patrón antero-posterior de los dedos.

## Establecimiento del eje dorso-ventral

Las extremidades de los vertebrados también poseen características diferentes en las porciones dorsales y ventrales, por ejemplo, las uñas de los tetrápodos siempre se localizan en la región dorsal, en cambio, los músculos y tendones presentan patrones dorso-ventrales que permiten la movilidad a las articulaciones.

Se ha reportado que el ectodermo dirige el establecimiento del eje dorso-ventral, debido a que si el ectodermo dorsal es retirado y luego colocado en la región ventral, la extremidad experimental desarrolla un patrón dorsal donde debería de ser ventral (MacCabe et al. 1974). Tras la búsqueda de la explicación molecular del establecimiento de las identidades dorso-ventrales, se encontró que el ectodermo dorsal y ventral de la extremidad presentan diferencias en la expresión de varios genes. El ectodermo dorsal expresa *Wnt7a*, que al ser mutado en ratones, presentan extremidades biventrales, donde los cojinetes palmares también se encuentran en la región dorsal (Parr y MacMahon. 1995). El papel de WNT7a es controlar la expresión de *Lmx-1* en el mesodermo dorsal (Factor con homeodominio LIM), donde ambos están involucrados en la especificación de las identidades dorsales (Riddle et al. 1995, Vogel et al. 1995). La expresión de *Engrailed-1* (*En-1*) en el ectodermo ventral parece ser requerido para la especificación de los destinos ventrales debido a que ratones *En-1*<sup>-/-</sup> presentan fenotipos bidorsales (Loomis et al. 1996), ya que en el ectodermo ventral *En-1* previene la expresión de *Wnt7a* (Cygan et al. 1997; Loomis et al. 1998).

Se propone que la región ventral de la extremidad está especificada por la expresión de *Bmp* y *En-1* en el ectodermo ventral ya que la sobreexpresión de *Bmp* en el ectodermo dorsal induce la expresión ectópica de *En-1* en el ectodermo dorsal, inhibiendo la expresión de *Wnt7a* y *Lmx1*, dando como resultado extremidades biventrales (Pizette et al. 2001).

## Interacción de los centros de señalización

Los centros de señalización son regiones caracterizadas por secretar factores (Tabla 1) que controlan la morfogénesis. El resultado de activar ciertas vías de transducción es la activación o la represión génica, que es mediada por factores de transcripción (Tabla 2).

**Tabla 1.** Moléculas de señalización que se requieren en el desarrollo de la extremidad (Modificada de Wilkins. 2002).

Familia de moléculas de señalización	Miembro	Papel en el desarrollo de la extremidad	Fuente celular
FGF	FGF10	-Inductor del primordio de la extremidad.	-Placa lateral del mesodermo
	FGF8	-Proliferación de las células mesenquimáticas; crecimiento proximo-distal.	-AER
	FGF4	-Participa en un asa de regulación positiva con FGF10. -Participa en un asa de regulación positiva con SHH.	-Región posterior de la AER
Hedgehog	SHH	-Morfógeno que establece la polaridad antero-posterior de la extremidad.	-ZPA
WNT	WNT7A	-Participa en la especificación de la porción dorsal de la extremidad.	-Ectodermo dorsal
BMP	BMP2, 4 y 7	-Regulan negativamente a los FGF. -Promueven muerte interdigital. Participan en el establecimiento de la Identidad digital en etapa temprana y tardía.	-AER y mesénquima posterior de la extremidad en etapas tempranas y en Interdígotos en etapa tardía

**Tabla 2.** Factores de transcripción que participan en la morfogénesis de la extremidad (Modificada de Wilkins. 2002).

Familia de factores de transcripción	Miembros	Papel en el desarrollo de la extremidad	Sitio de expresión
HOX	HOXD11 HOXD12	-Regionalización posterior de la extremidad. -Efectores de la señalización SHH.	-Región posterior y distal de la extremidad
	HOXD13 HOXA13		
TBX	TBX2 TBX3	-Establecimiento de la ID en etapas tempranas y tardías.	Región anterior proximal y con más intensidad en la región posterior
LIM	LMX1	-Establecimiento del patrón dorsal de la extremidad.	Mesénquima
En	En-1	-Establecimiento del patrón ventral de la extremidad.	Ectodermo ventral

Los centros de señalización en la extremidad son la AER, que controla el crecimiento proximo-distal; la ZPA, que establece el crecimiento diferencial a lo largo del eje antero-posterior; y el ectodermo dorsal y ventral que especifican las características de las porciones dorsales y ventrales respectivamente.

La comunicación entre los diferentes centros de señalización es de suma importancia para el desarrollo normal de la extremidad, ya que la interrupción de cualquiera de las interacciones, genera graves alteraciones.

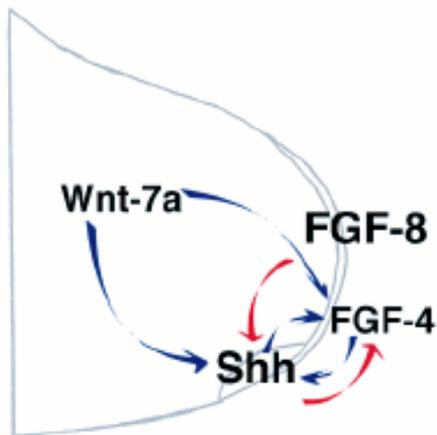
El ácido retinoico producido por el mesénquima de la extremidad induce la expresión de *Shh* en la ZPA, a su vez SHH induce la expresión de *Fgf4* en la región posterior de la AER, entonces FGF4 y 8 entablan un asa de regulación positiva con *Shh* (Fig. 10; Laufer et al. 1994; Niswander et al. 1994).

Las BMP producidas por el mesénquima del primordio de la extremidad, regulan negativamente la expresión de los *Fgf* en la AER. Sin embargo, la inducción de

*Fgf4* se establece cuando SHH induce la expresión de *Gremlin*, un antagonista de las BMP que permite que las BMP no regulen negativamente a los *Fgf*.

La expresión de *Fgf4* en la región posterior de la AER es mantenida por SHH, que además induce la expresión de *Gremlin*, un antagonista de BMP (Capdevila e Izpisúa-Belmonte. 1999) que previene que las BMP regulen negativamente a los FGF de la AER (Gañán et al. 1998, Zuniga et al. 1999). *Fgf8* que también es expresado en la AER no depende directamente de la inducción por SHH, ya que cuando se pierde la expresión de *Gremlin*, la AER se desorganiza y se altera negativamente la expresión de *Fgf8*.

Cabe mencionar que en la AER también se expresan varios miembros de la familia de las *Bmp* como la *Bmp2*, 4 y 7 (Francis et al. 1994) y su papel en la AER es delimitar, y regular negativamente el tamaño de la cresta, Esto se demostró con un mutante condicional de *Nogina* (antagonista de BMP), que expresa ectópicamente en la AER, y presenta una AER engrosada con la expresión de *Fgf8* incrementada, dando como resultado fenotípico polidactilias (dedos supernumerarios) con sindactilias (dedos pegados con tejido interdigital) (Wang et al. 2004). Adicionalmente, *Wnt7a* se expresa en el ectodermo dorsal y contribuye a la regulación positiva de *Shh* en la ZPA y de *Fgf4* en la AER (Fig. 10), esto se demostró en ratones mutantes para *Wnt7a*, donde se altera la expresión de *Shh* y se pierden elementos posteriores (Yang y Niswander. 1995). Estos datos demuestran la importancia de las interacciones entre los diferentes centros de señalización.



**Figura 10.** Modelo actual sobre de la inducción molecular y mantenimiento de *Shh*. FGF8 de la AER participa en la inducción de *Shh* en el mesénquima posterior de la extremidad. SHH subsecuentemente induce a *Fgf4* en la región posterior de la AER. Después de esta inducción, FGF4 se requiere para el mantenimiento de *Shh* y *Shh* es requerido para el mantenimiento de FGF4. Adicionalmente, WNT7A en el ectodermo dorsal es requerido para el mantenimiento de *Shh* y *Fgf* en la AER (Pearse y Tabin. 1998).

## Formación de los elementos esqueléticos

Un proceso importante para el desarrollo normal de los elementos esqueléticos de las extremidades, es la formación de un molde de cartílago, que posteriormente se diferenciará en hueso. El desarrollo de los elementos esqueléticos comienza con la condensación de células mesenquimáticas precondrogénicas para formar el molde de cartílago. Se han identificado varias moléculas que participan en la formación de las condensaciones como los factores de transcripción SOX9, SOX8, SOX6, L-SOX5 y miembros de la familia de las BMP.

*Sox 9* ha sido considerado como el gen maestro de la condrogénesis y es expresado por las células precondrogénicas, en las condensaciones cartilaginosas, en la punta de los dedos, y además se sabe que es capaz de regular la expresión de los genes que codifican a las principales proteínas del cartílago como Colágena tipo II y Agrecano.

Se ha demostrado la capacidad condrogénica de otras moléculas como lo es el Factor de Crecimiento Transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), ya que su aplicación en el tejido interdigital promueve condrogénesis y la formación de dedos ectópicos (Gañán et al. 1996). Este proceso es mediado por una cascada de inducciones génicas, donde se involucran a los principales marcadores de cartílago, como *Sox9*, *Sox8*, *Colágena tipo II* y *Agrecano* (Chimal-Monroy et al. 2003).

La expresión de *Tgf- $\beta$ 2* es evidente en el mesénquima y en el blastema tendinoso de la extremidad embrionaria de pollo desde el E21. Al avanzar el desarrollo, la expresión de Tgf- $\beta$ 2 se restringe a la punta de los dedos (E25), a los tendones en formación y a las articulaciones.

El patrón de expresión de *Tgf-β2* y su capacidad condrogénica en los interdígitos, sugiere que la señalización de TGF-β juega un papel importante en el desarrollo de los dedos.

En humanos, la mutación del Receptor tipo II para TGF-β (*TβRII*) permite la formación de un dedo supernumerario en la región posterior de la mano, sugiriendo que la señalización del TGF-β está involucrada en la regulación del número de dedos en la región posterior de la extremidad (Loeys et al. 2005).

Las Activinas (βA y βB) también son expresadas en la extremidad del embrión de pollo. Su patrón de expresión se localiza en los radios digitales y en la punta de los dedos y se ha demostrado que son importantes para su morfogénesis (Merino et al. 1999). Se ha reportado que las activinas βA y βB se expresan en la punta de los dedos.

Activina βA se encuentra en la punta de los dedos durante todo su desarrollo, mientras que activina βB se expresa en la punta de los dedos sólo cuando éstos han dejado de crecer. Debido a que es específica de la última falange, se ha considerado como uno de los marcadores de dicha estructura (Merino et al. 1999).

### **El Factor de Crecimiento Transformante-Beta (TGF-β)**

El Factor de Crecimiento Transformante-β, (TGF-β, por sus siglas en inglés, *Transforming Growth Factor-Beta*), es miembro de una superfamilia de citocinas involucradas en diversos procesos celulares, tales como proliferación, migración y reconocimiento (Massague et al. 2000; Piek et al. 1999).

La superfamilia del TGF-β comprende varios polipéptidos relacionados estructuralmente, como la familia de las Proteínas Morfogenéticas del Hueso

(BMP) y los Factores de Crecimiento y Diferenciación (GDF); la familia de las activinas y la familia del TGF- $\beta$  (Shi y Massagué. 2003).

Hay cinco tipos de TGF- $\beta$ , cada uno codificado por diferentes genes e identificados en diferentes tipos celulares y especies. TGF- $\beta$ 1, es un polipéptido de 25 KDa, identificado en fibroblastos transformados de mamíferos. Las isoformas TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3, se identificaron en células de pollo y mamífero, a diferencia de TGF- $\beta$ 4 que sólo se ha encontrado en células de pollo. TGF- $\beta$ 4 es el homólogo en pollo de TGF- $\beta$ 1 en mamíferos (Burt y Paton. 1992) y TGF- $\beta$ 5 es específico de *Xenopus*. La forma activa del TGF- $\beta$  es un homodímero estabilizado por interacciones hidrofóbicas y fijado por enlaces disulfuro intersubunitarios.

Las activinas también son proteínas diméricas constituidas por las subunidades  $\beta$ A o  $\beta$ B. Las principales formas de las activinas son: Activina A ( $\beta$ A  $\beta$ A), activina B ( $\beta$ B  $\beta$ B) y activina AB ( $\beta$ A  $\beta$ B) y en la extremidad embrionaria del pollo se han identificado ambas subunidades cuyo papel es condrogénico (Merino et al. 1999).

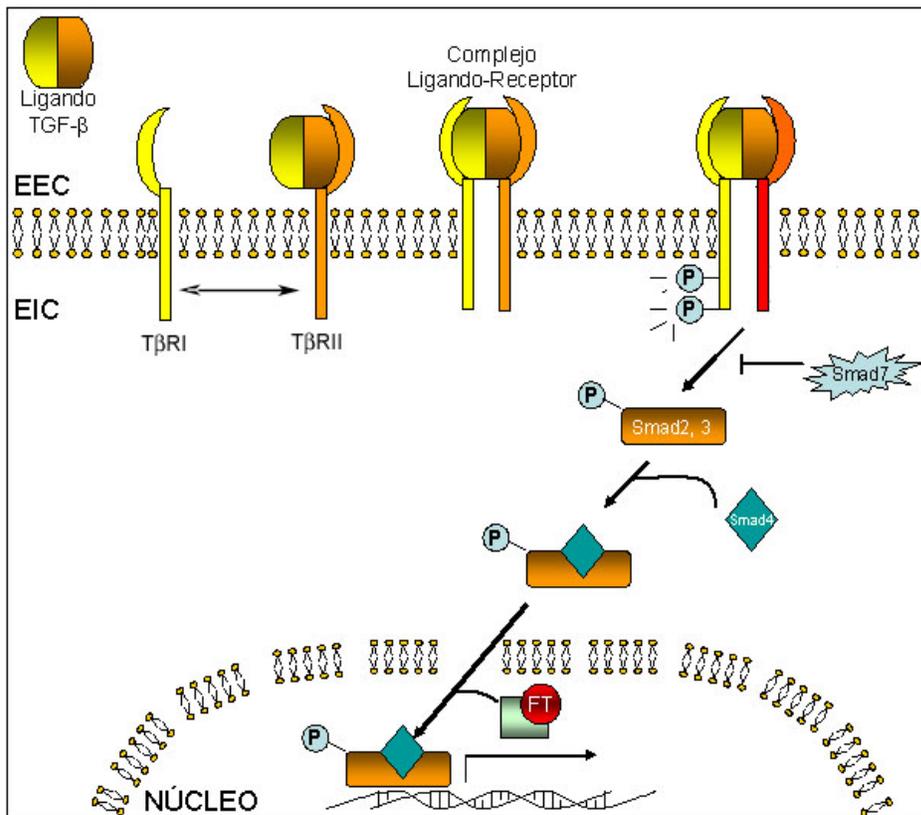
### **Transducción de la Señalización de TGF- $\beta$ .**

Los miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  transducen su señal intracelularmente mediante la unión a dos receptores transmembranales (tipo I y tipo II) con actividad cinasa de residuos de serina y treonina.

La vía comienza con la unión del TGF- $\beta$  o activinas al receptor tipo II (T $\beta$ R-II dimerizado), que es una cinasa constitutivamente activada, esta interacción promueve el reclutamiento y asociación del receptor tipo I (T $\beta$ R-I dimerizado,

también llamado Alk5 por sus siglas en inglés *Activin-Like Kinase*). La formación de este complejo promueve que el receptor tipo II fosforile al receptor tipo I, activándolo para propagar la señal al interior de la célula, mediante la fosforilación de las proteínas Smad (Fig. 11).

Hay ocho tipos de proteínas Smads, clasificadas en tres grupos dependiendo de su función: R-Smads (Smads Reguladas por Receptores), Co-Smads (Smads Cooperadoras) y las I-Smads (Smads Inhibidoras).



**Figura 11.** Mecanismo canónico de transducción de la señal del TGF-β. Después de la activación del Receptor tipo I (TβRI), las R-Smad (Smad 2/3) son fosforiladas (P). Esta fosforilación promueve la formación de complejos homoméricos, y el ensamblaje de la Co-Smad (Smad 4). Los complejos heteroméricos se translocan al núcleo, donde regulan la transcripción de genes blanco junto con otros factores de transcripción (FT). La I-Smad (Smad 7), puede regular

negativamente a la vía, uniéndose a las R-Smad. EEC= Espacio Extracelular, EIC= Espacio Intracelular.

Para el caso de la señalización del TGF-β, los receptores tipo I activados fosforilan a las R-Smads (Smad 2 y 3) promoviendo su homotrimerización y formación de complejos heteroméricos con la Co-Smad (Smad 4). Este

complejo es translocado al núcleo y junto con otros factores nucleares regulan la transcripción de genes blanco. Las I-Smad regulan negativamente la señalización TGF- $\beta$ , ya que pueden competir por el receptor, por las Co-Smad, o pueden promover la degradación de los receptores transmembranales (Shi y Massagué. 2003).

## ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El mecanismo que regula la Identidad digital es un proceso muy estudiado desde hace varios años, lo que ha permitido el desarrollo de una teoría que divide a este proceso en dos etapas, una temprana y otra tardía (Suzuki et al. 2004).

En los últimos años se ha propuesto que la señalización de FGF8 en la AER también es importante para el establecimiento de la Identidad Digital en la etapa tardía, así como las BMP y los TBX, ya que la aplicación de una perla embebida en el inhibidor del receptor de FGF8 (PD184352) en E28 induce cambios anteriorizantes de la ID (dedos con menos falanges; Fig. 11F). Adicionalmente, la aplicación de SHH, un regulador positivo de la expresión de *Fgf8* induce la formación de una falange extra (Fig.11E) clasificada como cambio posteriorizante de la ID (Sanz-Ezquerro y Tickle. 2003). Sin embargo, se desconoce el mecanismo que regula el establecimiento de la ID mediado por FGF8, ya que *Shh* no se expresa en los estadios de desarrollo en los que se realizaron estos experimentos, descartando su participación como regulador endógeno de *Fgf8*.

Se sabe que las BMP son reguladores negativos de los FGF, pero es probable que durante el establecimiento de la ID, las BMP no tengan efecto sobre FGF, ya que los niveles elevados de BMP en los interdógitos posteriores, posteriorizan a los dedos (Dahn y Fallon. 1999, Dahn y Fallon. 2000). Por tanto, si las BMP regularan a FGF8 durante este proceso, entonces, los altos niveles de BMP en la región posterior regularían negativamente la expresión de *Fgf8*, haciendo que los dedos fuesen más cortos, cosa que no ocurre. Esto abre la posibilidad de que exista otra u otras moléculas que regulen la heterocronía de la permanencia de *Fgf8* en la punta de los dedos (Fig. 12A) para especificar la ID.

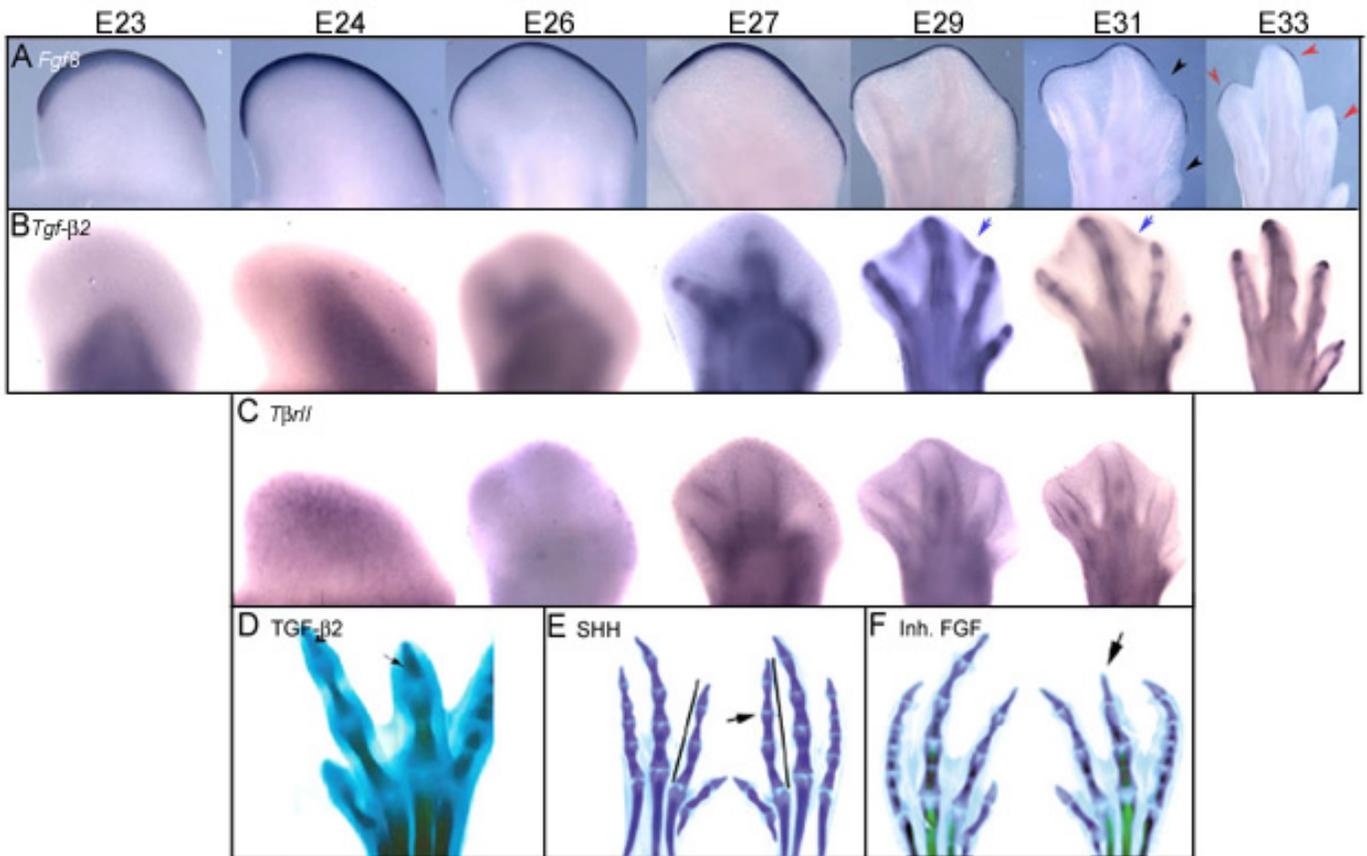
Tras la búsqueda de las moléculas candidatas que pudiesen estar regulando el establecimiento de la ID mediante la regulación de *Fgf8*, encontramos en la literatura (Merino et al. 1999), que la aplicación de TGF- $\beta$ 1 en la punta del dedo trunca el crecimiento de éste. Sin embargo, cuando analizamos estos datos encontramos que no es un truncamiento como lo refieren los autores, sino un cambio de ID, ya que el dedo no presenta alteraciones de la morfología distal (falange con garra), criterio importante para determinar cambios en la ID en el pollo (Fig. 12D, flecha).

Cuando analizamos el patrón de expresión de *Tgf- $\beta$ 2* y *Fgf8* durante el desarrollo de la extremidad embrionaria de pollo (E28 en adelante), encontramos que *Tgf- $\beta$ 2* se expresa en la punta de los dedos, tendones y en la porción más distal del interdígito y *Fgf8* se expresa en la AER, con una distribución heterocrónica durante el desarrollo de la extremidad de pollo. Una característica de su patrón de expresión es que primero desaparece en los dedos más cortos y en los interdigitos que morirán, poniendo de manifiesto su papel como promotor del crecimiento proximo-distal de la extremidad (Fig. 12A, flechas negras).

El análisis comparativo de la expresión de *Fgf8* y *Tgf- $\beta$ 2*, evidencia que la expresión *Tgf- $\beta$ 2* (fig. 12B, flechas azules) precede a la desaparición de *Fgf8* en la punta de los dedos y en la parte distal de los interdigitos (Fig 12A, flechas negras), sugiriendo que TGF- $\beta$ 2 pudiese estar regulando negativamente la expresión de *Fgf8* en la punta de los dedos, lo que permite que los dedos posteriores sean más largos que los anteriores y con mayor número de falanges en la pata del pollo.

Debido a que las células responden, de manera general a las citocinas mediante receptores transmembranales, observamos que la expresión de *T $\beta$ RII* ocurre en las células mesenquimáticas que rodean a los dedos (interdígito y zona de progreso, Fig. 12C) sugiriendo que este mesénquima es el efector inmediato de la señal del TGF- $\beta$ .

Por otra parte, resultados de nuestro laboratorio sugieren que TGF- $\beta$  está involucrado en el establecimiento de la ID en etapas tempranas ya que la aplicación de TGF- $\beta$ 1 en la región posterior de la extremidad altera el patrón antero-posterior, transformando a los dedos posteriores en dedos anteriores (García-García. 2005).



**Figura 12.** Patrón de expresión de *Fgf8*, *Tgf- $\beta$ 2*, *TβRII*. A) *Fgf8* se expresa en la AER durante el desarrollo de la extremidad de manera heterocrónica sobre los dedos. La expresión de *Fgf8* desaparece primero en los dedos más cortos e interdígitos (flechas negras) y al final en los dedos más largos y con mayor número de falanges (flechas rojas). B) *Tgf- $\beta$ 2* en E23 se expresa en el blastema tendinoso y conforme avanza el desarrollo se dirige hacia la región distal de la extremidad y en las condensaciones cartilagosas, para luego intensificarse en la punta de los dedos (E27 en adelante) y evidenciarse en la región más distal del interdígito (flechas azules). C) El receptor tipo II de TGF- $\beta$  se expresa en la región distal de la extremidad en E24, para luego localizarse en el mesénquima que circunda a los dedos y en la zona de progreso (localizada bajo la AER y sobre el dedo). D) La aplicación de una perla de acrílico-heparina embebida en TGF- $\beta$ 1 (2 ng/ $\mu$ l) induce anteriorización del dedo III (cuatro falanges), para convertirlo en dedo I (dos falanges) (Merino et al. 1999). E) El mantenimiento de FGF8 en la AER mediante la aplicación de SHH, induce la formación de una falange extra (posteriorización del dedo), mientras que la aplicación del inhibidor de la señalización de FGF8 induce la anteriorización del dedo tratado (F, flecha), sugiriendo que la identidad de los dedos en la etapa tardía también depende de la permanencia o ausencia de FGF8 en la AER (Sanz-Ezquerro et al. 2003).

Adicionalmente, se ha demostrado que este tratamiento regula negativamente la expresión de *Tbx3*, *Bmp2*, *Bmp4* y *Bmp7* (García-Cruz. 2006), sin embargo se desconoce si los fenotipos inducidos por TGF- $\beta$  también se deben a la regulación de otros genes involucrados en el establecimiento de la ID como *Shh* y los genes *Hox*.

Adicionalmente, el patrón de expresión de *Tgf- $\beta$ 2* en estadios más tempranos (E20), está restringido a la región posterior distal del primordio de la extremidad, para luego desaparecer de esa región (García-Cruz. 2006) y relocalizarse en estadios posteriores. Si la aplicación de TGF- $\beta$  indujo esos cambios anteriorizantes de la ID, es probable que la expresión de *Tgf- $\beta$ 2* tenga que desaparecer en la región posterior de la extremidad para que los dedos de esa región adquieran identidad posterior.

## HIPÓTESIS

PAPEL DEL TGF- $\beta$  EN LA ETAPA TARDÍA DEL ESTABLECIMIENTO DE LA ID.

TGF- $\beta$  controla el establecimiento de la ID mediante la regulación negativa de *Fgf8* en la punta de los dedos.

PAPEL DEL TGF- $\beta$  EN LA ETAPA TEMPRANA DEL ESTABLECIMIENTO DE LA ID.

TGF- $\beta$  en la región posterior distal de la extremidad induce anteriorización de la ID, mediante la regulación negativa de genes involucrados en la especificación de las identidades posteriores como *Shh* y *Hox* en etapas tempranas. Alternativamente, TGF- $\beta$  induce anteriorización de la ID mediante la regulación negativa de *Fgf8* como se sugiere en la etapa tardía.

## OBJETIVOS

### Generales

El presente trabajo tiene como objetivo esclarecer el mecanismo por el cual, la identidad de los dedos es regulada por TGF- $\beta$ , tanto en la etapa tardía como en la etapa temprana del establecimiento de la ID.

### Particulares

#### En la etapa tardía del establecimiento de la ID.

1. Caracterizar fenotípicamente el efecto de la aplicación de TGF- $\beta$  en la punta del dedo en la extremidad embrionaria del pollo en E28.
2. Realizar ensayos de regulación de la expresión de *Fgf8* a diferentes tiempos post-tratamiento de extremidades tratadas con TGF- $\beta$ 1 en la punta del dedo en E28.
3. Evaluar el efecto del bloqueo de la señalización TGF- $\beta$  en la punta de los dedos en E28.

#### En la etapa temprana del establecimiento de la ID

4. Caracterizar el efecto de la administración de TGF- $\beta$ 1 en la región posterior distal de la extremidad embrionaria en E24 y realizar ensayos de regulación de la expresión de *Shh*, *Fgf8* y *Hox* a diferentes tiempos post-tratamiento de extremidades tratadas con TGF- $\beta$ .

## DISEÑO EXPERIMENTAL

Una de las maneras de evaluar el papel que juegan los genes y las moléculas en los diferentes procesos biológicos es mediante la ganancia y la pérdida de su función. Por esta razón, se decidió estudiar el papel del TGF- $\beta$  en el establecimiento de la ID mediante la aplicación de este factor proteico y la de el inhibidor de su receptor (*SB-431542*). Para el depósito del TGF- $\beta$  en la extremidad se implantaron perlas de acrílico-heparina y para el depósito del inhibidor de la señalización de TGF- $\beta$  se utilizaron perlas de intercambio iónico debido a que este sistema libera gradualmente los factores al medio. Por tanto, esta técnica es ampliamente utilizada en estudios de biología del desarrollo para dosificar diversas moléculas (Chimal-Monroy et al. 2003, Gañan et al. 1998).

Para estudiar el papel del TGF- $\beta$  en la etapa tardía del establecimiento de la ID, se aplicaron perlas embebidas en esta proteína y se implantaron en la punta del dedo en E28. Se decidió aplicar dicho factor en E28 ya que se ha reportado que en este estadio, la aplicación de TGF- $\beta$  altera el tamaño de los dedos (Merino et al. 1999) y es en esta etapa cuando se abre una ventana de tiempo que permite modificar el establecimiento de la ID (Dahn y Fallon 1999). Con la finalidad de evaluar el papel de TGF- $\beta$  en la etapa temprana del establecimiento de la ID se decidió aplicar al factor en la región posterior distal de la extremidad, ya que se sabe que su aplicación en esta posición altera el patrón antero-posterior digital. Adicionalmente es el sitio donde TGF- $\beta$  se deja de expresar después del E20 y sería interesante evaluar el mantenimiento de TGF- $\beta$  cuando este se deja de expresar endógenamente. El estadio de desarrollo que se eligió para la aplicación del factor fue el E24, ya que se ha reportado que en esta etapa se preespecifican los dedos (Dudley et al. 2002).

Las alteraciones en la expresión de los genes causadas por las manipulaciones experimentales pueden ser evaluadas mediante la técnica de hibridación *in*

*situ*. El fundamento de esta técnica es el tratamiento de las muestras con una sonda de RNA marcada, que por complementariedad puede hibridarse con el RNA mensajero de interés. La ribosonda es detectada con un anticuerpo acoplado a una enzima, la cual, al suministrarle el sustrato adecuado, catalizará una reacción que dará un producto insoluble color púrpura. Esta reacción permite localizar el sitio de expresión del gen de interés. Por tanto, esta técnica es muy útil para visualizar los efectos locales de la administración de un factor como TGF- $\beta$  sobre la transcripción de los genes.

Por otro lado, una técnica que permite visualizar los fenotipos en el hueso y en el cartílago, es la tinción de azul Alciano y Alizarina roja, los cuales tiñen componentes de la matriz extracelular del cartílago y del hueso respectivamente.

La identificación de células muertas en órganos completos puede detectarse mediante la tinción de rojo neutro, la cual marca de color rojo a las células muertas fagocitadas, por lo que nos permite determinar si la aplicación de algún factor induce muerte celular.

Por estas razones, decidimos utilizar dichas técnicas para la comprobación de nuestras hipótesis.

## MATERIAL Y MÉTODO

### *Material biológico*

Se utilizaron huevos de pollo fertilizados (ALPES 2) provenientes de Aves Libres de Patógenos SA, Puebla, incubados a 37°C con 68% de humedad durante 4 a 6 días en incubadoras Incumatic 1000 e Incumatic 300. Los embriones se clasificaron morfológicamente en estadios de desarrollo según Hamburger y Hamilton (1951), ver apéndice C).

### *Soluciones*

La preparación de todas las soluciones utilizadas en Materiales y Método se encuentran descritas en el Apéndice B.

### *Preparación de las perlas de acrílico-heparina y de intercambio iónico*

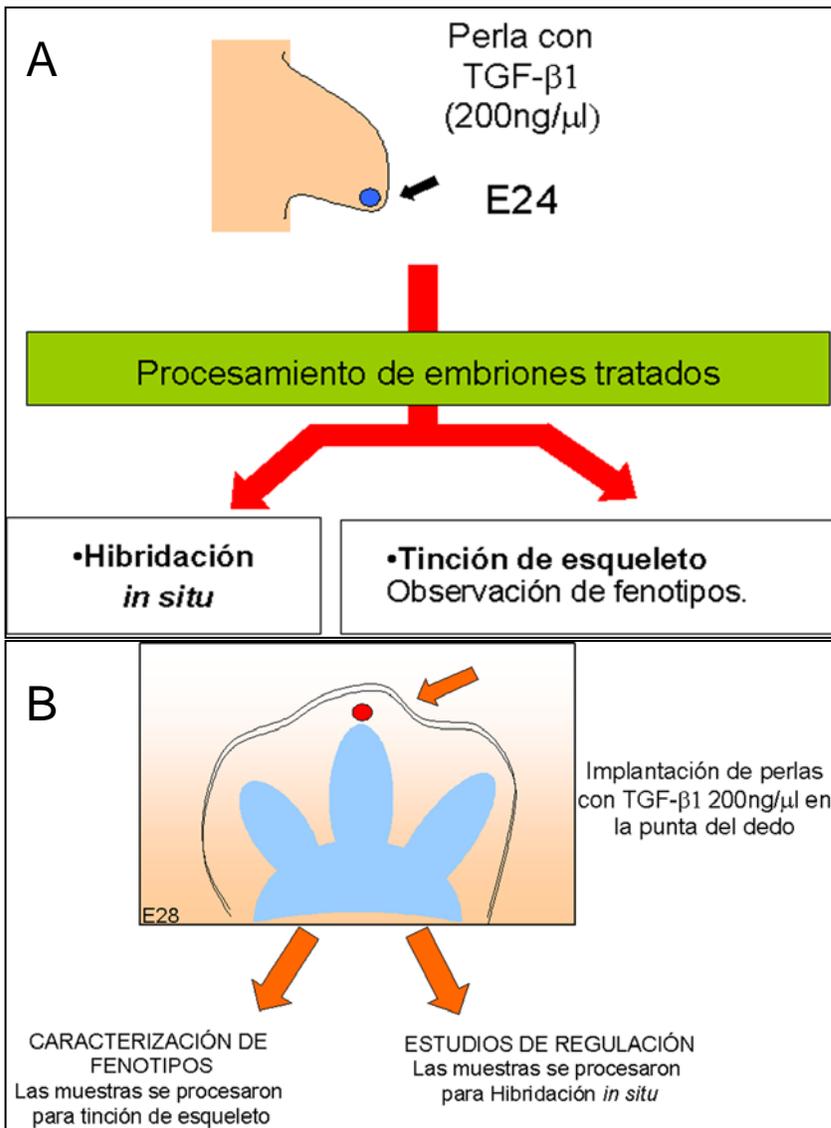
Se preparó una cámara húmeda en una caja petri, colocando gotas de PBS 1X en la periferia de ésta. Se colocaron 30 perlas de acrílico-heparina de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro (Sigma, Cat. 5360) para TGF- $\beta$ , o de intercambio iónico (AG1-X2 Biorad, Cat. 140-1253) para SB-431542 (Inhibidor del receptor tipo I para TGF- $\beta$ ; Tocris) sobre un trozo de parafilm, se les retiró el medio de almacenamiento y se les agregaron 2  $\mu\text{l}$  del factor reconstituido (TGF- $\beta$ 1 en agua a 200 ng/ $\mu\text{l}$  y el SB-431542 en DMSO a 10mM). Se incubaron por 2 h a 4°C. Posteriormente, las perlas de intercambio iónico a diferencia de las de acrílico-heparina, se lavaron 15 min. con PBS dos veces.

### *Manipulación *in ovo**

La manipulación de los embriones consistió en hacer una ventana en el huevo, rompiendo el cascarón en el extremo más agudo (donde se encuentra una cámara de aire), se desgarró la membrana amniótica para exponer la extremidad del embrión. Después de hacer los tratamientos, el huevo se tapó con cinta adhesiva transparente (Diurex) y luego se incubó el tiempo necesario para evaluar los efectos del tratamiento.

### Aplicación de TGF- $\beta$ 1 y SB-431542 en la extremidad embrionaria

Se administró el factor de crecimiento TGF- $\beta$ 1 (PeproTech, inc USA, Cat. 100-21R, Lot. 031S88) en la extremidad de pollo a una concentración inicial de 200 ng/ $\mu$ l usando como vehículo perlas de Acrílico-Heparina. Las perlas se implantaron en la región posterior distal de la extremidad en E24 (Fig. 13A) y en la punta del dedo en E28 (Fig. 13B).



**Figura 13.** A) Implantación de las perlas impregnadas con TGF- $\beta$  en la región posterior distal de la extremidad en E24. Las muestras se procesaron para hibridación *in situ* y tinción de esqueleto después de varias horas hasta 144 h.

B) Implantación de las perlas impregnadas con TGF- $\beta$  o su inhibidor sobre la punta del dedo (zona de progreso) en E28, las muestras se procesaron para hibridación *in situ* y tinción de esqueleto después de varias horas hasta 144 h.

Después de estos tratamientos, los embriones se procesaron para hibridación *in situ* y para tinción de esqueleto (azul Alciano/Alizarina roja). Las perlas

impregnadas con SB-431542 a una concentración de 10 mM se implantaron en la punta del dedo en E28 y se siguió su desarrollo *in ovo* por varias horas hasta 144 h. Las muestras se procesan para tinción de esqueleto y para tinción de rojo neutro.

#### *Tinción de esqueleto.*

Para evidenciar la formación del esqueleto, los embriones tratados con TGF- $\beta$ 1 se sacrificaron y se fijaron con etanol 96% toda la noche (TN), luego se les decantó el etanol y se les agregó acetona, dejándolos incubar TN. Posteriormente, se decantó la acetona y se les agregó la mezcla de colorante azul Alciano 3% y Alizarina roja 0.1%, y una vez que el tejido se encuentra totalmente teñido, éste es transparentado con una mezcla de KOH 1% y glicerol 20% hasta que sólo sea evidente el esqueleto del embrión. Por último, las muestras se almacenaron en PBS 50%/Glicerol 50%.

#### *Tinción de rojo neutro.*

Para evidenciar las zonas de muerte celular, las extremidades tratadas con el inhibidor de TGF- $\beta$  se colocaron en una caja petri con 10 ml de PBS y se les agregaron 3 gotas del colorante vital rojo neutro al 2% y se incubaron hasta que fueron evidentes las zonas de muerte. Se lavaron con PBS y se fijaron en formol cálcico durante toda la noche a 4°C. Se deshidrataron con dos lavados de 1 h en isopropanol y luego se aclararon con dos lavados de xileno (JT. Baker, USA) y se fotografiaron inmediatamente.

#### *Hibridación in situ en embriones completos*

Los embriones tratados con TGF- $\beta$ 1 se sacrificaron a diferentes tiempos (30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h y 72 h) y se fijaron en paraformaldehído al 4%, a 4°C durante toda la noche y se deshidrataron con metanol/PBT graduales (25%/75%, 50%/50%, 75%/25%; JT. Baker, USA) hasta dejarlos en metanol absoluto (se almacenaron a -20°C).

### *Rehidratación*

Los embriones se rehidrataron con metanol/PBT graduales (75%/25%, 50%/50%, 25%/75%) hasta llevarlos a PBT.

### *Permeabilización de las muestras*

Las muestras se incubaron por una hora en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 6%/PBT (Sigma, USA) en la oscuridad y se lavaron con PBT 15 min por 3 veces.

Se les aplicó un tratamiento de Proteinasa K (Sigma, Cat. P2308), considerando las siguientes concentraciones y tiempos para cada gen evaluado:

**Tabla 3.** Condiciones experimentales para los tratamientos con proteinasa K.

Ribosonda de:	Concentración de Proteinasa K	Tiempo de incubación	Temperatura de incubación
<i>Fgf8</i>	15 µg/ml	20 min	21°C
<i>Hoxa13</i>	40 µg/ml	20 min	21°C
<i>Hoxd12</i>	60 µg/ml	20 min	21°C
<i>Hoxd11</i>	60 µg/ml	20 min	21°C
<i>Shh</i>	60 µg/ml	20 min	21°C
<i>Tgf-2</i>	60 µg/ml	25 min (<E26) 28 min (≥E26)	21°C
<i>T RII</i>	60 µg/ml	25 min (<E26) 28 min (≥E26)	21°C

Inmediatamente se fijaron las muestras en Paraformaldehído 4% /glutaraldehído 0.2% durante 20 min a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron con PBT durante 15 min 3 veces.

Las muestras se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 ml y se les retiró el PBT, sustituyéndolo por Amortiguador de Hibridación y se dejaron incuban por 3 h (prehibridación).

### *Aplicación de la Ribosonda*

La ribosonda se diluyó en amortiguador de hibridación en una proporción 1:100 y se desnaturalizó a 80°C por 2 min en un baño seco pasándolo inmediatamente a hielo. Se retiró el amortiguador usado para la prehibridación y se sustituyó por la sonda desnaturalizada, dejándola incubar toda la noche a 65°C en un baño seco.

### *Lavados con amortiguador de citratos*

Las muestras se transfirieron a frascos de centelleo líquido de 20 ml y se lavaron con Solución I una hora, dos veces. Luego se lavaron con una mezcla 1:1 de Solución I/Solución II por 15 min, después se realizaron cuatro lavados de 10 min y uno de 1 h con Solución II. Se hicieron dos lavados (de 10 min y 30 min) con Solución III (todos los lavados se realizaron a 65°C). Las muestras se lavaron 10 min, tres veces con TBST/levamizole 2 mM a temperatura ambiente. El prebloqueo se realizó con suero de cabra 10% /TBST levamizole 2 mM durante tres horas. Se aplicó el anticuerpo anti-Digoxigenina (1:2000; Anti-DIG Roche, Cat. 11 093 274 910) en suero de cabra 10% /TBST levamizole 2 mM y se dejó incubando toda la noche en agitación a 4°C.

### *Revelado*

Se retiró el anticuerpo realizando 15 lavados de 10 min con TBST levamizole 2 mM y tres lavados de 15 min con NTMT levamizole 1 mM. Se aplicó el revelador BM Purple (Roche, Cat. 11 442 074 061), incubando en la oscuridad y a temperatura ambiente, hasta que el tejido tomó una coloración púrpura.

Una vez adquirido el color, las muestras se lavaron tres veces con PBS, en cambios rápidos. Por último, las muestras se fijaron con paraformaldehído al 4% toda la noche y se almacenaron en PBS a 4°C.

### *Análisis de imágenes*

Los resultados de cada experimento se fotografiaron con el sistema digital Axio Cam MRc con el programa Axio Vision de Carl Zeiss, adaptado a un estereomicroscopio (Nikon SMZ1500). Las composiciones de imágenes presentadas en la sección de RESULTADOS se procesaron en el programa Adobe Photoshop CS2.

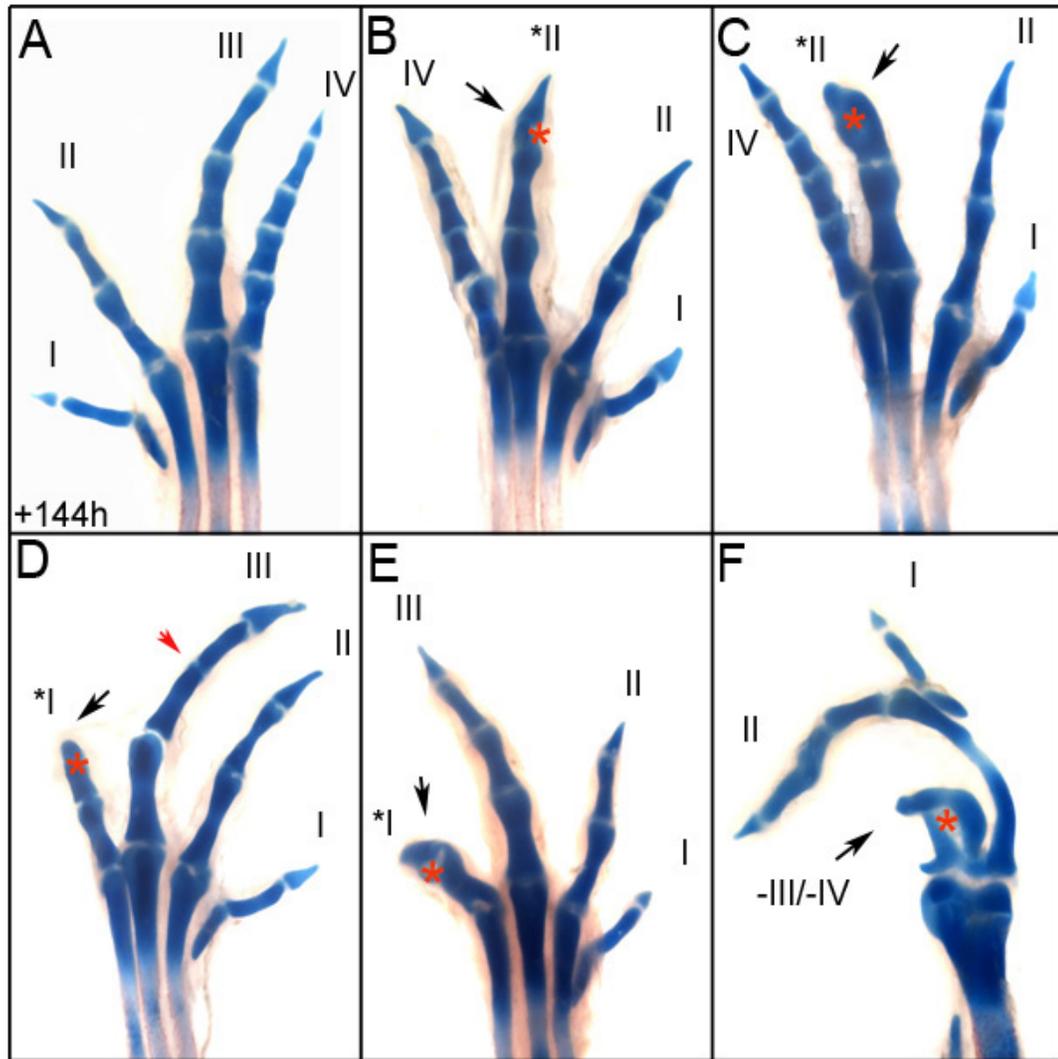
## RESULTADOS

### **La aplicación de TGF- $\beta$ 1 en la punta de los dedos en E28 induce cambios anteriorizantes en la Identidad digital**

La expresión de *Tgf- $\beta$*  en la punta de los dedos y en los interdigitos precede a la desaparición de la expresión de *Fgf8* en la AER (Fig. 12A y B). Estos datos sugieren que TGF- $\beta$  regula negativamente la expresión de *Fgf8* necesaria para el establecimiento de la identidad de los dedos. Adicionalmente se ha demostrado que la aplicación de TGF- $\beta$  en la punta de los dedos cambia la morfología de éstos, acortando su tamaño y número de falanges (Merino et al. 1999). Este cambio es interpretado por nosotros como una anteriorización de la ID y no como un truncamiento, como lo refiere el autor, por lo que proponemos a TGF- $\beta$  como un regulador del establecimiento de la ID.

Para comprobar nuestra hipótesis en la que la señalización del TGF- $\beta$  controla la identidad digital, se implantaron perlas embebidas en TGF- $\beta$ 1 a una concentración inicial de 200 ng/ $\mu$ l en el mesénquima indiferenciado subyacente a la AER y suprayacente al cartilago de la punta del dedo. El desarrollo de los embriones se siguió durante varios días.

Las tinciones de esqueleto a las 144 h post-tratamiento evidencian un cambio en la identidad digital como se aprecia en la figura 14B y C, donde la flecha indica que el dedo III redujo su tamaño y número de articulaciones con un fenotipo similar al dedo II\* (dedos transformados marcados con \*). Es importante mencionar que una característica para clasificar a los dedos que están cambiando de ID, es la formación de la última falange (con garra) que indica que el dedo se ha terminado de formar y ya no seguirá creciendo.



**Figura 14.** La aplicación de TGF- $\beta$ 1 en la punta de los dedos induce cambios anteriorizantes de la identidad. A) Extremidad contralateral sin tratamiento (E28+144 h; Izquierda-región anterior; derecha-región posterior). B-F) Experimentales (E28+144 h; Izquierda-región posterior; derecha-región anterior; el asterisco rojo indica la posición de la perla). B y C) La aplicación de TGF- $\beta$  en la punta del dedo III cambió la identidad del dedo que normalmente tiene cuatro articulaciones a dedo II\* con tres articulaciones (n=2). D y E) La aplicación de TGF- $\beta$ 1 en la punta del dedo IV cambió la identidad del dedo que normalmente tiene cinco articulaciones a dedo I\* con dos falanges (n=2). Nótese en D, que una de las articulaciones del dedo III parece que va a desaparecer (flecha roja). F) Caso más severo donde se aprecia que el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 en la punta del dedo IV genera la pérdida de los dedos III y IV, y fusión de sus tarsos (Flecha; n=1). De un lote de 10 embriones tratados, se obtuvieron 5 con alteración en fenotipo y son los que se muestran en este panel.

La implantación de la perla con TGF- $\beta$  en algunos casos también genera dedos ligeramente engrosados y de menor número de articulaciones (Fig. 14C). Este efecto probablemente se debe al papel condrogénico de TGF- $\beta$  (Gañán et al.

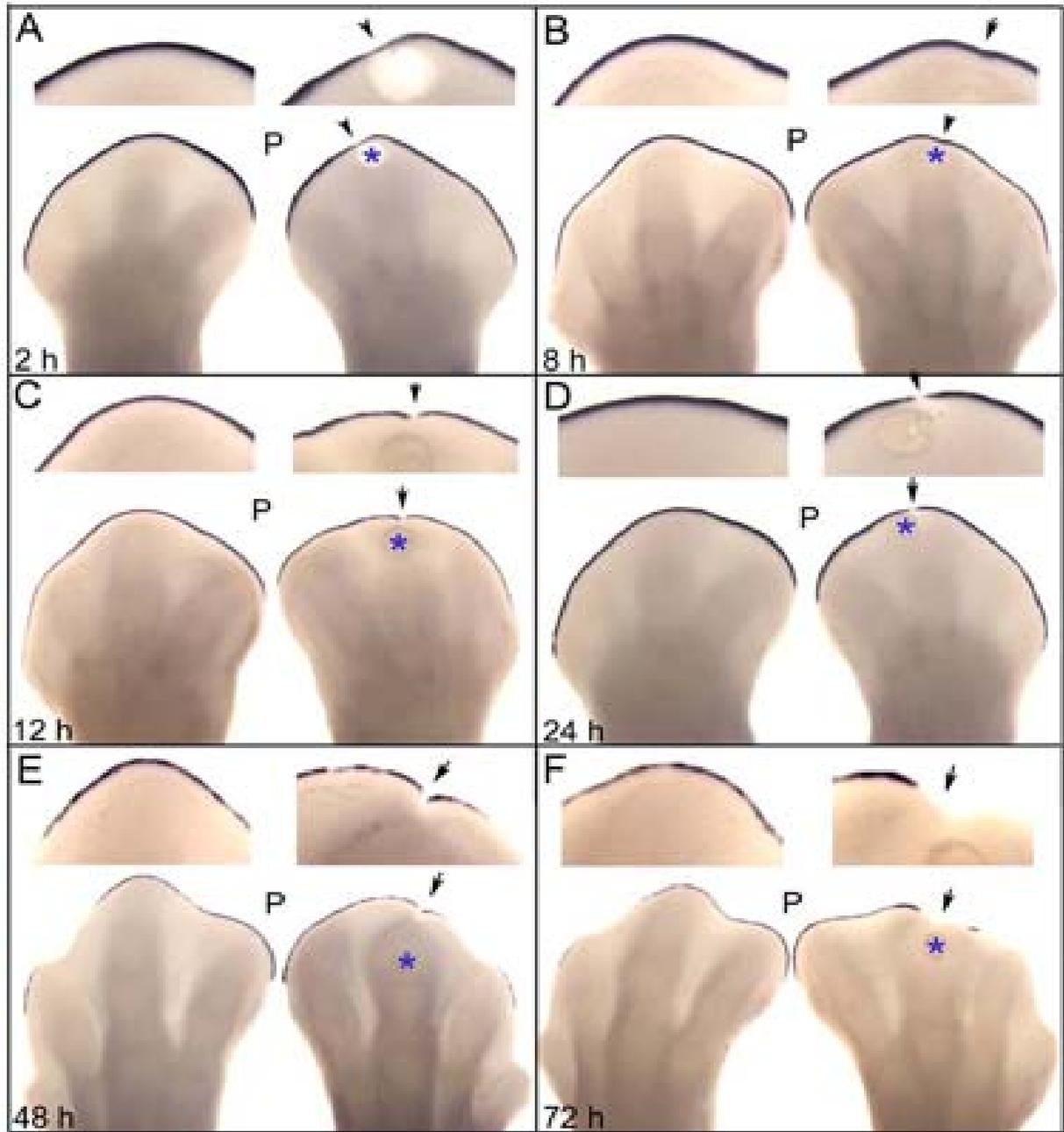
1996). En los casos más severos, la aplicación de TGF- $\beta$ 1 induce la pérdida de dígitos completos (Fig. 14F). Un detalle experimental es que para la obtención de cambios de ID, la perla debe ser colocada justo en la zona de progreso (mesénquima indiferenciado y proliferativo localizado entre la punta del dedo y la AER).

Un dato interesante es que aparentemente los dedos responden de manera diferente al tratamiento con TGF- $\beta$ , ya que cuando la perla se coloca sobre el dedo III, éste cambia a dedo II\* (Fig. 14B y C), mientras que cuando la perla se coloca sobre el dedo IV este cambia a dedo I\* (Fig. 14D y E), o genera pérdida de los elementos posteriores (Fig. 14F). Estos datos sugieren que debe de existir alguna señal que controle la respuesta diferencial de los dedos con el TGF- $\beta$ . Alternativamente, es probable que la posición de la perla sea una variable que genere la diferencia de los fenotipos obtenidos en los dedos III y IV.

### **La aplicación de TGF- $\beta$ 1 en la punta de los dedos regula negativamente la expresión de *Fgf8*.**

Para comprobar que la disminución del tamaño de los dedos y el cambio de ID inducido por TGF- $\beta$ 1 se debe a la desaparición de la expresión de *Fgf8* en la AER, se realizaron Hibridaciones *in situ* para el mRNA de *Fgf8*, procesando las extremidades a diferentes horas post-tratamiento.

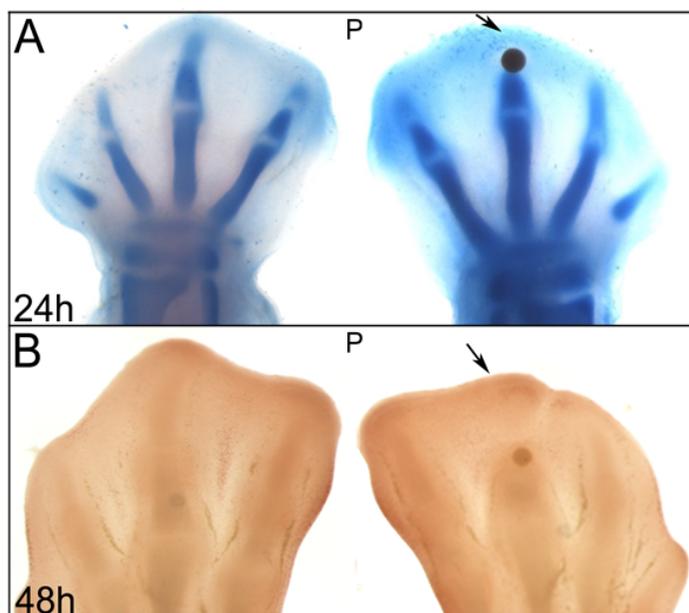
Los resultados muestran que a las 12 h post-tratamiento (Fig. 15C), comienza a observarse una pequeña muesca en la AER suprayacente a la perla con inhibición de la expresión de *Fgf8*, esta muesca se mantiene constante hasta las 24 h, pero a las 48 h el mesénquima que rodea al dedo en la región distal comienza a degenerar, siendo aún más evidente a las 72 h (Fig. 15F).



**Figura 15.** Patrón de expresión de *Fgf8* resultado de la aplicación de TGF- $\beta$ 1 sobre el dedo a diferentes horas (a la izquierda de cada recuadro, extremidad contralateral sin tratamiento y a la derecha la extremidad experimental; P=región posterior de ambas extremidades; el asterisco azul indica la posición de la perla. En la parte superior de cada recuadro se encuentra la amplificación de la punta de los dedos tratados y su contralateral). A y B) La aplicación de TGF- $\beta$ 1 comienza a adelgazar la AER localizada sobre la perla a las 2 h post-tratamiento (2/2). B) El aspecto de la AER se ve alterado a las 8 h post-tratamiento (1/2). C) A las 12 h se observa una muesca que carece de la expresión de *Fgf8* sobre la perla de TGF- $\beta$  (Flecha; 1/2). D) A las 24 h se mantiene la muesca en la AER (2/2). A las 48 h (E; 2/2) y 72 h (F; 2/2) el mesénquima localizado sobre el dedo degenera y la AER pierde la expresión de *Fgf8* que al parecer también degenera.

## La inhibición de la señalización TGF- $\beta$ genera dedos truncados

Si la aplicación de TGF- $\beta$  en la punta de los dedos induce cambios anteriorizantes de la ID mediante la regulación negativa de la expresión de *Fgf8*, entonces, la aplicación de un inhibidor de la señalización de TGF- $\beta$  como el *SB-431542* que bloquea la actividad de receptor tipo I de TGF- $\beta$  (ALK5) inducirá cambios posteriorizantes de la ID, formando falanges extras. Con esta idea decidimos evaluar la pérdida de la función de TGF- $\beta$  en nuestro sistema, aplicando este inhibidor a una concentración inicial de 10 mM en DMSO, en la punta de los dedos, usando como vehículo de depósito perlas de intercambio iónico.



**Figura 16.** La inhibición de la señalización TGF- $\beta$  trunca el desarrollo de los dedos y no causa muerte celular (a la izquierda de cada recuadro, extremidad contralateral sin tratamiento y a la derecha extremidad experimental; P=región posterior de ambas extremidades). A) La tinción de esqueleto muestra que la implantación de una perla embebida en *SB-431542* (inhibidor del receptor tipo I de TGF- $\beta$ ) en la punta del dedo III trunca el desarrollo de éste (E28+24 h post-tratamiento; 3/5). B) La tinción para detectar muerte (rojo neutro) muestra que el mesénquima localizado sobre el dedo truncado no muere a las 48 h post-tratamiento; 3/4).

Bajo estas condiciones experimentales encontramos que el bloqueo de la señal TGF- $\beta$  trunca el desarrollo de los dedos (Fig. 16A y B), aparentemente estos resultados son contradictorios a nuestra hipótesis ya que nosotros esperábamos un cambio posteriorizante de la ID. Sin embargo, los fenotipos obtenidos son muy parecidos a los inducidos por la aplicación de la proteína FGF8 en la

punta de los dedos, donde el dedo se trunca con alteraciones de la morfología distal, es decir, la garra no se forma o se fusiona con el dedo contiguo (Fig. 16A) (Sanz-Ezquerro et al. 2003).

Para tratar de determinar si este truncamiento se debía a la inducción de la muerte celular en la punta de los dedos y si este mesénquima degeneraría por muerte celular a las 48 h, se realizó la tinción con rojo neutro, la cual nos permite detectar muerte celular tiñendo de rojo a las células muertas fagocitadas (Fig. 16B).

Los resultados mostraron que la aplicación del inhibidor del receptor tipo I de TGF- $\beta$  no induce muerte celular en la punta del dedo ni en el mesénquima que lo rodea. Estos datos sugieren que bajo la inhibición de la señalización de TGF- $\beta$  no se reprime la expresión de *Fgf8*. Sin embargo, el truncamiento encontrado en el dedo tratado con el inhibidor, podría deberse a una sobre dosis de FGF8 como lo sugiere Sanz-Ezquerro et al. (2003) y que la persistencia del mesénquima sobre el dedo se debe a que FGF8 mantiene a las células indiferenciadas.

Adicionalmente, se realizaron controles implantando perlas de intercambio iónico embebidas únicamente en DMSO. En esos experimentos no se observaron cambios en la morfología de los dedos, concluyendo que la perla de intercambio iónico *per se* o el DMSO no tienen efecto sobre el desarrollo de los dedos.

### **La aplicación de TGF- $\beta$ 1 en la región posterior distal de la extremidad en E24 induce cambios anteriorizantes de la ID.**

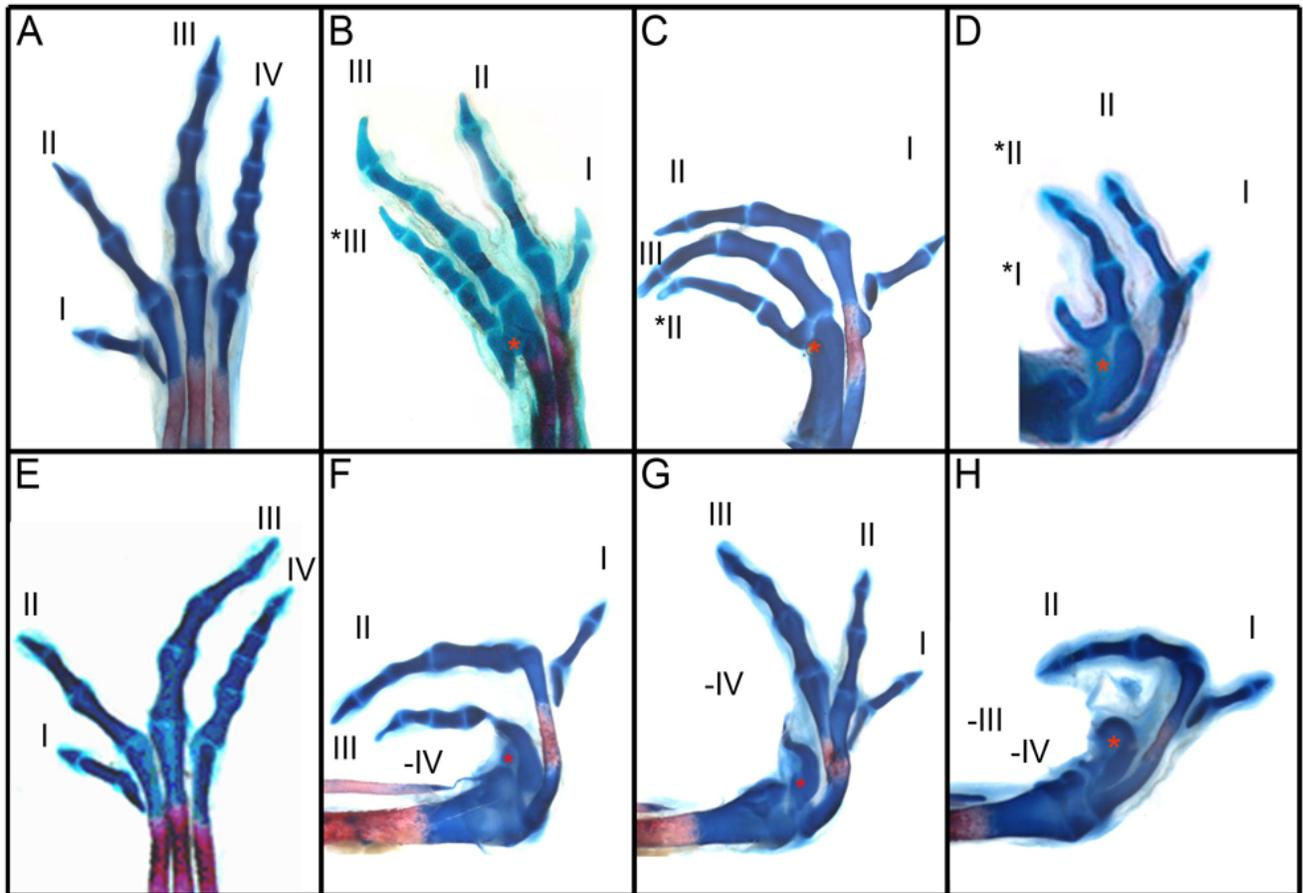
Se sabe que la aplicación de TGF- $\beta$ 1 en la extremidad del pollo en estadios tempranos del desarrollo altera el patrón antero-posterior de los dedos (García-García. 2005). Con el fin de caracterizar los fenotipos inducidos por TGF- $\beta$ , lo

aplicamos a una concentración inicial de 200 ng/ $\mu$ l en la región posterior distal de la extremidad de pollo en E24 y se siguió el desarrollo *in ovo* de los embriones durante varios días (72 h, 96 h, 120 h y 144 h).

Observamos que la administración de TGF- $\beta$ 1 induce cambios en la morfología de los dedos situados en la región donde éste se aplicó. Dichas morfologías se interpretaron como cambios anteriorizantes de la identidad digital. Como podemos ver en la figura 17B el dedo IV que normalmente se distingue por tener cinco falanges o articulaciones, bajo el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 cambia su morfología de dedo IV a dedo III (marcado como \*III, ahora con cuatro articulaciones y reducción de su longitud), también se encontraron cambios de dedo IV a \*II (Fig. 17C), y de dedo III a \*II junto con un cambio de dedo IV a \*I (Fig.17D).

Bajo estas condiciones también se encontraron fenotipos más severos que afectaron la formación de dedos completos, donde sólo se ausenta el dedo IV (F y G), o los dedos III y IV (H) están ausentes. En algunos casos se observó la reducción y fusión de los tarsos (Fig. 17C, D, F, G, y H). Sin embargo, la ausencia o presencia de estos elementos no es relevante para la obtención de cambios de identidad digital, ya que al parecer son fenómenos independientes aunque frecuentemente asociados.

Como podemos observar en la figura 17, la aplicación de TGF- $\beta$  en la región posterior de la extremidad genera una serie de fenotipos que van desde cambios de dedo IV a dedo III\*, II\* I\* ó la pérdida de dedos completos (-IV ó -III y -IV). La variación de los fenotipos obtenidos probablemente se debe al sitio de colocación de la perla, o a las horas de diferencia de desarrollo que existen entre un lote de embriones en E24. También es probable que las pequeñas variaciones en micrómetros de la perla de heparina tengan un efecto en la cantidad de proteína que ésta adsorbe y libera en la extremidad.



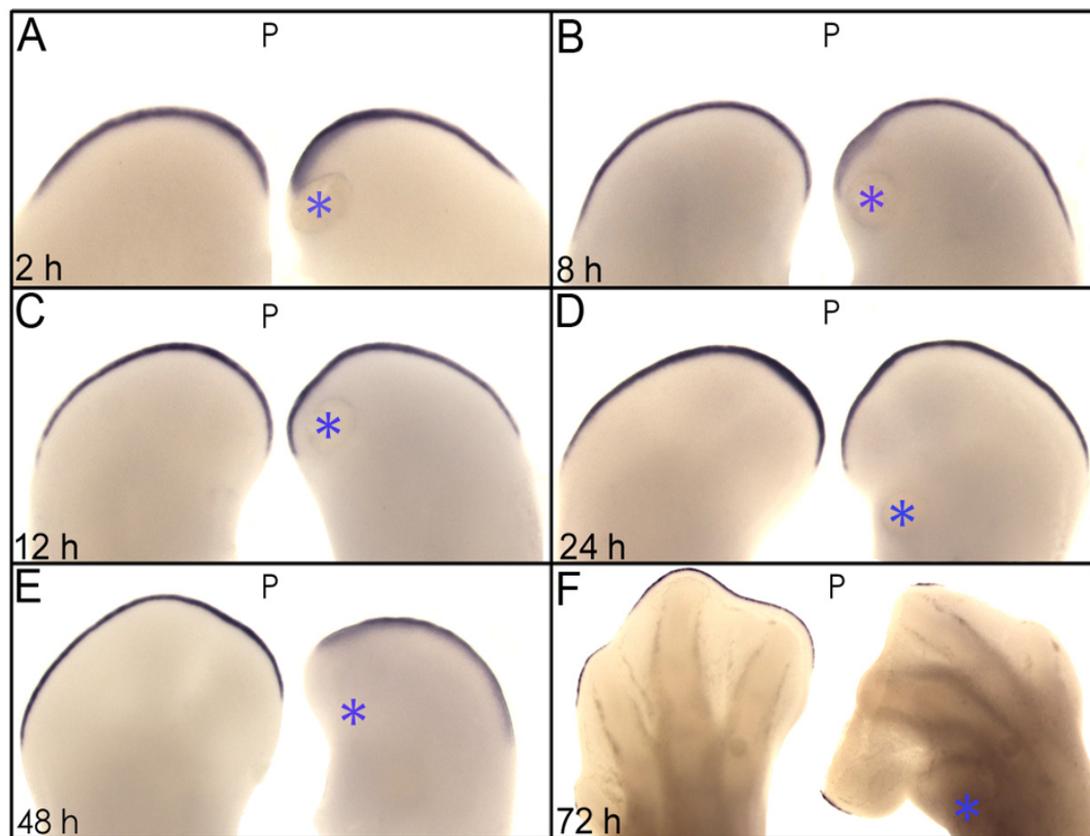
**Figura 17.** TGF- $\beta$ 1 induce cambios anteriorizantes de la ID al ser aplicado en la región posterior distal de la extremidad en E24. A) Extremidad contralateral sin tratamiento (E24+96 h; Izquierda-región anterior; derecha-región posterior; el asterisco rojo indica la posición de la perla), los dedos presentan patrón antero-posterior I-II-III-IV con dos, tres, cuatro y cinco falanges respectivamente. B-D) Extremidades tratadas con TGF- $\beta$ 1 (200 ng/ $\mu$ l; Izquierda-región posterior; derecha-región anterior). Fenotipos ordenados de menor a mayor severidad con patrones I-II-III-III\* (B; E24+120 h; n=3). I-II-III-II\*(C; E24+96 h; n=2) y I-II-II\*-I\* (D; E24+72 h; n=2). E) extremidad contralateral sin tratamiento (E24+144 h; Izquierda-región anterior; derecha-región posterior). F-H) La aplicación de TGF- $\beta$ 1 bajo las mismas condiciones también genera pérdida de elementos esqueléticos (E24+144 h; casos más severos marcados como -III y -IV). F y G) Extremidad con ausencia del dedo IV (n=7). H) Extremidad con ausencia de los dedos II y IV.

**La aplicación de TGF- $\beta$ 1 en la región posterior distal de la extremidad en E24 modifica el dominio de expresión de *Fgf8* a las 48h post-tratamiento**

Debido al papel de FGF8 en el crecimiento proximo-distal de la extremidad y su relación con el establecimiento de la identidad digital en la etapa tardía, decidimos evaluar si la expresión de *Fgf8* es regulada por TGF- $\beta$  durante el establecimiento de la ID en etapas tempranas. Con esta idea, se evaluó la

expresión de *Fgf8* bajo el efecto de la aplicación de una perla embebida en TGF- $\beta$ 1 en la región posterior distal de la extremidad en E24 a diferentes horas post-tratamiento.

La hibridación *in situ* para *Fgf8* demuestra que el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 en la región posterior distal de la extremidad en E24 a tiempos cortos como a las 2 h , 8 h, 12 h y 24 h no modifica la expresión de *Fgf8* ni la morfología de la AER (Fig. 18A-D). Sin embargo, sí genera cambios evidentes en la distribución de la expresión de *Fgf8* a las 48 h (Fig. 18E) y 72 h post-tratamiento (Fig. 18F).



**Figura 18.** Hibridación *in situ* de *Fgf8* después del tratamiento con TGF- $\beta$  . A la derecha extremidades tratadas con TGF- $\beta$ 1 (200 ng/ $\mu$ l; el asterisco azul indica la posición de la perla) en la región posterior distal (P) en E24 y procesadas a las 2 h (A; 4/4), 8 h (B; 4/4), 12 h (C; 4/4), 24 h (D; 4/4), 48 h (E; 2/3) y 72 h (F; 2/3)). A la izquierda de cada recuadro se encuentra la extremidad contralateral sin tratamiento. Nótese que la integridad de la expresión de *Fgf8* se altera hasta las 48 h post-tratamiento (E), donde la extremidad experimental presenta reducción de su tamaño y del tamaño de la Cresta Ectodérmica Apical. A las 72 h (F) la expresión de *Fgf8* está ausente en los dedos afectados por TGF- $\beta$ 1, nótese que sobre el dedo IV (que está cambiando de ID, en la extremidad experimental derecha), permanece tejido mesenquimático no cartilaginoso con ausencia de expresión de *Fgf8*.

Cabe resaltar que a las 48 h post-tratamiento, el dominio de expresión de *Fgf8* se ve reducido en cuanto a su longitud, sin embargo, aparentemente el grosor de éste no cambia. Un dato importante es que a las 72 h post-tratamiento ya es evidente el cambio de identidad de los dedos posteriores (Fig. 18F), donde el dedo IV y el dedo III se encuentran reducidos en comparación con la extremidad contra lateral, indicando un posible fenotipo clasificado como I- II- II\*- I\*. Adicionalmente, se observa que el dedo IV, que está cambiando de identidad a dedo I\* presenta tejido mesenquimático no cartilaginoso en la parte más distal, sin la expresión de *Fgf8* tanto en la punta del dedo III como en el mesénquima suprayacente al dedo IV en transformación, quedando un segmento corto positivo a *Fgf8* en el extremo más posterior de la extremidad.

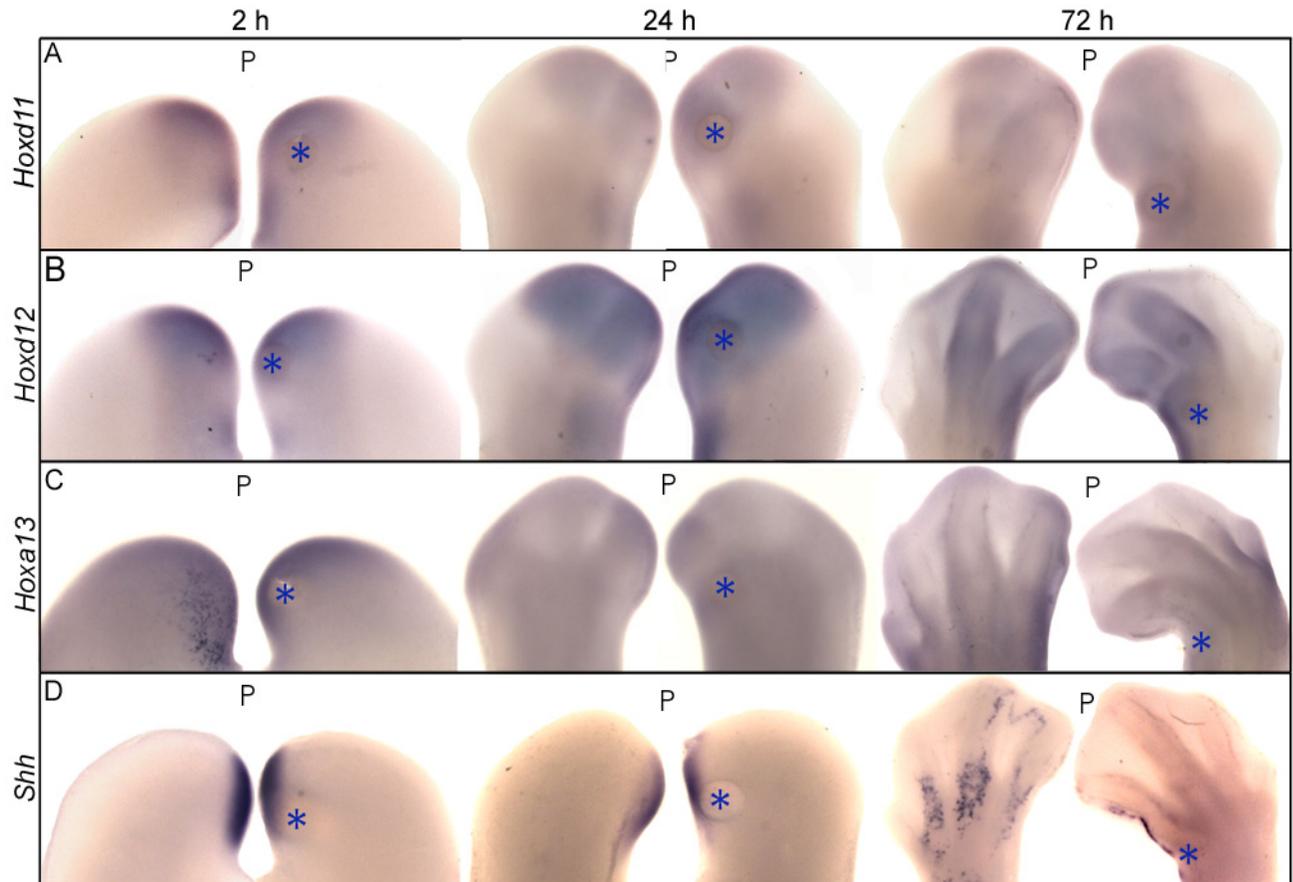
Estos datos sugieren que el cambio de ID inducido por TGF- $\beta$ 1 en etapas tempranas inicialmente no depende de *Fgf8*, ya que su expresión se ve afectada hasta las 48 h, y que la alteración del patrón de *Fgf8* probablemente es el resultado final de la regulación de otros genes.

**La aplicación de TGF- $\beta$ 1 en la región posterior distal de la extremidad en E24 no regula la expresión de genes involucrados en el establecimiento de la ID en etapas tempranas como *Shh* y *Hox*.**

Debido a que hemos demostrado que FGF8 no participa directamente durante la etapa temprana del establecimiento de la ID, decidimos estudiar la participación de otras moléculas involucradas en este proceso como *Shh* y los factores de transcripción *Hox*.

Para demostrar que el cambio anteriorizante inducido por TGF- $\beta$ 1 se debe a la regulación negativa de estos genes se realizaron hibridaciones *in situ* para sus mRNA, encontrando que TGF- $\beta$ 1 no regula a *Hoxd11*, *Hoxd12*, *Hoxa13*, *Shh* (Fig. 19A, B, C, D), ni a *Hoxd13* (datos no mostrados), donde se aprecia que no hay cambio en los dominios de expresión de las extremidades tratadas en

comparación con las extremidades experimentales. Estos resultados sugirieron que el cambio de ID



**Figura 19.** Efecto de la aplicación de TGF- $\beta$  en la región posterior distal (P; el asterisco azul indica la posición de la perla) de la extremidad en E24 sobre la expresión del mRNA de los genes *Hoxd11*, *Hoxd12*, *Hoxa13* y *Shh*. (Controles a la izquierda y experimentales a la derecha de cada par). El tratamiento no regula la expresión de los genes *Hoxd11* (A; 4/4), *Hoxd12* (B; 4/4), *Hoxa13* (C; 4/4) ni *Shh* (D; 4/4) durante la etapa temprana del establecimiento de la ID.

inducido por TGF- $\beta$ 1 es independiente de la regulación de estos genes y que otras moléculas como *Bmp* y *Tbx* son reguladas por este factor como se observó en el trabajo de García-Cruz (2006).

## DISCUSIÓN

En este trabajo demostramos que la aplicación de TGF- $\beta$  sobre la punta de los dedos en E28 induce anteriorización de los dedos y que este tratamiento regula negativamente la expresión de *Fgf8* en la AER. También encontramos que el bloqueo de la señalización del TGF- $\beta$  en la punta de los dedos trunca su desarrollo, y que este truncamiento no se debe a un incremento en la muerte celular a las 48 h. Adicionalmente, mostramos que la aplicación de TGF- $\beta$ 1 en región posterior distal de la extremidad en E24 induce cambios de anteriorizantes de la ID. Encontramos que estos cambios no dependen de la regulación de los genes participantes en la etapa temprana del establecimiento de la ID como *Shh*, *Hox*, ni de señales que controlan el crecimiento proximo-distal de la extremidad como *Fgf8*.

Nuestros resultados sugieren que el cambio de la ID en etapas tardías, inducido por la aplicación de TGF- $\beta$ 1, se debe a la regulación negativa de la expresión de *Fgf8* en la AER, a las 12 h post-tratamiento. Cabe mencionar que el fenotipo obtenido bajo estas condiciones experimentales concuerda con los datos obtenidos por Sanz-Ezquerro et al. (2003) quienes reportan que la formación de la última falange con garra depende de la pérdida de la expresión de *Fgf8* sobre el dedo, sugiriendo que la desaparición de *Fgf8* es un requisito para que los dedos adquieran su morfología final.

Se sabe que las BMP y los TBX 2/3 del interdígito, dan la identidad digital a los dedos posteriores, y lo hacen de manera independiente al proceso regulado por FGF8 que regula los pasos finales del establecimiento de la ID. Esta idea surgió ya que hay evidencia que sugiere que los interdígitos poseen diferentes niveles de estas señales; los interdígitos posteriores presentan niveles más elevados de BMP y TBX en comparación con los interdígitos anteriores, esto permite a los interdígitos posteriores controlar la identidad de los dedos posteriores, generando un "gradiente" BMP/TBX que controla la identidad de

posterior a anterior (Dahn y Fallon. 2000). También se sabe que las BMP regulan negativamente a *Fgf8* en la AER (Selever et al. 2004 y Wang et al. 2004) pero sería poco probable que el establecimiento de la ID mediada por FGF8 estuviera regulada por las BMP en etapas tardías, ya que los altos niveles de BMP en los interdógitos posteriores, regularían negativamente a *Fgf8* en los dedos posteriores, y entonces éstos serían más cortos, tal vez con identidad anterior. Pero esto no ocurre, tal como lo vemos en el patrón de expresión de *Fgf8* en la figura 12A, donde se observa que la desaparición de su expresión ocurre primero sobre los dedos más cortos, en los interdógitos que comenzarán a degenerar por apoptosis y al último en los dedos más largos.

Por tanto, debe de haber otro mecanismo que regule la expresión diferencial de *Fgf8* en la AER. Nuestros resultados sugieren que TGF- $\beta$  es la señal digital que regula negativamente la expresión de *Fgf8* como último paso del establecimiento de la Identidad Digital en etapas tardías, pues la desaparición de *Fgf8* sobre los dedos es un requisito para la formación de la última falange.

De todo esto surge la idea de que debe de haber un mecanismo adicional que regule la heterocronía de la expresión de *Fgf8*, ya que aunque nuestros datos presentan evidencia de que TGF- $\beta$  actúa como regulador negativo de *Fgf8*, se desconoce el mecanismo por el cual TGF- $\beta$  regula la expresión de *Fgf8* de manera heterocrónica en los dedos, permitiendo que se deje de expresar primero en los dedos anteriores y al final en los dedos posteriores.

Para complementar la información obtenida con la aplicación de TGF- $\beta$  (ganancia de función), también se realizaron experimentos bloqueando la transducción de la señal TGF- $\beta$  usando un inhibidor del receptor tipo I de TGF- $\beta$ , encontrando que los dedos se truncaban y que a las 48 h permanecía una membrana de mesénquima sobre ellos. Aunque estos resultados son contrarios a la hipótesis de que la inhibición de TGF- $\beta$  en la punta de los dedos induciría posteriorización, nuestros resultados son muy interesantes, ya que es probable

que la aplicación de este inhibidor permite la sobreproducción de FGF8 en la AER y esto mantiene a las células mesenquimáticas en un estado indiferenciado y no permite que las células de la zona de progreso se diferencien en cartilago lo que resulta en el truncamiento de los dedos (Kawakami et al. 2003).

Los truncamientos observados en este trabajo son muy parecidos a los encontrados con la aplicación de FGF8 en la punta de los dedos (Sanz-Ezquerro et al. 2003), dato que refuerza nuestras hipótesis. Además estos datos también apoyan la idea de que la señalización de TGF- $\beta$  regula el establecimiento de la ID mediante la regulación negativa de *Fgf8*. Para comprobar esta idea, sería necesario demostrar mediante hibridación *in situ*, que el dominio de expresión de *Fgf8* aumenta sobre el dedo tratado. Además se tendría que comprobar que el truncamiento del dedo tratado con SB-431542 se debe al mantenimiento de la indiferenciación celular en el mesénquima, mediante la detección de marcadores de indiferenciación como MKP3 (Kawakami et al. 2003).

Cabe resaltar que el inhibidor SB-431542 no es específico del receptor tipo I para TGF- $\beta$  (ALK5), sino que también puede inhibir a ALK4 y ALK7, los cuales pueden unirse a su respectivo receptor tipo II para transducir la señalización de Inhibina, Activina, Nodal y GDF1. Esta capacidad de inhibir varios receptores tipo I abre la posibilidad de que el establecimiento de la ID en la etapa tardía esta mediada por otros miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  como lo es Activina  $\beta$ B, que se sabe se expresa en la punta de los dedos del pollo, de manera similar al patrón de expresión de TGF- $\beta$ , por lo que sería necesario determinar si es TGF- $\beta$ , Activina o ambas proteínas, las encargadas de regular negativamente la expresión de *Fgf8* sobre los dedos.

En este trabajo, encontramos que la aplicación de TGF- $\beta$ 1 en la punta de los dedos regula negativamente la expresión de *Fgf8*, sin embargo, esta regulación transcripcional es evidente hasta las 12 h, abriendo así una ventana de tiempo, donde cabe la posibilidad de involucrar a otros efectores río abajo de la señal

del TGF- $\beta$  como SP8 y SP9 que se sabe son factores transcripcionales tipo *Buttonhead* que regulan la expresión de *Fgf8* (Kawakami et al. 2004) y que responden a la inducción de la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina (Ver apéndice B) para inducir y mantener la expresión de *Fgf8* en la AER (Barrow et al. 2003). Por lo que para abordar este problema se tendrían que evaluar la actividad y la expresión de estos factores bajo el efecto de la aplicación de TGF- $\beta$  en la punta de los dedos y determinar si TGF- $\beta$  participa en la regulación negativa de los factores de mantenimiento de expresión de *Fgf8* en la AER.

García-García (2005) reportó que la aplicación de TGF- $\beta$ 1 en la región posterior distal de la extremidad en E24 altera el patrón antero-posterior de los dedos. Con la idea de evaluar si TGF- $\beta$  también regula negativamente la expresión de *Fgf8* en etapas tempranas como se sugiere en etapas tardías del establecimiento de la identidad de los dedos, se evaluó la expresión de *Fgf8* en las extremidades tratadas con TGF- $\beta$ 1 en la región posterior distal en E24, encontrando que hasta las 72 h post-tratamiento, la expresión de *Fgf8* se ve regulada negativamente sobre los dedos que aparentemente cambiaron de identidad. Estos resultados nos sugieren que los cambios de ID inducidos en esta etapa por la aplicación de TGF- $\beta$ 1 son independientes de *Fgf8*, y que el cambio en el patrón de expresión de éste, es el resultado de la regulación de los otros genes involucrados en el establecimiento de la ID en la etapa temprana.

Adicionalmente, la observación de la AER en el estereomicroscopio a mayores aumentos en etapas tempranas, sugieren que no solamente desaparece la expresión de *Fgf8* en el ectodermo, sino que la integridad de la AER también se ve afectada, probablemente debido a la pérdida de *Fgf8*.

Por otra parte, el análisis del patrón de expresión de TGF- $\beta$  en E19 (polarizada hacia la región posterior y que desaparece en estadios posteriores), sugiere que el TGF- $\beta$ 2 tendría que desaparecer de la región posterior de la extremidad para

que los genes que participan en el establecimiento de las identidades posteriores lleven a cabo su función.

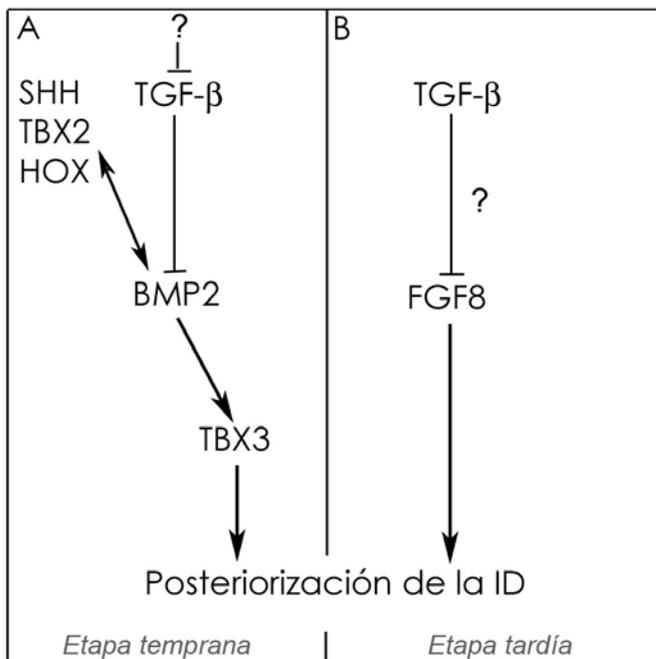
De acuerdo a esta idea se decidió mantener la dosis de TGF- $\beta$  en la región posterior de la extremidad, encontrando que la aplicación de TGF- $\beta$ 1 en la región posterior distal de la extremidad sí indujo cambios anteriorizantes. Sin embargo, estos cambios no se deben a la regulación de los genes involucrados en el establecimiento de la ID en etapas tempranas, como *Shh*, *Hoxd11*, *Hoxd12*, *Hoxd13* y *Hoxa13*. Los resultados obtenidos sugieren que el fenotipo inducido por TGF- $\beta$  es independiente de estos genes pero es mediado por la regulación de otros genes que también participan en el establecimiento de la ID en etapas tempranas como *Bmp* y *Tbx* (García-Cruz. 2006).

Datos obtenidos en nuestro laboratorio refuerzan esta idea, pues la aplicación de TGF- $\beta$ 1 bajo estas mismas condiciones, regula negativamente la expresión de los genes *Bmp2*, *Bmp7* y *Tbx3* (García-Cruz. 2006). Se sabe que TBX2 y 3 regulan la identidad de los dedos posteriores a través de la regulación de las BMP y que el bloqueo de estas moléculas generan cambios anteriorizantes en la identidad de los dedos (Suzuki et al. 2004), como los observados con la aplicación de TGF- $\beta$  en E24. Sin embargo, nosotros reportamos que en esta etapa TGF- $\beta$  no regula a los genes *Hox* ni a *Shh*, que son parte de el asa de regulación positiva del establecimiento antero-posterior junto con TBX (Suzuki et al. 2004), sugiriendo que TGF- $\beta$  induce el cambio de ID mediante la activación de una vía alterna que involucra a los TBX y a las BMP durante la etapa temprana del establecimiento de la ID (García-Cruz. 2006).

La información que se tiene a la fecha sobre el mecanismo del establecimiento de la ID en etapas tempranas y tardías, así como los datos obtenidos en este trabajo y en el trabajo de García-Cruz (2006), nos permiten formular un modelo donde involucramos al TGF- $\beta$  en el establecimiento de la ID tanto en etapas tempranas como en tardías.

El mecanismo por el cual se especifican los dedos posteriores en la etapa temprana, está mediado por el morfógeno SHH y los factores de transcripción TBX2 y HOX que establecen un asa de regulación positiva con BMP2 en la región posterior de la extremidad. BMP2 ahora induce la expresión de TBX3 para especificar las identidades de los dedos posteriores (Fig.18A).

La expresión de *Tgf-β2* en E19-20 se localiza en la región posterior distal de la extremidad, pero se deja de expresar en esa región en estadios posteriores (García-Cruz. 2006) para relocalizarse en los blastemas tendinosos. Es probable que TGF-β tenga que desaparecer de la región posterior para que TBX y BMP puedan especificar las identidades de los dedos posteriores. Es por eso que la aplicación de TGF-β genera cambios anteriorizantes de la ID. Sin embargo, se desconocen las moléculas que regulan negativamente la expresión de TGF-β en la región posterior del primordio de la extremidad en estadios posteriores al E19-20 (Fig. 20A).



**Figura 20.** Modelo integrativo del papel de TGF-β durante el establecimiento de la ID. A) En etapas tempranas, SHH, TBX2 y HOX especifican las identidades de los dedos posteriores a través de BMP2 y TBX3, pero de manera independiente a FGF8. La presencia de TGF-β regula negativamente la expresión de *Bmp2* y por consecuencia la de *Tbx3* cambiando la ID de manera anteriorizante. Por otro lado, el establecimiento de la ID mediada por SHH, TBX2 y HOX es independiente a TGF-β, ya que TGF-β no ejerce cambio alguno en la expresión de estos genes. B) En etapas tardías, TGF-β especifica la identidad de los dedos posteriores mediante la regulación negativa de FGF8, sin embargo se desconoce el mecanismo por el cual TGF-β controla la heterocronía de la expresión de *Fgf8* en la punta de los dedos.

Por otra parte, en etapas tardías, la desaparición de FGF8 en la punta de los dedos se considera el último paso en la especificación de las identidades digitales. FGF8 se expresa de manera heterocrónica sobre la AER, permaneciendo más tiempo sobre los dedos más largos.

Se propone que TGF- $\beta$  regula negativamente a *Fgf8* de manera heterocrónica, primero inhibiendo su transcripción en los dedos más cortos (anteriores) e interdígitos y luego en los dedos más largos (posteriores), ya que si se mantiene la expresión de FGF8 por más tiempo se obtienen dedos posteriores. Es por eso que la aplicación de TGF- $\beta$  en la punta de los dedos induce anteriorización de los dedos posteriores. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual TGF- $\beta$  controla la expresión de *Fgf8* en la AER (Fig. 20B).

## CONCLUSIONES

### **ETAPA TARDÍA DEL ESTABLECIAMIENTO DE LA ID**

- La aplicación de TGF- $\beta$ 1 en la punta del dedo en E28 induce cambios anteriorizantes de la ID. En algunos casos se observó la desaparición de los dedos posteriores.
- TGF- $\beta$  regula negativamente la expresión de *Fgf8* en la punta del dedo, a las 12 h post-tratamiento.
- La inhibición de la señalización TGF- $\beta$  trunca el desarrollo de los dedos, fenotipos similares a los encontrados con el tratamiento de FGF8 en la punta del dedo.

### **ETAPA TEMPRANA DEL ESTABLECIAMIENTO DE LA ID**

- La aplicación de TGF- $\beta$ 1 en la extremidad E24 induce cambios anteriorizantes de la ID.
- Los cambios inducidos por TGF- $\beta$  en E24 no alteran el patrón de expresión de *Shh*, *Fgf8*, *Hoxd11*, *12*, *13* y *Hoxa13*.
- La expresión de *Fgf8* desaparece en los dedos que cambian de ID bajo el tratamiento de TGF- $\beta$ 1 a las 72 h post-tratamiento.

De estos resultados concluimos que en etapas tardías del desarrollo, TGF- $\beta$  especifica la identidad de los dedos posteriores mediante la regulación negativa de FGF8, sin embargo se desconoce el mecanismo por el cual TGF- $\beta$  controla la heterocronía de la expresión de *Fgf8* en la punta de los dedos (Fig. 20B). Se sabe que en la etapa temprana del establecimiento de la ID, SHH, TBX2 y HOX especifican las identidades de los dedos posteriores a través de BMP2 y TBX3; y nosotros demostramos que lo hacen de manera independiente a FGF8. Sin embargo, la presencia de TGF- $\beta$  en esos estadios de desarrollo regula negativamente la expresión de *Bmp2* y por consecuencia la de *Tbx3*, cambiando la ID de manera anteriorizante (García Cruz. 2006). Por otro lado, proponemos que el establecimiento de la ID mediada por SHH, TBX2 y HOX es independiente al inducido por TGF- $\beta$ , ya que TGF- $\beta$  no ejerce cambio alguno en la expresión de estos genes (Fig. 20A).

## PERSPECTIVAS

A manera de reforzar que TGF- $\beta$  en E28 es la molécula que regula la ID en etapas tardías, es necesario realizar experimentos de rescate de función, donde si TGF- $\beta$  controla la ID mediante la regulación negativa de *Fgf8*, entonces la aplicación simultánea de perlas embebidas en FGF8 y TGF- $\beta$ 1, rescatará el fenotipo inducido por TGF- $\beta$ , es decir, no habría cambio de ID.

Se analizará con Microscopía Electrónica de Barrido la integridad de la AER, para determinar si la pérdida de la expresión de *Fgf8* inducida por TGF- $\beta$ 1 se debe a una regresión prematura de la AER o únicamente a la regulación transcripcional del gen *Fgf8*.

Se evaluará la expresión de *Fgf8* bajo el efecto del inhibidor del receptor de TGF- $\beta$ , ya que si TGF- $\beta$  regula negativamente la expresión de *Fgf8*, entonces este tratamiento induciría o mantendría la expresión de *Fgf8* en la AER de manera exacerbada.

Se determinará si TGF- $\beta$ , Activina o ambas moléculas son las responsables de la regulación de *Fgf8* sobre los dedos, mediante su inactivación local con RNA de interferencia.

Se evaluará si TGF- $\beta$  tiene un efecto negativo sobre las moléculas que se sabe regulan positivamente a *Fgf8* como WNT, SP8 y SP9 y FGF10.

Se realizarán más experimentos para aumentar la "n" y tratar de determinar cuales son las variables que permiten la obtención de una variedad de fenotipos bajo un mismo tratamiento.

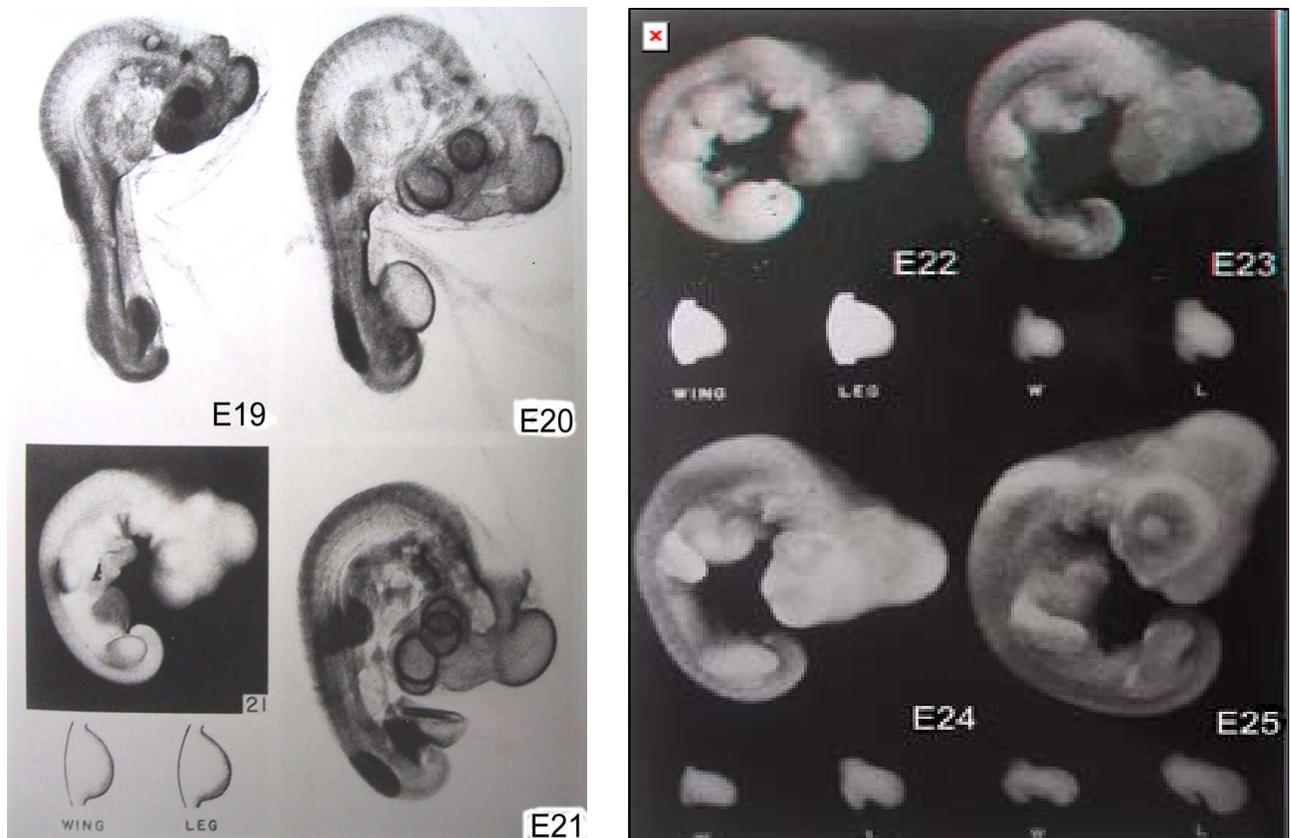
## APÉNDICE A

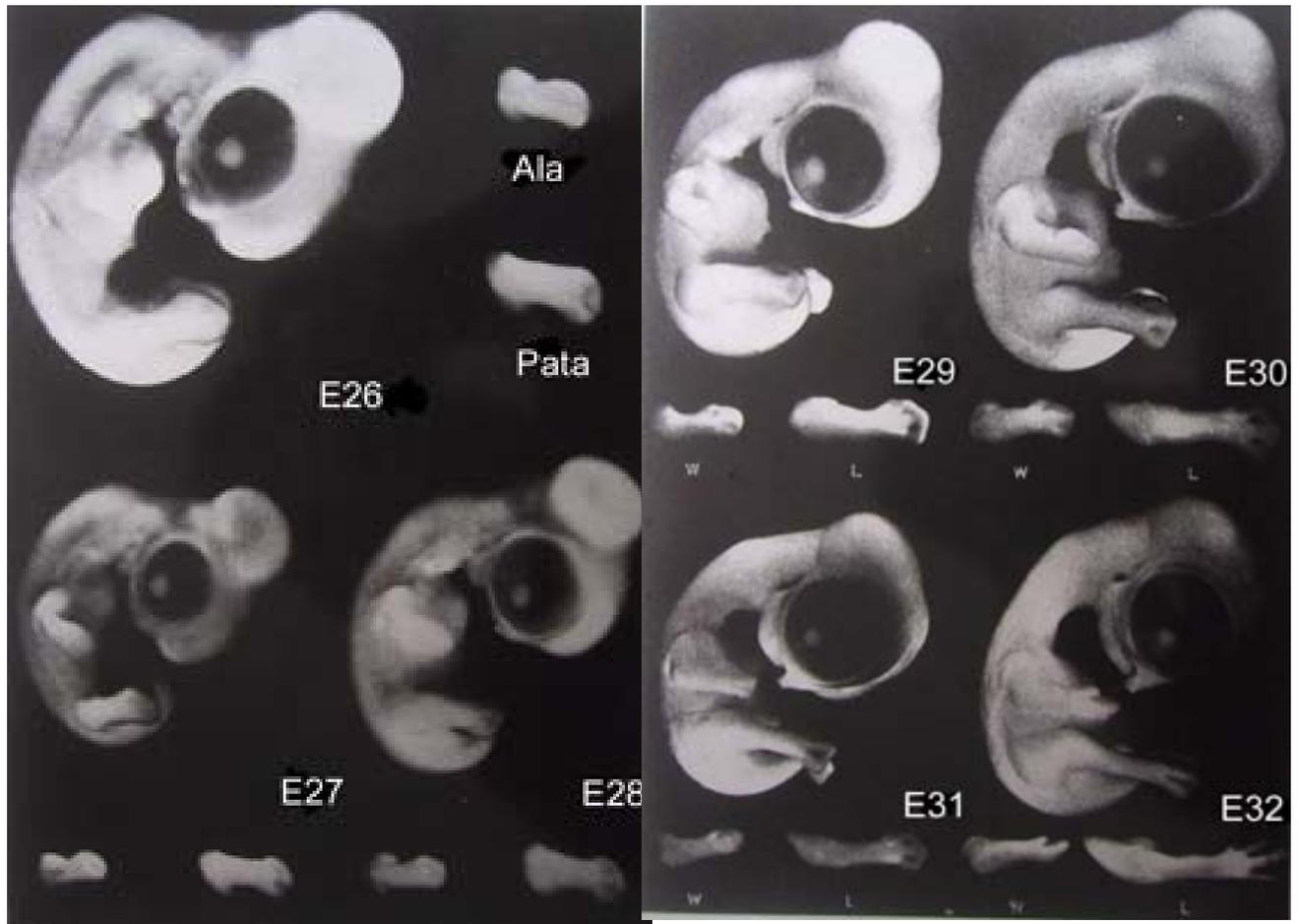
Clasificación de las etapas de desarrollo del embrión de pollo según Hamburger y Hamilton (1951). Esta clasificación se basa en la morfología de las extremidades y de los arcos branquiales. Para obtener los estadios de desarrollo que manipulamos dejamos incubar los embriones durante el siguiente tiempo:

E24 por 96 h.

E28 por 168 h.

Y a esos tiempos se verificó que los embriones tuvieran las características morfológicas que se muestran en este apéndice.

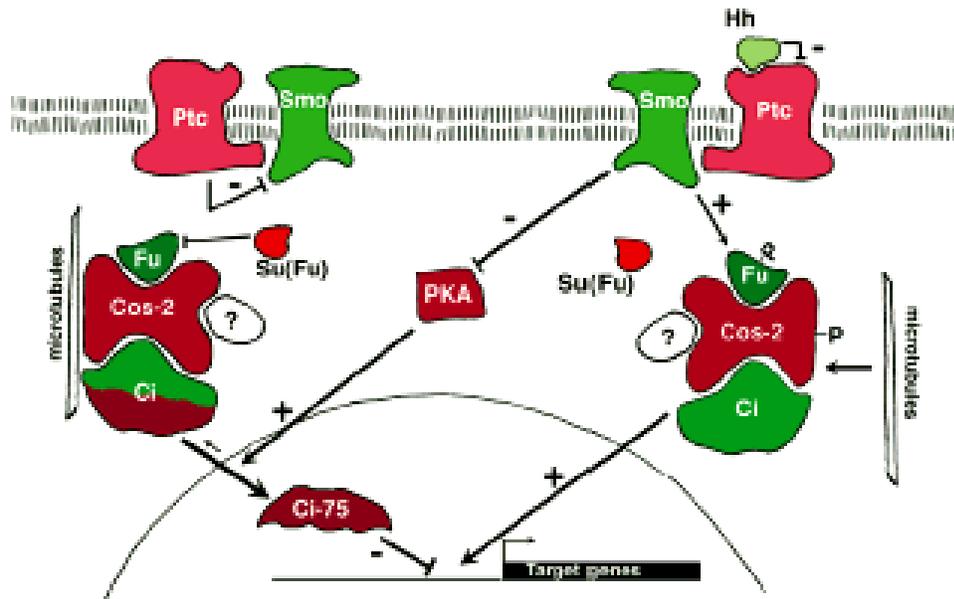




## APÉNDICE B

Vías de transducción de algunas señales presentes durante el desarrollo embrionario de las extremidades.

### Señalización Hedgehog (HH)

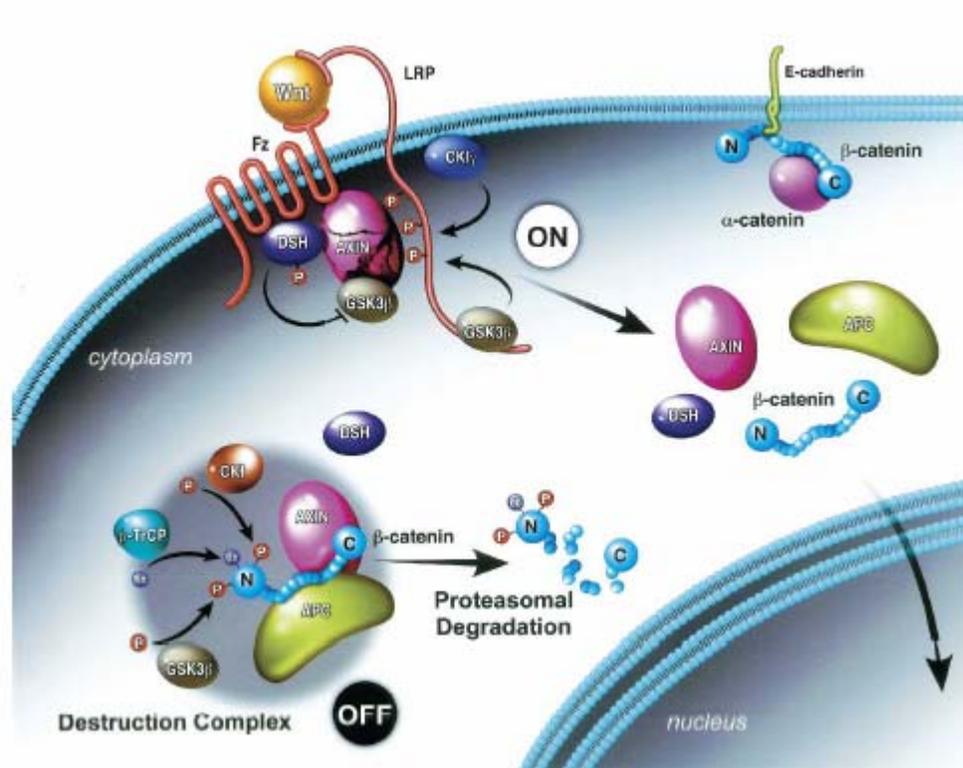


El modelo de la transducción de la señal HH muestra dos estados; en ausencia y en presencia de HH (Los factores que participan positivamente en la vía se encuentran en color verde, mientras que los reguladores negativos se encuentran en rojo). El receptor Patched (Ptc) reprime la señalización HH inhibiendo directamente a Smo. Cuando HH se une a Ptc, inhibe la actividad de Ptc causando la liberación de Smo y la activación de la vía de transducción.

Cuando Smo se encuentra reprimido (unido a Ptc), Cos-2 reprime la activación de Fu y Gli (Gli en vertebrados; Ci-Cubitus interruptus en *Drosophila*;) anclándolos a los microtúbulos del citoplasma. El complejo Cos-2 también contiene factores de funciones desconocidas en adición a Gli3 y Fu (Su). Fu (Su) sinergiza con Cos-2 para reprimir la activación de Fu en ausencia de HH. En ausencia de HH, Gli es cortado proteolíticamente (Gli-Represor o Ci-75) y se transloca al núcleo para reprimir la transcripción de genes blancos. PKA inhibe la activación de los genes blancos promoviendo la proteólisis de Gli en ausencia de HH.

Smo activo reprime la señalización de PKA y permite la activación de Fu. Cos-2 es subsecuentemente fosforilado y se libera del complejo de los microtúbulos. Adicionalmente, el corte proteolítico de Gli es inhibido y es estabilizada la forma completa de Gli-Activador que se transloca al núcleo para activar la transcripción de genes blancos de HH (Pearse y Tabin. 1998).

## Señalización WNT/ $\beta$ -catenina



El receptor para WNT es un receptor de siete pasas transmembrana, y pertenece a la familia de Frizzled. La vía WNT mediada por  $\beta$ -catenina es la mejor estudiada, donde, en ausencia del ligando WNT,  $\beta$ -catenina se asocia a un complejo de degradación citoplasmático que contiene APC, Axin y las cinasas CK1 y GSK3. Esto promueve la fosforilación de  $\beta$ -catenina para promover su ubiquitinación y consecuente degradación por el proteosoma (off). En presencia del ligando WNT, éste se une al receptor Frizzled, lo que permite la activación de Dsh. Dsh activo promueve la fosforilación de GSK3 $\beta$  inhibiendo su actividad y permitiendo la acumulación de  $\beta$ -catenina libre no fosforilada en el citoplasma (on), que entonces se transloca al núcleo para interactuar con factores de transcripción y regular la expresión génica (Willert y Jones. 2006).

## APÉNDICE C Soluciones Stock

### *PBS pH 7.4* (Buffer de Fosfatos Salino, pH 7.4)

	<b>1 X</b>
NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g
Agua bidestilada	800 ml

Ajustar el pH a 7.4 con HCl.

Aforar a 1 lt con Agua bidestilada.

Esterilizar en la autoclave.

### *PBT* (PBS-Tween 20 0.1 %)

	<b>100 ml</b>
Tween 20	100 µl
PBS	Aforar

### *SSC 20 X* (Buffer de Citratos Salino Standard, pH 7.0, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>: H<sub>2</sub>O 0.3M, NaCl 3M)

	<b>100 ml</b>
Agua mili-Q	80 ml
NaCl	17.53 g
Citrato de Sodio:2H <sub>2</sub> O	8.82 g
HCl	pH 7.0
Agua mili-Q	Aforar

### *Tris-HCl 1 M pH 7.5, 8, 9.*

	<b>100 ml</b>
H <sub>2</sub> O-DPEC	80 ml
Trizma base	12.1 g
HCl 1N (pH)	Ajustar pH
H <sub>2</sub> O-DPEC	Aforar

Filtrar y esterilizar.

## Soluciones para la Hibridación *in situ*

### *PFA 4 %* (Paraformaldehido al 4 %)

	<b>100 ml</b>
Agua desionizada	80 ml
Paraformaldehido	4 g
NaOH 10 N	6 µl
PBS 10 X	10 ml
Filtro Whatman	Filtrar
Agua desionizada	Aforar

El NaOH aclara la solución.

Preparar alicuotas para almacenar a  $-20^{\circ}$  C.

*H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6 %/PBT* (Peróxido de hidrógeno al 6% en PBT)

	<b>5 ml</b>
PBT	4 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 % (frasco)	1 ml

*Buffer de Hibridación* (Formamida 50%, SSC 5X, SDS 1%, RNAt 50 µg/ml, Heparina 50 µg/ml)

	<b>5 ml</b>
Formamida	2.5 ml
SSC 20 X (pH 7.0)	1.25 ml
SDS 10 %	0.5 ml
RNAt (10 mg/ml)	25 µl
Heparina(10 mg/ml)	25 µl
Agua mili-Q estéril	0.7 ml

*Solución I* (Formamida 50%, SSC 4X, SDS 1%)

	<b>40 ml</b>
Formamida	20 ml
SSC 20X	8 ml
SDS 10%	4 ml
Agua mili-Q	8 ml

*Solución II* (NaCl 0.5M , Tris 10 mM pH 7.4, Tween-20 0.1%)

	<b>100 ml</b>
NaCl 5M	10 ml
Tris 1M pH 7.4	1 ml
Tween 20	100 µl
Agua mili-Q	89 ml

*Solución III* (Formamida 50%, SSC 2X)

	<b>40 ml</b>
Formamida	20 ml
SSC 20X pH 7.4	4 ml
Agua mili-Q	16 ml

*TBST+Levamisole 2 mM* (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, KCl 10 mM, Triton 1%, Levamisole 2 mM)

	<b>100 ml</b>
Tris 1M pH 7.4	5 ml

NaCl 5M	3 ml
KCl 1M	1 ml
Triton	1 ml
Levamisole 200 mM	1ml
Agua mili-Q	89 ml

**NTMT+Levamisole 1 mM** (Tris-HCl 50 mM pH 9.5, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, NaCl 20 mM, Tween 20 1 %, Levamisole 1 mM)

	<b>100 ml</b>
Tris 1M pH 9.5	10 ml
MgCl <sub>2</sub> 1M	5 ml
NaCl 5M	2 ml
Tween 20	0.1 ml
Agua mili-Q	82.4 ml
Levamisole 200 mM	0.5 ml

**Suero 10%/TBST+Lev** (Suero de Oveja 10%/TBST-Levamisole 2 mM)

	<b>5 ml</b>
TBST+Levamisole	4.5 ml
Suero de Cabra	0.5 ml

## PREPARACIÓN DE RIBOSONDA

Linearización del plásmido que contiene el fragmento del gen de interés

Los reactivos para purificación de plásmidos a escala midipreparación fueron de Qiagen HiSpeed Plasmid midi Kit (25) (Cat. 12643).

**Digestión** *digerir de 10 a 20 µg del plásmido (templado)*

H <sub>2</sub> O estéril	X µl (para aforar a 50 µl)	
Buffer 10X	5 µl	
Plásmido (~1 µg/µl)	20 µl (10 a 20 µg del plásmido)	<b>No más de 20 µg</b>
Enzima de restricción* (X U/µl)	X µl (25 U)	<b>(agitar y centrifugar con un spin)</b>
Incubar	2 h	37°C.

\*La actividad de las endonucleasas es variable.

## Electroforesis

Para comprobar la linearización del plásmido se realizó una electroforesis con la digestión del plásmido (2 µl) y con el plásmido sin digerir (1 µl), en la que debe observarse que la banda del plásmido linearizado corre por arriba del plásmido superenrollado.

### *Precipitar el plásmido linearizado:*

Etanol 100%	150 µl	
Dejar precipitar		2 h a -70°C
Centrifugar a 14,000 rpm		30 min a 4°C
Retirar sobrenadante		
Etanol 70%	1 ml	
Centrifugar a 14,000 rpm		10 min a 4°C
Retirar sobrenadante		
Dejar secar		-15 min a temperatura ambiente
H <sub>2</sub> O estéril	7 µl	

Se resuspende en el volumen adecuado para que el plásmido linearizado tenga una concentración de ~1 a 2 µg/µl, tomando en cuenta que se pierde aproximadamente un 30% después del proceso de digestión. El plásmido puede almacenarse a -20°C durante varios años.

## Síntesis y marcaje de la ribosonda

Utilizar la RNA polimerasa adecuada para síntesis de la sonda antisentido.

### *Transcripción*

Buffer de transcrip. 5X*		4 µl
DTT (100 mM)	2 µl (10mM)	
rATP (10 mM)	2 µl (1 mM)	
rCTP (10 mM)	2 µl (1 mM)	
rGTP (10 mM)	2 µl (1 mM)	
rUTP (10 mM)	1.2 µl (0.65 mM)	
Dig UTP (10 mM)	0.8 µl (0.35 mM)	
Plásmido linearizado (1 µg/µl)	2 µl	
Inhibidor RNAasa (40 U/µl)	1 µl (20 a 40 U)	
H <sub>2</sub> O estéril	X µl (para aforar a 20 µl)	
RNApolimerasa* (X U/µl)	X µl (40 U)	(agitar y centrifugar con un spin)
Incubar	2h a 37° C	

## Electroforesis

Para comprobar la transcripción de la ribosonda se realizó una electroforésis con 0.5 µl de la reacción de transcripción, en la que se debe observar una banda 10 veces más intensa que la banda del plásmido linearizado. Agregar 20 U de DNAasa a la reacción y dejar 15' a 37° C. Agregar 2 µl de EDTA 0.2 M, para parar la reacción.

### *Precipitar la Ribosonda*

tRNA (10 mg/ml)	3 µl
TE (pH 8)	200 µl
Acetato de NH <sub>4</sub> 5M	4 µl
Etanol 100% (-20° C)	300 µl
Agitar bien con la mano	

Dejar precipitar	a -20° C toda la noche	
Centrifugar a 12,000 rpm	20 min	
Retirar sobrenadante		
Etanol 70%	1 ml	
Centrifugar a 12,000 rpm	10 min	
Retirar sobrenadante		
Dejar secar	-5 min a temperatura ambiente	<b>(cuidado de no secar demasiado)</b>
H <sub>2</sub> O DPEC	30 µl	
Almacenar a -20° C.		<b>Evitar descongelar continuamente (hacer alicuotas)</b>

### Tinción para detectar muerte celular

Solución de Rojo neutro

Rojo Neutro 2%. Preparar 2 g de Rojo neutro en 100 ml de PBS (FILTRARLA CON PAPEL FILTRO). De esta solución agregar 100 µl a 2 ml de medio de cultivo ó 50 µl a 3ml de PBS en una caja Petri.

### Formol cálcico

Mezclar:

100 ml Formol al 4% con 1 g de CaCl<sub>2</sub> y ajustar a pH 7.

### Tinción de esqueleto

Solución de Azul alciano y Alizarina roja.

Mezclar:

- 1 ml de azul alciano 0.3% (p/v) en etanol 70 %.
- 1 ml de alizarina roja 0.1 % (p/v) en etanol 70 %.
- 1 ml de ácido acético.
- 17 ml de etanol 70%.

## REFERENCIAS

- Altabef M, Clarke JD, Tickle C. 1997. Dorsoventral ectodermal compartments and origin of apical ectodermal ridge in developing chick limb. *Development* 124:4547-56.
- Aono H, e Ide H. 1998. A gradient of responsiveness to the growth-promoting activity of ZPA (Zone of Polarizing Activity) in the chick limb bud. *Dev. Biol.* 128: 136-141.
- Arman E, Haffner-Krausz R, Gorivodsky M, Lonai P. 1999. FGFR2 is required for limb outgrowth and lina-branching morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 11895-11899.
- Bamshad M, Lin RC, Law DJ, Watkins WC, Krakowiak PA. Moore ME. Franceschini P. Lala R. Holmes LB. Gebuhr TC. et al. 1997. Mutations in human TBX3 alter limb, apocrine and genital development in ulnar-mammary syndrome. *Nat. Genet.* 16: 311-315.
- Basilico C, Moscatelli D, 1992. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv. Cancer Res.* 59: 115-165.
- Barrow JR, Thomas KR, Boussadia-Zahui O, Moore R, Kemler R, Capecchi MR, McMahon AP. 2003. Ectodermal Wnt3/beta-catenin signaling is required for the establishment and maintenance of the apical ectodermal ridge. *Genes Dev.* 17: 394- 409.
- Boulet AM, Moon AM, Arenkiel BR, Capecchi MR. 2004. The Roles of Fgf4 y Fgf8 in limb bud initiation and outgrowth. *Dev. Biol.* 273: 361-372.
- Burt DW, y Paton IR. 1992. Evolutionary origins of the Transforming Growth factor-beta gene family. *DNA cell biol.* 7:497-510.
- Capdevila J, e Izpisúa Belmonte JC. 1999. Extracellular modulation of the Hedgehog, Wnt and TGF-beta signalling pathways during embryonic development. *Curr. Opin. Genet.Dev.* 9:427-33.
- Charité J, de GraaffW, Shen S, Deschamps J. 1994. Ectopic expression of Hoxb-8 causes duplication of the ZPA in the forelimb and homeotic transformation of axial structures. *Cell* 78:589-601.
- Charité J, McFadden DG, Olson EN. 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, Rodriguez-Leon J, Montero JA, Ganan Y, Macias D, Merino R, Hurle JM. 2003. Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev Biol.* 15;257(2):292-301.
- Cohn MJ, Izpisúa-Belmonte J-C, Abud H, Heath JK, Tickle C. 1995. Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell* 80: 739-46.
- Crossley PH, Minowada G, MacArthur CA, Martin GR. 1996. Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell* 84:127-36.
- Cygan JA, Johnson RL, McMahon AP. 1997. Novel regulatory interactions revealed by studies of murine limb pattern in Wnt-7a and En-1 mutants. *Development* 124:5021-32.

- Suzuki T, Takeuchi J, Koshiba-Takeuchi K. 2004. *Tbx* Genes Specify Posterior Digit Identity through Shh and BMP Signaling. *Developmental Cell*, 6: 43–53.
- Tickle C, Alberts B, Wolpert L, Lee J. 1982. Local application of retinoic acid to the limb bud mimics the action of the polarizing region. *Nature* 296:564–66.
- Tickle C. 1999. Morphogen gradients in vertebrate limb development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10:345–51.
- Tickle C, y Wolpert L. 2002. The progress zone –Alive or dead?. *Nature Cell Biol.* 4: 216-217.
- Todt WL, y Fallon JF. 1984. Development of the apical ectodermal ridge in the chick wing bud. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 80:21–41.
- Vogel A, Rodriguez C, Izpisua-Belmonte JC. 1996. Involvement of FGF-8 in initiation, outgrowth and patterning of the vertebrate limb. *Development* 122:1737–50.
- Vogel A, Rodriguez C, Warnken W, Izpisua Belmonte JC. 1995. Dorsal cell fate specified by chick *Lmx1* during vertebrate limb development. *Nature* 378:716–20.
- Wang CL, Omi M, Ferrari D, Cheng H, Lizarraga G, Chin H, Upholt WB, Dealy CN, Kosher RA. 2004. Function of BMPs in the apical ectoderm of the developing mouse limb. *Dev. Biol.* 269:109-122.
- Wilkins AS. 2002. The evolution of developmental pathways. Ed. Sinauer Associates, Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts. USA.
- Willert K, y Jones KA. 2006. Wnt signaling is the party in the nucleus?. *Genes and dev.* 20: 1394-1404.
- Yang Y, Drossopoulou G, Chuang PT, Duprez D, Marti E, et al. 1997. Relationship between dose, distance and time in Sonic Hedgehog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb. *Development.* 124:4393–404.
- Yang Y, y Niswander L. 1995. Interaction between the signaling molecules WNT7a and SHH during vertebrate limb development: dorsal signals regulate anteroposterior patterning. *Cell.* 80:939–47.
- Zákány J, y Duboule D. 1996. Synpolydactyly in mice with a targeted deficiency in the *HoxD* complex. *Nature.* 384:69–71.
- Zuniga A, Haramis AP McMahon AP, Zeller R. 1999. Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds. *Nature* 401:598–602.