



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EL ÁCIDO RETINOICO COMO FACTOR INDUCTOR DE APOPTOSIS E INHIBIDOR DE CONDROGÉNESIS DURANTE LA MORFOGÉNESIS DE LOS DEDOS EN EL EMBRIÓN DE POLLO

T E S I S

CON LA FINALIDAD DE OPTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A:

DAVID CRUZ SÁNCHEZ

TUTOR: DR. JESÚS CHIMAL MONROY

Octubre, 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.

Cruz-Sánchez, D. 2006. El Ácido Retinoico como Factor Inductor de Apoptosis e Inhibidor de Condrogénesis durante la Morfogénesis de los Dedos en el Embrión de Pollo. Tesis de Licenciatura, Biología. Facultad de Ciencias, UNAM.

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

División de Estudios Profesionales

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

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:
"El Ácido Retinoico como Factor Inductor de Apoptosis e Inhibidor de
Condrogénesis durante la Morfogénesis de los Dedos en el Embrión de
Pollo"

realizado por **David Cruz Sánchez**

con número de cuenta **09804932-5** , quien cubrió los créditos de la licenciatura en
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Tutor (a)
Propietario **Dr. Jesús Chimal Monroy**

Propietario **Dra. Rosa Estela Navarro González**

Rosa Navarro

Propietario **Dr. David Garciadiego Cázares**

Suplente **Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza**

Suplente **Dr. Ernesto Maldonado Olvera**

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D.F., a 14 de Septiembre del 2006
CONSEJO DEPARTAMENTAL DE BIOLOGÍA

M en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



Agradecimientos

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

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

Gracias a los miembros del jurado: Dr. David Garciadiego Cázares, Dra. Rosa Estela Navarro González, Dr. Ernesto Maldonado Olvera y a la Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza por sus recomendaciones sobre este trabajo. También agradezco al Dr. Jesús Chimal Monroy por la dirección de esta de tesis, por su apoyo y tolerancia, y por todo lo que he aprendido durante mi estancia en este laboratorio.

A Alberto Ríos por el trabajo y discusión conjunta durante la realización de esta tesis.

Un especial agradecimiento a mis padres por su comprensión, apoyo (emocional y económico) que me han brindado durante toda mi vida.

A todos mis maestros de la Fac. que han sido parte importante durante mi formación y aprendizaje de esta gran carrera.

A mis amigas: María gracias por estar en los momentos difíciles, por haber sido una gran amiga y por todo lo que he aprendido de ti, a las "Ritas" por esos días de sana diversión, a Lintzy (otra vez) por tu compañía y amistad durante muchos muchos años, a Chela por el cariño que he recibido de ti y a mis compañeros (as) de la Fac.

Gracias a mis compañeros y amigos del laboratorio: David, Rene, Marcia, Karla (mi buena amiguis), Karina, Martha (gracias por el curso express de Portugués), Alberto, Georgina, Sinué, Emelí y por supuesto a la vieja mesa chacotera.

A mi alma mater de toda la vida la Universidad Nacional Autónoma de México por que siga siendo laica, pública y gratuita, y por supuesto la mejor universidad de México.

“Para todo problema complejo, existe una solución sencilla que es simple, elegante (limpia) e incorrecta.”

Henry Louis Mencken

Contenido

RESUMEN	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
SIGLAS	2
INTRODUCCIÓN	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
ESTRUCTURA ANATÓMICA DE LA EXTREMIDAD	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
ESTABLECIMIENTO DEL CAMPO DE LA EXTREMIDAD	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
INDUCCIÓN DE LA EXTREMIDAD	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
ESTABLECIMIENTO DE LOS TRES EJES ANATÓMICOS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
Establecimiento del Eje Posterior-Distal (P-D)	¡Error! Marcador no definido.
Establecimiento del Eje Anterior-Posterior (A-P)	¡Error! Marcador no definido.
Establecimiento del Eje Dorsal-Ventral (D-V)	¡Error! Marcador no definido.
Coordinación de los mecanismos moleculares de los Tres Ejes	¡Error! Marcador no definido.
FORMACIÓN DEL ESQUELETO APENDICULAR	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
El papel de <i>Sox9</i> durante la condrogénesis	¡Error! Marcador no definido.
MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN LA EXTREMIDAD	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
Las BMP promueven la apoptosis en los interdígitos	¡Error! Marcador no definido.
Interrelación entre FGF y BMP durante el control de la apoptosis	¡Error! Marcador no definido.
Participación de <i>Msx1</i> y <i>Msx2</i> en el control de la apoptosis interdigital	¡Error! Marcador no definido.
EL PAPEL DUAL DEL ÁCIDO RETINOICO DURANTE LA REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS Y LA CONDROGÉNESIS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL ÁCIDO RETINOICO	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
HIPÓTESIS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
OBJETIVO	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
MATERIALES Y MÉTODOS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
PREPARACIÓN DE PERLAS CON ÁCIDO RETINOICO (AR)	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
MANIPULACIÓN DE LOS EMBRIONES	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
PREPARACIÓN DE SONDAS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> EN ÓRGANO COMPLETO	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
TINCIÓN DEL ESQUELETO	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
TINCIÓN CON ROJO NEUTRO	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
RESULTADOS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
¿EL AR ANTICONDROGÉNICO O APOPTÓTICO?	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
EL AR INHIBE LA CONDROGÉNESIS REPRIMIENDO LA EXPRESIÓN DE <i>Sox9</i>	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
EL AR INDUCE LA EXPRESIÓN DE <i>Bmp7</i> Y <i>Msx2</i>	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
EL AR INHIBE LA EXPRESIÓN DE <i>FGF8</i>	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
EL AR PUEDE ESTAR PARTICIPANDO EN UN BALANCE ENTRE SEÑALES CONDROGÉNICAS Y APOPTÓTICAS DURANTE LA MORFOGÉNESIS DEL AUTÓPODO	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
DISCUSIÓN	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
CONCLUSIONES	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
PERSPECTIVAS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
REFERENCIAS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Siglas

AAR: Antagonista del Ácido Retinoico

AER: Cresta Ectodérmica Apical (Apical Ectodermal Ridge)

ANZ: Zona Necrótica Anterior (Anterior Necrotic Zone)

A-P: eje Antero Posterior

AR: Ácido Retinoico

BMP: Proteína Morfogénica de Hueso (Bone Morphogenetic Protein)

BMPR1a (Alk3): Receptor tipo 1a de las Proteínas Morfogénicas de Hueso (Bone Morphogenetic Protein Receptor 1a)

BMPR1b (Alk6): Receptor tipo 1b de las Proteínas Morfogénicas de Hueso (Bone Morphogenetic Protein Receptor 1b)

D-V: eje Dorsal Ventral

FGF: Factor de Crecimiento de Fibroblastos (Fibroblast Growth Factor)

KO: *Knockout*

LPM: Mesoderma de la Placa Lateral (Lateral Plate Mesoderm)

PBS: Amortiguador Salino de Fosfatos (Phosphate Buffer Saline)

P-D: eje Próximo Distal

PNZ: Zona Necrótica Posterior (Posterior Necrotic Zone)

PZ: Zona de Progreso (Progress Zone)

TGFβ: Factor de Crecimiento Transformante β (Transforming Growth Factor β)

ZPA: Zona de Actividad Polarizante (Zone of Polarizing Activity)

Resumen

Durante la morfogénesis tardía de la extremidad las células del mesodermo indiferenciado forman los dedos en regiones específicas por medio de la condrogénesis, y las células de las regiones interdigitales permanecen indiferenciadas y posteriormente mueren por apoptosis. La respuesta de las células a uno o a otro proceso (condrogénesis o apoptosis), depende del tipo y cantidad de señales que reciben. Hay evidencias que sugieren que el Ácido Retinoico (AR) puede estar regulando la apoptosis interdigital y la condrogénesis, puesto que es la molécula más temprana conocida involucrada en el proceso de apoptosis interdigital e inhibición de cartílago, ya que al aplicarlo en el interdígito acelera la muerte y al inhibirlo se forman dedos ectópicos. Además, al colocarlo en la punta del dedo éste se trunca y el mesénquima indiferenciado muere por apoptosis (Rodríguez-León, *et al.*, 1999). A pesar de esto, se desconoce como es la regulación temporal de las señales condrogénicas y de las señales que participan en la apoptosis por el AR durante el desarrollo del autópodo.

En la presente tesis los resultados sugieren que el AR regula negativamente la condrogénesis inhibiendo la expresión de *Sox9* después de 1 h de aplicarlo en la punta del dedo y al mismo tiempo promueve la apoptosis induciendo la expresión de *Bmp7* (1 h), *Msx2* (4 h) e inhibiendo a *Fgf8* 6 h después del tratamiento. Sin embargo, el fenotipo observado muestra que el AR promueve la apoptosis entre 6 h y 12 h e inhibe el crecimiento del dedo 12 h después de ser aplicado en la punta del dedo.

Los resultados también sugieren que el papel anticondrogénico y apoptótico del AR presenta un antagonismo respecto al efecto condrogénico del TGF β aplicado en el interdígito. Reforzando la idea de que pueda existir un balance de señales que regule la morfogénesis del autópodo.

Introducción

¿Cómo se forma a partir de una célula recién fertilizada un organismo pluricelular complejo? Esta es la pregunta, que tratan de responder los estudiosos de la biología del desarrollo y para responderla; en general, se estudian los mecanismos y procesos por los cuales las células, inicialmente indiferenciadas, se coordinan formando y estableciendo la disposición tridimensional y funcional de las diferentes estructuras anatómicas de organismos pluricelulares complejos. Sin embargo, al estudiar estos procesos es necesario utilizar sistemas experimentales, entre los más socorridos se encuentran el estudio del desarrollo del sistema nervioso, del corazón, del sistema reproductor, de las extremidades, entre otros.

Así mismo, la extremidad de los tetrápodos (de anfibios, reptiles, aves y mamíferos) constituye, a este respecto, un sistema experimental adecuado para estudiar la formación de patrones y abordar los mecanismos moleculares que controlan el crecimiento y el establecimiento de la información posicional durante el desarrollo embrionario.

Durante el estudio de la formación de patrones y mecanismos moleculares de desarrollo, se utilizan animales como modelos experimentales, los cuales deben tener características particulares tales como: una manipulación accesible, manutención de bajo costo, ciclo de vida relativamente corto y conocido, entre otras características. Entre los más utilizados están los individuos pertenecientes a las especies *Mus musculus* (ratón) y *Gallus gallus* (pollo) cada uno con sus ventajas y desventajas. Por ejemplo, en el primero se pueden inducir mutaciones dirigidas para determinado(s) gene(s) y analizar el resultado en un tiempo determinado del desarrollo. Por otra parte, el pollo se puede manipular experimentalmente *in ovo* con técnicas de

sobreexpresión de genes o adición de factores de crecimiento en zonas específicas, en diferentes estadios del desarrollo sin interrumpirlo y observar el resultado en diferentes tiempos utilizando diferentes técnicas como: tinción de esqueleto, tinción de áreas de muerte celular con rojo neutro, hibridación *in situ*, entre otras.

La información obtenida de estos dos modelos experimentales puede ser aplicada, de modo general, a las extremidades de los tetrápodos ya que comparten un *bauplan* (morfología, estructura y fisiología) al ser homólogas entre si, es decir, tienen el mismo origen embrionario. Además, se ha observado que los mecanismos básicos de formación de la extremidad están conservados a lo largo de la escala evolutiva de los amniotas, a pesar de que encontramos diferencias estructurales entre los taxones. Es por eso que en biología del desarrollo también podemos hacer inferencias evolutivas y tratar de explicar cuales son los mecanismos moleculares y/o celulares que han surgido en el transcurso de la evolución y como consecuencia tenemos una gran diversidad morfológica en las extremidades de los tetrápodos.

Estructura Anatómica de la Extremidad

Antes de hablar de como se forman las extremidades hay que conocer su estructura básica general, así como los tres ejes anatómicos determinados arbitrariamente para su estudio: El proximal-distal (P-D) el cual recorre la extremidad desde de la parte más cercana a la línea media del embrión hacia la más alejada; el eje anterior-posterior (A-P) del segmento superior o cefálico de la extremidad hacia el inferior o caudal. Y el dorsal-ventral (D-V) que va de la parte externa de la extremidad hacia la interna. Además, se pueden reconocer tres estructuras básicas en el esqueleto de la extremidad las cuales son, de proximal a distal: el estilópodo con un solo elemento

llamado húmero en el miembro anterior o fémur en el posterior; el zeugópodo que consta de dos elementos, radio y ulna en el anterior o tibia y fíbula en el posterior. Por último, el autómodo está constituido por los carpos o tarsos, respectivamente, y con un número variable de radios digitales (Fig. 1) dependiendo de la especie, en el caso del pollo tiene 3 dedos en las alas y 4 en las patas.

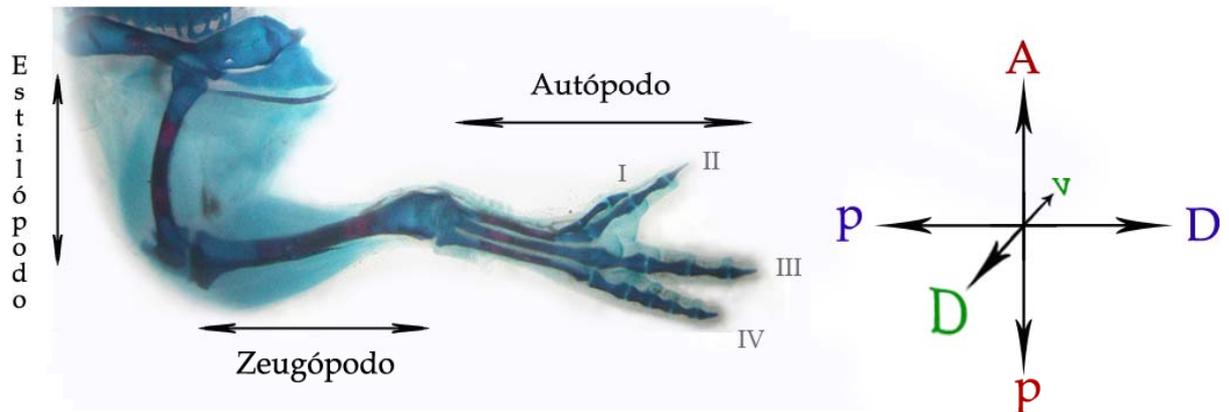


Figura 1. Estructura anatómica básica de la extremidad de tetrápodos. Se muestra una fotografía de la extremidad posterior de pollo teñida con azul Alciano y Alizarina roja.

Establecimiento del Campo de la Extremidad

El primer evento que ocurre durante el desarrollo de las extremidades, es su establecimiento posicional en cuatro puntos determinados del flanco del embrión en los tetrápodos, dos en cada lado. En el caso del pollo las extremidades anteriores se forman entre las somitas 15 y 20, y las posteriores entre las somitas 26 y 32 (Bellaris y Osmond, 2005).

Las cuatro zonas del embrión en donde surgen los primordios, se conocen como campos de la extremidad. Actualmente, se sabe que estos campos están determinados por la combinación funcional de varios genes homeóticos en el LPM. Estos genes constituyen una extensa familia de genes Hox que codifican para factores de transcripción, los cuales se encuentran muy conservados en diferentes taxones a

través de la escala evolutiva de organismos pluricelulares. Fueron descubiertos en *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) al observar que diferentes combinaciones de la expresión y función de genes Hox confieren identidades diferentes a los distintos segmentos del embrión.

En vertebrados, se ha observado por hibridación *in situ* que los genes *Hox4*, *Hoxb5*, *Hoxc6*, y *Hoxc8* se expresan en el Mesodermo de la Placa Lateral (LPM, por sus siglas en inglés) precisamente en donde se posicionará la extremidad anterior (Izpisua-Belmonte, *et al.*, 1991; Nelson, *et al.*, 1996), lo que sugiere la participación de los productos de estos genes en su establecimiento posicional. Un ejemplo que corrobora esta participación es el ratón mutante para *Hoxb5*, el cual presenta un desplazamiento de ciertas estructuras de la extremidad respecto de sus posiciones normales en el flanco embrionario (Rancourt, *et al.*, 1995). Una vez que se establece la posición de las extremidades el siguiente paso es la inducción y formación de los primordios.

Inducción de la Extremidad

Los primordios se forman a partir del estadio 17 HH (Hamburger y Hamilton, 1951), son el resultado de la agrupación y proliferación de células provenientes del LPM, estas células mesodérmicas se encuentran recubiertas por células del ectodermo, que en la parte más distal convergen formando un pliegue engrosado llamado Cresta Ectodérmica Apical (AER, por sus siglas en inglés). Ésta recorre el primordio de la región anterior a la posterior y delimita la región dorsal de la ventral (Todt y Fallon, 1984). Esta estructura fue descrita desde hace más de un siglo (Köllicker, 1879; en Saunders, 1998) y juega un papel importante durante el desarrollo de la extremidad, del cual hablaré mas adelante.

Los Factores de Crecimiento de los Fibroblastos (FGF) son moléculas que participan en la inducción de la extremidad, puesto que al aplicar una perla de heparina embebida con FGF en el flanco del embrión resulta en la inducción de una extremidad ectópica (Cohn, *et al.*, 1995). Además, está descrito que *Fgf8* es una molécula que se expresa en el mesodermo intermedio (MI) e induce la expresión de *Fgf10* en el LPM en los campos de la extremidad. Una vez que *Fgf10* se ha establecido en el LPM, induce la expresión de *Fgf8* en el ectodermo que se encuentra en los campos de la extremidad, con la consecuente formación de la AER (Crossley, *et al.*, 1996; Ohuchi, *et al.*, 1997; Ohuchi, *et al.*, 1999). Adicionalmente, en el ratón mutante de *Fgf10* la AER no se forma y por consiguiente las extremidades no se desarrollan (Sekine, *et al.*, 1999) estos resultados indican el papel de *Fgf10* durante la inducción del primordio.

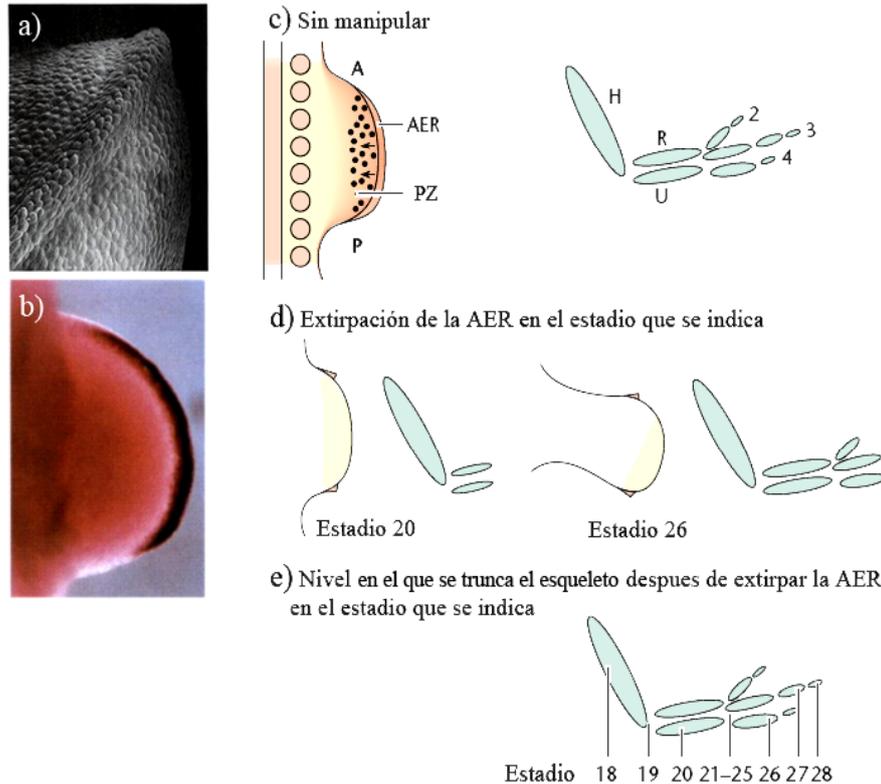
Establecimiento de los Tres Ejes Anatómicos

Durante la inducción y el desarrollo subsiguiente del primordio, se observan asimetrías morfológicas y funcionales en todo lo largo y ancho de cada uno de los ejes P-D, A-P y D-V de la extremidad de cualquier tetrápodo. Las estructuras o grupos celulares que establecen estas diferencias son: la AER la cual está implicada en el crecimiento, además, como se propone, influye en un grupo de células conocido como la Zona de Progreso (PZ) estableciendo la posición de los elementos a lo largo del eje P-D. La Zona de Actividad Polarizante (ZPA por sus siglas en inglés) establece el eje A-P. Por último el ectodermo del primordio no perteneciente a la AER establece el eje D-V. Sin embargo, las estructuras o grupos celulares no están aislados uno del otro, por lo tanto, la coordinación de los mecanismos moleculares de cada eje permiten que se establezca la morfología tridimensional de la extremidad.

Establecimiento del Eje Posterior-Distal (P-D)

La formación y el mantenimiento de la AER es indispensable durante el crecimiento de la extremidad y el establecimiento del eje P-D, puesto que al quitarla quirúrgicamente resulta en el truncamiento de la extremidad, además, si se quita la AER en estadios

tempranos del desarrollo no se forman los elementos intermedios ni los más distales. Y si se elimina la AER en estadios intermedios de desarrollo, los elementos más



dístales de la **Figura 2.** La AER es importante para la progresión de la extremidad. **a):** micrografía de la AER. **b):** Fgf8 se expresa en la AER. **c):** Esquema del primordio en estadio 20 y a la derecha el establecimiento normal de los elementos esqueléticos. **d, e):** Resultado en el establecimiento de los elementos esqueléticos después de la extirpación de la AER. Esquema (Saunders,

1948; Todt y Fallon, 1984) lo que sugiere que las señales provenientes de la AER son continuamente necesarias durante el crecimiento de la extremidad.

Las moléculas implicadas en la progresión de la extremidad son las proteínas pertenecientes a la familia de FGF, específicamente FGF8 y FGF4; las cuales se sintetizan en la AER y pueden difundir hacia las células del mesénquima. En un

experimento de rescate de función, al extirpar la AER y ser sustituida por una perla embebida en FGF4 o cualquier otro de la misma familia, no se trunca el desarrollo de la extremidad (Niswander, *et al.*, 1993). Similarmente en el doble "knockout" (KO) de *Fgf8* y *Fgf4*, las extremidades posteriores no se forman y las anteriores presentan enanismo, esto último se explica debido al promotor que se utilizó el cual permite que *Fgf8* y *Fgf4* se expresen en un periodo de tiempo corto en la AER (Sun, *et al.*, 2002). Con estos resultados se concluye que *Fgf8* y *Fgf4* son los responsables del crecimiento Próximo-Distal de la extremidad.

Sin embargo, la estructura básica de las extremidades de los tetrápodos posee una heterogeneidad a lo largo del eje P-D, es decir, presenta diferentes estructuras con morfología y número variable de elementos esqueléticos en la parte proximal con respecto a la distal. Estas estructuras temporalmente se desarrollan en una secuencia próximo distal (Saunders, 1948). Una teoría que trata de explicar la forma en que se establecen estas estructuras, se conoce como el Modelo de la Zona de Progreso.

Este modelo propone que: por debajo de la AER hay un grupo de células mesodérmicas que ocupan un área de aproximadamente 200 μm en la parte distal del primordio, estas células se encuentran en un estado indiferenciado y de proliferación continua, probablemente debido a la influencia de señales provenientes de la AER. A medida que la extremidad crece las células mesodérmicas abandonan la PZ y conforme se alejan adquieren información posicional dando origen al elemento del estilópodo en primer lugar, posteriormente a los del zeugópodo y al último los del autópedo (Saunders, 1948; Summerbell, *et al.*, 1973). Por otra parte, en la extremidad también hay diferencias a lo largo del eje A-P.

Establecimiento del Eje Anterior-Posterior (A-P)

El establecimiento del eje antero-posterior (A-P) está dirigido por un grupo de células de la parte posterior del primordio, descrito gracias a un experimento de transplante de células, puesto que al colocar células de la región posterior en la parte anterior del primordio de otro embrión, resulta

en la duplicación de la extremidad en imagen especular (Saunders, *et al.*, 1958). A esta región de la extremidad se conoce como la Zona de Actividad Polarizante (Fig. 3).

Veinticuatro años después del experimento de transplante, Cheryll Tickle describió que el Ácido Retinoico (AR) al ser

colocado en la parte anterior del primordio simulaba la acción de la ZPA (Tickle, *et al.*, 1982). Sin embargo, esta molécula no se

consideró como el morfógeno responsable del establecimiento A-P, ya que la degradación del AR en la parte de la ZPA, ocurre rápidamente (Eichele, *et al.*, 1985; Thaller y Eichele, 1988). Por otro lado, las células adyacentes a una perla con AR colocada en la región anterior del primordio de la extremidad, son capaces de inducir duplicaciones en imagen especular, por lo tanto el AR es el inductor de la ZPA y no el factor responsable del establecimiento de la polaridad A-P (Noji, *et al.*, 1991; Wanek,

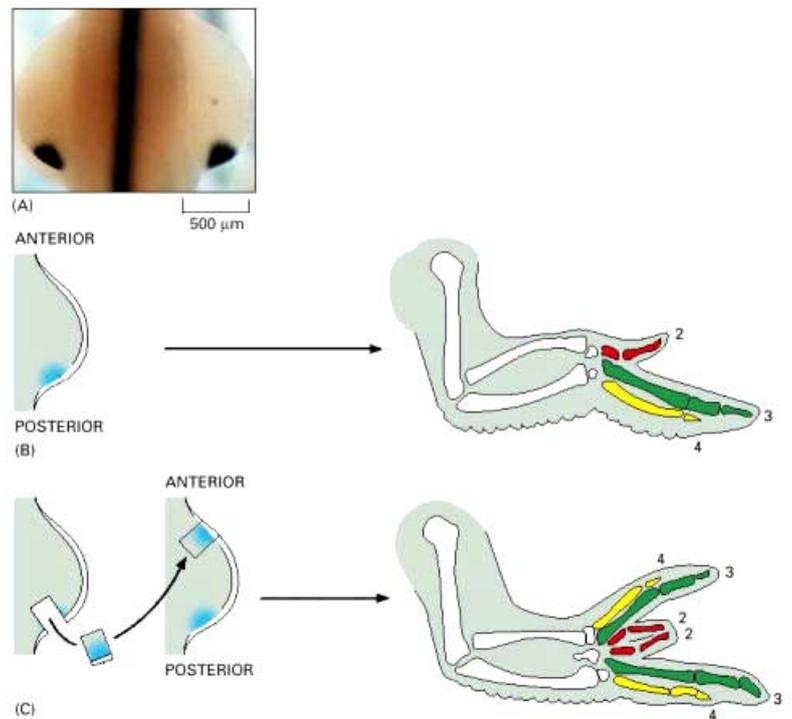


Figura 3. El establecimiento del eje A-P es controlado por un grupo de células de la parte posterior conocido como la ZPA y que expresa Shh. (A) Vista dorsal del embrión mostrando la expresión de Shh en la parte posterior de los primordios. El cual es el morfógeno responsable de la actividad de la ZPA, (B) desarrollo normal de la extremidad, (C) Resultado del transplante de células de la ZPA a la parte posterior del primordio de otro embrión (Alberts, *et al.*, 2002).

et al., 1991). Actualmente, se sabe que el AR induce la expresión de *Hoxb8* y éste a su vez establece, la posición de la ZPA en el primordio temprano (Lu, *et al.*, 1997).

En 1993 Riddle y colaboradores describieron que el RNA mensajero de la proteína, con capacidad de difusión, Sonic Hedgehog (SHH) se expresa en la ZPA (Fig. 3), el cual es inducido por AR y la presencia de células transfectadas con el gen de *Shh* en la parte anterior del primordio de la extremidad, resultaba en el mismo fenotipo de duplicación en imagen especular producido por las células provenientes de la ZPA (Riddle, *et al.*, 1993). Por otra parte, el ratón mutante de *Shh* carece de los elementos posteriores (Chiang, *et al.*, 1996; Chiang, *et al.*, 2001; Litingtung, *et al.*, 2002). Además, se ha observado que el efecto de SHH sobre la especificación e identidad de los dedos posteriores depende de un gradiente espacial y temporal de la proteína sobre las células del primordio (Harfe, *et al.*, 2004) correspondiendo con la función de un centro organizador.

Sin embargo, existen otros factores que contribuyen al establecimiento de este eje restringiendo o estableciendo el dominio de expresión de *Shh* en el mesodermo de la parte posterior. Por ejemplo la mutación en ratón en el gen de *Alx4*, que codifica para un factor de transcripción, resulta en el incremento del dominio de expresión de *Shh* en el margen anterior del primordio, además *Alx4* se expresa en el mesodermo anterior complementariamente a *Shh* (Qu, *et al.*, 1997a; Qu, *et al.*, 1997b; Takahashi, *et al.*, 1998). También, se ha identificado como un regulador positivo de *Shh* al factor de transcripción dHAND, el cual se expresa en la parte posterior (Fernández-Terán, *et al.*, 2000) y es inducido por *Hoxb8* muy temprano en el desarrollo del primordio. Así mismo, la sobreexpresión del gen de *dHand* en la parte anterior del primordio induce ectópicamente la expresión de *Shh*. Por otra parte, en el ratón mutante de *dHand*

nunca se expresa *Shh* (Charite, *et al.*, 2000; Fernández-Terán, *et al.*, 2000). Todos estos resultados sugieren que existe un complejo sistema genético que permite que *Shh* se exprese en el lugar y momento justo mediando la función de la ZPA.

Establecimiento del Eje Dorsal-Ventral (D-V)

El establecimiento del eje D-V y la consiguiente formación de elementos ventrales y dorsales, tales como: los tendones, los nudillos, los cojinetes de las palmas, etc., es resultado de una relación compleja entre el mesénquima y el ectodermo. Se ha visto que se puede revertir este eje intercambiando el mesodermo o el ectodermo dorsal y ventral dependiendo del estadio de desarrollo en que se encuentre el primordio de la extremidad. Por ejemplo, si se intercambia el ectodermo entre el estadio 12 y 14 HH en las áreas presuntivas de formación del primordio, el eje no se invierte; por el contrario si se invierte el mesodermo en las mismas etapas el eje se invierte (Geduspan y MacCabe, 1989), sugiriendo que el mesodermo dirige el establecimiento del eje D-V en la extremidad (Fig. 4A). Sin embargo, haciendo el mismo tipo de experimentos en estadios posteriores al surgimiento del primordio (posterior a 17 HH), es el ectodermo el que dirige el establecimiento del eje D-V (Fig. 4B) (MacCabe, *et al.*, 1974; Geduspan y MacCabe, 1989).

Las señales o los mecanismos moleculares que establecen este eje D-V en estadios anteriores a 16 HH no están del todo claros. Sin embargo, en los estadios posteriores se conoce que el mensajero del gen *Wnt7a* se expresa en el ectodermo dorsal (Fig. 4C), experimentalmente, el ratón mutante de *Wnt7a* presenta elementos ventrales en ambos lados de la extremidad (Parr y McMahon, 1995). WNT7a es una proteína que difunde y en el mesodermo dorsal induce la expresión del gen de *Lmx1*, factor de

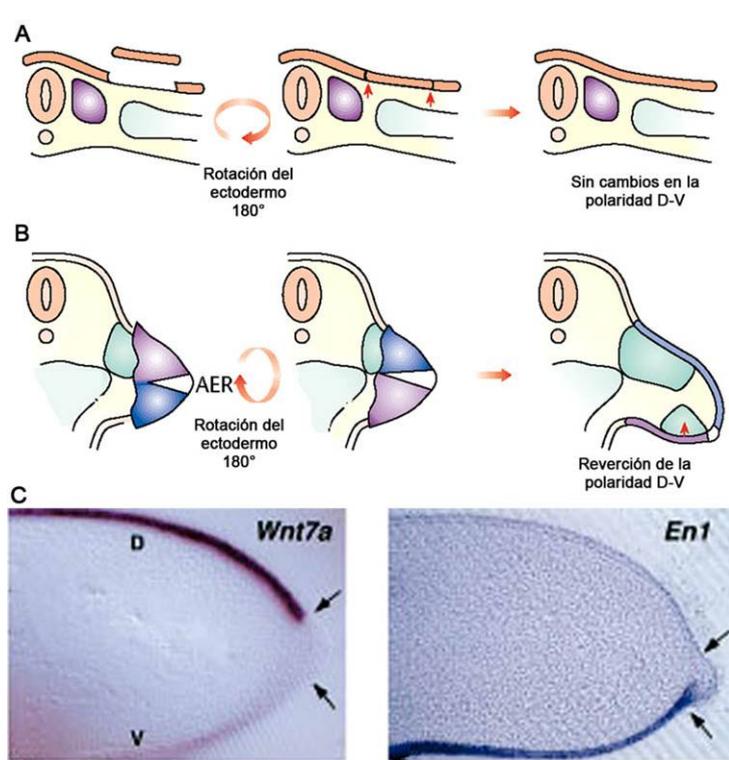


Figura 4. El ectodermo no perteneciente a la AER establece el eje D-V. **A:** Se muestra esquemáticamente que al rotar el ectodermo 180° en estadio 14 se mantiene la polaridad D-V del mesodermo. **B:** Al rotar el ectodermo 180° en estadio 20 la polaridad se revierte en la parte distal. Ectodermo dorsal: morado. Ectodermo ventral: azul. **C:** Hibridaciones *in situ* en cortes longitudinales del primordio mostrando la expresión en el ectodermo no perteneciente a la AER de *Wnt7a* (morado) y *En1* (azul), genes involucrados en el establecimiento del eje D-V. Esquema modificado de (Niswander, 2001), Hibridaciones *in situ* de (Logan, *et al.*, 1997).

transcripción que al ser sobreexpresado en el mesodermo ventral, se produce una transformación hacia elementos dorsales (Riddle, *et al.*, 1995), indicando que LMX1 es suficiente para especificar a las células a formar elementos dorsales.

El gen del factor de transcripción *Engreiled1* (*En1*) se expresa en el ectodermo ventral y además de establecer la posición de la AER, restringe la expresión

de *Wnt7a* en el ectodermo dorsal, puesto que en el ratón mutante de *En1*, la expresión de *Wnt7a* se amplía al ectodermo ventral resultando en la formación de estructuras

dorsales en ambas superficies (Loomis, *et al.*, 1998). En conclusión el eje D-V está controlado por la función regionalizada de *Wnt7a* y *En1* en el ectodermo del primordio en estadios posteriores al surgimiento del primordio.

Coordinación de los mecanismos moleculares de los Tres Ejes

La extremidad tiene una organización tridimensional bien establecida, es por eso que cada uno de los centros organizadores del primordio (AER, ZPA y el Ectodermo no perteneciente a la AER) no se encuentran aislados uno del otro, al contrario, hay una estrecha comunicación entre ellos. En resumen, *Fgf4* en la AER y *Wnt7a* en el ectodermo dorsal mantienen la expresión de *Shh* en el mesodermo, mientras que éste a su vez permite que *Fgf4* mantenga su expresión en la AER.

De esta forma tenemos que en el ratón mutante de *Wnt7a*, además de presentar doble polaridad ventral, en muchos casos pierde elementos posteriores y la expresión de *Shh* se ve reducida (Parr y McMahon, 1995). En el embrión de pollo ocurre de igual forma cuando se quita el ectodermo dorsal (Yang y Niswander, 1995). A su vez *Shh* regula positivamente la expresión de *Fgf4* en la parte posterior de la AER y *Fgf4* mantiene a *Shh* en la ZPA (Laufer, *et al.*, 1994; Niswander, *et al.*, 1994) en retroalimentación positiva. Pero esta regulación es indirecta puesto que *Shh* induce la expresión de Gremlin un antagonista de BMP (Bone Morphogenetic Protein), y las BMP reprimen la expresión de FGF en la AER (Gañan, *et al.*, 1998; Pizette y Niswander, 1999).

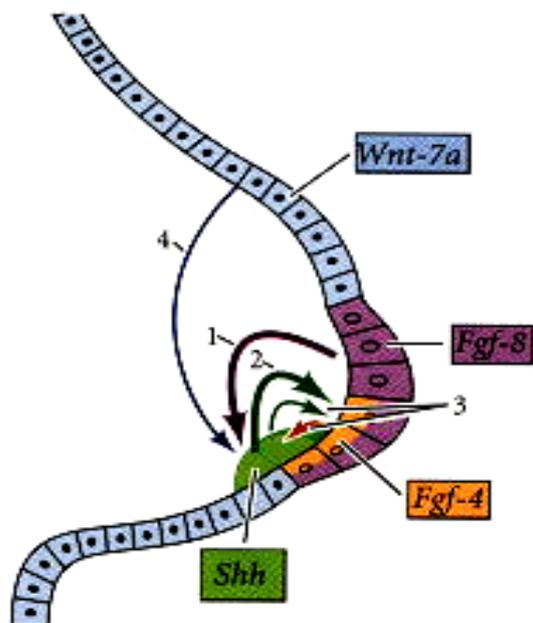


Figura 5. Coordinación de la señalización de los tres ejes. (1) Estabilización de *Shh* en la ZPA por *Fgf8*; (2) inducción de *Fgf4* in la AER por *Shh*; (3) asa de regulación entre *Fgf4* y *Shh*; (4) Mantenimiento de la expresión de *Shh* por *Wnt7a* desde el ectodermo dorsal. Las flechas gruesas indican inducción y las delgadas mantenimiento. Tomado de (Gilbert, 2003).

Es así que durante el desarrollo de la extremidad, como se ha visto hasta ahora, existen distintos tipos celulares que dan origen a diferentes tejidos, diferentes partes anatómicas, o como veremos, también presentan un proceso de muerte celular. Todos estos procesos dependen de la posición y la historia de cada uno de los linajes celulares. De forma que el balance entre distintos procesos celulares, por mencionar algunos, como la proliferación, la diferenciación, la migración e inclusive la

muerte celular, determinan el destino de cada linaje, así como el número de células que conforman cada porción de la extremidad.

De forma general, en el desarrollo tardío de la extremidad las células de la zona de progreso tienen dos destinos celulares; uno es el proceso de formación del esqueleto y otro es la muerte celular programada. El balance y/o la coordinación entre ambos procesos puede ser el que esté determinando la posición, la forma y el número de elementos en la extremidad.

Formación del Esqueleto Apéndice

En la etapa adulta de cualquier tetrápodo el esqueleto apéndice, es decir, los elementos esqueléticos de las extremidades, están compuestos por huesos, los cuales

están unidos por articulaciones de cartílago. Durante la formación embrionaria del esqueleto apendicular la condrogénesis desempeña un papel importante en su desarrollo, es a partir de este proceso por el cual los elementos esqueléticos se forman.

En las etapas iniciales de formación el esqueleto apendicular se compone de cartílago y conforme avanza el desarrollo, a manera de molde, el cartílago lleva a cabo un proceso de diferenciación, mineralización y de reemplazo de las células de cartílago por células de hueso, a este proceso lo conocemos como osificación endocondral.

Dada la importancia de la condrogénesis durante la morfogénesis de los elementos esqueléticos, incluidos los dedos, es necesario mencionar cuales son los principales mecanismos celulares y moleculares que ocurren durante este proceso.

El primer paso durante la condrogénesis es la agregación celular o condensación de células del mesénquima con potencial condrogenico (Fig. 6) (Thorogood y Hinchliffe,

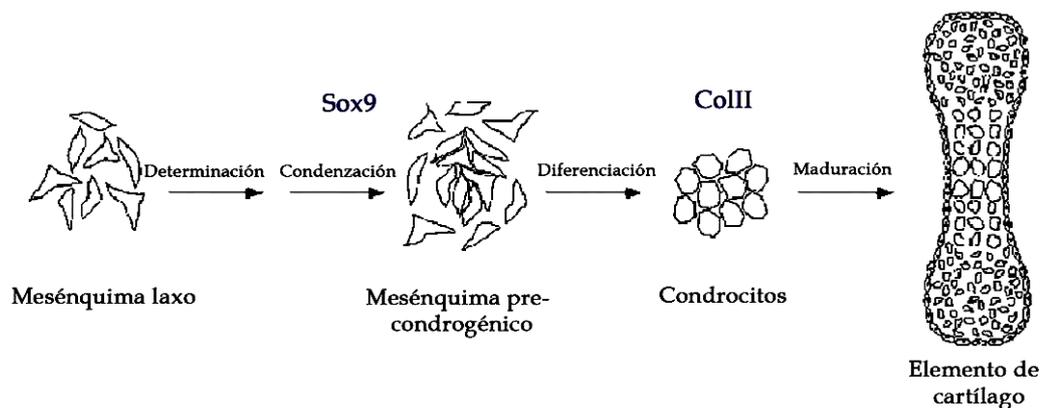


Figura 6. Principales eventos celulares durante la condrogénesis. El primer paso es la condensación del mesénquima laxo, durante la condensación se expresa *Sox9*. En seguida las células agregadas o precondrogenicas, se diferencian a condrocitos que expresan *ColII*. El siguiente paso es la maduración del cartílago en el elemento esquelético. Tomado de (Pizette y Niswander, 2000)

1975). Esta condensación está asociada al incremento de interacciones célula-célula y

célula-matriz, como resultado al incremento de moléculas de adhesión celular como N-caderina y N-CAM (Oberlender y Tuan, 1994). Estas condensaciones celulares se diferencian en condrocitos que adquieren una morfología poligonal, pierden contactos célula-célula y secretan abundante matriz extracelular con un alto contenido de Colágena tipo II (ColII) la cual se considera exclusiva del cartílago, también es rica en proteoglicanos, como el agregano (Fig. 6).

Los condrocitos se diferencian desde el centro de la condensación hacia la periferia, las células tipo fibroblastoide de la periferia conforman una capa que recubre el cartílago la cual llamamos pericondrio, éste es un centro de señalización que contribuye con el crecimiento del elemento esquelético. Los siguientes estados en la diferenciación de los condrocitos incluyen proliferación, maduración e hipertrofia. Es en la hipertrofia cuando las células sintetizan otro tipo de matriz extracelular rica en Colágena X (ColX). Se calcifica la matriz con la subsiguiente invasión por vasos sanguíneos y el reemplazo de los condrocitos apoptóticos por células precursoras de hueso.

El papel de Sox9 durante la condrogénesis

Se sabe que existe un control temporal y espacial en cada uno de los estados de diferenciación durante la osificación endocondral. Un factor de transcripción que juega un papel importante en el inicio de la condensación es *Sox9*. En la extremidad *Sox9* se expresa en las áreas prospectivas a la formación del esqueleto de cartílago y mantiene su expresión hasta la formación del cartílago hipertrófico. También es conocido como el gen maestro de la condrogénesis, porque al sobreexpresarlo es suficiente para inducir la condensación y diferenciación de las células de mesénquima hacia cartílago.

Por otro lado, el ratón mutante del gen *Sox9* carece de cartílago (Bi, *et al.*, 1999; Healy, *et al.*, 1999), confirmando su importancia durante la formación del cartílago.

Un sistema experimental que permite recapitular la formación de cartílago *in vivo* es la aplicación del Factor de Crecimiento Transformante β (TGF β) en el interdígito del pollo induciendo la formación de dedos ectópicos, además, *Tgf β 2* se expresa en los dedos desde etapas muy

tempranas, sugiriendo que puede estar participando en su formación (Gañan, *et al.*, 1996). De esta forma se caracterizó la cascada molecular relacionada a la condrogénesis. En resumen, se describió a *Sox9* como el

gen más temprano que se expresa durante la cascada

molecular, al iniciar su expresión 30 min. después de aplicar TGF β . Además, el marcador de cartílago ColII se observa hasta las 12 h después del tratamiento (Chimal-Monroy, *et al.*, 2003) y el gen del factor de crecimiento Activina β a (*Act β a*), el cual se expresa en la punta de los dedos (Merino, *et al.*, 1999a), se observa a las 20 h después de aplicar TGF β en el interdígito (comunicación personal Chimal-Monroy) (Fig. 7). En resumen estos resultados proponen a *Sox9* como el gen que participa inicialmente en la condrogénesis, a *ColIII* como un marcador condrogénico intermedio y a *Act β a* como un marcador tardío en la condrogénesis.

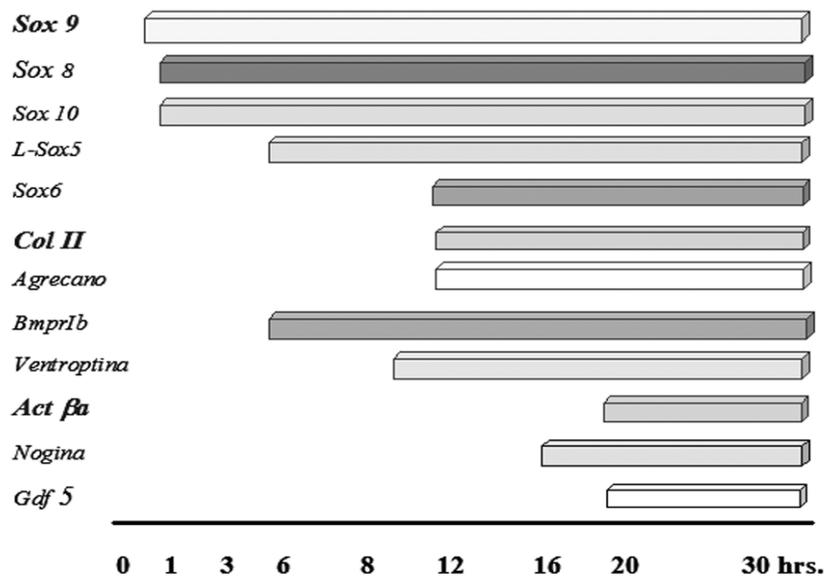


Figura 7. Representación grafica de la inducción de diferentes genes después de aplicar TGF β 1 en el tercer interdígito en estadio 28 HH. en el eje x se muestra el tiempo en horas y en y los nombres de los genes (modificada de Chimal-Monroy *et al.* 2003)

Muerte Celular Programada en la extremidad

Ya se mencionó que las células de la zona de progreso se diferencian o mueren por apoptosis. La apoptosis durante el desarrollo embrionario es de suma importancia ya que esculpe la forma final de la extremidad.

A lo largo del desarrollo de la extremidad del embrión de pollo presenta varias zonas en donde ocurre muerte celular programada por apoptosis. La Zona Necrótica Anterior (ANZ, por sus siglas en inglés) y la Zona Necrótica Posterior (PNZ, por sus

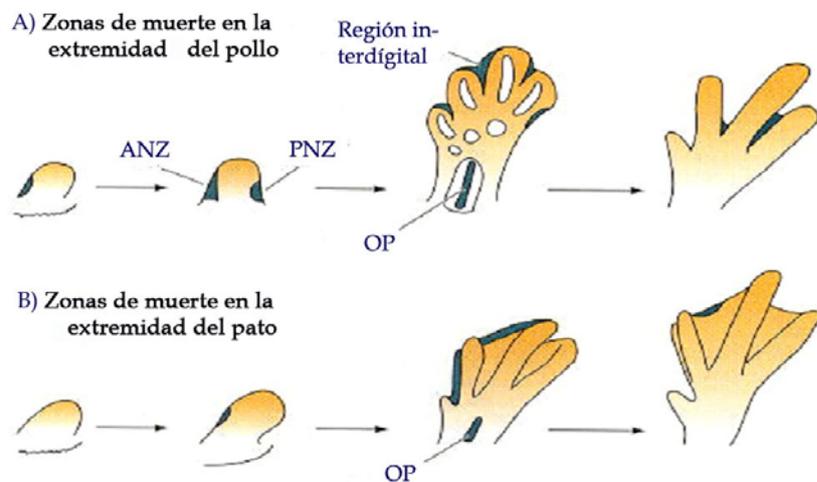


Figura 8. Comparación esquemática de las áreas de muerte celular (en azul oscuro) del pollo (A) y del pato (B) durante su desarrollo. Tomada de (Gilbert 2003)

siglas en inglés) son áreas que rodean el borde anterior y posterior, respectivamente, del primordio de la extremidad (Fig. 8).

La eliminación de estas células por apoptosis podría estar

controlando el número de dedos en las aves, por ejemplo, el pollo mutante *talpid3* presenta polidactilias y carece de estas áreas de muerte celular (Hinchliffe y Thorogood, 1974). De igual forma, en mamíferos que presentan pentadactilia carecen de una de estas áreas de apoptosis. El parche opaco (OP, por sus siglas en inglés) es otra zona en el mesénquima central de la extremidad en donde ocurre apoptosis que tal vez, permite la separación de la ulna y el radio en las extremidades anteriores de

aves y mamíferos, consistente con esto el mutante *talpid3* también carece del OP, exhibiendo fusión de estos dos elementos (Hinchliffe y Thorogood, 1974).

Los interdígitos, que como su nombre lo indica se encuentran entre los dedos, también presentan apoptosis y dependiendo de la especie se eliminan parcial o completamente por este proceso (Fig. 8). En las especies con dedos separados como el pollo, el lagarto, el ratón y el humano la apoptosis se extiende en todo el espacio interdigital (Pautou, 1975; Fallon y Cameron, 1977). En cambio en el pato o la tortuga, que presentan patas palmeadas, la apoptosis solo ocurre en la parte distal del interdígito (Pautou, 1974; Fallon y Cameron, 1977).

En la AER también se ha observado que la apoptosis juega un papel importante sobretodo regulando su tamaño, y de esta forma la AER lleva acabo adecuadamente su función en el desarrollo de la extremidad. El incremento en la muerte de las células de la AER resulta en el truncamiento parcial o total de la extremidad (Seto, *et al.*, 1997), lo que ocurre de manera natural en las serpientes (Raynaud, 1990).

Por otra parte, se ha reportado que si aumenta la muerte cuando ocurre la formación de los dedos hay una reducción en su número; o si se inhibe la muerte hay polidactilias (Chen y Zhao, 1998). Todo esto evidencia el papel esencial que tiene la apoptosis durante la morfogénesis de las extremidades.

Las BMP promueven la apoptosis en los interdígitos

Entre las moléculas solubles que regulan la apoptosis en la extremidad están las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP, por sus siglas en ingles) llamadas así porque al ser colocadas subcutáneamente en ratas adultas inducen a las células a formar hueso. Los genes de *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp5* y *Bmp7* se expresan en la ANZ, PNZ y en el interdígito sugiriendo la posible participación de estas en el destino apoptótico de estos

tejidos (Zou y Niswander, 1996; Laufer, *et al.*, 1997; Zuzarte-Luis, *et al.*, 2004). La aplicación de BMP en el interdígito resulta en la aceleración de la apoptosis (Gañan, *et al.*, 1996; Yokouchi, *et al.*, 1996; Macias, *et al.*, 1997) y a su vez la aplicación de antagonistas de BMP, como Nogina o Gremlin en el interdígito resulta en la inhibición de la apoptosis (Merino, *et al.*, 1998; Merino, *et al.*, 1999b). En el pato se ha visto que Gremlin se expresa en casi todo el interdígito e inhibe la apoptosis promovida por las BMP (Merino, *et al.*, 1999b). Además, en el ratón mutante de *Bmp7* presenta sindactilias y polidactilias, probablemente como consecuencia de la inhibición de la apoptosis (Hofmann, *et al.*, 1996).

Las BMP también participan en el control de la condrogénesis puesto que la sobreexpresión de las formas dominantes negativas de BMPR1a (Alk3) y de BMPR1b (Alk6) en extremidades embrionarias de pollo resulta en el truncamiento de los dedos, así como en la inhibición de la muerte, dependiendo de la región en donde se transfecten (Yokouchi, *et al.*, 1996; Zou y Niswander, 1996). Además, la sobreexpresión de las formas constitutivas activas de estos receptores produce engrosamiento de los elementos esqueléticos y solo en el caso de BMPR1b se acelera la muerte interdigital (Zou, *et al.*, 1997). Confirmando el papel de las BMP, tanto en la muerte interdigital como en el crecimiento y diferenciación del cartílago.

A pesar de que la sobreexpresión de ambos receptores, en su forma dominante negativa, inhiben la apoptosis interdigital, los patrones de expresión de los genes que codifican para estos receptores no coinciden con las áreas de muerte. *Bmpr1b* se localiza en las regiones condrogénicas, mientras que *Bmpr1a* se expresa en la parte más distal de la extremidad subyacente a la AER (Merino, *et al.*, 1998) y posteriormente en las células prehipertróficas del cartílago (Zou, *et al.*, 1997). En la

cascada molecular relacionada a la condrogénesis inducida por TGF β en el interdígito *Bmpr1b* es inducido a las 6 h (Chimal-Monroy, *et al.*, 2003), lo que indica que este receptor participa en la diferenciación del cartílago. Estos resultados descartan que estos receptores sean por los cuales las BMP promueven la muerte celular en el interdígito, y aunque no se conoce el receptor por el que las BMP actúan en el interdígito, es probable que las distintas respuestas dependan del receptor que expresan y de la posición en que se encuentran las células del autópodo destinadas a diferenciarse o morir.

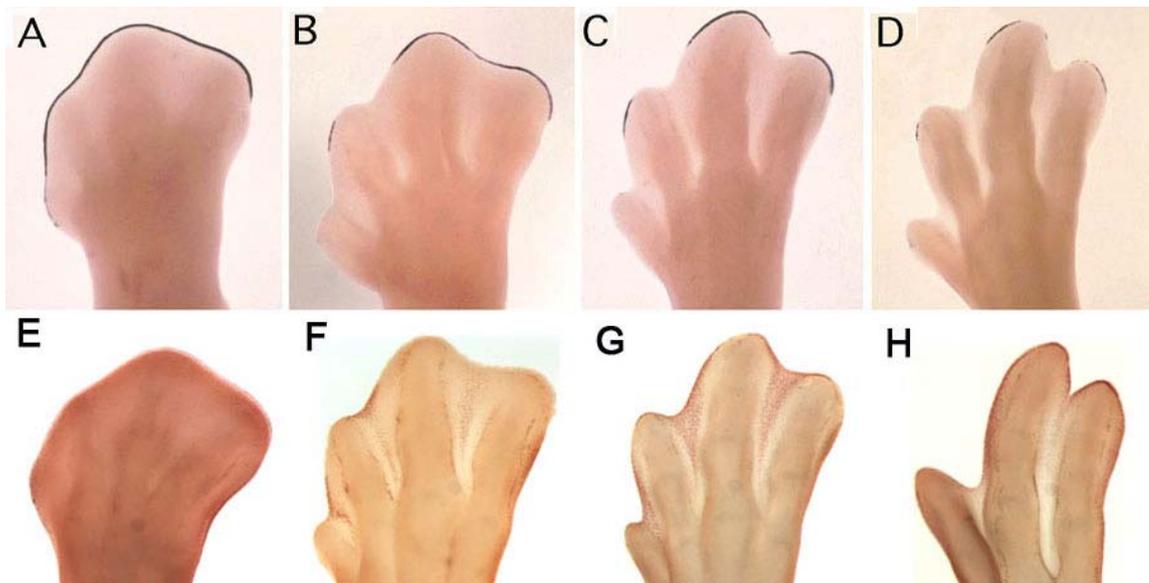


Figura 9. Correlación entre la ausencia de Fgf8 en la AER del interdígito y la presencia de muerte celular en la parte distal del interdígito. **A-D** expresión de Fgf8, **E-H** tinción de rojo neutro evidenciando las áreas de muerte celular en el autópodo. **A, E:** estadio 29 HH; **B, F:** estadio 30 HH; **C, G:** estadio 32 y **D, H:** estadio 33 HH. Hibridaciones *in situ* tomadas de (Gañan, *et al.*, 1998)

Interrelación entre FGF y BMP durante el control de la apoptosis

El crecimiento P-D de la extremidad está estrechamente relacionado con el control de la muerte celular en los interdígito. FGF8 juega un papel importante en este control, puesto que al anular su expresión durante el crecimiento de la extremidad ésta se

trunca, además, de presentarse una apoptosis masiva (Sun, *et al.*, 2002), sugiriendo que *Fgf8* tiene un papel importante en la sobrevivencia celular. Aunado a esto, el inicio de la apoptosis de los interdígitos coincide con la ausencia en la expresión de *Fgf8* en la AER (Fig. 9), además, al inducir apoptosis colocando BMP en el interdígito la expresión de *Fgf8* desaparece 6 h después (Gañan, *et al.*, 1998). Así mismo, si se coloca BMP en la punta del dedo *Fgf8* desaparece a las 4 h (Dahn y Fallon, 1999).

Sin embargo, la aplicación de FGF en el interdígito promueve dos efectos, el primero entre 10 y 12 h en el que la muerte se inhibe estos datos sugieren que los FGF promueven la sobrevivencia celular al inhibir la apoptosis en tiempos cortos. El segundo efecto en donde la muerte se induce posterior a las 20 h de la aplicación de FGF, este efecto inductor de apoptosis no ocurre si se aplica al mismo tiempo Nogina o Gremlin, antagonistas de BMP. Por otro lado, al inhibir la señalización de FGF en el interdígito se bloquea la apoptosis inducida por BMP (Montero, *et al.*, 2001) indicando que FGF permite que las células del interdígito respondan a la apoptosis inducida por BMP.

Participación de *Msx1* y *Msx2* en el control de la apoptosis interdigital

Existen otros genes que pueden estar participando en la muerte interdigital son los factores de transcripción *Msx1* y *Msx2*. Ambos se expresan en la AER, en la Zona de Progreso, en ANZ, PNZ y en los interdígitos tanto en el pollo como en el ratón (Fig. 10 I) (Yokouchi, *et al.*, 1991). Se a observado que al transfectar *Msx2* en el mesénquima indiferenciado de primordios de pollo se induce apoptosis y se inhibe la proliferación celular (Ferrari, *et al.*, 1998). Por otra parte, el ratón doble "Knockout" (KO) de *Msx1* y *Msx2* presentan tanto sindactilia como polidactilia (Lallemand, *et al.*, 2005). Estos

resultados sugirieren la participación de estos genes en el control de la apoptosis interdigital.

También se ha visto que existe una correlación entre la apoptosis inducida por BMP y la expresión de *Msx1* y *Msx2*, puesto que al colocar BMP7 en el interdígito del pollo la expresión de los dos genes se induce (Gañan, *et al.*, 1998). En el ratón, reducen su expresión cuando se elimina *Bmp7* (Hofmann, *et al.*, 1996). Aunque no se conoce la cascada molecular de la apoptosis en los interdígitos probablemente los Msx se encuentran por debajo de BMP en la cascada.

El Papel Dual del Ácido Retinoico durante la Regulación de la Apoptosis y la Condrogénesis

El Ácido Retinoico (AR) es una molécula liposoluble derivada de la vitamina A, en el interdígito es sintetizado por RALDH2 y su receptor RAR β 2 también se expresa en el interdígito (Dolle, *et al.*, 1989). El AR puede estar jugando un papel importante promoviendo la apoptosis interdigital. Por ejemplo, en el mutante *Hammertoe* la apoptosis interdigital no ocurre y la administración de ácido retinoico en hembras preñadas rescata el fenotipo (Ahuja, *et al.*, 1997). Por otro lado, la eliminación de los receptores del AR γ y β 2 (RAR γ y RAR β 2) resulta en sindactilias y polidactilias, entre otros defectos en el esqueleto (Lohnes, *et al.*, 1994; Dupe, *et al.*, 1999), a causa de la inhibición de la apoptosis. Estos resultados sugieren la participación del AR en la muerte interdigital.

En el embrión del pollo se demostró el papel del AR en la apoptosis interdigital, puesto que, al aplicar AR en el interdígito se acelera la apoptosis acompañada de la inducción en la expresión de *Bmp7*. Por otra parte, al colocar el antagonista del AR (AAR) en el interdígito la muerte se inhibe, y la expresión de *Msx2* se inhibe. Además,

al colocar AR y al mismo tiempo un antagonista de BMP como Nogina o Gremlin en el interdígito, se inhibe el efecto promotor de la apoptosis del AR lo cual no ocurre si hacemos el experimento contrario, es decir, colocar BMP y el antagonista de AR (Fig. 10). De esta forma sabemos que el AR promueve apoptosis a través de BMP (Rodríguez-León, *et al.*, 1999).

Es interesante observar que al mantener la inhibición de AR por más tiempo, es decir aplicando otra perla del AAR, 16 h después se forma un dedo sugiriendo que el AR también está inhibiendo la condrogénesis, por lo tanto, evaluaron el efecto del AR en la punta del dedo, resultando en un truncamiento de éste e inducción de apoptosis

en el mesénquima indiferenciado, con aumento en el dominio de expresión de *Msx2* (Rodríguez-León, *et al.*, 1999) (Fig. 10). Afirmando la idea que el AR es un inhibidor de la condrogénesis, pero no queda claro el mecanismo de inhibición.

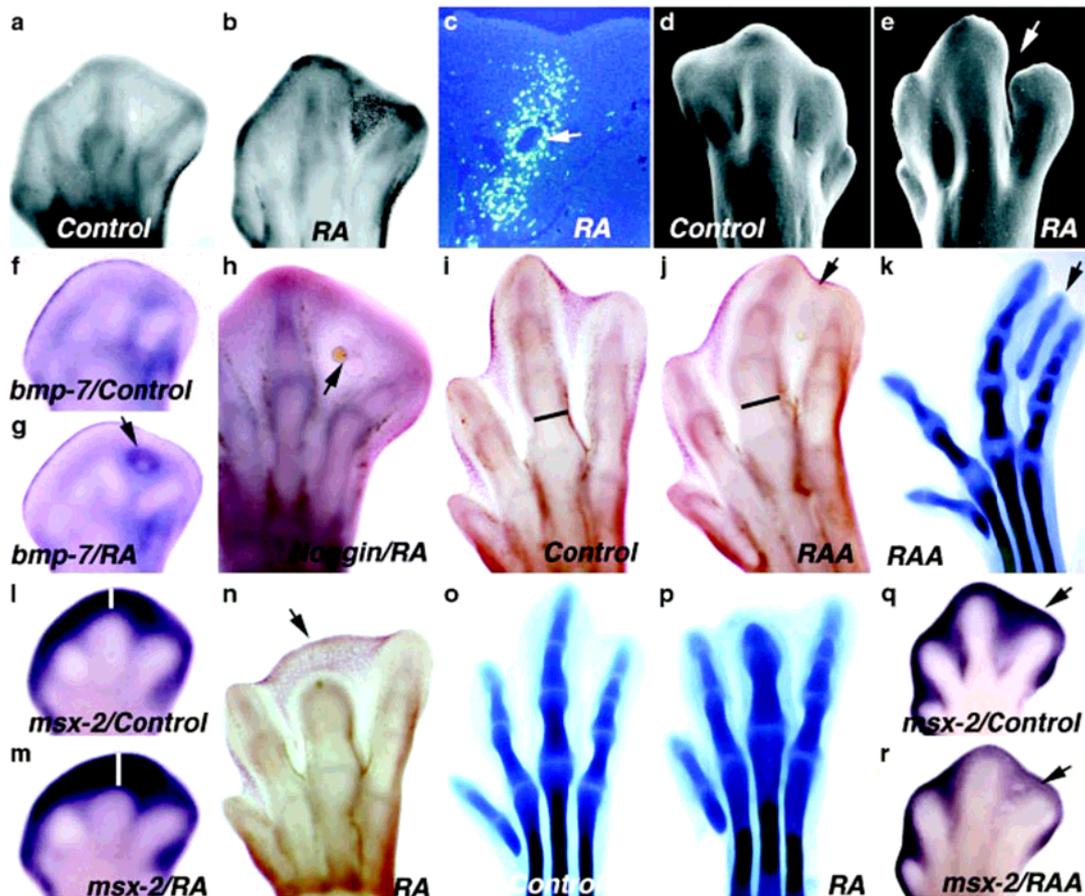


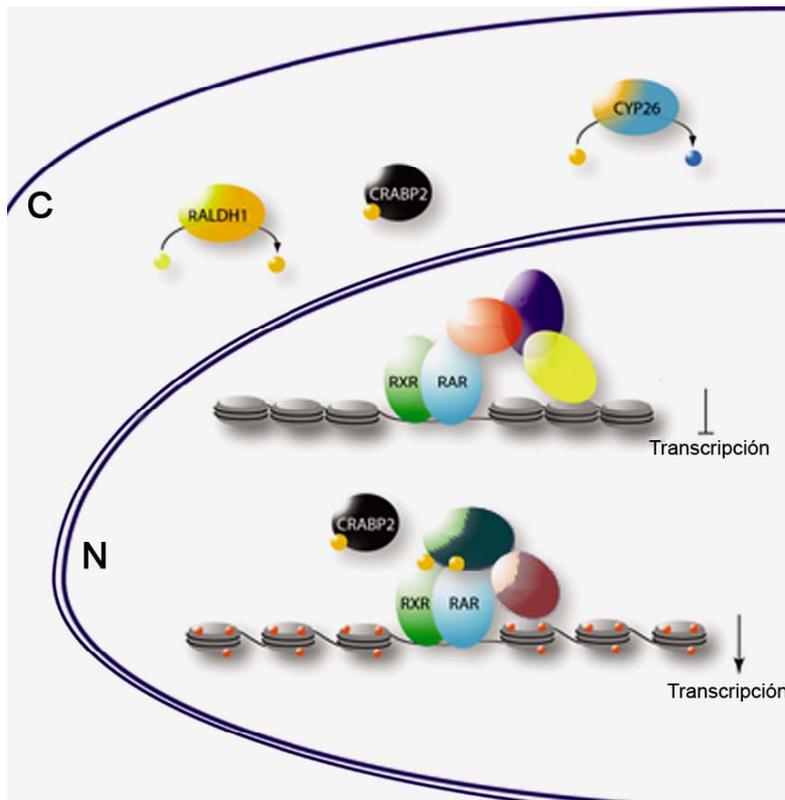
Figura 10. Efecto del AR y del antagonista del AR durante el desarrollo tardío de la extremidad del embrión de pollo. **a y b:** Tinción con rojo neutro 15 h después de aplicar AR en el interdígito. **c:** Células apoptóticas detectadas con TUNEL 15 h después de tratamiento, la flecha indica la perla con AR. **d y e:** Micrografías electrónicas de barrido que muestran la regresión del interdígito (flecha) después del tratamiento con AR. **f y g:** Inducción de la expresión de *Bmp7* por AR en el interdígito. **h:** inhibición de la apoptosis promovida por el AR después de la implantación de otra perla con Nogina. **i y j:** Inhibición de la apoptosis por el antagonista de AR (RAA) 72 h después del tratamiento. **k:** inducción de un dedo ectópico al aplicar una segunda perla 16 h después de haber aplicado la primera. **l y m:** Hibridación *in situ* de *Msx2* mostrando que el dominio de expresión se amplía después del tratamiento con AR en la punta del dedo, comparar las líneas. **n:** Tinción con rojo neutro mostrando áreas de muerte celular promovida por el AR (flecha) en la punta del dedo. **o y p:** El dedo tres se trunca después de implantar una perla con AR en la punta del dedo. **q y r:** inhibición de la expresión de *Msx2* en el interdígito 10 h después de implantar secuencialmente dos perlas con el RAA en el interdígito. Tomada de (Rodríguez-León, *et al.* 1999)

Vía de Señalización del Ácido Retinoico

La vía de señalización del AR, y de los retinoides en general, es sumamente versátil y compleja, se sabe que los retinoides se unen a receptores nucleares específicos que son miembros de la superfamilia de los receptores nucleares hormonales, presentan cinco dominios muy conservados y sobre todo con una alta homología en los dominios de unión al DNA y de unión al ligando. Existen dos tipos de receptores: Receptores de Ácido Retinoico (RAR, por sus siglas en inglés) y Receptor de Retinoides X (RXR), se conocen tres isoformas principales generadas por empalme alternativo para cada tipo de receptor: RAR α , β , γ y RXR α , β y γ . Estos receptores pueden formar homodímeros (RAR-RAR, RXR-RXR) o heterodímeros (RAR-RXR) y así unirse a secuencias específicas del DNA regulando la transcripción, estas secuencias se conocen como Elementos de Respuesta a Ácido Retinoico o Elementos de Respuesta a Retinoides X, abreviados RARE ó RXRE respectivamente (Heyman, *et al.*, 1992; Kliewer, *et al.*, 1992; Levin, *et al.*, 1992; Allenby, *et al.*, 1993).

El AR presenta dos conformaciones la *todo-trans*-ácido retinoico y la *9-cis*-ácido retinoico, ambas se encuentran en las células pero la *todo-trans*-ácido retinoico es más estable y abundante. Las dos conformaciones pueden unirse con gran afinidad a los RAR pero solo *9-cis*-ácido retinoico se une a RXR. Estos receptores en ausencia del ligando se unen a un complejo co-represor y como resultado la transcripción no ocurre. Cuando el ligando se une a los receptores se genera un cambio conformacional, se desprende del complejo represor y se une a un complejo activador que promueve la transcripción de genes blanco que presentan sitios de reconocimiento en sus promotores, es decir, RARE ó RXRE (Gottlicher, *et al.*, 1998; Weston, *et al.*, 2003).

Existen otras proteínas involucradas en la vía que son las llamadas Proteínas Citoplasmáticas de Unión al Ácido Retinoico (CRABP1 y CRABP2), no está del todo claro la función que llevan a cabo en el desarrollo, puesto que al parecer en los mutantes no hay un efecto evidente (Gorry, *et al.*, 1994; Lampron, *et al.*, 1995). Sin embargo, se piensa que regulan la concentración intracelular disponible de AR secuestrándolo y



previniendo que se acumule en el núcleo de la célula (Weston, *et al.*, 2003).

No obstante, se sabe que el control en los niveles de AR en las células está regulado por la actividad de dos grupos de enzimas: la

Retinaldehido

Deshidrogenasa (RALDH) y CYP26 (P450RA), éstas lo sintetizan o lo degradan, respectivamente.

Mediante una reacción

Figura 11. Vía de señalización de AR. La síntesis del AR (esferas amarillas) es llevada a cabo por la RALDH. En el citoplasma las CRABP se unen al AR y pueden funcionar como un transporte llevando el AR hacia los receptores nucleares (RAR y RXR) y posiblemente regulando la disponibilidad de AR. Sin embargo, CYP26 en el citoplasma degrada al AR y evitando que pueda señalizar a través de esta vía. Los receptores nucleares pueden formar heterodímeros u homodímeros entre ellos, en ausencia del ligando se unen a un complejo represor de la transcripción. Cuando el ligando se une a los receptores se genera un cambio conformacional y se forma un complejo activador de la transcripción. (Weston, *et al.*, 2003)

de oxidación a partir de retinaldeído, tres enzimas (RALDH1, RALDH2 y RALDH3) sintetizan el AR, de estas tres, RALDH2 parece ser la más importante durante el

desarrollo embrionario, puesto que, se expresa más temprano, con un dominio más amplio y se sabe, por estudios enzimáticos, produce la mayor cantidad de AR en el tronco del embrión (Niederreither, *et al.*, 1997). La prueba más convincente de la importancia de RALHD2 está en el ratón nulo de esta enzima, el cual muere muy temprano en el desarrollo embrionario y presenta múltiples defectos en el tronco, en el tubo neural y en el corazón (Niederreither, *et al.*, 2000; Niederreither, *et al.*, 2001). Por otra parte, si se suministra un suplemento alimenticio de AR a la madre de los ratones mutantes los embriones sobreviven por más tiempo permitiendo observar los efectos de la ausencia de la síntesis del AR en las extremidades dependiendo de la dosis y el tiempo de administración, de 7.5 a 8.5 dpc los mutantes presentan hipoplasia y pérdida del establecimiento anteroposterior, si se suministra por más tiempo, hasta 10.5 dpc y a mayor concentración, los ratones presentan polidactilia (Niederreither, *et al.*, 2002b).

Por otra parte, se han identificado dos enzimas la CYP26a1 y la CYP26b1 (White, *et al.*, 1997) que convierten el AR en 4-oxo y 4-hidroxi-ácido retinoico, los cuales no están involucrados en la señalización del AR (Niederreither, *et al.*, 2002a). De esta forma CYP26 tiene un papel importante en regular la distribución del AR durante el desarrollo, en el mutante de *Cyp26a1* aumenta la concentración del AR, presentando diversos efectos como exencefalia, espina bifida, el cuerpo posterior está truncado, entre otros (Abu-Abed, *et al.*, 2001; Sakai, *et al.*, 2001). Esto sugiere la importancia en el control de la concentración de AR por CYP26 durante el desarrollo embrionario.

Planteamiento del Problema

Durante la formación del autópodo las células de mesénquima se diferencian a cartílago formando los dedos en regiones específicas. Por otro lado, el espacio entre cada dedo conocido como interdígito, en determinado momento muere por apoptosis (Hurle, *et al.*, 1995). Sin embargo, este interdígito tiene la capacidad de diferenciarse en células de cartílago y formar dedos ectópicos (Gañan, *et al.*, 1996), sugiriendo que existen señales, o algún mecanismo, por el cual se inhibe la formación de cartílago y se induce la apoptosis en estas regiones, el cual se desconoce.

Un candidato que puede estar regulando la apoptosis y la condrogénesis interdigital es el ácido retinoico (AR), puesto que es la molécula conocida que actúa inicialmente en el proceso de apoptosis interdigital e inhibición de cartílago, ya que al aplicarlo en el interdígito acelera la muerte y al inhibirlo se forman dedos ectópicos. Además, cuando el AR se coloca en la punta del dedo, éste se trunca y el mesénquima indiferenciado muere por apoptosis (Rodríguez-León, *et al.*, 1999). Esto nos sugiere que el AR puede estar participando en la inhibición del cartílago en el interdígito, así como en la inducción de la apoptosis en células indiferenciadas. Sin embargo, se desconoce como es la regulación temporal de las señales condrogénicas y apoptóticas por el AR en el desarrollo del autópodo.

Un sistema experimental que permite evaluar la regulación de las señales condrogénicas y apoptóticas por el AR al mismo tiempo, es la aplicación de éste en la punta del dedo en el estadio 27-28 HH del embrión de pollo.

Hipótesis

El Ácido Retinoico regula negativamente la condrogénesis a través de inhibir la expresión de *Sox9* e induce tempranamente la expresión de señales que participan en el proceso de apoptosis, como *Bmp7*, cuando se aplica en la punta del dedo.

Objetivo

Determinar como el Ácido Retinoico regula señales condrogénicas tempranas (*Sox9*) y tardías (*ColIII* y *Actβa*), así como señales involucradas en la apoptosis (*Bmp7*, *Msx2* y *Fgf8*) en diferentes tiempos cuando se aplica en la punta del dedo tres del embrión de pollo en estadio 27-28 HH.

Materiales y Métodos

Preparación de Perlas con Ácido Retinoico (AR)

Se utilizan perlas de intercambio iónico AG1-X2 en acetato (Bio-Rad Cat. 140-1253), de aproximadamente 200-250 μm , éstas se colocaron en un microtubo con *todo-trans*-ácido retinoico (Sigma Cat. R2625) en DMSO a una concentración de 5 mg/mL, durante 1 hora en agitación. Posteriormente se centrifugaron por aproximadamente 10 segundos a 8000 rpm, se retiró la solución de AR y se tiñeron con 500 μL de Rojo Fenol/PBS (10 mL de PBS se le agregan 50 μL de solución de Rojo Fenol a 2 mg/mL en etanol) en agitación durante 10 min. se centrifugó y se retiró la solución, en seguida, se lavaron con PBS durante 5 min. al término, se pasaron a una caja húmeda. Todo se hizo en condiciones de oscuridad por el mayor tiempo posible (Eichele, *et al.*, 1985; Tickle, *et al.*, 1985; Wedden, *et al.*, 1990).

Manipulación de los Embriones

Se utilizaron huevos fértiles ALPES II (Aves Libres de Patógenos Específicos) incubados a 37 °C y 70% humedad relativa. Los embriones se operaron en estadio 27-28 HH (Hamburger y Hamilton, 1951) de la siguiente forma: bajo el microscopio estereoscópico, con unas pinzas del número 5, se manipularon hasta descubrir y retirar el amnios sobre la extremidad derecha, en ésta se hizo un orificio con una lanceta muy afilada de tungsteno en la punta del dedo tres, una vez hecho esto; nuevamente con las pinzas se tomó una perla y se introdujo en el orificio. Por último, se selló la ventana hecha en el cascarón del huevo con cinta adhesiva transparente, se metieron en la incubadora y se sacaron a los 30 min., 1, 2, 4, 6, 12, 16, 18, 24 y 48 horas después

para su análisis con tinción de esqueleto, tinción con rojo neutro o se fijaron en PFA 4% para hibridación *in situ*.

Transformación de Bacterias

La transformación se hace con la finalidad de introducir un plásmido al citoplasma de las bacterias, las cuales lo multiplican al crecer en un medio complejo o nutritivo, como el LB (Luria-Bertani).

Se utilizan bacterias químicamente competentes de *Escherichia coli* DH5 α y se incuban durante 20 minutos en hielo con 1-2 μ L de plásmido, preferentemente a 1 μ g/ μ L y que contenga en su secuencia un gen de resistencia a ampicilina. Se les aplica un choque térmico de 90 seg. a 42 °C y se colocan inmediatamente en hielo. Posteriormente se siembran en medio LB con agar y ampicilina, se dejan incubar durante toda la noche a 37 °C.

Las bacterias transformadas crecerán en forma de colonias, de las cuales se toma una y se resiembró en 100 mL de LB líquido, después, se dejan en agitación de 200-300 rpm a 37 °C toda la noche. Cuando el cultivo esté en fase estacionaria se prosigue a realizar la purificación de DNA a gran escala.

Purificación de Plásmido

Esta técnica se hace con el propósito de extraer y purificar el plásmido de las bacterias. La técnica se realizó utilizando y siguiendo el protocolo proporcionado por el estuche de preparación de DNA a gran escala o "*maxi-prep*" de Marligen (Cat. 11452-026)

Preparación de Sondas

Las sondas son secuencias marcadas de RNA complementarias a la secuencia de nucleótidos del mensajero del gen de interés y se obtienen por transcripción de RNA *in vitro*. Por lo tanto nos sirven, en la técnica de hibridación *in situ*, para evidenciar el patrón de expresión de algún gen.

Previo a la síntesis *in vitro* de RNA es necesario tener un plásmido en forma lineal, por lo tanto, se realizó una reacción de restricción con 20 µL de cada uno de los diferentes plásmidos a una concentración de 1 µg/µL, agregando 22.5 µL de H₂O estéril, 5 µL de amortiguador 5X de la enzima utilizada y 2.5 µL de enzima. Las enzimas utilizadas para cada plásmido son: BamH1 (New England Biolabs Cat. R01365): *Sox9* y *ColII*; Xho1 (New England Biolabs Cat. R01465): *Bmp7*; Not1 (New England Biolabs Cat. R0189S): *Fgf8*; Pst1 (New England Biolabs Cat. R0140S): *Actβ* y Xba1 (New England Biolabs Cat. R0145S): *Msx2*.

Esta mezcla se incubó durante 2 h a 37 °C, una vez transcurrido el tiempo, el DNA se precipitó toda la noche a -70 °C, agregándole antes 125 µL de etanol 100% y 5 µL de acetato de sodio, al día siguiente se centrifugó a 14,000 rpm 25 min. 4 °C, se decantó y se agregó 1 mL de etanol 70%, se centrifugó 10 min. 14,000 rpm a 4 °C y se retiró el sobrenadante. Por último, se agregaron 7 µL de H₂O estéril.

Con la finalidad de sintetizar la sonda de RNA *in vitro* se agregó en otro micro tubo los siguientes reactivos: 5 µL de H₂O estéril, 4 µL de Amortiguador de transcripción 5X (Promega Cat. P1181), 1 µL de DTT 100 mM (Cat. P1171), 3.6 µL de una mezcla de ATP+CTP+GTP (Promega, Cat. P1132, Cat. P1142 y Cat. P1152, respectivamente), 1.6 µL de UTP (Cat. P1162), 0.8 µL de UTP-Digoxigenina (Roche. Cat. 11 209 256 910), 2 µL del plásmido cortado, 1 µL de inhibidor de RNAasa (Cat. N2611) y 1 µL de RNA

polimerasa: T7 (Promega Cat. P2075) para *ActβA* y *Msx2* ó T3 (Promega Cat. P2083) para *Bmp7*, *ColII*, *Fgf8* y *Sox9*. Se dejaron incubando a 37 °C durante 2 h. Posteriormente, se precipitan a -70 °C toda la noche, agregando a la reacción: 3 µL de tRNA [10mg/mL], 200 µL de TE (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8), 12 µL de Acetato de sodio 3M, 300 µL de Etanol 100%. Después, se centrifugaron a 14,000 rpm 20 min. 4°C, se decantó, se agregó 1 mL de etanol 70%, se centrifugó a 14,000 rpm 10 min. 4 °C, se decanta nuevamente y por último se resuspendió en 30 µL de H₂O DPEC.

Hibridación *in situ* en Órgano Completo

Esta técnica se utiliza para poder ver el patrón de expresión de algún gen en particular, por medio de una sonda marcada y complementaria al RNA mensajero del gen particular.

Primer día: Pretratamiento e hibridación: Se fijaron las partes caudales de los embriones en PFA 4% a 4 °C toda la noche, después se lavaron 5 min. en PBT (PBS + 0.1% de Tween-20) a 4 °C, se deshidrataron en soluciones de metanol/PBT a las siguientes concentraciones: 25, 50, 75% por 5 min. cada una a temperatura ambiente, después dos veces en metanol 100% (JT-Baker, USA) por 10 min. Se almacenaron a -20 °C.

Posteriormente para empezar la hibridación se rehidrataron con las mismas soluciones de metanol/PBT pero en sentido inverso, es decir, 100, 75, 50 y 25%. Se lavaron dos veces en PBT 5 min. Después se trataron con peróxido de hidrogeno (H₂O₂) 6% en PBT por 1 hora en oscuridad, se lavaron tres veces 5 min. a temperatura ambiente con PBT. Subsecuentemente se permeabilizó el tejido incubando con proteinasa K (PK). La temperatura, tiempo y concentración varían dependiendo de las condiciones previamente establecidas para cada gen, las cuales se resumen en la Tabla 1.

Después del tratamiento con la PK se fijaron durante 20 min. con PFA 4%+ 0.2% de Glutaraldehido al 25% a temperatura ambiente. A continuación se lavaron 2 veces 5 min. con PBT. Se pasaron a microtubos y se ponen a prehibridar en amortiguador de hibridación (50% formamida, 5x SSC pH 5, 50 µg/mL tRNA, 1% SDS y 50 µg/mL de heparina) 3 horas a 65 °C. Transcurrido el tiempo, se retiró el amortiguador de hibridación y se añadieron 500 µL de sonda 1:100 en amortiguador de hibridación, se dejó incubando toda la noche a 65 °C.

Tabla 1. Condiciones de PK utilizadas de cada uno de los mensajeros analizados

	Concentración	Temperatura	Tiempo
<i>Actβa</i>	60 µg/mL	25 °C	25 min.
<i>Bmp7</i>	60 µg/mL	25 °C	23 min.
<i>ColIII</i>	60 µg/mL	25 °C	25 min.
<i>Fgf8</i>	15 µg/mL	20 °C	20 min.
<i>Msx2</i>	60 µg/mL	25 °C	25 min.
<i>Sox9</i>	60 µg/mL	25 °C	25 min.

Nota: Antes de añadir la sonda 1:100

en amortiguador de hibridación, está se desnaturaliza incubándola a 80 °C durante 2 min. e inmediatamente se coloca en hielo.

Segundo Día: Post-hibridación, lavados e incubación con el anticuerpo: Los embriones se lavaron con Solución I (50% formamida, 5x SSC pH 5, 1% SDS) 1 h dos veces a 65 °C, después se lavaron en una ocasión con una mezcla 1:2 de Solución I y II respectivamente por 10 min. a 65 °C. Se lavaron seis veces 10 min. con Solución II (0.5 M NaCl, 10 mM tris-HCl pH 7.5, 0.1% Tween-20). Se lavaron con Solución III dos veces (50% formamida, 2x SSC pH 5) 10 min. y 30 min. respectivamente a 65 °C. Posteriormente se lavaron con TBST+ 0.5% de levamisol 200 mM 10 min tres veces a temperatura ambiente. Posteriormente, se tratan con 10% suero de chivo en TBST+0.5% de levamisol 200 mM durante 3 h en movimiento horizontal a temperatura ambiente. Por ultimo, incubar en una solución 1:2000 de anticuerpo anti-Digoxigenina (Roche Cat.11 093 274 910) en TBST+ 0.5% de levamisol 200 mM mas 10% de suero de chivo, toda una noche a 4 °C.

Tercer día: lavados post-anticuerpo y detección: Se lavaron con TBST+ 0.5% de levamisol 200 mM 15 veces 10 min. Consecutivamente se lavaron con NTMT + 0.5% de levamisol 200 mM 2 veces 15 min. Subsecuentemente, se incubaron en la oscuridad con 1.2 mL del sustrato de la fosfatasa alcalina: BM Purple (ROCHE Cat.11 442 074 061) hasta que la reacción se complete. Una vez que las extremidades se tiñeron se lavaron con NTMT 15 min. en oscuridad 2 veces, lavar con PBS varias veces con cambios rápidos. Por último, se colocaron en glicerol/PBS 1:1 y se fotografiaron bajo el microscopio estereoscópico Nikon SMZ1500 empleando la cámara digital AxioCam junto con el programa de fotografía Axio Vision de Carl Zeiss.

Tinción del Esqueleto

Esta tinción se utiliza con el objetivo de evidenciar el esqueleto de los embriones utilizando azul Alciano y Alizarina roja, colorantes que tiñen cartílago en azul y hueso en rojo.

Primero, las extremidades o los embriones se fijaron en etanol 96° durante 24 h, posteriormente se permeabilizaron con acetona por 24 h, trascurrido el tiempo, se tiñeron durante 24 h con el colorante preparado de la siguiente manera: 1 volumen de azul Alciano 0.3% en etanol 70%, 1 volumen de Alizarina roja 0.1 % en etanol 70%, 1 volumen de ácido acético glacial y 17 volúmenes de etanol 70%. Después se lavaron con agua bidestilada por unos segundos. Las muestras se mantienen en una solución de KOH 1%/glicerol 20% en H₂O, por varios días hasta que se observa claramente el esqueleto. Por último, se almacenaron en glicerol/PBS 1:1 y se fotografiaron bajo el microscopio estereoscópico Nikon SMZ1500 empleando la cámara digital AxioCam junto con el programa de fotografía Axio Vision de Carl Zeiss.

Tinción con Rojo Neutro

Esta es una tinción vital que nos ayuda a evidenciar áreas de muerte celular en rojo, durante el desarrollo de las extremidades.

Las extremidades se lavaron con PBS por algunos segundos posteriormente se colocaron en aproximadamente 5 mL de PBS con dos gotas de Rojo Neutro al 2% en H₂O, de 3 a 5 minutos cuidando que la extremidad no se tiña demasiado. Se lavaron por unos segundos en PBS y posteriormente se fijaron en Formol Calcico (1% CaCl₂ / Formol 4% en H₂O) 24 h, al día siguiente se deshidrataron en isopropanol 1h dos veces. Por último se pasaron a xilol y se fotografiaron el mismo día bajo el microscopio

estereoscópico Nikon SMZ1500 empleando la cámara digital AxioCam junto con el programa de fotografía AxioVision de Carl Zeiss.

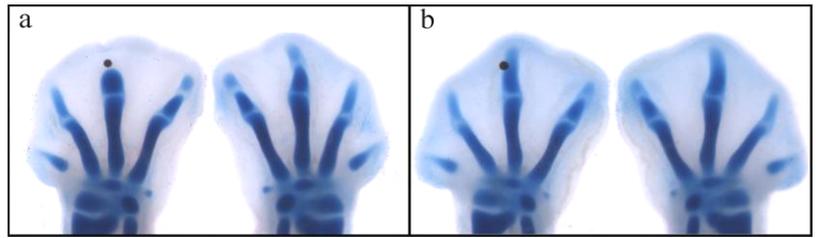


Figura 12. La manipulación y la perla en si no tienen efecto aparente en el desarrollo del dedo. Embriones operados en la punta del dedo en estadio 28+ 24h tenidos con azul Alciano **a:** Experimental (perla con AR) y su contra lateral; **b:** Experimental (perla con DMSO) y su contra lateral.

Resultados

¿El AR anticondrogénico o apoptótico?

El papel dual del AR durante el desarrollo de la extremidad del pollo fue descrito por Rodríguez-León *et al.* (1999), ellos reportan que el AR promueve apoptosis a través de BMP. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual el AR inhibe la condrogénesis o si ésta inhibición es resultado de la inducción de la apoptosis.

Por lo tanto, con la finalidad de esclarecer el tiempo en que el AR inhibe el crecimiento del dedo y promueve apoptosis, se aplicaron perlas con AR en la punta del dedo tres de embriones de pollo en estadio 27-28 HH. Los cuales se analizaron en diferentes tiempos (1h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 18 h, 24 h y 48 h) después de ser operados y se procesaron para teñir el esqueleto con azul Alciano y Alizarina roja o teñir áreas de muerte celular con Rojo Neutro.

Además, se realizaron controles negativos colocando una perla en la punta del dedo con DMSO, se llegó a la conclusión que la manipulación o la perla por si solas no tienen un efecto aparente durante el desarrollo del dedo (Fig. 12).

Los resultados de la aplicación del AR muestran que a partir de 12 h (n= 4/4) después del tratamiento (Fig. 13) se reduce el tamaño del dedo respecto al contra lateral. Además, observamos que el elemento esquelético se engruesa en su parte

proximal siendo más evidente posterior a las 12 h (Fig. 12, 13). Por otra parte, con la tinción de Rojo Neutro observamos que el AR promueve la muerte celular entre 6 h (n= 1/4) y 12 h (n= 4/4) después de aplicarse en la punta del dedo (Fig. 13).

Estos resultados sugieren que el AR primero promueve la muerte celular y tal vez como consecuencia la condrogénesis no ocurre. No obstante, hay que recordar que los proteoglicanos solo se encuentran en el cartílago y no en las etapas iniciales de la diferenciación condrogénica, por lo tanto, la tinción del esqueleto con azul Alciano no nos permite evaluar el efecto del AR en las etapas iniciales de la condrogénesis.

Por lo tanto, fue necesario evaluar la expresión de *Sox9* posterior a la aplicación del

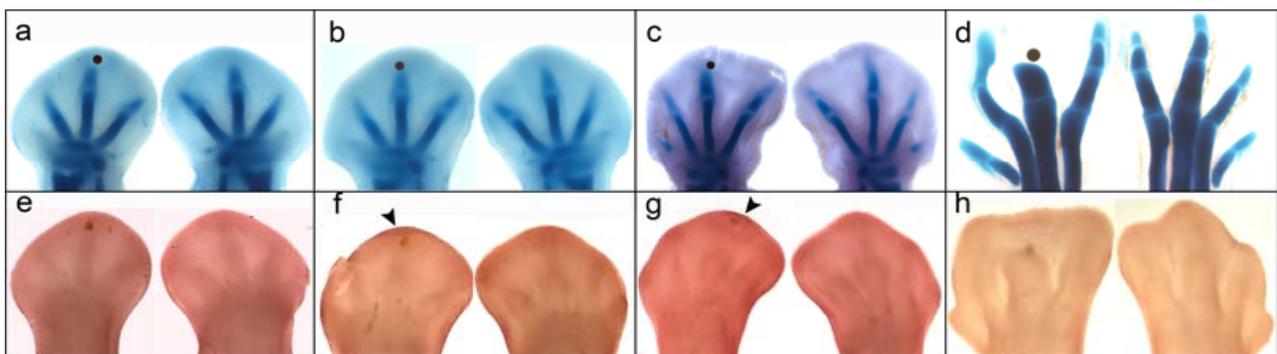


Figura 13. El AR promueve apoptosis 6 h después e inhibe el crecimiento del dedo 12 h después del tratamiento. Tinción del esqueleto con azul Alciano (**a-d**). Tinción de áreas de muerte celular con rojo neutro (**e-h**). En todos los casos se muestra experimental (izquierda) y su contra lateral (derecha): 2 h (**a, e**), 6 h (**b, f**), 12 h (**c, g**) y 42 h (**d, h**) después del tratamiento.

AR en la punta del dedo, en diferentes tiempos (30 min., 1, 2, 4, 6, 12, 16, 18, 24 y 48 hrs.). De esta forma poder determinar si el AR inhibe la condrogénesis desde sus pasos moleculares iniciales.

El AR inhibe la condrogénesis reprimiendo la expresión de Sox9

Sox9 es el gen más temprano involucrado en la condrogénesis puesto que se expresa 30 min. después de aplicar TGF β en el interdígito (Chimal-Monroy, *et al.*, 2003), por si solo puede inducir la formación de cartílago y si se elimina no hay formación del cartílago en las extremidades (Bi, *et al.*, 1999).

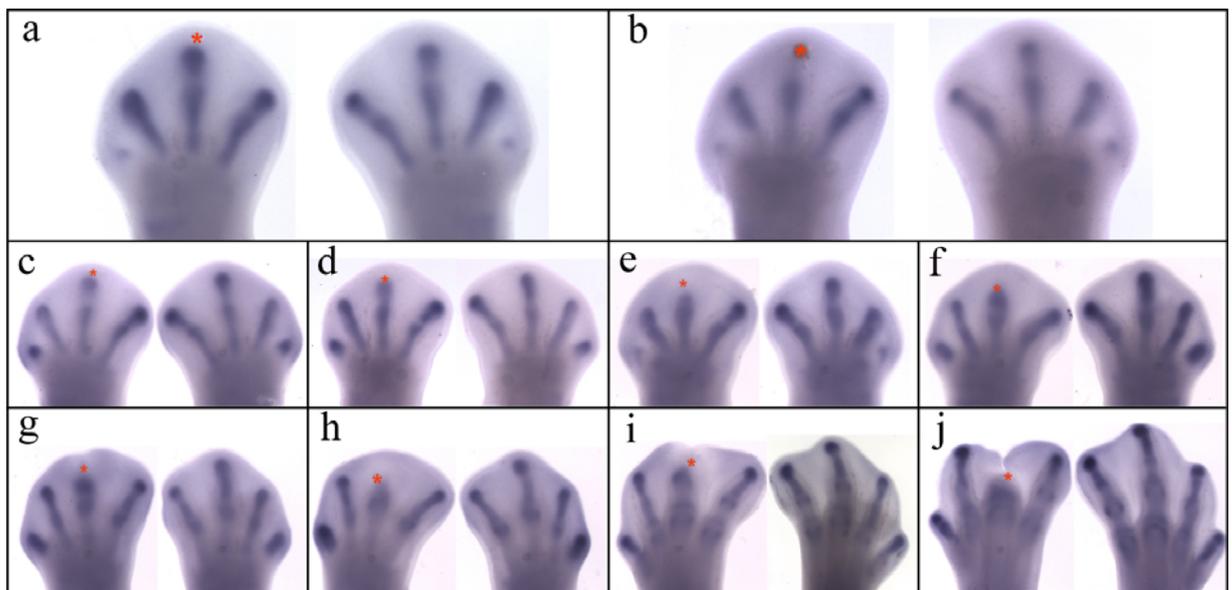


Figura 14. El AR inhibe la expresión de *Sox9* 1 h (b) después de aplicarse en la punta del dedo. Hibridación *in situ* de *Sox9*, en todos los casos se muestra la extremidad experimental (a la izquierda) y la extremidad contra lateral (a la derecha), el asterisco muestra la posición de la perla: 30 min. (a), 2 h (c), 4 h (d), 6 h (e), 12 h (f), 16 h (g), 18 h (h), 24 h (i), y 48 h (j) después del tratamiento con AR en la punta del dedo.

Los resultados obtenidos indican que la expresión de *Sox9* se inhibe a partir de 1 h después del tratamiento con AR (n= 4/6) en la punta del dedo (Fig. 14) en los subsecuentes tiempos esta inhibición se mantiene, de forma que se hace más evidente conforme crece la extremidad.

Con la finalidad de confirmar la inhibición del cartílago por AR, también evaluamos la expresión de *ColIII* (Fig. 15), el cual es considerado como el marcador del cartílago y durante la cascada molecular del cartílago inducida por TGF β se expresa 12 h después del tratamiento (Chimal-Monroy, *et al.*, 2003). Además, evaluamos la expresión de

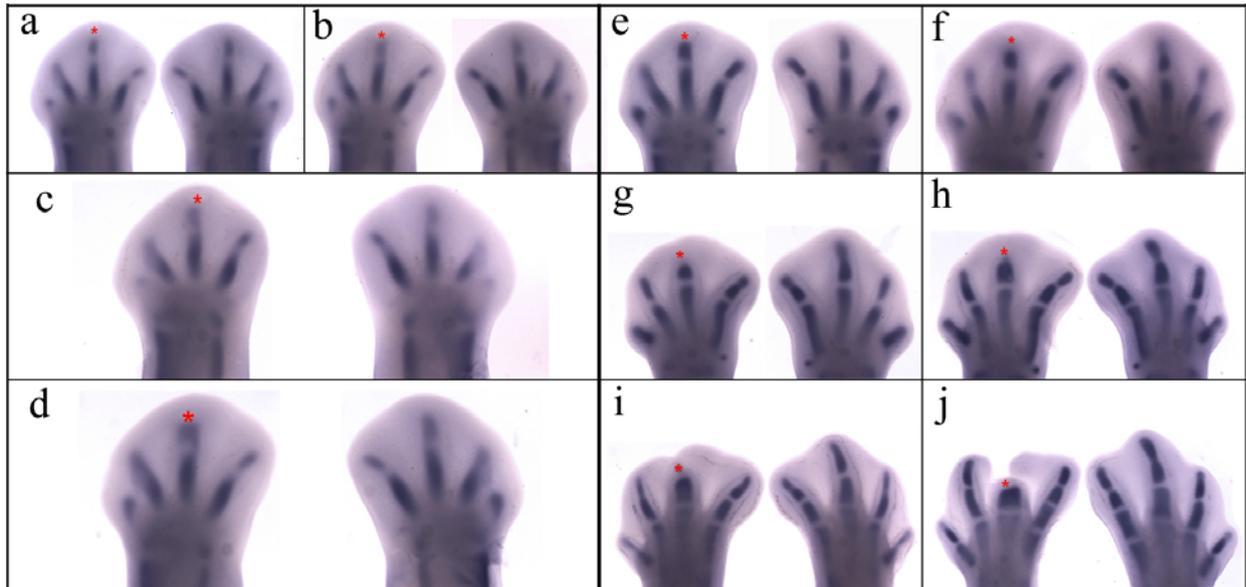


Figura 15. El AR restringe el dominio de expresión de *ColIII* 4 h (**d**) después del tratamiento en la punta del dedo. A partir de las 4 h el efecto del AR en la expresión de *ColIII* se hace más evidente conforme la extremidad crece, también la expresión se ensancha con respecto al contra lateral (a la derecha). El asterisco indica la posición de la perla. 30 min. (**a**), 1 h (**b**) y 2 h (**c**), 6 h (**e**), 12 h (**f**), 16 h (**g**), 18 h (**h**), 24 h (**i**), y 48 h (**j**) después del tratamiento.

Act β a el cual se expresa en la punta de los dedos y en este caso funge como un marcador del cartílago de los dedos.

Los resultados indican que *ColIII* disminuye su dominio de expresión en la punta del dedo a partir de 4 h después de aplicar el AR (n= 4/4), pero es interesante observar, en el mismo tiempo, que en el dedo se amplía su expresión ensanchándose (Fig. 15), similarmente a lo observado con la tinción de azul Alciano (Fig. 12, 13). En el caso de *Act β a* (Fig. 16) observamos que disminuye su dominio de expresión, a partir de 4 h

después (n= 4/4) de la aplicación del AR y en los estadios posteriores desaparece de la

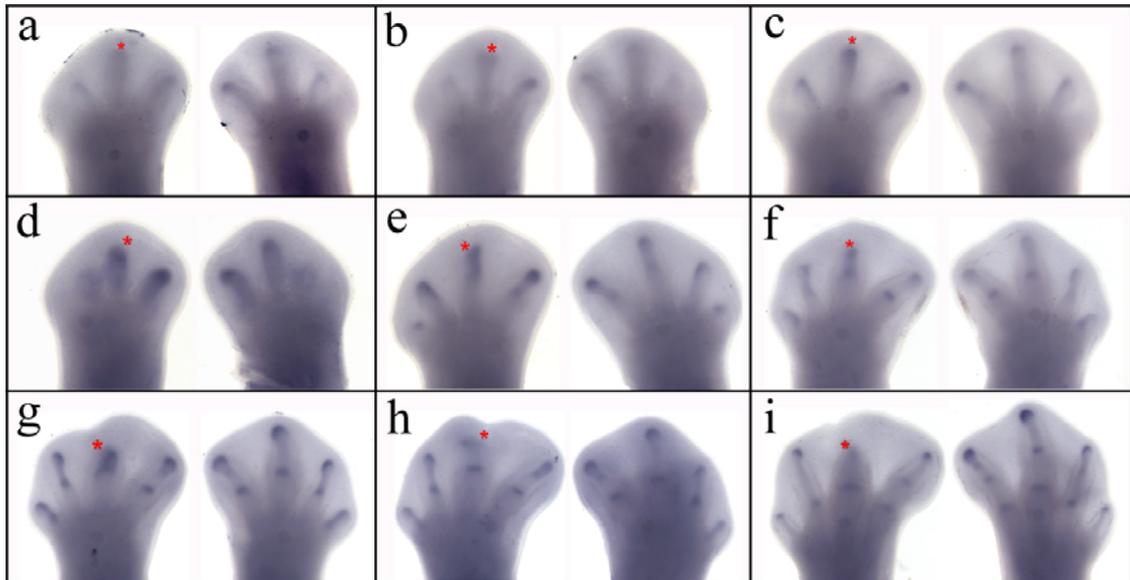


Figura 16. El AR restringe el dominio de expresión de *Actβ* hasta 4 h después (**d**). Hibridación *in situ* de *Actβ*, en todos los casos se muestra la extremidad experimental (a la izquierda) y su contra lateral (a la derecha) El asterisco indica la posición de la perla: 30 min. (**a**), 1 h (**b**), 2 h (**c**), 4 h (**d**), 6 h (**e**), 12 h (**f**), 16 h (**g**), 18 h (**h**) y 24 h (**i**) después del tratamiento con AR en la punta del dedo.

punta del dedo.

Los resultados anteriores sugieren que el AR inhibe la condrogénesis desde etapas muy tempranas y la muerte celular se observa en un intervalo de entre 6 h y 12 h después del tratamiento con AR en la punta del dedo. Esto podría deberse a que el AR inhibe a *Sox9* y entonces ocurre la muerte. Sin embargo, puede ocurrir que el AR al mismo tiempo promueva la apoptosis. Por lo tanto, evaluamos la expresión de *Bmp7*.

El AR induce la expresión de *Bmp7* y *Msx2*

Sabemos que *Bmp7* se expresan en los interdígitos y promueve la apoptosis en el mesénquima indiferenciado incluyendo los interdígitos (Macias, *et al.*, 1997; Merino, *et al.*, 1998). También, se conoce que *Bmp7* se encuentra río abajo del AR y que éste puede inducir su expresión (Rodríguez-León, *et al.*, 1999). Sin embargo, se desconoce

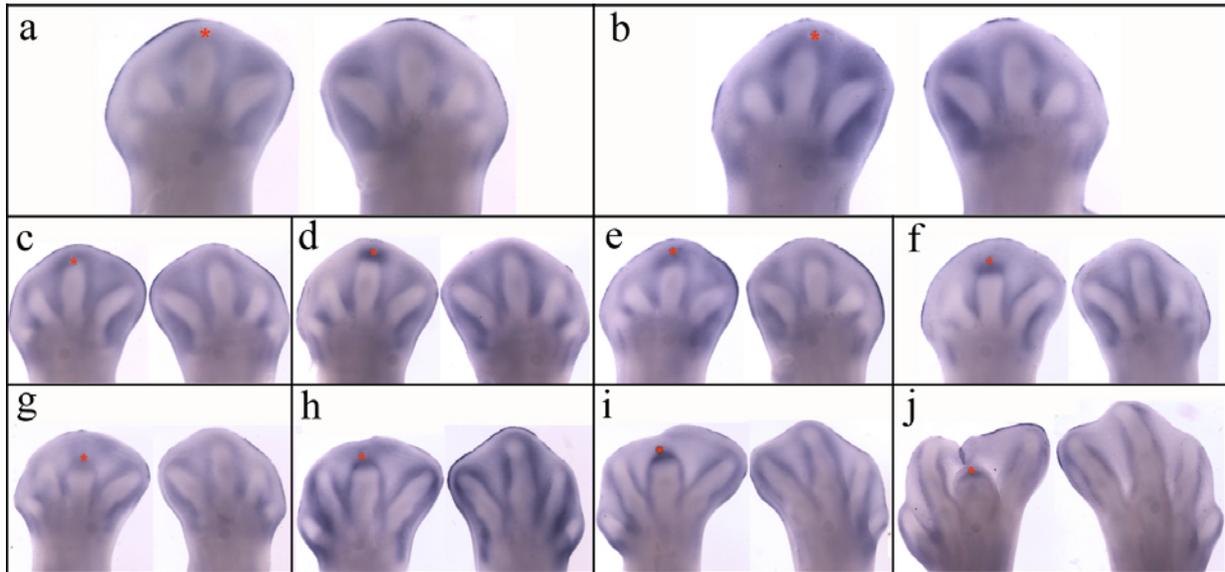


Figura 17. La expresión de *Bmp7* se induce 1 h después (**b**) del tratamiento con AR en la punta del dedo. Hibridación *in situ* de *Bmp7*, en todos los casos se muestra la extremidad experimental (izquierda) y su contra lateral (derecha), el asterisco indica la posición de la perla: La relación de los tiempos es la siguiente: 30 min. (**a**), 2 h (**c**), 4 h (**d**), 6 h (**e**), 12 h (**f**), 16 h (**g**), 18 h (**h**), 24 h (**i**), y 48 h (**j**) después del tratamiento con AR en la punta del dedo.

el tiempo en el cual es inducido y su lugar dentro de una cascada molecular que conlleva a la apoptosis promovida por el AR.

Los resultados sugieren que el AR induce a *Bmp7* a partir de 1 h posterior a su aplicación (n= 9/9) y es más evidente 4 h después del tratamiento, esta inducción se aprecia principalmente en la zona de progreso cercana al dedo (Fig. 17).

Otra molécula implicada en la apoptosis interdigital es el factor de transcripción *Msx2* el cual se expresa en los interdígitos y en las células indiferenciadas de la zona de progreso. *Msx2* induce apoptosis en mesénquima indiferenciado (Ferrari, *et al.*, 1998) y su expresión es regulada positivamente por BMP cuando se colocan en el interdígito, por lo tanto, se cree que también forma parte de una cascada molecular que resulta en el proceso de la apoptosis interdigital.

Por estas razones evaluamos su expresión posterior a la aplicación de AR en la punta del dedo. Encontramos que el dominio de expresión de *Msx2* en la punta del

dedo se amplia a partir de las 4 h (n= 4/4), posterior a la inducción de *Bmp7* por AR, y extendiéndose más aún en los tiempos posteriores (Fig. 18).

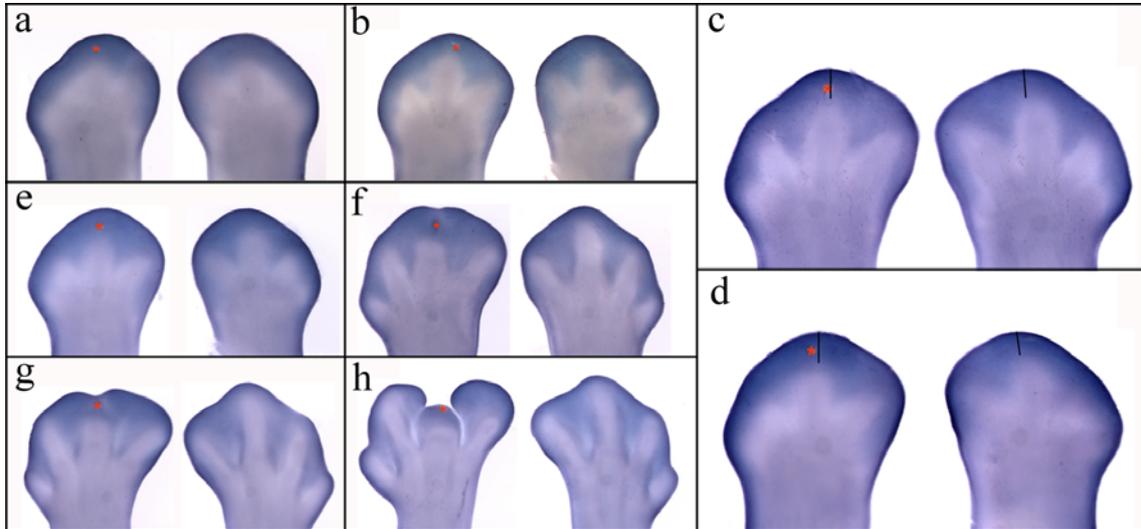


Figura 18. El AR amplia en domino de expresión de *Msx2* 4 h (**d**, comparar la longitud de las líneas) después del tratamiento en la punta del dedo. En todos los casos se muestra la extremidad experimental (a la izquierda) y su contra lateral (a la derecha) los asteriscos muestran la posición de la perla: 30 min. (**a**), 1 h (**b**), 2 h (**c**), 6 h (**e**), 16 h (**f**), 24 h (**g**), y 48 h (**h**) después del tratamiento con AR en la punta del dedo.

El AR inhibe la expresión de *Fgf8*

El Factor de Crecimiento de los Fibroblastos 8 (*Fgf8*) sintetizado en la AER, se considera como un factor de supervivencia celular y bajo la observación de que la ausencia de la expresión de *Fgf8* coincide en aproximadamente los mismos estadios embrionarios en que empieza la apoptosis en los interdógitos (Gañan, *et al.*, 1996). Posiblemente esta regulación negativa esta mediada por BMP (Gañan, *et al.*, 1998; Pizette y Niswander, 1999) lo que conlleva a la muerte celular interdigital. Por lo tanto, se evaluó la expresión de este gen, en diferentes tiempos posterior a la aplicación de AR en la punta del dedo (Fig. 19). Encontramos que la expresión de *Fgf8* se inhibe a partir de 6 h después de la aplicación de AR (n= 3/3) (Fig. 19 e), está inhibición

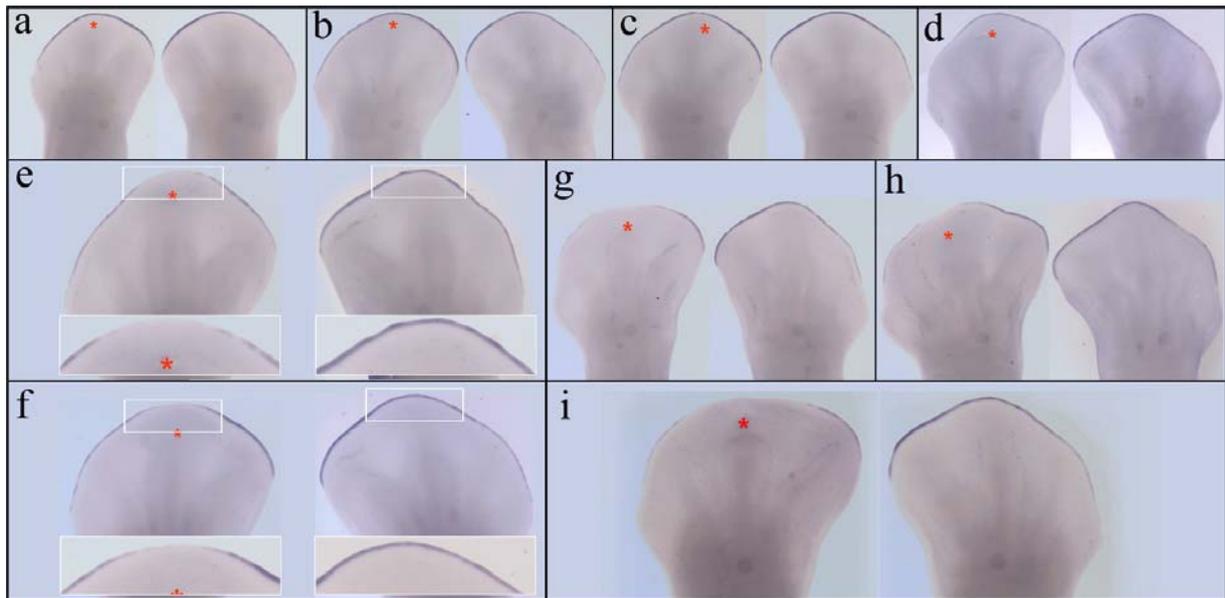


Figura 19. El AR inhibe la expresión de *Fgf8* después de 6 h (e) de aplicar AR en la punta del dedo. En todos los casos se muestra la extremidad experimental (a la izquierda) y su contra lateral (a la derecha). 6 h (e) y 12 h (f) con sus respectivas magnificaciones 5x, el asterisco indica la posición de la perla: 30 min. (a), 1 h (b) 2 h (c), 4 h (d), 16 h (g), 18 h (h) y 24 h (i) después del tratamiento con AR en la punta del dedo.

coincide con el inicio de la muerte celular promovida por AR en la punta del dedo (Fig. 13 b).

El AR puede estar participando en un balance entre señales condrogénicas y apoptóticas durante la morfogénesis del autópodo

Probablemente durante la formación del autópodo exista un balance entre señales condrogénicas, apoptóticas y anticondrogénicas, que estén regulando la formación de dedos extras, la morfogénesis y posición de los dedos o la regresión del interdígito.

Un experimento que nos puede ayudar a inferir si existe este balance es colocando una señal condrogénica, como el TGF β , en el interdígito y al mismo tiempo AR (Fig. 20), que como los resultados descritos hasta este momento sugieren que funge como una señal anticondrogénica y al mismo tiempo promueve la apoptosis.

El resultado del experimento fue: al colocar TGFβ1 [200 ng/μL] y AR [5 mg/mL] no hay inducción de cartílago o aceleración evidente de la apoptosis (Fig. 20). Sin

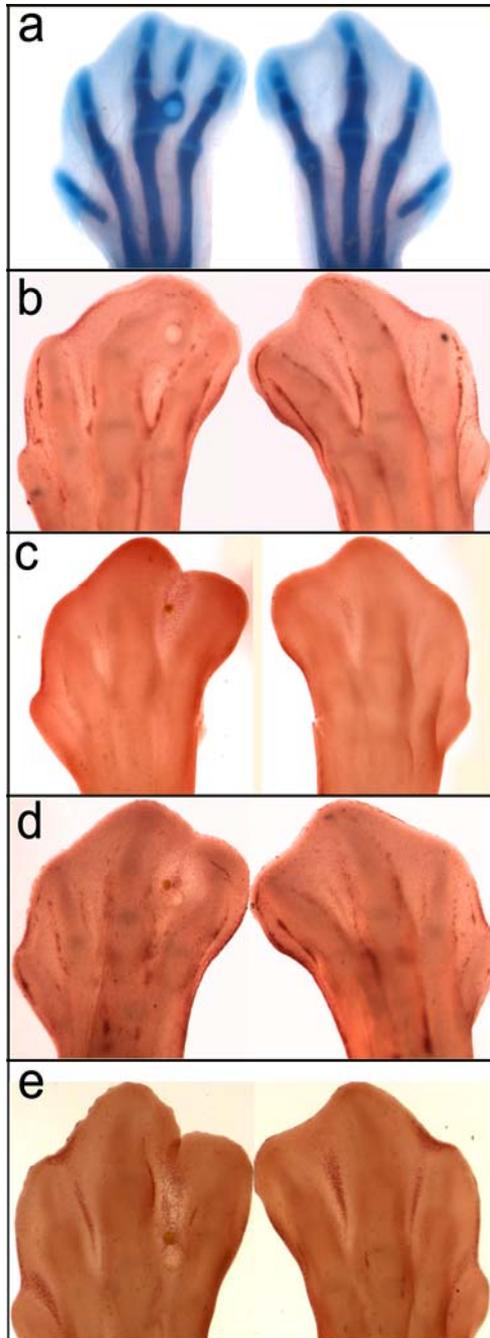


Figura 20. El efecto condrogénico y antiapoptótico del TGFβ se neutraliza con el efecto anticondrogénico y apoptótico del AR. **(a)** Inducción de un cartílago ectópico 48 h después de la aplicación de TGFβ1 [100 ng/μL] en el tercer interdígito. **(b)** Inhibición de la muerte celular 24 h posterior a la aplicación de TGFβ1 [200 ng/μL]. **(c)** Aceleración de la muerte interdigital por AR 24 h después [5 mg/mL]. **(d)** Efecto en la muerte interdigital 24 después a la aplicación de AR+TGFβ1 [5 mg/mL] y [200 ng/μL] respectivamente. **(e)** Aceleración de la muerte interdigital 40 h después de la aplicación de AR+TGFβ1 [5 mg/mL] y [100 ng/μL] respectivamente.

embargo, cuando se disminuye la concentración de TGFβ1 a la mitad (100 ng/μL) la aceleración de la apoptosis inducida por AR ocurre (Fig. 20 e).

Discusión

El mecanismo morfogenético por el cual los dedos y los interdógitos se forman en el lugar donde están se desconoce, sin embargo, la diferencia entre los dedos y el interdígito radica en que las células de los dedos previamente entraron en el programa de condrogénesis y las células del interdígito se mantienen indiferenciadas y posteriormente mueren por apoptosis. Estas diferencias posiblemente se deben al contexto celular y al tipo de señal al que se encuentran más expuestas las células. Por ejemplo, las células del interdígito tienen la capacidad de entrar en el programa condrogénico si se les aplica un factor en exceso como TGF β (Gañan, *et al.*, 1996). Por otra parte, al inhibir al AR en el interdígito se regula negativamente la muerte celular y si se aplica una doble dosis del inhibidor de AR, se forman dedos ectópicos insinuando que el interdígito está expuesto a señales condrogénicas provenientes de los dedos, probablemente TGF β o Activinas (Merino, *et al.*, 1998; Merino, *et al.*, 1999a). Al administrar el AR en exceso se acelera la apoptosis (Rodríguez-León, *et al.*, 1999) indicando el papel dual del AR (anticondrogénico y apoptótico).

En la presente tesis se muestra que el AR al ser colocado en la punta del dedo inhibe la expresión de *Sox9* 1 h después del tratamiento, sugiriendo que el AR inhibe el proceso de condrogénesis desde sus eventos iniciales (Chimal-Monroy, *et al.*, 2003), tal vez inhibiendo directamente a *Sox9* en las células indiferenciadas que se encuentran en la punta del dedo. Probablemente actúa de la misma forma en las células del interdígito evitando que entren en el programa condrogénico. Consecuentemente, observamos que el efecto del AR sobre la expresión del marcador de cartílago *ColIII* y el marcador de la punta de dedo *Act β* , que sus dominios de expresión disminuyen a

las cuatro y seis horas después del tratamiento respectivamente, probablemente como consecuencia de haber inhibido inicialmente a *Sox9*.

Al mismo tiempo que el AR actúa como una señal anticondrogénica, también actúa como apoptótica puesto que induce la expresión de *Bmp7* 1 h después del tratamiento. Recordemos que las células del mesénquima indiferenciado o del interdígito responden a BMP entrando anticipadamente en el programa apoptótico (Macias, *et al.*, 1997), probablemente por medio de *Msx2* (Chen y Zhao, 1998), y que el AR promueve el programa apoptótico a través de BMP (Rodríguez-León, *et al.*, 1999) y aunque se desconoce la cascada molecular por la cual se lleva a cabo la apoptosis en el interdígito, los resultados sugieren que el AR promueve muerte celular en un lapso de entre 6 y 12 horas. En este intervalo de tiempo encontramos que el orden de los genes analizados dentro de la cascada molecular que se propone se resume en la Fig. 21.

Así mismo, FGF8 es considerado como un factor de sobrevivencia celular. El cual, se cree, que al desaparecer de la AER del interdígito se inicia la apoptosis promovida por BMP. Se ha descrito que al colocar BMP en el interdígito *Fgf8* desaparece de la AER seis horas después y al colocarlas en la punta del dedo desaparece cuatro horas después del tratamiento (Merino, *et al.*, 1998; Dahn y Fallon, 1999). Nuestros resultados indican que el AR regula negativamente la expresión de *Fgf8* 6 h posteriores al tratamiento, coincidiendo con el tiempo reportado por Merino, *et al.* 1998 y por Dahn y Fallon, 1999. Por lo tanto, el mecanismo que se propone consiste en que *Bmp7* inducida por el AR regula negativamente la expresión de *Fgf8* en la AER (Merino, *et al.*, 1998; Dahn y Fallon, 1999; Pizette y Niswander, 1999) y entonces ocurre la apoptosis.

El papel anticondrogénico y apoptótico del AR puede ser importante durante el desarrollo de otras especies, por ejemplo, en el pato que presenta extremidades

palmeadas el AR también puede estar promoviendo la apoptosis a través de BMP, pero Gremlin, antagonista de BMP, evita que lleven a cabo su función apoptótica en el interdígito (Merino, *et al.*, 1999b), a pesar de esto el AR también lleva a cabo su función anticondrogénica resultando en un autópodo con membrana interdigital pero sin dedos extras.

Otro efecto interesante que observamos con la tinción de azul Alciano, es que el dedo se ensancha en la parte proximal cercano a la perla con AR, sugiriendo que el AR también promueve la proliferación de los condrocitos, de igual forma ocurre en la expresión de *ColIII* 4 h después del tratamiento con AR, sugiriendo que las células del cartílago responden diferente al AR respecto a las células precondrogénicas. Por ejemplo, el patrón de expresión de las diferentes isoformas de los receptores es muy dinámico durante el desarrollo del autópodo. $RAR\gamma$ se expresa en las células precondrogénicas y en los condrocitos hipertrofos, $RAR\alpha$ tiene un patrón muy difuso en la extremidad y $RAR\beta2$ se expresa en los interdígitos (Dolle, *et al.*, 1989). Esto sugiere que pueden existir respuestas diferenciales al AR dependiendo del receptor presente en las células, además se ha visto *in vitro* que bajas concentraciones de AR (1-10 ng/mL) aumentan la condrogénesis y concentraciones altas (>25 ng/mL) la inhiben (Paulsen, *et al.*, 1988), reforzando la idea de la respuesta diferencial al AR por parte de las células. Por otro lado, observamos que el AR induce la expresión de *Bmp7* 1 h después del tratamiento. La respuesta de las células de cartílago a BMP se ve reflejada con sobrecrecimiento del elemento esquelético, posiblemente esta respuesta es mediada por *Bmpr1b* el cual se expresa en los dedos (Merino, *et al.*, 1998) y al sobreexpresar su forma constitutiva activa en los dedos, estos presentan un sobrecrecimiento (Zou, *et al.*, 1997). Conjuntamente *Nogina* un antagonista de BMP,

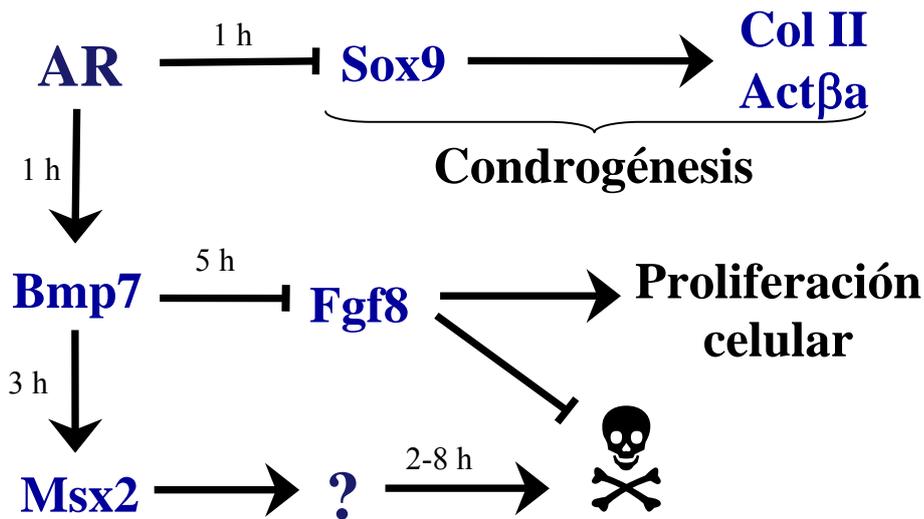


Figura 21. El AR lleva a cabo su función anticondrogénica inhibiendo la expresión de *Sox9* y al mismo tiempo, promueve apoptosis induciendo la expresión de *Bmp7*. Posteriormente *Bmp7* induce la expresión de *Msx2* e inhibe la expresión de *Fgf8*, de esta forma se promueve la inducción de la apoptosis.

se expresa en los dedos y si se elimina los dedos se ensanchan presentando sobrecrecimiento de cartílago (Brunet, *et al.*, 1998), confirmando el papel promotor de BMP en la diferenciación del cartílago.

Es probable que el AR desempeñe un papel importante mediando la respuesta de las células a BMP. El AR en el interdígito inhibe su capacidad condrogénica, por lo tanto *Bmpr1b* no se expresa. Por otro lado promueve la apoptosis induciendo la expresión de *Bmp7*. Sin embargo, TGFβ, el cual se expresa en los dedos, induce la expresión de *Bmpr1b* 6 h después de ser aplicado en el interdígito (Chimal-Monroy, *et al.*, 2003) promoviendo la respuesta condrogénica de las células a BMP. Por otra parte, TGFβ inhibe la expresión de *Bmp7* 1 h después de ser aplicado en el interdígito (Mares-Sámano, *en progreso*), por lo tanto, las células no entran en el programa apoptótico. Lo que nos lleva a pensar que probablemente existe un balance entre señales condrogénicas, anticondrogénicas y apoptóticas que regulan la forma y posición de los dedos, y la apoptosis en los interdígitos. Los resultados sugieren que este balance

puede existir, puesto que cuando se coloca una perla con AR [5 mg/mL] acelera la muerte interdigital, y si se coloca una perla con TGF β 1 [100 ng/ μ L] induce dedos ectópicos y cuando se aplican al mismo tiempo el resultado es un incremento en la muerte celular. Sin embargo, cuando se aumenta la concentración de TGF β 1 al doble se neutraliza el efecto de ambos sobre el interdígito. Sugiriendo que la concentración de cada uno de ellos en el autópodo juega un papel importante en el establecimiento del destino celular.

Conclusiones

El AR en la punta del dedo induce apoptosis e inhibe la condrogénesis al mismo tiempo, a través de regular negativamente *Sox9* y positivamente *Bmp7*. Sugiriendo que el papel del AR en el interdígito es inhibir la condrogénesis y al mismo tiempo inducir apoptosis.

Además, se sugiere que puede existir un balance entre señales condrogénicas, provenientes de los dedos, y el AR en el interdígito, como apoptótica y anticondrogénica.

Perspectivas

En la presente tesis observamos que el AR inhibe la expresión de *Sox9* cuando es aplicado en la punta del dedo. Sugiriendo que puede estar inhibiendo a *Sox9* en el interdígito, por lo tanto el experimento a seguir sería colocar el antagonista del AR en el interdígito y evaluar si *Sox9* se expresa y el momento en que ocurre.

Por otra parte, en la presente tesis utilizamos la tinción de Rojo Neutro para evidenciar áreas de muerte celular, aunque esta técnica no es específica de apoptosis, se sabe que el AR promueve apoptosis. Es importante establecer el tiempo más frecuente en que el AR induce este proceso en la punta del dedo y en el interdígito, utilizando una técnica específica como TUNEL o evaluar por inmunolocalización a proteínas efectoras de la apoptosis como la Caspasa3.

Establecido el tiempo más frecuente de inducción de la apoptosis el siguiente paso sería conocer la cascada molecular que conlleva a la apoptosis interdigital. En este sentido, se operarían embriones de pollo tanto en interdígito como en la punta del dedo con AR y se evaluaría la regulación en expresión de otros genes implicados en

esté proceso como: *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp5*, *Bmp7*, *Snail*, *Slug*, *Msx1*, *Msx2*, *Dkk*, etc.

(Ros, *et al.*, 1997; Sefton, *et al.*, 1998; Montero, *et al.*, 2001)

Referencias

- Abu-Abed, S., Dolle, P., Metzger, D., Beckett, B., Chambon, P. and Petkovich, M. 2001. The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. *Genes Dev* **15**: 226-40.
- Ahuja, H. S., James, W. and Zakeri, Z. 1997. Rescue of the limb deformity in hammertoe mutant mice by retinoic acid-induced cell death. *Dev Dyn* **208**: 466-81.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. 2002. **Molecular Biology of The Cell**. Garland Science, New York.
- Allenby, G., Bocquel, M. T., Saunders, M., Kazmer, S., Speck, J., Rosenberger, M., Lovey, A., Kastner, P., Grippo, J. F., Chambon, P. and et al. 1993. Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 30-4.
- Bellaris, R. and Osmond, M. 2005. **The Atlas of Chick Development**. Elsevier Academic Press, London.
- Bi, W., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R. and de Crombrughe, B. 1999. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* **22**: 85-9.
- Brunet, L. J., McMahon, J. A., McMahon, A. P. and Harland, R. M. 1998. Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science* **280**: 1455-7.
- Cohn, M. J., Izpisua-Belmonte, J. C., Abud, H., Heath, J. K. and Tickle, C. 1995. Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell* **80**: 739-46.
- Crossley, P. H., Minowada, G., MacArthur, C. A. and Martin, G. R. 1996. Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell* **84**: 127-36.
- Charite, J., McFadden, D. G. and Olson, E. N. 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.
- Chen, Y. and Zhao, X. 1998. Shaping limbs by apoptosis. *J Exp Zool* **282**: 691-702.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Harris, M. P., Simandl, B. K., Li, Y., Beachy, P. A. and Fallon, J. F. 2001. Manifestation of the limb prepattern: limb development in the absence of sonic hedgehog function. *Dev Biol* **236**: 421-35.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H. and Beachy, P. A. 1996. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**: 407-13.
- Chimal-Monroy, J., Rodríguez-León, J., Montero, J. A., Gañan, Y., Macias, D., Merino, R. and Hurle, J. M. 2003. Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev Biol* **257**: 292-301.
- Dahn, R. D. and Fallon, J. F. 1999. Limb outgrowth: BMPs as negative regulators in limb development. *Bioessays* **21**: 721-5.

- Dolle, P., Ruberte, E., Kastner, P., Petkovich, M., Stoner, C. M., Gudas, L. J. and Chambon, P. 1989. Differential expression of genes encoding alpha, beta and gamma retinoic acid receptors and CRABP in the developing limbs of the mouse. *Nature* **342**: 702-5.
- Dupe, V., Ghyselinck, N. B., Thomazy, V., Nagy, L., Davies, P. J., Chambon, P. and Mark, M. 1999. Essential roles of retinoic acid signaling in interdigital apoptosis and control of BMP-7 expression in mouse autopods. *Dev Biol* **208**: 30-43.
- Eichele, G., Tickle, C. and Alberts, B. M. 1985. Studies on the mechanism of retinoid-induced pattern duplications in the early chick limb bud: temporal and spatial aspects. *J Cell Biol* **101**: 1913-20.
- Fallon, J. F. and Cameron, J. 1977. Interdigital cell death during limb development of the turtle and lizard with an interpretation of evolutionary significance. *J Embryol Exp Morphol* **40**: 285-9.
- Fernández-Terán, M., Piedra, M. E., Kathiriya, I. S., Srivastava, D., Rodriguez-Rey, J. C. and Ros, M. A. 2000. Role of dHAND in the anterior-posterior polarization of the limb bud: implications for the Sonic hedgehog pathway. *Development* **127**: 2133-42.
- Ferrari, D., Lichtler, A. C., Pan, Z. Z., Dealy, C. N., Upholt, W. B. and Kosher, R. A. 1998. Ectopic expression of Msx-2 in posterior limb bud mesoderm impairs limb morphogenesis while inducing BMP-4 expression, inhibiting cell proliferation, and promoting apoptosis. *Dev Biol* **197**: 12-24.
- Gañan, Y., Macias, D., Basco, R. D., Merino, R. and Hurle, J. M. 1998. Morphological diversity of the avian foot is related with the pattern of *Msx* gene expression in the developing autopod. *Dev Biol* **196**: 33-41.
- Gañan, Y., Macias, D., Duterque-Coquillaud, M., Ros, M. A. and Hurle, J. M. 1996. Role of TGF beta s and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development* **122**: 2349-57.
- Geduspan, J. S. and MacCabe, J. A. 1989. Transfer of dorsoventral information from mesoderm to ectoderm at the onset of limb development. *Anat Rec* **224**: 79-87.
- Gilbert, S. F. 2003. **Developmental Biology**. Sinauer Associates, New York.
- Gorry, P., Lufkin, T., Dierich, A., Rochette-Egly, C., Decimo, D., Dolle, P., Mark, M., Durand, B. and Chambon, P. 1994. The cellular retinoic acid binding protein I is dispensable. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 9032-6.
- Gottlicher, M., Heck, S. and Herrlich, P. 1998. Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J Mol Med* **76**: 480-9.
- Hamburger, H. and Hamilton, V. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* **88**: 49-92.
- Harfe, B. D., Scherz, P. J., Nissim, S., Tian, H., McMahon, A. P. and Tabin, C. J. 2004. Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell* **118**: 517-28.

- Healy, C., Uwanogho, D. and Sharpe, P. T. 1999. Regulation and role of Sox9 in cartilage formation. *Dev Dyn* **215**: 69-78.
- Heyman, R. A., Mangelsdorf, D. J., Dyck, J. A., Stein, R. B., Eichele, G., Evans, R. M. and Thaller, C. 1992. 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* **68**: 397-406.
- Hinchliffe, J. R. and Thorogood, P. V. 1974. Genetic inhibition of mesenchymal cell death and the development of form and skeletal pattern in the limbs of talpid3 (ta3) mutant chick embryos. *J Embryol Exp Morphol* **31**: 747-60.
- Hofmann, C., Luo, G., Balling, R. and Karsenty, G. 1996. Analysis of limb patterning in BMP-7-deficient mice. *Dev Genet* **19**: 43-50.
- Hurle, J. M., Ros, M. A., Garcia-Martinez, V., Macias, D. and Gañan, Y. 1995. Cell death in the embryonic developing limb. *Scanning Microsc* **9**: 519-33; discussion 33-4.
- Izpisua-Belmonte, J. C., Tickle, C., Dolle, P., Wolpert, L. and Duboule, D. 1991. Expression of the homeobox Hox-4 genes and the specification of position in chick wing development. *Nature* **350**: 585-9.
- Kliwer, S. A., Umesono, K., Noonan, D. J., Heyman, R. A. and Evans, R. M. 1992. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* **358**: 771-4.
- Kölliker, A. 1879. **Entwicklungsgeschichte des Menschen und der höheren Thiere.** Englemann, Leipzig.
- Lallemand, Y., Nicola, M. A., Ramos, C., Bach, A., Cloment, C. S. and Robert, B. 2005. Analysis of Msx1; Msx2 double mutants reveals multiple roles for Msx genes in limb development. *Development* **132**: 3003-14.
- Lampron, C., Rochette-Egly, C., Gorry, P., Dolle, P., Mark, M., Lufkin, T., LeMeur, M. and Chambon, P. 1995. Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABPII) or in both CRABPI and CRABPII are essentially normal. *Development* **121**: 539-48.
- Laufer, E., Nelson, C. E., Johnson, R. L., Morgan, B. A. and Tabin, C. 1994. Sonic hedgehog and Fgf-4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell* **79**: 993-1003.
- Laufer, E., Pizette, S., Zou, H., Orozco, O. E. and Niswander, L. 1997. BMP expression in duck interdigital webbing: a reanalysis. *Science* **278**: 305.
- Levin, A. A., Sturzenbecker, L. J., Kazmer, S., Bosakowski, T., Huselton, C., Allenby, G., Speck, J., Kratzeisen, C., Rosenberger, M., Lovey, A. and et al. 1992. 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha. *Nature* **355**: 359-61.
- Litingtung, Y., Dahn, R. D., Li, Y., Fallon, J. F. and Chiang, C. 2002. Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature* **418**: 979-83.
- Logan, C., Hornbruch, A., Campbell, I. and Lumsden, A. 1997. The role of Engrailed in establishing the dorsoventral axis of the chick limb. *Development* **124**: 2317-24.

- Lohnes, D., Mark, M., Mendelsohn, C., Dolle, P., Dierich, A., Gorry, P., Gansmuller, A. and Chambon, P. 1994. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* **120**: 2723-48.
- Loomis, C. A., Kimmel, R. A., Tong, C. X., Michaud, J. and Joyner, A. L. 1998. Analysis of the genetic pathway leading to formation of ectopic apical ectodermal ridges in mouse *Engrailed-1* mutant limbs. *Development* **125**: 1137-48.
- Lu, H.-C., Revelli, J.-P., Goering, L., Thaller, C. and Eichele, G. 1997. Retinoid signaling is required for the establishment of a ZPA and for the expression of *Hoxb-8*, a mediator of ZPA formation. *Development* **124**: 1643-51.
- MacCabe, J. A., Errick, J. and Saunders, J. W., Jr. 1974. Ectodermal control of the dorsoventral axis in the leg bud of the chick embryo. *Dev Biol* **39**: 69-82.
- Macias, D., Gañan, Y., Sampath, T. K., Piedra, M. E., Ros, M. A. and Hurle, J. M. 1997. Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development* **124**: 1109-17.
- Merino, R., Gañan, Y., Macias, D., Economides, A. N., Sampath, K. T. and Hurle, J. M. 1998. Morphogenesis of digits in the avian limb is controlled by FGFs, TGFbetas, and noggin through BMP signaling. *Dev Biol* **200**: 35-45.
- Merino, R., Macias, D., Gañan, Y., Rodríguez-León, J., Economides, A. N., Rodríguez-Esteban, C., Izpisua-Belmonte, J. C. and Hurle, J. M. 1999a. Control of digit formation by activin signalling. *Development* **126**: 2161-70.
- Merino, R., Rodríguez-León, J., Macias, D., Gañan, Y., Economides, A. N. and Hurle, J. M. 1999b. The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. *Development* **126**: 5515-22.
- Montero, J. A., Gañan, Y., Macias, D., Rodríguez-León, J., Sanz-Ezquerro, J. J., Merino, R., Chimal-Monroy, J., Nieto, M. A. and Hurle, J. M. 2001. Role of FGFs in the control of programmed cell death during limb development. *Development* **128**: 2075-84.
- Nelson, C. E., Morgan, B. A., Burke, A. C., Laufer, E., DiMambro, E., Murtaugh, L. C., Gonzales, E., Tessarollo, L., Parada, L. F. and Tabin, C. 1996. Analysis of Hox gene expression in the chick limb bud. *Development* **122**: 1449-66.
- Niederreither, K., Abu-Abed, S., Schuhbaur, B., Petkovich, M., Chambon, P. and Dolle, P. 2002a. Genetic evidence that oxidative derivatives of retinoic acid are not involved in retinoid signaling during mouse development. *Nat Genet* **31**: 84-8.
- Niederreither, K., McCaffery, P., Drager, U. C., Chambon, P. and Dolle, P. 1997. Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mech Dev* **62**: 67-78.
- Niederreither, K., Vermot, J., Messaddeq, N., Schuhbaur, B., Chambon, P. and Dolle, P. 2001. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse. *Development* **128**: 1019-31.

- Niederreither, K., Vermot, J., Schuhbauer, B., Chambon, P. and Dolle, P. 2000. Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo. *Development* **127**: 75-85.
- Niederreither, K., Vermot, J., Schuhbauer, B., Chambon, P. and Dollé, P. 2002b. Embryonic retinoic acid synthesis is required for forelimb growth and anteroposterior patterning in the mouse. *Development* **129**: 3563-74.
- Niswander, L. 2001. Vertebrate Embryo: Limb Development. *Encyclopedia of Life Sciences*: 1-7.
- Niswander, L., Jeffrey, S., Martin, G. R. and Tickle, C. 1994. A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb. *Nature* **371**: 609-12.
- Niswander, L., Tickle, C., Vogel, A., Booth, I. and Martin, G. R. 1993. FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell* **75**: 579-87.
- Noji, S., Nohno, T., Koyama, E., Muto, K., Ohyama, K., Aoki, Y., Tamura, K., Ohsugi, K., Ide, H., Taniguchi, S. and et al. 1991. Retinoic acid induces polarizing activity but is unlikely to be a morphogen in the chick limb bud. *Nature* **350**: 83-6.
- Oberlander, S. A. and Tuan, R. S. 1994. Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. *Development* **120**: 177-87.
- Ohuchi, H., Nakagawa, T., Itoh, N. and Noji, S. 1999. FGF10 can induce Fgf8 expression concomitantly with En1 and R-fng expression in chick limb ectoderm, independent of its dorsoventral specification. *Dev Growth Differ* **41**: 665-73.
- Ohuchi, H., Nakagawa, T., Yamamoto, A., Araga, A., Ohata, T., Ishimaru, Y., Yoshioka, H., Kuwana, T., Nohno, T., Yamasaki, M., Itoh, N. and Noji, S. 1997. The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development* **124**: 2235-44.
- Parr, B. A. and McMahon, A. P. 1995. Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature* **374**: 350-3.
- Paulsen, D. F., Langille, R. M., Dress, V. and Solursh, M. 1988. Selective stimulation of in vitro limb-bud chondrogenesis by retinoic acid. *Differentiation* **39**: 123-30.
- Pautou, M. P. 1974. Comparative development of interdigital morphogenetic necrosis in the foot of chick and duck embryos. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* **278**: 2209-12.
- Pautou, M. P. 1975. Morphogenesis of the chick embryo foot. *J Embryol Exp Morphol* **34**: 511-29.
- Pizette, S. and Niswander, L. 1999. BMPs negatively regulate structure and function of the limb apical ectodermal ridge. *Development* **126**: 883-94.
- Pizette, S. and Niswander, L. 2000. BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis: formation of prechondrogenic condensations and their differentiation into chondrocytes. *Dev Biol* **219**: 237-49.
- Qu, S., Li, L. and Wisdom, R. 1997a. Alx-4: cDNA cloning and characterization of a novel paired-type homeodomain protein. *Gene* **203**: 217-23.

- Qu, S., Niswender, K. D., Ji, Q., van der Meer, R., Keeney, D., Magnuson, M. A. and Wisdom, R. 1997b. Polydactyly and ectopic ZPA formation in *Alx-4* mutant mice. *Development* **124**: 3999-4008.
- Rancourt, D. E., Tsuzuki, T. and Capecchi, M. R. 1995. Genetic interaction between *hoxb-5* and *hoxb-6* is revealed by nonallelic noncomplementation. *Genes Dev* **9**: 108-22.
- Raynaud, A. 1990. Developmental mechanism involved in the embryonic reduction of limbs in reptiles. *Int J Dev Biol* **34**: 233-43.
- Riddle, R. D., Ensini, M., Nelson, C., Tsuchida, T., Jessell, T. M. and Tabin, C. 1995. Induction of the LIM homeobox gene *Lmx1* by *WNT7a* establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell* **83**: 631-40.
- Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E. and Tabin, C. 1993. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* **75**: 1401-16.
- Rodríguez-León, J., Merino, R., Macías, D., Gañan, Y., Santesteban, E. and Hurle, J. M. 1999. Retinoic acid regulates programmed cell death through BMP signaling. *Nature Cell Biology* **1**: 125-26.
- Ros, M. A., Sefton, M. and Nieto, M. A. 1997. Slug, a zinc finger gene previously implicated in the early patterning of the mesoderm and the neural crest, is also involved in chick limb development. *Development* **124**: 1821-9.
- Sakai, Y., Meno, C., Fujii, H., Nishino, J., Shiratori, H., Saijoh, Y., Rossant, J. and Hamada, H. 2001. The retinoic acid-inactivating enzyme *CYP26* is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo. *Genes Dev* **15**: 213-25.
- Saunders, J. W., Jr. 1998. Apical ectodermal ridge in retrospect. *J Exp Zool* **282**: 669-76.
- Saunders, J. W., Jr., Gasseling, M. T. and Gfeller, M. 1958. Interactions of ectoderm and mesoderm in the origin of axial relationships in the wing of the fowl. *J Exp Zool* **137**: 39-74.
- Saunders, J. W. J. 1948. The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of ectoderm. *J. Exp. Zool.* **108**: 363-403.
- Sefton, M., Sanchez, S. and Nieto, M. A. 1998. Conserved and divergent roles for members of the Snail family of transcription factors in the chick and mouse embryo. *Development* **125**: 3111-21.
- Sekine, K., Ohuchi, H., Fujiwara, M., Yamasaki, M., Yoshizawa, T., Sato, T., Yagishita, N., Matsui, D., Koga, Y., Itoh, N. and Kato, S. 1999. *Fgf10* is essential for limb and lung formation. *Nat Genet* **21**: 138-41.
- Seto, M. L., Nunes, M. E., MacArthur, C. A. and Cunningham, M. L. 1997. Pathogenesis of ectrodactyly in the Dactylaplasia mouse: aberrant cell death of the apical ectodermal ridge. *Teratology* **56**: 262-70.
- Summerbell, D., Lewis, J. H. and Wolpert, L. 1973. Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature* **244**: 492-6.

- Sun, X., Mariani, F. V. and Martin, G. R. 2002. Functions of FGF signaling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature* **418**: 501-8.
- Takahashi, M., Tamura, K., Buscher, D., Masuya, H., Yonei-Tamura, S., Matsumoto, K., Naitoh-Matsuo, M., Takeuchi, J., Ogura, K., Shiroishi, T., Ogura, T. and Belmonte, J. C. 1998. The role of Alx-4 in the establishment of anteroposterior polarity during vertebrate limb development. *Development* **125**: 4417-25.
- Thaller, C. and Eichele, G. 1988. Characterization of retinoid metabolism in the developing chick limb bud. *Development* **103**: 473-83.
- Thorogood, P. V. and Hinchliffe, J. R. 1975. An analysis of the condensation process during chondrogenesis in the embryonic chick hind limb. *J Embryol Exp Morphol* **33**: 581-606.
- Tickle, C., Alberts, B., Wolpert, L. and Lee, J. 1982. Local application of retinoic acid to the limb bud mimics the action of the polarizing region. *Nature* **296**: 564-6.
- Tickle, C., Lee, J. and Eichele, G. 1985. A quantitative analysis of the effect of all-trans-retinoic acid on the pattern of chick wing development. *Dev Biol* **109**: 82-95.
- Todt, W. L. and Fallon, J. F. 1984. Development of the apical ectodermal ridge in the chick wing bud. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **80**: 21-41.
- Wanek, N., Gardiner, D. M., Muneoka, K. and Bryant, S. V. 1991. Conversion by retinoic acid of anterior cells into ZPA cells in the chick wing bud. *Nature* **350**: 81-3.
- Wedden, S., Thaller, C. and Eichele, G. 1990. Targeted Slow-Release of Retinoids into Chick Embryos. *Methods in Enzymology* **190**: 201-09.
- Weston, A. D., Hoffman, L. M. and Underhill, T. M. 2003. Revisiting the role of retinoid signaling in skeletal development. *Birth Defects Res C Embryo Today* **69**: 156-73.
- White, J. A., Beckett-Jones, B., Guo, Y. D., Dilworth, F. J., Bonasoro, J., Jones, G. and Petkovich, M. 1997. cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochromes P450. *J Biol Chem* **272**: 18538-41.
- Yang, Y. and Niswander, L. 1995. Interaction between the signaling molecules WNT7a and SHH during vertebrate limb development: dorsal signals regulate anteroposterior patterning. *Cell* **80**: 939-47.
- Yokouchi, Y., Ohsugi, K., Sasaki, H. and Kuroiwa, A. 1991. Chicken homeobox gene Msx-1: structure, expression in limb buds and effect of retinoic acid. *Development* **113**: 431-44.
- Yokouchi, Y., Sakiyama, J., Kameda, T., Iba, H., Suzuki, A., Ueno, N. and Kuroiwa, A. 1996. BMP-2/-4 mediate programmed cell death in chicken limb buds. *Development* **122**: 3725-34.
- Zou, H. and Niswander, L. 1996. Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science* **272**: 738-41.
- Zou, H., Wieser, R., Massague, J. and Niswander, L. 1997. Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev* **11**: 2191-203.

Zuzarte-Luis, V., Montero, J. A., Rodríguez-León, J., Merino, R., Rodríguez-Rey, J. C. and Hurle, J. M. 2004. A new role for BMP5 during limb development acting through the synergic activation of Smad and MAPK pathways. *Dev Biol* **272**: 39-52.