



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**TGF-BETA INHIBE LA CASCADA MOLECULAR QUE
LLEVA A LA APOPTOSIS EN EL INTERDÍGITO DE
LA EXTREMIDAD DEL EMBRIÓN DE POLLO**

T E S I S

CON LA FINALIDAD DE OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

KARINA MARES SÁMANO



TUTOR: DR. JESÚS CHIMAL MONROY

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios Profesionales

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

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

"TGF-beta inhibe la cascada molecular que lleva a la apoptosis en el
interdígito de la extremidad del embrión de pollo"

realizado por **Karina Mares Sámano**

con número de cuenta **09815663-0**

Biología

quien cubrió los créditos de la licenciatura en

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

- Tutor (a) Propietario Dr. Jesús Chimal Monroy
- Propietario Dra. Rosa Estela Navarro
- Propietario Dr. David Garciadiego Cáz.
- Suplente Dra. Norma Angélica Moreno
- Suplente Dr. Iván Velasco Velásquez

Rosa Navarro

Atentamente

C

Dr. Zenón Cano Santana

del 2006

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

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.

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

Agradezco de manera especial a mis padres por el gran apoyo moral y económico que he recibido durante toda mi vida.

Gracias a mis hermanos Sergio y José Juan, por apoyarme siempre.

A mis dos mejores amigas: Alejandra, por sus consejos, compañía y por todos esos momentos de felicidad y diversión, a Marisol (Gabriela Maricela), por su paciencia, apoyo, comprensión y por estar siempre conmigo, Gracias!!!!

A mis amigos y compañeros de la Facultad: Angeles, Paula, Roberto, Erika, Nidia, Lizeth y Elena.

A mis amigas y compañeros de laboratorio: David, René, Marcia, Sinué, Georgina, Karla, David chiquito (por su gran apoyo técnico) Martha, Alberto y Emelí.

Y a “todas esas personas” que han estado conmigo y que sabiéndolo o no, han contribuido a la realización de esta tesis.

Y por supuesto a la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Ciencias y a todos mis maestros.

GRACIAS!!!!!!!

LISTA DE ABREVIATURAS.....	2
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
EL DESARROLLO DE LA EXTREMIDAD DE LOS VERTEBRADOS DEPENDE DE TRES CENTROS ORGANIZADORES.....	5
<i>Establecimiento del eje Próximo-Distal.....</i>	<i>5</i>
<i>Establecimiento del eje Anterior-posterior.....</i>	<i>7</i>
<i>Establecimiento del eje Dorsal-Ventral.....</i>	<i>8</i>
DESARROLLO DEL ESQUELETO.....	12
PAPEL DE Sox9 EN LA CONDRÓGENESIS.....	13
PAPEL DE LAS BMPs EN LA CONDRÓGENESIS.....	14
IMPORTANCIA DE LAS BMPs EN LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA.....	18
PAPEL DE Msx2 DURANTE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA.....	21
PAPEL DE Dkk1 DURANTE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA.....	23
LA APLICACIÓN EXÓGENA DE TGFB INDUCE CONDRÓGENESIS EN EL INTERDÍGITO DE LA EXTREMIDAD DE POLLO.....	26
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVO GENERAL.....	29
OBJETIVOS PARTICULARES.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
MATERIAL BIOLÓGICO.....	30
PREPARACIÓN DE PERLAS.....	30
IMPLANTACIÓN DE PERLAS INCUBADAS CON TGFB-1.....	30
PREPARACIÓN DE SONDAS.....	31
HIBRIDACIÓN IN SITU EN ÓRGANO COMPLETO.....	32
TINCIÓN DE ESQUELETO.....	34
TINCIÓN CON ROJO NEUTRO.....	34
RESULTADOS.....	35
LA APLICACIÓN EXÓGENA DE TGFB-1 INDUCE LA FORMACIÓN DE CARTÍLAGO EN EL INTERDÍGITO DE LA EXTREMIDAD DE POLLO.....	35
LA APLICACIÓN DE TGFB-1 EN EL TERCER INTERDÍGITO DE LA EXTREMIDAD DE POLLO, INHIBE LA MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS.....	36
LA APLICACIÓN DE TGFB-1 EN EL INTERDÍGITO DE POLLO INDUCE LA EXPRESIÓN ECTÓPICA DE Sox9.....	37
LA APLICACIÓN DE TGFB-1 EN EL TERCER INTERDÍGITO REGULA NEGATIVAMENTE LA EXPRESIÓN DE BMP-7, 1 HORA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO.....	39
LA APLICACIÓN DE TGFB-1 EN EL TERCER INTERDÍGITO REGULA NEGATIVAMENTE LA EXPRESIÓN DE Dkk1 16 HORAS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO.....	40
LA APLICACIÓN DE TGFB-1 EN EL TERCER INTERDÍGITO DE POLLO REGULA NEGATIVAMENTE LA EXPRESIÓN DE Msx2, 24 HORAS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO.....	41
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIONES.....	48
REFERENCIAS.....	49

RESUMEN

Dos procesos fundamentales durante el desarrollo de las extremidades, son la condrogénesis y la muerte celular programada ó apoptosis. El balance entre ambos procesos, ayuda a dar la forma final de los dedos de las extremidades, y por lo tanto, un correcto funcionamiento.

La muerte celular programada es un proceso importante para que se lleve acabo la regresión de las zonas interdigitales, y por lo tanto que los dígitos adquieran su morfología final. En este trabajo evaluamos el efecto que tiene una señal condrogénica como el TGF β , sobre la expresión de genes involucrados en la muerte celular programada en el interdígito en embriones de pollo, como son *Bmp-7*, *Msx2* y *Dkk1*

Al aplicar TGF β en el interdígito de embriones de pollo, se activa la cascada molecular de la condrogénesis, que inicia con la expresión de Sox9 solo 30 minutos después de la aplicación, lo que conduce a la formación de un dedo ectópico. Este hecho inhibe la expresión tanto de *Bmp-7*, *Dkk1* y de *Msx2*, en el tejido interdigital. Los resultados muestran que la expresión de *Bmp-7* se inhibe tempranamente, 1 hora después del tratamiento. Por otro lado la expresión de *Dkk* y *Msx-2* se inhibe 16 y 24 horas después del tratamiento respectivamente. Estos resultados sugieren, que TGF β podría regular directamente la expresión de Sox 9, y que Sox9 probablemente regula de manera directa la expresión de Bmp-7. Por otro lado creemos que la inhibición tanto de Dkk1 como de Msx2 podría ser principalmente una consecuencia de la formación de cartílago en el tejido interdigital.

INTRODUCCIÓN

“La formación del cartílago es un proceso esencial en la esquetogénesis de los vertebrados, en la cual se forman estructuras muy complejas e importantes tales como los son las extremidades. Debido a este proceso hace 360 millones de años nuestros antecesores empezaron a desplazarse sobre la tierra con la ayuda de apéndices pareados, además la evolución de las extremidades permitió distintos tipos de locomoción, que van desde correr hasta volar” (Mariani and Martin, 2003).

El desarrollo de las extremidades de vertebrados empieza con la formación de un pequeño primordio en lugares específicos sobre el eje del cuerpo llamados campos de la extremidad. La posición de las extremidades depende del nivel de las somitas (Burke et al., 1995). 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).

Mientras avanza el desarrollo de la extremidad, ésta crece de manera que se forman los diferentes elementos esqueléticos que la componen: en la región proximal, el estilópodo (húmero/fémur) adyacente a la pared del cuerpo; el zeugópodo (radio-ulna/ tibia-fíbula) en la región media; y en la parte distal, el autópedo (carpos-tarsos/dedos; Figura 1; Gilbert, 2000).

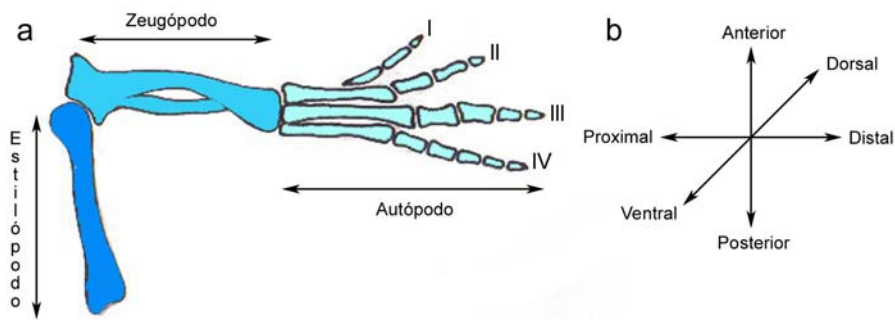


Figura 1. Esquema que representa el patrón esquelético de la extremidad en pollo. (a) Elementos esqueléticos que conforman la extremidad, estilópodo, zeugópodo y autópodo. Los dedos del autópodo de pollo se han numerado de acuerdo al número de articulaciones que presentan, el dedo I con dos articulaciones, el dedo II, III y IV, con 3, 4 y 5 articulaciones respectivamente. (b) Para su mejor estudio, la extremidad se ha dividido en tres ejes anatómicos; el próximo-dístal, el antero-posterior y el dorso-ventral.

El primordio de la extremidad surge cuando células mesenquimales indiferenciadas proliferan y migran desde, de la placa lateral del mesodermo y de las somitas, hacia el campo de la extremidad.

El desarrollo de la extremidad de los vertebrados depende de tres centros organizadores.

Establecimiento del eje Próximo-Distal

Una vez formado el primordio de la extremidad ocurre el crecimiento próximo-distal, dirigido por una estructura llamada Cresta del Ectodermo Apical (AER por sus siglas en inglés; Figura 2a), esta estructura es distinta al ectodermo de los bordes laterales del primordio de la extremidad. La AER es un epitelio pseudo-estratificado y engrosado que se encuentra en la parte más distal de la extremidad, teniendo como función mantener la proliferación y

sobrevivencia celular y como consecuencia, el crecimiento próximo-distal de la extremidad.

La función de la AER se evidenció en 1948 cuando Saunders (1948) removió esta estructura del primordio de la extremidad de pollo en varios estadios del desarrollo. Cuando la AER se removió en etapas tempranas del desarrollo, el zeugópodo y el autópodo no se formaron (Figura 2b2), pero cuando la AER se removió en etapas más tardías (Figura 2b3) solo el autópodo no se formó. De esta manera, se determinó la función de la AER en el crecimiento proximal-distal de la extremidad (Figura 2b; Mariani and Martin, 2003).

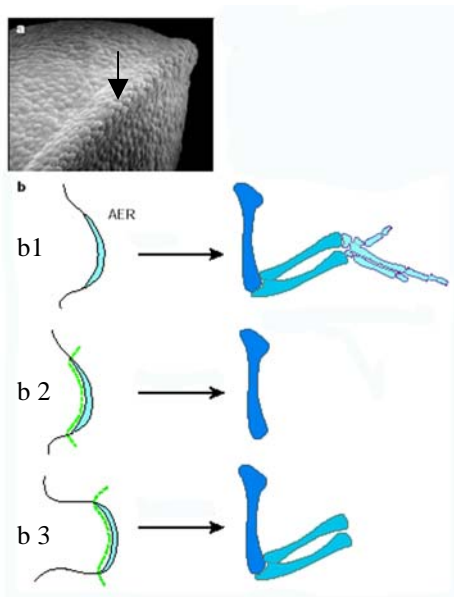


Figura 2. Importancia de la AER para el crecimiento normal de la extremidad. (a) Micrografía electrónica de barrido, donde se muestra el primordio de la extremidad, así como la AER (Tomada del Gilbert, 2000). (b1) Esquema donde se muestra el crecimiento normal en sentido proximal-distal de la extremidad. Las alteraciones que presenta este eje cuando se remueve la AER en diferentes etapas del desarrollo. Si se remueve en una etapa temprana (b2) el resultado es la formación del elemento más proximal, en cambio cuando la AER es removida en etapas más tardías (b3) resulta en el truncamiento de los elementos más distales. (Tomada de Mariani and Martin, 2003).

Varios experimentos muestran que la formación de los elementos esqueléticos distales pueden ser rescatados aplicando la proteína FGF en la parte más distal de los primordios de extremidades de embriones de pollo, lo

cual sugiere que algunos miembros de esta familia son secretados por dicha estructura de la cual se derivan las señales requeridas para el desarrollo de la extremidad (Sun et al., 2002). Entre los genes que se expresan en la AER se encuentran los factores de crecimiento de fibroblastos 4 y 8 (*Fgf4* y *Fgf8*).

Cuando se eliminan los genes *Fgf4* y *Fgf8* de la AER la extremidad no se forma, sin embargo, la inactivación de *Fgf8* puede causar hipoplasia de los tres segmentos de la extremidad, mientras que la inactivación tanto de *Fgf4* como de *fgf8* produce alteraciones más severas (Sun et al., 2002).

Establecimiento del eje Anterior-posterior

Un segundo centro organizador involucrado en el desarrollo de la extremidad es la Zona de Actividad Polarizante (ZPA) que reside en el mesénquima del margen posterior de la extremidad. Su función se mantiene por señales que provienen de la AER, y controla la simetría anterior-posterior de la extremidad, la cual se puede distinguir por la posición de los dedos, es decir, en el caso de los humanos, el dedo pulgar está hacia la parte anterior y el dedo meñique hacia la parte posterior. El trasplante de la ZPA a la región anterior de la extremidad de pollo, causa la duplicación en imagen especular de los elementos esqueléticos (Figura 3; Tickle, 1981). Estos resultados sugieren que el modelo de la ZPA es responsable del establecimiento del patrón normal anterior-posterior de la extremidad (Riddle et al., 1993).

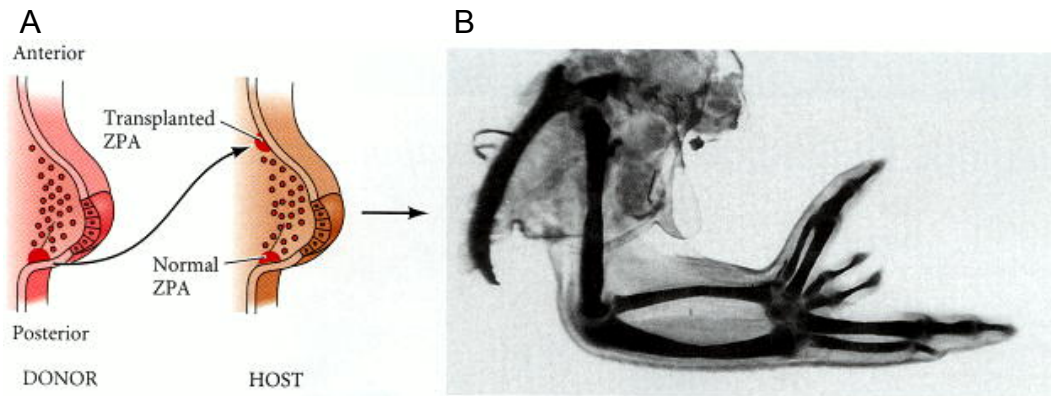


Figura 3. El transplante de la ZPA da como resultado la formación de una extremidad en imagen especular. A) Esquema donde se muestra el transplante de células del mesodermo de la parte posterior, hacia el mesodermo de la parte anterior. B) Fotografía donde se observa el resultado del transplante de la ZPA: la duplicación de los dígitos que origina una extremidad en imagen especular. (Tomada de Gilbert 2000).

En la búsqueda de las moléculas que confieren a esta región la actividad polarizante, se encontró que el gen *Sonic hedgehog (Shh)*, se expresa específicamente en la ZPA, además la aplicación ectópica de la proteína (SHH) en la región anterior de la extremidad de pollo es suficiente para inducir un fenotipo igual al obtenido con el transplante de la ZPA, lo que sugiere una correlación entre la ZPA y *Shh* (Riddle et al., 1993).

Establecimiento del eje Dorsal-Ventral

El tercer centro organizador es el que establece el eje dorsal-ventral de la extremidad, que se distingue entre el dorso y la palma de la mano.

En 1974 MacCabe y colaboradores demostraron que la polaridad dorso-ventral de la extremidad está controlada por señales que provienen del ectodermo. Cuando se rota 180° el ectodermo de las extremidades de embriones de pollo con respecto al mesénquima del primordio de la extremidad

resulta que el eje dorsal-ventral se invierte parcialmente. Los elementos dístales (dedos) están al revés, lo que sugiere aún más que la especificación del eje dorsal-ventral de la extremidad está regulada por componentes del ectodermo.

Estudios recientes han establecido que las señales moleculares que establecen dicho patrón provienen del ectodermo y que están mediadas por un miembro de la familia de los factores de crecimiento *Wnt* (*Wingless-int related protein*); *Wnt7a* (Parr and McMahon, 1995). Este factor de crecimiento se expresa solo en el ectodermo dorsal durante los estadios iniciales del primordio de la extremidad en ratón (Parr et al., 1993) y en pollo (Dealy et al., 1993). La eliminación de este gen en ratones sugiere que actúa en el establecimiento del patrón dorsal de la extremidad (Parr and McMahon, 1995).

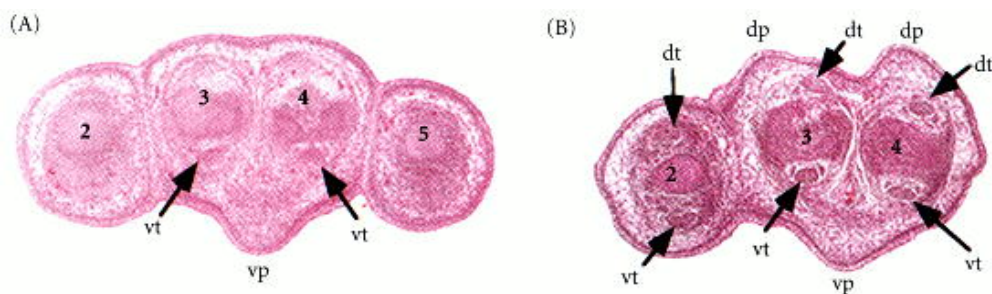


Figura 4. La anulación del gen *Wnt7a* en embriones de ratón, causa una transformación de la región dorsal a ventral.

Para determinar la función del gen *Wnt7a* en la dorsalización de la extremidad se realizaron experimentos en donde la pérdida de función de *Wnt7a* en ratones mutantes da como resultado una transformación de estructuras dorsales a estructuras ventrales (Figura 4; Logan et al., 1997).

Wnt7a es uno de los primeros genes que se expresan en el eje dorsal-ventral durante el desarrollo de la extremidad, éste a su vez induce la activación del factor de transcripción *Lmx1* en el mesénquima dorsal, que parece ser esencial para establecer el destino dorsal de las células (Gilbert, 2000). Cuando la proteína LMX1 se expresa ectópicamente en células del mesénquima ventral, estas células desarrollan un fenotipo dorsal (Riddle et al., 1995).

Por otra parte, los ratones deficientes en *Wnt7a* carecen tanto de estructuras dorsales como de los dígitos posteriores, debido tal vez a que la expresión de *Shh* se redujo, sugiriendo que *Wnt7a* también participa en el establecimiento del eje anterior-posterior (Yang and Niswander, 1995).

En cuanto a las señales moleculares involucradas en el patrón ventral, los análisis de mutaciones en ratones muestran que el gen *Engrailed* (*En-1*) participa en el establecimiento de dicho patrón (Loomis et al., 1996; Wurst et al., 1994). *En-1* se expresa en todo el ectodermo ventral tanto en ratón como en pollo (Davis et al., 1991) y la pérdida de su función da como resultado que estructuras con fenotipo dorsal cambien a un fenotipo ventral (Loomis et al., 1996). Además dichos embriones mutantes, resultan con la expresión ventral de *Wnt7a* (Logan et al., 1997).

Los tres ejes anteriormente descritos se encuentran relacionados y coordinados entre si, ya que algunas de las moléculas que definen a uno de estos ejes, son necesarias para el mantenimiento de otro, así por ejemplo, *Shh* en la ZPA induce la expresión de *Fgf4* en la región posterior de la AER, el cual es importante para la incorporación de células mesenquimales hacia la Zona de

Progreso y también para el mantenimiento de *shh* en la ZPA (Li and Muneoka, 1999).

Una vez establecidos los centros organizadores, el primordio de la extremidad crece en sentido próximal-distal formándose primero los elementos esqueléticos del estilópodo y por último los del autómodo (Figura 5; Dudley et al., 2002). Así, las células mesenquimáticas interpretan las señales de los tres centros para seguir uno de los dos posibles destinos: condrogénesis o muerte celular por apoptosis, dependiendo de si ellas son incorporadas hacia lo que serán las regiones de los radios digitales o hacia las regiones interdigitales (Figura 6).

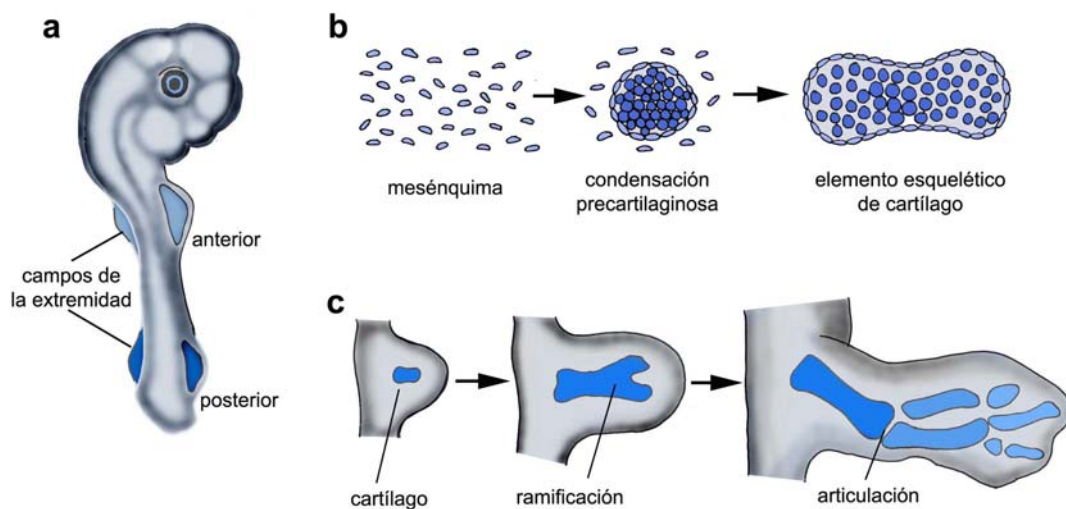


Figura 5. Formación del esqueleto apendicular en la extremidad de pollo. (a) Regiones ubicadas a lo largo del cuerpo del embrión donde se formarán las extremidades, conocidas como campos de la extremidad. (b) Esquema donde se muestra el inicio de las agregaciones de las células del mesénquima que posteriormente van a diferenciarse y dar origen al esqueleto cartilaginoso. (c) Una vez que se ha formado el elemento cartilaginoso este crece y se ramifica dando origen a las articulaciones y a los diferentes elementos esqueléticos que forman a la extremidad. (Garcíadiago-Cázares, 2005).

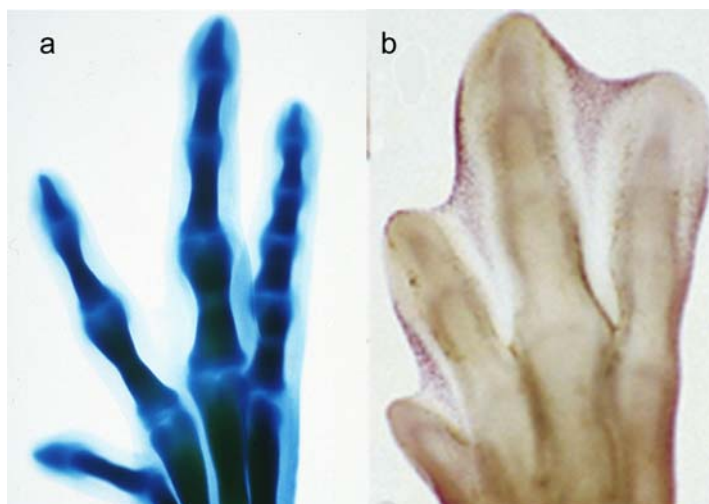


Figura 6. Las células del mesénquima tienen dos posibles destinos. (a) Si las células del mesénquima son incorporadas hacia lo que serán los radios digitales éstas formarán cartílago. (b) Por otro lado, si éstas son incorporadas hacia lo que serán las regiones interdigitales morirán por apoptosis.

Desarrollo del esqueleto

La formación del esqueleto parece estar regulada en un punto de referencia molecular que establece y coordina tempranamente el primordio de la extremidad, que controla y precede la diferenciación del mesodermo. Este paso temprano en el modelo del esqueleto es seguido por la expresión regulada de señales moleculares que diferencian directamente el mesodermo hacia el linaje condrogénico, prefigurando los elementos esqueléticos. Este proceso de determinación celular es muy complejo, así como la formación, coordinación y establecimiento de las piezas del esqueleto, que incluye la definición de futuras diáfisis y epífisis, de los huesos, la determinación de la posición de las articulaciones, el establecimiento de los límites del cartílago, la formación del

pericondrio y la regulación de la ubicación de los tendones en el lugar apropiado (Merino et al., 1999).

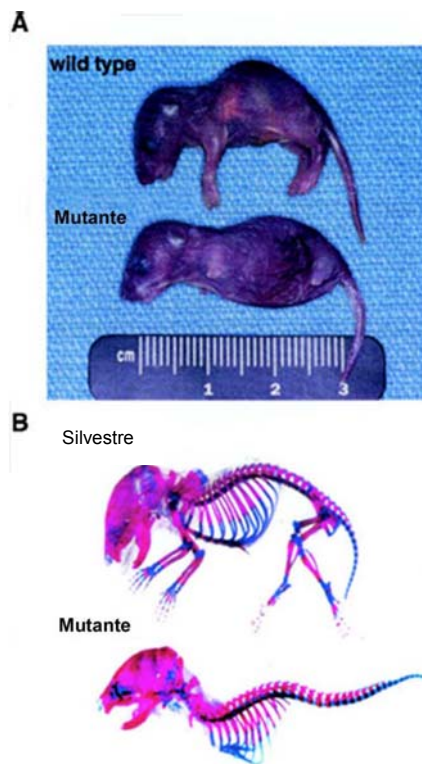
Básicamente el esqueleto se compone de dos tipos de tejido; cartílago y hueso, compuesto por condrocitos y osteoblastos respectivamente.

Las células mesenquimatosas de la extremidad en desarrollo forman agregaciones celulares que darán origen a las células precartilaginosas. Éstas se caracterizan porque son regiones de muy alta densidad celular, donde las adhesiones célula-célula son muy importantes para su formación y se han involucrado moléculas como la β -catenina y N-cadherina. Posterior a las agregaciones ocurre la diferenciación del cartílago. Finalmente estas células serán reemplazadas por hueso mediante el proceso llamado Osificación endocondral.

Papel de Sox9 en la condrogénesis

La diferenciación hacia cartílago está relacionada con la expresión de Sox9, un factor de transcripción, presente en todas las células precondrogénicas y en los condrocitos diferenciados (Akiyama et al., 2002; Bi et al., 1999). Sox9 es también conocido como el gen maestro de la condrogénesis, ya que la sobreexpresión de este gen es suficiente para inducir la diferenciación de las células del mesénqima hacia cartílago. Las alteraciones en este gen, causa entre otros el síndrome conocido como displasia campomélica caracterizada por presentar anomalías en el esqueleto (Wagner et al., 1994; Bi et al., 2001). Mutaciones en el gen Sox9 tiene como consecuencia la inhibición de la

formación de las agregaciones precondrogénicas y por lo tanto la ausencia de cartílago (Figura 7).



Papel de las BMPs en la condrogénesis

Otros factores involucrados en la condrogénesis son las Proteínas Morfogenéticas de Hueso (BMP) que constituyen una larga familia de proteínas secretadas pertenecientes a la superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante β (TGF β), que ejercen su función a través de receptores de membrana celular tipo I y tipo II, los cuales son cinasa de serina /treonina y ambos son necesarios para transducir la señalización de los ligandos. Existen

tres tipos de receptores tipo I BMPR-1a ó ALK-3, BMPR-1b ó ALK-6 Y ALK-2. Originalmente, la señalización de las BMPs se involucró en la condrogénesis, debido a su capacidad de inducir condrogénesis ectópica en animales adultos (Urist, 1968).

Los receptores de BMP presentan un patrón de expresión específico durante el desarrollo de la extremidad. En etapas tempranas de la formación de los dedos, el receptor *BmpR-1a* se expresa en bajos niveles en el mesodermo indiferenciado de la extremidad (Merino et al., 1998; Nohno et al., 1995), posteriormente la expresión de *BmpR-1a* llega a ser restringida al cartílago lo que sugiere el papel de este receptor en la condrogénesis (Zou et al., 1997). Además la sobre-expresión de una forma constitutiva activa (que transduce la señal sin necesidad del ligando) del receptor *BmpR-1a* durante el desarrollo de los dígitos bloquea la diferenciación de los condrocitos en la fase de hipertrofia (Zou et al., 1997).

Por otro lado, la expresión del otro receptor de BMP, *bmpR-1b*, se observa fuertemente en las condensaciones mesenquimatosas de los radios digitales (Kawakami et al., 1996; Merino et al., 1998; Zou et al., 1997), lo cual también sugiere el papel de las BMPs en la condrogénesis. Cuando se administra BMP en la punta de los dedos, lugar donde *bmpR-1b* se expresa, da como resultado el alargamiento dramático del cartílago (Merino et al., 1998), por otra parte cuando se sobre-expresa la forma dominante negativa (que no transduce señal) da como resultado la inhibición de la condrogénesis (Kawakami et al., 1996; Zou et al., 1997).

Muerte Celular Programada durante el desarrollo de la extremidad.

Otro papel en el cual se han involucrado a las BMPs, es en la muerte celular programada ó apoptosis, que es el otro destino que pueden tener las células mesenquimatosas que son incorporadas hacia lo que serán las regiones interdigitales (Figura 6b).

La muerte celular programada ó apoptosis presenta características en particular como lo son: la pérdida del contacto de la membrana celular con el citoesqueleto, la fragmentación del DNA en fragmentos de tamaño específico; 180 pares de bases, así como la formación de cuerpos apoptóticos los cuales son fagocitados por macrófagos. Por el contrario, el otro tipo de muerte que suele presentarse en las células es la necrosis, en donde se presenta un hinchamiento de la célula y por consiguiente el rompimiento de la membrana celular, y generalmente provoca inflamación en los tejidos (Wyllie et al., 1980)

La apoptosis es un proceso celular muy importante, que regula varios procesos durante el desarrollo animal, como el número de células en diferentes tejidos. Además contribuye a “esculpir” la forma final de distintos órganos, por ejemplo la morfología final de los dígitos en los vertebrados tetrápodos. En especies con dígitos libres como el pollo (Pautou, 1975), ratón (Milaire, 1977) y el humano (Kelley, 1970) la apoptosis se extiende por todo el espacio interdigital, en cambio en especies con dígitos palmeados como el pato o la tortuga, la apoptosis está limitada a la parte distal de este tejido (Fallon and Cameron, 1977; Saunders, 1966). Estas zonas de muerte interdigital han recibido el nombre de zonas necróticas interdigitales (INZ).

Además de las zonas necróticas interdigitales (INZ) las cuales se ubican entre las zonas donde se desarrollan los dedos, existen otras áreas bien caracterizadas donde ocurre apoptosis, y que están también correlacionadas con el patrón esquelético de la extremidad. Estas zonas de muerte son: la zona necrótica anterior (ANZ) y la zona necrótica posterior (PNZ), las cuales son áreas del mesodermo que rodean los bordes anterior y posterior de la extremidad, respectivamente. Además se han relacionado con la reducción del número de dedos en las aves, ya que los mutantes que presentan polidactilias (aumento en el número de dedos) carecen de estas zonas apoptóticas (Hinchliffe and Ede, 1968).

Otro sitio de muerte celular está también presente en el mesénquima central de la extremidad el cual ha sido denominado Parche Opaco (OP) (Hinchliffe and Thorogood, 1974), que se piensa está relacionado con la separación de la úlna y el radio en extremidades anteriores y de la tibia y la fíbula en extremidades posteriores. Se ha observado que en pollos mutantes que carecen de esta área apoptótica presentan fusión de estos dos huesos (Hinchliffe and Ede, 1968).

Aunque las INZ, ANZ, PNZ y OP son las áreas mejor caracterizadas donde ocurre muerte celular durante el desarrollo de la extremidad, ésta también se observa en otros dominios tales como la AER. Esta área de muerte es particularmente importante, ya que dirige el crecimiento de la extremidad, por lo que alteraciones en dicha estructura resulta en consecuencias dramáticas tal como el truncamiento de la extremidad (Saunders and Reuss, 1974).

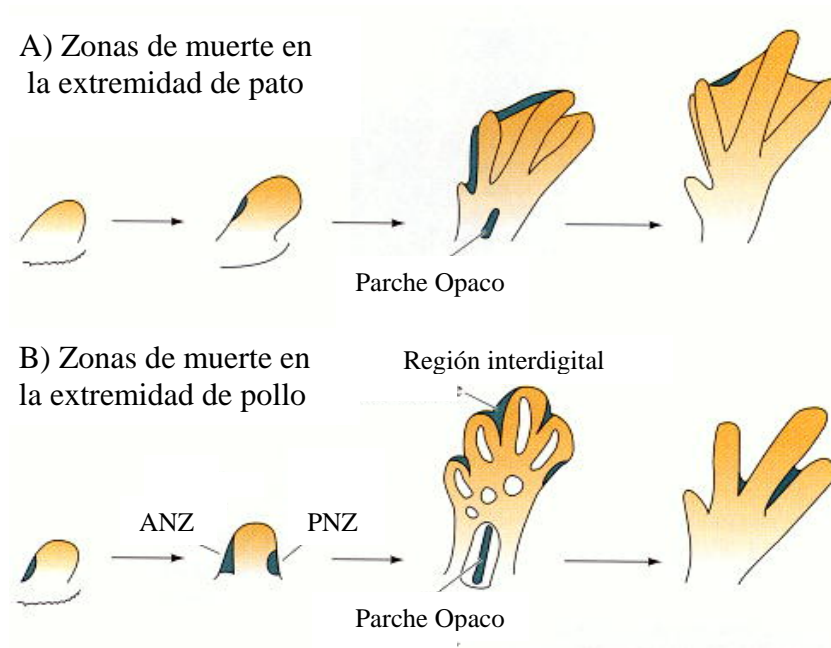


Figura 8. Esquema comparativo que representa las diferentes zonas donde ocurre muerte celular en el primordio de pato y de pollo. (A) En el primordio de la extremidad en pato observamos una pequeña zona de muerte celular en lo que correspondería a la zona necrótica anterior (ANZ), también se observamos una zona de muerte llamada parche opaco, así como en la parte más distal de los interdógitos. (B) Esquema del primordio de la extremidad de pollo donde se muestran las zonas de muerte celular que corresponden a la zona necrótica anterior y posterior (ANZ y PNZ), el parche opaco (OP), y las regiones interdigitales, nótese que en comparación con la extremidad de pato, en la extremidad de pollo, la muerte celular no se limita a la parte más distal de los interdógitos, si no que ocurre en todo el tejido (Tomada de Gilbert, 2000).

Importancia de las BMPs en la muerte celular programada

Si bien no se conoce la cascada molecular que conduce a la apoptosis en el interdígito, si se conocen algunos de los genes que están involucrados en ella. Estudios realizados en embriones de pollo han revelado parte del mecanismo molecular responsable de su inducción durante el desarrollo de la extremidad.

Cuatro miembros de la familia de las BMP; BMP2, BMP4, BMP5 y BMP7, se expresan durante el desarrollo de la extremidad, en el mesodermo indiferenciado, en la AER y en el mesodermo interdigital (Francis et al., 1994;

Francis-West et al., 1995; Lyons et al., 1995; Macias et al., 1997; Laufer et al., 1997; Zuzarte-Luis and Hurlé, 2004), además de que *Bmp-2* y *Bmp-7* también se expresan en regiones donde se forman las articulaciones y en el pericondrio (Macias et al., 1997).

Para evidenciar el papel de las BMP en la muerte celular durante el desarrollo de la extremidad, se han realizado varios experimentos. En primer lugar se administró la forma proteica de diferentes BMP en varias etapas del desarrollo de la extremidad de pollo, en donde se observó que, en general la aplicación de BMP induce muerte celular (Gañan et al., 1996; Laufer et al., 1997; Yokouchi et al., 1996; Zuzarte-Luis et al., 2004). Cuando las BMP fueron implantadas en el primordio de la extremidad en E19-25 (Hamburger and Hamilton, 1951), se observó un área ectópica de muerte celular en el mesénquima indiferenciado.

En etapas posteriores del desarrollo, E27-29, donde ya se observa la formación de los dedos y principalmente las áreas de muerte celular que corresponden a las zonas interdigitales, la perla con BMP, fue implantada en este tejido, resultando en una aceleración de la muerte celular (Figura 9; Macias et al., 1997).

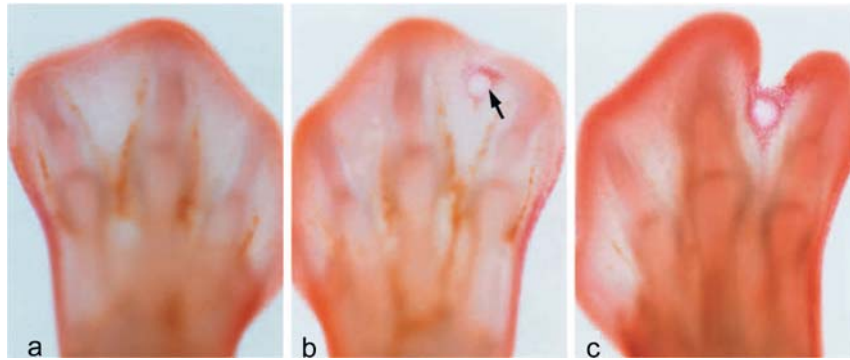


Figura 9. La aplicación exógena de Bmp acelera la muerte celular en el interdígito en la extremidad de pollo. (a) Extremidad control teñida con el colorante rojo neutro. (b) Extremidad teñida con rojo neutro (el cual tiñe células muertas) después de la aplicación de una perla incubada con BMP en el tercer interdígito 10 horas después. (c) Patrón de muerte celular 20 horas después de la aplicación de la perla (Tomada de Gañan et al., 1996).

Estos resultados sugieren fuertemente la participación de las BMP en la muerte celular del tejido interdigital. Experimentos realizados con antagonistas para BMP como lo es Gremlin (Merino et al., 1999) ó Nogina (Merino et al., 1998; Merino et al., 1999) da como resultado la inhibición de la muerte celular interdigital (Figura 10), lo que comprueba que estas moléculas son necesarias para que se lleve a cabo el proceso de apoptosis.

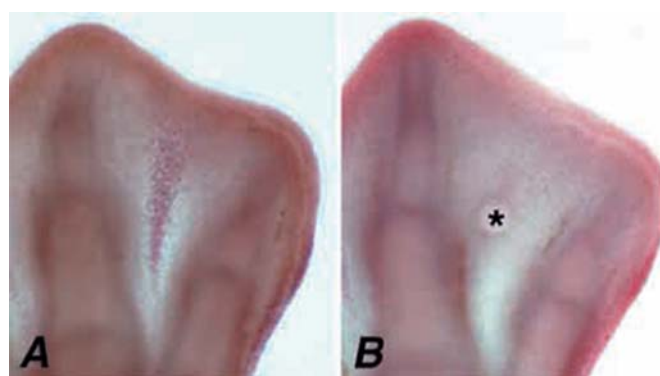


Figura 10. Inhibición de la muerte celular por un antagonista de BMP. (A) Extremidad control donde observamos la distribución de la muerte celular a lo largo del interdígito. (B) Tinción de muerte celular, 20 horas después de la implantación de una perla incubada con Gremlin, un antagonista de BMP. (*) Nótese la ausencia de muerte celular en el interdígito (Tomada de Merino et al., 1999).

Durante el desarrollo de la extremidad, el gen homeótico, *Hoxa13* se expresa en pequeñas regiones del tejido interdigital, además de que su función es requerida para que se lleve a cabo la muerte celular programada. Se sabe que *Hoxa13*, regula directamente la expresión de *Bmp-2* y *Bmp-7*, ya que en experimentos realizados donde se pierde la función de *Hoxa13*, la expresión de estos genes se observa altamente disminuida (Knosp et al., 2004).

Otros genes que se han involucrado en la muerte celular programada, de acuerdo a su patrón de expresión y por experimentos de ganancia o pérdida de su función durante el desarrollo de la extremidad, son los genes *Msx2* y *Dkk1*.

Papel de *Msx2* durante la Muerte Celular Programada

Msx2 es un factor de transcripción el cual se expresa en la AER en etapas tempranas del desarrollo de la extremidad, en el mesodermo del margen anterior, y en un grupo de células mesodérmicas del margen posterior (Coelho et al., 1991; Nohno et al., 1992; Yokouchi et al., 1991). En etapas posteriores, la expresión de *Msx2* se expande hacia el mesodermo distal y posteriormente se extiende hacia el mesodermo interdigital que demarca el desarrollo de los dígitos durante el desarrollo de la extremidad. Cabe mencionar que los dominios de expresión de *Msx2*, que incluyen el mesodermo anterior, la PNZ, y el mesénquima interdigital, presentan considerablemente menor proliferación, en comparación con las células que se encuentran subyacentes a las AER (Cameron and Fallon, 1977; Dealy and Kosher, 1995; Pollak and Fallon, 1976),

además su expresión también concuerda con algunas regiones donde ocurre muerte celular programada (Saunders and Gasseling, 1962).

Experimentos para evaluar la función de *Msx2*, se realizaron al sobre-expresarlo en el mesodermo posterior, lo que dio como resultado la formación de extremidades severamente angostas a lo largo del eje anterior-posterior, que ocasionalmente se truncan, además de presentar alteraciones en el patrón de formación de los elementos esqueléticos (Ferrari et al., 1998). Por otra parte, el fenotipo resultante en el ratón doble “Knockout” (KO) de *Msx1* y *Msx2* es la ausencia del dígito I, la pérdida de falanges en los dígitos II, III, IV y V, la persistencia del tejido interdigital, además de que no se forma el radio (Figura 11; Lallemand et al., 2005). Estos resultados nos sugieren la participación de estos genes en el control de la muerte celular por apoptosis.

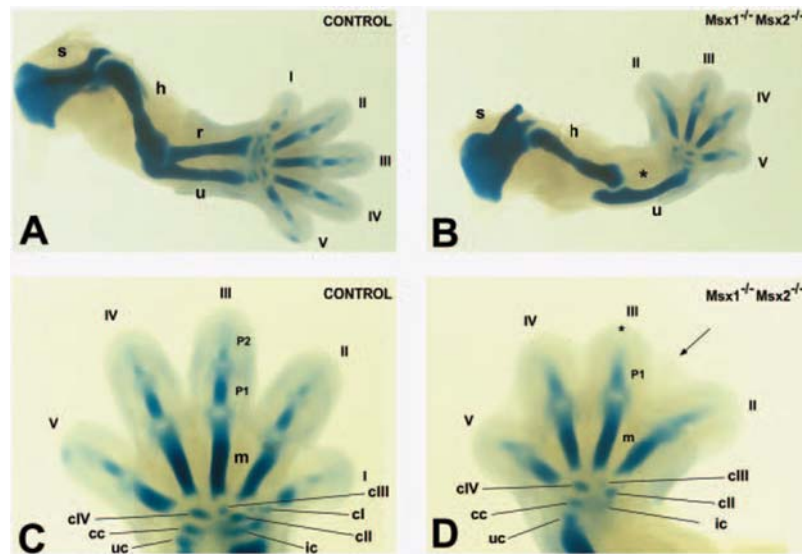


Figura 11. Tinción de esqueleto que muestra el Fenotipo del doble mutante de *Msx1*^{-/-}; *Msx2*^{-/-} en embriones de ratón. (A) Extremidad control. (B) Doble mutante de *Msx1*^{-/-}; *Msx2*^{-/-}, donde se observa una reducción en el tamaño de la extremidad, así como la pérdida del radio. (C,D) Aumento de los autópodos de A y B respectivamente. En (D) se observa que en los dígitos II, III, IV y V, solo se ha desarrollado una falange, además de que no hay regresión del tejido interdigital (Tomada de Lallemand et al., 2005).

Así mismo, se observó que la expresión de *Msx2* en el interdígito es dependiente de BMP, ya que al aplicar una perla incubada con Gremlin, un antagonista de BMP, en el interdígito de la extremidad de pollo, la expresión de *Msx2*, se inhibe (Figura 12; Merino et al., 1999), lo que también sugiere un papel de *Msx2* en la muerte celular.

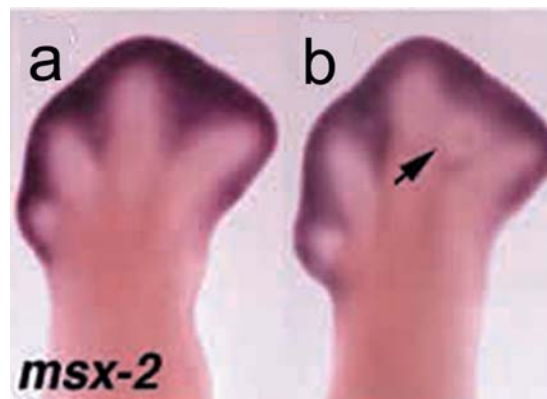


Figura 12. Inhibición de la expresión de *Msx2* por Gremlin, un antagonista de BMP. (a) Extremidad control de la expresión de *Msx2*. (b) Inhibición de la expresión de *Msx2* 15 horas después de la implantación de una perla incubada con Gremlin un antagonista de BMP, en el interdígito (Tomada de Merino et al., 1999).

Papel de *Dkk1* durante la Muerte Celular Programada

Dkk1 es otro factor involucrado con la muerte celular en el interdígito, que actúa como antagonista de la vía de señalización Wnt/ β catenina (Zorn, 2001). *Dkk1* es miembro de una familia de proteínas secretadas, que originalmente fueron aisladas en *Xenopus* (Glinka et al., 1998), con homólogos que han sido identificados en diferentes vertebrados, como en pollo, pez, ratón y humano. La expresión de *Dkk1* durante el desarrollo de la extremidad de ratón llega a ser restringida en la ANZ, PNZ al igual que en la AER. Finalmente su expresión

se ubica en los espacios interdigitales. La expresión en pollo se da de una manera similar (Mukhopadhyay et al., 2001).

La expresión en tiempo y espacio de *Dkk1* durante el desarrollo de la extremidad en vertebrados coincide significativamente con los sitios donde ocurre muerte celular programada (Grotewold and Ruther, 2002; Grotewold et al., 1999; Mukhopadhyay et al., 2001).

Los ratones mutantes nulos para *Dkk1* presentan sindactilias y variablemente la aparición de un dedo ectópico en la zona anterior y posterior, que resultan de la reducción de la muerte celular programada en las zonas interdigitales, en la ANZ así como en la PNZ respectivamente (Mukhopadhyay et al., 2001). Además, la expresión de *Msx2* se reduce, lo que sugiere que los dedos ectópicos formados en este mutante son el resultado de la alteración en los mecanismos que regulan la muerte celular programada.

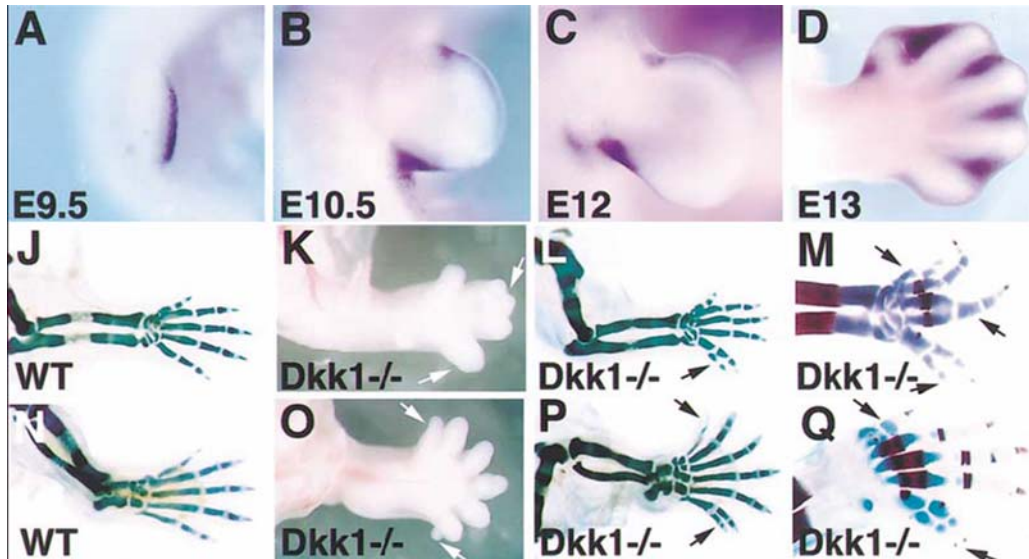


Figura 13. La ausencia de *Dkk1* produce alteraciones en el crecimiento de la extremidad en ratón. En A-D se muestra la expresión de *Dkk1* en diferentes etapas de desarrollo en ratón. (A) La expresión se localiza en el ectodermo de la parte más distal. (B y C) Posteriormente se observa tanto en la zona necrótica anterior como posterior, sitios donde ocurre muerte celular. (D) Finalmente, en etapas más tardías su expresión se localiza en las áreas interdigitales. En J-Q, se muestran tinciones de esqueleto de extremidades silvestres y de mutantes nulos para *Dkk1* en ratón (J y N) Tinción de esqueleto en extremidad normal, anterior y posterior respectivamente. (K y O) Los dígitos en la parte más distal no están claramente separados por el tejido interdigital. (L, M, P, Q) Adicionalmente se desarrollaron dígitos tanto axiales como postaxiales en el mutante nulo de *Dkk1* (Tomada de Mukhopadhyay et al., 2001).

Por otro lado, la expresión de *Msx1* y de *Dkk1* es dependiente de BMP, ya que la administración ectópica de BMP en el interdígito induce su expresión. Sin embargo, la sobre-expresión de *Dkk1* regula negativamente la expresión de *Bmp-2*, tanto en las células del mesénquima como en la AER (Mukhopadhyay et al., 2001).

Hasta este punto hemos descrito los dos posibles destinos que tienen las células mesenquimatosas del autópodo, la de diferenciarse hacia cartílago y dar origen a los dedos ó la de morir por apoptosis, si éstas son incorporadas hacia

las futuras zonas interdigitales donde se mantienen por un tiempo en estado indiferenciado, antes de degenerar (Garcia-Martinez et al., 1993).

Sin embargo, los análisis experimentales han revelado que las zonas interdigitales que originalmente están destinadas a morir por apoptosis presentan un gran potencial condrogénico, es decir que son capaces de responder a señales condrogénicas y formar dedos extras (Hurle et al., 1989; Lee et al., 1994).

El potencial de los interdígitos para formar dedos en condiciones experimentales, indica que existen señales en el autópodo, que controlan la posición de los radios digitales, alternando la posición de los dígitos con la de los interdígitos (Gañan et al., 1996).

La aplicación exógena de TGF β induce condrogénesis en el interdígito de la extremidad de pollo

Los miembros de la superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF β), son candidatos fuertes como las señales que especifican las zonas digitales y las interdigitales, por su patrón de expresión durante el desarrollo de la extremidad y por su efecto biológico cuando son administrados exógenamente. Algunos miembros de esta familia presentan patrones de expresión específicamente en las condensaciones precondrogénicas incluyendo los radios digitales. Se ha observado que estos factores de crecimiento son altamente condrogénicos cuando son colocados en cultivos celulares (Kulyk et al., 1989; Leonard et al., 1991; Schofield and Wolpert, 1990), y causan

malformaciones en el esqueleto cuando son administrados exógenamente en extremidades de pollo (Hayamizu et al., 1991).

El potencial condrogénico que tiene el interdígito se evidenció al implantar perlas incubadas con TGF β en el tercer interdígito de extremidades de pollo, en los que el resultado fue, la inducción de cartílago ectópico. Estos resultados variaron dependiendo de la etapa de desarrollo y de la posición en la cual las perlas fueron implantadas, ya que cuando la perla se colocó en E27-28 en el tercer interdígito, la morfología del autópodo es normal. Por el contrario, cuando la perla fue colocada en E29 en el tercer interdígito a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$, lo que se observó fue un intensa condrogénesis alrededor de la perla, además de la fusión de los dígitos III y IV. En cambio, cuando la perla se implantó bajo las mismas condiciones pero a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, el efecto se vio restringido solo a la formación de un dedo extra y no tuvo efecto en el desarrollo de los demás elementos esqueléticos del autópodo (Gañan et al., 1996).

Experimentos similares fueron realizados colocando la perla en E31 y el resultado fue un efecto menor, ya que sólo se formó un pequeño cartílago ectópico (Gañan et al., 1996). Esto nos sugiere que el estadio de desarrollo es importante para la inducción de la condrogénesis, siendo el resultado más significativo cuando la perla se implantó en E29 etapa que precede al inicio de la muerte celular programada.

La condrogénesis ectópica inducida por TGF β recapitula la cascada molecular observada en condiciones normales, se determinó que Sox9 se expresa 30 minutos después de la aplicación de TGF β , Sox8 y Sox10 a la hora,

L-Sox5 y *BmpR1b* a las 6 horas, *Ventropina* a las 10 horas, *Colagena II* (Col II), *Agrecano* y *Sox6* a las 12 horas, *Nogina* a las 16 horas y finalmente *Gdf5* a las 20 horas después de la aplicación de TGF β (Chimal-Monroy et al., 2003).

Por otro lado, la condrogénesis ectópica inducida por TGF β también induce cambios en la expresión de genes relacionados con el proceso de muerte celular, ya que experimentos realizados muestran que la expresión de *Bmp-4*, *Msx1* y *Msx2*, disminuye 8 horas después de la aplicación de TGF β (Gañan et al., 1996).



Figura 14. La aplicación de TGF β -1 en el tercer interdígito de pollo en E29, induce la formación de un dedo ectópico.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se ha descrito anteriormente tanto la condrogénesis como la muerte celular programada juegan papeles importantes en la morfogénesis final de la extremidad lo que sugiere una relación entre estos dos procesos, en tiempo y espacio específicos.

Con base en el hecho de que $TGF\beta$ es capaz de cambiar el destino celular de las células del interdígito hacia al programa de condrogénesis, mediante la inducción del gen *Sox 9*, en este trabajo nos interesamos en determinar como el $TGF\beta$ regula las señales apoptóticas del interdígito. De igual manera quisimos establecer en que momento, después de inducir la condrogénesis ectópica, se inhiben las señales apoptóticas, como *Bmp-7*, *Dkk1*, y *Msx2*, que normalmente se expresan en el interdígito ó si las alteraciones que pudieran presentar estas expresiones son una consecuencia del crecimiento del cartílago inducido por $TGF\beta$.

HIPÓTESIS

$TGF\beta$ no solo es capaz de inducir directamente la cascada molecular involucrada con la condrogénesis, sino que además es capaz de inhibir la cascada molecular involucrada con la muerte celular en el interdígito.

OBJETIVO GENERAL

- ◆ Determinar si TGF β inhibe las señales apoptóticas como *Bmp-7*, *Msx2*, y *Dkk1* en el interdígito durante la formación de dedos extras.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ◆ Determinar la expresión ectópica de *Sox9* a diferentes tiempos después de la aplicación de una perla incubada con TGF β en el interdígito.
- ◆ Correlacionar la expresión ectópica de *Sox9* con la inhibición temporal de las señales apoptóticas en el interdígito como *Bmp-7*, *Msx2*, y *Dkk1*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron huevos de pollo fertilizados provenientes de la empresa ALPES, SA, Puebla. Los huevos se incubaron a una temperatura de 37.5°C y una humedad de 70%. Se incubaron durante 6 y 7 días hasta tenerlos en E29 y E30 (Hamburger y Hamilton, 1951).

Preparación de perlas

Se colocan alrededor de 30 perlas de heparina (No. Cat. 5360 SIGMA) en una cámara húmeda (caja de petri con PBS) y se les quita el exceso de PBS y se les agrega 2 µl del factor TGF -1 (No. Cat.100-21R, Lote 0805S88 H235 PEPROTECH) a una concentración de 200 ng/ml y se dejan incubar a 4°C durante 1 hora.

Implantación de perlas incubadas con TGFβ-1

Para la implantación de perlas incubadas con TGF -1 se utilizaron embriones de pollo en E29 HH. Se realizó un orificio en el cascarón del huevo, posteriormente se descubrió y retiró el amnios la extremidad derecha, una vez descubierta se realizó un orificio con una lanceta muy afilada en el tercer interdígito y se les colocó la perla hacia la parte más distal. Finalmente el orificio realizado en el cascarón del huevo se selló con cinta adhesiva transparente y se regresaron a la incubadora, para posteriormente ser fijados a diferentes tiempos y ser procesados para hibridación *in situ*, tinción de esqueleto con azul Alciano y tinción de muerte celular con el colorante Rojo Neutro.

Preparación de Sondas

Para la realización de las sondas específicas de pollo de *Bmp-7*, *Msx2*, *Dkk1* y *Sox9*, en primer lugar se linearizaron los plásmidos, agregando lo siguiente: 20 μ l de cada uno de los plásmidos a una concentración de 1 μ g/ μ l, 22.5 μ l de H₂O estéril, 2.5 μ l de enzimas de restricción específicas para cada plásmido (Tabla 1), 5 μ l de amortiguador 5X de la enzima utilizada. La reacción se dejó incubando durante 3 horas a 37°C, y se analizó por medio de electroforesis. Después se agregaron 125 μ l de etanol absoluto y 5 μ l de Acetato de sodio y se dejó precipitar toda la noche a -70°C, al día siguiente se centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y se agregó 300 μ l de etanol al 70%, se centrifugó por 10 minutos a 12000 rpm, se retiró el sobrenadante y se dejó secar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendió en 7 μ l de agua estéril.

Una vez que se tiene el plásmido linerizado se realizó la transcripción agregándole 4 μ l de amortiguador de transcripción 5X (Promega, Cat. P1181), 2 μ l de DTT 100 mM (Cat. P1171), 1 μ l de inhibidor de RNAasa (Cat. N2611), 2 μ l de mezcla de nucleótidos Adenina+Citosina+Guanina (Promega, Cat. P1132, Cat. P1142 y Cat. P1152 respectivamente), 2.4 μ l de UTP 100 μ M (Cat. P1162), 0.8 μ l de UTP-Digoxigenina (Roche, Cat. 11 209 256 910) y 1 μ l de la RNA polimerasa específica para cada plásmido (Tabla 1). La reacción se dejó incubando durante 3 horas a 37°C, posteriormente se precipitó agregando 3 μ l de tRNA 10 mg/ml, 200 μ l de TE (50 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH=8), 12 μ l de Acetato de sodio 3 M y 300 μ l de etanol absoluto y se dejó toda la noche a -70°C, al día siguiente se centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos a 4°C, se

retiró el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 70%, se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y se dejó secar durante 5 minutos, finalmente se resuspendió en 30 µl de agua DEPC.

Tabla 1. Enzimas de restricción y transcripción utilizadas para la elaboración de las sondas.

Gen	Enzima de restricción	RNA polimerasa
<i>Bmp7</i>	XhoI	T3
<i>Dkk1</i>	KpnI	T3
<i>Msx2</i>	XbaI	T3
<i>Sox9</i>	BamHI	T7

Hibridación *in situ* en órgano completo

Para realizar hibridación *in situ* se extrajeron extremidades posteriores de embriones de pollo se fijaron en paraformaldehído al 4 % y se dejaron a 4°C toda la noche, después se lavaron por 5 minutos en PBT (PBS + 0.1% de Tween-20), posteriormente se deshidrataron en concentraciones graduales de metanol (JT-Baker, USA) en PBT (25%, 50%, 75% y 100%). Finalmente se almacenaron a -20°C.

Día 1. En el primer día de hibridación se rehidrataron en concentraciones graduales de metanol en PBT (100%, 75%, 50% y 25%). Se permeabilizaron incubándolos 1 hora en H₂O₂ al 6% / PBT cubriéndolos de la luz, se lavaron en PBT 3 veces durante 5 minutos, después se incubaron con proteinasa K (PK) a una concentración, tiempo y temperatura específica para cada gen (Tabla 2), después se fijaron en paraformaldehído 4%-glutaraldehído 0.2% durante 20 minutos y se hicieron 2 lavados con PBT de 5 minutos cada uno. Posteriormente, las extremidades se incubaron durante 3 horas en amortiguador de hibridación a 65°C. La sonda se diluyó en amortiguador de

hibridación durante 2 minutos a 80°C y se colocaron inmediatamente en hielo. La sonda se añadió a las extremidades y se dejó incubando toda la noche a 65°C en baño seco.

Día 2. Los embriones se lavaron dos veces, durante 1 hora con solución I (50% Formamida, 5x SSC pH=5, 1% SDS), posteriormente se realizó 1 lavado de 10 minutos con una mezcla de solución I con solución II. Se hicieron 3 lavados de 10 minutos con solución II (0.5 M NCL, 10 mM Tris-HCL pH=7.5, 0.1% Tween-20), 2 lavados de 30 minutos con solución II, 1 lavado de 10 minutos con solución II. Se lavaron 10 minutos con solución III (50% Formamida, 2x SSC pH=5), 2 lavados de 30 minutos con solución III, todos estos lavados se hacen a 65°C. Después se hicieron 3 lavados de 10 minutos con TBST+levamisol 2mM (Tris-HCL 50 mM pH=7.4, NCL 150 mM, KCL 10 mM, Triton 1%, Levamisol 2 mM), y se incuban durante 3 horas en TBST+levamisol 2mM con 10% de suero de chivo en agitación. Posteriormente, se sustituyó el TBST+levamisol 2 mM con 10% de suero de chivo por una dilución 1:2000 de anticuerpo antidigoxigenina en TBST+levamisol 2mM y se deja en agitación toda la noche a 4°C.

Día 3. Se realizaron 15 lavados de 10 minutos cada uno con TBST+levamisol 2mM y 2 lavados de 15 minutos con NTMT+levamisol 2mM (Tris-HCL 50 mM pH=9.5, MgCl₂ 50 mM, NaCl 200 mM, Tween 20 1%, Levamisol 1 mM). Finalmente se revelaron con el sustrato BM-purple (Roche, Cat. 11 442 074 061) cubriéndolos de la luz hasta que de color, una vez concluida la reacción se realizaron 2 lavados rápidos con PBS y se fijaron el paraformaldehído al 4%.

Tabla 2. Condiciones experimentales para los tratamientos con proteinasa K (PK).

Gen	[] de PK	Tiempo PK	Temp.
<i>Bmp-7</i>	60µg/ml	25min	20°C
<i>Dkk1</i>	60µg/ml	20min	20°C
<i>Msx2</i>	60µg/ml	25min	21°C
<i>Sox9</i>	60µg/ml	20min	25°C

Tinción de Esqueleto

Para teñir el esqueleto se utilizó el colorante azul Alciano y Alizarina roja que tiñen cartílago en azul y hueso en rojo respectivamente.

Las extremidades a teñir se deshidrataron en Etanol al 96% durante 24 horas, posteriormente se permeabilizaron en acetona por 24 horas, después se colocaron en el colorante azul Alciano y Alizarina roja durante 24 horas, preparado de la siguiente manera: 1 volumen de azul Alciano 0.3% en etanol al 70%, 1 volumen de Alizarina roja 0.1% en etanol al 70%, 1 volumen de ácido acético glacial y 17 volúmenes de etanol al 70%, después se lavaron en agua destilada y se colocan en KOH al 1% / Glicerol hasta aclarar el tejido, finalmente se almacenan en Glicerol/Etanol una mezcla 1:1.

Tinción con Rojo Neutro

La distribución de muerte celular fue analizada utilizando el colorante Rojo Neutro. Las extremidades a teñir se aislaron y se lavaron con PBS, posteriormente se colocaron en una mezcla de PBS con el colorante Rojo Neutro, y cuando se obtuvo la tinción adecuada se fijaron en formol cálcico (1% CaCl₂ / Formol 4% en H₂O) toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron 2 lavados de 1 hora con isopropanol y finalmente se colocaron el xilol para aclarar el tejido.

RESULTADOS

En este trabajo se determinó si el TGF β -1, como factor condrogénico tiene la capacidad de inhibir las señales apoptóticas durante la formación de un dedo extra en el interdígito. En primer lugar, se evaluó el papel condrogénico que tiene TGF β -1 en el interdígito por medio de tinciones de esqueleto, para observar la formación de cartílago. En segundo lugar, se determinó la expresión del factor de transcripción *Sox9* en extremidades de pollo tratadas con TGF β -1, para observar su expresión ectópica en el interdígito. Finalmente, para determinar el papel del TGF β -1 sobre el control de la muerte celular en el tejido interdigital se evaluó la expresión de *Bmp-7*, *Dkk1*, y *Msx2*, que se sabe están involucradas en la cascada molecular que lleva a la apoptosis en el interdígito.

La aplicación exógena de TGF β -1 induce la formación de cartílago en el interdígito de la extremidad de pollo.

Con la idea de observar el efecto condrogénico que tiene la aplicación de TGF β -1 en el interdígito, colocamos una perla incubada con este factor en el tercer interdígito de extremidades de pollo en E28-29 de desarrollo.

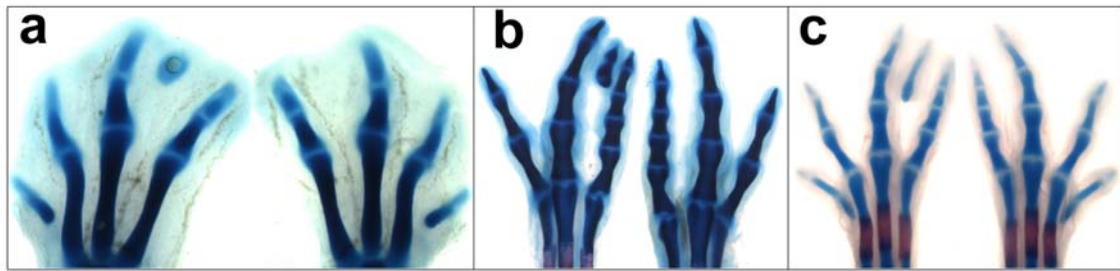


Figura 15. La aplicación de TGF β -1 en el interdígito, induce la formación de un dedo ectópico. Extremidades de embriones de pollo en E28-29, teñidas con el colorante azul Alciano y Alizarina roja 24hrs (a), 48hrs (b) y 72hrs (c) después de haber colocado una perla incubada con TGF β -1 a una concentración de 200 ng/ μ l.

Los resultados muestran la presencia de un cartílago alrededor de la perla, 24 horas después del tratamiento (Figura 15a), posteriormente, a las 48 horas y 72 horas postratamiento con TGF β -1 (Figura 15b-c), se observa que el cartílago ectópico adquiere la morfología de un dedo. Además, se forma un interdígito más, el cual aún persiste en comparación de su control.

De acuerdo a estos resultados decidimos realizar tinciones con Rojo Neutro, para observar lo que pasa con la muerte celular por apoptosis en el interdígito, una vez que se ha activado la cascada molecular de la condrogénesis en éste tejido.

La aplicación de TGF β -1 en el tercer interdígito de la extremidad de pollo, inhibe la muerte celular por apoptosis.

Los resultados, que se obtuvieron al realizar la tinción con Rojo Neutro después de colocar una perla incubada con TGF β -1 en el tercer interdígito, muestran que, la muerte celular por apoptosis se inhibe 24 hrs después del

tratamiento (Figura 16a), la inhibición se observa alrededor de la perla, hacia la parte más distal, comparado con la extremidad control.

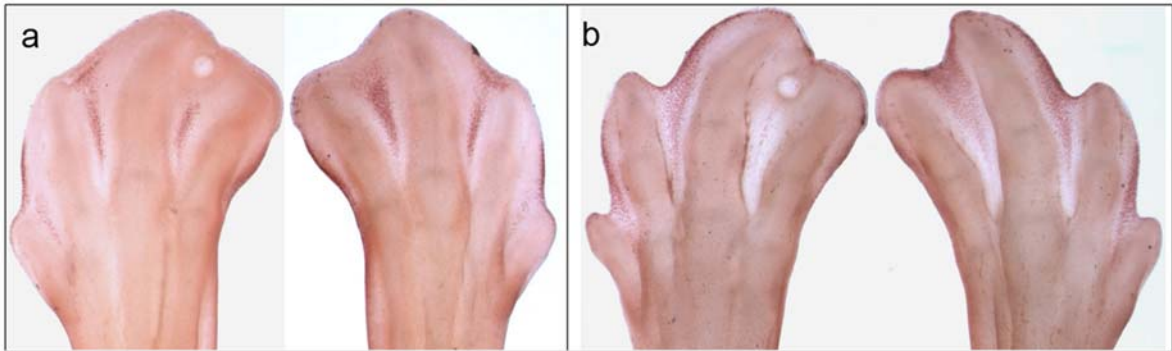


Figura 16. La aplicación de TGF β -1 en el interdígito inhibe la muerte celular por apoptosis. Extremidades de pollo teñidas con el colorante Rojo Neutro. Inhibición de la muerte celular en E28-29+24 hrs. (a), y E31+24 hrs. (b) posterior al tratamiento con una perla incubada con TGF β -1 a una concentración de 200 ng/ μ l.

Por otra parte de acuerdo a lo que reporta Gañan et al., 1996, donde la formación de un dedo ectópico bajo el efecto de TGF β -1, depende del estadio de desarrollo de la extremidad, teniendo menor efecto cuando éste se aplica a partir del E30, quisimos evaluar el patrón de muerte celular en el interdígito en esta etapa después de la aplicación de TGF β -1. Nuestros resultados muestran que si hay inhibición de la muerte celular en el interdígito. La inhibición se observó claramente a las 24 hrs después del tratamiento (Figura 16b), a pesar de que en esta etapa la frecuencia de formación de cartílago sea menor.

La aplicación de TGF β -1 en el interdígito de pollo induce la expresión ectópica de Sox9.

Con la idea de observar la expresión ectópica de Sox9 inducida por TGF β -1, se realizó una hibridación *in situ*, en extremidades tratadas con este factor y lo que observamos fue que ésta ocurre desde los 30 minutos después de la

aplicación de TGF β -1 (Figura 17a). Esta expresión la podemos observar alrededor de la perla y se mantiene 1, 2, 4, 12 y 24 horas después (Figura.17b-f). Además de que la expresión se ve más intensa hacia la punta de los dedos. Posteriormente, a las 32 y 48 horas, su expresión se mantiene en la punta de los dedos, incluyendo el dedo ectópico (Figura 17g-h) y ya se observa también en las articulaciones. Finalmente a las 72 horas después de haber colocado la perla, la expresión de Sox9 se limita solo a las articulaciones (Figura 17i).

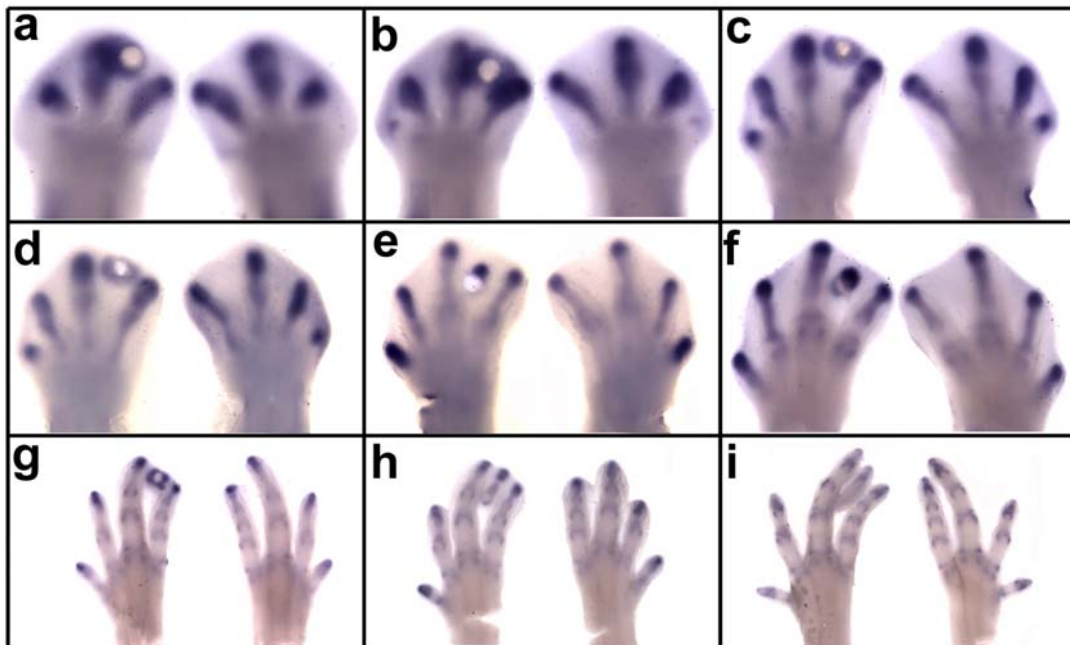


Figura 17. La aplicación de TGF β -1 en el interdígito de pollo induce la expresión ectópica de Sox9. Hibridación *in situ* para Sox9 en extremidades de pollo tratadas con TGF β -1 a una concentración de 200ng/ μ l. En todos los casos se muestra la extremidad experimental (izquierda) y su contra lateral (derecha). En E29 más 30 minutos (a); 1 hora (b); 2 horas (c); 4 horas (d); 12horas (e); 24 horas (f); 32 horas (g); 48 horas (h) y 72 horas (i) después del tratamiento.

La aplicación de TGFβ-1 en el tercer interdígito regula negativamente la expresión de *Bmp-7*, 1 hora después del tratamiento.

Una vez confirmado que TGFβ-1 induce la expresión de Sox9, como lo reportan Chimal-Monroy et al (2003), nuestro siguiente objetivo fue determinar si TGFβ-1 tiene la capacidad de inhibir la cascada molecular que lleva a la apoptosis en el interdígito. O bien, si la muerte celular no ocurre como consecuencia de que las células ya iniciaron el programa de diferenciación hacia el linaje condrogénico. Por lo tanto, se evaluó la expresión de *Bmp-7* en el interdígito en presencia de TGFβ-1. Los resultados muestran que a los 30 minutos después del tratamiento, la expresión de *Bmp-7* no presenta cambios comparada con la extremidad control, observándose su expresión principalmente en el tejido interdigital y en la AER. En cambio, 1 hora después del tratamiento (Figura 18b) se observa inhibición en la expresión de *Bmp-7* alrededor de la perla, misma que se mantiene 2, 4, 8, 13, 24 y 48 horas después del tratamiento con respecto a las extremidades controles (Fig. 18c-h). Por otro lado, a partir de las 13 y 24 horas (Figura 18f-g), la expresión de *Bmp-7* se observa también en las articulaciones. Además la inhibición es más evidente, ya que a estos tiempos de acuerdo a nuestros resultados de tinción de esqueleto ya hay formación de cartílago (Figura 15). Finalmente, a las 48 horas (Fig.18h), la expresión de *Bmp-7* se limita solo a la punta de los dedos.

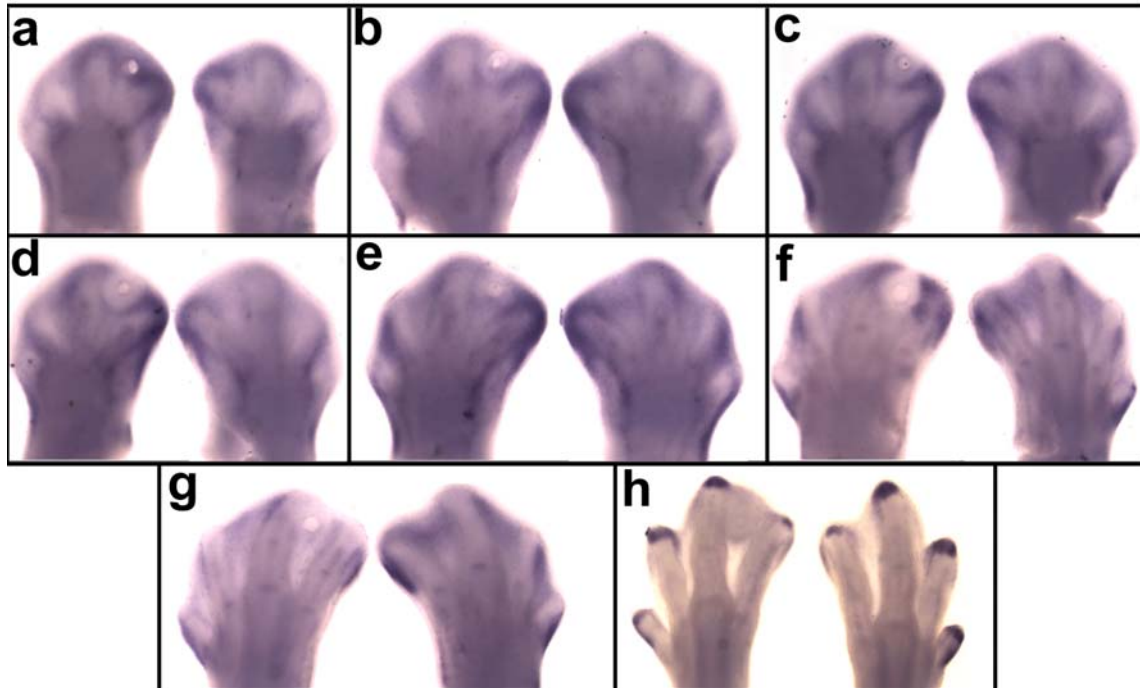


Figura 18. La aplicación de TGF β -1 en el tercer interdígito regula negativamente la expresión de *Bmp-7*, 1 hora después del tratamiento. Hibridación *in situ* para *Bmp-7* en extremidades de pollo tratadas con TGF β -1 en E29. En todos los casos se muestran las extremidades experimentales (izquierda) y su contra lateral (derecha). 30 minutos (a); 1 hora (b); 2 horas (c); 4 horas (d); 8 horas (e); 13 horas (f); 24 horas (g) y 48 horas (h) después del tratamiento.

La aplicación de TGF β -1 en el tercer interdígito regula negativamente la expresión de *Dkk1* 16 horas después del tratamiento.

Otro gen involucrado en el proceso de apoptosis es *Dkk1*, por lo que también decidimos evaluar su expresión en extremidades de pollo, después de ser tratadas con TGF β -1. Los resultados muestran que a los primeros tiempos; 30 minutos, 1, 2 y 8 horas después del tratamiento, la expresión en las extremidades experimentales es normal, se observa *Dkk1* en la AER y muy ligeramente en los interdígito (Figura 19a-d). Posteriormente observamos que a partir de las 16 horas (Figura 19e) hay alteraciones en el patrón de expresión, ya que la expresión de *Dkk1* se ve disminuida en la AER y en el interdígito

(Figura 19f-g). A las 32 y 48 horas, la expresión de *Dkk1* se ve claramente en los interdígitos y en la punta de los dedos, en las extremidades experimentales en estas etapas, se inhibe de la muerte celular en los interdígitos.

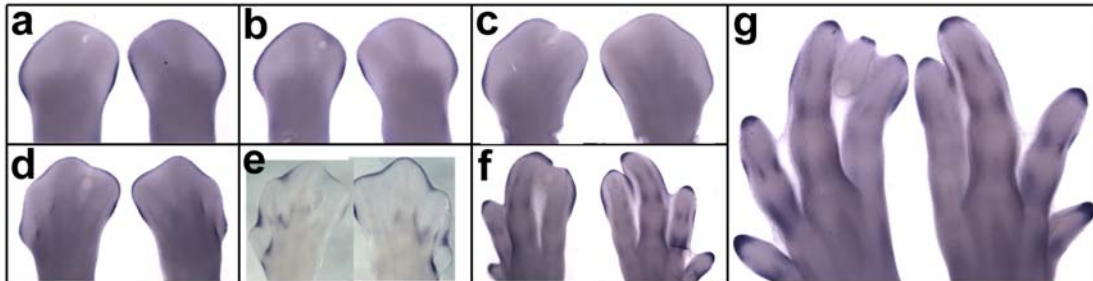


Figura 19. Expresión de *Dkk1* en extremidades de pollo, bajo el efecto de TGF β -1. Hibridación *in situ* en extremidades de pollo tratadas con TGF β -1. En todos los casos se muestran las extremidades experimentales (a la izquierda) y su contra lateral (a la derecha). E28-29, 30 minutos (a); 1 hora (b); 2 horas (c); 8 horas (d); 16 horas (e); 32 horas (f) y 48 horas (g) después del tratamiento.

La aplicación de TGF β -1 en el tercer interdígito de pollo regula negativamente la expresión de *Msx2*, 24 horas después del tratamiento.

Finalmente, otra de las señales apoptóticas que se encuentran en el interdígito es *Msx2*, por lo que también se analizó su expresión bajo el efecto de TGF β -1, y se observó que en los primeros tiempos, 30 minutos, 1, 2, 4 y 8 horas después del tratamiento (Figura 20a-e), no hay ningún cambio en la expresión de *Msx2*. La expresión de este gen se observa principalmente en el tejido interdigital y en la AER. En cambio a las 24 y 48 horas postratamiento (Figura 20f-g), se observaron cambios, ya que su expresión se inhibió en el interdígito, persistiendo solo en la AER. A las 72 horas postratamiento (Figura 20h) observamos que la expresión de *Msx2* solo se limita a la punta de los dedos.

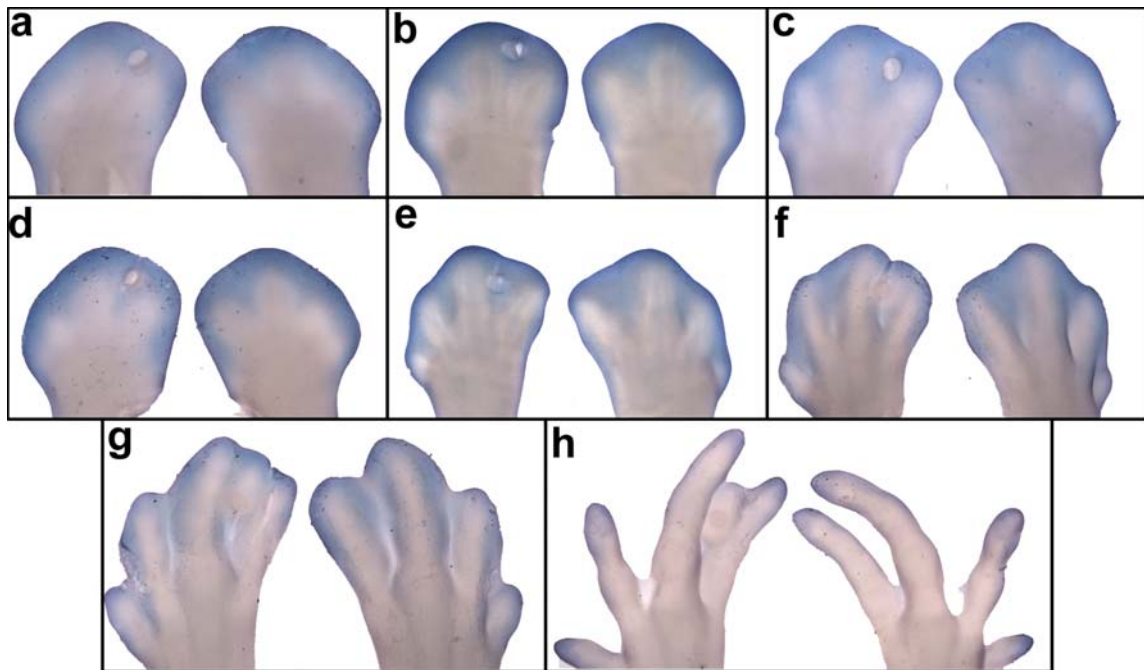


Figura 20. La aplicación de TGF β -1 en el tercer interdígito de pollo regula negativamente la expresión de *Msx2*, 24 horas después del tratamiento. Extremidades de embriones de pollo en E29, bajo el efecto de la aplicación de TGF β -1. En todos los casos se muestra la extremidad experimental (a la izquierda) y su contra lateral (a la derecha). 30 minutos (a); 1 hora (b); 2 horas (c); 4 horas (d); 8 horas (e); 24 horas (f); 48 horas (g) y finalmente 72 horas (h) después del tratamiento.

DISCUSIÓN

Como hemos descrito en este trabajo, tanto la condrogénesis, como la muerte celular programada, juegan papeles muy importantes en el desarrollo de la extremidad, ya que el balance entre ambos procesos lleva a que haya una correcta alternancia entre la posición de los dígitos y la de los interdígitos. Por el contrario, cualquier alteración en alguno de estos procesos, provocan alteraciones en la morfología final del autópodo.

En relación al proceso de condrogénesis inducida por TGF β -1, se sabe el orden en que ocurre la expresión de algunos genes involucrados durante la cascada molecular y el momento en el cuál participan en ella (Chimal-Mpnroy et al., 2003). Con respecto a la cascada molecular que lleva a la muerte celular por apoptosis, aún no es bien conocida. En este trabajo hicimos uso de esta información para estudiar la manera en que las señales condrogénicas regulan a las señales apoptóticas en el interdígito de la extremidad de pollo.

En nuestro trabajo comprobamos el efecto condrogénico que tiene el TGF β -1, cuando es aplicado en el interdígito en E29, el cual induce la expresión de Sox9, activándose así la cascada molecular de la condrogénesis, y por lo tanto formando dedos ectópicos, observándose la formación de cartílago desde las 24 horas después de la aplicación (Figura 15), resultado que coincide con nuestros resultados de la tinción con Rojo Neutro, donde bajo las mismas condiciones experimentales, observamos que la muerte celular se inhibe (Figura 16). Ambos resultados correlacionan entre si, ya que al inducir la diferenciación de las células del interdígito, hacia cartílago, al aplicar el TGF β -

1, éstas han cambiado su destino celular de morir por apoptosis, debido a lo cual la tinción con Rojo Neutro nos resulta negativa. Por otro lado, cuando nosotros aplicamos TGF β en el interdígito en E30, etapa en la cual la formación de dedos ectópicos es menos frecuente (Gañan et al., 1996), y donde la muerte celular, es más evidente, al realizar la tinción con Rojo Neutro, encontramos que la muerte celular se inhibe (Figura 16). Estos resultados nos sugieren que TGF β -1, podría estar actuando como una señal condrogénica, y como una señal antiapoptótica, dependiendo del estadio de desarrollo en la cual es administrado. Cuando el TGF β -1 se aplica en el interdígito en E28-29, este podría estar induciendo la formación de cartílago, debido a que en ésta etapa las células se encuentran indiferenciadas, y por lo tanto, el potencial que tienen las células del interdígito para responder a esta señal es mayor. En cambio cuando el TGF β -1 es administrado en E30, aunque ya no todas las células sean capaces de formar cartílago, TGF β -1 es capaz de inhibir el proceso de apoptosis.

Un resultado sobresaliente de nuestro estudio y de interés para el proceso de la apoptosis, es el descubrimiento de la inhibición de *Bmp-7*, 1 hora después de la aplicación de TGF β -1 en el interdígito. Si tomamos en cuenta que TGF β -1 induce la expresión de *Sox9* 30 minutos después del tratamiento, de acuerdo a los tiempos que tarda la transcripción de un gen, que son aproximadamente 30 minutos, podemos decir que TGF β -1 regula directamente la expresión de *Sox9* (Figura 21). Por otro lado, si *Bmp-7* se inhibe solo 30 minutos después de la inducción de *Sox9* (Figura 21), ésto nos podría sugerir que *Sox9* podría estar regulando de manera directa la expresión de *Bmp-7*. Sin embargo, al parecer el

promotor de *Bmp-7* de humano carece de sitios de unión a Sox9. Por lo que se hace necesaria la búsqueda de otros factores que pudieran controlar la expresión de *Bmp-7*, entre los genes candidatos se encuentra el factor de transcripción homeótico *Hoxa13* que se sabe regula de manera directa la expresión de *Bmp-7* (Knosp et al., 2004). Durante el desarrollo de la extremidad, *Hoxa13* se expresa en los interdógitos y en las regiones interarticulares, donde su función es requerida para la muerte celular programada, y la condrogénesis (Fromental-Ramain et al., 1996; Stadler et al., 2001). Esta observación nos permite proponer la hipótesis de que *Hoxa13* regula directamente a genes cuyos productos son necesarios para la muerte celular programada y para la formación de las articulaciones (Knosp et al., 2004). Por lo tanto, dado que *Hoxa13* regula directamente la expresión de *Bmp-7*, y que esta expresión se ve inhibida 1 hora después de la aplicación de TGF β -1, podríamos esperar que la expresión de *Hoxa13* se inhibiera 30 minutos después de la aplicación de TGF β -1.

De acuerdo con la hipótesis descrita arriba, si *Hoxa13* se inhibiera 30 minutos después, podríamos decir que TGF β -1 inhibiría directamente la cascada molecular que lleva a la apoptosis al inhibir la expresión de *Hoxa13*, que a su vez regula directamente la expresión de *Bmp-7*. Sin embargo aún es necesario demostrar este punto.

En experimentos realizados donde se pierde la función de *Hoxa13*, se observa como resultado severas malformaciones en las articulaciones distales, así como la persistencia de la membrana interdigital (Fromental-Ramain et al.,

1996; Stadler et al.,2001), que coincide con una inhibición de la expresión de *Bmp-2* y *Bmp-7* que son importantes reguladores tanto de la muerte celular programada como de la condrogénesis, (Zuzarte-Luis et al., 2002; Merino et al., 1998; Macias et al., 1997; Zou et al., 1997; Yokouchi et al., 1996; Zou et al., 1996). La inhibición de *Bmp-2* y *Bmp-7* ocurre específicamente en regiones donde son co-expresados con *Hoxa13* (Knosp et al., 2004).

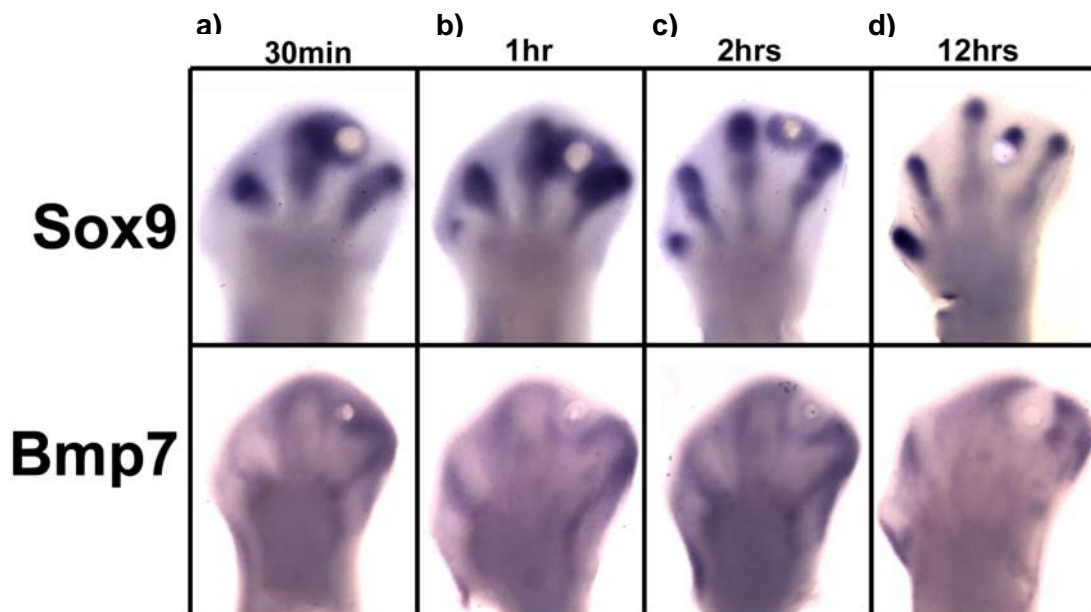


Figura 21. Correlación de la expresión ectópica de *Sox9*, con la inhibición de *Bmp-7*. Hibridación *in situ* de *Sox9* y *Bmp-7*, en extremidades tratadas con TGFβ-1. En (a) se muestra la expresión tanto de *Sox9* como de *Bmp-7*, 30 minutos después del tratamiento, donde observamos la expresión ectópica de *Sox9*, mientras que la expresión de *Bmp-7*, no presenta alteraciones. En (b) 1 hora después del tratamiento, la expresión de *Sox9* se mantiene, y la expresión de *Bmp-7* se ve inhibida alrededor de la perla. En (c y d) vemos que tanto la expresión de *Sox9* como la inhibición de *Bmp-7* se mantienen. Nótese que la expresión de *Sox9* correlaciona muy bien con la inhibición de *Bmp-7*.

Otros genes relacionados con la muerte celular, de los que se evaluó su expresión posterior al tratamiento con TGFβ-1 son *Dkk1* y *Msx2*, donde la inhibición de estos genes se observó, 16 y 24 horas después respectivamente. Este resultado nos sugiere que la inhibición de *Dkk1* y *Msx2* podría deberse

más a una consecuencia de la formación de cartílago ya que a este tiempo después de la aplicación de TGF β -1, ya se ha activado la cascada molecular de la condrogénesis, aunque aún no se haya formado cartílago. O bien, como *Msx2*, es considerado como un marcador de células indiferenciadas, su expresión no desaparece a tiempos cortos después de la aplicación de TGF β , ya que aún las células se encuentran es estado indiferenciado, en cambio 24 horas después, estas células, ya se han diferenciado hacia células que van a morir por apoptosis, y como consecuencia la expresión de *Msx2* desaparece. Por otra parte la inhibición de *Msx2*, 24 horas después de la aplicación de TGF β -1, en el interdígito, difiere de lo observado por Gañan y colaboradores (1996) ya que ellos observan la inhibición de *Msx2* bajo las mismas condiciones, 8 horas después del tratamiento. En nuestras manos esta regulación negativa no ocurrió.

Finalmente, aunque no se conoce completamente la cascada molecular que induce la muerte celular programada en los interdígitos, estos resultados sugieren a BMP7 como fuerte candidato como la molécula en activarse más tempranamente en este proceso, por el hecho de inhibirse solo 1 hora después del tratamiento con TGF β -1. Sin embargo, esto no se puede confirmar sin antes evaluar bajo las mismas condiciones a otros genes involucrados en este proceso tales como *Hoxa13*, *Bmp-2*, *Bmp-4*, *Snail*, solo por mencionar algunos.

CONCLUSIONES

En este trabajo se comprobó el efecto condrogénico de TGF β -1, al ser aplicado exógenamente en el tercer interdígito de la extremidad de pollo, induciendo la formación de un dígito extra.

Por otro lado la inducción de Sox9 en el interdígito de pollo inhibe el proceso de apoptosis, regulando negativamente la expresión de *Bmp-7*, 30 minutos después, por lo que puede ser una de las moléculas en activarse más tempranamente durante el proceso de apoptosis.

Finalmente sugerimos que la inhibición de la expresión de *Dkk1* y *Msx2*, que observamos al aplicar TGF β -1, en el interdígito, se deba a una consecuencia de que ya se haya formado cartílago en el tejido interdigital.

REFERENCIAS

Akiyama, H., Chaboissier, M. C., Martin, J. F., Schedl, A. and de Crombrughe, B. (2002). The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* **16**, 2813-28.

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.

Bi, W., Huang, W., Whitworth, D. J., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R. and de Crombrughe, B. (2001). Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6698-703.

Burke, A. C., Nelson, C. E., Morgan, B. A. and Tabin, C. (1995). Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology. *Development* **121**, 333-46.

Cameron, J. A. and Fallon, J. F. (1977). The absence of cell death during development of free digits in amphibians. *Dev Biol* **55**, 331-8.

Chimal-Monroy, J., Rodriguez-Leon, J., Montero, J. A., Ganan, Y., Macias, D., Merino, R. and Hurlé, J. M. (2003). Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev Biol* **257**, 292-301.

Coelho, C. N., Sumoy, L., Rodgers, B. J., Davidson, D. R., Hill, R. E., Upholt, W. B. and Kosher, R. A. (1991). Expression of the chicken homeobox-containing gene GHox-8 during embryonic chick limb development. *Mech Dev* **34**, 143-54.

Dealy, C. N. and Kosher, R. A. (1995). Studies on insulin-like growth factor-I and insulin in chick limb morphogenesis. *Dev Dyn* **202**, 67-79.

Dealy, C. N., Roth, A., Ferrari, D., Brown, A. M. and Kosher, R. A. (1993). Wnt-5a and Wnt-7a are expressed in the developing chick limb bud in a manner suggesting roles in pattern formation along the proximodistal and dorsoventral axes. *Mech Dev* **43**, 175-86.

Davis, C. A., Holmyard, D. P., Millen, K. J. and Joyner, A. L. (1991). Examining pattern formation in mouse, chicken and frog embryos with an En-specific antiserum. *Development* **111**, 287-98.

Dudley, A. T., Ros, M. A. and Tabin, C. J. (2002). A re-examination of proximodistal patterning during vertebrate limb development. *Nature* **418**, 539-44.

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.

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.

Francis-West, P. H., Robertson, K. E., Ede, D. A., Rodriguez, C., Izpisua-Belmonte, J. C., Houston, B., Burt, D. W., Gribbin, C., Brickell, P. M. and Tickle, C. (1995). Expression of genes encoding bone morphogenetic proteins and sonic hedgehog in talpid (ta3) limb buds: their relationships in the signalling cascade involved in limb patterning. *Dev Dyn* **203**, 187-97.

Francis, P. H., Richardson, M. K., Brickell, P. M. and Tickle, C. (1994). Bone morphogenetic proteins and a signalling pathway that controls patterning in the developing chick limb. *Development* **120**, 209-18.

Fromental-Ramain, C., Warot, X., Messadecq, N., LeMeur, M., Dolle, P., Chambon, P. (1996). Hoxa-13 and Hoxd-13 play a crucial role in the patterning of the limb autopod. *Development* **122**, 2997-3011.

Gañan, Y., Macias, D., Duterque-Coquillaud, M., Ros, M. A. and Hurler, 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.

Garciadiego-Cázares David. 2005. La integrina $\alpha 5\beta 1$ coordina la diferenciación del cartílago y la formación de articulaciones durante el desarrollo del esqueleto. Tesis Doctorado. Instituto de Investigaciones Biomedicas. UNAM. 87pp.

Garcia-Martinez, V., Macias, D., Ganán, Y., Garcia-Lobo, J. M., Francia, M. V., Fernandez-Teran, M. A. and Hurler, J. M. (1993). Internucleosomal DNA fragmentation and programmed cell death (apoptosis) in the interdigital tissue of the embryonic chick leg bud. *J Cell Sci* **106 (Pt 1)**, 201-8.

Gilbert SF. (2000). **Development Biology, 6a ed, Sinauer Associates Inc, Sunderland Massachusetts, USA. 749 pp.**

Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A. P., Blumenstock, C. and Niehrs, C. (1998). Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* **391**, 357-62.

Grotewold, L. and Ruther, U. (2002). The Wnt antagonist Dickkopf-1 is regulated by Bmp signaling and c-Jun and modulates programmed cell death. *Embo J* **21**, 966-75.

Grotewold, L., Theil, T. and Ruther, U. (1999). Expression pattern of Dkk-1 during mouse limb development. *Mech Dev* **89**, 151-3.

Hamburger, H. and Hamilton, V. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* **88**: 49-92.

Hayamizu, T. F., Sessions, S. K., Wanek, N. and Bryant, S. V. (1991). Effects of localized application of transforming growth factor beta 1 on developing chick limbs. *Dev Biol* **145**, 164-73.

Hinchliffe, J. R. and Ede, D. A. (1968). Abnormalities in bone and cartilage development in the talpid mutant of the fowl. *J Embryol Exp Morphol* **19**, 327-39.

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.

Hurle, J. M., Ganam, Y. and Macias, D. (1989). Experimental analysis of the in vivo chondrogenic potential of the interdigital mesenchyme of the chick leg bud subjected to local ectodermal removal. *Dev Biol* **132**, 368-74.

Kawakami, Y., Ishikawa, T., Shimabara, M., Tanda, N., Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M., Kuwana, T., Ueki, A., Noji, S. and Nohno, T. (1996). BMP signaling during bone pattern determination in the developing limb. *Development* **122**, 3557-66.

Kelley, R. O. (1970). An electron microscopic study of mesenchyme during development of interdigital spaces in man. *Anat Rec* **168**, 43-53.

Knosp, W. M., Scott, V., Bachinger, H. P., Stadler, H. S. (2004). HOXA13 regulates the expression of bone morphogenetic proteins 2 and 7 to control distal limb morphogenesis. *Development* **131**, 4581-92.

Kulyk, W. M., Rodgers, B. J., Greer, K. and Kosher, R. A. (1989). Promotion of embryonic chick limb cartilage differentiation by transforming growth factor-beta. *Dev Biol* **135**, 424-30.

Lallemand, Y., Nicola, M. A., Ramos, C., Bach, A., Cloment, C. S., Robert, B. (2005). Analysis of Msx1; Msx2 double mutants reveals multiple roles for Msx genes in limb development. *Development* **132**, 3003-14

Laufer, E., Pizette, S., Zou, H., Orozco, O. E. and Niswander, L. (1997). BMP expression in duck interdigital webbing: a reanalysis. *Science* **278**, 305.

- Lee, K. K., Li, F. C., Yung, W. T., Kung, J. L., Ng, J. L. and Cheah, K. S.** (1994). Influence of digits, ectoderm, and retinoic acid on chondrogenesis by mouse interdigital mesoderm in culture. *Dev Dyn* **201**, 297-309.
- Lefebvre, V., Li, P. and de Crombrughe, B.** (1998). A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *Embo J* **17**, 5718-33.
- Leonard, C. M., Fuld, H. M., Frenz, D. A., Downie, S. A., Massague, J. and Newman, S. A.** (1991). Role of transforming growth factor-beta in chondrogenic pattern formation in the embryonic limb: stimulation of mesenchymal condensation and fibronectin gene expression by exogenous TGF-beta and evidence for endogenous TGF-beta-like activity. *Dev Biol* **145**, 99-109.
- Li, S. and Muneoka, K.** (1999). Cell migration and chick limb development: chemotactic action of FGF-4 and the AER. *Dev Biol* **211**, 335-47.
- 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.
- Loomis, C. A., Harris, E., Michaud, J., Wurst, W., Hanks, M. and Joyner, A. L.** (1996). The mouse Engrailed-1 gene and ventral limb patterning. *Nature* **382**, 360-3.
- Lyons, K. M., Hogan, B. L. and Robertson, E. J.** (1995). Colocalization of BMP 7 and BMP 2 RNAs suggests that these factors cooperatively mediate tissue interactions during murine development. *Mech Dev* **50**, 71-83.
- 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., Ganan, 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.
- Mariani, F. V. and Martin, G. R.** (2003). Deciphering skeletal patterning: clues from the limb. *Nature* **423**, 319-25.
- Merino, R., Ganan, 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., Ganan, Y., Rodriguez-Leon, J., Economides, A. N., Rodriguez-Esteban, C., Izpisua-Belmonte, J. C. and Hurle, J. M.** (1999). Control of digit formation by activin signalling. *Development* **126**, 2161-70.

Merino, R., Rodriguez-Leon, J., Macias, D., Ganan, Y., Economides, A. N. and Hurle, J. M. (1999). The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. *Development* **126**, 5515-22.

Milaire, J. (1977). Histochemical expression of morphogenetic gradients during limb morphogenesis (with particular reference to mammalian embryos). *Birth Defects Orig Artic Ser* **13**, 37-67.

Mukhopadhyay, M., Shtrom, S., Rodriguez-Esteban, C., Chen, L., Tsukui, T., Gomer, L., Dorward, D. W., Glinka, A., Grinberg, A., Huang, S. P. et al. (2001). Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev Cell* **1**, 423-34.

Nohno, T., Ishikawa, T., Saito, T., Hosokawa, K., Noji, S., Wolsing, D. H. and Rosenbaum, J. S. (1995). Identification of a human type II receptor for bone morphogenetic protein-4 that forms differential heteromeric complexes with bone morphogenetic protein type I receptors. *J Biol Chem* **270**, 22522-6.

Nohno, T., Noji, S., Koyama, E., Nishikawa, K., Myokai, F., Saito, T. and Taniguchi, S. (1992). Differential expression of two msh-related homeobox genes Chox-7 and Chox-8 during chick limb development. *Biochem Biophys Res Commun* **182**, 121-8.

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.

Parr, B. A., Shea, M. J., Vassileva, G. and McMahon, A. P. (1993). Mouse Wnt genes exhibit discrete domains of expression in the early embryonic CNS and limb buds. *Development* **119**, 247-61.

Pautou, M. P. (1975). [Morphogenesis of the chick embryo foot]. *J Embryol Exp Morphol* **34**, 511-29.

Pollak, R. D. and Fallon, J. F. (1976). Autoradiographic analysis of macromolecular syntheses in prospectively necrotic cells of the chick limb bud. II. Nucleic acids. *Exp Cell Res* **100**, 15-22.

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.

Saunders, J. W., Jr. (1966). Death in embryonic systems. *Science* **154**, 604-12.

Saunders, J. W., Jr. and Gasseling, M. T. (1962). Cellular death in morphogenesis of the avian wing. *Dev Biol* **5**, 147-78.

Saunders JW Jr. (1948) The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *J Exp Zool.* 108, 363-404.

Saunders, J. W., Jr. and Reuss, C. (1974). Inductive and axial properties of prospective wing-bud mesoderm in the chick embryo. *Dev Biol* **38**, 41-50.

Schofield, J. N. and Wolpert, L. (1990). Effect of TGF-beta 1, TGF-beta 2, and bFGF on chick cartilage and muscle cell differentiation. *Exp Cell Res* **191**, 144-8.

Stadler, H. S., Higgins, K. M., Capecchi, M. R. (2001). Loss of Eph-receptor expression correlates with loss of cell adhesion and chondrogenic capacity in Hoxa13 mutant limbs. *Development* **128**, 4177-88

Stricker, S., Fundele, R., Vortkamp, A. and Mundlos, S. (2002). Role of Runx genes in chondrocyte differentiation. *Dev Biol* **245**, 95-108.

Sun, X., Mariani, FV., and Martin GR.(2002). Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature* 501-8.

Tickle, C. (1981). The number of polarizing region cells required to specify additional digits in the developing chick wing. *Nature* **289**, 295-8.

Urist, M. R. (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science* **150**, 893-9.

Wagner, T., Wirth, J., Meyer, J., Zabel, B., Held, M., Zimmer, J., Pasantes, J., Bricarelli, F.D., Keutel, J., Hustert, E. (1994) Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* **79**,1111-20.

Wurst, W., Auerbach, A. B. and Joyner, A. L. (1994). Multiple developmental defects in Engrailed-1 mutant mice: an early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum. *Development* **120**, 2065-75.

Wyllie, A., H., Kerr, J. F. Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* **68**, 251-306

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.

Zorn, A. M. (2001). Wnt signalling: antagonistic Dickkopfs. *Curr Biol* **11**, R592-5.

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., Rodriguez-Leon, J., Merino, R., Rodriguez-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.

Zuzarte-Luis, V., Hurle, J. M. (2002). Programmed cell death in the developing limb. *Int J Dev Biol* **46**, 871-6.