



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ANÁLISIS DE LA CASCADA MOLECULAR EN LA
FORMACIÓN DE LAS ARTICULACIONES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

Alejandro Farrera Hernández



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Jesús Chimal Monroy
2009**



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.

Agradecimientos:

Este trabajo fue financiado por el proyecto 54384 de CONACYT, México y el proyecto IN220808 de DGAPA, UNAM, México.

Agradezco la enseñanza y apoyo técnico que me dio en especial Marcia Bustamante Zepeda para el trabajo de biología molecular que fue necesario a lo largo de esta tesis (¡Gracias March!).

Gracias a Alberto Ríos Flores por todo el trabajo que le costo el enseñarme a operar embriones y realizar hibridaciones, además de las discusiones que se generaron en el laboratorio, las cuales fueron muy formativas.

Un agradecimiento muy especial a Martha Elena Díaz Hernández por todo el trabajo conjunto que realizamos a lo largo de esta tesis. A trabajo me refiero tanto a experimentos como a la revisión constante y dedicada que le diste a mi escrito, por eso te estaré siempre agradecido Martha.

Gracias a mis Sinodales: Rosa Estela Navarro, David Garciadiago Cázares (¡Gracias Men!) y a Iván Velasco Velazquez que me ayudó bastante en la corrección de estilo y revisar con atención varios detalles importantes en esta tesis.

Gracias Jesús por la dirección de esta tesis que me ha permitido conocer una gran cantidad de cosas que deseaba estudiar desde hacía mucho tiempo y que han generado en mí el deseo de seguir conociendo aún más.

Gracias a mis padres y a Javier, Eloisa y Mónica que en toda mi vida me han mostrado cariño, apoyo, atención, me han enseñado y seguramente me seguirán enseñando muchísimas cosas a lo largo de mi vida ¡Los AMO mucho!

También te agradezco siempre Moni por todo lo que hemos vivido juntos y que me ha dado mucha felicidad. Todos los días eres un motivo enorme para salir y hacer todo el trabajo que sea necesario para poder estar contigo ¡TE AMO!

Por supuesto agradezco a mis compañeros de laboratorio, tanto presentes como a los que se han ido: René (el otro Men), Carlos, Alberto, Martha, Marcia, Rodrigo, Saray, Elida, Fernando, Raúl, Miguel, Dante, Daniel, Sabina, Silvina y Antonio.

Abuelo Carlos y abuela Eloísa, de verdad siempre los recordare con mucho afecto y me hubiera gustado mucho el haberles enseñado este trabajo.

Conclusiones

En esta tesis se comprobó el efecto condrogénico del TGF- β al aplicarlo de manera exógena en el interdígito con la consecuencia de un dedo ectópico. Todos los marcadores de la articulación estudiados se indujeron alrededor de las 16-18 horas de la aplicación de TGF- β , previo a la elongación de cartílago. El marcador *Gdf5* fue el primero en expresarse siendo el único a las 48 horas y observándose de manera transversal al cartílago, característico a la expresión en la interzona en el desarrollo de la extremidad.

Perspectivas

A pesar de que observamos una expresión de *Gdf5* a las 48 horas de manera transversal en los moldes de cartílago, el análisis histológico es muy importante para determinar cuantas horas después de la expresión comienzan los cambios morfológicos característicos de la interzona. Este resultado se puede respaldar si también se estudia la expresión de matriz extracelular de la interzona, como es *colágena 3* o *colágena 6* en la formación del dedo ectópico. También los cortes histológicos a partir de la hibridación nos ayudarían a identificar el tipo de células que expresan el marcador de la interzona, dado que los marcadores como se observó en el trabajo no se expresan en la misma región. Es importante buscar si los marcadores articulares como *Gdf5* se expresan en las mismas zonas de cartílago, donde se expresa *colágena II*, para saber si su participación es solo en la región de la interzona o en la diferenciación a cartílago.

Bajo este modelo experimental podemos hacer un acercamiento sobre las señales que inducen la cascada molecular en la formación de la articulación, no

solamente en la diferenciación a cartilago, sino la regulación del mismo para la formación del dedo. Una vez que conocemos cual es el marcador mas temprano tenemos un marco de tiempo en el cual conocemos el inicio de su expresión. Podemos evaluar diferentes inhibidores de las rutas de señal involucradas en la formación de las articulaciones y comprobar si la falta de expresión del marcador más temprano se correlaciona con la falta de articulación del dedo ectópico.

Contenido

Resumen	1
Lista de Abreviaturas	2
Introducción	4
o Formación de la extremidad	6
o Ejes anatómicos: próximo-distal, antero-posterior y dorso-ventral	8
o Coordinación de los tres ejes	15
o Condrogénesis	17
o Formación de las articulaciones: Interzona, cavitación y segmentación	22
o Inducción del dedo ectópico mediante la aplicación de TGF- β	30
Planteamiento del problema	32
Hipótesis	33
Objetivo	33
o Objetivos particulares	
Material y métodos	34
o Preparación de TGF- β	34
o Preparación de perlas con TGF- β	34
o Operación de embriones de pollo	35
o Tinción de esqueleto	36
o Fijación de muestras para hibridación in situ	37
o Hibridación in situ en órgano completo	37
1. Diseño de sondas para hibridación	
2. Clonación de la secuencia de interés	
3. Extracción del plásmido y liberación del inserto	
4. Corte del plásmido por endonucleasas, síntesis de ribosonda y marcaje	
5. Día 1 de hibridación: introducción de la sonda en los embriones	
6. Día 2 de hibridación: lavados post-hibridación e incubación con el anticuerpo.	
7. Día 3: lavados post-anticuerpo	
8. Día 4: revelado	
o Análisis de imágenes	45
Resultados	45
Discusión	58
Conclusiones	63
Perspectivas	64
Referencias	65

Lista de Abreviaturas:

AEMF	Factor de mantenimiento del ectodermo apical (Apical ectoderm maintenance factor)
AER	Cresta ectodérmica apical (Apical ectodermal ridge)
ATP	Trifosfato de adenosina (Adenosine triphosphate)
BMP	Proteína morfogenética del hueso (Bone morphogenetic protein)
BMP_{r2}	Receptor de la proteína morfogenética del hueso tipo 2
CD44	Cluster of differentiation 44
CDMP	Proteína morfogénica derivada del cartílago 1 (cartilage derived morphogenetic protein 1)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CTP	Trifosfato de citosina (Cytosine triphosphate)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Desoxirribonucleic acid)
DV	Dorsoventral
FGF	Factor de crecimiento de fibroblatos (Fibroblast growth factor)
GDF5	Factor de crecimiento y diferenciación 5 (Growth and differentiation factor 5)
GLI3	Factor de transcripción de la ruta de señalización hedgehog (homólogo a Cubitus Interruptus en <i>Drosophila</i>)
GTP	Trifosfato de guanina (Guanine triphosphate)
HA	Acido hialurónico
HIF	Factor inducible por hipoxia (Hipoxia inducible factor)
Hox	Homeodominio caja T (Homeodomain T-box)
IMPAD1	Inositol monofosfatasa
LacZ	Gen que codifica para β -galactosidasa
Lev	Levamisole
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
LMX	Homeo caja de LIM (LIM Homeobox)
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NTMT	Amortiguador con Sal (NaCl), Tris, Magnesio y Tween20
PBS	Amortiguador de fosfatos salinos (Phosphate buffer saline)
PBT	Amortiguador de fosfatos salinos con Tween
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction)
PFA	Para-formaldehído
PK	Proteinasa k
RNA	Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid)
RNA^t	Ácido ribonucleico de transferencia
SHH	Sonic Hedgehog
Sox9	Sex determining region in chromosome Y box9
TBST	Amortiguador salino con Tris y tritón (Tris Buffered Saline and Triton)
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta (Transforming growth factor beta)
UTP	Trifosfato de uracilo (Uracyl triphosphate)
WNT	Wingless/Int related
ZPA	Zona de actividad polarizante (Zone of polarizing activity)

INTRODUCCIÓN:

Las extremidades son estudiadas en diversos campos, como es el arte, la medicina, la medicina veterinaria, la educación física y la biología. En biología ayuda a determinar la clasificación de los vertebrados. En el desarrollo embrionario, las extremidades son estructuras con cambios morfológicos muy evidentes, por lo que han servido como una herramienta para identificar los estadios embrionarios por los que pasan los tetrápodos.

Las extremidades tienen diversas funciones: en la locomoción, alimentación, reproducción, exploración del medio y en la comunicación (Mariani y Martin, 2003). Las extremidades, poseen una anatomía compleja, consistiendo en el adulto de tejidos duros conformado por los huesos, estructuras mineralizadas con calcio y fosfatos. Los músculos forman parte del tejido contráctil, se encuentran acomodados en paquetes y su fuerza permite la locomoción del organismo. Los tendones focalizan la región de la contracción del músculo, con lo que se produce fuerzas de palanca y se anclan en regiones específicas del hueso. Durante el desarrollo embrionario, el cartílago es el molde del esqueleto apendicular y solo se retiene en la etapa adulta en las articulaciones como tejido de baja fricción.

Los elementos esqueléticos de las extremidades presentan adaptaciones en cada especie de acuerdo a su hábitat, aún así, conservan un patrón similar en la organización del eje próximo-distal que divide en tres regiones a la extremidad: el estilópodo (húmero y fémur), zeugópodo (radio/ulna y fibula/tibia) y el autópedo (manos y pies). Cada región se encuentra separada por una articulación sinovial (Figura 1).

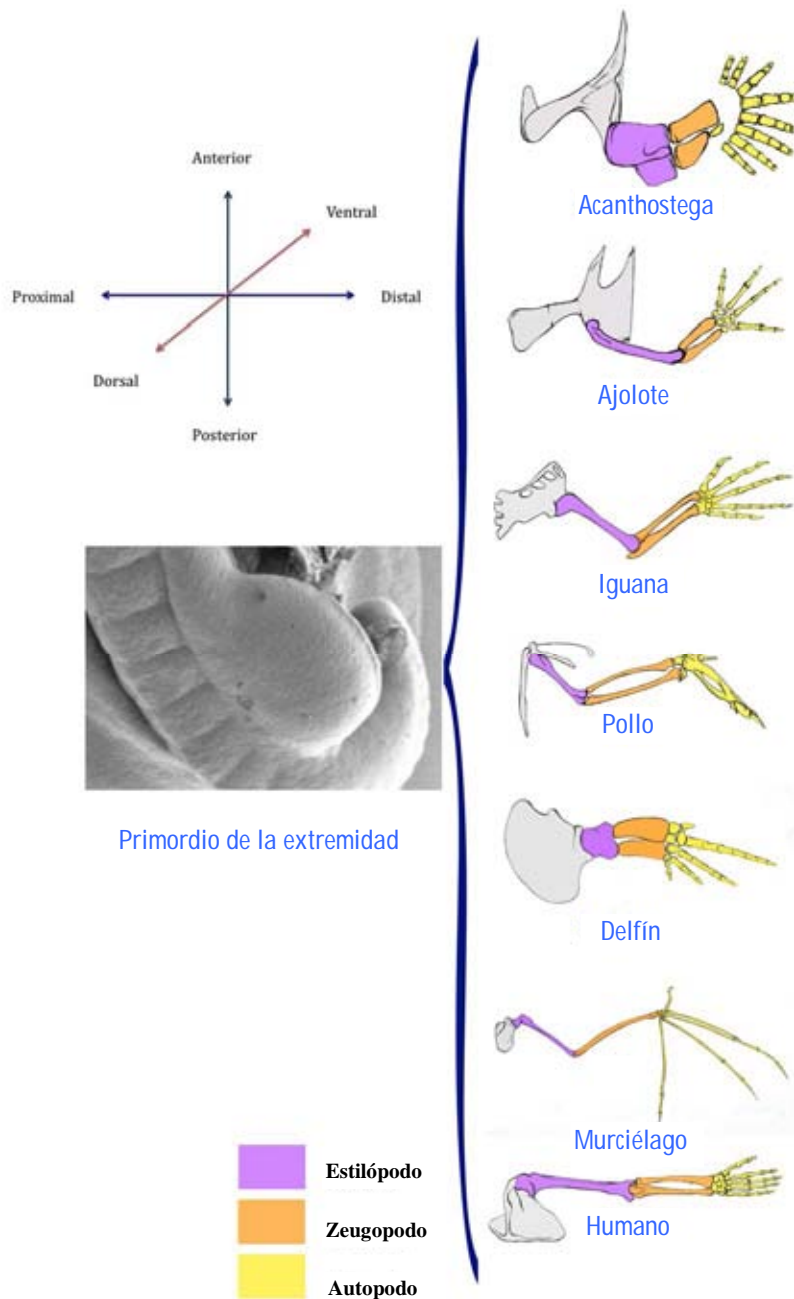


Figura 1. Esquemas que representan a las extremidades de diferentes grupos de vertebrados surgiendo de una estructura homóloga, el primordio de la extremidad. Se muestra un patrón similar de los elementos esqueléticos. El color guinda representa el estilópodo, el naranja el zeugópodo y el amarillo el autopodo (Abarca-Buis, *et al.*, 2009).

La extremidad presenta una organización asimétrica donde se pueden distinguir 3 diferentes ejes, como ejemplo en el caso del pollo, en el eje dorso-ventral, las plumas y escamas se encuentran en el dorso mientras que los huesos sesamoideos y los tendones largos son más gruesos en la región ventral. En el eje anteroposterior, los dedos anteriores (mas cercanos a la cabeza) tienen un menor número de falanges y conforme se van

posteriorizando (acercándose a la cola) los dedos presentan mayor número de falanges. En el eje proximodistal, se aprecia los elementos esqueléticos organizados de la siguiente manera: un elemento proximal (cerca del centro del cuerpo o columna) en el estilópodo, 2 elementos intermedios en el zeugópodo y varios distales (parte de la extremidad lejana a la columna) en el autópodo. La posición de la extremidad de muchos organismos en la etapa adulta pasa por un proceso de rotación y flexión, por lo que los ejes de simetría son difíciles de identificar con claridad en algunos casos.

Formación de la extremidad

Karl Ernst von Baer a finales del siglo XIX, al etiquetar embriones de vertebrados omitió colocar en la etiqueta el grupo al que pertenecían por lo que no logró determinar la especie y llegó a la conclusión de que los tetrápodos mantienen gran similitud en las primeras etapas del desarrollo embrionario, siendo complicado distinguir el género o familia al que pertenecen en el desarrollo temprano del embrión (Gilbert, 2003).

Todas las extremidades inician su desarrollo a partir de la placa lateral del mesodermo, la cual se encuentra junto al mesodermo intermedio y a las somitas. La placa lateral se divide en dos tipos de tejido, la esplacnopleura y la somatopleura (Figura 2).

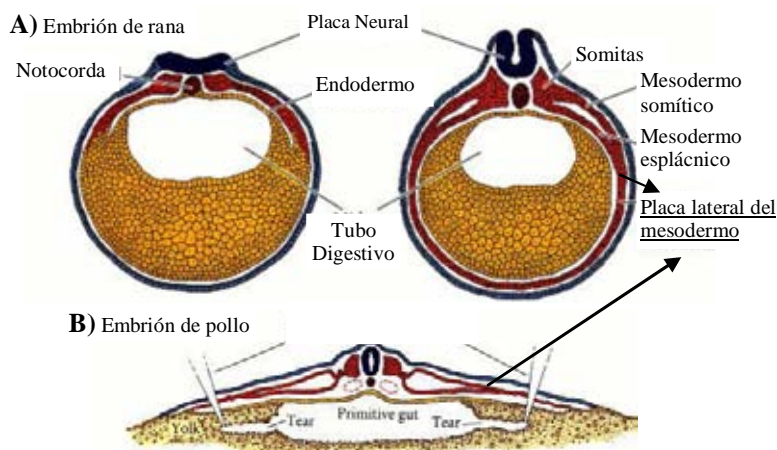


Figura 2. Esquemas que muestran corte transversal en los embriones de la rana *Xenopus* (A) y el pollo (B). En ambos se aprecia la similitud de estructuras y la presencia de la placa lateral del mesodermo dividida en esplacnopleura y somatopleura (Gilbert, 2003).

Harrison en 1918 mostró que las células del campo de la extremidad poseen diferencias durante su formación. En el embrión de *Ambystoma* él demostró que se necesita de la placa lateral del mesodermo (Figura 2) para que se desarrolle la extremidad (específicamente la somatopleura). Si él retiraba la placa lateral de embriones muy tempranos no se podían formar la extremidad y cuando trasplantó el mesodermo del campo de la extremidad en los flancos del ajolote obtuvo patas normales o incluso duplicadas. La duplicación sucedió dependiendo la zona de cuadrantes que definió como ejes de la extremidad, en la cual el cuadrante posterior provocaba la duplicación.

Por otro lado, Balinsky en 1933 generó otra interrogante interesante a estudiar acerca de la formación de la extremidad. Al trasplantar una región de la vesícula óptica y auricular en el flanco del embrión de *Ambystoma* se generó una extremidad completa. ¿Cómo es que otros órganos participan en el desarrollo de la extremidad?

Actualmente se ha podido correlacionar que el mesodermo intermedio que dará origen al riñón, contribuye con factores que potencian la formación de primordio. Ohuchi *et al.*, en 1997, observaron que tanto el mesodermo intermedio como la placa lateral contribuyen en la secreción de la proteína FGF10, inductor de la expresión de *Fgf8*, que como veremos más adelante es indispensable para el crecimiento proximal-distal.

Ejes anatómicos: próximo-distal, antero-posterior y dorso-ventral

En el embrión de pollo durante el inicio de la formación de la extremidad, se observan cambios morfológicos que comienzan con el engrosamiento del ectodermo en forma de cresta en el estadio 16 (Hamburger y Hamilton, 1951) (Figura 3) seguido por una "protuberancia" del mesodermo de la placa lateral en el estadio 17. Después, el primordio se elonga y forma una paleta redondeada hasta el estadio 24, que se flexiona por la rodilla y el codo en el estadio 25. Esta paleta después forma ángulos, uno por cada dedo que tendrá el organismo, los dedos se van formando de manera posterior hacia anterior y generará indentaciones en los interdígitos para liberar los dedos en los estadios 30 a 34.

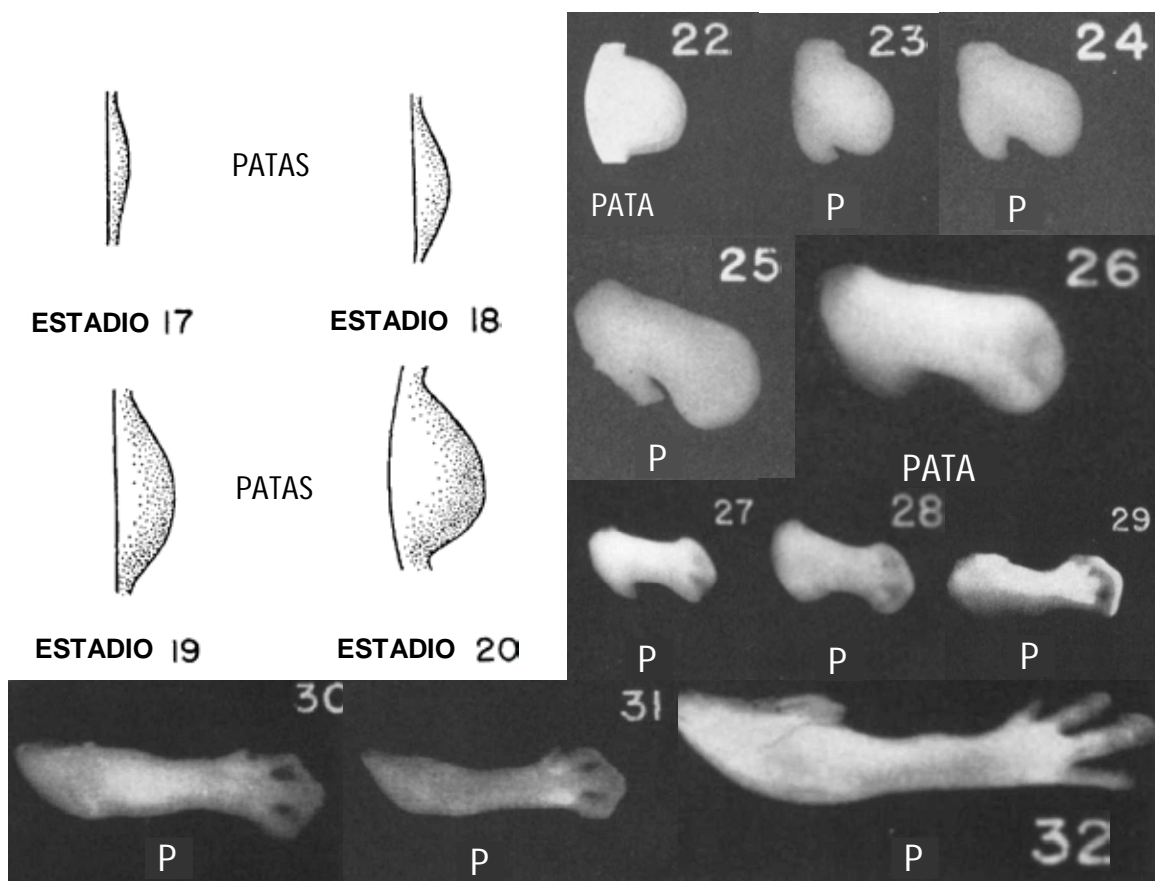


Figura 3. Tabla de estadios en el desarrollo de la extremidad posterior del embrión de pollo y se basa en las modificaciones morfológicas, según el trabajo de Hamburger y Hamilton (1951).

Eje próximo distal: Durante la formación de las estructuras esqueléticas se observa un patrón secuencial próximo-distal que comienza con la condensación del fémur, seguido de la tibia, la fíbula y finalmente los dedos. Saunders (1948) marcó con polvo de carbón a las células del mesodermo que se encontraban debajo de la cresta ectodérmica apical (Apical Ectoderm Ridge o AER por sus siglas en inglés) y observó que las partículas permanecían en los elementos esqueléticos más proximales de la pata. Por otro lado, también encontró que la AER es una estructura indispensable para el crecimiento de la extremidad, si se retira desde etapas tempranas se detiene la formación de la extremidad (Figura 4).

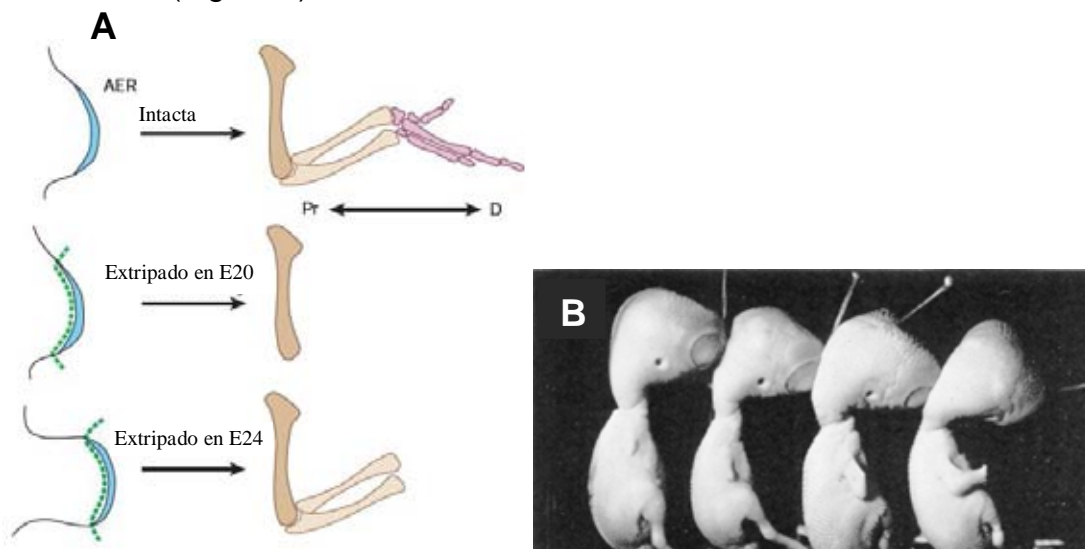


Figura 4. La falta de la cresta ectodérmica o AER en el embrión de estadios tempranos trunca el desarrollo de la extremidad. En (A) se muestra la extripación de la AER (vista en azul) en diferentes estadios de desarrollo. Según en la etapa de desarrollo en la cual se retira la AER, menos estructuras esqueléticas forma y la extremidad es mas corta. Si se retira a estadios mas avanzados del desarrollo se forman los elementos esqueléticos mas distales. (A y B) (Gilbert, 2003; Saunders, 1948).

Más adelante, se estudió la importancia de los factores de crecimiento en el desarrollo de las extremidades. Se conocía que en el primordio había una alta cantidad de células en mitosis (Harrison, 1918). Cuando las células de la extremidad se cultivan, la proliferación aumenta si se agrega al medio el factor

de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Aono *et al.*, 1988). Estos estudios llevaron a la búsqueda de la expresión de las proteínas FGF y sus receptores en la extremidad In Ovo. A través de la técnica de hibridación, se observó que *Fgf4* se expresa en la AER en región posterior. Niswander *et al.*, en 1994, retiraron la AER y colocaron una perla embebida con el factor FGF4 en la región posterior de la extremidad con lo que se recuperó la formación de estructuras dístales. De la misma manera, otros miembros de la familia de las FGFs pueden realizar la función de la AER, si se coloca FGF1, 2 y 4 en la placa lateral se puede obtener la formación de primordios y extremidades ectópicas (Cohn *et al.*, 1995). Cuando se muta *Fgf4/Fgf8* se trunca por completo la extremidad, sin embargo, no todas las FGFs se expresan en la totalidad de la AER, por lo que *Fgf8* por su patrón de expresión y acción es el factor indispensable en el desarrollo de la extremidad (Crossley *et al.*, 1996)

Eje antero posterior: Un experimento importante que elaboró Harrison en 1918 fue la segmentación y la eliminación de regiones en los ejes anterior-posterior y dorsal-ventral del primordio. La ausencia de la mitad posterior causa la pérdida de tres dedos y si se retira la mitad anterior se obtiene la duplicación del zeugópodo y autópedo o solo el autópedo. Zwillig en 1956 (citado en Saunders, 1968) obtuvo la duplicación del autópedo por la inversión del primordio 180° y propuso que en la parte posterior se encontraba un factor que mantenía a la cresta apical (AEMF), el cual al ser rotado y colocado hacia la región anterior, provoca su engrosamiento y la formación de un segundo autópedo. Saunders en 1968 realizó transplantes de la región posterior hacia la región anterior con lo que generó duplicaciones del autópedo o el zeugópodo. A la región posterior con la capacidad de inducir duplicaciones se

le denominó Zona de Actividad Polarizante (ZPA). Tickle *et al.*, en 1975, transplantaron la ZPA tomando en cuenta el nivel de somitas y la etapa de desarrollo, observaron que la repetición de los dedos varía según el nivel de la somita y proponen una curva de gradiente que afecta la duplicación.

Ya se había documentado que la carencia de vitamina A generaban deformidades en las extremidades en recién nacidos. Por otro lado, en el caso de ajolotes en proceso de regeneración, la vitamina A y sus derivados como el retinol y el ácido retinoico inducen la duplicación completa de la extremidad, (Summerbell, 1983). A pesar de que se tenía bien identificado este fenómeno, parecía que el ácido retinoico no era el factor endógeno ya que el tejido posterior no presentaba mayores cantidades de ácido retinoico que la región anterior. Si las células adyacentes a la perla con retinoico se transplantan a otro embrión en la región anterior, estas no generan la duplicación de la extremidad (Summerbell, 1983). Riddle *et al.*, en 1993, observaron la expresión de *sonic hedgehog* (*Shh*) justo en la ZPA y al transplantar células productoras de Shh en la región anterior generó diferentes grados de duplicación parecidos a la aplicación del ácido retinoico o el trasplante de la ZPA (Figura 5). Además, colocaron perlas en la región anterior del primordio con ácido retinoico, obteniendo la expresión ectópica de *Shh* a las 24 horas por lo que identificaron a SHH como el factor que contribuye a la formación del eje antero posterior de la extremidad.

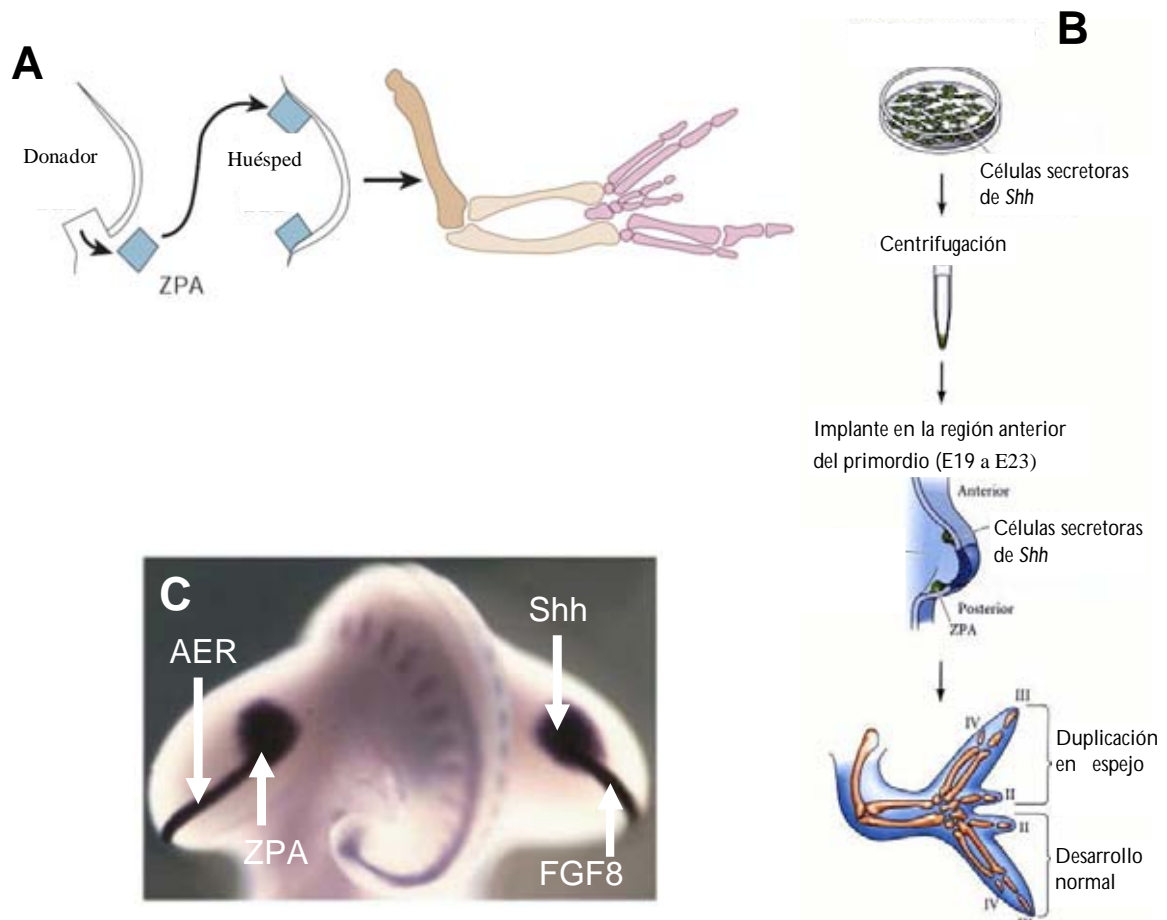


Figura 5. A) El trasplante de la ZPA (recuadro azul) a la región anterior del primordio genera duplicación de los elementos esqueléticos del autópodo en imagen espejular. B) Esquema que muestra cultivo de células secretoras de SHH las cuales al implantarse en la región anterior del primordio generan duplicación en imagen espejular. C) Hibridación in situ mostrando a la ZPA expresando específicamente *Shh* y la AER expresa *FGF8*. (Mariani y Martin, 2002; Gilbert, 2003).

El eje dorsoventral: Saunders en 1968 fue quien propuso la interacción del ectodermo y mesodermo en el eje dorsoventral. MacCabe en 1974 separó los primordios y disgregó el ectodermo del mesodermo, después vuelve a unirlos en orientaciones diferentes. Rotó 180° el ectodermo del primordio izquierdo con el mesodermo derecho y lo suturó en el flanco derecho para invertirlo dorsoventralmente, sin hacer cambios en el eje anteroposterior (Figura 6B). Bajo estas condiciones las patas generaron escamas gruesas en la parte ventral de varios dedos y cojinetes en las partes dorsales, además de que el tobillo se dobla del lado contrario. Así demostró que el ectodermo es el

responsable de las diferencias entre las regiones dorsal y ventral. Dealy *et al.*, en 1993, muestran que la expresión de *Wnt7a* se localiza en el ectodermo dorsal. Parr y McMahon en 1995 inactivan la acción de *Wnt7a* obteniendo estructuras ventrales en el dorso de la pata de ratón. Posteriormente Riddle *et al.*, en 1995, observan la expresión del gen *Lmx1* en el mesodermo dorsal, el cual al ser mutado provocan que se pierdan las estructuras dorsales (Figura 6C), el mismo fenotipo producido por la eliminación de *WNT7a*. Además la expresión ectópica de *Wnt7a* induce la expresión de *Lmx1B* en los primordios de la extremidad por lo cual esta interacción es importante para el patrón dorsoventral.

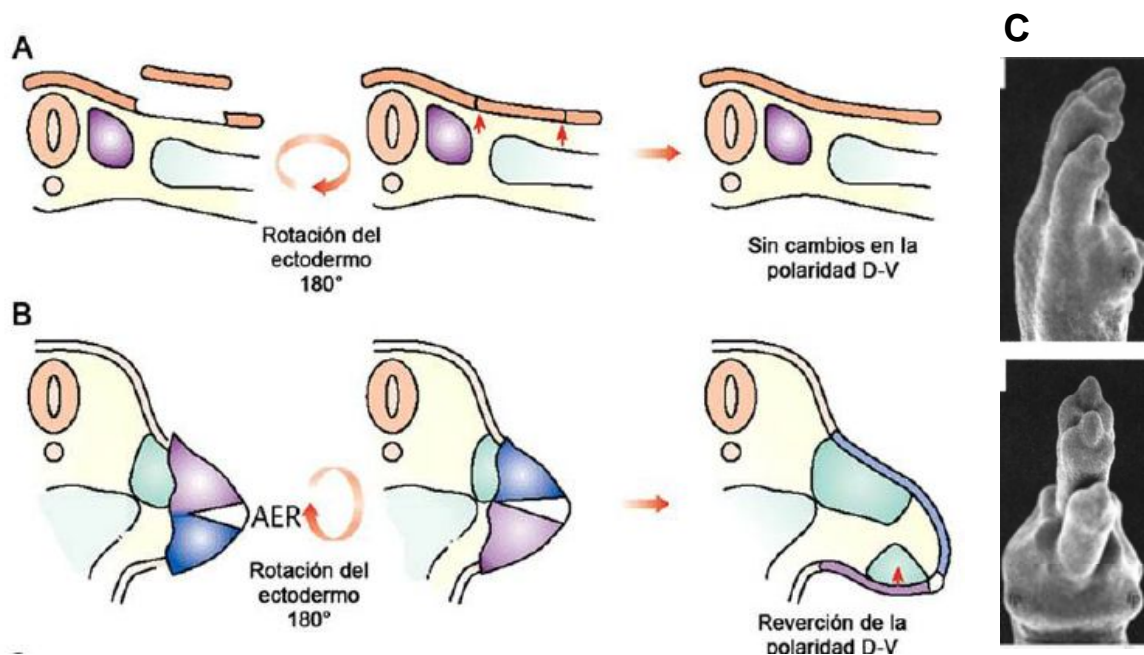


Figura 6. La rotación del ectodermo genera el intercambio de estructuras dorsales por ventrales y viceversa dependiendo del estadio. En (A) cuando aún no inicia la formación de la extremidad, la rotación del ectodermo no afecta el desarrollo de la extremidad. En (B) se observa que en un estadio avanzado la rotación del ectodermo genera cambios en la formación. En (C) se muestra un ejemplo de deficiencia dorsoventral, la mano de ratón mutante para *Lmx1* es biventral (abajo), a diferencia de una pata ratón normal (arriba) tiene cojinetes en el dorso y sin curvatura de las uñas (esquemas de Niswander, 2001; fotografías de Chen *et al.*, 1998).

Coordinación de los tres ejes.

Para que la formación completa del patrón de la extremidad se lleva a cabo la interacción de diversas moléculas de diferentes familias de señalización como FGFs, WNT, Shh y las BMP. Se ha observado, por ejemplo, el lugar de expresión de *Wnt3a* en el ectodermo es necesario para que *Fgf10* en la placa lateral del mesodermo induzca a *Fgf8* y comience la formación de la extremidad (Kengaku *et al.*, 1998) (Figura 7).

Los centros de señalización que participan en la formación de los ejes durante la formación de la extremidad son de alguna manera interdependientes. Todt y Fallon en 1987 analizaron la relación entre la AER y el mesodermo, encontraron que la región anterior de la extremidad se afectaba al retirar la AER donde observaron necrosis en el mesodermo anterior, lo que indica que no solo la ZPA era necesaria para la sobrevivencia del mesodermo anterior. *Fgf4* no solo es de importancia por su expresión en la AER posterior, sino que además puede recuperar el desarrollo de la extremidad si la AER ha sido retirada, al igual que el ácido retinoico y Shh (Niswander, 1992, 1993, 1994). Yang en 1995 relaciona la expresión de *Shh* dependiente de FGF4 y observa que al retirar el ectodermo dorsal se pierde la expresión de *Shh* (zona donde se expresa *Wnt7a*) y es recuperada al inducir *Wnt7a*.

Las proteínas morfogenéticas de hueso o Bone Morphogenetic Proteins (BMP) son miembros de la familia de proteínas del factor de crecimiento transformante beta o Transforming Growth Factor beta (TGF- β) y han sido caracterizadas por su capacidad de formar cartílago y hueso (Urist, 1965) además, se han estudiado en el desarrollo de la extremidad en procesos como la muerte celular, la condrogénesis y la maduración de los condrocitos. Niswander en

1992 publicó que BMP2 inhibe la acción de FGF4 aunque después Duprez en 1996 observa que Shh induce la expresión de *Gremlin*, inhibidor de BMP2 y activa a marcadores de estructuras distales como *Hoxd-11* y *Fgf4* en el mesénquima y la AER anterior. Zuñiga *et al.*, en 1999, demostraron que el mutante *limb deformity* no expresa *Fgf4* en la cresta posterior generando defectos en la extremidad, además carece de la expresión de *Formina* y *Gremlin*. Al transplantar células productoras de Shh a la región anterior encuentran la expresión de ambos genes en la extremidad. Después transplantan células productoras de Gremlin a un mutante *limb deformity* con lo que se recupera el asa de retroalimentación Shh-FGF4 proponiendo como intermediario del mesénquima a *Gremlin* (Figura 7).

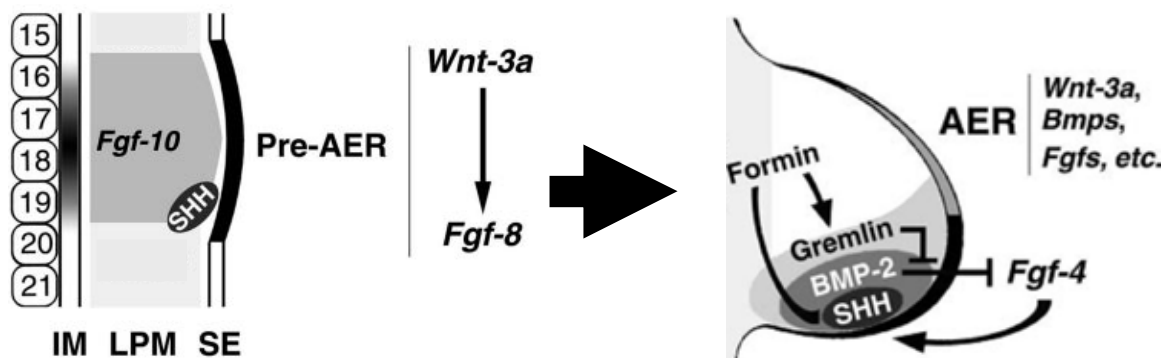


Figura 7. Interacción entre diferentes moléculas involucradas en la formación de los tres ejes de la extremidad. FGF 10 es expresado en la placa lateral del mesodermo y este a su vez induce a *Wnt3a* el cual induce la expresión de *Fgf8* (lado izquierdo de la flecha) que participa en la proliferación del primordio de la extremidad. En el primordio de la extremidad de etapas tempranas SHH induce a la proteína Gremlin que actúa para inhibir a BMP2, la cual puede inhibir a *Fgf4* y a su vez la proliferación del primordio (Capdevila e Izpisua-Belmonte, 2001).

Condrogénesis.

El esqueleto en un organismo maduro posee diferentes tipos celulares, osteoblastos y osteocitos. En su interior los huesos tienen una capa de células delgadas llamadas endosteo y en el exterior peristosteo. También hay otro tipo celular interno con células que degradan tejido óseo llamados osteoclastos.

El esqueleto embrionario es muy diferente ya que adquiere su morfología a partir de moldes de tejido cartilaginoso el cual a través de un proceso de diferenciación llega a la hipertrofia y osificación en el centro de los moldes, proceso que se conoce como osificación endocondral (Karsenty y Wagner, 2002). Por esta razón, para el estudio de la formación del esqueleto, es importante estudiar la generación del cartílago en la extremidad.

El cartílago en la extremidad es formado a partir de células mesenquimales que expresan Sox9 (Sex determining region Y box9) y que los llevarán a una condensación celular, por la cual las células mesenquimales que poseen filopodios alargados cambian su morfología y su adhesión celular confiriéndoles un agregado precondrogénico. Posteriormente, una vez condensadas las células expresan moléculas de matriz específicas, entre ellas la colágena II, colágena IX y agregano.

El primordio de la extremidad se desarrolla como una masa de células mesenquimales que poseen filopodios confiriéndoles una apariencia estrellada, con espacio intercelular considerable y vascularización (Farquhar, 1963; Searls *et al.*, 1972). Las células comienzan a perder sus filopodios y el espacio intercelular hasta quedar estrechamente unidas formando una condensación, primer paso en la formación de cartílago que da origen al esqueleto apendicular (Thorogood y Hinchliffe, 1975). El proceso de condensación, fue descrito por primera vez por Strangeways y Fell (1926), y propusieron una abundante mitosis de las células centrales del primordio para explicar el rápido incremento en el número celular, pero fue Thorogood y Hinchliffe en 1975 quien observó que se debía a la disminución del volumen celular y del espacio intercelular (Figura 8). Además, al mismo tiempo la expresión de proteínas de

matriz extracelular cambia. Los centros de condensación sustituyen a la colágena I en su centro por la colágena II, restringiendo la colágena I a las células aplanadas que rodean el blastema cartilaginoso, denominado pericondrio (Von der Mark *et al.*, 1976). Aunque la colágena I y la fibronectina persisten en los elementos esqueléticos, siempre permanecen en la periferia, tanto en el pericondrio como en el mesénquima adyacente (Dessau *et al.*, 1980; Kulyk *et al.*, 1989). Otras moléculas de matriz de cartílago secretadas son la colágena IX (Kulyk, 1986). El ácido hialurónico (HA) facilita la agregación celular en etapas tempranas del primordio (Maleski *et al.*, 1996) y disminuye con la producción de Hialuronidasa (degradador del HA) y condroitin sulfato, que son glicosaminoglicanos que se secretan previo a la condensación de cartílago (Searls, 1965; Kosher *et al.*, 1981; Kulyk *et al.*, 1986). Las proteínas de adhesión celular o N-Cadherinas son importantes para una completa condensación (Delise y Tuan, 2002).

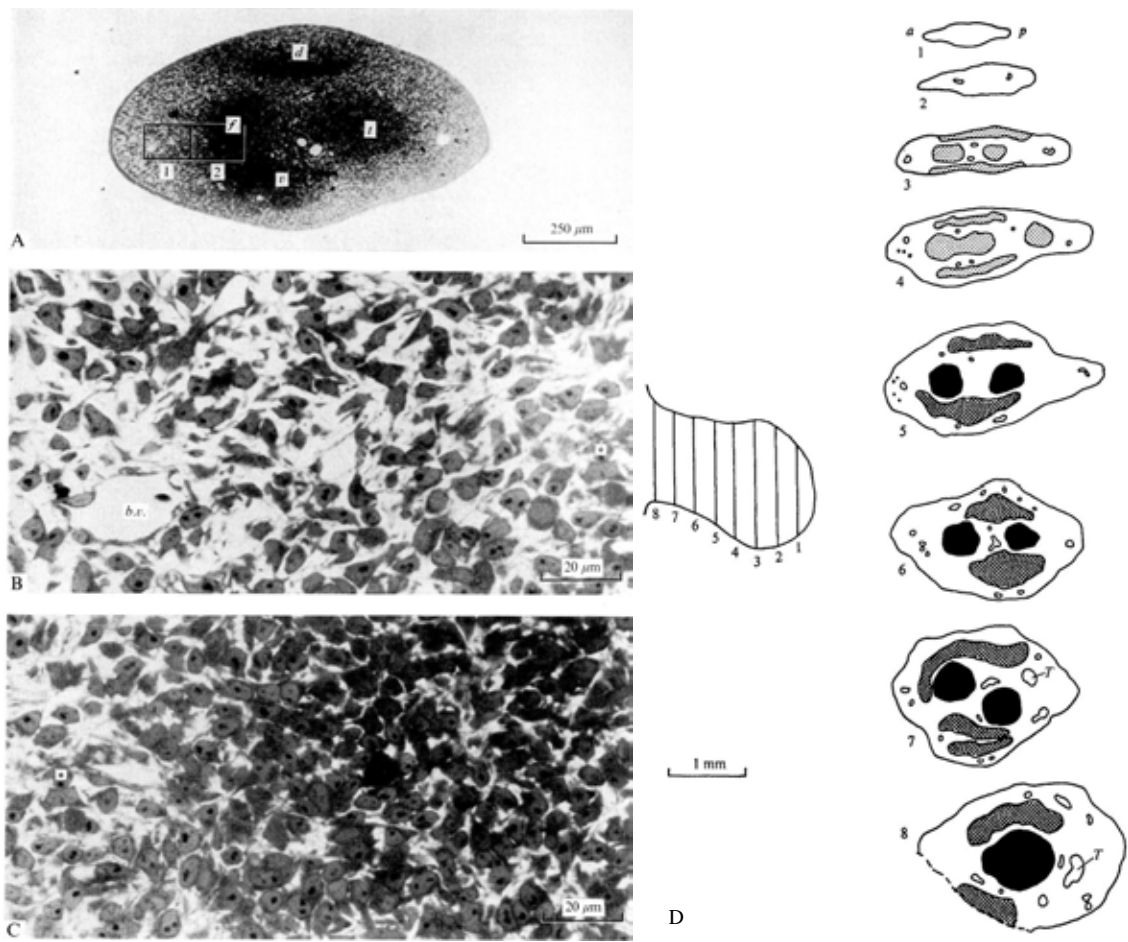


Figura 8. En (A) se muestra un corte transversal en la región del zeugópodo de estadio 26, el pequeño recuadro a la izquierda indica un acercamiento visto en (B) donde se muestra el mesénquima su espacio intercelular y el recuadro de la derecha corresponde a un acercamiento visto en (C) donde hay una condensación de las células. En (D) se esquematizan varios cortes transversales en el mismo estadio donde se observa que la condensación varía en el eje próximo distal. La tonalidad de gris corresponde al grado de condensación, lo que esta arriba y abajo del centro son los músculos. (Thorgood y Hinchliffe, 1975)

Como se había mencionado las células que se condensan en el primordio son aquellas que expresan Sox9. El factor de transcripción Sox9 es esencial en la formación de cartílago, el cual se identificó en la displasia campomélica, enfermedad congénita del esqueleto. Los individuos con displasia campomélica presentan acortamiento de las extremidades, escápula e ilion pequeños y el fémur y la tibia curvados, además tienen orejas pequeñas, nariz aplanada (Akiyama, 2002). Uno de los genes blanco de Sox9 es la colágena 2a1

(Lefebvre, 1997). Zhao et al 1997 observaron la expresión de Sox9 en las zonas donde *colágena II* se expresa en el esqueleto. El ratón homocigoto recesivo para Sox9 , el cual no expresa el gen Sox9 no forma los elementos cartilaginosos y a pesar de expresar factores importantes en la formación de los ejes de la extremidad, se observa que el tejido al no diferenciarse a cartílago entra en apoptosis (Akiyama, 2002). El TGF- β se ha relacionado con la formación de nódulos de cartílago en micromasas (Kulyk, 1989) induce la formación de un dedo ectópico en el espacio interdigital (Gañan *et al.*, 1996) y como resultado se expresa Sox9 a los 30 minutos después de la colocación de la perla con el factor TGF- β (Chimal-Monroy *et al.*, 2003).

La familia de BMP y sus antagonistas participan en la formación del cartílago. La mutación en el gen *Bmp5* está asociada a defectos en el esqueleto incluyendo la reducción en el tamaño de los huesos largos (King *et al.*, 1994). La colocación de perlas de BMP7 en la punta del dedo induce cartílago de forma excesiva (Gañan *et al.*, 1996). El receptor por el cual actúan las BMPs en la condensación condrogénica es BMPR1b, su sobreexpresión genera elementos gruesos. En cultivo de micromasas, la construcción dominante negativa del gen *Bmpr1b* da como resultado la inhibición de la formación del cartílago (Zou *et al.*, 1997). En la formación del dedo ectópico BMPR1b se observa previo a la expresión de *colágena II* (Chimal-Monroy *et al.*, 2003).

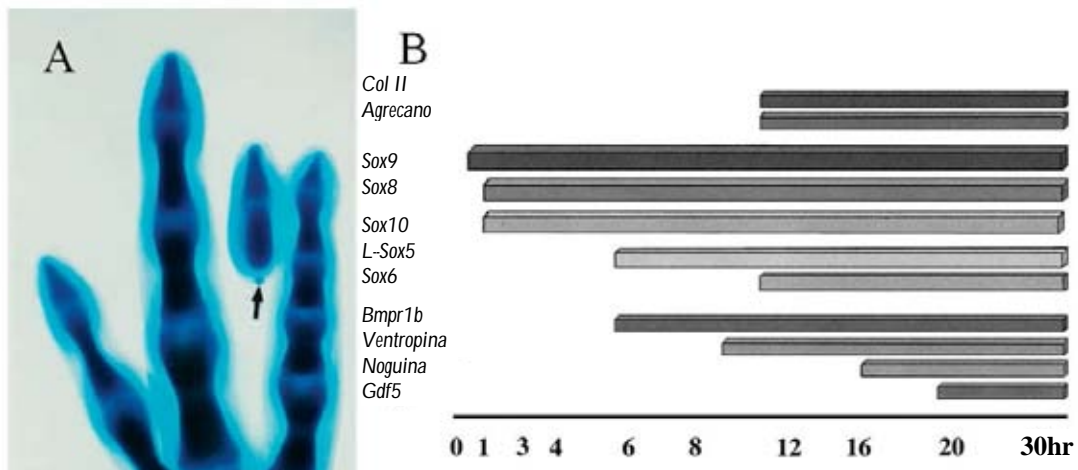


Figura 9. La aplicación de TGF- β en el interdígito dispara una cascada molecular involucrada en Condrogénesis y la formación de los elementos esqueléticos. En (A) se muestra la formación del dedo ectópico en una tinción de azul anciano (específica para el cartílago). En (B) se muestra el inicio de la expresión de moléculas que participan en etapas tempranas en la formación del esqueleto (dedo ectópico de Gañan *et al.*, 1996; Gráfica de Chimal-Monroy, 2003).

El antagonista de BMP, *Noguina*, se expresa en las condensaciones por lo que puede formar un asa de retroalimentación con BMP controlando el tamaño de los dígitos (Merino *et al.*, 1998). El mutante nulo para *Noguina* genera extremidades engrosadas y de menor tamaño (Brunet *et al.*, 1998). Las células transfectadas con *Noguina* no permiten la formación de cartílago ni la expresión de *Sox9* (Pizette y Niswander, 2000). Si se coloca *Noguina* en la punta del dedo, esta trunca su crecimiento e induce la muerte celular en tejido distal (Merino *et al.*, 1998).

Cuando los elementos esqueléticos alcanzan cierto tamaño, entonces los condrocitos en el centro del elemento esquelético salen del ciclo celular y entran al programa de articulaciones (Garciadiego *et al.*, 2004; Chimal-Monroy *et al.*, 2005). En esta fase las células pre-articulares cambian su morfología y bioquímica para iniciar la formación de las articulaciones (Craig *et al.*, 1987) y por mecanismos desconocidos dejan de expresar los marcadores de cartílago

y expresan los marcadores tempranos de las articulaciones, como son Wnt9a, Gdf5 y CD44 (Archer *et al.*, 2003).

Posterior a este evento, el elemento esquelético segmentado sigue proliferando y se diferencia hacia el centro del elemento, deja de proliferar e inicia la pre-hipertrofia donde dejará de secretar proteínas de cartílago y sus células comenzarán a crecer en volumen. Después pasará a la hipertrofia y hacia la osificación endocondral en el centro del molde cartilaginoso (Ortega, 2004).

Formación de las articulaciones: interzona, cavitación y segmentación

Las articulaciones sinoviales permiten la movilidad de las extremidades en los tetrápodos. Adyacente a las cavidades articulares, existe una importante inserción de músculos que permiten la aplicación de fuerzas de palanca y movimiento pendular. Las articulaciones poseen una fricción muy baja debido al líquido sinovial, lo que evita el desgaste de las mismas (Hildebrand, 1982). La formación de la articulación se divide en tres procesos: la formación de la interzona que se distingue por presentar células aplanadas entre dos elementos. Luego sigue la cavitación, proceso por el que la zona media de la interzona se separa e inicia a la separación de dos superficies articulares. Una vez separados los elementos forman los cóndilos articulares donde la articulación adquiere su morfología con un extremo cóncavo y otro convexo en varios elementos (Archer *et al.*; 2003 Pacifici *et al.*, 2005) (Figura 10).

Fell y Canti en 1934 cultivaron primordios de la extremidad en ausencia de nervios y músculos, dejando solo los moldes de cartílago. Los cultivos presentaron los primeros eventos de la formación de las articulaciones,

demostrando que las articulaciones son formadas por actividad intrínseca de los elementos esqueléticos. Además identificaron la presunta zona de la articulación o interzona dentro de los moldes de cartílago.

El inicio de la formación de las articulaciones se reconoce por la presencia de células alargadas en arreglo discoidal y avasculares. La orientación de dichas células es de manera perpendicular al molde de cartílago o longitudinal en los extremos. La interzona forma tres capas reconocibles, dos de células aplanadas rodeando el cartílago. Entre estas dos capas hay un disco intermedio, visto en corte transversal como una línea de células esparcidas y estrelladas con grandes espacios intercelulares (Mitrovic, 1978) (Figura 10).

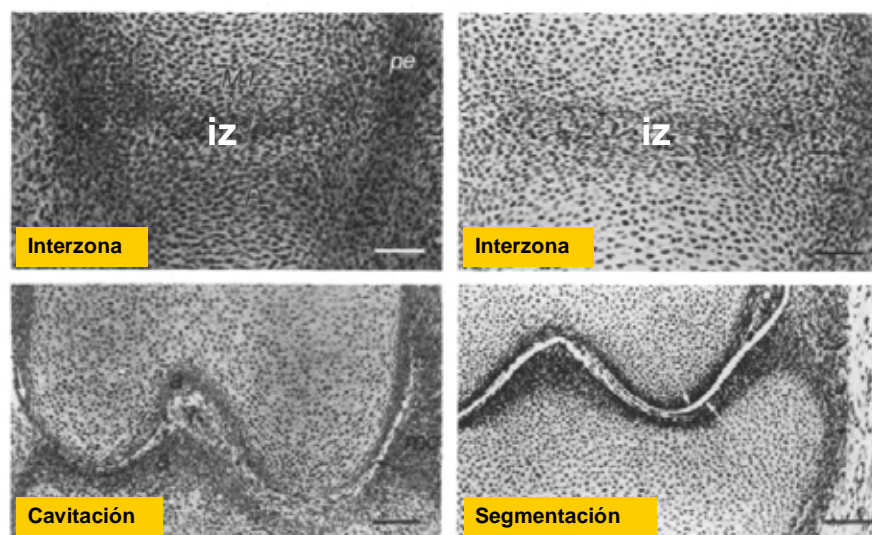


Figura 10. Cortes histológicos de la articulación metatarso-falange a diferentes etapas mostrando los diferentes fases de la formación de las articulaciones. En A y B se muestra la interzona, en C se muestra la cavitación y en D se observa la segmentación completa de los elementos esqueléticos con sus cóndilos articulares. (Craig, 1987).

En el estadio E23, el cartílago del estilópodo y zeugopodo son continuos entre si y dan la apariencia de una Y (Fell y Canti, 1934) como se puede notar por la expresión de *colágena II* (Dessau *et al.*, 1980). Holder en 1977 cortó la región de la interzona entre el húmero, el radio y la ulna antes de que llegara a formar la articulación. Al unir las regiones restantes de la extremidad observó que se

desarrolló un elemento continuo entre el húmero, el radio y la ulna, el cual se osifica como un elemento único. Estos resultados han llevado a la idea de que la articulación es una región determinada desde estadios tempranos. Estudios posteriores acerca de la histoquímica de la interzona demostraron cambios tanto morfológicos como bioquímicos dentro de la presunta articulación. Durante los estadios 26 y 27, la interzona retiene la expresión de condroitín sulfato y colágena 2 y en el estadio 28 disminuye su expresión (Craig *et al.*, 1987) (Figura 11).

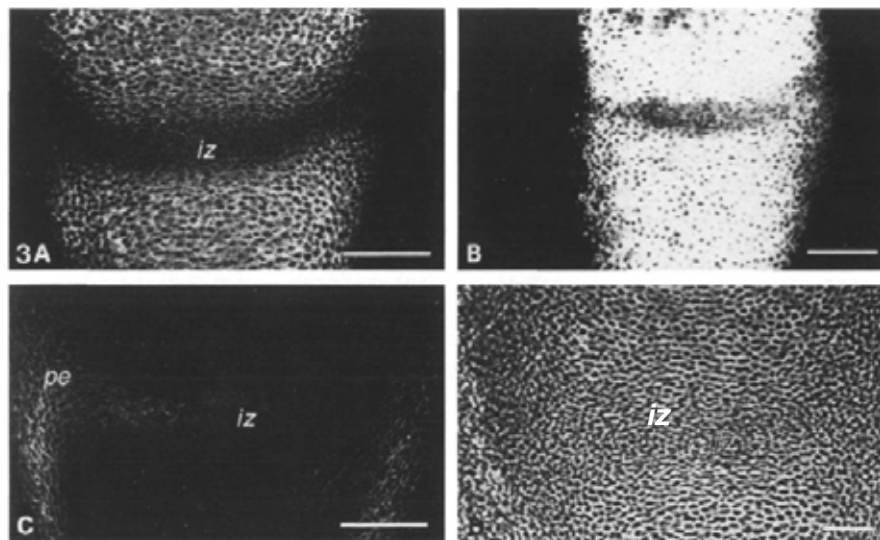


Figura 11. Durante la formación de la interzona, las células cambian la matriz extracelular. (A-C) Inmunohistoquímica de Keratan sulfato (A) y de colágena 2 (B) donde se muestran la pérdida de proteína Colágena II y se encuentra Colágena I (C). En D) un corte al nivel de la interzona que aún no posee evidencia morfológica de la misma. (Craig, 1987)

Craig *et al.*, en 1990, encontraron que la síntesis del ácido hialurónico (HA) tiene relación con el evento de cavitación, además de participar en la agregación celular en etapas tempranas, el HA contribuye a la separación de las superficies articulares. Dowthwaite *et al.*, en 1998, colocaron oligosacáridos incompletos de HA en rodillas embrionarias, los cuales logran bloquear la acción del HA endógeno. Como resultado observaron que las superficies

articulares no se separaron y de manera simultánea observaron que *Cd44* (el receptor para HA) disminuye su expresión en sus condiciones experimentales. El ratón mutante en *braquipodium* carece de dedos y de algunas articulaciones. El factor responsable de este fenotipo es el GDF5 (growth and differentiation factor 5) o CDMP (cartilage derived morphogenetic protein 1) (Storm *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1994). GDF5 al igual que BMP2 y BMP4 son miembros de la familia TGF β y la implantación subcutánea de la proteína GDF5 forma cartílago (Chang, 1994), no obstante desde estadios tempranos en el desarrollo de la extremidad del ratón, el patrón de expresión de *Gdf5* se observa en la interzona y se mantiene en la articulación hasta el nacimiento (Storm y Kingsley, 1996).

Se han hecho diferentes aproximaciones para conocer el papel de GDF5 en el desarrollo de la extremidad. La colocación de perlas embebidas con la proteína GDF5 produce un incremento en el tamaño de los elementos esqueléticos y la pérdida de expresión de *Gdf5* en la interzona en el elemento esquelético adyacente (Storm y Kingsley, 1999). De la misma manera, Merino *et al.*, en 1999, obtienen engrosamiento de los elementos esqueléticos y observan el aumento de expresión de los genes involucrados en la condrogénesis, como *Bmpr1b*, *Noguna*, *Tgf- β* . Francis-West en 1999, sobreexpresa *Gdf5* por medio de retrovirus en primordios de etapas tempranas y obtiene engrosamiento de elementos proximales debido a un incremento celular. Propuso que las células del pericondrio eran inducidas por *Gdf5* a proliferar y diferenciarse a cartílago, pero no induce la formación de la articulación. *Gdf5* se une al receptor *Bmpr1b* y al igual que otros miembros de la familia BMP es inhibido por *Noguna* (Merino, 1999). El mutante de *Noguna* también forma elementos

engrosados y cortos, además no posee articulaciones (Brunet, 1998; Tylzanowski, 2006). Por lo que se le atribuye a Noguina un papel dual en la condrogénesis y en determinar el sitio de formación de la articulación (Figura 12).

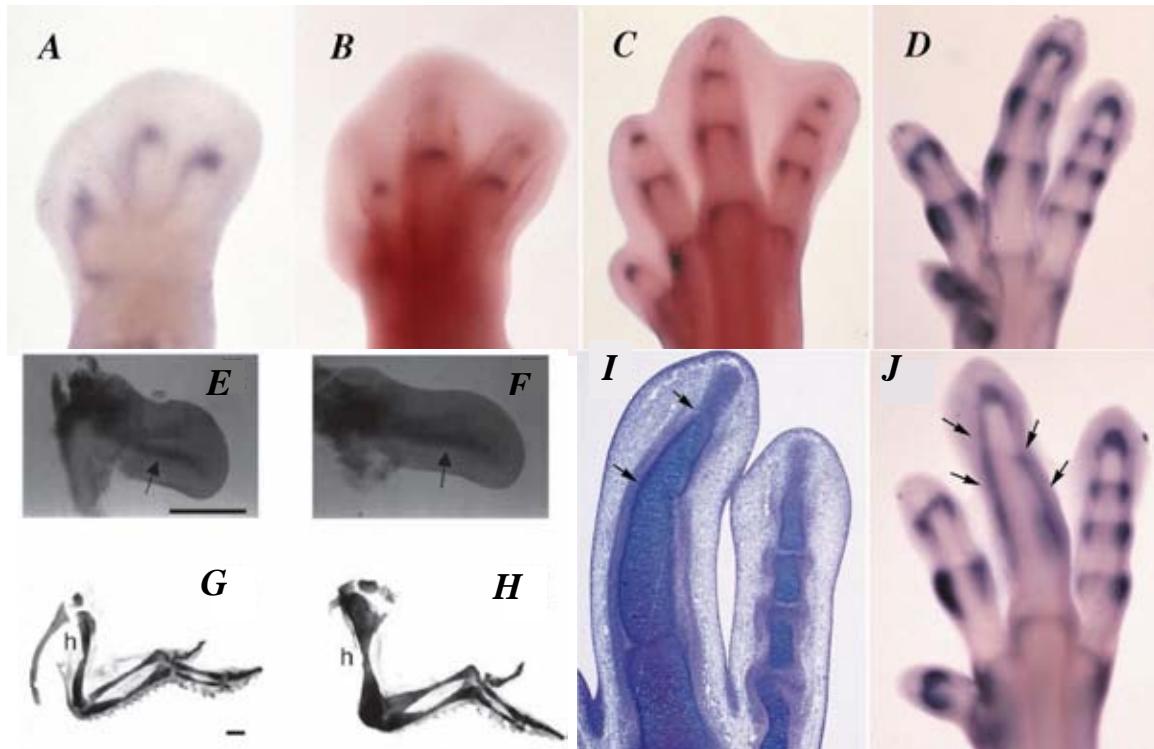


Figura 12. A-D, se muestran diferentes etapas del desarrollo del autópodo marcando la expresión de *Gdf5* en las articulaciones. E- H transducción de extremidades para sobreexpresar *Gdf5* a las 48 horas, E y F ya los 10 días (abajo), en la derecha muestran un incremento de cartílago en el elemento con respecto al control izquierda. En F y G se muestra la transducción para sobreexpresar la vía de hedgehog donde hay fusión de articulaciones vista en la continuidad de cartílago en el dedo (F) y la falta de expresión de *Gdf5* (G) (Storm y Kingsley, 1999; Merino *et al.*, 1999).

La familia WNT participa de manera importante en la formación de los elementos esqueléticos y las articulaciones, sin embargo algunos miembros pueden regular negativamente la condrogénesis. La expresión de los genes *Wnt1* y *Wnt7a* en cultivos de micromasas genera deficiencias en la agregación celular y secreción de matriz extracelular (Rudnicki *et al.*, 1997). Se tiene reportado que los miembros de la familia WNT llevan a cabo funciones diversas, *Wnt5a* se expresa en el mesénquima distal y pericondrio donde

retrasa la maduración de los condrocitos, mientras que *Wnt4*, que se expresa en los flancos de las articulaciones provoca la maduración de los condrocitos en la placa de crecimiento (Hartman y Tabin, 2000). Hartmann y Tabin en el 2001 observan que la expresión ectópica de *Wnt9a* en los cartílagos del autópodo da como resultado la disminución de la condrogénesis, causando la baja expresión de genes como *colágena II*, *colágena IX*, *Sox9*, y *Noguina*, mientras que se inducen los marcadores típicos como *Cordina*, *CD44*, *Gli3*, *autotaxina* (Bächner *et al.*, 1999), *colágena III* y *Gdf5* (Hartman y Tabin, 2001) (Figura 13). Por lo que Hartman y Tabin (2001) proponen que *WNT9a* es el factor inductor de la formación de la interzona.

La señalización de la ruta canónica de Wnt transduce a través de β -catenina. En el mutante condicional de *β -catenina* bajo el promotor de *colágena II*, es decir, cuando comienza a expresarse *colágena II*, se expresa Cre-recombinasa que escinde la región LoxP específica en ambos extremos del gen de *β -catenina*, por lo cual se silencia dicho gen, y se observa fusión del codo y falanges, por lo que Guo *et al.*, en el 2004 proponen que β -catenina es necesario y suficiente para la formación de las articulaciones a través proteínas *WNT4*, *WNT9a* y *WNT16* que se expresan en las articulaciones y pueden activar a β -catenina e inhibir a *Sox9*, lo que lleva a la inducción de *Gdf5*.

Por otro lado, en el ratón doble mutante *Wnt9a* y *Wnt4*, la interzona es completa y los marcadores tempranos como *Gdf5* o *Gli3* se expresan pero disminuye el tamaño de los elementos esqueléticos y se fusionan algunos elementos esqueléticos de la muñeca y el tobillo (Später *et al.*, 2006).

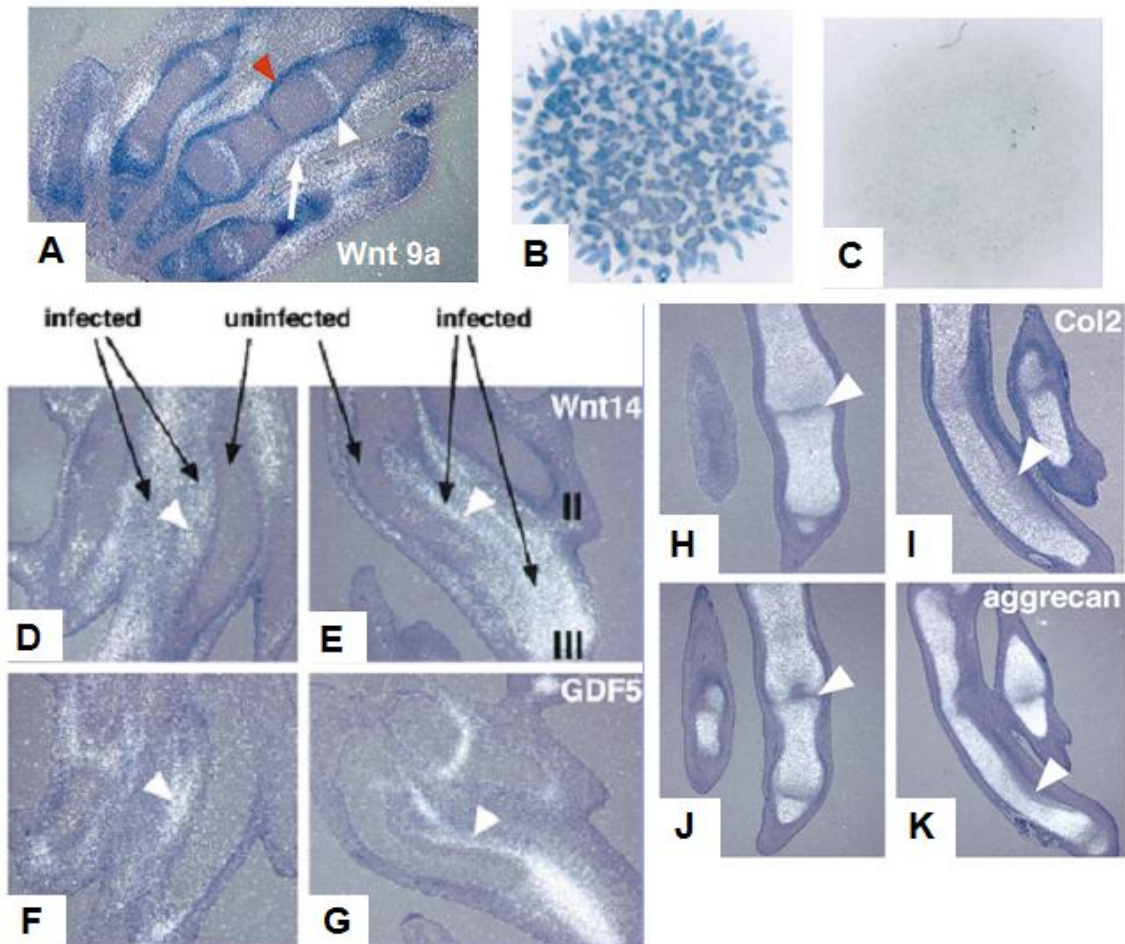


Figura 13. En A se muestra la expresión de *Wnt9a* en la extremidad de embrión de pollo en estadio 35. B y C, son cultivos en micromasas de células infectadas por virus RCAS con fosfatasa alcalina como control (B) y con *Wnt9a* (C) nótese la falta de tinción azul alciano cuando se sobreexpresa *Wnt9a*. (D-G) La infección con *Wnt9a* en los rayos digitales de las extremidades causa el incremento de expresión de *Wnt9a* (D y F, cabeza de flecha) y *Gdf5* (E y G, cabeza de flecha) en la zona infectada. La disminución en expresión de *colágena II* y *agrecano* puede de ser vista en la región de la interzona (H y J) así como en la región donde se sobreexpresa *Wnt9a* (K e I). (Hartman y Tabin, 2001).

La vía de señalización Hedgehog, que participa en varios procesos, entre ellos la condrogénesis parece tener gran importancia en el desarrollo de la articulación, el factor de transcripción *Gli3* componente de la vía Hedgehog fue de los primeros en identificarse como marcador de la interzona (Hui *et al.*, 1993). Las extremidades del mutante de *Gli3* tienen muchos dedos que carecen de articulaciones (Litingtung *et al.*, 2002). Indian hedgehog (*Ihh*) posee una participación fundamental en la maduración de los condrocitos

(Vortkamp *et al.*, 1996), la inhibición de *Ihh* afecta a la extremidades, en el fenotipo se puede observar que los dedos se adelgazan y no presentan la regiones de la interzonas (Koyama *et al.*, 2007). Por otra parte, cuando *Ihh* se sobreexpresa, se generan dedos gruesos sin interzonas (Merino *et al.*, 1999) (Figura 12 F y 12 G).

En los últimos años se han encontrado factores que han inducido cambios a nivel molecular que preceden a la formación de una articulación. Sin embargo, el trabajo de Garciadiego *et al.*, en el 2004 han sido los únicos en observar cambios morfológicos y moleculares que finalizan con la separación total de los elementos esqueléticos, es decir, una articulación ectópica completa. La inactivación de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en la extremidad en desarrollo induce el cambio en los moldes de cartílago de un destino prehipertrófico hacia el destino articular, expresando todos los marcadores propios de la articulación (Garciadiego *et al.*, 2004). Sohaskey *et al.*, en el 2008, introdujeron una nueva interrogante acerca de las articulaciones, observaron que mutación nula del gen *Jaws* o dominio 1 de la inositol monofosfatasa (*Impad1*), producía cambios en la expresión de marcadores de la interzona, por lo que la expresión transversal ahora se observaba longitudinal a los dedos, al igual que la mutación condicional del gen *Hif1* α (Hipoxia inducible factor 1 alfa) (Amarilio *et al.*, 2007), indicativo de una posible regulación de la posición dentro del dedo, sin embargo por el momento se desconoce la función de *Jaws* y de *Hif1* α .

Por último, se ha observado la expresión específica de distintos genes en la articulación como la *staniocalacina 2* (Mittapalli *et al.*, 2006), *Erg* (Iwamoto *et al.*, 2000) y el *versicano* (Shepard *et al.*, 2007). Aunque se propone que dichos marcadores contribuyen de manera transitoria durante la morfogénesis de la

articulación, su papel en las primeras fases en la formación de la articulación aún no está esclarecido.

Inducción del dedo ectópico mediante la aplicación de TGF β

El factor de crecimiento transformante beta (TGF β) es una superfamilia compuesta de diferentes miembros, como son las activinas, BMPs y GDFs (Massagué 2000). En cultivos *in vitro* de micromasas de células de la extremidad en desarrollo, los miembros TGF β 1 y TGF β 2 favorecen la producción de glucosaminoglicanos propios de la matriz de cartílago 3 veces más y hasta 6 veces más producción de mRNA del gen *colágena II* que cultivos en ausencia de este factor (Kulyk *et al.*, 1989). Además, provoca la diferenciación de cartílago en células cultivadas en baja densidad, lo cual no sucede normalmente en esos tipos de cultivo (Kulyk *et al.*, 1989). Al mismo tiempo se ha demostrado que la extracción del ectodermo marginal en el interdígito de la extremidad de pollo provoca la diferenciación a tejido cartilaginoso con una apariencia alargada, lo que sugiere que estas células son capaces de formar cartílago en ausencia de señales inhibitoras del ectodermo (Hurlé *et al.*, 1989). *Tgf β* se expresa en el cartílago de la extremidad en desarrollo del ratón (Millan *et al.*, 1991) y el pollo (Roark y Greer 1994), pero en ambos animales se ausenta en el resto del mesénquima. La aplicación de perlas de agarosa embebidas en TGF β generan cambios en la formación del esqueleto en la extremidad, entre ellas la reducción de elementos esqueléticos y la formación de cartílago ectópico (Hayamizu *et al.*, 1991). Los resultados

obtenidos por Gañan *et al.*, en 1996, mostraron que la aplicación de una perla de heparina embebida en la proteína TGF- β en el estadio 27 o 28 es capaz de cambiar el destino celular del tejido interdigital, dando como resultado la formación de cartílago y desarrollándose un dedo ectópico. El potencial de este modelo permitió comprobar que TGF β es capaz de inducir la condrogénesis e inducir al receptor *Bmpr1b* y al antagonista de BMPs, *Noguina* y que la señalización proveniente del ectodermo participante en el crecimiento proximodistal de la extremidad, como es FGF, regula la condrogénesis manteniendo las células indiferenciadas en la región distal y en el interdígito (Merino *et al.*, 1998). Se encontró con ayuda de este modelo que *Sox9* es el factor más temprano de la condrogénesis, al inducirse a los 30 min. (Figura 14B) y a partir de este momento llevar a cabo una cascada molecular en la que se inducen genes condrogénicos como *Noguina*, *Bmpr1b* y *colágena II* (Figura 9B) (Chimal-Monroy *et al.*, 2003). Estos trabajos comprueban que la inducción del dedo puede recapitular el proceso que se lleva de forma natural en la extremidad y nos ayuda a obtener información acerca del papel de las moléculas involucradas en la formación del dedo y las articulaciones.

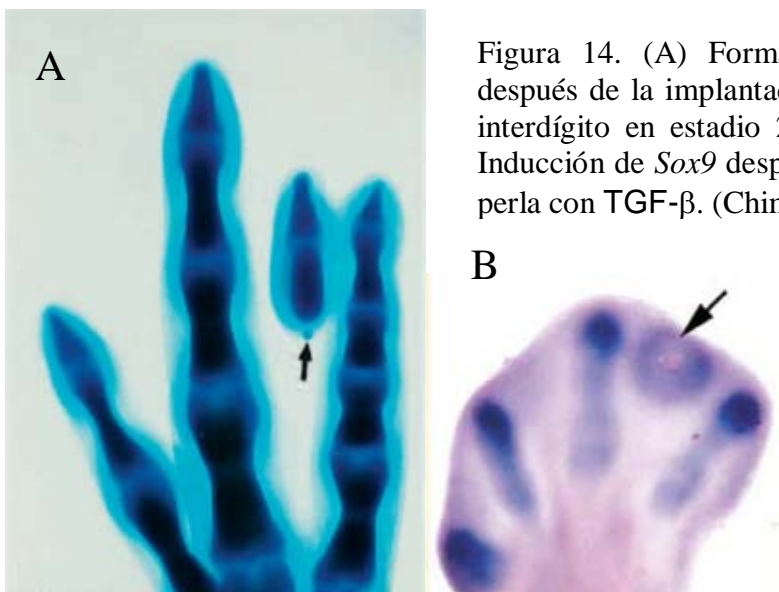


Figura 14. (A) Formación de un dedo ectópico después de la implantación de una perla en el tercer interdígito en estadio 29 (Gañan *et al.*, 1996). (B) Inducción de *Sox9* después de 30 minutos de colocar perla con TGF- β . (Chimal-Monroy *et al.*, 2003)

Material y métodos:

Preparación de la solución de TGF- β

Como se mencionó en la introducción, la aplicación de perlas de heparina embebidas en TGF- β en estadio 28-29 inician la formación de un dedo ectópico en el interdígito. La proteína TGF- β de la compañía Preprotech (Cat# 100-21R), concentrada a 1 mg se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto y resuspendió en 100 μ l de agua destilada y estéril, posteriormente se dió una centrifugación rápida para concentrar la proteína. Se realizaron alícuotas de 2 μ l a una concentración final de 50 ng/ μ l dado que es la concentración óptima para obtener la formación de un dedo ectópico.

Preparación de las perlas con TGF- β

En el fondo de una caja de Petri de 2.5 cm de diámetro se colocó un cuadro de parafilm y se fijó con pinzas, luego se colocaron gotas de amortiguador salino de fosfatos (PBS) para que la alícuota con las perlas se mantuvieran húmedas. Se separaron 30 perlas acrílicas de Heparina (SIGMA Cat. 5360) y se lavaron con PBS dos veces, luego se les retiró el PBS y se agregó 2 μ l de TGF- β . Las perlas se dejaron incubando 1 hora a 4°C. La caja Petri se colocó en una superficie fría, hielo o geles refrigerantes.

Operación de embriones de pollo

Se utilizó como modelo experimental el embrión de pollo, dada la ventaja de intervenir en tiempos específicos de su desarrollo embrionario. Los huevos de gallina fértiles y libres de patógenos fueron adquiridos de la empresa distribuidora ALPES. Los huevos se mantuvieron a 37°C y 70% de humedad en

una incubadora InCumatic N300 durante 7 días, para que los embriones se desarrollaran hasta el estadio 27-28. Para manipular los embriones, los huevos se colocaron con la cámara de aire hacia arriba y se les rompió el cascarón de esa región, después se retiraron las membranas del corion. En el embrión, por lo general, las extremidades están expuestas y para manipularlas se usó una pinza para levantar el amnios cercano a la extremidad (una membrana transparente que lo cubre) y con ayuda de un arpón se hizo una perforación en el 3er interdígito. Se tomó una perla acrílica de heparina embebida en TGF- β y se colocó en el lugar de la perforación. Una vez manipulado el embrión, se cubrió el orificio hecho en el cascarón con una tapa de cinta adhesiva y se regresó a la incubadora para que continuara con su desarrollo.

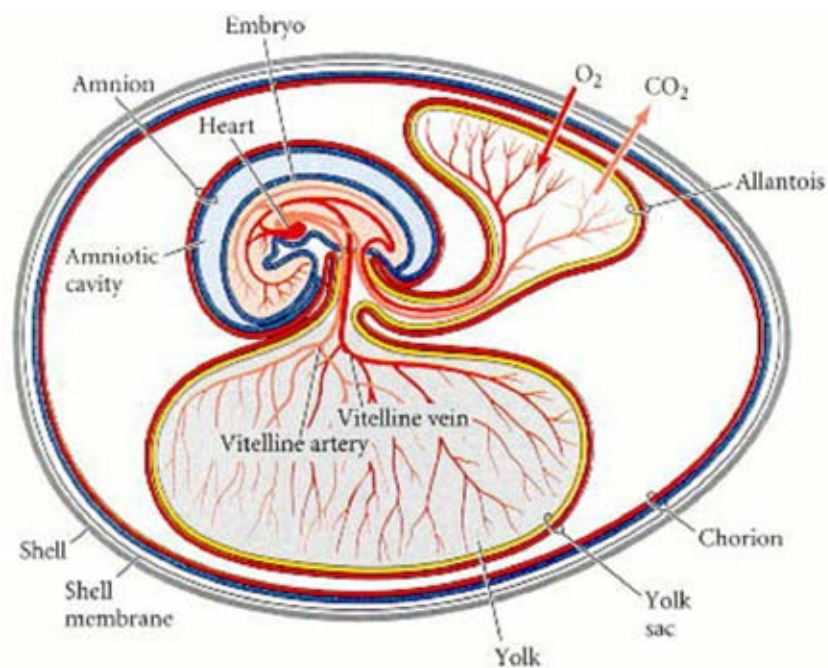


Figura 15. En este esquema se muestran las membranas que cubren al embrión durante su desarrollo, la membrana que envuelve la pared interna es el corion, el embrión se encuentra envuelto por una membrana avascular denominada amnios, la otra membrana vascularizada es el alantoides, donde se realiza el intercambio gaseoso y la membrana donde se encuentra la yema se denomina el saco vitelino (Gilbert, 2003).

Tinción de esqueleto

El efecto del TGF- β en el interdígito se observó al realizar una tinción de esqueleto con azul alciano/alizarina roja. El primero tiñe específicamente los proteoglicanos sulfatados del cartílago en azul y el rojo alizarina tiñe de este color los minerales de calcio en las regiones del esqueleto ya osificadas. Para teñir y observar los esqueletos, los embriones se lavaron en PBS para retirar la mayor cantidad de sangre posible y se fijaron en etanol al 96% para que se deshidrataran parcialmente. Al siguiente día se cambió el etanol por acetona, que provocó deshidratación por completo en los tejidos haciéndolos permeables a los colorantes. Pasado otro día, se retiró la acetona y se agregó una mezcla de 1 volumen de azul alciano 0.3%, 1 volumen de rojo alizarina 0.1%, 1 volumen de ácido acético 100% y 17 volúmenes de etanol al 70%. La mezcla ingresa a todos los tejidos para teñir el esqueleto y se mantuvo toda la noche en agitación. Para poder observar el esqueleto se retiró la mezcla de tinción y se agregó glicerol al 20% con hidróxido de potasio (KOH) al 1%, en esta mezcla todos los tejidos, excepto el esqueleto, se transparentaron permitiendo ver a este último.

Fijación de muestras para hibridación *in situ*

Para conocer la expresión de los genes es muy importante que el material biológico no se degrade con el tiempo. Para la prueba de hibridación, los embriones a los que se les implantó pelotas con TGF- β así como los controles embrionarios que correspondan a la misma etapa se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% toda la noche. El PFA detiene las reacciones bioquímicas, lo cual nos permite preservar al organismo en momentos precisos

de su desarrollo. Una vez fijadas las muestras, se lavaron dos veces en PBS para retirar el PFA, luego se colocaron en PBS con Tween (PBT) y se pasaron a diferentes concentraciones de metanol y PBT (25, 50, 75 a 100%) con la finalidad de deshidratar las muestras y poder almacenarlas a -20°C.

Hibridación *in situ* en órgano completo

Es posible conocer la expresión de un gen en un órgano completo de un estadio embrionario específico. En este proceso el mRNA solo posee una cadena de bases nucleicas y es en este momento que se puede hibridar una sonda de RNA con un marcador, para ser observada en tinción específica a un gen en transcripción (Gilbert, 2003).

1. Diseño de sondas para hibridación

Como primer paso de la hibridación *in situ* se generó una sonda de RNA que se hibridaría con el mRNA endógeno. Se realizaron oligonucleótidos específicos para delimitar la secuencia de interés, mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, los oligonucleótidos se unirían a la región sentido y antisentido de la doble hélice donde se encontraba nuestro gen de interés. Para la PCR se utilizó una mezcla que contenía DNA complementario (cDNA) de todo el mRNA de un embrión junto con los oligonucleótidos sentido y antisentido, nucleótidos trifosforados sueltos y la enzima Taq polimerasa. En el caso de *Cd44* se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: sentido GCATGTGGCATGTCATTGTT y el antisentido CACAATAGAGCTGGGGTCGT. En el primer paso del ciclo se aumentó la temperatura a 95°C, por 35 segundos con el fin de desnaturalizar el cDNA, en el segundo paso del ciclo se

disminuyó la temperatura a 60°C por 30 segundos para que los oligonucleótidos se alinearan en ambos sentidos con el cDNA y en el tercer paso de extensión, la temperatura se mantuvo en 72°C por 1 minuto estas tres fases se repitieron durante 35 ciclos y se realizó la extensión final de la cadena a 72°C por 15 minutos con el fin de asegurar que todas las cadenas se amplificaran. Durante cada ciclo de temperatura se obtuvieron copias de DNA de manera exponencial. La reacción se corrió en gel de electroforesis y se tiñó con bromuro de Etidio para comprobar que obtuvimos DNA del peso molecular deseado (Lehninger, 2005).

2. Clonación de la secuencia de interés

Una vez obtenida la secuencia de interés se ligó al plásmido comercial, pGEM T-Easy vector de la compañía Promega, con este plásmido se transformaron bacterias *Escherichia coli* competentes para cultivos a gran escala. El plásmido previo a la ligación contenía un sitio de clonación múltiple en la región del gen *LacZ*, que codifica para la enzima β -galactosidasa, la cual al momento de unirse a la lactosa le da una coloración azul a las bacterias, pero cuando se inserta la secuencia de nuestro gen de interés en el sitio de clonación múltiple inactiva la región del gen *LacZ* en el plásmido, no permitiendo la expresión de β -galactosidasa y dejando a las colonias de bacterias de un color blanco. El plásmido conteniendo insertada la secuencia se utilizó para transformar bacterias competentes mediante un choque térmico a 42°C. Las bacterias se sembraron en placas Petri y se incubaron toda la noche a 37°C. El plásmido, posee un gen de resistencia a la Ampicilina, lo cual ayuda a distinguir a las

bacterias que si transportan el plásmido pues son las que sobreviven en un medio de agar LB con Ampicilina.

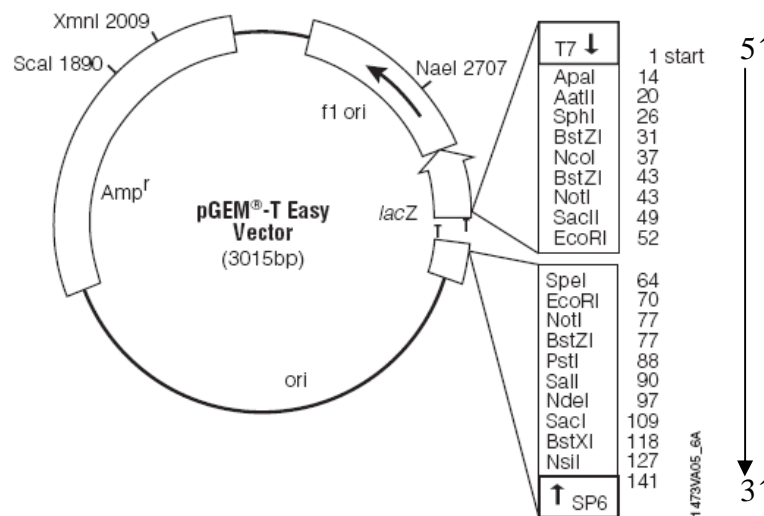


Figura 16. Plásmido comercial pGEM[®]-T Easy Vector (3015bp)

Se tomó una colonia blanca de *E. coli* y se hizo crecer en 2 ml de medio LB durante toda la noche a 37°C y en agitación constante. Pasado este tiempo, se volvieron a hacer crecer en 150 ml de medio LB un día más. Los cultivos se centrifugaron a 7000 rpm y se congelaron ya sin medio a -20°C. El análisis de la secuencia introducida al plásmido se hizo por medio de un secuenciador y primers T7. Esto nos da información del orden de las bases nucleicas y si está en sentido o antisentido y se comprueba con la base de datos del Genbank.

3. Extracción del plásmido y liberación de inserto

A partir de las muchas copias de nuestra secuencia en el plásmido que se reprodujo en las bacterias, se obtuvo dicho plásmido a través de la técnica de mini-preparaciones, y con ello se pudo recuperar específicamente el plásmido de los cultivos de bacterias. En esta técnica, se purificó el DNA de las bacterias y se pasó por una columna con un filtro especial que sólo adhiere al plásmido. Luego con agua desionizada se eluyó el DNA para recuperar el plásmido en un

tubo esteril. La concentración del plásmido se midió por absorbancia en la relación 260 a 280 nm (específica para la doble cadena de DNA) con un espectrofotómetro, quedando como mínimo 1 µg por µl.

4. Corte del plásmido por endonucleasas, síntesis y marcaje de ribosonda

Además del plásmido obtenido por clonación, los plásmidos con *Gdf5* y *Noguina* nos fueron obsequiados por el Dr. Juan Hurle y el plásmido con *Wnt9a* por el Dr. Clifford Tabin. Estos plásmidos fueron cortados con la enzima endonucleasa adecuada para obtener la secuencia de alrededor 500 pb expuesta para la transcripción (Tabla 1). Si el plásmido no se corta, la RNA polimerasa transcribe el plásmido completo, además de la sonda.

Gen	Enzima endonucleasa	RNA polimerasa
<i>Gdf5</i>	Bamh1	T7
<i>Wnt9a</i>	Spe1	T7
<i>Noguina</i>	EcoR1	T3
<i>CD44</i>	Nco 1	Sp6

Tabla 1. Endonucleasas utilizadas para obtener la secuencia molde y RNA polimerasas necesarias para obtener una sonda de 500pb específica, en la dirección que complementa para el mRNA del embrión de pollo.

El plásmido cortado sirvió de molde para transcribir la ribosonda que se usó directamente en la hibridación. Se empleó una RNA polimerasa (Tabla 1), amortiguador correspondiente a la enzima y una mezcla de nucleótidos trifosfatados (ATP, CTP, GTP y UTP) con la variante de que un tercio de los UTPs están marcados con Digoxigenina, la cual es reconocida por un anticuerpo comercial que permitirá su detección posterior por hibridación. Finalizada la reacción se precipita la sonda y se puede usar en la hibridación o almacenarse a -20°C.

5. Día 1 de hibridación: Introducción de la sonda en los embriones

Los embriones almacenados en metanol se rehidratan a diferentes concentraciones de PBT/metanol (100, 75, 50 a 25%) a intervalos de 5 minutos. Durante toda la hibridación, los reactivos se diluyeron en PBT para mantener equilibrio osmótico y porque el Tween-20, incluido en esa solución, mantiene abiertas las membranas celulares para la entrada de todos los reactivos a la célula. Ya en PBT se pasaron las muestras a peróxido de hidrógeno al 6% por 1 hora en obscuridad para blanquear las muestras y disminuir la cantidad de fondo en el resultado final (por la disminución de actividad de las fosfatasas). Para retirar el peróxido las muestras se dejaron en baño maría con diferentes tratamientos de Proteinasa K (PK), las condiciones variaron de acuerdo al gen que se hibridó (Tabla 2).

Gen	[PK] $\mu\text{g/ml}$	Tiempo PK min.	Temp. PK $^{\circ}\text{C}$
Gdf5	60 $\mu\text{g/ml}$	25 min.	20 $^{\circ}\text{C}$
Wnt9a	40 $\mu\text{g/ml}$	27 min.	20 $^{\circ}\text{C}$
Noguina	60 $\mu\text{g/ml}$	23 min.	20 $^{\circ}\text{C}$
CD44	70 $\mu\text{g/ml}$	23 min.	20 $^{\circ}\text{C}$

Tabla 2. Genes hibridados y condiciones de PK.

La PK degrada proteínas en las células. Dado que puede desintegrar el embrión, se le agregó una solución de PFA al 4% con Glutaraldehído al 0.2% por 20 minutos para detener la acción de la PK. Se realizaron algunos lavados de PBT y se procedió a prehibridar colocando los embriones en amortiguador de hibridación (Formamida 50%, SSC 5X, SDS 1%, RNAt 50 $\mu\text{g/ml}$ y Heparina 50 $\mu\text{g/ml}$) sin sonda a 65 $^{\circ}\text{C}$ por 3 horas. Durante la prehibridación la formamida, las sales y la temperatura estabilizan las moléculas de mRNA. La sonda se preparó colocándola en amortiguador de hibridación y calentándola a 80 $^{\circ}\text{C}$ por 2.5 minutos para alinear la sonda, después de las 3 horas se cambió al amortiguador de hibridación que contenga la sonda durante toda la noche a 65 $^{\circ}\text{C}$.

6. Día 2 de hibridación: lavados post-hibridación e incubación con el anticuerpo

Una vez que la sonda se encontraba dentro del embrión se procedió a realizar una serie de lavados a 65°C con soluciones con alta concentración de sales con formamida para que la doble cadena generada en la hibridación exponga el marcador digoxigenina. Primero se lavaron dos veces los embriones en la Solución I (Formamida 50%, SSC 4X, SDS 1%) durante 1 hora cada lavado, luego se pasaron a la Solución I y II por 10 minutos. Posteriormente se hicieron dos lavados de media hora en Solución II (NaCl 0.5 M, Tris 10 mM pH=7.4, Tween-20 0.1%) para finalizar con dos lavados de media hora en Solución III (Formamida 50%, SSC 2X).

Pasados los lavados a 65°C, los embriones se colocaron en una solución de TBST (Tris-HCl 50 mM pH=7.4, NaCl 150 mM, KCl 10 mM, Triton al 1%) con Levamisole 2 mM que de aquí en adelante se incluyó en todos los pasos para mantener la alta concentración en sales ya que el Levamisole inactiva a la fosfatasa alcalina de la muestra. Después de tres lavados de 10 minutos en TBST los embriones se pasaron a TBST+Lev y suero de cabra al 10% (PAA laboratories Cat. B11-035) durante 3 horas para bloquear los sitios de unión inespecíficos. El siguiente paso fué poner los embriones con el anticuerpo anti-Digoxigenina (Roche, 11 093 274 910) a una proporción 1:2000 en TBST+Lev suero al 10% durante toda la noche.

7. Día 3: Lavados post-anticuerpo

Se realizaron 15 lavados de 15 minutos cada uno con TBST+Lev y se dejaron toda la noche en el último lavado. El anticuerpo anti-digoxigenina está conjugado con la enzima fosfatasa alcalina del intestino de cabra. Los lavados tuvieron como objetivo retirar el suero, debido al TBST, y todo el anticuerpo que no se adhirió a la digoxigenina. Por su parte el levamisol inactiva a la fosfatasa alcalina que se encuentra en el embrión de pollo pero sin inactivar la adherida al anticuerpo ya que esta última no reacciona con levamisol.

8. Día 4: revelado

Los embriones se lavaron dos veces por 15 minutos en solución NTMT (Tris-HCl 50 mM pH=9.5, MgCl₂ 50 mM, NaCl 20 mM, Tween-20 al 1%, Levamisole 1 mM). Finalmente se pasaron los embriones al revelador BMpurple (Roche 11 442 074 001), el cual contiene un sustrato para la fosfatasa alcalina. Cuando la fosfatasa reacciona a su sustrato deja un producto de color púrpura insoluble en la región en que se encuentra el mRNA de nuestro interés y se puede visualizar fácilmente al microscopio.

Análisis de imágenes

Tanto las tinciones de esqueleto como las hibridaciones *in situ* de órgano completo para *Gdf5*, *Wnt9a*, *Noguna*, y *Cd44*, de controles normales y de los tratados con TGF- β se observaron en un microscopio Nikon SMZ1500 y se fotografiaron en una cámara Axio Cam MRc (Cat. 1253 6323) de la compañía Carl Zeiss con el programa de computadora AxioVision y se ordenaron las imágenes en Photoshop.

Resultados:

La primera parte de los experimentos consistió en ver los marcadores articulares en las extremidades de los embriones durante el desarrollo del autópodo para conocer su patrón de expresión. El marcador con mayor nivel de expresión fue *Gdf5*. Éste se observó en la región de la interzona, tanto en la rodilla como en los dedos y también en el pericondrio de las falanges de los dedos (Figura 17, flechas blancas). En estadio 25 se expresó en la región de la rodilla y entre el fíbula y la tibia (Figura 17A, flecha gris). En estadio 26 se observó entre la articulación tarso-metatarso (Fig. 17B).

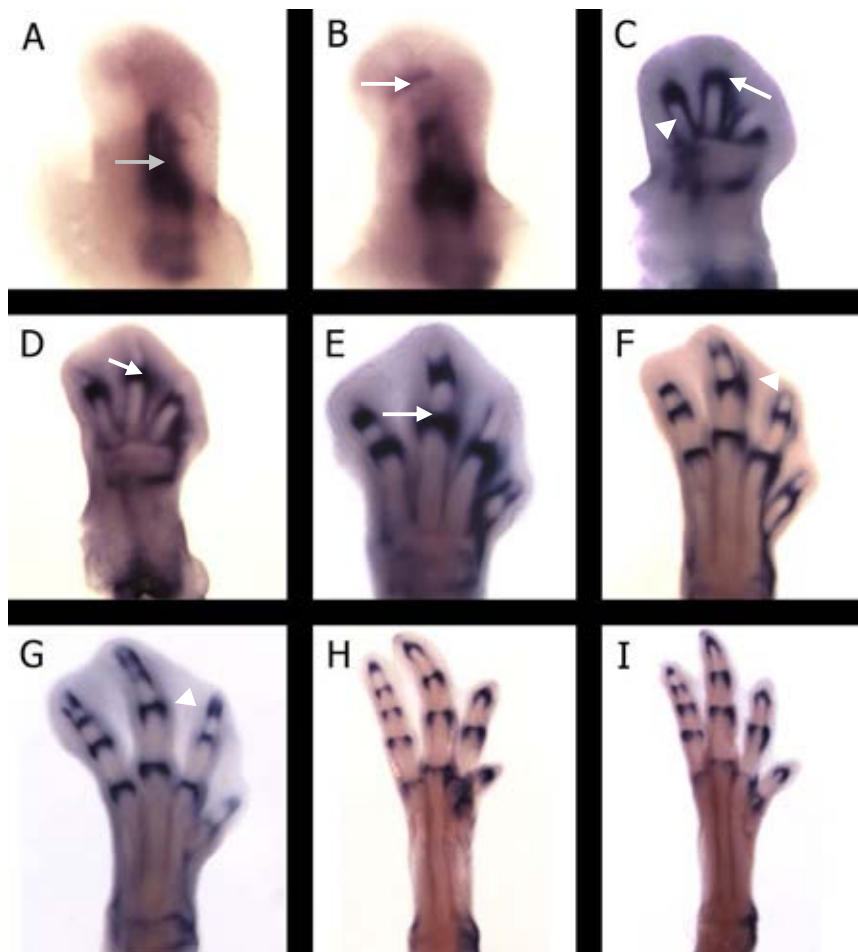


Figura 17. Expresión de *Gdf5* durante el desarrollo de la extremidad en estadio HH 25 (A), 26(B), 27 (C), 29 (D), 30 (E), 31 (F) 32 (G) 33(H) y 34 (I)

Conforme avanzaba el desarrollo de la extremidad, la expresión de *Gdf5* continuaba en la muñeca y en el pericondrio de los metatarsos hacia el estadio 27 (Figura 17C, cabeza de flecha blanca). Posteriormente la expresión de *Gdf5* sólo se mantuvo presunta en la zona de las articulaciones en las falanges (Figura 17C-17G, flechas blancas) y muy ligeramente en el pericondrio de las falanges mas cercanas al mesénquima distal (17H y 17I).

Dado que GDF5 es una proteína de la familia BMP y *Noguina* es un antagonista de BMPs. Y que el mutante de *Noguina* no posee articulaciones en los dedos (Btunet, 1998), nos interesó observar la expresión del gen *Noguina* en la extremidad en desarrollo. La expresión de *Noguina* se observó desde etapas muy tempranas del desarrollo en la región posterior del primordio de la extremidad (Figura 18A), así como en etapas subsecuentes en los moldes de cartílago, sin marcar el pericondrio. En etapas 25 y 26 también se observó *Noguina* marcando la fíbula y la tibia, los metatarsos posteriores y el mesénquima posterior (Figura 18B y 18C, flechas grises). En las etapas 29, 30 y 31 *Noguina* se expresó en los metatarsos y en las falanges, pero no se expresó en la interzona (Figura 18D-18F, flechas blancas). En el estadio 31 también hubo expresión en el interdígito. Finalmente, en los estadios mas avanzados que se evaluaron, *Noguina* solo restringió su expresión en la superficie articular (Figura 18G-18I).

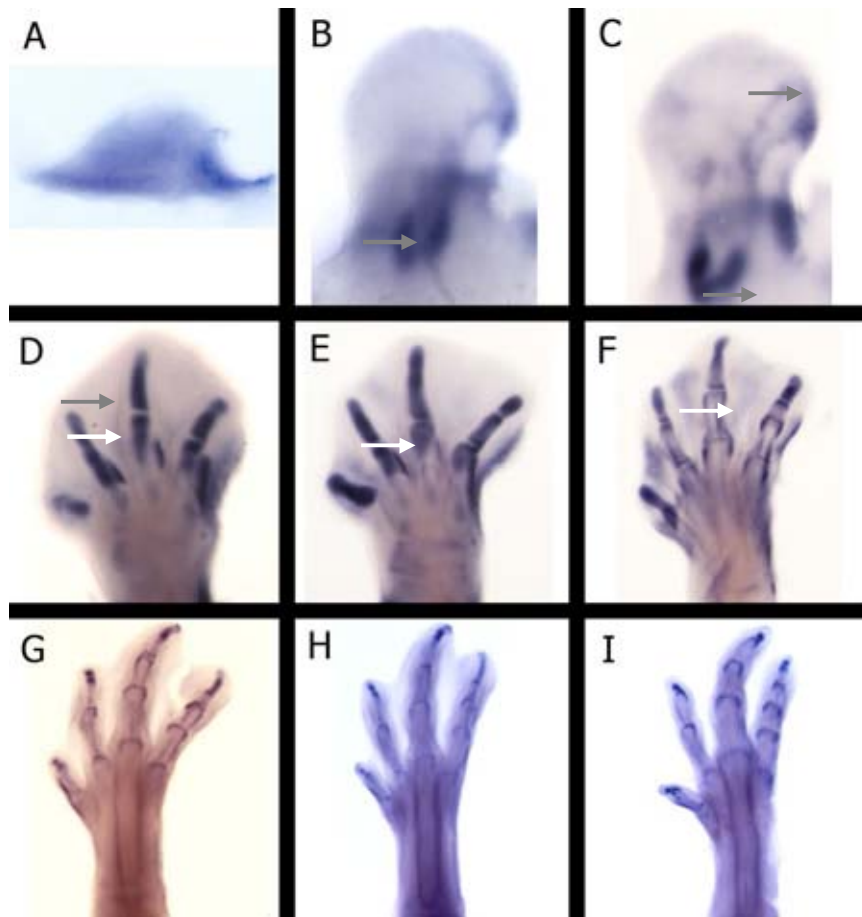


Figura 18. Expresión de *Noguina* durante el desarrollo de la extremidad en estadio HH 21 (A), 26(B), 27 (C), 29 (D), 30 (E), 31 (F) 33 (G) 34(H) y 35 (I)

En los trabajos mencionados en la introducción se maneja a WNT9a como un factor determinante en el mantenimiento del fenotipo articular, por lo cual también se evaluó al gen *Wnt9a*. Se realizaron hibridaciones durante el desarrollo de la extremidad y se observó su expresión en varios tejidos, como entre la fíbula y la tibia en estadio 26 (Figura 19B, flecha gris). Posteriormente se observó a *Wnt9a* en el mesénquima que rodea la zona media la fíbula, la tibia y en los dedos (Figura 19C a 19F, cabezas de flecha blancas) y posteriormente también se pudo observar en el estadio 29, en la región que dará lugar a las articulaciones y en el dedo 3 se pudo observar no sólo una línea transversal sino dos separadas ligeramente (Figura 19E, flecha blanca). Entre los estadios 30 a 34, *Wnt9a* se siguió expresando tanto en las

articulaciones como en el mesénquima cercano a los dedos, pero también se pudo observar claramente en la punta del dedo y ligeramente en los tendones (Figuras 19F a 19I, flechas negras).

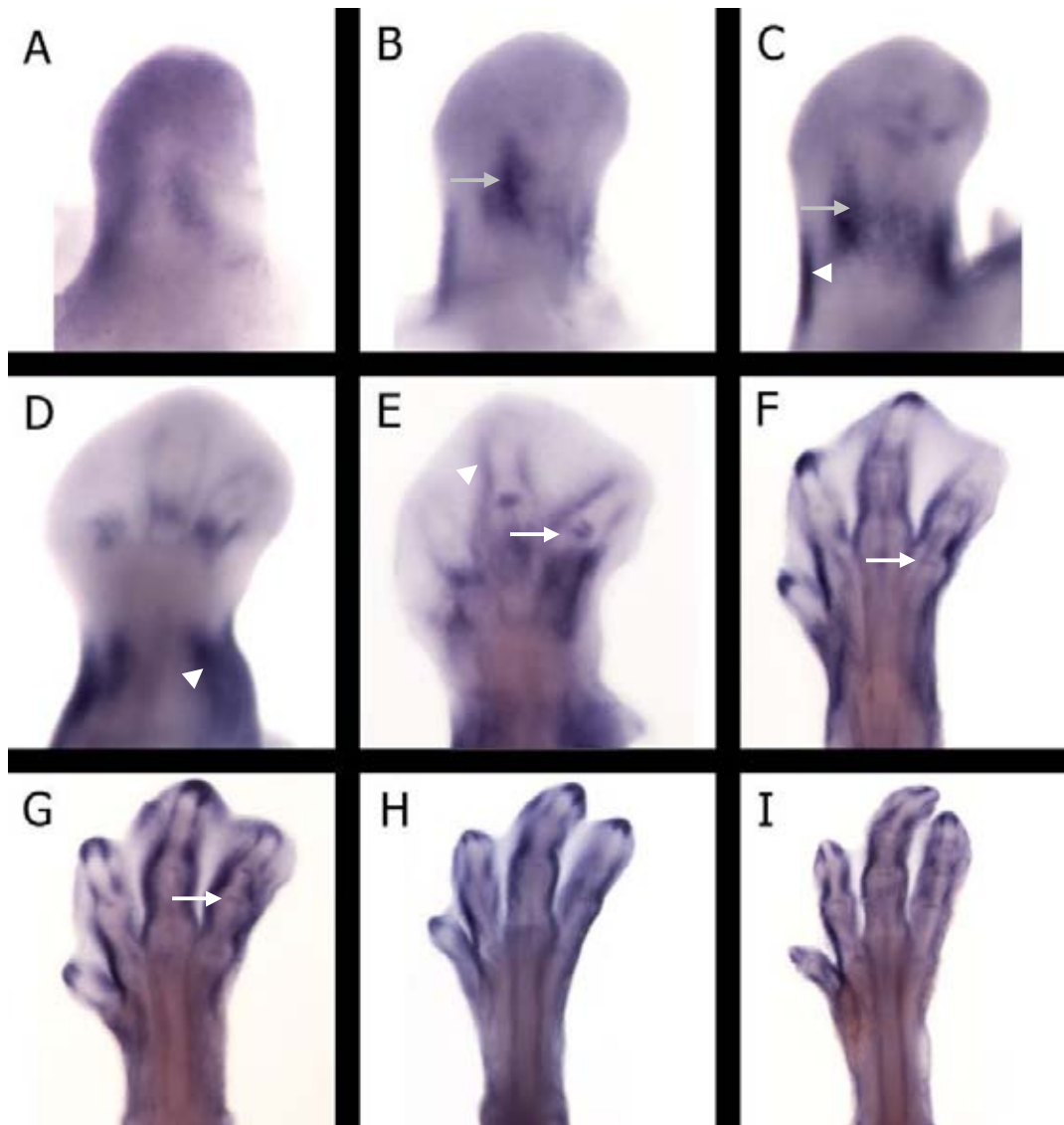


Figura 19. Expresión de *Wnt9a* durante el desarrollo de la extremidad en estadio HH 24 (A), 25(B), 26 (C), 27 (D), 29 (E), 30 (F) 32 (G) 33(H) y 34 (I)

Después de haber evaluado a *Wnt9a*, el cual se ha reportado en etapas tempranas en la región de la articulación (Hartmann, 2001), se evaluó la expresión de *Cd44* que es un marcador que participa en una fase mas avanzada de la formación de las articulaciones (Dowthwaite, 1998). La expresión en el desarrollo de la extremidad se observó desde la etapa 22 por debajo de la AER (Figura 20A, flecha gris). Mas adelante en el desarrollo, entre

los estadios 26 y 27, se observó en el centro de los elementos esqueléticos como la fíbula, la tibia y los metatarsos (Figura 20B y 20C, flechas negras). En el estadio 29 se pudo observar la expresión de *Cd44* en el mesénquima que se encuentra por debajo de la AER (Figura 20D, flecha gris) y también comenzó a observar su expresión en las articulaciones del metatarso y las falanges, dos estadios mas tarde que la expresión de *Gdf5* y *Wnt9a* en dichas articulaciones (Figura 20D, flechas blancas). En los siguientes estadios, *Cd44* se expresó en la punta del dedo, perdiendo la expresión en el mesénquima distal del interdígito, mientras que se mantiene en las articulaciones (Figuras 20E a 20I).

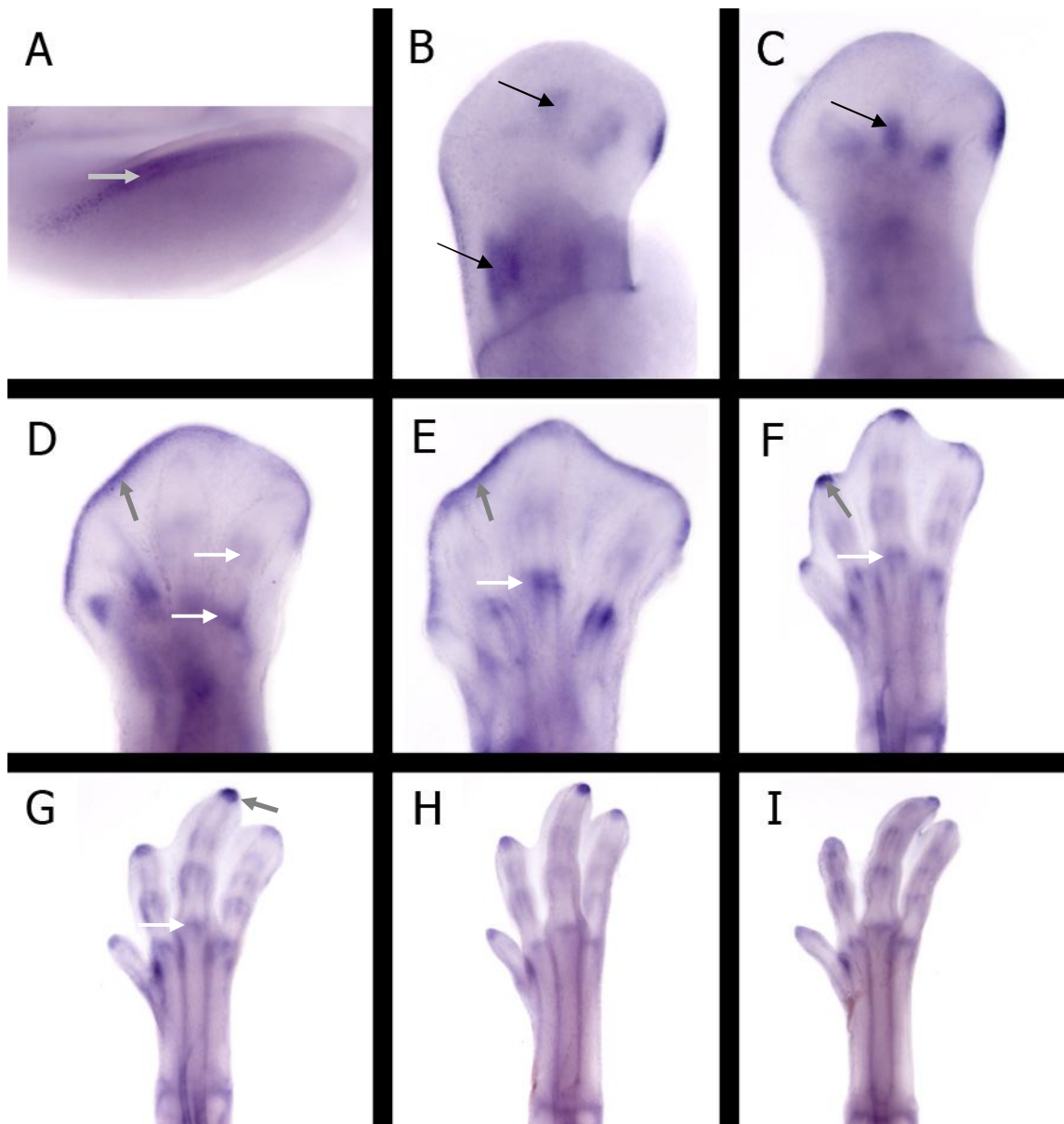


Figura 20. Expresión de *Cd44* durante el desarrollo de la extremidad en estadio HH 22 (A), 26(B), 27 (C), 29 (D), 30 (E), 32 (F) 33 (G) 34(H) y 35 (I)

Una vez conocida la expresión de los cuatro genes en el desarrollo, se pudo observar que *Gdf5* se expresó en etapas anteriores a las de los demás genes del desarrollo de la formación de la extremidad. Por esta razón, se analizó la expresión de estos marcadores de articulación durante la formación de los elementos esqueléticos. La segunda parte de este trabajo consistió en ensayar operaciones con perlas embebidas en TGF- β y obtener dedos ectópicos de manera constante en el estadio 28 a 29. Después de colocada la perla, se realizó una tinción de azul alciano y rojo alizarina a las 48 horas y 72 horas para observar los moldes de cartílago de los elementos esqueléticos. En algunos casos si la perla no era colocada en la parte distal del interdígito se obtenía la fusión de los dedos adyacentes a la perla (Figura 21A, cabeza de flecha). Cuando la perla era colocada en la parte central y distal se observó la tinción de azul alciano desde las 24 horas en la región interdigital. Esta tinción corresponde al cartílago del dedo ectópico generado después de la aplicación de TGF- β . En la tinción se observó el cartílago grueso en la zona de la perla, pero en la región distal se formó cartílago delgado similar a los dedos adyacentes (Figura 21B, cabeza de flecha). Alrededor de los 6 días, se pudo observar que a partir de la perla se formó un dedo con articulaciones en la región interdigital (Figura 21C, flecha blanca).

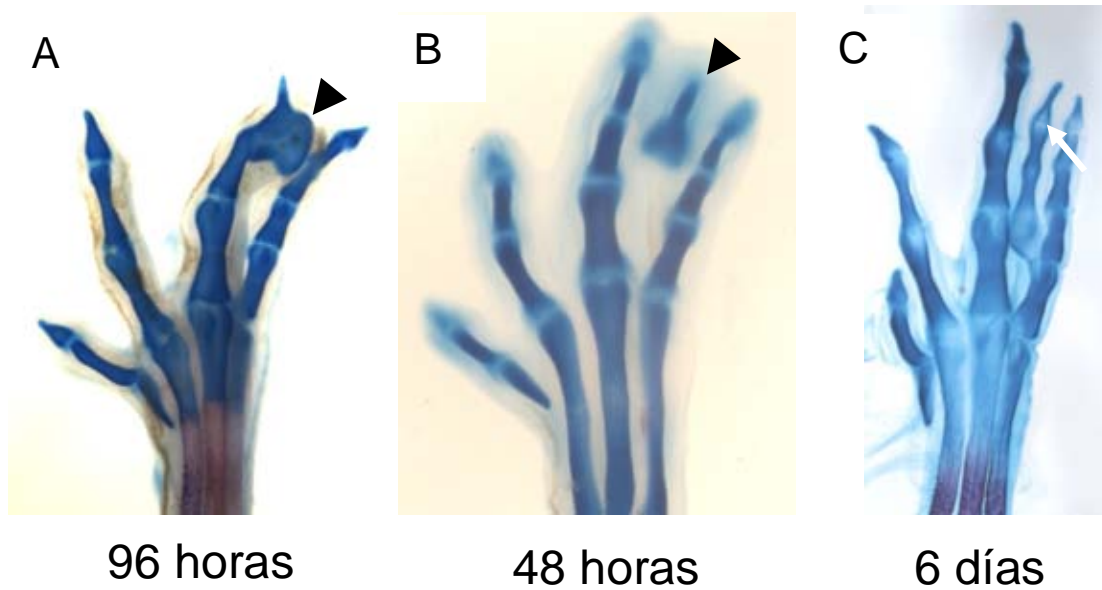


Figura 21. Efecto condrogénico al aplicar perlas con TGF- β . A) Perla colocada muy cerca del dedo generó una fusión del cartílago en formación y el dedo III. B) Elongación del cartílago en el lugar de una perla con TGF- β después de 48 horas y en C) después de 6 días mostrando el dedo con articulaciones.

Ya que a partir de la formación del molde de cartílago la elongación se observó después de las 12 horas de la aplicación de TGF- β , se realizaron hibridaciones de todos los marcadores antes evaluados en el desarrollo para conocer el primer momento de su expresión en el dedo ectópico.

La expresión de *Gdf5* se observó durante la formación del dedo ectópico a partir de las 16 horas en la parte distal con respecto a la perla (Figura 22A, flecha roja). Después se observó que *Gdf5* recubrió la perla a las 20 y 24 horas (Figura 22B y 22C, flecha roja) y en los siguientes estadios, después de 30 horas todo el pericondrio y la región distal expresaron *Gdf5* (Figura 22D). En el dedo ectópico en desarrollo a las 48 y 72 horas pudo verse en la falange proximal y la interzona (Figura 22E-22F, flechas azules). La expresión de *Gdf5* en esta serie fue muy fuerte en el pericondrio del metatarso y algunas falanges.

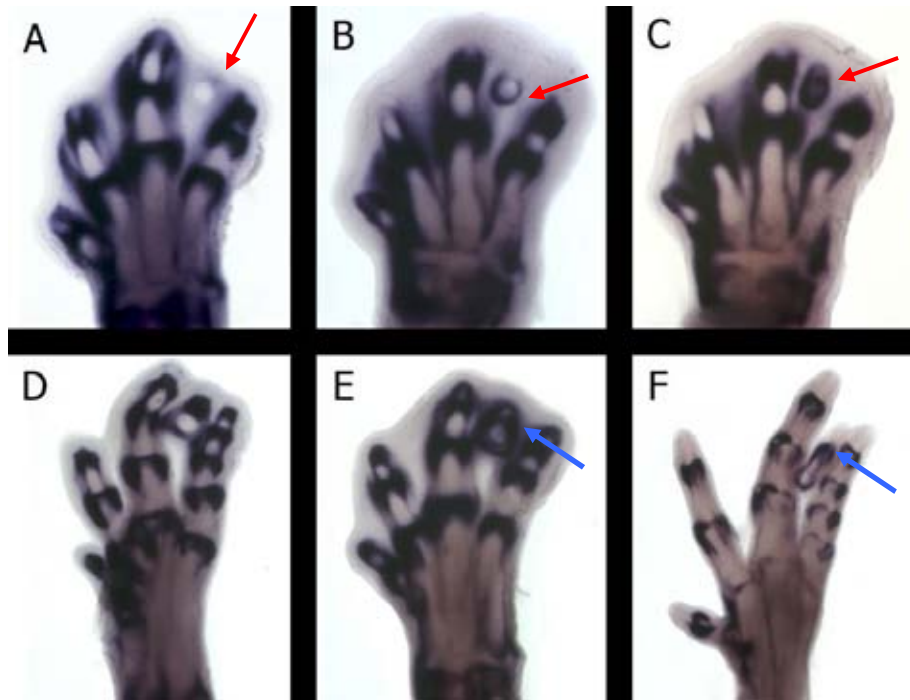


Figura 22. Expresión de *Gdf5* a las 16 horas después de la aplicación de una perla embebida con TGF- β (A), a las 20 horas (B), a las 24 horas (C), a las 30 horas (D), a las 48 horas (E) y a las 72 horas (F).

Al estudiar la expresión de *Noguin*a en la formación normal de los dedos, se encontró que está presente en las zonas opuestas a *Gdf5* en el cartílago y ausente en la articulación, así que se observó su expresión en la formación del dedo ectópico. La expresión de *Noguin*a en el dedo ectópico se observó en el centro del molde de cartílago de manera tenue. A las 16 horas, la expresión fue más distal que la perla (Figura 23A). Entre las 21 horas y las 30 horas sólo se observó una expresión alargada en el lugar de la perla (Figura 23B-23D, flechas rojas). A las 48 horas la expresión de *Noguin*a en el dedo ectópico, así como en los normales, fue en una zona más amplia, sin expresarse en el pericondrio (Figura 23E), además de que presentó expresión en el interdígito. El dedo a los 3 días es mucho más alargado y aún se observa la expresión continua de *Noguin*a en el cartílago (Figura 23F).

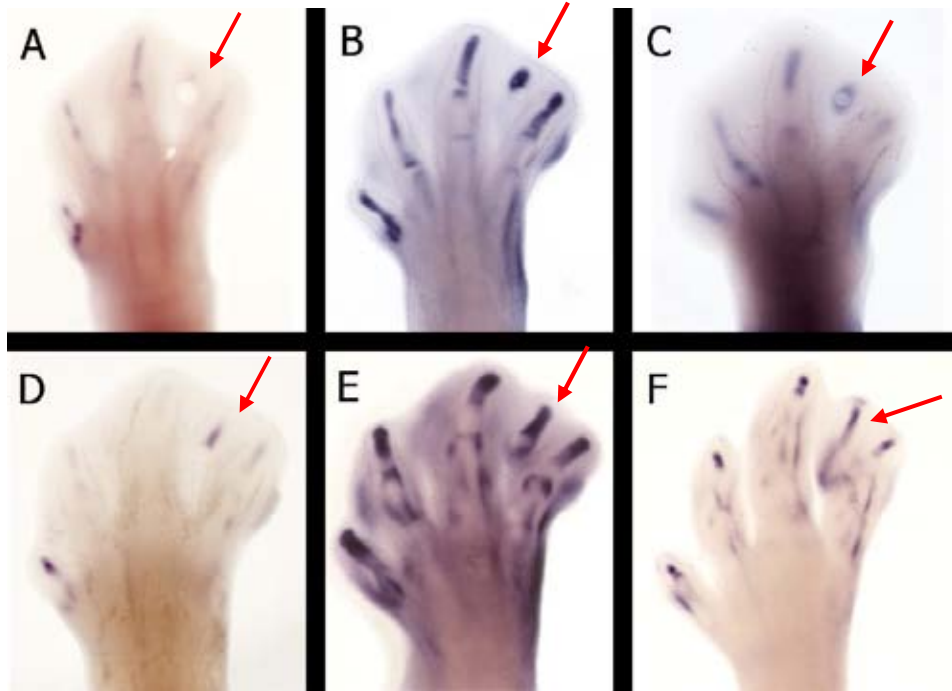


Figura 23. Expresión de *Noguina* a las 16 horas después de la aplicación de una perla embebida con TGF- β (A), a las 20 horas (B), a las 24 horas (C), a las 30 horas (D), a las 48 horas (E) y a las 72 horas (F).

Posteriormente, dado que *Wnt9a* tuvo una expresión temprana en el desarrollo de los dedos y se observó en estadio 29 en la región de la articulación, se analizó su expresión en el dedo ectópico esperando encontrarlo antes que *Gdf5*. Se observó la expresión de *Wnt9a* durante la formación del dedo ectópico en la parte distal después de 16 horas de haber colocado la perla con TGF- β (Figura 24A). A las 21 horas después de la operación no se observó la expresión de *Wnt9a* en el dedo ectópico (Figura 24B). Por otro lado, a las 30 horas *Wnt9a* se observó en la punta de todos los dedos, incluyendo la del dedo ectópico (Figura 24C, flecha roja). A las 48 horas *Wnt9a* mantuvo su expresión en el mesénquima cercano a los dedos y en la punta de los dedos además del tejido distal del interdígito (Figura 24D). A las 72 horas el dedo ectópico también se expresó *Wnt9a* tanto en la punta del dedo como en la base y los dedos adyacentes tuvieron una baja expresión de manera transversal a los dedos (Figura 24E).

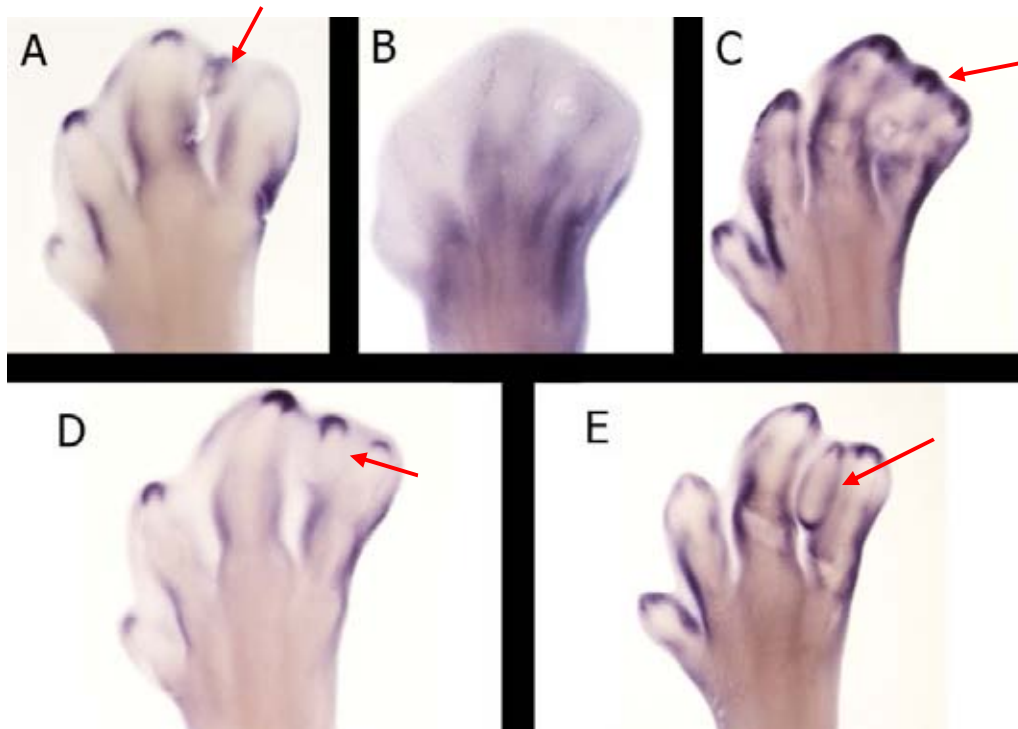


Figura 24. Expresión de *Wnt9a* a las 16 horas después de la aplicación de una perla embebida con TGF- β (A), a las 20 horas (B), a las 24 horas (C), a las 30 horas (D) y a las 72 horas (E).

Por último, para conocer el momento en que CD44 comienza su expresión en la formación de la articulación, se hicieron hibridaciones para observar *Cd44* durante la formación del dedo ectópico. *Cd44* no se observó a las 12 horas después de haberse colocado la perla con TGF- β (Figura 25A, flecha blanca). A las 18 horas se observó la expresión de *Cd44* alrededor de la perla y en las articulaciones (Figura 25B, flecha roja). A las 24 y 30 horas después de la inducción ya no se observaba la expresión de *Cd44* en la formación del dedo (Figura 25C y 25D). A las 48 horas de formación del dedo ectópico *Cd44* se expresó tenuemente alrededor del dedo ectópico tal como se observa en los dedos del desarrollo normal además de expresarse en los tendones y en el mesénquima distal (Figura 25E, flechas grises). A los 3 días de implantada la perla se observó marcadamente a *Cd44* en la punta del dedo ectópico al igual que en el resto de los dedos (Figura 25F). También se observó a los 3 días en

el autópodo la expresión de *Cd44* en los tendones y en las articulaciones de los elementos mas proximales (Figura 25F).

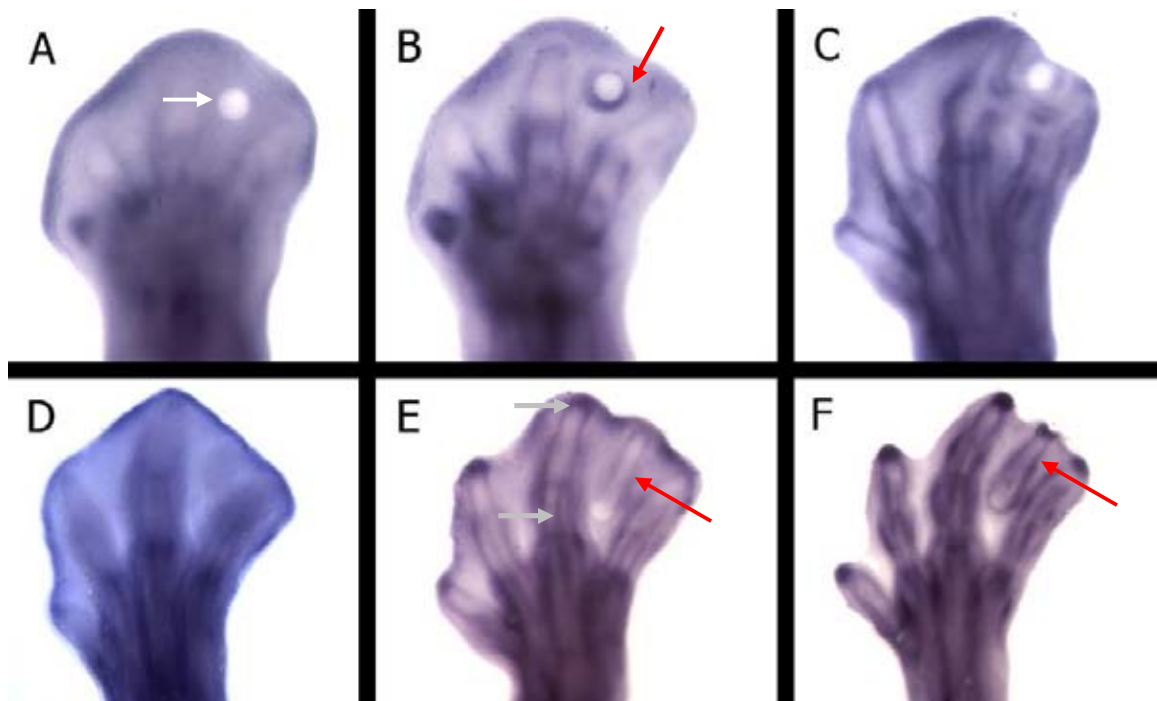


Figura 25. Expresión de *Cd44* a las 12 horas después de la aplicación de una perla embebida con TGF- β (A), a las 18 horas (B), a las 24 horas (C), a las 30 horas (D), a las 48 horas (E) y a las 72 horas (F).

Una vez obtenidos estos datos, en la figura 26 se muestra que la expresión de *Gdf5* se inicia a partir de las 16 horas, *Wnt9a* a partir de las 16 horas, *Noguina* ligeramente a partir de las 16 horas y *Cd44* a partir de las 18 horas. En figura 27 se muestra sólo al gen *Gdf5* marcando la interzona en el dedo ectópico.

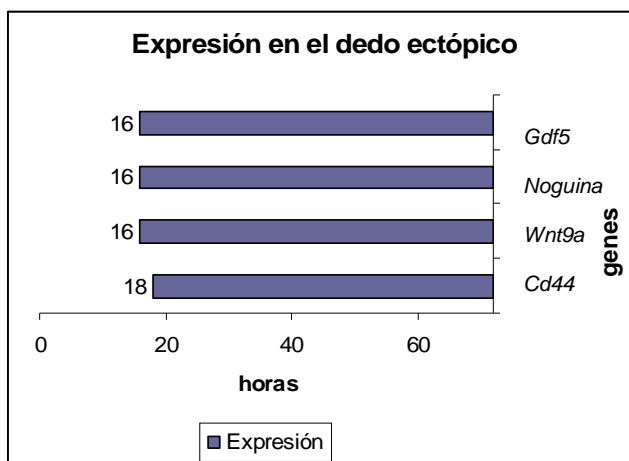


Figura 26. Tiempo a partir del cual se muestra la expresión de los genes *Gdf5*, *Noguina*, *Wnt9a* y *Cd44*, aledaña a la perla, durante la formación del dedo ectópico.

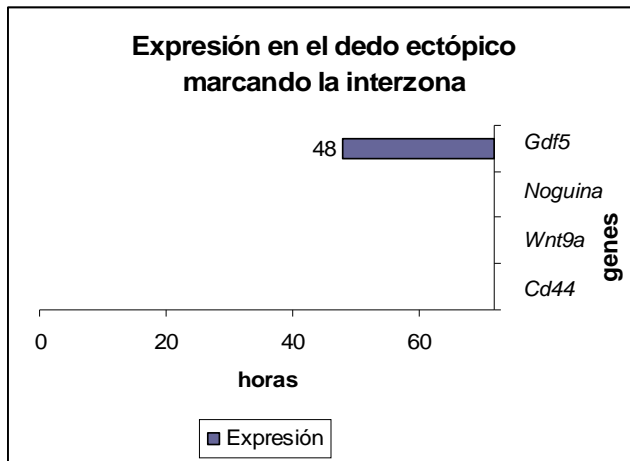


Figura 27. Tiempo a partir del cual se detecta la expresión del gen *Gdf5* marcando la interzona.

Discusión

La formación del dedo ectópico en el interdígito por la inducción con perlas embebidas en TGF- β recapitula la cascada molecular de la condrogénesis (Chimal-Monroy, 2003). Estos eventos también permiten evaluar la formación del molde de cartílago de los elementos esqueléticos y de las articulaciones. Al analizar la formación del dedo ectópico se logró observar la formación de un sólo elemento cartilaginoso continuo hasta los 2 días después de colocar la perla en el interdígito (Figura 21B). La morfogénesis del dedo ectópico cambia debido al lugar específico de implantación de perlas en el interdígito. Si la perla era colocada cercana a los dedos, la condrogénesis en el interdígito y en el dedo se fusionaban y solo se observaba un dedo mas grueso (Figura 21A). Este resultado es importante, con respecto a que la condrogénesis no ocurre de manera desordenada, sino que son necesarias ciertas señales que dirijan la formación de los patrones espaciales y terminen en la morfogénesis del dedo individual.

Como ya se había mencionado en la introducción, se ha propuesto que GDF5 tiene un papel importante en la diferenciación de células pericondriales a cartílago (Francis-West, 1999; Merino, 1999). Se ha encontrado que el receptor

más importante en la formación de cartílago en los dedos es BMP1b que transduce su señal al interactuar molecularmente con el ligando GDF5 (Nishitoh *et al.*, 1996), lo cual puede explicar la expresión de *Gdf5* en todo el dedo ectópico (Figura 22B, 22C y 22D), porque tiene una participación en la diferenciación de pericondrio hacia cartílago. Lo más interesante sería saber por que se restringe la expresión solo a la región de la interzona.

La expresión de *Noguna* en el desarrollo de la extremidad muestra que está presente en los moldes de cartílago y finalmente sólo permanece en la zona del cartílago articular (Figura 22F, flecha blanca). Se ha reportado a *Noguna* como un importante regulador del crecimiento de los moldes de cartílago (Capdevila and Johnson, 1998), y su expresión tardía en el desarrollo de la articulación sugiere una regulación de la formación del cartílago articular.

Al comparar la expresión de *Noguna* a las 48 horas y a los 3 días aún se observa de manera continua en el dedo ectópico, a diferencia de *Gdf5*. Es interesante que *Noguna* se encuentre en los mismos lugares en la articulación porque *Noguna* se propone como inhibidor de GDF5 (Merino *et al.*, 1999) y regulador de la formación de cartílago. Sin embargo, si observamos como se expresan *Noguna* y *Gdf5* en el desarrollo, no los encontramos en los mismos tejidos, *Noguna* se expresa como un continuo en los dedos posteriores y GDF5 en el pericondrio y articulaciones (Figura 17C y 18C). Por la expresión en el desarrollo de la extremidad y en la formación del dedo ectópico, la regulación de *Noguna* en la interzona comienza en etapas posteriores en la formación de las articulaciones (Figura 18).

Otro resultado interesante fue que *Wnt9a* se expresó en la zona articular en estadios posteriores de desarrollo a donde se expresa *Gdf5* (Figura 17,

comparar con Figura 19). El marcador *Gdf5* se expresó en la formación del dedo ectópico a las 16 horas (Figura 22A) pero se expresó en la interzona a las 48 horas (Figura 22E), en un momento en el cual el cartílago se observa como un continuo por la tinción de esqueleto, lo cual indica que se expresa previo al cambio de matriz extracelular en la formación de la articulación (Figura 21B comparar con la Figura 22E).

A diferencia de este patrón, durante la formación del dedo ectópico, *Wnt9a* se expresa en su región más proximal y más distal pero no se observa de manera transversal a los moldes de cartílago. *Wnt9a* se expresa de manera temprana en la formación del dedo ectópico, a las 16 horas después de colocar TGF- β (Figura 24A). Probablemente por problemas con la técnica no se observó la expresión de *Wnt9a* a las 20 horas de aplicar TGF- β , porque no solo falta la expresión en dedo ectópico, también falta la expresión en la punta de los demás dedos (Figura 18 y 24).

Es interesante que la expresión de *Wnt9a* ocurra un poco después de la expresión de matriz extracelular de cartílago, porque se ha relacionado *Wnt9a* con el cambio de destino celular de los condrocitos a células de la articulación (Hartmann y Tabin, 2001) y en los resultados es inducido de manera temprana en la condrogénesis (Figura 24A). *Wnt9a* ha sido uno de los marcadores más importantes recientemente estudiados en la articulación proponiendo que induce a marcadores tempranos como *Gdf5* (Hartmann y Tabin, 2001), pero los resultados muestran que *Gdf5* se expresa en la región de la interzona antes que *Wnt9a*. Se ha demostrado que el mutante nulo de *Wnt9a* sigue expresando los marcadores de la articulación como *Gdf5* y sólo existe fusión en algunas articulaciones (Später *et al.*, 2006) lo que concuerda con los resultados, ya que

en los mismos estadios *Gdf5* se expresa antes que *Wnt9a*. En cambio, *Wnt9a* se expresó en la punta de los dedos, y se ha reportado que *Wnt* inhibe la formación de cartílago (Hartmann y Tabin, 2001; Später *et al.*, 2006). Otro dato publicado recientemente es que la señalización de FGF y WNT mantiene a las células de la región distal de la extremidad en un estado indiferenciado y reprimen la condrogénesis (Berge *et al.*, 2008), dando a *Wnt9a* en la punta del dedo un papel en la regulación de la formación del cartílago.

Gdf5 desde las 48 horas se observa en la formación del dedo ectópico en un patrón característico de la interzona. Dado que *Gdf5* se expresa previó al cambio de matriz extracelular en la región articular, y este cambio es incluso anterior a su evidencia morfológica (Craig *et al.*, 1987) estos resultados sugieren que *Gdf5* marca a las células comprometidas a formar la interzona y *Wnt9a* no podría inducirlo dado que al mismo tiempo no se expresa en dicha región. Sin embargo, GDF5 no inicia el proceso de formación de las articulaciones, porque no genera los cambios de matriz extracelular como es la deposición de Colágena III y Colágena VI, ni la expresión ectópica de otros marcadores articulares (Merino *et al.*, 1999) por lo que debe haber un mecanismo que actúe antes para iniciar este cambio en los moldes de cartílago.

La expresión de *Cd44* se observó constantemente en el mesénquima distal de la extremidad. Posterior a la etapa 29, *Cd44* deja de expresarse en el interdígito y su expresión solo se mantiene en la punta del dedo (Figura 20). Estos resultados concuerdan con trabajos que proponen una relación entre ácido hialurónico, *Cd44* y la proliferación celular (Li *et al.*, 2007), dado que se mantiene en la punta del dedo y antes de la regresión del interdígito se pierde.

También *Cd44* tuvo una expresión mas tardía que *Gdf5* y *Wnt9a* (Comparar Figuras 17D, 19E y 20D), lo cual tiene relación con el papel que se ha propuesto en la segunda fase del desarrollo de la articulación y no con su inicio (Dowthwaite, 1998). Durante la formación del dedo ectópico se observó a las 18 horas alrededor de la perla, lo cual corrobora con el trabajo de Knudson (2003) donde propone el papel de CD44 en la condensación del mesénquima previo a la condrogénesis. Además en la formación del dedo ectópico no se observó la expresión de *Cd44* de manera transversal, como se observó con *Gdf5* pero se expresó muy marcado en la punta del dedo a los 3 días.

Los trabajos publicados acerca de los genes evaluados, *Gdf5*, *Noguin*, *Wnt9a* y *Cd44* más los resultados obtenidos en esta tesis apuntan a una participación de dichos genes en regular la diferenciación del mesénquima a cartílago durante la formación del dedo ectópico antes de su participación en la formación de la interzona. En ninguno de los casos los genes marcan exclusivamente la zona articular, su expresión se da en diferentes zonas del dedo ectópico, por lo que su participación puede ser tanto en el cartílago como en la articulación.

Otro punto interesante es gracias a otros trabajos publicados, donde la ausencia de *Jaws* (Soharskey, *et al.*, 2008) y el mutante del gen *Hif1* α (Amarilio, *et al.*, 2007) donde aumenta la expresión y cambia la orientación de *Gdf5*, además de que pierde la expresión de *Wnt9a* y hay cambios de matriz extracelular en el cartílago, como en la formación de las articulaciones, sugiriendo que *Gdf5* es un marcador mas temprano que *Wnt9a*.

Planteamiento del problema:

Las articulaciones surgen como un proceso intrínseco de los moldes de cartílago (Fell, 1934). Las células del molde de cartílago, en el área presuntiva de la articulación dejan de expresar los marcadores de cartílago *colágena II*, *Sox9* y *Noguina*, e inician la expresión de otro tipo de marcadores, como *Gdf5*, *Wnt9a* y *Cd44*. Cada una de estas moléculas tiene diversas funciones en el desarrollo del esqueleto, sin embargo dentro del contexto articular se desconoce cuál es su participación y su expresión temporal, por lo que en este trabajo se plantea un análisis detallado de la inducción de las moléculas que se expresan en la articulación, como *Gdf5*, *Wnt9a* y *Cd44* y conocer su expresión en las diferentes fases del proceso de formación de la articulación: interzona, cavitación o morfogénesis.

Hipótesis:

Si los marcadores articulares se expresan a diferentes tiempos dependiendo de la fase de formación de la articulación, entonces se espera que *Wnt9a* se exprese como primer marcador y *Gdf5* como segundo marcador una vez formado el molde de cartílago, ausentándose *Noguina* a nivel articular en el mismo tiempo. Se espera también que *Cd44* se exprese posterior a los otros marcadores articulares.

Objetivo:

- Establecer la cascada molecular de los genes expresados durante la formación de las articulaciones de la pata de pollo.

Objetivos Particulares:

- Analizar la expresión de los marcadores *Gdf5*, *Wnt9a*, *Noguina* y *Cd44* en diferentes fases de desarrollo de la extremidad.
- Aplicación de perlas embebidas en TGF- β para la inducción de un dedo ectópico y realizar análisis de expresión de marcadores de la articulación *Gdf5*, *Wnt9a*, *Noguina* y *Cd44* a diferentes tiempos después de esta inducción.

Referencias

- 1) Abarca-Buis, R. F., A. Rios-Flores, et al. (2009). "Control of cell differentiation and programmed cell death during digit development." Trends in Developmental Biology. (en prensa)
- 2) Akiyama, H., M. C. Chaboissier, et al. (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**(21): 2813-28.
- 3) Amarilio, R., S. V. Viukov, et al. (2007). "HIF1alpha regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis." Development **134**(21): 3917-28.
- 4) Andersen, H. (1961). "Histochemical studies on the histogenesis of the knee joint and superior tibio-fibular joint in human fetuses." Acta Anat (Basel) **46**: 279-303.
- 5) Aono, H. and H. Ide (1988). "A gradient of responsiveness to the growth-promoting activity of ZPA (zone of polarizing activity) in the chick limb bud." Dev Biol **128**(1): 136-41.
- 6) Archer, C. W., G. P. Dowthwaite, et al. (2003). "Development of synovial joints." Birth Defects Res C Embryo Today **69**(2): 144-55.
- 7) Bächner, D., M. Ahrens, et al. (1999). "Developmental expression analysis of murine autotaxin (ATX)." Mech Dev **84**(1-2): 121-5.
- 8) Balinsky, B. I. (1933). "Das extremitätenseitenfeld, seine ausdehnung und beschaffenheit." Roux Archives **130**: 704-747.

- 9) Brunet, L. J., J. A. McMahon, et al. (1998). "Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton." Science **280**(5368): 1455-7.
- 10) Capdevila, J. and J. C. Izpisua Belmonte (2001). "Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 87-132.
- 11) Capdevila, J. and R. L. Johnson (1998). "Endogenous and ectopic expression of noggin suggests a conserved mechanism for regulation of BMP function during limb and somite patterning." Dev Biol **197**(2): 205-17.
- 12) Chang, S. C., B. Hoang, et al. (1994). "Cartilage-derived morphogenetic proteins. New members of the transforming growth factor-beta superfamily predominantly expressed in long bones during human embryonic development." J Biol Chem **269**(45): 28227-34.
- 13) Chimal-Monroy, J., J. Rodriguez-Leon, et al. (2003). "Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling." Dev Biol **257**(2): 292-301.
- 14) Cohn, M. J., J. C. Izpisua-Belmonte, et al. (1995). "Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos." Cell **80**(5): 739-46.
- 15) Craig, F. M., G. Bentley, et al. (1987). "The spatial and temporal pattern of collagens I and II and keratan sulphate in the developing chick metatarsophalangeal joint." Development **99**(3): 383-91.
- 16) Craig, F. M., M. T. Bayliss, et al. (1990). "A role for hyaluronan in joint development." J Anat **171**: 17-23.

- 17) Crossley, P. H., G. Minowada, et al. (1996). "Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development." Cell **84**(1): 127-36.
- 18) Dealy, C. N., A. Roth, et al. (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**(2-3): 175-86.
- 19) Delise, A. M. and R. S. Tuan (2002). "Analysis of N-cadherin function in limb mesenchymal chondrogenesis in vitro." Dev Dyn **225**(2): 195-204.
- 20) Dessau, W., H. von der Mark, et al. (1980). "Changes in the patterns of collagens and fibronectin during limb-bud chondrogenesis." J Embryol Exp Morphol **57**: 51-60.
- 21) Dowthwaite, G. P., J. C. Edwards, et al. (1998). "An essential role for the interaction between hyaluronan and hyaluronan binding proteins during joint development." J Histochem Cytochem **46**(5): 641-51.
- 22) Duprez, D. M., K. Kostakopoulou, et al. (1996). "Activation of Fgf-4 and HoxD gene expression by BMP-2 expressing cells in the developing chick limb." Development **122**(6): 1821-8.
- 23) Farquhar, M. G. and G. E. Palade (1963). "Junctional complexes in various epithelia." J Cell Biol **17**: 375-412.
- 24) Fell, H. B. and R. Canti (1934). "Experiments on the Development in vitro of the Avian Knee-Joint." Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences **116**(799): 316-351.
- 25) Gañan, Y., D. Macias, et al. (1996). "Role of TGF beta s and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital

- cell death in the developing chick limb autopod." Development **122**(8): 2349-57.
- 26) Garciadiego-Cazares, D., C. Rosales, et al. (2004). "Coordination of chondrocyte differentiation and joint formation by alpha5beta1 integrin in the developing appendicular skeleton." Development **131**(19): 4735-42.
- 27) Gilbert, S. (2005). Biología del Desarrollo. Buenos Aires, Médica Panamericana.
- 28) Guo, X., T. F. Day, et al. (2004). "Wnt/beta-catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation." Genes Dev **18**(19): 2404-17.
- 29) Hamburger, V. and H. L. Hamilton (1992). "A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951." Dev Dyn **195**(4): 231-72.
- 30) Harrison, R. (1918). "Experiments on the development of the fore limb of *Amblystoma*, a self-differentiating equipotential system." The Journal of Experimental Zoology **5**(2): 413-461.
- 31) Hartmann, C. and C. J. Tabin (2000). "Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb." Development **127**(14): 3141-59.
- 32) Hartmann, C. and C. J. Tabin (2001). "Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton." Cell **104**(3): 341-51.
- 33) Hayamizu, T. F., S. K. Sessions, et al. (1991). "Effects of localized application of transforming growth factor beta 1 on developing chick limbs." Dev Biol **145**(1): 164-73.
- 34) Hildebrand, M. (1982). Anatomía y Embriología de Vertebrados. Mexico, DF, Limusa.

- 35) Hui, C. C. and A. L. Joyner (1993). "A mouse model of greig cephalopolysyndactyly syndrome: the extra-toesJ mutation contains an intragenic deletion of the Gli3 gene." Nat Genet **3**(3): 241-6.
- 36) Hurler, J. M., Y. Ganam, et al. (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**(2): 368-74.
- 37) Iwamoto, M., Y. Tamamura, et al. (2007). "Transcription factor ERG and joint and articular cartilage formation during mouse limb and spine skeletogenesis." Dev Biol **305**(1): 40-51.
- 38) Karsenty, G. and E. F. Wagner (2002). "Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development." Dev Cell **2**(4): 389-406.
- 39) Kengaku, M., J. Capdevila, et al. (1998). "Distinct WNT pathways regulating AER formation and dorsoventral polarity in the chick limb bud." Science **280**(5367): 1274-7.
- 40) King, J. A., P. C. Marker, et al. (1994). "BMP5 and the molecular, skeletal, and soft-tissue alterations in short ear mice." Dev Biol **166**(1): 112-22.
- 41) Knudson, C. B. (2003). "Hyaluronan and CD44: strategic players for cell-matrix interactions during chondrogenesis and matrix assembly." Birth Defects Res C Embryo Today **69**(2): 174-96.
- 42) Kosher, R. A., M. P. Savage, et al. (1981). "A gradation of hyaluronate accumulation along the proximodistal axis of the embryonic chick limb bud." J Embryol Exp Morphol **63**: 85-98.

- 43) Koyama, E., T. Ochiai, et al. (2007). "Synovial joint formation during mouse limb skeletogenesis: roles of Indian hedgehog signaling." Ann N Y Acad Sci **1116**: 100-12.
- 44) Kulyk, W. M. and R. A. Koshier (1986). "Temporal and spatial analysis of hyaluronidase activity during development of the embryonic chick limb bud." Dev Biol **120**(2): 535-41.
- 45) Kulyk, W. M., B. J. Rodgers, et al. (1989). "Promotion of embryonic chick limb cartilage differentiation by transforming growth factor-beta." Dev Biol **135**(2): 424-30.
- 46) Kulyk, W. M., W. B. Upholt, et al. (1989). "Fibronectin gene expression during limb cartilage differentiation." Development **106**(3): 449-55.
- 47) Lefebvre, V., W. Huang, et al. (1997). "SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene." Mol Cell Biol **17**(4): 2336-46.
- 48) Li, Y., B. P. Toole, et al. (2007). "Hyaluronan in limb morphogenesis." Dev Biol **305**(2): 411-20.
- 49) Litingtung, Y., R. D. Dahn, et al. (2002). "Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity." Nature **418**(6901): 979-83.
- 50) MacCabe, J. A., J. Errick, et al. (1974). "Ectodermal control of the dorsoventral axis in the leg bud of the chick embryo." Dev Biol **39**(1): 69-82.
- 51) Mariani, F. V. and G. R. Martin (2003). "Deciphering skeletal patterning: clues from the limb." Nature **423**(6937): 319-25.

- 52) Merino, R., D. Macias, et al. (1999). "Expression and function of Gdf-5 during digit skeletogenesis in the embryonic chick leg bud." Dev Biol **206**(1): 33-45.
- 53) Merino, R., Y. Ganon, et al. (1998). "Morphogenesis of digits in the avian limb is controlled by FGFs, TGFbetas, and noggin through BMP signaling." Dev Biol **200**(1): 35-45.
- 54) Millan, F. A., F. Denhez, et al. (1991). "Embryonic gene expression patterns of TGF beta 1, beta 2 and beta 3 suggest different developmental functions in vivo." Development **111**(1): 131-43.
- 55) Mitrovic, D. (1978). "Development of the diarthrodial joints in the rat embryo." Am J Anat **151**(4): 475-85.
- 56) Mittapalli, V. R., F. Prols, et al. (2006). "Avian stanniocalcin-2 is expressed in developing striated muscle and joints." Anat Embryol (Berl) **211**(5): 519-23. Niswander, L., C. Tickle, et al. (1993). "FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb." Cell **75**(3): 579-87.
- 57) Nishitoh, H., H. Ichijo, et al. (1996). "Identification of type I and type II serine/threonine kinase receptors for growth/differentiation factor-5." J Biol Chem **271**(35): 21345-52.
- 58) Niswander, L., S. Jeffrey, et al. (1994). "A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb." Nature **371**(6498): 609-12.
- 59) Ohuchi, H., T. Nakagawa, et al. (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**(11): 2235-44.

- 60) Ortega, N., D. J. Behonick, et al. (2004). "Matrix remodeling during endochondral ossification." Trends Cell Biol **14**(2): 86-93.
- 61) Pacifici, M., E. Koyama, et al. (2005). "Mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation: recent advances, but many lingering mysteries." Birth Defects Res C Embryo Today **75**(3): 237-48.
- 62) Parr, B. A. and A. P. McMahon (1995). "Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb." Nature **374**(6520): 350-3.
- 63) Pizette, S. and L. Niswander (2000). "BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis: formation of prechondrogenic condensations and their differentiation into chondrocytes." Dev Biol **219**(2): 237-49.
- 64) Riddle, R. D., M. Ensini, et al. (1995). "Induction of the LIM homeobox gene Lmx1 by WNT7a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb." Cell **83**(4): 631-40.
- 65) Riddle, R. D., R. L. Johnson, et al. (1993). "Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA." Cell **75**(7): 1401-16.
- 66) Roark, E. F. and K. Greer (1994). "Transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein-2 act by distinct mechanisms to promote chick limb cartilage differentiation in vitro." Dev Dyn **200**(2): 103-16.
- 67) Rudnicki, J. A. and A. M. Brown (1997). "Inhibition of chondrogenesis by Wnt gene expression in vivo and in vitro." Dev Biol **185**(1): 104-18.

- 68) Saunders, J. W., Jr. (1998). "The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. 1948." J Exp Zool **282**(6): 628-68.
- 69) Saunders, J. W., Jr. and M. T. Gasseling (1968). Ectodermal-Mesenchymal Interactions in the Origin of Limb Symmetry. Epithelial-Mesenchymal interactions. R. F. a. R. E. Billingham. Baltimore, Williams & Willkins: 78-97.
- 70) Searls, R. L., S. R. Hilfer, et al. (1972). "An ultrastructural study of early chondrogenesis in the chick wing bud." Dev Biol **28**(1): 123-37.
- 71) Shepard, J. B., H. A. Krug, et al. (2007). "Versican expression during synovial joint morphogenesis." Int J Biol Sci **3**(6): 380-4.
- 72) Sohaskey, M. L., J. Yu, et al. (2008). "JAWS coordinates chondrogenesis and synovial joint positioning." Development **135**(13): 2215-20.
- 73) Später, D., T. P. Hill, et al. (2006). "Role of canonical Wnt-signalling in joint formation." Eur Cell Mater **12**: 71-80.
- 74) Später, D., T. P. Hill, et al. (2006). "Wnt9a signaling is required for joint integrity and regulation of Ihh during chondrogenesis." Development **133**(15): 3039-49.
- 75) Storm, E. E. and D. M. Kingsley (1996). "Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family." Development **122**(12): 3969-79.
- 76) Storm, E. E. and D. M. Kingsley (1999). "GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development." Dev Biol **209**(1): 11-27.

- 77) Storm, E. E., T. V. Huynh, et al. (1994). "Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF beta-superfamily." Nature **368**(6472): 639-43.
- 78) Strangeways, T. S. P. and H. B. Fell (1926). "Experimental studies on the differentiation of the embryonic tissues growing in vivo and in vitro.-I. The development of the undifferentiated limb bud (a) when subcutaneously grafted into the post-embryonic chick and (b) when cultivated in vitro." Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences **99**(698): 340-366.
- 79) Summerbell, D. (1983). "The effect of local application of retinoic acid to the anterior margin of the developing chick limb." J Embryol Exp Morphol **78**: 269-89.
- 80) ten Berge, D., S. A. Brugmann, et al. (2008). "Wnt and FGF signals interact to coordinate growth with cell fate specification during limb development." Development **135**(19): 3247-57.
- 81) Thorogood, P. V. and J. R. Hinchliffe (1975). "An analysis of the condensation process during chondrogenesis in the embryonic chick hind limb." J Embryol Exp Morphol **33**(3): 581-606.
- 82) Tickle, C., D. Summerbell, et al. (1975). "Positional signalling and specification of digits in chick limb morphogenesis." Nature **254**(5497): 199-202.
- 83) Todt, W. L. and J. F. Fallon (1987). "Posterior apical ectodermal ridge removal in the chick wing bud triggers a series of events resulting in defective anterior pattern formation." Development **101**(3): 501-15.

- 84) Tylzanowski, P., L. Mebis, et al. (2006). "The Noggin null mouse phenotype is strain dependent and haploinsufficiency leads to skeletal defects." Dev Dyn **235**(6): 1599-607.
- 85) Urist, M. R. (1965). "Bone: formation by autoinduction." Science **150**(698): 893-9.
- 86) von der Mark, K., H. von der Mark, et al. (1976). "Study of differential collagen synthesis during development of the chick embryo by immunofluorescence. II. Localization of type I and type II collagen during long bone development." Dev Biol **53**(2): 153-70.
- 87) Vortkamp, A., K. Lee, et al. (1996). "Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein." Science **273**(5275): 613-22.
- 88) Zou, H., R. Wieser, et al. (1997). "Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage." Genes Dev **11**(17): 2191-203.
- 89) Zuñiga, A., A. P. Haramis, et al. (1999). "Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds." Nature **401**(6753): 598-602.

el único en expresarse a las 48 horas observándose de manera transversal al cartílago, característico a la expresión en la interzona.