

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**“MORFOGÉNESIS DE LA EXTREMIDAD: FUNCIONES DEL FGF8 Y DEL ÁCIDO
RETINOICO DURANTE LA ACTIVACIÓN DE LA MUERTE CELULAR
INTERDIGITAL”.**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

BIOL. ROCÍO ENRIQUETA HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

TUTOR: DR. LUIS FERNANDO COVARRUBIAS ROBLES

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicada a toda mi familia.
Siempre serán la razón para quedarse.
Los quiero mucho.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Luis Covarrubias Robles por la dirección y el apoyo otorgado en la realización de este trabajo.

A los miembros del comité revisor de ésta tesis: Dr. Mario Zurita, Dra. Hilda Lomelí, Dra. Marina Macías y el Dr. Ernesto Méndez por las sugerencias emitidas para mejorar este escrito.

A los miembros del comité tutorial por sus críticas y sugerencias experimentales hacia éste trabajo: el Dr. Jesús Chimal-Monroy y la Dra. Diana Escalante Alcalde.

Al Dr. Christopher Wood por la ayuda brindada en múltiples ocasiones.

A la M.C. Concepción Valencia por su disposición de ayuda y colaboración frente a cualquier circunstancia.

Dra. Elizabeth Mata, Dra. Guadalupe Zavala y M.C. Andrés Saralegui por el apoyo técnico en las unidades del bioterio, de microscopía electrónica y de microscopía confocal, respectivamente.

Este trabajo fue financiado por CONACYT, DGAPA y CONACYT-SNI.

A todos los miembros del laboratorio del Dr. Luis Covarrubias con los he convivido en este largo trayecto.

A mis amigos que siempre han creado momentos muy gratos.

A mis amores que aún siendo pocos han sido mucho.

Resumen

La extremidad en desarrollo representa uno de los paradigmas más interesantes para su estudio en la biología del desarrollo. Particularmente, la muerte que ocurre en las regiones interdigitales (i.e. 'Interdigital Cell Death', ICD) de la extremidad embrionaria es un evento morfogénico ampliamente estudiado. Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado la cohorte completa de moléculas que regulan éste proceso y sus posibles interacciones. La proteína de Bmp, el Ácido retinoico (RA) y el Fgf8 son moléculas que han sido previamente identificadas como factores relevantes en el control de la ICD. En este trabajo nosotros determinamos que la regulación negativa de la expresión del Fgf8 en el ectodermo interdigital es el evento que inicia la ICD, mientras el RA es la molécula que induce persistentemente la muerte celular del mesénquima distal por un mecanismo que involucra la inducción de la expresión de Bax. La inhibición de la vía de las MAPK inhibe el efecto de supervivencia del Fgf8 en las células interdigitales y sus respuestas consecuentes como son la fosforilación de Erk1/2 y la inducción de la expresión de Mkp3. Fgf8 regula los niveles del RA por medio de disminuir la expresión de la enzima que lo sintetiza (Raldh2) y de incrementar la expresión de la enzima que lo inactiva (Cyp26b1), mientras que RA reduce la expresión de Fgfr1 y la fosforilación de Erk1/2. En la extremidad embrionaria, la inhibición de la señalización de Bmps en el mesénquima no afecta la ICD. Sin embargo, Noggin en el ectodermo distal induce la expresión del Fgf8 y reduce la regresión del interdígito. En la extremidad del pollo, la administración de Noggin exógeno reduce la ICD pero cuando se aplica al mesénquima distal esta reducción se asocia con un incremento en la expresión del Fgf8. En correspondencia con el decline crítico en la expresión del Fgf8 para la activación de la ICD, las células interdigitales adquieren una posición proximal conforme ocurre la regresión del interdígito. Identificamos a las células del mesénquima distal como aquellas que originan a las células del interdígito destinadas a morir. Por lo tanto, la ICD está determinada por la regulación antagónica de la muerte celular por el Fgf8 y el RA y ocurre a través de un mecanismo de muerte celular progresivo y no masivo. En este estudio también se describen los primeros acercamientos para determinar algunas moléculas involucradas en la regulación de la fagocitosis interdigital, tales como la Pi3k y la Dinamina.

Abstract

The complete cohort of molecules involved in interdigital cell death (ICD) and their interactions are yet to be defined. Bmp proteins, Retinoic acid (RA) and Fgf8 have been previously identified as relevant factors in the control of ICD. Here we determined that downregulation of Fgf8 expression in the ectoderm overlying the interdigital areas is the event that triggers ICD, whereas RA is the persistent cell death-inducing molecule that acts on the distal mesenchyme by a mechanism involving the induction of Bax expression. Inhibition of the mitogen-activated protein kinase (Mapk) pathway prevents the survival effect of Fgf8 on interdigital cells and the accompanying Erk1/2 phosphorylation and induction of Mkp3 expression. Fgf8 regulates the levels of RA by both decreasing the expression of Raldh2 and increasing the expression of Cyp26b1, whereas RA reduces Fgfr1 expression and Erk1/2 phosphorylation. In the mouse limb, inhibition of Bmp signaling in the mesenchyme does not affect ICD. However, noggin in the distal ectoderm induces Fgf8 expression and reduces interdigit regression. In the chick limb, exogenous noggin reduces ICD, but, when applied to the distal mesenchyme, this reduction is associated with an increase in Fgf8 expression. In agreement with the critical decline in Fgf8 expression for the activation of ICD, distal interdigital cells acquire a proximal position as interdigit regression occurs. We identified proliferating distal mesenchymal cells as those that give rise to the interdigital cells fated to die. Thus, ICD is determined by the antagonistic regulation of cell death by Fgf8 and RA and occurs through a progressive, rather than massive, cell death mechanism. In addition, we explored the role of molecules that potentially will regulate the phagocytosis process such as, the Pi3k and Dynamin.

INDICE

1. Introducción	7
1.1 La morfogénesis de la extremidad	8
1.1.1. El surgimiento de la extremidad	10
1.1.2.El eje próximo-distal de la extremidad	
1.1.2.1.La Cresta Ectodérmica Apical ('Apical Ectodermal Ridge', AER) y los Factores de Crecimiento de Fibroblasto ('Fibroblast Growth Factors', Fgfs).....	10
1.1.2.2.El Acido Retinóico (RA).....	19
1.1.2.3. Los genes Hox en la polaridad Próximo-Distal	22
1.1.2.4.Modelos de la formación de la extremidad en el eje Próximo-Distal	23
1.1.3.El eje Antero-Posterior	25
1.1.3.1. La Zona de Actividad Polarizante ('Zone of Polaring Activity', ZPA)	25
1.1.3.2. Los centros de señalización secundarios en la especificación Antero-Posterior	30
1.1.4.El eje Dorso-Ventral	31
1.1.5.La Muerte Celular durante el desarrollo de la extremidad	31
1.1.5.1. La Muerte Celular Programada ('Programmed Cell Death', PCD)	36
1.1.5.2. Las regiones de PCD en la extremidad embrionaria	36
1.1.5.3. La interacción de factores durante la ICD de la extremidad	38
1.1.5.4. Los factores intrínsecos que participan en la ICD	43
1.2 . La evolución de la extremidad	46
2. Hipótesis	47
3. Objetivos	47
3.1. Objetivo General	47
3.2. Objetivos Particulares	48
4. Materiales y Métodos	48
4.1. Animales	48
4.2. Cultivo de las extremidades	48
4.3. Implantación de esferas en las extremidades de ratón	49
4.4. Implantación de esferas en los embriones de pollo	49
4.5. Infección de las extremidades con los adenovirus Noggin-GFP y GFP.....	49
4.6. Tinciones con el Anaranjado de Acridina (AO), Lysotracker (LT) y con Rojo Neutro (NR)	50
4.7. Inmunohistoquímica en cortes de tejido de muestras embebidas en Paraplast	50
4.8. Inmunohistoquímica en cortes de tejido de muestras congeladas	52
4.9. Detección de DNA fragmentado (TUNEL)	53
4.10. Incorporación e Inmunodetección de Bromodeoxiuridina (BrdU)	54

4.11. Inmunohistoquímica en tejido completo	55
4.12. Hibridación in situ en tejido completo de la extremidad del ratón	57
4.13. Hibridación in situ en tejido completo de la extremidad del pollo	61
5. Resultados	62
5.1. La regulación de la ICD por el Fgf8	62
5.1.1. Las vías de señalización que utiliza el Fgf8 en la extremidad. embrionaria para promover la supervivencia celular	64
5.2. La participación del RA durante la ICD	69
5.3. La señalización antagónica entre el Fgf8 y el RA en la ICD.	73
5.4. La participación de los Bmps en la ICD	76
5.4.1. La señalización de los Bmps en el mesénquima interdigital.....	76
5.4.2. La señalización de los Bmps en el ectodermo	78
5.4.3. La señalización de los Bmps en la extremidad embrionaria del pollo	81
5.5. La participación de los genes Msx1/2 en la ICD	82
5.6. El origen y destino de las células del interdígito	83
5.7. La regulación de la fagocitosis interdigital	86
5.7.1. La Pi3k participa en la fagocitosis de las células del interdígito	86
5.7.2. La dinamina participa en la fagocitosis de las células del interdígito	94
6. Discusión	95
6.1. El Fgf8 es un factor de supervivencia	95
6.2. El RA y su participación en la ICD	99
6.3. La señalización antagónica entre el RA y el Fgf8 en la ICD	102
6.4. La participación de los Bmps en la ICD	104
6.5. La formación del interdígito en la extremidad embrionaria	107
6.6. La regulación de la fagocitosis en las células del interdígito	110
7. Conclusiones	113
8. Perspectivas	114
9. Bibliografía	115
10. Abreviaturas y siglas	125

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. La morfogénesis de la extremidad.

La extremidad en desarrollo es un excelente modelo para entender como es que las células interpretan la información molecular para traducirla en información espacial y formar estructuras. También es un paradigma experimental en el que se pueden estudiar los procesos celulares de proliferación, de diferenciación y de muerte.

La extremidad de los vertebrados delantera o trasera esta formada por una configuración básica que consta de tres elementos: el estilopodo (húmero ó fémur), el zeugopodo (ulna y cúbito ó fíbula y tibia) y el autopodo (carpos, tarso y falanges) (Figura 1a). Cada región de la extremidad que se observe es morfológicamente diferente: la palma de la mano lo es del dorso, los dedos no son iguales entre sí y tampoco lo son el brazo, el antebrazo y la mano uno respecto del otro. Las diferencias morfológicas son producto de la interacción coordinada de tres ejes durante el desarrollo. El eje próximo-distal está formado por todo lo largo de la extremidad, desde el hombro hasta la punta del dedo. La polaridad antero-posterior explica como se establecen las diferencias en el desarrollo de los dedos, mientras que la del eje dorso-ventral comprende la región entre la palma y el dorso de la extremidad (Figura 1a). Esta organización característica se establece en el embrión desde que se forma el primordio a partir del cual se desarrollará la extremidad. Todas la estructuras de la extremidad se forman por la interacción de las moléculas que son producidas por tres centros de señalización: la Cresta Ectodérmica Apical (AER), la Zona de Actividad Polarizante (ZPA) y el resto del ectodermo que no constituye a la AER (Figura 1b). Las moléculas derivadas de éstos centros interaccionan y son interdependientes, sin embargo, cada centro señala mayoritariamente para la formación de un eje de polaridad de la extremidad (Figura1b).

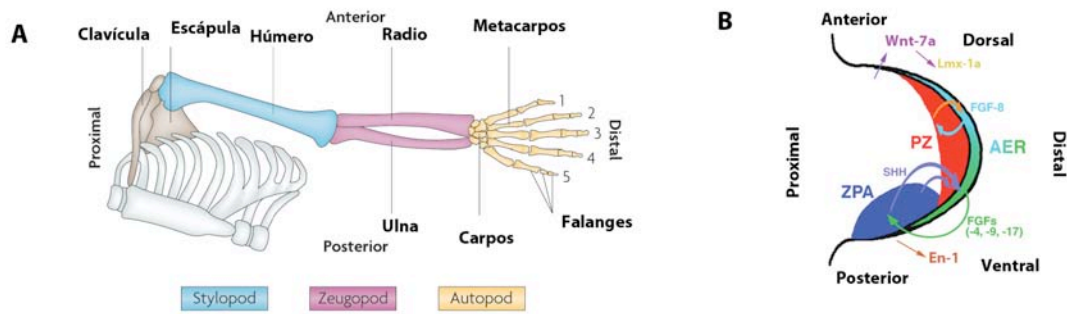


Figura 1. A. La configuración básica de la extremidad. B. Los centros de señalización y las moléculas que éstos producen para dirigir el desarrollo de la extremidad

1.1.1.El surgimiento de la extremidad.

En el embrión de ratón la extremidad comienza a desarrollarse a los 9,5 días de fertilización, mientras que en el embrión del pollo se observa entre las 51 y 56 horas de incubación que corresponde con la etapa de 17-18 del sistema de Hamilton y Hamburger (HH).

Las extremidades se desarrollan a partir de la Placa Lateral del Mesodermo ('Lateral Plate Mesoderm', LPM) como un paquete de células que proliferan activamente formando un primordio o yema cubierto por una capa ectodérmica. El sitio donde se forman en el tronco del embrión es muy específico, y se denomina área de la extremidad; se piensa que existen señales en todo el eje Antero-Posterior del embrión que inhiben su formación o la estimulan. Hasta el momento no se sabe cuáles son éstas señales, los genes *Hoxc6*, *Hoxc8* y *Hoxb5* se expresan en la LPM del embrión de ratón y por ello se piensa que existe un código de genes Hox que determinan el área de la extremidad (revisado en(Capdevila and Izpisua Belmonte, 2001). El Mesodermo Intermedio ('Intermediate Mesoderm',IM) también produce señales necesarias para que la extremidad inicie su desarrollo. Inicialmente se propuso que los Factores de Crecimiento de Fibroblasto (Fgfs) podrían ser estas moléculas ya que se expresan en ésta región y en el LPM; además, su administración

exógena en el flanco del embrión es suficiente para generar extremidades ectópicas (Martin, 1998). Sin embargo, la expresión de los genes *Tbx5* y de *Tbx4* antecede temporalmente a la expresión de los Fgfs en el IM y en la LPM y se observó recientemente que la eliminación del *Fgf8* en la PLM no afecta el surgimiento de la extremidad (Boulet et al., 2004).

Los genes de *Tbx5* y de *Tbx4* se expresan en la LPM alrededor de la etapa en que surge la extremidad delantera y la trasera respectivamente y se les considera como marcadores tempranos del surgimiento de cada extremidad y de la identidad anterior o posterior. La eliminación de *Tbx5* en una etapa temprana del desarrollo impide que las extremidades delanteras se formen (Agarwal et al., 2003), sin embargo, la eliminación más tardía permite la formación de la extremidad sin anomalías aparentes (Hasson et al., 2007). En cambio en los ratones que no expresan *Tbx4*, la extremidad inicia su desarrollo pero se detiene poco tiempo después (Naiche and Papaioannou, 2003). Ambos datos indican que los genes de *Tbx5/4* son necesarios para que las extremidades arranquen su desarrollo. Por otra parte, la sobre-expresión de *Tbx5* en el área en donde se desarrollará la extremidad trasera del embrión de pollo produce que se revierta el fenotipo hacia una ala, mientras que la sobre-expresión de *Tbx4* en la región delantera modifica el fenotipo hacia una pata, lo cual sugiere que la expresión de *Tbx5* es suficiente para conferir la identidad de extremidad delantera a través de reprimir los genes de extremidad trasera, mientras que la de *Tbx4* hace lo propio en la extremidad trasera (Rodríguez-Esteban et al., 1999; Takeuchi et al., 1999). Esta última observación no se sustenta en los experimentos hechos en el embrión de ratón. En los embriones que no expresan *Tbx5* ó *Tbx4* no se producen modificaciones moleculares que reviertan la identidad hacia una extremidad delantera ó trasera (Agarwal et al., 2003; Naiche and Papaioannou, 2003). En los embriones que no expresan *Tbx5* y se introduce un alelo silvestre de *Tbx4* que se expresa específicamente en la extremidad delantera se rescata el desarrollo de ésta extremidad y se mantiene la identidad morfológica y molecular propia de la misma (Minguillon et al., 2005).

Aunque las relaciones jerárquicas no se entienden completamente se piensa que los genes de *Tbx5/4* activan la expresión de *Wnt8c* y de *Wnt2b* los cuales a su vez regulan la expresión de *Fgf10* en el mesénquima del pollo (Kawakami et al., 2001; Ng et al., 2002). En el ratón no se expresan ni *Wnt8c* ni *Wnt2b*, sin embargo la señalización por algún miembro de la familia Wnt pudiera ser importante para mantener la expresión de *Fgf10* en el mesénquima, ya que su expresión disminuye al eliminar a *Lef1* y *Tcf1*, los factores de transcripción que regulan la vía canónica de Wnt (Agarwal et al., 2003). La información es más clara en lo referente al *Fgf10*, el cual se expresa en el mesénquima del primordio de la extremidad del embrión de pollo y de ratón. En los embriones de ratones que no expresan el *Fgf10* (*Fgf10*^{-/-}) la extremidad inicia su desarrollo pero no crece formando un rudimento de la extremidad (Min et al., 1998; Sekine et al., 1999). Al parecer, la falta de crecimiento se debe a que no se establece el primer circuito de regulación positiva entre el epitelio y el mesénquima, uno de los muchos circuitos que ocurren durante el desarrollo de la extremidad. La expresión de *Fgf10* en el mesénquima induce la expresión del *Fgf8* en las células del ectodermo, las cuales originarán la Cresta Ectodérmica Apical ('Apical Ectodermal Ridge', AER) que es la estructura esencial que guía el desarrollo próximo-distal de la extremidad como abajo se describe. Para completar este circuito es necesaria la expresión diferencial de dos isoformas del receptor a FGF tipo 2 (*Fgfr2*), la isoforma de *Fgfr2IIIb* que une el FGF10 en el ectodermo, y la forma *Fgfr2IIIc* que une el Fgf8 que se produce en el ectodermo en el mesénquima. La unión de los ligandos a sus respectivos receptores retro-alimenta la expresión de *Fgf10* en el mesénquima y de *Fgf8* en el ectodermo (Revest et al., 2001; Xu et al., 1998).

1.1.2.El eje Próximo-Distal de la extremidad embrionaria.

1.1.2.1.La Cresta Ectodérmica Apical ('Apical Ectodermal Ridge', AER) y los Factores de Crecimiento de Fibroblasto (Fgfs).

La AER es una estructura especializada que se ubica en la parte más distal de la extremidad; morfológicamente se describe como un engrosamiento del ectodermo. Se forma por la migración de células del ectodermo ventral hacia una posición más dorsal, donde se organizan en varias capas y en columnas de células formando una estructura poliestratificada en el embrión de ratón, mientras que en el embrión de pollo las células solo se acomodan en columnas, por lo que se dice que es pseudoestratificada. La AER pasa por tres etapas desde su surgimiento hasta su desaparición. La primera es la inducción y diferenciación de las células que formaran la AER; la segunda es la maduración y mantenimiento de la AER; y la última es su proceso de regresión (Lu et al., 2008).

El surgimiento de la AER depende de la producción de una serie de señales y de la localización precisa de las células en la parte distal del ectodermo. Para llegar a este punto es necesario que se hayan producido las interacciones moleculares correctas durante el inicio de la formación de la extremidad. Particularmente, se requiere de la expresión del *Fgf10* en el mesénquima para que se una al receptor *Fgfr2* en el ectodermo y se promueva la actividad de Wnt3/ β -catenina en las células del ectodermo precursoras de la AER (Lu et al., 2008). En el ratón se ha reportado que el receptor tipo Ia de las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) (*Bmpr1a*) señala antes que los factores Wnt y establece un circuito de retroalimentación positiva con β -catenina a través de estimular la expresión de sus ligandos como *Bmp4*, *Bmp7* y de *Bmp2* (Soshnikova et al., 2003). Algunos estudios sugieren que los precursores de la AER del pollo provienen de todo lo largo del ectodermo, mientras que los análisis en el ratón muestran que se originan en el ectodermo ventral (Fernandez-Teran and Ros, 2008). El proceso de inducción de la AER culmina con el

inicio de la expresión del *Fgf8* en las células que formaran la AER debido a las interacciones moleculares antes descritas.

Durante el proceso de maduración de la AER, las células aumentan su tamaño, se organizan en una estructura compacta y se ubican en su posición final. Este proceso ha sido menos estudiado pero se sabe que la ubicación final de la AER se produce por los movimientos morfogénéticos del ectodermo ventral en los cuales *Engrail-1* (*En-1*) (Loomis et al., 1998) y *Sp8* participan (Bell et al., 1959; Treichel et al., 2003). Para que la AER se siga manteniendo requiere de la señalización constante de Wnt, puesto que la ausencia de *Wnt3a* provoca la regresión prematura de la AER (Barrow et al., 2003); también se requiere de las señales que el mesénquima produce, particularmente de *Fgf10* (Pajni-Underwood et al., 2007) y de otro circuito de regulación positiva que se establece entre el epitelio y el mesénquima. Este último circuito promueve la expresión de *Gremlin* en el mesénquima, el cual inhibe a los Bmps, las señales que promueven su regresión. Esto se explicará con mayor detalle en los siguientes párrafos y en la sección de la ZPA.

El proceso de regresión de la AER es morfológico y molecular. Durante la regresión las células del ectodermo se aplanan, primero en las regiones interdigitales y después en la punta de los dedos, en el embrión de ratón esto ocurre a los 11,5 días y en el embrión de pollo se observa entre las etapas de 33-35 de HH. Los Bmps son los factores que se requieren para la regresión de la AER. La sobre-expresión de *Noggin*, un antagonista de éstos factores, en el ectodermo de la extremidad del pollo y del ratón lleva a que la AER exprese el *Fgf8* por más tiempo que en el embrión silvestre (Guha et al., 2002; Pizette and Niswander, 1999; Wang et al., 2004). Se desconoce cual de los Bmps podría estar realizando esta función, ya que durante esta etapa los genes *Bmp2* y *Bmp7* se expresan en el mesénquima, mientras que el *Bmp4* se localiza mayoritariamente en el ectodermo (Robert, 2007). El receptor *Bmpr1a* podría mediar esta interacción debido a que la eliminación de su expresión en el ectodermo impide la regresión de la AER (Pajni-Underwood et al., 2007).

La actividad principal de la AER reside en algunos miembros de los *Fgfs*; una familia muy grande de glicoproteínas que esta formada por al menos 22 genes descritos (Itoh and Ornitz, 2004). En el embrión de ratón y de pollo se expresan específicamente en la AER cuatro genes de ésta familia: el *Fgf4*, el *Fgf8*, el *Fgf9* y el *Fgf17*. En la AER del embrión de pollo además se expresan el *Fgf2* (Savage et al., 1993) y el *Fgf19* (Kurose et al., 2004). Todos los *Fgfs* anteriores, excepto el *Fgf8*, muestran un patrón de expresión restringido a ciertas etapas de desarrollo de la extremidad y a ciertas regiones de la AER. En el embrión de ratón se observa que el *Fgf4*, el *Fgf9* y el *Fgf17* se comienzan a expresar en la región posterior un día después de que se ha formado la AER y su expresión termina a los 11,5 días de desarrollo del embrión (Mariani et al., 2008).

Los primeros experimentos que se realizaron para conocer la función de la AER y de los *Fgfs* consistieron en la eliminación mecánica de ésta estructura. Cuando se remueve en etapas tempranas no se forma el zeugopodo ni el autopodo, sólo el estilopodo y si se elimina la AER en un embrión más grande el único que no se forma es el autopodo (Rowe et al., 1982; Summerbell, 1974). En éstos experimentos se observó que las esferas impregnadas con las proteínas de *Fgf4* ó de *Fgf8* e insertadas en el mesénquima distal pueden rescatar el desarrollo más o menos normal de la extremidad lo que indica que estos factores son los mediadores de la actividad de la AER (Fallon et al., 1994; Niswander et al., 1993).

Con el desarrollo de nuevas herramientas genéticas se ha podido conocer la función de cada uno de los *Fgfs* en el desarrollo de la extremidad. En los casos en que no resulta en la letalidad temprana del embrión, se han producido ratones mutantes que no expresan constitutivamente algunos de los *Fgfs*. Alternativamente, se ha eliminado la expresión de cada factor ó combinaciones de ellos en la extremidad durante cierta etapa de desarrollo (mutantes condicionales). La ausencia de expresión de *Fgf4*, de *Fgf9* y de *Fgf17* por separado o en conjunto, no genera ninguna anormalidad en la extremidad (Mariani et al., 2008; Moon et al., 2000; Sun et al.,

2000b; Xu et al., 2000). La expresión del *Fgf8* en la AER es la única verdaderamente esencial para el crecimiento de la extremidad. Sin embargo solo se revela cuando se elimina algún otro de los Fgfs ya que en ausencia de *Fgf8* y algún otro de los Fgf que se expresan en la AER, la extremidad tiene severas malformaciones (Mariani et al., 2008). Para comprender el porqué el *Fgf8* es tan esencial, es importante saber que es el único de los Fgf que se expresa durante todo el tiempo de vida de la AER. La expresión del *Fgf8* inicia incluso antes de que la AER sea morfológicamente identificable, en las células que originarán la AER (células pre-AER) y el RNAm de este gen se sigue detectando en el ectodermo de los dedos aún cuando ya ha ocurrido la regresión morfológica de las células de la AER (Salas-Vidal et al., 2001). Por esta razón en ocasiones se considera que la expresión del *Fgf8* es sinónimo de la AER. Por otra parte, el *Fgf8* se expresa en diferentes tejidos que funcionan regularmente como centros organizadores (Ohkubo et al., 2002; Sato and Joyner, 2009), por lo que la eliminación constitutiva de este factor produce que los embriones se mueran en las primeras etapas de desarrollo (Moon and Capecchi, 2000). La eliminación condicional del *Fgf8* en la extremidad genera severas malformaciones, se forman los tres elementos pero son más pequeños que los de los ratones silvestres y no están completamente desarrollados (hipoplásticos)(Lewandoski et al., 2000; Moon and Capecchi, 2000). En éstos ratones el fenotipo no es tan drástico como se esperaba, sin embargo esto se debe a que los otros Fgfs que se expresan en la AER pudieran compensar por la ausencia del *Fgf8* (Lewandoski et al., 2000; Sun et al., 2002). Lo anterior se comprueba al observar que los ratones mutantes que no expresan ni el *Fgf4* ni el *Fgf9*, ni el *Fgf17* (*Fgf4*^{-/-},*Fgf9*^{-/-},*Fgf17*^{-/-}) tienen extremidades casi normales, mientras que la eliminación del *Fgf8* en un fondo doble mutante que no expresa *Fgf4* ni el *Fgf9* (*Fgf4*^{-/-},*Fgf9*^{-/-},*Fgf8*^{-/-}) lleva a que no se forme la extremidad (Mariani et al., 2008). Las posibles interacciones génicas entre los *Fgfs* también se revelaron al analizar los ratones mutantes condicionales; por ejemplo, se observó que existe una represión genética del *Fgf8* hacia el *Fgf4*, ya que en los ratones que no expresan el *Fgf8* la

expresión del *Fgf4* se mantiene por más tiempo y se extiende hacia la región anterior de la AER (Lewandoski et al., 2000).

Existen cuatro posibles mecanismos que pueden explicar el fenotipo que se genera por la ausencia de la señalización de los Fgfs en la extremidad. Podría ser que los Fgfs, particularmente el *Fgf4* y el *Fgf8* actúen como señales que promuevan la proliferación celular; el segundo mecanismo los involucraría como factores de supervivencia; el tercer mecanismo es que se requieran por los precursores del esqueleto para darles una identidad distal y la última posibilidad es que sea una combinación de todos los procesos anteriores. En los experimentos de extirpación de la AER se observó que muchas de las células del mesénquima distal se mueren, esta zona se localiza alrededor de 200µM por debajo del ectodermo, además esta muerte se evita por la inserción de esferas embebidas en *Fgf8* (Dudley et al., 2002; Rowe et al., 1982). Un análisis más detallado muestra que se reduce la proliferación celular del mesénquima al eliminar mecánicamente la AER (Dudley et al., 2002); o bien a través de remover la expresión de *Fgfr2* en las células de la AER (Yu and Ornitz, 2008). La función de supervivencia que potencialmente tendrían se refuerza al observar que en los ratones dobles mutantes (*Fgf4*^{-/-}; *Fgf8*^{-/-}) y en los triples mutantes (*Fgf4*^{-/-}; *Fgf9*^{-/-}; *Fgf8*^{-/-}) hay muchas células del mesénquima en apoptosis, sin embargo, las células se localizan en el mesénquima proximal muy cerca de la región dorsal (Mariani et al., 2008; Sun et al., 2002). En ambos embriones dobles y triples mutantes no hay cambios aparentes en la proliferación celular (Mariani et al., 2008; Sun et al., 2002). Por otra parte, en los embriones triples mutantes se observó una expansión del dominio de expresión del gen *Meis1*, mismo que se requiere para conferir un fenotipo proximal. Esto sugiere que los Fgfs pudieran promover la especificación distal reprimiendo a los genes proximales (Mariani et al., 2008). Como podemos observar ninguna de estas observaciones se favorece respecto a la otra, por lo que muy probablemente sea una combinación de todos los procesos. Hasta el momento el modelo más aceptado es que los Fgfs de la AER influyen el desarrollo de la extremidad, al menos en parte a través de promover la

supervivencia y la especificación distal de los progenitores condrogénicos (Mariani et al., 2008; Mariani and Martin, 2003).

Los Fgfs después de ser traducidos se modifican pos-traduccionalmente por heparan sulfato para impedir su difusión y estabilizar su unión con el receptor. Los receptores a Fgfs (*Fgfrs*) son proteínas que atraviesan la membrana y que poseen tres dominios característicos: uno de unión al ligando, una región trans-membranal y un dominio intracelular con actividad de tirosina-cinasa. En el embrión de ratón y del pollo se expresan cuatro receptores a Fgfs (*Fgfr1*, *Fgfr2*, *Fgfr3* y *Fgfr4*) codificados por genes diferentes. La región extracelular de los receptores tiene tres dominios tipo inmunoglobulina en donde se produce la edición alternativa de los RNAm para generar isoformas de la proteína (Itoh and Ornitz, 2004). La unión del Fgf a su receptor induce la formación de dímeros, lo que lleva a la transfosforilación de los dominios de tirosina citoplásmicos y el reclutamiento de diferentes moléculas. Una de las proteínas que frecuentemente se recluta es FRS2 la cual funciona como molécula adaptadora y se une al dominio PTB de los FGFR provocando su fosforilación en múltiples sitios; ésta fosforilación promueve que se unan diferentes adaptadores de la vía de las Mapk como Grb2 y también la subunidad p85 de la vía de la Pi3k (Acevedo et al., 2009). A su vez éstas vías de señalización inducen la expresión de reguladores negativos para evitar la sobre-activación de los FGFR; por ejemplo los FGFs a través de las Mapk inducen la transcripción del regulador negativo *Sprouty* (Tsang and Dawid, 2004) y de la fosfatasa *Dusp6/Mkp3* (Eblaghie et al., 2003). En el embrión de pollo y de ratón *Mkp3* se expresa en sitios en cuales los Fgfs señalizan o donde se producen ectópicamente (Kawakami et al., 2003). En el embrión de ratón que no expresa la *Mkp3* se observa un incremento de la forma fosforilada de Erk en regiones en las cuales los *Fgfs* señalizan; éstos ratones tienen las extremidades más pequeñas debido a que se retrasa el proceso de osificación (Li et al., 2007). En la extremidad del pollo también se evaluó el papel de la fosfatasa *Mkp3* y se observó que es un regulador negativo de la activación de las Mapk inducida por el Fgf8 (Eblaghie et al.,

2003). Sin embargo, otro grupo de trabajo describe una función diferente para la *Mkp3* durante el desarrollo de la extremidad embrionaria. Kawakami y sus colaboradores proponen que la fosfatasa es regulada transcripcionalmente por el Fgf8 por la vía de la Pi3k lo que genera una distribución diferente en el mesénquima y en el ectodermo. Las consecuencias de ésta localización producen efectos celulares diferentes; la *Mkp3* en el mesénquima promueve la supervivencia a través de desfosforilar a Erk, cinasa que tiene un función pro-apoptótica y que pudiera ser la responsable de la muerte fisiológica de las células de la AER (Kawakami et al., 2003).

Se ha observado que las proteínas de *Sprouty* inhiben la activación de Erk inducida por los Fgfs y por los Vegfs, sin embargo se desconoce el mecanismo molecular preciso de cómo lo logran. Al parecer interacciona con algunos elementos de la vía de señalización de las Mapk (Christofori, 2003). Los genes *Sprouty1 (Spry1)*, *Sprouty2(Spry2)* y *Sprouty4(Spry4)* se expresan en el ectodermo y el mesénquima de la extremidad embrionaria (Zhang et al., 2001); los embriones mutantes en *Spry2* y *Spry4 (Spry2^{-/-}; Spry4^{-/-})* desarrollan polisindactilia en las extremidades delanteras lo cual sugiere que en la extremidad embrionaria éstos factores funcionan a través de antagonizar la señalización de los Fgfs (Taniguchi et al., 2007). Otro antagonista de la señalización de los Fgfs es *Sef* ('Similar expression to Fgf'), el cual codifica para un putativo receptor transmembranal. Al igual que las moléculas anteriores, se expresa en las mismas áreas de la extremidad en las cuales los Fgfs señalizan, sin embargo, su expresión se induce sólo por el Fgf2 exógeno y no por el Fgf8. Esta observación sugiere que cada Fgf que se expresa en la extremidad podría tener un inhibidor particular para su propia vía de señalización (Harduf et al., 2005).

Particularmente durante el desarrollo de la extremidad del embrión de ratón y del pollo se expresan tres receptores, el *Fgfr1*, el *Fgfr2* y el *Fgfr3* en distintas regiones de la extremidad y en etapas específicas. El *Fgfr1* se expresa antes de que se forme la extremidad en la LPM y posteriormente en el mesénquima distal (Li et al., 2005; Verheyden et al., 2005). En los embriones de los ratones condicionales nulos en

Fgfr1 (*Fgfr1*^{-/-}) se observan dos fenotipos que dependen del tiempo de supresión de este gen; en el menos drástico debido a una eliminación tardía, se pierden dos de los dedos anteriores (Li et al., 2005). En cambio cuando se elimina su expresión desde el inicio las extremidades están morfológicamente y molecularmente alteradas; los embriones tienen el estilopodo y el zeugopodo muy corto y solo se forman tres dedos. Ambos fenotipos se asocian con una disminución en los procesos de la supervivencia y de especificación de los progenitores del mesénquima, así como en el de restringir las dimensiones de la extremidad (Li et al., 2005; Verheyden et al., 2005).

El *Fgfr2* se expresa en el ectodermo y en el mesénquima de la extremidad en desarrollo (Itoh and Ornitz, 2004), y su eliminación en ambos tejidos impide que se forme la extremidad (Xu et al., 1998; Yu et al., 2003). Particularmente la isoforma de *Fgfr2IIIb* se requiere para mantener la supervivencia de las células de la AER, su eliminación permite que se forme esta estructura pero no es estratificada y degenera en poco tiempo, por ello la extremidad crece muy poco (Lu et al., 2008; Revest et al., 2001; Yu and Ornitz, 2008). La eliminación de *Fgfr2* en el mesénquima no genera ninguna anomalía de la extremidad, es probable que junto con *Fgfr1* tengan funciones redundantes (Li et al., 2005; Yu and Ornitz, 2008). Para determinar la existencia de compensación génica se generaron embriones que no expresan los dos receptores (*Fgfr1*^{-/-}; *Fgfr2*^{-/-}). En ellos se observa que todos los elementos del esqueleto son más cortos, fenotipo asociado con un incremento en la apoptosis del mesénquima proximal y medial. Este fenotipo es indistinguible del que se obtiene al eliminar la expresión simultáneamente del *Fgf8* y del *Fgf4* (*Fgf4*^{-/-}; *Fgf8*^{-/-}), lo que sugiere que éstos factores señalarían a través de éstos receptores (Yu and Ornitz, 2008).

El receptor *Fgfr3* no tiene una función dentro de las primeras etapas de formación de la extremidad, se requiere para la diferenciación de las células mesenquimales hacia condrocitos y el ligando que a éste se une es totalmente diferente a los Fgfs que se expresan en la AER, es el FGF18 (Davidson et al., 2005).

1.1.2.2.El Ácido Retinoico (RA) .

El RA es el metabolito activo de la vitamina A (retinol). Se requieren de dos pasos de oxidación para su síntesis; la primera es la oxidación reversible del retinol hacia el retinaldehído evento que es catalizado por las enzimas alcohol deshidrogenasas (Adh) y retinol deshidrogenasas (Roldh). El segundo es la oxidación irreversible de retinaldehído mediado por las enzimas retinaldehído deshidrogenasas (*Raldh*) para generar el ácido retinoico (Niederreither and Dolle, 2008). En mamíferos existen dos isómeros del RA: el all-trans que es la forma más abundante y el 9-cis, el cual solo se detecta cuando hay un exceso del RA y sus funciones se relacionan más con efectos farmacológicos que con los fisiológicos (Duester, 2008). El RA es liposoluble por lo que atraviesa fácilmente las membranas celulares, cuando llega al núcleo señala través de unirse a receptores que funcionan como factores de transcripción. Existen dos tipos de receptores los RAR y los RXR que se unen como heterodímeros a secuencias del DNA muy conservadas (denominadas RARE) (Duester, 2008). Los receptores tipo RXR también se unen a otros receptores nucleares y por ello se ha propuesto que pudiera ser un adaptador que facilite la unión al DNA. La unión de los heterodímeros a las secuencias RARE permite el reclutamiento de co-activadores o co-represores que activan o inhiben la transcripción respectivamente (Niederreither and Dolle, 2008).

En el embrión, el RA se produce de forma controlada espacio-temporalmente. La manera más precisa de saber si un tejido sintetiza RA es a través de medir las pequeñas cantidades de este compuesto mediante HPLC, sin embargo, este protocolo resulta sumamente difícil para realizarlo cotidianamente. Una estrategia más simple es el analizar los patrones de expresión de las enzimas que participan en los dos pasos de síntesis. Particularmente la expresión de las *Raldh* (*Raldh1*, *Raldh2* y *Raldh3*) es un buen indicador de la presencia del RA; la *Raldh2* sintetiza casi todo el RA requerido durante la embriogénesis del ratón (Niederreither et al., 1999). Adicionalmente existen ratones transgénicos que expresan genes reporteros bajo

promotores con secuencias RARE, en los cuales se detecta la activación del reportero frente a muy bajas concentraciones del RA (Rossant et al., 1991).

Durante el desarrollo del embrión es esencial el mantener los niveles adecuados del RA ya que la exposición a dosis elevadas de éste produce teratogenicidad. En el embrión existen enzimas que regulan la concentración de este compuesto catalizando su oxidación e inactivación, éstas proteínas forman parte de la familia del citocromo P450 y se denominan *Cyp26* (Thatcher and Isoherranen, 2009). Los tres miembros de ésta familia: la *Cyp26a1*, la *Cyp26b1* y la *Cyp26c1* se expresan en diferentes tejidos y etapas en el embrión de ratón. Sus patrones de expresión son complementarios a la expresión de las *Raldh* y pueden considerarse como regiones en el embrión que son sensibles y se deben proteger de la señalización por el RA. La expresión de los receptores tipo RAR a menudo también se utiliza como un indicador de la señalización del RA.

Durante el desarrollo de la extremidad el RA se distribuye en forma de gradiente en el eje próximo-distal, siendo mayor en la región proximal y menor en la distal (Yashiro et al., 2004), esto se debe a la acción coordinada de los procesos de síntesis y de degradación que son reflejo de los patrones de expresión de las enzimas. La enzima *Raldh2* se expresa en el mesodermo del flanco del embrión (Niederreither et al., 2002) y posteriormente en el mesénquima proximal, mientras que la enzima *Cyp26a1* y *Cyp26b1* se expresan desde que inicia el crecimiento de la extremidad en la AER y en el mesénquima distal, respectivamente (MacLean et al., 2001). En los embriones de ratones que no expresan la *Raldh2* (*Raldh2*^{-/-}) no se forman las extremidades delanteras de los embriones, y el rescate con la administración de pequeñas dosis de RA a la madre permite que las extremidades delanteras arranquen su desarrollo, sin embargo, son pequeñas y con alteraciones en el eje antero-posterior, en cambio las extremidades traseras son normales (Niederreither et al., 2002). Por otra parte, la exposición a altas dosis del RA en el embrión de pollo lleva a que el mesénquima de la extremidad adquiera posiciones más proximales

(Tamura et al., 1997); un fenómeno similar se observa durante el proceso de regeneración de las extremidades de los anfibios, donde el tratamiento con el RA induce la formación de las nuevas estructuras con fenotipo proximal (Maden, 1982). En el embrión de pollo se observó que el RA regula la expresión de los genes *Meis1* y *Meis2* (*Meis1/2*), misma que se asocia con identidades proximales (Mercader et al., 2000). La eliminación de la expresión de *Cyp26b1* (*Cyp26b1*^{-/-}) en la extremidad produce un incremento del RA en la región distal; las extremidades de éstos embriones exhiben muchas anomalías en el patrón próximo-distal, se acorta el estilopodo, el zeugopodo y el autopodo; a nivel molecular se expande el dominio de expresión de los genes *Meis1/2* mientras que se reduce la expresión de genes distales como *Hoxd12-13* (Yashiro et al., 2004). En conjunto, los datos anteriores muestran que el RA es un regulador importante de la identidad próximo-distal, sin embargo, un reporte reciente argumenta en contra de esta visión. Este grupo de trabajo eliminó simultáneamente la expresión de *Raldh2* y de *Raldh3* (*Raldh2*^{-/-} ; *Raldh3*^{-/-}), para evitar la compensación que pudiera generarse por la ausencia de una u otra. Observan que los genes de *Meis1/2* se expresan de la misma forma que en el embrión silvestre y las extremidades traseras no tienen anomalías, no obstante, en éstos embriones mutantes la extremidad delantera no se forma debido a un aumento en la expresión del *Fgf8*. Duester y su grupo de trabajo proponen que el papel del RA no es el de instruir las identidades próximo-distales sino el de regular negativamente la expresión de *Fgf8* para permitir que la extremidad delantera inicie su desarrollo (Zhao et al., 2009). Un nuevo reporte trata de clarificar la situación, mediante la generación de un embrión mutante doble en los genes *Cyp26b1* y *Rar γ* (*Cyp26b1*^{-/-}; *Rar γ* ^{-/-}); el fenotipo que se observa es un rescate parcial de las estructuras de la extremidad, se forma el estilopodo y el autopodo, sin embargo el zeugopodo sigue sin desarrollarse bien. Al parecer las anomalías que se ven en el mutante de *Cyp26b1* están parcialmente ligadas con la especificación, debido a una expansión del dominio de expresión de *Meis1/2*, pero mayoritariamente con efectos apoptóticos-teratogénicos del RA que son mediados por el *Rar γ* (Pennimpede et al., 2010).

Por otra parte, existen los receptores al RA, particularmente los tipos RAR serían más informativos. Sin embargo, el análisis de los ratones mutantes en los receptores al RA genera resultados más difíciles de interpretar, debido a la existencia de redundancia funcional entre ellos (Mark et al., 1999).

1.1.2.3. Los genes Hox en la polaridad Próximo-Distal.

Los elementos Hox forman parte de una gran familia de genes que se encuentran formando grupos en el genoma. En el embrión se requieren para conferir identidad regional, por lo que su expresión esta controlada por una propiedad intrínseca denominada colinearidad espacial y temporal (Tschopp et al., 2009). Esto significa que los genes que se expresan primero en las regiones anteriores del embrión son los que se encuentran localizados en el extremo 5' del DNA. Dentro de este concepto también se incluye el de prevalencia posterior, el cual indica que los genes que se expresan temporalmente antes reprimen a los que se expresan después (Zakany and Duboule, 2007). Durante el desarrollo de la extremidad son necesarios los grupos HoxD y HoxA para la especificación en el eje próximo-distal y en el antero-posterior. Ambos grupos se expresan en dos fases, en la primera obedeciendo las reglas de la colinearidad espacial y temporal; mientras que en la segunda es más compleja y requieren de las moléculas que guían la morfogénesis de la extremidad. Las mutaciones de genes que pertenecen a los grupos HoxA (9-13) y HoxD (9-13) producen la pérdida de los elementos del esqueleto; sus efectos se aprecian claramente cuando se eliminan sus correspondientes genes en el otro grupo. Por ejemplo, cuando no se expresan los genes de los grupos HoxA11 y HoxD11 los elementos del zeugopodo son muy cortos, mientras que la pérdida de genes de los grupo HoxA13 y HoxD13 impide la formación del autopodo. Siguiendo esta misma lógica la eliminación de los genes *HoxA9* y *HoxD9* afecta regiones más proximales de la extremidad que la pérdida de los genes de los grupos *HoxA10* y *HoxD10*. Existe una independencia parcial en estos grupos, ya que se ha visto que mutaciones en los

genes de los grupos HoxA11 y Hoxd11 podrían también afectar a los elementos del autopodo. Con éstas observaciones a veces resulta impredecible saber cual es el fenotipo que se generará por la pérdida de los diferentes grupos (Zakany and Duboule, 2007).

1.1.2.4. Modelos de la formación de la extremidad en el eje próximo-distal.

Con la información que se ha ido generando surge la necesidad de explicar a través de diferentes modelos como es que se integran todas las señales para poder formar una extremidad. A continuación se describen los modelos que han sido propuestos para explicar la polaridad próximo-distal; dependiendo del paradigma experimental algunos han sido favorecidos respecto a otros, y hasta el momento ninguno ha satisfecho totalmente a los biólogos del desarrollo por lo que la controversia continua.

a) El modelo de la Zona de Progresión:

Fue descrito por Saunders (Saunders, 1998) en base a los fenotipos que se generan por la extirpación de la AER. Saunders propuso que las células mesenquimales que se encuentran hasta 300 μ M por debajo del ectodermo reciben constantemente las señales provenientes de la AER, las cuales son interpretadas por un reloj molecular interno el cual se detiene cuando quedan fuera de esta área. A ésta región de la extremidad la llamó Zona de Progresión ('Progression Zone', PZ) y el destino de las células se establece debido al tiempo de exposición a las señales que recibieron las células al estar en la PZ, si permanecieron mucho tiempo en la PZ formarán parte de los elementos distales del esqueleto, mientras que si fue poco constituirán los elementos proximales (Tabin and Wolpert, 2007). El tiempo de permanencia de cada célula en la ZP a su vez, depende de los procesos morfogénéticos inherentes en el desarrollo de la extremidad como son la migración y la proliferación. Los Fgfs son los factores permisivos que permiten a las células de la ZP mantener su reloj interno adquirir y progresivamente un destino más distal (Figura 2a).

b) El modelo de la especificación temprana:

Se propuso al marcar las células distales con colorantes fluorescentes y observar que después de la extirpación de la AER éstas células no se integran a los elementos proximales en la extremidad del pollo como lo predice el modelo de la ZP (Dudley et al., 2002). Adicionalmente se hicieron experimentos de trasplante y se observó que el tejido mesenquimal proximal ya está pre-especificado para adquirir las identidades de su ubicación, así como el mesénquima intermedio, el único que es más lábil es el distal pero hasta ciertas etapas desarrollo. Con estas observaciones se concluyó que cada uno de los elementos próximo-distales de la extremidad (estilopodo, zeugopodo y autopodo) se especifican muy temprano, desde que la extremidad se forma y cada elemento se expande por la proliferación de los progenitores presentes (Tabin and Wolpert, 2007) (Figura 2b).

c) El modelo de las dos señales:

Este modelo se generó a partir de las últimas observaciones en las que se implica a los Fgfs como señales instructivas. Se propone que desde que se forma el botón de la extremidad las células del mesénquima están expuestas a una señal proveniente del flanco del mesodermo, probablemente el RA que dicta un fenotipo proximal, y después a otra señal opuesta, los Fgfs, que confieren la identidad distal. Debido al crecimiento, se forman tres dominios de señalización, el más proximal en el que predomina el RA, el distal por debajo de la AER en que señalizan los Fgfs, y un dominio intermedio en donde convergen ambas señales. A partir de éstas tres regiones se forma el estilopodo, el zeugopodo y el autopodo en una forma similar a lo propuesto en el modelo de la especificación temprana (Mariani et al., 2008)(Figura 2c).

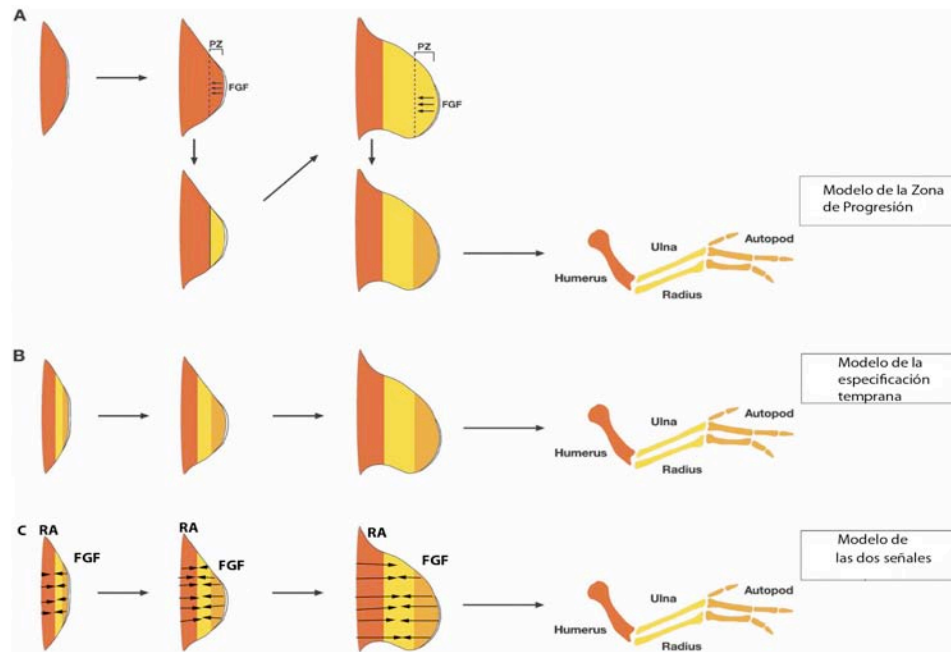


Figura 2. Los modelos de especificación de las células de la extremidad en el eje próximo-distal. A. El modelo de la Zona de Progresión. B. El modelo de la especificación temprana. C. El modelo de las dos señales

1.1.3. El eje antero-posterior de la extremidad embrionaria.

1.1.3.1. La Zona de Actividad Polarizante ('Zone of Polarizing Activity'; ZPA).

La ZPA se descubrió a partir de ensayos de transplante en la extremidad embrionaria del pollo; se observó que al tomar las células de la región posterior de la extremidad y al transplantarlas a la región anterior de otra extremidad de la misma etapa se duplican los dedos como si se proyectaran en una imagen en el espejo. Esta capacidad de transformación se definió como una actividad polarizante y por ello a la región posterior del mesénquima se le nombró la ZPA. También se observó que la actividad polarizante disminuye si los injertos de la ZPA se colocan en posiciones más posteriores de la extremidad receptora (Tickle et al., 1975). Para explicar estas observaciones se propuso que la molécula que allí residiera debiera actuar como un morfógeno, es decir, como un factor soluble que se distribuyera en

forma de gradiente siendo mayor en la región posterior y menor en la anterior. Las células adquirirían la información posicional respondiendo a umbrales específicos de este morfógeno, tal como lo propuso Wolpert en 1969 para el modo de acción de estas moléculas (Wolpert, 1969).

Inicialmente se describió que el RA poseía la capacidad de inducir duplicaciones de los dedos en forma similar a los transplantes de la ZPA (Summerbell, 1983; Tickle et al., 1982). Sin embargo, ahora se sabe que esta función no es directa sino que lo hace a través de regular otros factores que se describirán más adelante. Con el tiempo se determinó que la verdadera actividad polarizante reside en la proteína del gen de *Sonic hedgehog* (Shh). La proteína Shh cumple con todos los requisitos para ser la señal proveniente de la ZPA: su RNAm se expresa en ésta zona a los 11,5 días de la embriogénesis de ratón cuando inicia el desarrollo de la extremidad; cuando se transplantan las células que expresan Shh hacia la región anterior de la extremidad se inducen duplicaciones de los dedos; por último, la proteína es soluble y se distribuye en forma de gradiente siendo mayor en la región posterior y menor en la anterior (Li et al., 2006; Zeng et al., 2001).

El péptido activo de Shh que señala se genera por el procesamiento proteolítico de una proteína más larga; a la versión procesada se le adicionan colesterol y palmitato, modificaciones que limitan y aumentan su rango de difusión, respectivamente (Mann and Beachy, 2004). Las células reciben la señal a través de la unión de SHH a un pseudoreceptor de nombre Patched (Ptch), el cual constitutivamente inhibe a la molécula transmembranal Smoothed (Smo). Cuando SHH se une a PTCH se libera la inhibición hacia Smo el cual a través de su dominio intracelular recluta diferentes proteínas que inician una cascada de señalización que culmina principalmente en la activación de los factores de transcripción *Gli*. Los factores de transcripción *Gli1* y *Gli2* funcionan como activadores de los principales genes blancos como consecuencia de la señalización iniciada por *Shh*, mientras que *Gli3* es un represor de genes blanco esencial en la señalización por Shh. Es

importante distinguir entre las dos versiones proteicas que se generan de Gli3, una forma completa de la proteina que actúa como un activador transcripcional (GLI3A) y una proteina más pequeña que se forma debido al procesamiento proteolítico de la versión más larga y actúa como un represor transcripcional (GLI3R). En la extremidad las dos versiones de la proteina de Gli3 se distribuyen en forma de gradiente (GLI3A:GLI3R) en el eje antero-posterior de la extremidad, siendo SHH el responsable de esta distribución; cuando SHH esta presente, se impide el procesamiento hacia la forma represora de GLI3 y en su ausencia se procesa, por lo que el GLI3R se encuentra predominantemente en la región anterior (Wang et al., 2000).

Los análisis de los ratones mutantes muestran cual es el factor transcripcional responsable de los efectos de *Shh* durante el desarrollo de la extremidad. Los ratones que no expresan *Shh* tienen el estilopodo normal, solo se forma el radio del zeugopodo y únicamente hay un dedo en la extremidad trasera mientras que la delantera no tiene ninguno. En las extremidades de éstos mutantes se observa que GLI3R se distribuye en todo el eje antero-posterior (Litingtung et al., 2002). En la mutación de Extra-toes (Xt) se observa polidactilia asociada con la pérdida del gen de *Gli3* debido a una deleción génica, en estos embriones se observa la expresión ectópica de *Shh* en la región anterior y se modifica el gradiente de GLI3A:GLI3R (Hui and Joyner, 1993; Maynard et al., 2002; Schimmang et al., 1992). Lo anterior sugiere que la presencia de *Shh* es el elemento clave en la generación de polidactilia, sin embargo el ratón mutante que no expresa *Shh* y *Gli3* (*Shh*^{-/-}; *Gli3*^{-/-}) aún desarrolla polidactilia (Litingtung et al., 2002; te Welscher et al., 2002), lo cual indica que *Shh* principalmente previene el procesamiento de GLI3.

El circuito descrito anteriormente muestra como se establecen las señales pero no explican como inicia la expresión de *Shh*. Algunos estudios indican que el dominio de expresión de *Shh* podría estar especificado por el factor de transcripción *dHand2*, el cual se expresa en la PLM y se restringe a la región posterior de la extremidad a los

9,25 días en el ratón, unas cuantas horas antes que la expresión de *Shh* (Galli et al., 2010). La eliminación de la expresión de *dHand2* en las extremidades de embriones de ratones y en las aletas de los peces cebra impiden que *Shh* se exprese, en contraparte la expresión ectópica de *dHand2* en la región anterior induce a *Shh* y genera polidactilia (McFadden et al., 2002). La sobre-expresión de *dHand2* en todo el mesénquima de la extremidad produce que se duplique la ulna, y los dedos 5, 4 y formando 2 extremidades como si se proyectaran en un espejo (Charite et al., 2000). Sin embargo, la regulación de *dHand2* hacia *Shh* no es directa, al parecer requiere de los genes *Hoxd* localizados en la región 5'(5'- *Hoxd*); los cuales pueden unirse directamente a las secuencias de DNA activadoras de *Shh* (Zeller et al., 2009). A su vez la expresión de *dHand2* y de 5'- *Hoxd* es regulada negativamente por GLI3R (Robert and Lallemand, 2006). También se ha reportado que el RA regula la expresión de *dHand2* promoviendo la correcta localización de la ZPA (Mic et al., 2004).

A diferencia de la AER, las células de la ZPA si forman parte de los elementos de la extremidad. Utilizando dos estrategias basadas en inserciones de reporteros en el gen de *Shh* o bien en el gen de respuesta a éste (*Gli1*), dos grupos de investigación realizaron mapas de destino de las células que alguna vez estuvieron sometidas a la señalización por *Shh* y observaron que las células que forman la ZPA constituyen el 30% del dedo 3, la totalidad del dedo 4 y 5; y un tercio de la ulna. Estos resultados sugieren que el dedo 2 y el 70% del dedo 3 requieren de la difusión o transporte de *Shh* (Ahn and Joyner, 2004; Harfe et al., 2004). Esta última observación ya había sido descrita en un ratón transgénico que expresa constitutivamente una versión de *Shh* a la que no se le puede pegar el colesterol, esto genera que la proteína de *Shh* difunda menos y en consecuencia en el ratón no se forman los dedos 2 y 3 (Lewis et al., 2001). El único que es independiente de la señalización de *Shh* es el dedo 1. Estos mismos estudios muestran que también el tiempo de exposición y concentración de *Shh* indica que dedo se forma; una alta concentración hace que se formen dedos más anteriores, mientras que una baja y prolongada genera dedos

más posteriores (Ahn and Joyner, 2004; Harfe et al., 2004). Estos datos sugieren que *Shh* promueve las identidades de los dedos a través de una combinación de mecanismos que involucran la especificación, la supervivencia y la proliferación. Esta última observación se comprobó al observar que la inhibición de la señalización de *Shh* en las extremidades de pollo, reduce la proliferación de las células y, como el tiempo de exposición a *Shh* es corto, se impide la formación de los dedos posteriores. Por el contrario, bloquear la proliferación pero mantener la señalización de *Shh* lleva a que se formen dedos posteriores (Towers et al., 2008). En el embrión de ratón se llegó a una conclusión diferente, al inactivar *Shh* en etapas puntuales de desarrollo observan que la secuencia de los dedos que se pierden no corresponde con lo predicho por la teoría del morfógeno, más bien refleja el orden en que se condensan los dedos. Este estudio concluye que los mecanismos están temporalmente desacoplados, al parecer *Shh*, primero produce la especificación de los progenitores de los dedos y posteriormente promueve la proliferación de éstos (Zhu et al., 2008).

Las proteínas de *Shh* y de *GLI3R* interactúan con otras moléculas provenientes de la AER formando un circuito de retroalimentación positivo entre éstos dos centros, conectando el establecimiento de patrones en los dos ejes. La expresión de *Fgf4* depende de *Shh* ya que regula positivamente la expresión de *Gremlin*, un antagonista de los *Bmps*, en las células aledañas a la ZPA. Los *Bmps* son reguladores negativos de la función de la AER y en ausencia de *Gremlin* la expresión de *Fgf4* disminuye (Kuhlman and Niswander, 1997). En los embriones de ratones mutantes en *Shh* la expresión de *Fgf4*, de *Fgf9* y de *Fgf17* no se mantiene y la expresión de *Fgf8* disminuye drásticamente (Chiang et al., 2001; Sun et al., 2000; Zuniga et al., 1999), mientras que en los ratones que no expresan ni el *Fgf4* ni el *Fgf8* se observa que no hay expresión de *Shh* y de *Ptch* en las extremidades traseras que son las más afectadas (Sun et al., 2002). Por su parte *GLI3R* regula negativamente la expresión de *Gremlin*, provocando que su RNAm se distribuya en forma de gradiente siendo mayor en la región posterior y menor en la anterior (Litington et al., 2002; te

Welscher et al., 2002). Este circuito de regulación se termina debido a que los niveles de *Fgf8* y de *Fgf4* estimulados por el circuito de Shh-Gremlin funcionan de forma negativa para reprimir a *Gremlin*, y debido al crecimiento inherente de la extremidad las células descendientes de *Shh* son refringentes e incapaces de inducir la expresión de *Gremlin*, éstas dos alteraciones moleculares inician con un circuito de regulación negativa entre el *Fgf* y *Gremlin*. Se piensa que éstos dos circuitos de retroalimentación positiva y negativa son los responsables de regular el crecimiento de la extremidad (Verheyden and Sun, 2008).

1.1.3.2. Los centros de señalización secundarios en la especificación Antero-Posterior.

Cada dedo de la extremidad posee un número de falanges perfectamente definido, este patrón no está inherentemente determinado en cada condensación condrogénica sino que se establece durante los últimos pasos de formación del autopodo (Dahn and Fallon, 2000). En este punto *Shh* ya no tiene influencia directa, ya que su papel en la especificación ocurrió en etapas tempranas (Zhu et al., 2008).

Los experimentos de trasplante o eliminación de las regiones interdigitales producen transformaciones homeóticas de los dedos anteriores hacia un destino más posterior; esto ocurre porque los interdógitos sintetizan moléculas como los *Bmps* que influyen a las células que formarán los dedos (Dahn and Fallon, 2000). La zona que es más sensible a las señales producidas por el interdígito es la Región Formadora de Falanges (PFR), la cual se ubica en la parte distal del dedo, justo por debajo de la AER, es parte del mesénquima indiferenciado que irá formando cada falange. Se reportó que cada PFR expresa niveles específicos de *Smad1/5/8*, los cuales están asociados con la identidad de cada dedo, siendo mayor el nivel de las *Smad* en los dedos posteriores y menor en los anteriores. La inducción de transformaciones homeóticas a través de intercambiar los interdógitos, modifica el nivel de actividad de éstos factores hacia la identidad que dicta el nuevo interdígito. Los interdógitos entonces, actuarían como centros de señalización secundarios

produciendo los Bmps, tal vez *Bmp5*, *Bmp6*, *Gdf5* ó *Gdf6*, que especifican los niveles de Smad1/5/8 de cada PFR (Suzuki et al., 2008).

1.1.4. El eje dorso-ventral.

Los modelos actuales sugieren que las señales que regulan la polaridad dorsal residen en el mesénquima de la PLM mientras que la información ventral proviene del mesodermo medial somítico. Posteriormente esta información es transferida hacia el ectodermo por un mecanismo que hasta el momento se desconoce. Los experimentos en los que se rota el ectodermo 180° muestran que el mesénquima de la extremidad se invierte, localizando el lado ventral hacia arriba y el dorsal hacia abajo, lo cual indica que el ectodermo produce señales necesarias para la polaridad. El primer paso en la especificación dorso-ventral es la expresión del receptor *Bmpr1a* en el ectodermo ventral; no se sabe exactamente cuales podrían ser sus ligando pero se propone que *Bmp4* ó *Bmp7* podría mediar esta función. *Bmpr1a* en el ectodermo regula la expresión de (*englailed*) *En-1*, el cual es suficiente para dictar una identidad ventral al mesénquima de la extremidad y para reprimir la expresión de *Wnt7a* que es un factor dorsalizante (Loomis et al., 1998). Por el contrario, la identidad dorsal inicia con la represión de los genes ventralizantes como *En-1* por parte de *Wnt7a*, el cual a su vez dirige la expresión diferencial de *Lmx1b* en el mesénquima dorsal. Los embriones de ratones que no expresan β -catenin ó *Wnt7a* ó *Lmx1b* tienen dos partes ventrales del mesénquima mientras que eliminar la expresión de *Bmpr1a* o de *En-1* en el ectodermo genera una extremidad con dos partes dorsales (Ahn et al., 2001; Soshnikova et al., 2003; Wang et al., 2004). Es interesante observar que la expresión de *Lmx1b* modifica las propiedades adhesivas de las células y promueve la segregación entre las células que formarán parte del compartimento dorsal respecto a las que formarán el ventral (Qiu et al., 2009).

1.1.5. La muerte celular durante el desarrollo de la extremidad.

1.1.5.1. La Muerte Celular Programada (PCD).

El término PCD se refiere al proceso de eliminación de células que ocurre en forma programada y en patrones definidos durante la formación de un organismo. No

obstante, frecuentemente se utiliza para referirse al conjunto de eventos que culminan en la muerte de células específicas, si bien la definición más correcta a este fenómeno es muerte celular fisiológica ya que no siempre ocurre en forma programada. Durante el desarrollo del embrión, la PCD ocurre siempre en los mismos sitios, es genéticamente regulada, requiere del gasto de energía y se produce de tal forma que la células vecinas no se ven afectadas. Se le han atribuido diferentes funciones a la PCD como la de controlar el número de células que se produjeron en exceso, eliminar las células que podrían ser dañinas para el organismo y el esculpir o dar forma a los tejidos vía la eliminación de algunas estructuras transitorias (Conradt, 2009). La PCD de acuerdo a la morfología que adquieren las células cuando están muriendo y a la maquinaria molecular que participa se ha clasificado en tres tipos: PCD tipo I o la apoptosis, la PCD tipo II ó muerte celular autofágica, y la PCD tipo III o lisosomal, que en ocasiones se considera como un subtipo de la muerte autofágica (Clarke, 1990).

La apoptosis es el proceso que ocurre con mayor frecuencia durante el desarrollo del embrión. Las células que mueren bajo este mecanismo presentan una serie de cambios morfológicos entre los que se incluyen el encogimiento celular, la aparición de ondulaciones en la membrana, la condensación de la cromatina, la fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos y su engullimiento por células especializadas como los macrófagos. A nivel molecular, la apoptosis se caracteriza por la exposición de fosfatidilserina y la activación de proteasas como las caspasas, encargadas de activar la degradación de muchos componentes de la célula. El proceso de apoptosis puede dividirse en tres fases: la activación, la ejecución y la degradación de la célula. La apoptosis puede activarse por diferentes estímulos; se piensa que no existen vías de señalización que bajo cualquier circunstancia conduzcan a la apoptosis, más bien, el proceso de activación depende del contexto en que se encuentra la célula. Se desconocen con precisión las condiciones que favorecen la apoptosis in vivo, sin embargo algunos oncogenes de la familia de Myc, logran activar la apoptosis bajo condiciones donde las células no pueden proliferar (Meyer et al., 2006), lo que indica que el ambiente y la situación celular son importantes. Una visión alterna

indica que la activación de la apoptosis se produce por la pérdida del balance en la célula entre las señales de supervivencia y las pro-apotóticas recibidas (Matsuzawa and Ichijo, 2001).

El proceso de ejecución de la apoptosis está ligado a la activación de las caspasas, las proteasas que producen la mayoría de las modificaciones morfológicas y bioquímicas de la apoptosis (Riedl and Salvesen, 2007). Existen dos rutas muy bien descritas que activan a las caspasas. La vía extrínseca se promueve por la unión de un ligando a su receptor localizado en la membrana plasmática (i.e. Fas y TRAIL), lo que provoca la formación de un módulo para el reclutamiento en el lado intracelular de diferentes moléculas que activan a la caspasa-8. La ruta intrínseca inicia con la liberación del citocromo c de la mitocondria debido a un aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial ('Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization', MOMP) (Penalzo et al., 2008). En el citosol, el citocromo c actúa como un co-factor que permite la oligomerización de Apaf-1, y ambos forman una plataforma de señalización llamada el apoptosoma que conduce a la activación de la caspasa-9 (Riedl and Salvesen, 2007).

La MOMP se produce por estrés apoptótico, el cual está temporalmente determinado por la acumulación de diferentes proteínas celulares como abajo se detalla. La mayoría de las proteínas anti-apoptóticas de la familia de Bcl2 (Bcl2, Bclxl y Mcl1), residen en la membrana externa de la mitocondria y mantienen su integridad a través de unirse a los elementos pro-apoptóticos de esta misma familia. Existen dos tipos de elementos pro-apoptóticos de la familia de Bcl2: las proteínas efectoras como Bax y Bak que forman oligómeros y se unen directamente a los miembros anti-apoptóticos; mientras que los tipo BH3-only (Bad, Bid, Bim, Noxa, Puma) impiden la unión de Bax con Bcl2 y con la consecuente formación de los oligómeros de las proteínas efectoras. El estrés apoptótico puede producirse debido a diferentes estímulos que promuevan que las proteínas efectoras aumenten su concentración ó modifiquen su localización citosólica hacia la membrana mitocondrial, o vía un incremento en la concentración de las proteínas BH3-only

(Chipuk et al., 2010). Cuando se activa la caspasa-9 a su vez procesa a la caspasa-3, la caspasa-6 y la caspasa-7, las cuales se conocen como caspasas ejecutoras.

Las nucleasas de AIF y endo-G se liberan de la mitocondria cuando se forma el MOMP y viajan hasta el núcleo donde ejercen sus funciones. No requieren de las caspasas para su activación, por lo que en ocasiones se dice que participan en la apoptosis-independiente de caspasas (Joza et al., 2001; Li et al., 2001). Otra nucleasa, de nombre CAD reside en el citoplasma y es constitutivamente inhibida por la proteína ICAD, cuando inicia la apoptosis, la caspasa-3 corta a ICAD inactivándola y permitiendo que CAD se movilice al núcleo. Las nucleasas provocan la condensación de la cromatina y procesan el DNA genómico en fragmentos más pequeños ayudando a su compactación. Esto ocurre en dos pasos, en el primero AIF y CAD cortan el DNA en fragmentos de 50 a 300 kb de largo y en el segundo CAD y endoG siguen procesando el DNA generando fragmentos casi del tamaño de un nucleosoma (Widlak and Garrard, 2009).

La célula en apoptosis se separa de las vecinas y del sustrato al que esta anclada, generalmente la matriz extracelular; en su membrana se forman ondulaciones al parecer porque la célula pierde agua. Estas ondulaciones membranales ayudan a que la célula se fragmente en pedazos más pequeños denominados cuerpos apoptóticos. Para evitar la generación de respuestas inmunes semejantes a la inflamación, los cuerpos apoptóticos son fagocitados por los macrófagos o bien por células no especializadas. El proceso de fagocitosis se desarrolla en cuatro pasos: a) la producción de señales por la célula apoptótica para reclutar a los macrófagos; b) el reconocimiento de la célula apoptótica por los macrófagos; c) la internalización de los cuerpos y la reorganización del citoesqueleto del macrófago y d) la degradación del cuerpo engullido. La célula apoptótica secreta al medio extracelular lisofosfatidilcolina (LPC) y nucleótidos como el ATP y el UTP que actúan como quimio-atrayentes del macrófago. Adicionalmente el cuerpo apoptótico expone en la membrana moléculas que median el reconocimiento por el macrófago. Algunas de éstas señales son específicas del tipo celular y otras funcionan como moléculas de

andamiaje producidas por el macrófago para facilitar la unión. La señal más estudiada es la exposición en la membrana plasmática de fosfatidilserina por la célula apoptótica (van den Eijnde et al., 1997). En condiciones fisiológicas este fosfolípido reside en el lado intracelular de la membrana plasmática y de forma espontánea puede exponerse al lado extracelular, sin embargo, la enzima de nombre amino-fosfolípido-translocasa la regresa a su localización fisiológica. Cuando se activa la apoptosis, la caspasa-3 inactiva a esta enzima, provocando que la fosfatidilserina se exponga en el lado extracelular constitutivamente. Una vez que se produce el reconocimiento del cuerpo apoptótico por el macrófago este último tiene que remodelar el citoesqueleto para lograr el engullimiento. Esto se logra debido a la activación de diferentes miembros de proteínas que hidrolizan GTP. Entre las más estudiadas se encuentran Rac y RhoA. La proteína de RhoA tienen efectos negativos en el engullimiento a través de inhibir a ROCK. La proteína de ROCK es una cinasa que fosforila a la miosina promoviendo la contracción de la célula y su movilidad. Por el contrario, Rac incrementa el engullimiento a través de formar ondulaciones en la membrana que facilitan la ingesta. La proteína de Rac se activa por la formación de un complejo de proteínas en la membrana plasmática entre las que se encuentran ELMO1, CRKII y DOCK180 (Ravichandran and Lorenz, 2007).

Después del engullimiento se ha observado un incremento en la actividad lisosomal, esto podría ser una respuesta metabólica para digerir los fragmentos del cuerpo apoptótico. En muchas regiones del embrión se ha visto que correlacionan perfectamente los sitios en los que se ha observado apoptosis con una alta actividad lisosomal (Zucker et al., 1999; Zucker et al., 1998). Entre las últimas respuestas que el macrófago realiza se encuentran el reciclaje de los componentes ingeridos; se desconoce como lo logra, sin embargo, debe ser un proceso desencadenado por la célula apoptótica, ya que se ha observado que posterior al reconocimiento de la célula apoptótica por el macrófago se promueve que el exceso de colesterol acumulado por la ingesta se exporte al exterior del fagocito (Ravichandran and Lorenz, 2007).

En la PCD tipo II ó muerte celular autofágica la célula engulle los componentes de su citoplasma en vesículas de doble membrana las cuales se fusionan con los lisosomas en donde ocurre la degradación. Este proceso esta regulado por un conjunto de moléculas a las que se denominan genes Atg. Los mejores ejemplos de este tipo de muerte dentro de la PCD se observan en el embrión de *Drosophila melanogaster*, y hasta el momento en los mamíferos no existen evidencias de algún tejido que requiera preferentemente de la autofagia en condiciones fisiológicas para su degeneración; por lo que no se ahondará más al respecto (Melendez and Neufeld, 2008).

1.1.5.2. Las regiones de PCD en la extremidad embrionaria.

En el transcurso de la formación de la extremidad aparecen tres regiones muy bien definidas de PCD. Aunque originalmente se describió como necrótica, la muerte celular que se observa durante el desarrollo de la extremidad es del tipo apoptótica, sin embargo, el término se sigue utilizando por razones históricas. La primer zona de muerte celular se observa en la etapa 21 de HH en la extremidad del pollo, en la región del mesénquima anterior y se identifica como la Zona Necrótica Anterior ('Anterior Necrotic Zone', ANZ), esta zona se extiende hacia la región del mesénquima distal coincidente con la AER. La máxima detección de ésta zona se observa en la etapa 23 de HH y después desaparece. Esta zona tiene su equivalente en el embrión de ratón a los 11 dpc, sin embargo, se localiza en una posición más proximal respecto a la ANZ del embrión de pollo. Posteriormente, en el embrión de pollo de las etapas 22 de HH hasta las etapas 26 de HH se detecta una pequeña región de células muriendo en el mesénquima central, en la zona donde se formarán las condensaciones condrogénicas de la ulna y el radio. Este grupo de células apoptóticas se denomina Parche Opaco ('Opaque Patch', OP). En el embrión de ratón no se había descrito esta zona, sin embargo, ahora se sabe que es una región muy extensa que inicia en el zeugopodo y penetra hasta la región proximal del autopodo. Esta región aparece a los 10,5 dpc y persiste hasta los 12 dpc (Fernandez-Teran et al., 2006). En la etapa 23 de HH se observa que en el ala del embrión de pollo

aparece otra área de muerte en la región posterior del mesénquima denominada Zona Necrótica Posterior ('Posterior Necrotic Zone',PNZ). No existe un equivalente de ésta zona en la extremidad del embrión de ratón (Fernandez-Teran et al., 2006). En la etapa 31 de HH del embrión de pollo y a los 13,5dpc en el embrión de ratón, surge la Muerte Celular Interdigital ('Interdigital Cell Death', ICD), la cual es la más prominente de todas, y se observa en el mesénquima entre los dedos que se están formando (i.e., regiones interdigitales) (Montero and Hurle, 2010).

La ICD es la muerte celular que más se ha estudiado, probablemente porque representa una zona muy amplia y además se presenta en diversos organismos como el ratón, el pollo y el pato. No obstante, el inicio y progresión de la ICD es diferente entre las especies. En el embrión de pollo las primeras células que se mueren aparecen en el mesénquima del interdígito proximal separadas de las que surgen después en el mesénquima distal, posteriormente ambas áreas se unen para formar una zona común de muerte (Fernandez-Teran et al., 2006). Por el contrario, en el embrión de ratón, las primeras células en apoptosis se observan en el mesénquima del interdígito distal y se expanden uniformemente hacia la región proximal formando un triángulo invertido.

Una evaluación más detallada muestra que existen gradientes de apoptosis entre los ejes dorsal y ventral de la extremidad del embrión de ratón, siendo mayor el número de células que se mueren en el mesénquima ventral respecto al dorsal (Salas-Vidal et al., 2001). Este gradiente ventro-dorsal no se han detectado en la extremidad embrionaria del pollo, siendo la muerte celular más uniforme en ambos ejes (Fernandez-Teran et al., 2006).

No se sabe cuál es el significado fisiológico de éstas regiones de muerte, sin embargo, se piensa que la ANZ y la PNZ regulan el número de progenitores condrogénicos. Esta hipótesis surgió a partir de observar que las extremidades de algunos embriones del pollo mutantes como *talpid3*, desarrollan más dedos y no tienen ANZ ni tampoco PNZ (Hinchliffe and Ede, 1968). Por el contrario, en el embrión de pollo mutante *wingless* se observa que la muerte de éstas regiones es

más extensa y no se forman los dedos (Hinchliffe and Ede, 1973). La función de la ICD es más controversial, se propone que ocurre para que los dedos se separen ya que en algunas especies de animales como los murciélagos y los patos que tienen tejido interdigital no hay ICD ó es menor que la que ocurre en el embrión de ratón o del pollo (Merino et al., 1998; Weatherbee et al., 2006). Sin embargo, estudios más detallados muestran que la separación de los dedos ocurre por el crecimiento diferencial de los dedos y del interdígito, y por la ICD siendo éste último proceso el que menor contribución tiene en la separación (Salas-Vidal et al., 2001). Esta observación apunta a que la función de la ICD podría ser la de inhibir el crecimiento de las células interdigitales para permitir que los dedos crezcan.

1.1.5.3. Las interacción de factores durante la ICD de la extremidad.

Las moléculas que a continuación se describen se les ha relacionado con el proceso de ICD debido al fenotipo de sindactilia que generan. La sindactilia se refiere a la ausencia de separación de los dedos, sin embargo, esto puede ocurrir por muchos factores como son la ausencia de ICD; el desarrollo incorrecto de las estructuras del autopodo previo a que inicie la ICD ó bien por la falta de crecimiento de los dedos. Los fenotipos de sindactilia son muy variables, en unos casos se observa la presencia de una pequeña membrana en las regiones interdigitales como un triángulo invertido, mientras que en otros no hay membrana y los dedos permanecen unidos por una porción de tejido muy pequeña en las regiones laterales. En muy pocos casos se ha evaluado directamente la disminución o incremento en la ICD al sobre-expresar o inhibir la función de las moléculas que a continuación se enlistan.

a) Las Proteínas Morfogenéticas del Hueso (Bmps)

Los Bmps son parte de la gran familia de factores de nombre TGF- β , realizan sus función a través de unirse a los complejos que se forman entre dos tipos de receptores insertados en la membrana plasmática y poseen dominios intracelulares de serina-treonina cinasa. La vía de activación de los Bmps inicia con la unión del ligando al receptor tipo I (BMPRI), y la consecuente dimerización con el receptor

tipo II (BMPRII); la actividad de cinasa del receptor II es constitutivamente activa y cuando se une al BMPRI lo transfosforila en un dominio específico. El reclutamiento diferencial de moléculas en la región intracelular de estos receptores depende de muchos factores, no obstante existen dos vías básicas de transducción de señales. La vía que activa diferentes moléculas de señalización, por ejemplo, la MAPK p38. La otra ruta mediada por las Smads, es la mejor descrita e inicia con la fosforilación de las Smad regulatorias Smad1/5/8 por el receptor BmprI; una vez fosforilada se modifica su conformación haciéndose más afín a la Smad4 que es un factor común para todas las Smad. Cuando se forma el complejo de Smads su localización cambia del citosol al núcleo donde en cooperación con activadores o represores se ensambla en una gran variedad de promotores para regular la transcripción (Sieber et al., 2009).

Las proteínas Bmps fueron las primeras moléculas a las que se les atribuyó una función apoptótica (Merino et al., 1999). En la extremidad del pollo la expresión de los genes de *Bmp2* y de *Bmp4* coincide espacial y temporalmente con las regiones de la ANZ, la PNZ y con el mesénquima interdigital (Yokouchi et al., 1996). En la misma etapa en que ocurre la ICD se detecta la expresión de *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp5* y de *Bmp7* en el interdígito del pollo (Yokouchi et al., 1996; Zuzarte-Luis et al., 2004 (Laufer et al., 1997). Además, los tratamientos con BMP2, BMP4, BMP5 y BMP7 aplicado localmente inducen la muerte celular del mesénquima antes de que ocurra fisiológicamente de cualquiera de las regiones mencionadas (Ganan et al., 1996; Rodriguez-Leon et al., 1999; Zuzarte-Luis et al., 2004).

Existen dos genes del receptor *BmprI*; el *BmprIa* y *BmprIb*. Ambos se expresan en la extremidad en desarrollo del ratón y del pollo: *BmprIa* en el mesénquima en niveles muy bajos y en la AER; mientras que *BmprIb* se observa casi siempre en las zonas de condensación cartilaginosa y en la PFR ('Phalanges Forming Region') (Merino et al., 1999; Pajni-Underwood et al., 2007; Suzuki et al., 2008). La sobre-expresión en el mesénquima de una forma dominante negativa del receptor *BmprIa* inhibe la

muerte celular de la ANZ, de la PNZ, y de la ICD de la extremidad del embrión de pollo (Yokouchi et al., 1996). De forma similar, la sobre-expresión de un dominante negativo de *Bmpr1b* inhibe la ICD (Zou and Niswander, 1996). Complementariamente, la expresión de una forma constitutivamente activa de *Bmpr1b* promueve la muerte del mesénquima (Zou et al., 1997). A pesar de éstas observaciones es importante mencionar que ninguno de los dos receptores se expresa en las regiones interdigitales durante el proceso de ICD (Merino et al., 1999). Por otra parte, los efectos que se han observado debido a la sobre-expresión de las diferentes formas (i.e. constitutivamente activa ó dominante negativa) se realizó antes de que inicie la ICD, por lo que la participación de ambas moléculas directamente en éste proceso permanece aún sin resolverse.

Los efectos de los Bmps relacionados con la ICD son en su mayoría mediados a través de la fosforilación de las Smad, aunque también se observó que pueden activar la vía de p38 (Zuzarte-Luis et al., 2004). Para regular la señalización de los Bmps los tejidos sintetizan antagonistas fisiológicos que se unen a los Bmps e impiden su interacción con los receptores. En la extremidad en desarrollo se expresan *Noggin*, *Gremlin* y *Bambi*, quienes se unen con afinidades particulares a cada una de las proteínas de Bmp. *Noggin* se expresa en las condensaciones de cartílago en la extremidad del pollo y del ratón; al parecer su función no está relacionada con la ICD, sino con la regulación del tamaño y la forma de las condensaciones de cartílago (Brunet et al., 1998). *Gremlin* se expresa en las etapas tempranas de desarrollo en el mesénquima de la extremidad del pollo y del ratón, muy cerca de la región posterior y se piensa que indirectamente inhibe la muerte del mesénquima a través de mantener la expresión de los Fgfs en la AER en la extremidad del embrión de pollo y del ratón (Verheyden and Sun, 2008). *Bambi* es un antagonista diferente a los anteriores, ya que no se secreta, actúa como un pseudoreceptor secuestrando a los Bmps, se expresa en los mismos sitios en los que se detecta al *Bmp4* en la extremidad del ratón (Grotewold et al., 2001). Contrario a lo que hacen los Bmps, la aplicación de las proteínas de *Noggin* ó de *Gremlin* en los

interdígitos inhibe la ICD en la extremidad del embrión de pollo (Merino et al., 1999a; Rodríguez-Leon et al., 1999). Se piensa que la expresión fisiológica de éstos antagonistas en los interdígitos podría impedir o retrasar la activación de la muerte. Por ejemplo, en la extremidad del pato y en el ala de los murciélagos *Gremlin* se expresa abundantemente en el mesénquima interdigital y la ICD que hay es menor (Merino et al., 1999b; Weatherbee et al., 2006). Adicionalmente en la extremidad del pollo, *Gremlin* se expresa en las regiones interdigitales y cuando se inicia la ICD su expresión desaparece (Merino et al., 1999b). En el embrión de ratón se ha observado que de forma secundaria a la eliminación de la expresión de otras moléculas, incrementa la expresión de Bambi. En algunos de éstos embriones mutantes se observa una menor ICD, aunque aún no se analiza si esto está relacionado al incremento de expresión de Bambi (Grotewold et al., 2001; Pajni-Underwood et al., 2007).

A diferencia de la extremidad del pollo, en la del ratón se expresan *Bmp2* y *Bmp7* en el interdígito a los 12,5 y 13,5 días (Salas-Vidal et al., 2001). En esta misma etapa, *Bmp4* se expresa predominantemente en el ectodermo y en el mesénquima que subyace a éste (Pajni-Underwood et al., 2007). Sin embargo, un estudio muestra que la expresión de éstos factores se excluye de las áreas de apoptosis (Salas-Vidal, et al., 2001); es decir, la muerte de las células no se activa en los dominios de expresión de ambos genes. Los ratones mutantes podrían sugerir mayor información respecto al papel de los Bmps en la regulación de la muerte. La eliminación de *Bmp2* en el mesénquima de la extremidad genera sindactilia con los dedos unidos en las regiones laterales y se observa una menor ICD con una penetrancia variable, sin embargo si además en este fondo mutante se elimina *Bmp4* del mesénquima (*Bmp2*^{-/-}; *Bmp4*^{-/-}) el fenotipo se hace totalmente penetrante (Bandyopadhyay et al., 2006). Alternativamente, los Bmps podrían promover la muerte del mesénquima interactuando con otros genes. Se observó que al eliminar la región posterior del mesénquima de la extremidad, se muere el mesénquima anterior. Esta muerte se inicia con la acumulación de GLI3R y el incremento en la expresión de *Bmp4* en la

región anterior (Bastida et al., 2004). Por otra parte, otras moléculas podrían regular la expresión de los Bmps antes del inicio de la ICD, por ejemplo, se observó que la eliminación de *Rac1*, una de las enzimas que hidrolizan GTP, genera sindactilia en la extremidad del ratón y a este fenotipo se asocia una disminución de la expresión de *Bmp7* y de *Bmp2* en el interdígito (Suzuki et al., 2009).

b) Los Factores de Crecimiento de Fibroblasto (Fgfs)

A pesar de que son fuertes las evidencias que involucran a los Bmps como señales que regulan la ICD en el mesénquima, existen estudios alternativos que sugieren que sus efectos apoptóticos son indirectos. Está ampliamente reportado, que los componentes de la señalización de los Bmps, particularmente *Bmp2*, *Bmp4* y su receptor *Bmpr1a* también se expresan en el ectodermo distal de la extremidad embrionaria del ratón (Maatouk et al., 2009; Pajni-Underwood et al., 2007). Considerando este antecedentes, es probable que los Bmps promuevan la ICD a través de regular negativamente la expresión del *Fgf8* en el ectodermo. Esta hipótesis se generó a partir de una serie de observaciones derivadas de diferentes estudios: por ejemplo, un análisis de la expresión del *Fgf8* en diferentes etapas de desarrollo muestra que cuando se inicia la ICD, la expresión del *Fgf8* disminuye en el ectodermo de las regiones interdigitales (Salas-Vidal et al., 2001). Por otra parte, se reportó una disminución en la ICD asociada a la permanencia de la expresión del *Fgf8* de los embriones mutantes en los que se eliminó la expresión de *Bmpr1a* del ectodermo (Pajni-Underwood et al., 2007). Los ligandos de este receptor podrían ser *Bmp2* y *Bmp4*, ya que los embriones que no expresan ambos (*Bmp2*^{-/-}; *Bmp4*^{-/-}) en el ectodermo también tienen una menor ICD (Maatouk et al., 2009). Por otra parte, dos reportes independientes muestran que la sobre-expresión de Noggin en el ectodermo genera sindactilia y una menor ICD asociada a la persistencia de la expresión del *Fgf8* en el ectodermo (Guha et al., 2002; Wang et al., 2004). Asimismo la administración local de algunos FGFs, particularmente el FGF2 y el FGF4 inhiben la ICD de la extremidad del pollo (Macias et al., 1996). Dentro de la misma línea que sugiere que los Fgfs son factores de supervivencia, se observó que la sobre-

expresión del *Fgf4* en el ectodermo de los embriones produce polisindactilia y una menor ICD (Lu et al., 2006).

Todas éstas evidencias que en conjunto sugieren que los Fgfs, particularmente el *Fgf8* serían señales de supervivencia del tejido interdigital. No obstante, a los Fgfs también se les ha relacionado con una función apoptótica. Se observó que el FGF2, el *Fgf4* y el *Fgf8* inducen la muerte del mesénquima interdigital de la extremidad del pollo después de 48 horas a través de un mecanismo que es mediado por los Bmps y que requiere del receptor *Fgfr3* (Montero et al., 2001). Sin embargo, el significado fisiológico de éstas observaciones se desconoce ya que de los Fgfs reportados ninguno se expresa en el mesénquima interdigital del pollo durante ésta etapa.

c) El ácido retinoico (RA)

Otra molécula que induce apoptosis en diferentes regiones del embrión es el RA. El RA en altas dosis produce que se mueran las células del mesénquima distal de la extremidad (Yashiro et al., 2004). Por otra parte, se observó que el RA adicionado a cultivos de extremidades de embrión de ratón acelera la separación de los dedos (Lusier., et al., 1999). Muchos de los componentes de la señalización del RA como la *Raldh2*, los receptores $Rar\beta$, $Rar\gamma$ y $Rar\alpha$, se expresan en el mesénquima interdigital de la extremidad del ratón alrededor de las etapas en que ocurre la ICD (Dolle et al., 1990). Lo que sugiere que el mesénquima interdigital es competente para responder al RA. Sin embargo un análisis más detallado muestra que el receptor $Rar\beta$ no se expresa en las células del mesénquima interdigital que se mueren (Salas-Vidal et al., 2001). En la extremidad del embrión de pollo se observó que los tratamientos con el RA aplicado localmente inducen la muerte celular prematura del mesénquima, mientras que la ICD se reduce por la administración de un antagonista de los receptores del tipo RAR lo que revela la función fisiológica del RA (Rodriguez-Leon et al., 1999). Dentro de ésta propuesta se observó que el RA incrementa la expresión de *Bmp4* y de *Bmp7* y además que la co-administración de Noggin y de RA evita la muerte inducida por éste último. Observaciones que indican que los Bmps son los intermediarios de la señalización del RA (Rodriguez-Leon et al., 1999). Esta

hipótesis encuentra parcial sustento en el embrión de ratón, pues se disminuye la expresión de *Bmp7* y la ICD en las extremidades de ratones que carecen de *Rarβ* y *Rarγ* (*Rarγ*^{-/-}; *Rarβ*^{-/-}) (Dupe et al., 1999).

d) Los genes de *Msx1* y de *Msx2*

Los factores de transcripción de *Msx1* y de *Msx2* (*Msx1/2*) también se han involucrado en la ejecución de la ICD. Algunos reportes indican que los genes de *Msx1/2* se expresan alrededor de las etapas en que ocurre la ICD, en el mesénquima interdigital de la extremidad del pollo y del ratón. Sin embargo, en la extremidad del ratón se observó que la expresión de ambos genes precede al inicio de la ICD (Salas-Vidal et al., 2001). Muchas evidencias los relacionan con una participación en la muerte de las células. Por ejemplo, está reportado que la expresión de *Msx1/2* se incrementa cuando el RA y los BMP4/7 exógenos provocan la muerte del mesénquima interdigital (Rodriguez-Leon et al., 1999). Además, la sobre-expresión de *Msx2* induce la muerte del mesénquima de la región posterior de la extremidad (Ferrari et al., 1998). Sin embargo, la eliminación selectiva de cada gen no indica que regulen la ICD de forma fisiológica. Los ratones adultos que no expresan *Msx2* tienen los dedos separados (Satokata et al., 2000); al igual que los embriones de ratones que carecen de *Msx1* (Satokata and Maas, 1994). No obstante, los embriones de ratones que carecen de *Msx1/2* si sugieren su participación en la regulación de la ICD, ya que en ausencia de ambos genes (*Msx1*^{-/-}; *Msx2*^{-/-}) los embriones tienen sindactilia y una menor ICD (Lallemand et al., 2005). En el modelo original se propuso que éstos eran los últimos genes en la vía de activación de la ICD y dependían de la señalización de los Bmps. Sin embargo, la expresión de éstos genes es normal en los ratones mutantes que carecen simultáneamente de *Bmp2* y *Bmp4* en el mesénquima (Bandyopadhyay et al., 2006). Podrían éstos genes depender de los Bmps pero aquellos que se expresan en el ectodermo, ya que la expresión de *Msx2* disminuye en los embriones que no expresan *Bmp2* y *Bmp4* en el ectodermo (Maatouk et al., 2009).

1.1.5.4. Los factores intrínsecos que participan en la ICD.

Ahora bien, se desconoce como todas éstas señales activan a la maquinaria apoptótica. Los embriones de ratones que no expresan las caspasas de la vía intrínseca como la caspasa-9, la caspasa-3, la caspasa-7 y la caspasa-6 tienen los dedos separados aunque la ICD directamente no se ha evaluado (revisado en Montero and Hurle, 2010). Esto podría reflejar la redundancia que existen entre las diferentes caspasas ó podrían desencadenarse mecanismos compensatorios de muerte celular. Por ejemplo, en los embriones de ratones que no expresan el regulador de la apoptosis *Apaf* (*Apaf*^{-/-}) se describió una muerte celular parecida a la necrosis en lugar de la ICD apoptótica (Chautan et al., 1999). En el embrión de pollo se determinó que la ICD no se inhibe por fármacos de amplio espectro que bloquean a las caspasas (Zuzarte-Luis et al., 2006). Se ha propuesto que en la extremidad del pollo se activan otros tipos de muerte celular alternativa a la apoptosis como la muerte celular autofágica y la muerte lisosomal. (Montero et al., 2010; Zuzarte-Luis et al., 2007). Los estudios anteriores se realizaron en un sistema *in vitro*, mediante cultivos de extremidades del pollo por lo que aún tendrían que validarse éstas observaciones en el embrión del pollo *in vivo*.

Durante el desarrollo de la extremidad el gen anti-apoptótico de Bcl2 se expresa en los condensaciones condrogénicas de los dedos (Dupe et al., 1999). Por su parte, el gen de Bax se expresa en el mesénquima interdigital. La progresión de la ICD requiere, por lo menos en parte, de la función de los genes pro-apoptóticos de *Bax* y de *Bak*, así como de la proteína BH3-only Bim. Esto se deduce al observar que en los ratones adultos en los que se elimina *Bax* y *Bak* (*Bax*^{-/-}; *Bak*^{-/-}) (Lindsten et al., 2000) ó bien *Bax* y *Bim* (*Bax*^{-/-}; *Bim*^{-/-}) se desarrolla el fenotipo de sindactilia (Hutcheson et al., 2005). No obstante, en los embriones de éstos ratones mutantes no se ha evaluado la ICD, por lo que aún resta por saber si sus efectos son directos.

Durante el proceso de apoptosis la célula se separa de su sustrato, principalmente la matriz extracelular. Son pocos los ejemplos en donde se ha evaluado la relación que

guarda este proceso con la morfogénesis de los tejidos. Sin embargo, se reportó que se requiere de la degradación de los componentes de la matriz extracelular durante la ICD de la extremidad del ratón para que se separen los dedos. Se propuso que las metalo-proteasas ADAMTS5, ADAMTS9 y ADAMTS20, crean ambientes permisivos para que ocurra la ICD a través de mantener un umbral de las proteínas procesadas de la matriz extracelular como el versicano. En ausencia de ciertas combinaciones alélicas de ADAMTS5, ADAMTS9 y ADAMTS20 no se detecta la forma procesada del versicano en los interdígitos del embrión de ratón y se produce sindactilia y una menor ICD (McCulloch et al., 2009). Esta observación en principio interesante, no parece cumplirse en todos los casos, ya que los mismos autores muestran que algunos inductores de la apoptosis del mesénquima como los Bmps matan a las células sin necesidad de procesamiento del versicano lo que pone en entredicho la validez de su modelo. Por otra parte, algunos estudios muestran que en ausencia de la señalización del RA y en condiciones donde la ICD es menor como ocurre en el embrión mutante $Rar\beta^{-/-}$; $Rar\gamma^{-/-}$; se disminuye la expresión de algunas enzimas que degradan la matriz como Stromelysin-3 (Metaloproteínasa 11) (Dupe et al., 1999). Sin embargo, el significado funcional de ésta observación se desconoce.

Respecto a la regulación de la fagocitosis durante la ICD se sabe muy poco. Existen algunos embriones transgénicos donde es posible visualizar los macrófagos en el interdígito debido a la expresión de marcadores de la membrana plasmática acoplados a proteínas fluorescentes (Rae et al., 2007). Sin embargo, se ha visto que en ausencia de los macrófagos las mismas células mesenquimales engullen a las células apoptóticas del mesénquima. Lo que sugiere que otros tipos celulares pueden tener la capacidad de fagocitar (Wood et al., 2000).

1.2. La evolución de la extremidad.

El origen de la extremidad fue un evento que definió la evolución de los tetrápodos. El par de extremidades delanteras y traseras que poseen los amniotas tienen su origen evolutivo en las aletas pélvicas y pectorales de los primeros vertebrados agnathos (gnathostomados) (Boisvert, 2005). La transición de aletas a extremidades

ocurrió en el devónico tardío con el surgimiento de los dedos, un nuevo grupo de estructuras en los ancestros de los tetrápodos. Estas extremidades poseían 6, 7, 8 ó más dedos (Freitas et al., 2007). Los estudios comparativos del desarrollo muestran que las mismas interacciones génicas y procesos que guían el inicio del desarrollo, el crecimiento y el establecimiento de patrones de la extremidad del ratón y del pollo dirigen la morfogénesis de las aletas del pez cebra (Mercader, 2007). Por ejemplo, el circuito de retroalimentación que se forma entre *Shh* y los *Fgfs* se observa en la aleta pectoral del pez, aunque con algunas diferencias funcionales. Las moléculas como el RA, el *Fgf10* y *Tbx5* realizan la misma función en las aletas ó extremidades de los vertebrados (Mercader, 2007). Lo anterior sugiere que la morfogénesis de la extremidad es un proceso antiguo en términos evolutivos (Zeller et al., 2009). Sin embargo, existen algunas diferencias a nivel molecular y celular entre la aleta y la extremidad, mismas que podrían explicar las diferencias morfológicas entre ambas estructuras. Por ejemplo, en la aleta la AER es una estructura de vida muy corta, poco tiempo después de su surgimiento crece y se modifica convirtiéndose en un pliegue ectodermal apical. Se ha propuesto que esta transición es la razón de porque el esqueleto de la aleta es más corto que el de una extremidad (Freitas et al., 2007).

2. Hipótesis.

El Fgf8 y el RA señalizan antagónicamente durante la activación de la ICD de la extremidad del ratón.

3. Objetivos.

3.1. Objetivo General

Analizar si el Fgf8 y el RA tienen funciones antagónicas en la activación de la ICD de la extremidad del ratón.

3.2. Objetivos Particulares.

1. Determinar si el Fgf8 funciona como un factor de supervivencia del tejido interdigital de la extremidad embrionaria del ratón.
2. Observar si el RA regula fisiológicamente la ICD de la extremidad del ratón.
3. Determinar si el Fgf8 regula los elementos de la señalización del RA durante la ICD de la extremidad del ratón.
4. Observar si el RA regula los componentes de la señalización del Fgf8 durante la ICD de la extremidad del ratón.
5. Analizar la participación de los Bmps como moléculas ejecutoras del proceso de ICD de la extremidad embrionaria del ratón.

4. Materiales y Métodos.

4.1. Animales

Se utilizaron hembras de ratones preñados de la cepa CD-1. Se consideró como el día 0.5 de gestación el siguiente día en el cual se encontró el tapón vaginal. Las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical y se extrajeron los embriones de 13,5 días y de 12,5 días de gestación.

4.2. Cultivo de las extremidades

Los embriones se extrajeron del útero utilizando un microscopio óptico estándar. Los embriones se extraen del saco amniótico utilizando pinzas de disección y se cortan las extremidades traseras y/o delanteras con unas tijeras de disección finas, se observan y se clasifican de acuerdo al sistema de Wanek (Wanek et al., 1989). Solo se utilizaron las extremidades de las etapas de S8 y de S9, las cuales se mantienen hasta su cultivo en 3mL de medio de disección L-15 (Microlab, México). Las extremidades se cultivaron sobre filtros Millipore (Millipore, USA) en cajas de 4 pozos (Nunc, USA) con 1mL de medio de cultivo DMEM (Gibco) y se mantuvieron en una incubadora a 37°C con humedad controlada y 5% CO₂. En los casos en que fue requerido se adicionaron al medio de cultivo los siguientes reactivos con sus respectivas concentraciones: RA 10µM(Sigma-Aldrich, USA), SU5402 50µM

(Calbiochem, USA), LY294002 35-50 μ M (Calbiochem, USA), Dorsomorphin 15 μ M (Calbiochem, USA), Dynasore 50 μ M (Calbiochem, USA), NEM 10 μ M (Sigma-Aldrich) UO126 (50 μ M, Calbiochem, USA).

4.3. Implantación de esferas en las extremidades de ratón.

En las extremidades en las que se insertó una esfera se realizó de la siguiente forma: con unas pinzas se toma la extremidad y se coloca sobre una base de caucho y sobre ella se agrega una gota de medio de disección. Con una aguja de tungsteno se hace una incisión en el interdígito, se toma la esfera con una pinza de disección fina y se inserta en la incisión empujándola con la aguja de tungsteno. Después de este tratamiento las extremidades se cultivan sobre los filtros.

4.4. Implantación de esferas en los embriones de pollo.

Los huevos de gallina libres de patógenos se mantuvieron en una incubadora a 37°C con movimiento moderado. En la parte superior se removió una pequeña parte de cascaron y se rompieron las membranas internas para exponer la extremidad más cercana del embrión. Se toma la extremidad trasera con una asa y con una aguja de tungsteno se realiza una pequeña incisión en el tejido interdigital, se toma la esfera con unas pinzas finas y se inserta en el tejido empujándola con la misma aguja o con la punta de la pinza. Se acomodan las membranas del embrión y se coloca un pedazo de cinta adhesiva transparente en la parte superior para cubrir el orificio que se hizo en el cascarón. Después del tratamiento los embriones se incuban nuevamente a 37°C por el tiempo deseado.

4.5. Infección de las extremidades de ratón con los Adenovirus Noggin-GFP y GFP.

Posterior a la disección, las extremidades se mantuvieron en medio L-15. Dentro de una caja bacteriológica se colocó un pedazo de papel ahulado (Parafilm) y sobre éste se colocaron 3 gotas de 20 μ L de c/u de los sobrenadantes de los adenovirus. Se tomaron las extremidades evitando llevarse la menor cantidad de líquido y se

sumergieron en las gotas de adenovirus; las extremidades derechas se sumergieron en el adenovirus-GFP mientras que las extremidades izquierdas en el adenovirus-Noggin-GPF. Se mantuvieron durante 1 hora en una incubadora a 37°C con 5% de CO₂ y después de esta hora se adicionaron otros 10µL de los respectivos adenovirus sobre cada extremidad. Se incubaron por una hora adicional. Después de las 2 horas de infección se cultivaron las extremidades de forma similar a lo descrito arriba, sin embargo, al medio de cultivo se adicio no 10% de Suero Fetal Bovino.

4.6. Tinciones de la extremidad usando el Anaranjado de Acridina (AO), Lysotracker (LT) y con Rojo Neutro (NR).

1. Después del cultivo las extremidades se sumergen en las respectivas soluciones de tinción:

- a. Solución de tinción de AO: 1µg/mL de AO (Sigma-Aldrich) en PBS
 - b. Solución de tinción de NR: 1µg/mL de NR (Sigma-Aldrich) en PBS
 - c. Solución de tinción de LT: 1µM del la solución stock (Invitrogen) en 1mL de PBS
2. Se mantienen en una incubadora a 37°C por 15 minutos
3. Lavar 2 veces con PBS precalentado a 37°C.
4. De todas las tinciones anteriores solo el LT se puede fijar con paraformaldehído al 4% y observarlas posteriormente. Las extremidades teñidas con el AO y el NR requieren observarse y fotografiarse inmediatamente en un microscopio de fluorescencia.

4.7. Inmunohistoquímica en cortes de tejido de muestras embebidas en Paraplast

1. Las extremidades se fijan en PFA al 4% toda la noche a 4°C
2. Se hacen 2 lavados con PBS por 5 minutos c/u.
3. Se deshidratan en una serie de etanol-PBS con porcentajes crecientes (50%) durante 30 minutos cada cambio a TA
4. Se agrega una mezcla de etanol-xilol en un volumen de 1:1 por 30 minutos
5. Se sumergen en xilol por 30 minutos

6. Se colocan en una mezcla de xilol- paraplast 1:1, después una mezcla de xilol: parafina 1:2 durante 30 minutos a 60°C
7. Sumergir en paraplast toda la noche a 60°C
8. Al siguiente día se elimina el paraplast y se agrega más recién fundido, las extremidades se vierten y acomodan en moldes de metal colocados sobre una plancha caliente a 60°C para impedir la solidificación del paraplast
9. Una vez que se han orientado correctamente los tejidos, se quitan de la plancha caliente y se colocan en una superficie a TA y se permite que se solidifiquen durante al menos 1 hora
10. Posteriormente se saca el bloque de paraplast que contiene el tejido del molde de metal y con una navaja se corta alrededor del tejido formando una pirámide, a fin de dejar solo el paraplast en el que esta embebida la extremidad.
11. La pirámide de tejido se pega con paraplast sobre las bases de plástico y se le permite que se solidifique
12. Los bloques de tejido se cortan en un microtomo haciendo rebanadas de 10µM de grosor, cada corte se toma con un pincel fino y se coloca en un molde con agua con una temperatura de 42°C
13. Los cortes se adhieren a porta-objetos los cuales han sido tratados previamente con Poli-L-lisina (Sigma-Aldrich) y se colocan sobre una plancha a 37°C durante toda la noche para ayudar a que se estiren totalmente
14. Las laminillas se sumergen en xilol pre-calentado a 60°C durante 30 minutos, girando cada 15 minutos el recipiente en el que están contenidas
15. Las laminillas se remueven de esta solución y se sumergen en cada una de las soluciones (etanol absoluto, etanol al 90% en PBS, etanol al 70% en PBS, etanol al 50% en PBS y PBS) durante 10 minutos cada una a TA
16. Alrededor de cada corte se delinea un contorno hidrofóbico con el lápiz Immedge (Vector, USA) y se le permite secar

17. Para permeabilizar el tejido sobre cada corte se pone una cantidad suficiente de una solución de proteinasa K (20µg/ml) diluida en PBS, se incuban durante 20 minutos a 37°C
18. Se realizan tres lavados de 5 minutos con PBS c/u
19. Para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos se bloquea con PBSST (10% de Suero de Cabra, 0.1% de Tritón en PBS) durante 1 hora a TA
20. Se incuban con el anticuerpo primario diluido en PBSST durante toda la noche a 4°C
21. Al día siguiente se remueve la solución con el anticuerpo y se realizan 3 lavados de 10 minutos con PBS
22. Se incuba con el anticuerpo secundario diluido en PBSST durante 1 hora a TA.
23. Se remueve la solución anterior y se realizan 3 lavados de 5 minutos c/u con PBS
24. Sobre cada tejido se coloca una gota de glicerol al 50% en PBS y se pone un cubre-objetos. Las inmunohistoquímica se observan y fotografían en un microscopio de fluorescencia o confocal.

4.8. Inmunohistoquímica en cortes de tejido de muestras congeladas

1. Los tejidos se fijan en PFA al 4% durante toda la noche a 4°C
2. El siguiente día se realizan 3 lavados con PBN durante 5 minutos c/u a 4°C
3. Se sumergen en una solución de sacarosa al 30% en PBS y se mantienen a 4°C por hasta una semana
4. Se lavan los tejidos con PBS durante 5 minutos
5. Se agrega una cantidad suficiente de la resino crío-protectora (Tissue-Tek, Sakura, Japón) y se ponen en un molde metálico
6. Tomar el tejido con unas pinzas evitando tomar el líquido en el que se encuentra inmerso y se sumerge en la resina crío-protectora
7. El molde metálico se coloca sobre hielo seco hasta que se congele totalmente el tejido y la resina

8. Se saca el bloque congelado golpeando ligeramente el molde
9. Con ayuda de la resina se pega el bloque sobre las bases de metal para cortar el tejido en un criostato
10. Se realizan cortes de 10 μ M de grosor en el criostato (Leica, Alemania), los cuales se adhieren a porta-objetos cubiertos con Poli-L-lisina
11. Las laminillas se procesan inmediatamente o se guardan a -20°C para utilizarlas posteriormente
12. Las laminillas se sumergen en PBS durante 5 minutos
13. Alrededor de cada tejido se delinea un contorno hidrofóbico con el marcador Immedge y se le permite secar
14. Los cortes se fijan durante 15 minutos con PFA al 4% a TA
15. Se realizan 3 lavados con PBS durante 5 minutos c/u
16. Permeabilizar el tejido con una solución de 0.1% de Tritón en PBS por 5 minutos a TA
17. Se realizan 3 lavados de 5 minutos c/u con PBS a TA
18. A partir de este momento se procede de la misma manera que la inmunohistoquímica para cortes embebidos en Paraplast iniciando en el punto del bloqueo de unión inespecífica.

4.9. Detección de DNA fragmentado (TUNEL) en cortes de tejido

- a) Tejidos embebidos en Paraplast: Si el tejido fue embebido en Paraplast se sigue el mismo protocolo hasta el paso de la permeabilización con tripsina y después de esto se realiza lo siguiente:
 1. Lavar 3 veces con PBS por 5 minutos c/u
 2. Preparar la Mezcla de reacción por combinar 1 μ l de Enzyme Solution (TUNEL, Roche) con 9 μ l de Label Solution (TUNEL, Roche), mantenerla en hielo hasta su uso
 3. Sobre cada corte se pone una cantidad suficiente de mezcla de reacción y los cortes se incuban con esta solución durante 1 hora a 37°C en una cámara húmeda

4. Se realizan 3 lavados con PBS de 5 minutos c/u
 5. Agregar una gota de glicerol al 50% en PBS y se cubre con un cubreobjetos. Se observan y fotografían utilizando un microscopio confocal
- b) Cuando el tejido fue congelado y se realizaron los cortes en el criostato se siguen los primeros pasos de la inmunohistoquímica para tejido congelado hasta antes de permeabilizar. Posteriormente se siguen los siguientes pasos:
1. Permeabilizar con una solución de 0.1% de Citrato de Sodio, 0.1% de Tritón en PBS durante 5 minutos a TA
 2. Continuar con el mismo procedimiento arriba descrito.

4.10. Incorporación e Inmunodetección de Bromodeoxouridina (BrdU)

a) Incorporación de BrdU en el tejidos completo

1. Las extremidades de la etapa de S9 se sumergieron en una solución de 1µg/ml de BrdU (Roche, USA) diluida en medio DMEM
2. Incubar durante 1 hora en una incubadora a 37°C con humedad controlada y 5% de CO₂
3. Se realizaron 2 lavados de 5 minutos c/u con medio L-15 (Microlab, México)
4. La extremidad derecha se fijo en PFA al 4% durante toda la noche
5. La extremidad izquierda se cultivo en la misma forma antes descrita (ver Cultivo de extremidades)
6. Después de 12 horas de cultivo la extremidad izquierda se fijo en PFA al 4% O/N a 4°C

b) Ambas extremidades se embebieron y procesaron en Paraplast y se siguieron los mismos pasos que para la inmunohistoquímica hasta el punto de la permeabilización. Para detectar la incorporación de BrdU es necesario realizar lo siguiente:

1. Desnaturalizar el DNA a través de sumergir las laminillas en una solución de 0.1N de HCL durante 20 minutos a TA

2. Neutralizar el tratamiento con ácido por sumergir las laminillas 10 minutos en una solución de 0.1N de Ácido Bórico
3. Se realizan 3 lavados con PBS de 5 minutos c/u
4. Incubar con el anticuerpo Alexa-Fluor-594-Anti-BrdU (Invitrogen) durante dos horas a TA en una cámara húmeda y protegida de la luz
5. Se hacen 3 lavados con PBS de 5 minutos c/u
6. Proseguir con la detección de TUNEL a partir del punto de adición de la Mezcla de Reacción (ver punto 2 de Detección de DNA fragmentado).

4.11. Inmunohistoquímica en tejido completo

Este protocolo es una versión modificada del método descrito por Corson (Corson et al., 2003). Todos los pasos se realizan a 4°C, exceptuando aquellos en los que se indica y que se realizan a temperatura ambiente (TA); se requiere agitación moderada.

1. Las extremidades se fijan en PFA al 8% toda la noche a 4°C
2. El siguiente día se realizan 2 lavados con PBN (PBS) por 15 minutos cada uno(c/u)
3. Se deshidratan las extremidades en la siguiente serie creciente de metanol con PBN (25% metanol en PBN: 50% metanol en PBN;75% metanol en PBN) por 15 minutos c/u
4. Las extremidades se guardan en metanol absoluto a -20°C o se continua su procesamiento hasta el final
5. Se realiza un lavado con 25% de H₂O₂ en metanol por 1 hora
6. Se rehidratan las muestras en la misma serie de metanol con PBN pero en forma decreciente por 15 minutos c/u
7. Hacer 2 lavados con PBT (PBS con 0.1% Tritón) por 10 minutos c/u
8. Impedir la unión inespecífica del anticuerpo al sumergir las extremidades durante 1 hora en PBSST (5% de Suero de Cabra en PBT)
9. Incubar con el anticuerpo primario diluido en PBSST toda la noche

10. Remover la solución anterior del anticuerpo y realizar 2 lavados con PBSST a TA de 15 minutos c/u
11. Se realizan 5 lavados con PBSST de 1 hora c/u
12. Se incuban las extremidades en el anticuerpo secundario diluido en PBSST durante toda la noche
13. Eliminar la solución anterior y se realizan 2 lavados con PBSST por 15 minutos c/u a TA
14. Se realizan 5 lavados con PBSST por 1 hora c/u
15. Formar el complejo de avidina con peroxidada mezclando 5 μ L del reactivo A (Vector, USA) con 5 μ L del reactivo B (Vector, USA) en 1mL de PBSST incubar a TA durante 20 minutos
16. Incubar en esta solución durante toda la noche
17. El siguiente día se lavan las extremidades en PBTW (0.1% de Tween en PBS) por 15 minutos en TA
18. Se elimina esta solución y se incuban por 20 minutos en PBTW con 3mg/mL de DAB a TA
19. Eliminar la solución anterior e incubar en PBTW con 3mg/mL de DAB mas 0.01% de H2O2 hasta que se observe que la señal contrasta con el fondo, lo cual puede tardar entre 3 y 5 minutos
20. Posteriormente se realizan 2 lavados en PBTW por 10 minutos c/u
21. Post-fijar las muestras por 1 hora en PFA al 4% a TA
22. Lavar en PBTW por 10 minutos a TA
23. Para tener un mejor contraste de la señal, los tejidos se sumergen en una solución de glicerol al 50% en PBN por 30 minutos a TA
24. Sumergir los tejidos en glicerol al 70% en PBN por otros 30 minutos a TA.
25. Guardar a 4°C.

4.12. Hibridación in situ en tejido completo de la extremidad del embrión de ratón

El protocolo que a continuación se describe se adaptó de aquellos descritos por Wilkinson (Wilkinson and Nieto, 1993) y por la Dra. Lobe.

a) Síntesis de cadena sencilla de RNA

Para sintetizar cada una de las sondas de los ARN mensajeros que fueron analizados se linearizaron los plásmidos con las respectivas enzimas de digestión durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se inactiva la enzima con calor durante 10 minutos a 65°C. El DNA digerido se concentró aforando el volumen de la digestión a un volumen final de 500µL con 2-butanol. Se centrifugo por 5 minutos a 13,200rpm. Se elimina el líquido y se centrifuga nuevamente con etanol al 70% en H₂O por 5 minutos. Se disuelve el DNA linearizado a una concentración final de 1µg/µL. En un tubo eppendorlf de 1.5mL se mezclan los siguientes componentes en orden a TA:

- a. 10 µL de DEPC-H₂O.
- b. 2 µL de 10X Transcription buffer.
- c. 2 µL de 0.1 M DTT.
- d. 2 µL de DIG RNA labeling mix.
- e. 1 µL del plásmido linearizado (1 µg/µL).
- f. 0.5 µL de RNAsin.
- g. 1 µL de SP6, T3 o de T7 RNA polymerase.

1. Se incuba a 37 °C por 2 horas.

2. Adicionar 100 μL de DEPC- H_2O , 10 μL de 4 M LiCl más 300 μL de etanol absoluto
3. Guardar a -20°C por 2 horas
4. Centrifugar a 13,200rpm por 10 minutos a 4°C .
5. Lavar la pastilla con etanol en DEPC- H_2O a TA.
6. Dejar secar por 30 minutos a TA.
7. La pastilla se disuelve en 100 mL de H_2O -DEPC-. Se guarda a -20°C o a -70°C para conservarse por más tiempo. Para visualizar la correcta transcripción de la sonda se analiza en un gel de agarosa al 1%. Se toman 5 μL de la sonda disuelta en agua y se corre el gel hasta que ya no se observe el frente de corrida. La banda de RNA debe ser al menos 5 veces más intensa que el DNA templado.

b) Hibridación: Día 1

1. Las muestras se rehidratan al hacer lavados secuenciales de 5 minutos c/u en 75% v/v metanol/PBT, 50% v/v metanol/PBT, 25% v/v metanol/PBT, y PBT.
2. Hacer 4 lavados de 5 minutos c/u con PBT.
3. Permeabilizar las muestras con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteinasa K en PBT. El tiempo de tratamiento depende de la muestra y es entre 2-10 minutos
4. Neutralizar la pK con 2 mg/mL de glicina en PBT (agregar en el momento) por 5 minutos

5. Lavar 2 veces con PBT por 5 minutos
6. Fijar las muestras con glutaraldehído al 0.2% / PFA al 4% en PBT por 20 minutos (agregar 8 μ L de glutaraldehído al 25% y 5 μ L de Tween por cada mL de PFA al 4%)
7. Lavar 2 veces con PBT por 5 minutos
8. Incubar en la solución de pre-hibridación por 1 hora a 70°C
9. Remover la solución anterior, adicionar solución nueva más 10 μ L de la sonda de RNA (solución de hibridación). Incubar a 70°C toda la noche.

Hibridación: Día 2

10. Lavar dos veces en la Solución 1 de Lavado por 30 minutos a 70°C.
11. Lavar en una mezcla 1:1 v/v de Solución 1 de lavado: Solución 2 de lavado por 10 minutos a 70°C
12. Lavar 3 veces en la Solución 2 de lavado por 5 minutos c/u
13. Lavar por 5 minutos en la Solución 3 de lavado
14. Lavar 2 veces en la Solución 3 de lavado por 30 minutos a 65 °C (Al llegar a este punto iniciar en paralelo con el paso 17)
15. Lavar 3 veces en TBST 1X por 5 minutos
16. Incubar las muestras en 10% v/v de Suero de Oveja en PBT durante 2-3 horas para impedir la unión inespecífica. (Es necesario inactivar

previamente el suero de oveja a través de calentarlo 30 minutos a 70°C

17. Pre-absorber el anticuerpo con “polvo de embrión” de la siguiente forma:

- (i) pesar 3 mg de “polvo de embrión” y agregar 500 µL de TBST, incubar 30 minutos a 70 °C con agitación fuerte
- ; (ii) enfriar en hielo por 10 minutos
- ; (iii) adicionar 5µL de suero de oveja más 1 µL de anti-DIG antibody;
- (iv) agitar moderadamente durante 1 hora a 4°C
- ; (v) separar por centrifugación durante 5 minutos a 13.200 rpm y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, diluir esta solución a un volumen final de 2mL con 1% v/v de suero de oveja en TBST.

18. Eliminar el suero de oveja al 10% en TBST

19. Adicionar el anticuerpo pre-absorbido (del paso 17).

20. Agitar moderadamente toda la noche a 4 °C.

Hibridación: Día 3

21. Lavar 3 veces en TBST 1X por 5 minutos.

22. Lavar 4 veces en TBST 1X por 1 hora.

23. Lavar en TBST 1X durante toda la noche

Hibridación: Día 4

24. Lavar 3 veces en NTMT por 10 minutos

25. Transferir las muestras a platos de cultivo con 4 pozos
26. Incubar las muestras con agitación moderada en NTMT más 3.5 μ L NBT/mL + 3.5 μ L de BCIP/mL proteger de la luz por durante todo el revelado. Observar las muestras cada 10 minutos, ya que la intensidad de la señal varía con cada RNAm y con cada tejido.
27. Lavar 2 veces en PBT por 20 minutos.
28. Para contrastar la señal las muestras se pueden aclarar en glicerol al 50% en PBT por 20 minutos.
29. Guardar en glicerol al 80% en PBT a 4 °C.

4.13. Hibridación in situ en tejido completo de la extremidad del embrión de pollo

Se siguió el mismo protocolo que el del embrión de ratón, con las siguientes modificaciones:

1. Para detectar el RNAm del *Fgf8* se permeabilizaron las extremidades con 0.1% de Tween en PBS y nunca se uso proteinasa K
2. Para detectar los RNAm que se expresan en el mesénquima se utilizó una solución de 70 μ g/mL de proteinasa K en PBT durante 30 minutos a TA.
3. En el día 3 de hibridación se realizan los mismos lavados iniciales de 5 minutos con TBST y después se hacen 20 lavados con TBST de 10 minutos c/u.
4. En el día 3 se revela la señal, después del último lavado con TBST se incuban en la solución de NTMT y se prosigue con el protocolo descrito para el cuarto día del embrión del ratón.

5. RESULTADOS

5.1. La regulación de la ICD por el Fgf8.

En la extremidad del pollo se reportó que el Fgf2 y el Fgf4 inhiben la ICD (Macias et al., 1996). Determinamos si en la extremidad del ratón también se logra la inhibición de la ICD por los Fgfs. En este estudio se utilizó el Fgf8 porque es el único de los Fgfs que se sigue expresando en la etapa de S9 y, por tanto, podría ser el más relevante fisiológicamente. Se observó que después de 8 horas las esferas impregnadas con el Fgf8 e implantadas en el mesénquima interdigital impiden la progresión de la ICD; la muerte celular se analizó mediante la tinción del AO y a través de la fragmentación del DNA (TUNEL) (Figura 1A).

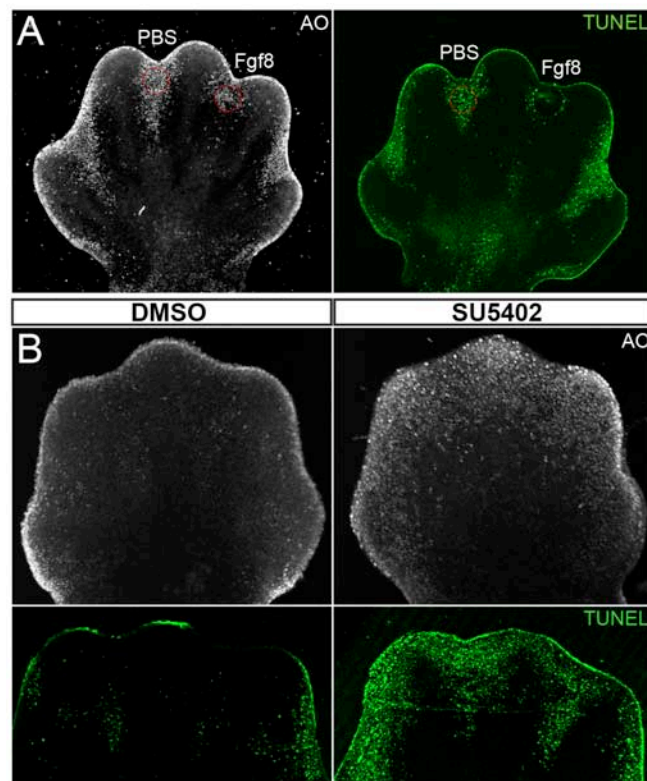


Figura 1. (A) La actividad de supervivencia del Fgf8 en el mesénquima interdigital. En las extremidades de la etapa de S9 que se cultivaron con una esfera con Fgf8 ó con PBS se disminuye la muerte interdigital detectada mediante el AO y el TUNEL (en verde). (B) La muerte celular se incrementa en las extremidades que se cultivaron con un inhibidor de los receptores a Fgf (SU5402) durante 8 horas. Detección con el AO y el TUNEL (en verde).

Un estudio reportó la regulación negativa de la expresión de *Fgf8* en el ectodermo del interdígito al tiempo en que inicia la ICD, sin embargo el análisis en este trabajo se realizó en muestras diferentes que posteriormente se sobrepusieron (Salas-Vidal et al., 2001). Debido a que una de las premisas principales en las que se basa nuestro estudio es que la regulación negativa de *Fgf8* es el evento que marca el inicio de la ICD, decidimos hacer un análisis mas fino de esta observación. Para ello se realizó la tinción de lysotracker en las extremidades de las etapas de S8, S8+, y de S9; los tejidos se fijaron y posteriormente se realizó una hibridación in situ en tejido completo para detectar el RNAm de *Fgf8*. Se observó que en la etapa de S8 no hay señal con el lysotracker en el mesénquima, sinónimo de ausencia de fagocitosis y por tanto de muerte celular; en esta etapa la expresión de *Fgf8* se observa en todas las células del ectodermo. En las extremidades de la etapa de S8+ se observa que algunas células del mesénquima se marcan con el lysotracker y que la expresión de *Fgf8* comienza a desaparecer del ectodermo del interdígito; en la etapa de S9 el RNAm de *Fgf8* se restringe a la punta de los dedos y es mayor el número de células que están siendo engullidas y detectadas por el lysotracker (Figura 2A). Para obtener más datos que sustenten la observación anterior, también se analizó la proteína de *Fgf8* y la activación de la Caspasa-3 en las extremidades de las mismas etapas de desarrollo; S8, S8+ y S9. Es importante recordar que el lysotracker detecta actividad lisosomal y por tanto bajo algunas condiciones podrían producirse resultados diferentes. En las extremidades de la etapa de S8 se observó una cantidad abundante de la proteína de *Fgf8* en la lámina basal del ectodermo, en esta etapa no se detectó la activación de la Caspasa-3 (Figura 2B). En las extremidades de la etapa de S8+ se observó que disminuye la cantidad de la proteína que hay en el ectodermo de los interdígitos y comienzan a aparecer células positivas para la Caspasa-3, en la etapa de S9 ya no hay *Fgf8* en el ectodermo y se detecta abundantemente la activación de la Caspasa-3 en el mesénquima interdigital (Figura 2B). Para revelar el papel fisiológico de la señalización de los Fgfs, las extremidades de la etapa de S8 y de S9 se cultivaron con un inhibidor general para los cuatro tipos de receptores a Fgfs (SU5402) y después de 8 horas con este compuesto, se analizaron sus efectos en relación a la supervivencia celular. Se observó que en las extremidades de la

etapa de S8 se mueren las células del mesénquima distal al agregar este compuesto; este análisis se realizó mediante la tinción con el AO y con el TUNEL (Figura 1B). En las extremidades de la etapa de S9 cultivadas con el SU5402 se detectó que se muere el mesénquima que forma parte de la punta de los dedos, una región en la cual también señala el Fgf8, sin embargo, se observó que la ICD detectada por el AO disminuye en el interdígito, lo cual señala que existen otros Fgfs que provocan efectos diferentes a la supervivencia en el interdígito en ésta etapa de desarrollo.

5.1.1. Las vías de señalización que utiliza el Fgf8 en la extremidad embrionaria para promover la supervivencia.

Los Fgfs señalizan a través de activar diferentes vías de señalización, las cuales inducen respuestas celulares como la proliferación, la supervivencia, la diferenciación y la muerte celular. Las vías más comunes de señalización utilizadas por los éstos factores de crecimiento durante la embriogénesis son aquellas mediadas por la Mapk y por la Pi3k (Turner and Grose, 2010). En la extremidad del embrión de pollo se reportó que el Fgf8 activa la vía de la Pi3k para inducir la expresión de la fosfatasa *Mkp3*, la cual a su vez, desfosforila a la proteína de Erk1/2 en el mesénquima y de esta forma es como el Fgf8 promueve la supervivencia del mesénquima; en este modelo se propone que la forma fosforilada de Erk1/2 induce la muerte celular (Kawakami et al., 2003). Para analizar si en la extremidad del ratón opera un mecanismo similar, se cultivaron las extremidades del embrión de ratón de la etapa de S8 y de S9 con un inhibidor de la Pi3k adicionado al medio de cultivo y después de 8 horas se analizaron sus efectos en cuanto a la muerte celular y a la expresión de la *Mkp3*. En las extremidades de la etapa de S8 se observó que la detección con el AO no se modifica en referencia a las extremidades control, sin embargo, la detección de TUNEL aumenta ligeramente en el mesénquima distal (figura no mostrada).

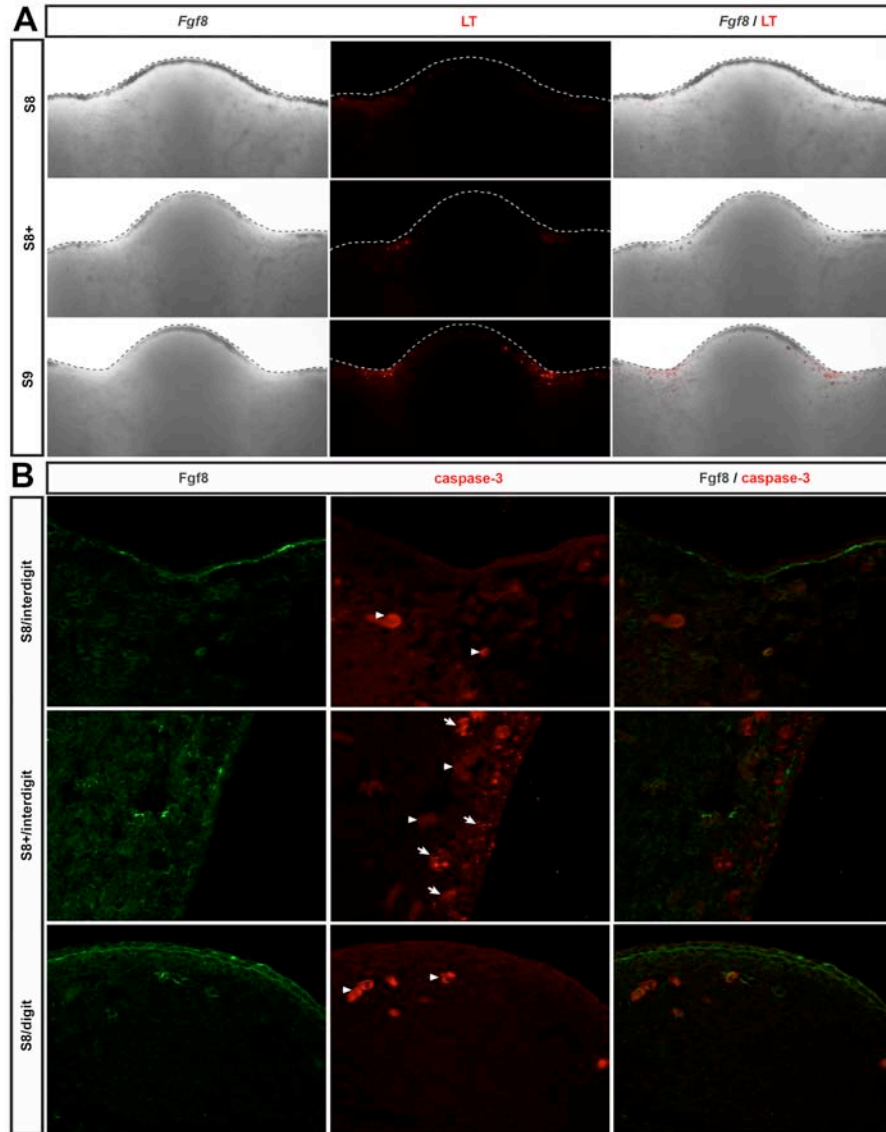


Figura 2. (A) La expresión de *Fgf8* al inicio de la ICD. Las extremidades de diferentes etapas de desarrollo se tiñeron con el lysotracker (LT, en rojo) y posteriormente se realizó una hibridación in situ para detectar *Fgf8*; posteriormente, ambas detecciones se superlaparon. La ICD comienza a detectarse en S8+ cuando la expresión de *Fgf8* empieza a restringirse al ectodermo. (B) En cortes de extremidades de diferentes etapas de desarrollo se realizó una inmunohistoquímica para detectar a *Fgf8* (verde) ó bien la caspasa-3 activa (rojo). La proteína de *Fgf8* se localiza en la membrana basal del ectodermo y la caspasa activa se detecta cuando ya no hay *Fgf8*. Las cabezas de flecha indican células sanguíneas autofluorescentes.

En las extremidades de la etapa de S9 se observa con mayor claridad este resultado, disminuyendo en su totalidad la tinción con el AO e incrementando el TUNEL (ver Figura 15). En nuestras condiciones experimentales ambas técnicas usualmente coinciden, es decir, si una aumenta la otra también y viceversa, por lo que el inhibidor de la Pi3k revela un fenómeno diferente en el que al parecer la apoptosis y la fagocitosis están desacopladas. Esta observación será discutida en mayor detalle en esta misma sección de resultados en el apartado de la regulación de la fagocitosis. En cuanto a la regulación de la expresión de la *Mkp3*, observamos que en las extremidades de la etapa de S8 y de S9 la expresión de la *Mkp3* aumenta ligeramente, lo cual indica que la expresión de ésta fosfatasa no se regula por la vía de la Pi3k (Figura 3A y 3B).

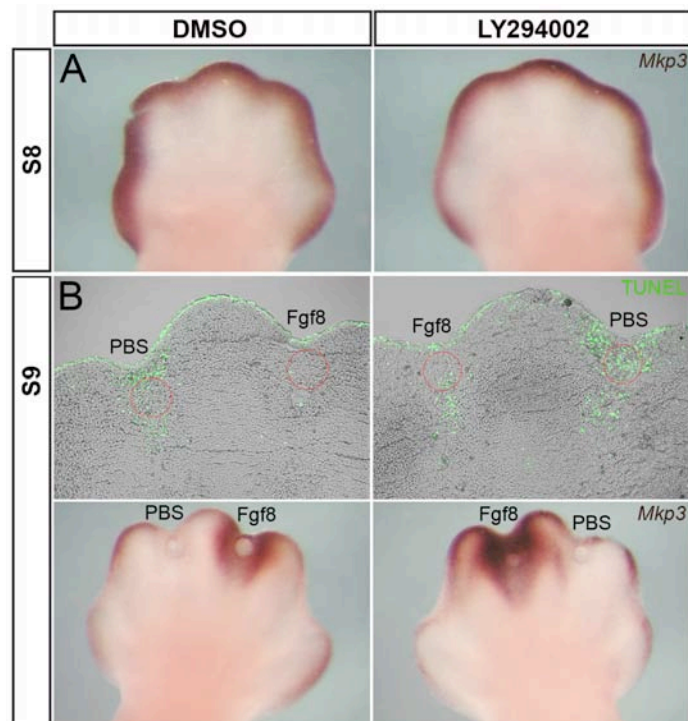


Figura 3. El efecto de la inhibición de la Pi3k en la expresión de la *Mkp3* y en la muerte celular. (A) Las extremidades de la etapa de S8 (A) y de S9 (B) se cultivaron con DMSO ó un inhibidor de la Pi3k. La expresión de la *Mkp3* no se modifica por la inhibición de la Pi3k en ninguna etapa. Al inhibir a la Pi3k no se altera la disminución de la muerte interdigital ni el incremento en la expresión de la *Mkp3* promovido por el Fgf8 exógeno.

Otro reporte sugiere que la expresión de la *Mkp3* es regulada por el Fgf8 pero utilizando la vía de señalización de las Mapk (Eblaghie et al., 2003). Contemplando ésta posibilidad, se analizó el estado de fosforilación de Erk1/2 en las extremidades de la etapa de S8 y de S9. Se observó que la forma fosforilada de Erk1/2 se localiza en las mismas regiones que la expresión de la *Mkp3*, en el mesénquima distal en las extremidades de la etapa de S8 y en la punta de los dedos de la etapa de S9, sitios que también dependen de la señalización de Fgf8 (Figura 4A y 4B). Con la finalidad de conocer si las Mapk son requeridas por el Fgf8 para regular la expresión de la *Mkp3* y la supervivencia del mesénquima, se cultivaron las extremidades de la etapa de S8 y de S9 con el U0126, un inhibidor de Mek (la cinasa que fosforila a Erk1/2). Después de 8 horas de cultivo con este compuesto se observó que la expresión de la *Mkp3* se disminuye del mesénquima distal en las extremidades de la etapa de S8 y también se regula negativamente de la punta de los dedos en la etapa de S9 (Figura 4A y 4B). En éstas mismas regiones se observó que las células del mesénquima se mueren de las extremidades cultivadas con el U0126, lo cual se detectó por la tinción con el AO y con el TUNEL (Figura 4A y 4B). Para comprobar que este compuesto efectivamente inhibe la vía de las Mapk se analizaron los cambios en la fosforilación de Erk1/2. Se observó que en las extremidades que fueron cultivadas con el U0126, la fosforilación de Erk1/2 disminuye del mesénquima distal de las extremidades de la etapa de S8 y en las extremidades de la etapa de S9 disminuye de la punta de los dedos (Figura 4A y 4B). Nuestro último análisis estuvo enfocado en observar si el efecto de supervivencia de Fgf8 exógeno requiere de la vía de la Mapk; para ello se cultivaron las extremidades de la etapa de S9 con este compuesto en el medio de cultivo, al mismo tiempo que en el interdígito dos de la extremidad izquierda se insertó una esfera previamente embebida en el Fgf8 y en el interdígito tres una esfera con PBS. En la condición control también se insertó una esfera con Fgf8 en el interdígito dos y una esfera con PBS en el interdígito tres de la extremidad derecha, pero no se adicionó el U0126 al medio de cultivo. Se observó que después de 8 horas en las extremidades cultivadas con el U0126, el Fgf8 exógeno no promueve la supervivencia del mesénquima interdigital. En éstas mismas condiciones se analizó la expresión de la *Mkp3*, observando que en la extremidad

derecha el Fgf8 induce la expresión ectópica de la *Mkp3* en el interdígito, mientras que en la extremidad izquierda el inhibidor bloquea esta regulación en los niveles del RNAm (Figura 4B). Los datos anteriores indican que el Fgf8 endógeno y exógeno utilizan la vía de las Mapk para regular la expresión de la *Mkp3* y para promover la supervivencia del mesénquima distal e interdigital.

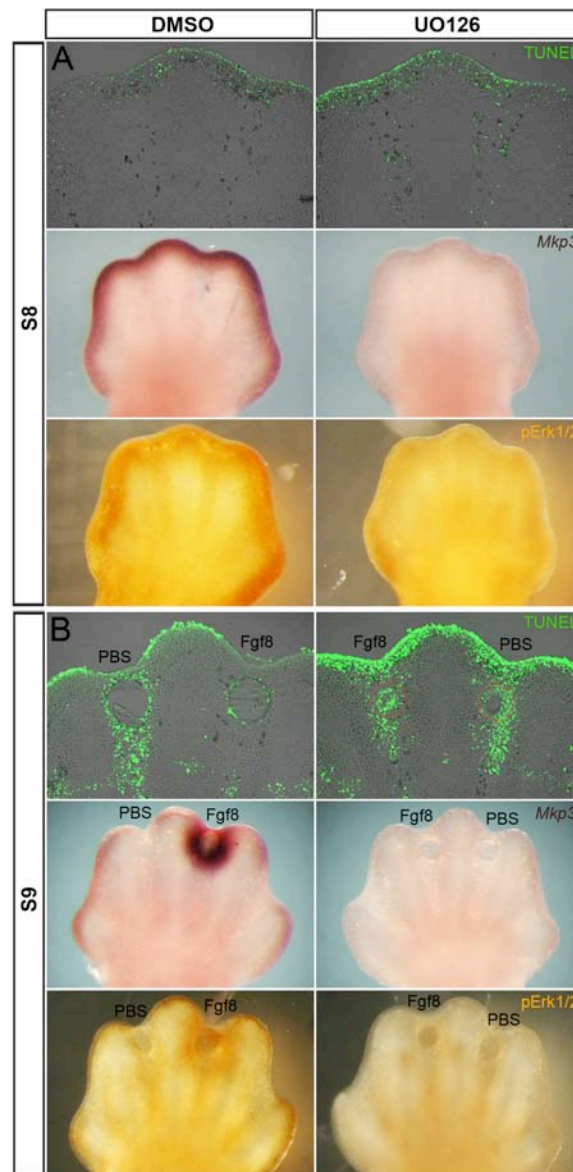


Figura 4. La inhibición de la vía de las Mapk y sus efectos en la expresión de *Mkp3* y en la muerte celular. Las extremidades de la etapa de S8 (A) y de S9 (B) se cultivaron con un inhibidor de Mek (UO126) durante 8 hrs. Las extremidades de la etapa de S9 portan una esfera con Fgf8 y otra con PBS. En las extremidades de la etapa de S8 la inhibición de Mek incrementa el número de células TUNEL+ en el mesénquima que se encuentra debajo del ectodermo. En las extremidades de la etapa de S9 la inhibición de Mek también incrementa la detección de TUNEL en la punta de los dedos. La inhibición de Mek bloquea el efecto de supervivencia del Fgf8 exógeno. La expresión de *Mkp3* y la fosforilación de Erk endógenas y las inducidas por el Fgf8 exógeno se disminuyen al inhibir a Mek. 68

5.2. La participación del RA durante la ICD.

En la extremidad del embrión de pollo se ha propuesto que el RA es un regulador fisiológico de la ICD (Rodríguez-Leon et al., 1999), mientras que en la extremidad del ratón sólo se ha analizado su efecto teratogénico (Alles and Sulik, 1989). Analizamos los efectos de adicionar diferentes concentraciones del RA al medio de cultivo de las extremidades de la etapa de S8 y de S9 del embrión de ratón. Observamos que en las extremidades de S8, el RA promueve la muerte de las células en el mesénquima distal; en las extremidades de la etapa de S9 induce la muerte de las regiones distales de los dedos y además incrementa la ICD. El análisis de la muerte celular se realizó utilizando tanto con el AO como el TUNEL (Figura 5A, 5B). Para determinar si el RA tiene alguna función relevante en la activación de la ICD fisiológica se cultivaron las extremidades de la etapa de S9 con un inhibidor de los receptores del tipo RAR (AG193002) y, después de 8 horas, se observó que este compuesto disminuye la tinción con el AO y la fragmentación del DNA (Figura 5C). El RA actúa a través de unirse a sus receptores, los cuales son factores de transcripción que activan ó reprimen genes. A pesar de que esto se sabe con claridad, hasta la fecha no se han reportado genes de supervivencia o proapoptóticos que el RA potencialmente podría regular. Debido a que los ratones adultos que no expresan *Bax* ni *Bak* tienen sindactilia (Lindsten et al., 2000), analizamos las regiones promotoras de ambos genes, en búsqueda de sitios consenso a los cuales los receptores tipo RAR pudieran unirse. Utilizando el software de RSA-tools, obtuvimos la secuencia de 1500pb antes del sitio de inicio de la transcripción del gen de *Bax* y de *Bak*. Esta secuencia se analizó con el programa MatInspector de Genomatix el cual analiza la secuencia y encuentra sitios putativos de unión a los receptores tipo Rar. En el gen de *Bax* el software encontró tres sitios de unión al DNA de los receptores tipo Rar, mientras que en el gen de *Bak* encontró dos sitios (Tabla 1). Para explorar si efectivamente ocurría lo predicho por el programa, analizamos los posibles cambios de expresión de *Bax* y de *Bak* en las extremidades de S8 y de S9 cultivadas con el RA. Observamos que el RA incrementa la expresión de *Bax* en las extremidades de S8 y de S9 en las mismas regiones del mesénquima en donde promueve la muerte celular (Figura 5D y 5E). Esta regulación

tendría relevancia si el RA endógeno del mesénquima interdigital también regulara la expresión de *Bax*. Para analizarlo, se cultivaron las extremidades de la etapa de S9 en presencia de un antagonista de los receptores tipo RAR y se observó que bajo estas condiciones la expresión de *Bax* disminuye significativamente (Figura 5E).

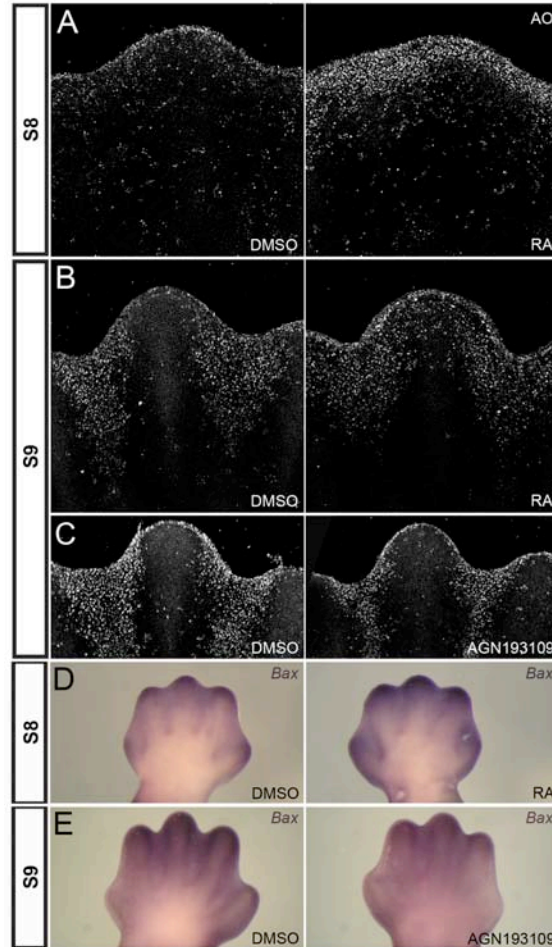


Figura 5. La activación de la muerte celular en el mesénquima distal e interdigital. Las extremidades de dos etapas de desarrollo; antes de que se inicie la muerte y al inicio de la ICD se cultivaron durante 8 horas en DMSO, en RA ó en el antagonista de los receptores tipo RAR (AGN193109; C). Después del cultivo, las extremidades se tiñeron con AO. El RA exógeno es un fuerte inductor de la muerte celular en el mesénquima distal de las extremidades de la etapa de S8, en el mesénquima interdigital y en la punta de los dedos de las extremidades de la etapa de S9. En contraste la ICD se reduce al inhibir a RAR. *Bax* se expresa mayoritariamente en el mesénquima distal y ésta expresión se incrementa por el RA en las extremidades de la etapa de S8 y se disminuye en las extremidades de la etapa de S9 por el antagonista de RAR.

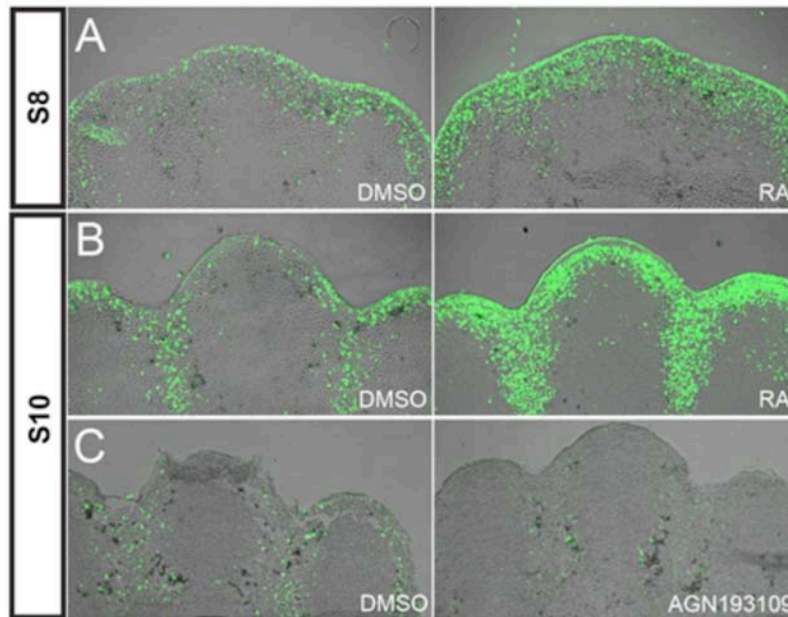


Figura 6. Determinación de la activación de la muerte celular por el RA en el mesénquima distal e interdigital. Las extremidades de dos etapas de desarrollo antes de la ICD, S8 (A) y durante la activación de la ICD, S9(B) fueron cultivadas por 8 horas en DMSO, en RA ó bien en un antagonista de los receptores tipo RAR (C). Después del cultivo las extremidades se seccionaron y procesaron para TUNEL.

Gene	Matrix	Opt. threshold	Start position	End position	Strand	Matrix Similitud	Core Similitud	Sequence
Bax	Vertebrate RAR_RXR.01	0.78	-1176	-1152	+	0.799	1.0	atgttctg gggttac AGGTatgggc
Bax	Vertebrate RAR_RXR.01	0.78	-1074	-1050	-	0.798	1.0	tacatagca agtgac AGGTcaatta
Bax	Vertebrate RAR_RXR.01	0.78	-82	-58	+	0.781	0.769	agtcctg cgggcgg AGGCcatggt
Bak	Vertebrate RAR_RXR.01	0.78	-107	-83	+	0.805	1.0	taagtact gggatta AGGTcacaca

Tabla 1. Los elementos de respuesta a RAR en los promotores de *Bax* y de *Bak*. Utilizando el programa MatInspector de Genomatix se analizaron 1500pb por arriba del sitio de inicio de la transcripción de los genes de *Bax* y de *Bak*. La matriz analizada pertenece a la familia de matrices de Vertebrados RXRF. Optimized threshold: es el valor optimizado definido de forma tal que un número mínimo de coincidencias se encuentra en secuencias no regulatorias (con esta matriz de similitud el número de falsos positivos se minimiza). Los términos 'Start' y 'End' indican la posición en la secuencia del DNA donde la secuencia principal se encuentra, considerando el inicio de la transcripción. 'Matrix similitud' define un valor para los nucleótidos más conservados por su posición en la matriz, una coincidencia perfecta con la matriz produce un valor de 1.00. La 'core sequence' de una matriz se definen como las posiciones más conservadas de la matriz (usualmente son 4). Los pares de bases en letras mayúsculas denotan la secuencia "core" usada por MatInspector y las letras rojas son nucleótidos importantes.

El RA también podría regular negativamente la expresión de genes de supervivencia, analizamos posibles cambios en la expresión de algunos de los miembros anti-apoptóticos de la familia de Bcl2. El RNAm de *Bcl2* se observa en las condensaciones de cartílago en las etapas de S8 y de S9, y no en el mesénquima interdigital o distal, por lo que por su patrón de expresión no sugiere alguna función relacionada con la supervivencia de las zonas de interés (Figura 7A). A pesar de ello, analizamos la posible regulación del RA hacia *Bcl2*, y observamos que en las extremidades de S8 y de S9 cultivadas con el RA se disminuye la expresión de *Bcl2* (Figura 7B y 7C). Otro de los miembros de la familia de Bcl2, *Bclxl*, tiene un patrón de expresión que sugiere su participación directa en promover la supervivencia del tejido interdigital (Figura 7 panel A), sin embargo, su expresión no se modificó en las extremidades que fueron cultivadas con el RA en el medio de cultivo (figura no mostrada).

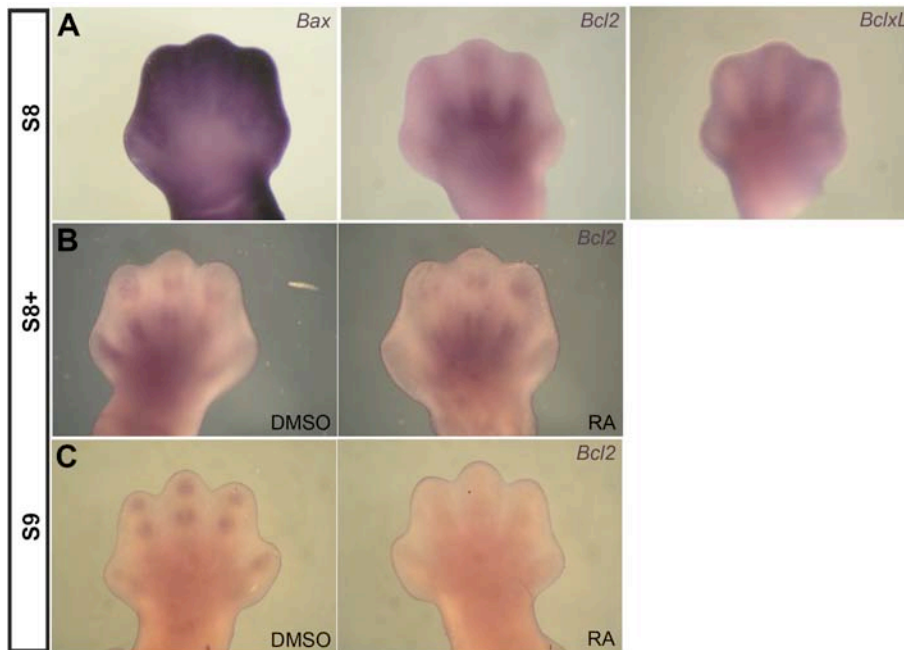


Figura 7. La expresión y la regulación de los genes de la familia de Bcl2 por el RA. (A) La expresión de *Bax*, de *Bcl2* y de *Bclxl* en extremidades recién disectadas de la etapa de S8 (B,C) Las extremidades de la etapa de S8+ y de S9 fueron cultivadas en ausencia o presencia del RA y la expresión de *Bcl2* y de *Bclxl* (datos no mostrados) se determinó por hibridación in situ.

5.3. La señalización antagónica entre el Fgf8 y el RA en la ICD.

Observamos que ambas moléculas, el RA y el Fgf8 señalizan en los mismos sitios del mesénquima pero provocan diferentes efectos celulares, el RA induce la muerte de las células mientras que, por el contrario, el Fgf8 promueve su supervivencia. Consideramos que ambas señales convergían en la misma célula y señalizaban antagónicamente. Para obtener indicios a favor de ésta hipótesis se cultivaron las extremidades en presencia de las dos moléculas y observamos sus efectos en cuanto a la muerte celular y la expresión de algunas moléculas que responden a la señalización de Fgf8 ó bien del RA. En la extremidad izquierda de la etapa de S9 se insertó una esfera con el Fgf8 en el interdígito dos, mientras que en el interdígito tres se insertó una esfera con PBS; al medio de cultivo se adicionó el RA en una concentración de 10 μ M. En las extremidades derechas de la misma etapa se les insertó una esfera con Fgf8 ó con PBS de la misma forma que la condición experimental, pero al medio de cultivo se adicionó el vehículo del RA, el DMSO. Después de 8 horas de cultivo observamos que el Fgf8 disminuye la ICD fisiológica y también la que el RA incrementa en ésta región (Figura 8A). Este dato señala que el Fgf8 es suficiente para impedir que las células del interdígito se mueran aún estando presente un estímulo inductor de la apoptosis como es el RA. Existen diferentes mecanismos mediante los cuales el FGF8 podría estar inhibiendo la señalización hacia el RA: a través de regular la expresión de sus receptores, de las enzimas que lo sintetizan o bien a través de promover su degradación. El embrión durante su desarrollo controla finamente los niveles del RA (Duester, 2008), por lo que una opción inmediata era analizar si el Fgf8 promovía la expresión de alguna de las enzimas que degradan el RA. El gen que codifica para la enzima *Cyp26b1* se expresa en el mesénquima de las extremidades de la etapa de S8 y de S9, en los sitios que subyacen a la señalización por el Fgf8 (MacLean et al., 2001). En las extremidades de la etapa de S9 observamos que una esfera con el Fgf8 induce la expresión de *Cyp26b1* en el interdígito dos mientras que una esfera con PBS no produce ningún efecto (Figura 8C). También se analizaron los cambios en la expresión de *Cyp26b1* pero en las extremidades que fueron tratadas con el RA y que además portaban una esfera con el Fgf8 insertada en el interdígito, bajo éstas condiciones se observa que

el RA induce la expresión de la *Cyp26b1* en un área muy amplia del mesénquima distal, sin embargo el Fgf8 induce una mayor expresión de ésta enzima en el interdígito (Figura 8C). Otra manera de regular la concentración del RA en un tejido es vía la inhibición de su síntesis. Un reporte muestra que el Fgf8 exógeno regula la expresión de la enzima que sintetiza el RA, la *Radlh2*, en el mesénquima del estilopodo de la extremidad del pollo (Mercader et al., 2000). Exploramos esta posibilidad al analizar posibles modificaciones en la expresión de la *Raldh2* en las extremidades de la etapa de S9 en las que se insertó una esfera con el Fgf8 en el interdígito dos y una esfera con PBS en el interdígito contiguo. Después de 8 horas se observó que la expresión de *Raldh2* disminuye en el interdígito que tiene la esfera con el Fgf8 (Figura 8B).

Analizamos si la regulación también ocurría en la dirección contraria, es decir, del RA hacia el Fgf8. Se observó que en las extremidades de la etapa de S8 la expresión de Fgf8 no se altera en las extremidades que fueron cultivadas con el RA respecto al control (Figura 8D). Los análisis de los ratones mutantes sugieren que el Fgf8 para señalar hacia el mesénquima requiere del receptor tipo I (Fgfr1) (Li et al., 2005). Se analizó si ocurría algún cambio en la expresión del gen que codifica para éste receptor frente al RA, y se observó que en las extremidades de la etapa de S8 que fueron cultivadas con el RA, la expresión de *Fgfr1* disminuye por acción de este compuesto (Figura 8E). La señalización por el Fgf8, determinada por la fosforilación de Erk1/2, también se regula negativamente por la acción del RA en las extremidades de S8 (Figura 8F) y en las extremidades de S9 (Figura 8F). Datos que en conjunto sugieren que el antagonismo ocurre en las dos direcciones produciendo destinos celulares diferentes; la regulación negativa de Fgf8 hacia el RA dicta supervivencia celular, mientras que del RA hacia el Fgf8 conduce a que las células se mueran.

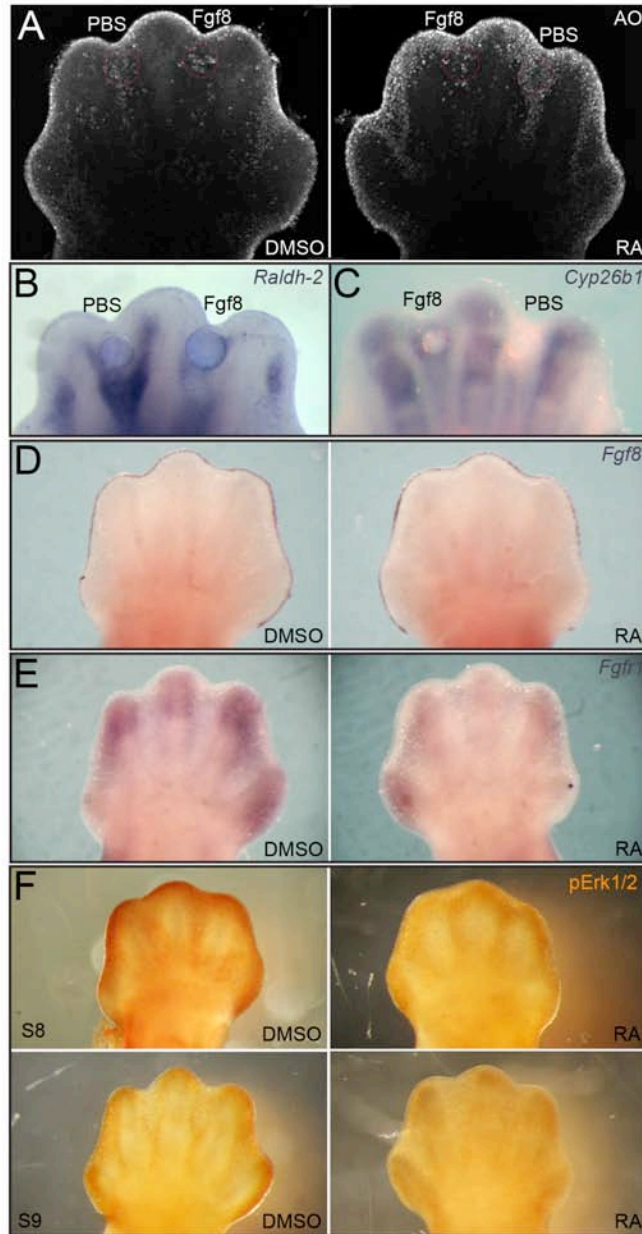


Figura 8. La regulación antagónica entre el Fgf8 y la señalización por el RA. Las extremidades de la etapa de S8 y de S9 se cultivaron durante 8 horas en DMSO ó bien RA (A, D-F). En algunos casos una esfera con Fgf8 se implantó en el interdígito 3 y otra con PBS en el interdígito 4 (A-C). El Fgf8 inhibe la ICD normal y la inducida por el RA exógeno. (A; AO). En presencia del Fgf8 exógeno se disminuye la expresión de *Raldh2* en el mesénquima interdigital (B), mientras que la expresión de la enzima *Cyp26b1* incrementa (C). Por otra parte, el RA no tiene efecto sobre la expresión de *Fgf8* (D), sin embargo, disminuye la expresión de *Fgfr1* (E). El RA también provoca una reducción en la fosforilación de Erk en el mesénquima distal de las extremidades de la etapa de S8 y en las extremidades de la etapa de S9 en el mesénquima de la punta de los dedos después de 4 horas de tratamiento (F).

5.4. La participación de los Bmps en la ICD.

5.4.1. La señalización de los Bmps en el mesénquima interdigital.

En la extremidad embrionaria de pollo se propuso que los Bmps señalizan por debajo del RA para promover la ICD (Rodríguez-Leon et al., 1999). En la extremidad embrionaria se observó que *Bmp2* y *Bmp7* se expresan en el interdígito, pero en células diferentes a las que se están muriendo (Salas-Vidal et al., 2001). Sin embargo, existen muchos reportes de ratones mutantes en los que al eliminar la expresión de los componentes de la señalización de los Bmps se desarrolla sindactilia asociada a una menor ICD (Bandyopadhyay et al., 2006; Maatouk et al., 2009; Pajni-Underwood et al., 2007). Para saber si los Bmps son reguladores de la ICD en la extremidad del ratón, se realizaron diferentes experimentos. En las extremidades de la etapa de S8 observamos que una esfera embebida en BMP7 genera la muerte ectópica del mesénquima distal (Figura 9B). En las extremidades de la etapa de S9 se insertó una esfera embebida en Noggin, un antagonista de la señalización de los Bmps. Se observó que aún después de 12 horas con esta proteína la ICD fisiológica no cambia respecto al interdígito control (Figura 10). En la extremidad de pollo se observó que el RA para matar a las células del interdígito requiere de la señalización de los Bmps y que la expresión de *Bmp4* y de *Bmp7* aumenta por el RA (Rodríguez-Leon et al., 1999). En las extremidades de la etapa de S9 se determinó que el RA añadido al medio de cultivo aumenta la expresión endógena de *Bmp7* en el mesénquima interdigital, sin embargo en las extremidades de la etapa de S8 a pesar de que se produce una inducción de la expresión de *Bmp7* ésta no se localiza en el mesénquima distal, región en la que el RA promueve la muerte de las células (Figura 9A). Analizamos si se requiere de algún Bmp para lograr el incremento en la ICD promovido por el RA exógeno. Para esto, se insertó una esfera con Noggin en el interdígito dos y una con PBS en el interdígito tres y al medio de cultivo se agregó el RA.

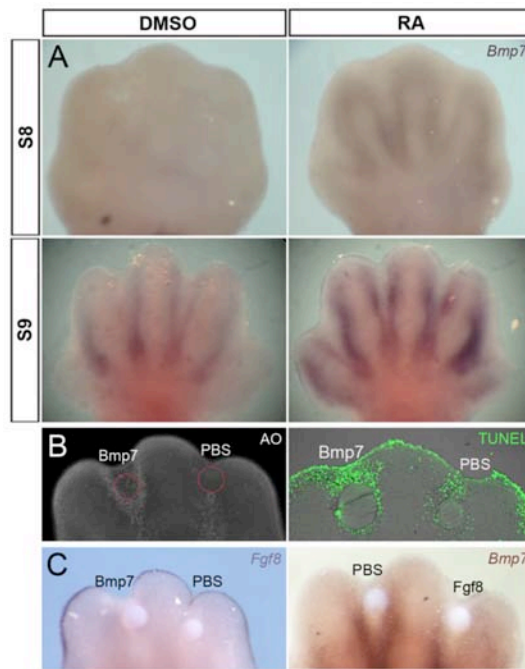


Figura 9. La expresión y la actividad de muerte celular de *Bmp7* en la extremidad en desarrollo. (A) La expresión de *Bmp7* en las extremidades de la etapa de S8 y de S9 tratadas con el RA durante 8 horas. (B) La inducción de la muerte celular después del tratamiento con esferas impregnadas en *Bmp7*. (C) La regulación de la expresión de *Fgf8* y de *Bmp7* por las proteínas exógenas de *Bmp7* y de *Fgf8* respectivamente.

Después de 8 horas se observó que *Noggin* no protege de la ICD adicional inducida por el RA (Figura 10). Debido a que *Noggin* tiene mayor afinidad hacia BMP7 que hacia BMP4 y hacia BMP2. Adicionalmente se utilizó el fármaco Dorsomorphin que inhibe la fosforilación de los factores de transcripción Smad1/5/8 (Yu et al., 2008), los blancos intracelulares que transducen la señalización de los Bmps. Las extremidades de la etapa de S9 se cultivaron con Dorsomorphin durante 8 horas, y después de éste tiempo se observó que no se disminuye la ICD, resultado interpretado a partir del TUNEL y de la tinción con el AO (Figura 10A ,10B y datos no mostrados). El reactivo Dorsomorphin funcionó eficazmente, ya que cuando se cultivaron las extremidades de la etapa de S9 con éste compuesto se disminuyó la fosforilación de Smad1/5/8 de las regiones interdigitales, sin embargo en la punta de los dedos se sigue observando un poco de Smad fosforilada, la cual pensamos podrían ser altos niveles de la Smad1 que se aprecia en el control (Figura 10B).

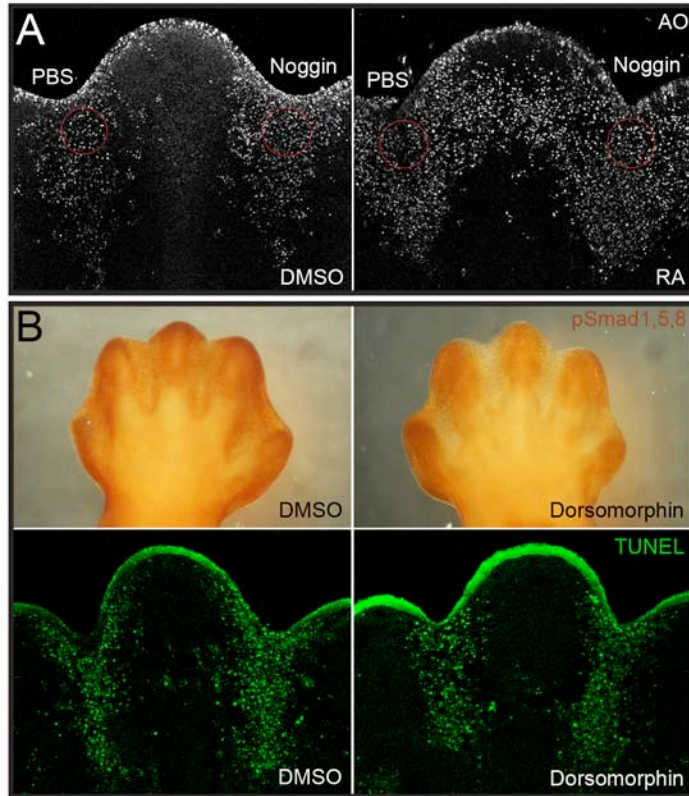


Figura 10. La señalización de los Bmp en el mesénquima durante la activación de la ICD. (A, B) Las extremidades de la etapa de S9 se cultivaron por 8 horas bajo diferentes condiciones. Una esfera impregnada en Noggin se implantó en el interdígito 3 mientras que una con PBS en el interdígito 2 en presencia de DMSO o de RA en el medio de cultivo. (B). Las extremidades de la etapa de S9 también se cultivaron con DMSO ó bien con Dorsomorphin, un inhibidor de la fosforilación de las Smad. (B). La muerte celular no se modifica (AO ó TUNEL) después de inhibir la actividad de los Bmps. Una disminución de la fosforilación de Smad indica que Dorsomorphin tuvo efecto en la actividad de los Bmps.

5.4.2. La señalización de los Bmps en el ectodermo.

Algunos de los fenotipos de los ratones mutantes y parte de los resultados experimentales en los que sugieren que los Bmps regulan la ICD podrían explicarse si éstas moléculas señalizaran en el ectodermo y no en el mesénquima. Recientemente se reportó que en los ratones que carecen del receptor *Bmpr1a* en el ectodermo se reduce la ICD y, como consecuencia, se observa sindactilia en las extremidades. De manera interesante se observa que en éstos embriones mutantes se mantiene en el ectodermo interdigital la expresión de *Fgf8* (Pajni-Underwood et al., 2007). Contemplando ésta posibilidad se realizaron diferentes experimentos

dirigidos a inhibir la señalización de los Bmps en el ectodermo. Las extremidades izquierdas de la etapa de S8+ se infectaron con un adenovirus que sobre-expresa la proteína de Noggin acoplada con la proteína GFP, mientras que las extremidades derechas se infectaron con un adenovirus control que sobre-expresa sólo la proteína de GFP, después de 2 horas de infección ambas extremidades se cultivaron durante 24 horas. La técnica que utilizamos para infectar las extremidades y que se describe en materiales y métodos garantizó que la mayoría del adenovirus se quedara en el ectodermo, y solo se consideraron como informativas aquellas extremidades en las que se observó una buena eficiencia de infección con el virus GFP. En aquellas extremidades en las que se sobre- expresó Noggin en el ectodermo se observó que después de 24 horas se reduce la ICD detectada con el lysotracker (Figura 11A). En estas mismas extremidades se detectó el RNAm de *Fgf8* y se observó que su expresión permanece en el ectodermo del interdígito en aquellas que fueron infectadas con el adenovirus de Noggin, no así con el adenovirus control. Esto indica que los Bmps controlan la ICD a través de controlar negativamente la expresión de *Fgf8* en el ectodermo del interdígito. Para obtener más indicios a cerca de esta posibilidad se cultivaron las extremidades izquierdas de la etapa de S8+ con el fármaco Dorsomorphin, y las derechas en el vehículo durante 12 horas. Después de este tiempo se observó que la ICD disminuye y, además, a este efecto se asocia una permanencia de la expresión de *Fgf8* en el ectodermo del interdígito (Figura 11B). Para poder cuantificar el efecto observado creamos una medida de la regresión del interdígito que llamamos Factor de Identación ('Identation Factor', IF). La medida del IF se obtuvo al trazar dos líneas paralelas: la primera en el límite más distal de dos interdígitos vecinos, y la segunda en la punta del dedo entre esos dos interdígitos. Se trazó una línea perpendicular a éstas dos líneas anteriores que fue la que se midió. En la figura 11C se observan las gráficas en verde que representan el promedio del IF con su desviación estándar de cuatro extremidades infectadas con el adenovirus control ó con el adenovirus que sobre-expresa Noggin; las gráficas en azul muestran el promedio con su desviación estándar de cinco extremidades cultivadas con el vehículo así como de las cultivadas con el fármaco Dorsomorphin. Como se aprecia bajo ambas situaciones experimentales ocurren cambios

significativos respecto a la condición control. Lo anterior indica que la regresión del interdígito se disminuye al bloquear la señalización de los Bmps.

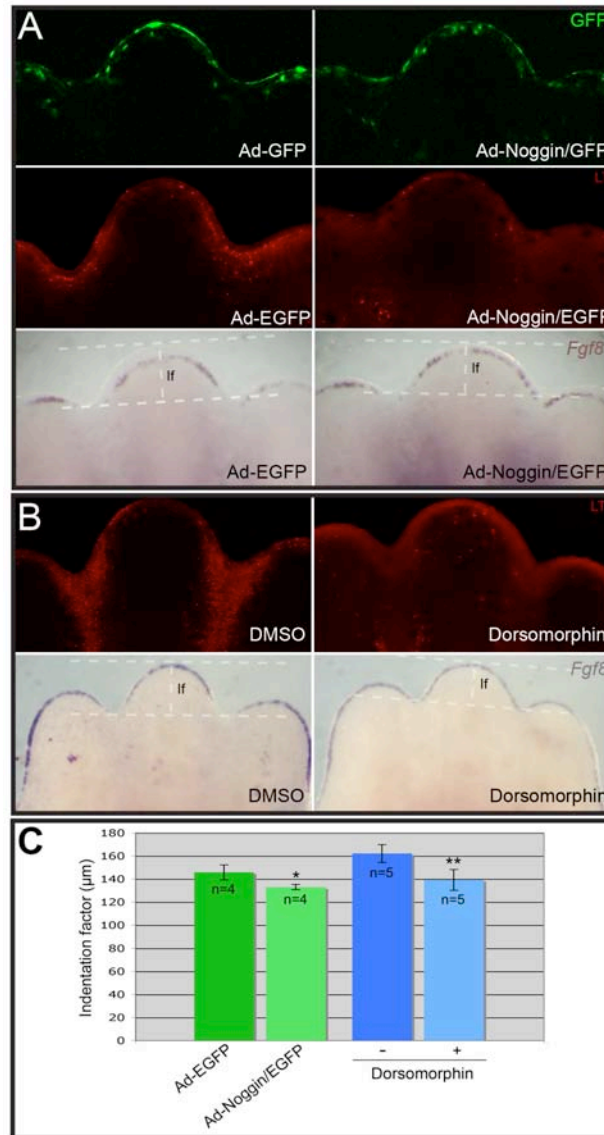


Figura 11. La señalización de los Bmps en el ectodermo durante la activación de la ICD. (A) Las extremidades de la etapa de S8 se infectaron con un adenovirus que expresa solo el gen de la EGFP (Ad-EGFP) ó fusionada a Noggin (Ad Noggin/EGFP) y posteriormente se cultivaron durante 24 horas (la expresión en verde). (B) Alternativamente las extremidades se trataron con Dorsomorphin por 12 horas. En las extremidades infectadas con el Ad-Noggin/EGFP ó tratadas con Dorsomorphin, persiste la expresión de *Fgf8* en el ectodermo distal. La muerte celular (LT) de las extremidades en S8 se reduce después del tratamiento con Dorsomorphin o las infectadas con Ad-Noggin/EGFP. (C) El nivel de indentación se estimó a través del 'Indentation Factor' (If). 'If' es la distancia entre la línea que toca la parte inferior de los interdigitos adyacentes y la línea paralela que toca la parte más distal de los digitos. Las barras son el promedio de 'If \pm d.e. de las muestras indicadas. El If se redujo en las regiones interdigitales de las muestras infectadas con Ad-Noggin/EGFP (*, $p < 0.01$) o las tratadas con dorsomorphin (**, $p < 0.005$).

5.4.3 La señalización de los Bmps en la extremidad embrionaria del pollo.

Pensamos que el mecanismo de activación de la ICD que opera en la extremidad del ratón podría estar conservado y ser el mismo que opere en la extremidad del pollo. La progresión de la ICD de la extremidad del pollo es diferente respecto a la del ratón. En esta especie se detectan dos regiones de muerte que al final se fusionan en una en común; la primer región se origina en el mesénquima proximal del interdígito, y poco tiempo después se empiezan a morir las células del mesénquima distal (Fernandez-Teran et al., 2006). Analizamos si ambos tipos de la ICD de la extremidad del pollo se regulan por los Bmps y por el *Fgf8*. Para probarlo, se insertaron esferas previamente embebidas en Noggin en el interdígito distal y en el proximal de la extremidad del pollo de la etapa 28 de HH. Después de 12 horas de incubación se observó que la muerte que ocurre en ambas regiones disminuye por la presencia de Noggin (Figura 12), lo que indica que ambas son reguladas por los Bmps. Para saber si éstos señalizan directamente en el mesénquima o en el ectodermo, en las mismas extremidades que fueron tratadas con el Noggin se analizó la expresión de *Fgf8*. Se observó que en las extremidades en que se insertó una esfera con Noggin en el mesénquima distal interdigital, el RNAm de *Fgf8* se regula positivamente a diferencia de la esfera control (Figura 12). Por el contrario, la esfera con Noggin insertada en la región proximal, si bien inhibe la muerte de las células, no promueve un incremento en la expresión de *Fgf8* en el ectodermo (Figura 12). Estos datos indican que las diferentes regiones de ICD que aparecen en la extremidad del pollo se regulan por mecanismos diferentes; la ICD distal requiere que los Bmps supriman la expresión de *Fgf8* en el ectodermo interdigital, mientras que la ICD proximal depende de las acciones de los Bmps, posiblemente en forma directa sobre el mesénquima interdigital (Figura 12).

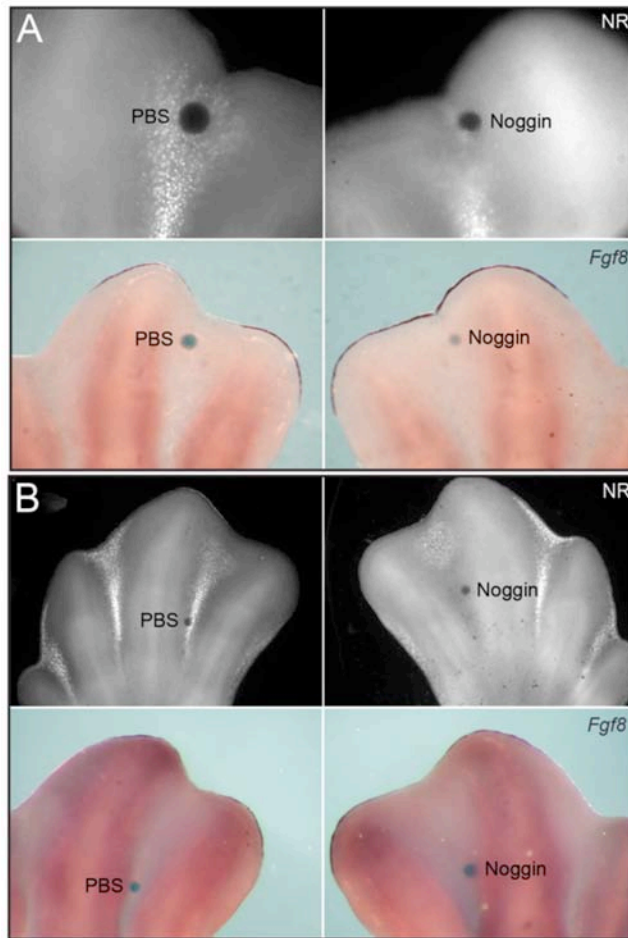


Figura 12. La actividad de los Bmp en el control de la ICD de la extremidad de pollo. Las esferas impregnadas en Noggin ó con Fgf8 se implantaron en las regiones interdigitales de las extremidades de la etapa 28 HH. (A) Las esferas con Noggin se implantaron en las regiones interdigitales del mesénquima distal o proximal. (B) Las extremidades fueron teñidas con rojo neutro (NR) y posteriormente se analizó la expresión de *Fgf8*. La proteína de Noggin inhibe la muerte celular en la region distal y proximal pero se observó un incremento en la expresión de *Fgf8* únicamente cuando Noggin se aplicó distalmente .

5.5. La participación de los genes *Msx1/2* en la ICD.

Los últimos genes que son regulados por el RA y por los Bmps en la cascada de activación propuesta para la ICD de la extremidad del pollo son los factores de

transcripción de *Msx1/2* (Rodríguez-Leon et al., 1999). Se exploró si ambos genes formaban parte del mecanismo que se ha estado describiendo para la activación de la ICD de la extremidad del ratón. Al realizar hibridaciones in situ se observó que desde la etapa de S8 la expresión de ambos es abundante en las regiones interdigitales, sin embargo en la etapa de S9 solo *Msx1* se sigue expresando mientras que *Msx2* ya no se detecta (Salas-Vidal et al., 2001). En la extremidad del pollo ocurre algo diferente, ya que para la etapa en que muchas de las células del interdígito se están muriendo se observa una fuerte expresión del gen de *Msx2* (Merino et al., 1998). Se analizó si el *Fgf8* podía regular negativamente la expresión de este gen en el interdígito de las extremidades del pollo. Para ello se insertó una esfera impregnada en *Fgf8*, y después de 12 horas se les realizó una hibridación in situ para detectar el RNAm de *Msx2*. Contrario a lo esperado, observamos que en las extremidades de pollo, la expresión de *Msx2* se regula positivamente, efecto que además está asociado con una disminución en la ICD (Figura 13A). Al observar este resultado, pensamos que tal vez algo parecido podría ocurrir en las extremidades del ratón, a pesar de que la expresión de *Msx2* ya no se detecta en esta etapa. Se realizó un experimento similar en la extremidad de la etapa de S9 del ratón y se observó que el *Fgf8* también promueve la expresión ectópica de *Msx2*, y que esta regulación positiva está asociada con la supervivencia del mesénquima interdigital (Figura 13B).

5.6. El origen y destino de las células del interdígito.

La expresión de la *Mkp3* puede considerarse como un buen parámetro para evaluar la actividad de *Fgf8*, ya que su RNAm aumenta o disminuye cuando se activa o se suprime la señalización por este factor. En la etapa de S8 se observa que la *Mkp3* solo se expresa en el mesénquima que subyace al ectodermo en una banda longitudinal muy pequeña que no cubre toda la región del interdígito (Figura 4A). Una de las premisas de este trabajo predice que las células del interdígito que se mueren son aquellas cuya supervivencia depende de la señalización de *Fgf8*. Esta predicción, sin embargo, no es insuficiente para explicar cómo se mueren las células

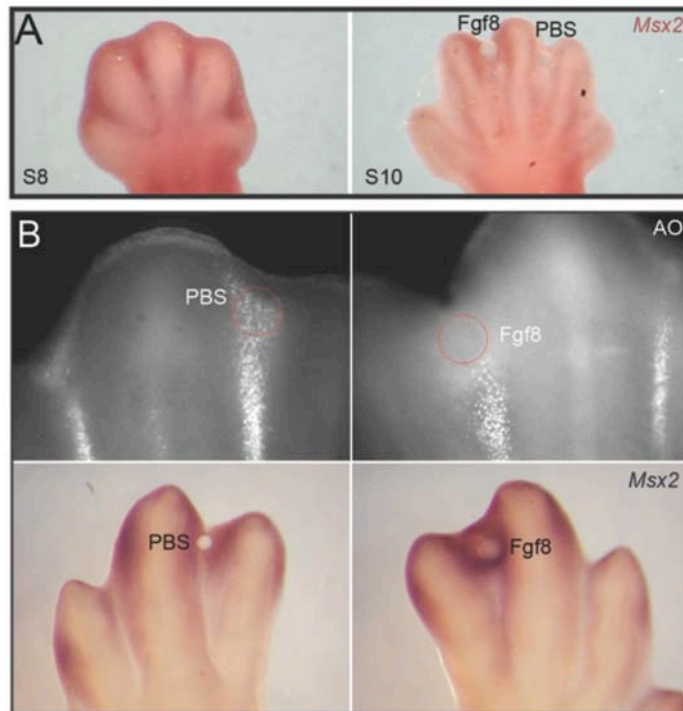


Figura 13. La regulación de la expresión de *Msx2* por el *Fgf8* en asociación con su actividad de supervivencia. (A) La expresión de *Msx2* después de 8 horas de cultivo con una esfera impregnada en *Fgf8* en el interdígito 3 y otra con PBS en el interdígito 2. (B) La expresión de *Msx2* en la extremidad de pollo después de 12 horas de incubación con una esfera con el *Fgf8* o bien con PBS, arriba se muestra que el *Fgf8* inhibió la ICD detectada mediante el AO.

que aparentemente no están protegidas por este factor de crecimiento. Recordemos que las células del interdígito que se están muriendo forma una especie de triángulo invertido (Salas-Vidal et al., 2001). Para tratar de explicar este fenómeno, se analizó la dinámica de formación del interdígito de la extremidad del embrión de pollo y del embrión de ratón. Para tener una referencia de la evolución del interdígito respecto al principio del cultivo, se insertó una esfera en el mesénquima distal de esta región, justo debajo del ectodermo en las extremidades de ratón de la etapa de S8, la cual se cultivó por un periodo de 22 horas. Al inicio del cultivo, a las 12 y a las 22 horas se fotografió la ubicación de la esfera, la cual como se observa en la figura adquiere una

posición más proximal conforme avanza el desarrollo de la extremidad en cultivo. Asimismo, a las 12 horas de cultivo, se observa una abundante acumulación de tejido por arriba de la esfera, el cual ya no está a las 24 horas (Figura 14A). Un análisis similar se realizó en la extremidad de pollo, sin embargo, debido a que el crecimiento del embrión es ligeramente más lento las observaciones se hicieron a las 24 y 36 horas de incubación del embrión. Se insertó la esfera en las extremidades de la etapa de 27 de HH. A las 24 horas se observa algo muy similar a lo que ocurre en la extremidad del ratón: una cantidad importante de tejido se concentra arriba de la esfera, siendo menor este tejido a las 36 horas. Ambas observaciones sugieren que las células del mesénquima interdigital inicialmente tienen una posición distal pero, conforme prosigue el desarrollo, adquieren una posición proximal. Para saber si esta hipótesis es correcta, se realizaron experimentos adicionales utilizando marcadores fluorescentes. El compuesto CCSFE es un éster fluorescente, que atraviesa las membranas celulares con facilidad, y en el citoplasma es procesado por enzimas con actividad de esterasas que impiden su salida de la célula (Sun et al., 2000a). Este compuesto se inyectó en las células del mesénquima interdigital más distal de la extremidad del ratón, la cual se cultivó y se observó después de 12 horas. A las 12 horas el colorante se concentra en el mesénquima proximal (datos no mostrados).

Las células de la zona que se encuentra por debajo de la ectodermo distal que expresa *Fgf8* están proliferando activamente. Se hicieron ensayos de incorporación de BrdU para saber si las mismas células del mesénquima distal que proliferan son las que se mueren y posteriormente forman el interdígito. Se sumergieron ambas extremidades del embrión de ratón de la etapa de S9 en una solución de marcaje con BrdU durante 1 hora; después de este tiempo, la extremidad derecha se sumergió en PFA, mientras que la extremidad izquierda se cultivo por 12 horas al término de las cuales también se proceso en el PFA. En ambas extremidades se realizó la inmunohistoquímica para detectar la incorporación de BrdU y al mismo tiempo analizar la fragmentación del DNA. Como se observa en la Figura 14 en el panel C, las células que se marcaron al principio están proliferando y se ubican en el mesénquima distal, es una región muy pequeña que corresponde aproximadamente

a 100 μ M de distancia desde el ectodermo. En la etapa inicial del cultivo, no hay células muriendo como se demuestra por la nula detección de células positivas para el TUNEL (primera línea, segunda columna). Después de 12 horas de cultivo se observa que las células que inicialmente estaban proliferando (porque incorporaron el BrdU) tienen una posición más proximal (Figura 14 panel C, segunda línea primera columna) y, además, la mayoría de éstas células se mueren ya que son positivas para el TUNEL (cabezas de flecha). Lo anterior señala que las mismas células que se encontraban en el mesénquima distal (incorporaron el BrdU) son las que se mueren (TUNEL positivas) y que conforman el interdígito. Esta población de células era la misma que estaba protegida de la muerte celular por el Fgf8 (como lo indica la expresión de la Mkp3).

5.7. La regulación de la fagocitosis interdigital

5.7.1. La Pi3k participa en la fagocitosis de las células del interdígito.

Al analizar la vía de señalización que utiliza el Fgf8 para promover la supervivencia del mesénquima, observamos que en las extremidades de la etapa de S9 el inhibidor de la Pi3k, el LY294002, disminuye la tinción con el AO e incrementa la fragmentación del DNA de las regiones interdigitales (Figura 15). Este efecto es paradójico, ya que usualmente la tinción con AO y el TUNEL correlacionan positivamente. El AO, el Rojo Neutro, el Lysotracker son colorantes que químicamente se comportan como bases. Son sustancias permeables y penetran en todos los compartimentos con membrana; sin embargo, son retenidos al ser por protonados en lugares con ambientes ácidos como los lisosomas (Zucker et al., 1998). Se ha observado que la actividad de los lisosomas incrementa en las regiones en las que hay apoptosis activa, lo cual es coincidente con un aumento en la fagocitosis (Zucker et al., 1999).

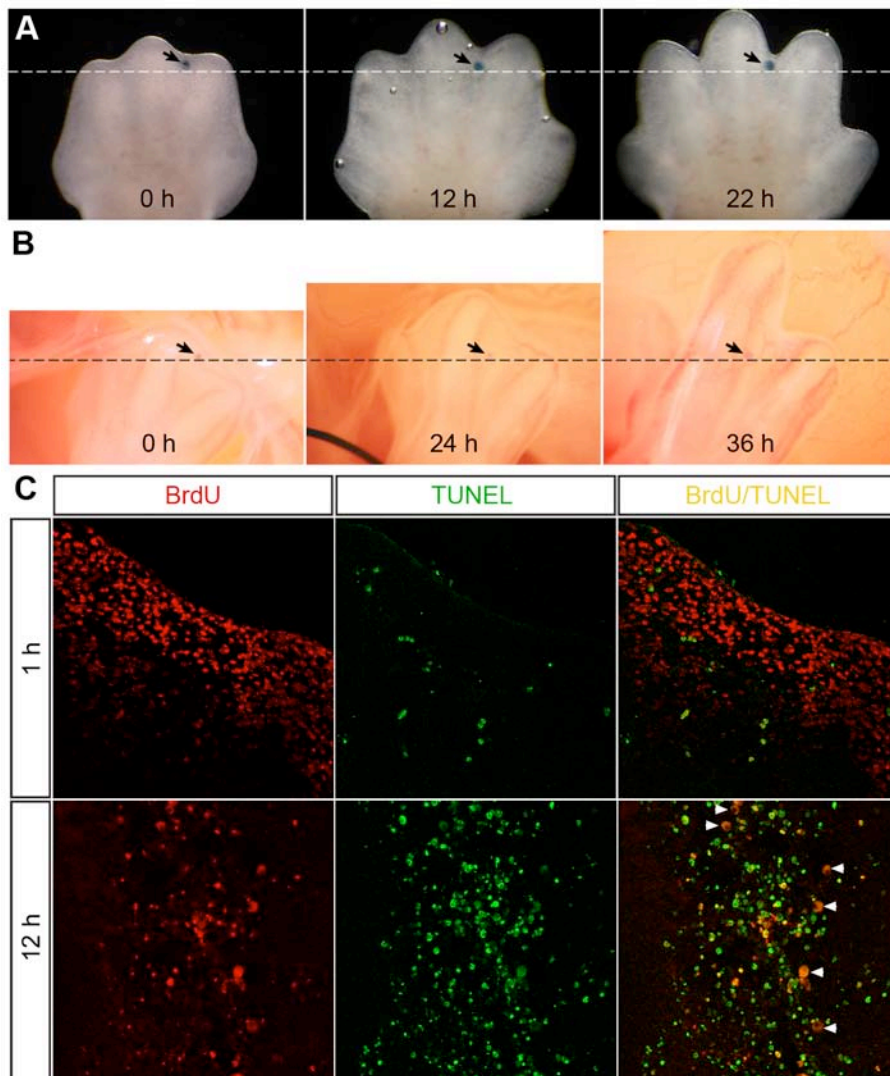


Figura 14. El destino de las células distales de las regiones interdigitales. (A) Una esfera fue implantada en la región distal de las extremidades de la etapa de S8 al momento en que inicia la ICD (0 h). La esfera se usó como referencia (línea punteada) para seguir el crecimiento y la regresión del tejido interdigital durante la ICD en la misma extremidad en cultivo. Después de 12 horas de haberse iniciado la ICD se observa un poco de crecimiento del tejido interdigital. Este tejido regresa a las 10 horas mientras que los dedos siguen creciendo. (B) El mismo procedimiento que en 'A' pero se realizó en las extremidades del pollo. La esfera se implantó en las extremidades de los embriones de la etapa 28, alrededor del inicio de la ICD. La misma extremidad con la esfera implantada se siguió hasta por 36 horas. Similar al ratón, se observó un poco de crecimiento de las regiones interdigitales, el cual se detiene mientras que los dedos se proyectan distalmente. (C) Las células distales de las extremidades de ratones se marcaron mediante cultivar las extremidades 1 hora con BrdU. Las extremidades se cultivaron por otras 12 horas sin BrdU, y se determinó el destino y la muerte de las células por TUNEL. Casi todas las células interdigitales BrdU-positivas se mueren. Las cabezas de flecha indican eritrocitos auto-fluorescentes.

Para saber si la inhibición de la Pi3k modifica las tinciones con otros colorantes lisosomórficos y de esta forma confirmar la regulación de la actividad lisosomal por esta enzima posiblemente asociada al proceso de fagocitosis, se tiñeron las extremidades de la etapa de S9 tratadas con el LY294002 con el Rojo Neutro y el Lysotracker. Se observó que todos producen resultados semejantes, representado por una disminución en todas las tinciones y un incremento en la detección de TUNEL semejante a lo que ocurre con el AO. Un análisis de microscopía electrónica reveló que, a diferencia de las regiones interdigitales control en donde los cuerpos apoptóticos son rodeados o engullidos por un fagocito, las extremidades tratadas con el LY294002 muestran cuerpos apoptóticos libres y no se encuentran asociados con ninguna célula fagocítica (Figura 15 E y F). Por lo tanto, la detección de la actividad lisosomal puede usarse como una medida de la actividad fagocítica en las regiones interdigitales. Como el sistema que estudiamos es un modelo *in vitro* en el que se corta la circulación sanguínea y, por tanto, el flujo de macrófagos podría alterarse fue necesario determinar si son los macrófagos o alguna otras célula las que participan en el engullimiento. Realizamos una inmunohistoquímica para detectar la presencia de macrófagos engullendo a los cuerpos apoptóticos, sin embargo, como se observa no todas las células que engullen a un cuerpo apoptótico expresan la proteína F4/80 característica del macrófago, lo que sugiere que también las células mesenquimales vecinas participan en el engullimiento de las células en apoptosis (Figura 18). De forma consecuente nos referiremos a ambos tipos celulares como fagocitos cuando se refiera a una afectación general.

El defecto en la fagocitosis que produce la inhibición de la Pi3k podría deberse a la ausencia de producción de señales quimioatrayentes por parte de la célula apoptótica o bien por problemas en el reconocimiento y engullimiento de las células apoptóticas por los fagocitos. Para poder discernir entre ambas situaciones, utilizamos el compuesto N-ethyl-maleimide (NEM), el cual inhibe a la amino-fosfolípido-translocasa y provoca que la fosfatidilserina quede expuesta en el lado extracelular de la membrana plasmática de forma constitutiva sin que se produzcan las otras modificaciones bioquímicas de la apoptosis (Elnemr et al., 2000).

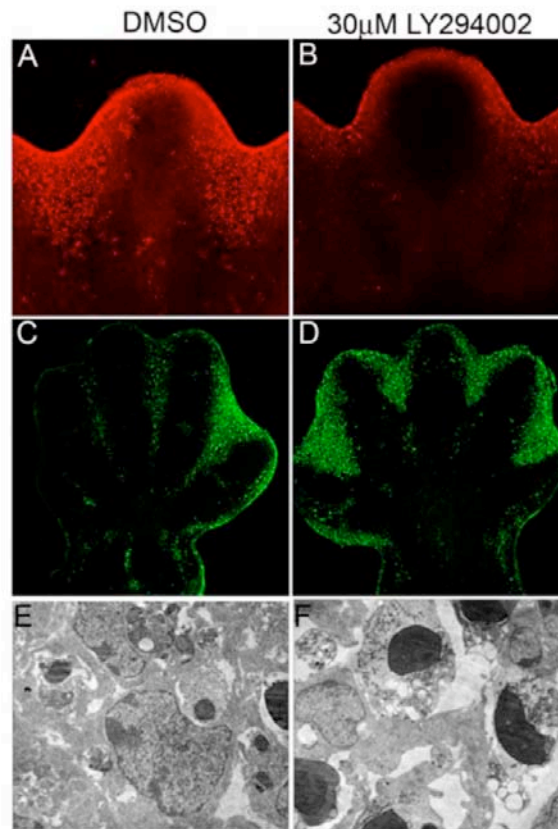


Figura 15. La señalización de la Pi3k durante la fagocitosis interdigital. (A-F) Las extremidades de la etapa de S9 se cultivaron con un inhibidor de la Pi3k (LY294002) ó bien con DMSO durante 8 horas. (A-B) Después del cultivo se determinó la muerte celular mediante AO y mediante TUNEL (C-D). La tinción con el AO disminuye al inhibir a la Pi3k mientras que el TUNEL incrementa. (E-F) Después del cultivo los interdígitos de ambas extremidades con DMSO y con LY294002 se observaron en microscopía electrónica. Se observa que el inhibidor de la Pi3k disminuye el número de cuerpos apoptóticos asociados con algún fagocito.

Este compuesto se ha utilizado en cultivos de líneas celulares, por lo que el primer paso fue realizar una curva de dosis-respuesta con éste en las extremidades de la etapa S8 para observar si promovía la fagocitosis y en qué concentraciones. Se observó que después de 8 horas, el NEM adicionado al medio de cultivo en una concentración de 10-20 μM aumenta la fagocitosis. El cambio es muy sutil al teñir las extremidades de la etapa de S8 con los colorantes del LT y el AO, (Figura 16A), sin embargo, el aumento en la fagocitosis se hace evidente al observar la aparición de puntos más intensos que, al ser analizados mediante microscopía electrónica, se revela que son macrófagos con muchos cuerpos apoptóticos dentro (Figura 16C).

Por tanto, este compuesto resulta adecuado para analizar la fagocitosis en ausencia de apoptosis. Así entonces, se procedió a realizar los cultivos en presencia de los dos compuestos, el NEM para promover la fagocitosis y el LY294002 para saber si aún bajo éstas condiciones se puede inhibir la progresión del proceso. Observamos que en las extremidades de la etapa de S8 y de la S9 el LY294002 inhibe la fagocitosis promovida por el NEM, la cual se observa con un incremento en el número de cuerpos apoptóticos positivos para el TUNEL y una disminución de la tinción con el lysotracker (Figura 17A). Este dato indica que la Pi3k está participando en el proceso inicial de fagocitosis, sin descartar su posible participación en la generación de señales quimioatrayentes por la célula apoptótica.

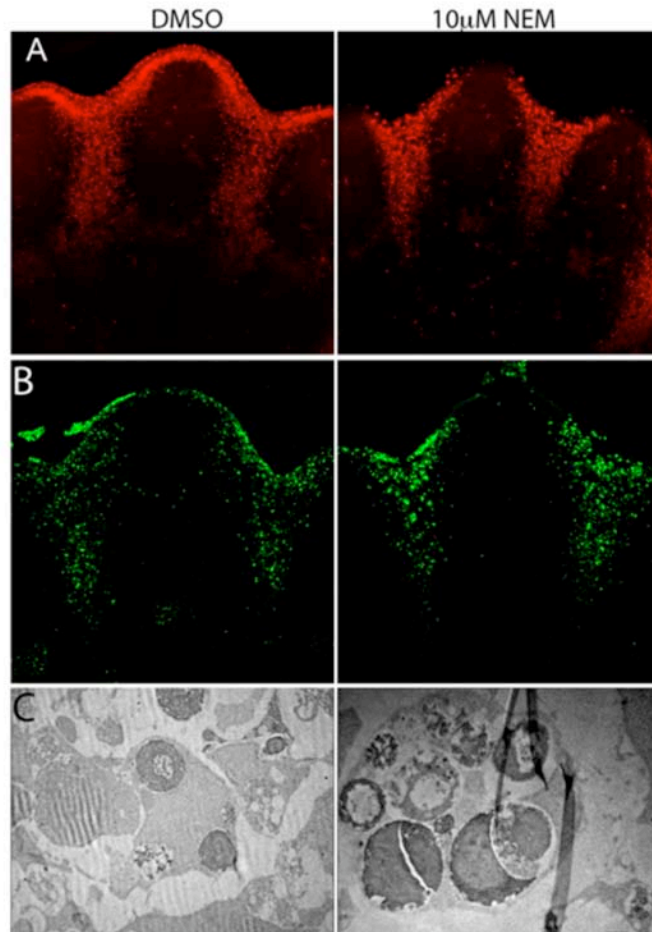


Figura 16. Los efectos de NEM (N-ethylmaleimide) en la fagocitosis interdigital. (A-C) Las extremidades de la etapa S9 se cultivaron durante 8 horas con un inhibidor de la amino-lípido-translocasa (NEM) y (A) se detectó la fagocitosis mediante AO ó (B) mediante TUNEL. Se observa que los cuerpos apoptóticos son más grandes. (C) Los interdígitos de las extremidades se observaron con microscopio electrónico y se observa que los macrófagos engullen más cuerpos apoptóticos (derecha).

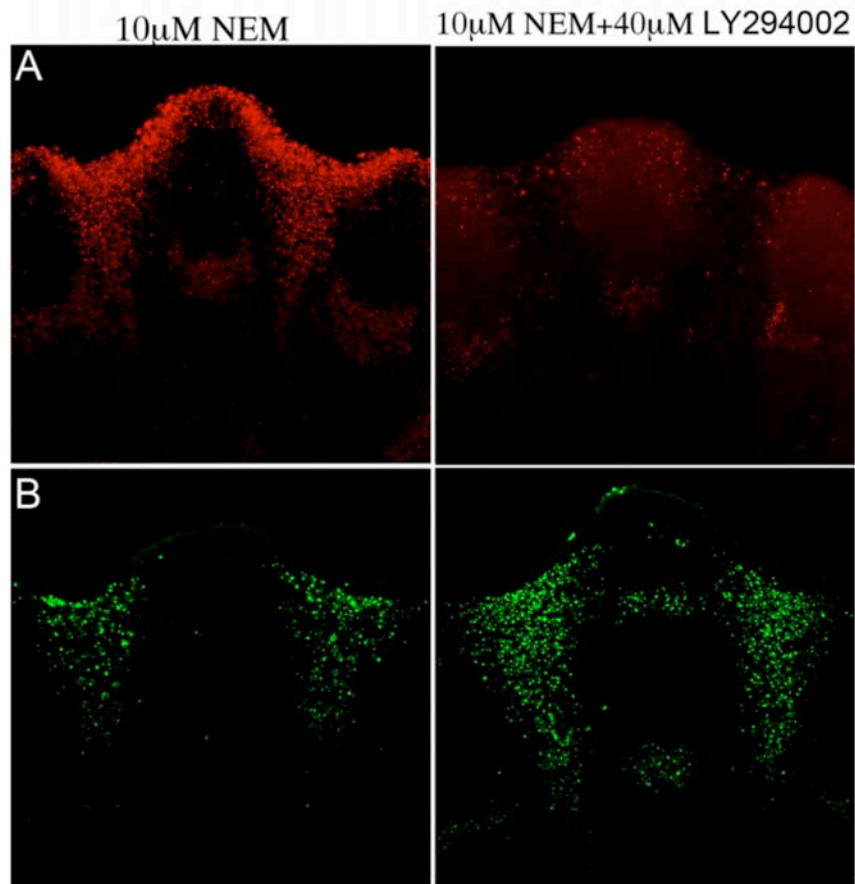


Figura 17. El efecto de la inhibición de la Pi3k en la fagocitosis inducida por NEM. Las extremidades de la etapa S9 se cultivaron durante 8 horas con NEM y DMSO ó con NEM y el inhibidor de la Pi3k (LY294002). Al término del cultivo las extremidades se tiñeron con AO (A) o se procesaron para TUNEL (B). Se observa que la tinción con AO disminuye, mientras que el TUNEL incrementa.

Para observar si el número de macrófagos y la morfología de los mismos se modifica por la presencia de los compuestos anteriores se realizó una inmunohistoquímica para detectar los macrófagos y el TUNEL en los mismos cortes como referencia para observar que los cuerpos apoptóticos no son engullidos. La figura 18 muestra que en presencia del NEM los macrófagos son más grandes y tienen un número mayor de cuerpos apoptóticos en su interior a diferencia del control. En las extremidades que fueron incubadas con el LY294002 se observa que los macrófagos son más pequeños y aparentemente hay menos de ellos (este dato es preliminar y requiere una cuantificación).

La familia de las Pi3k comprende tres clases de enzimas que tienen diferentes subunidades catalíticas así como regulatorias. Dentro de las tipo I se encuentran la Pi3k α , la Pi3k β , la Pi3k δ y la Pi3k γ . Las Pi3k clase II han sido poco estudiadas mientras que las Pi3k tipo III tienen como miembro más representativo a la enzima Vps34, cuyas funciones en autofagia han sido caracterizadas recientemente. (Vanhaesebroeck et al., 2010). Debido a que el inhibidor LY294002 es muy general bloqueando las actividades de casi todas las Pi3k, no es informativo respecto a la Pi3k que potencialmente funcionaría en la fagocitosis que ocurre durante la ICD. En la retina del pollo se observó una acumulación de los cuerpos apoptóticos debido a la inhibición farmacológica de la enzima Vps34 (Mellen et al., 2008) por lo que analizamos si esto podría ocurrir en nuestro sistema. Las extremidades de la etapa de S9 se cultivaron con 3-Methyladenine (3-MA), un compuesto que se reporta inhibe con cierta preferencia a la enzima Vps34 (Miller et al., 2010). Se analizaron los efectos de este compuesto en la fagocitosis mediante el AO, la acumulación de cuerpos apoptóticos a través del TUNEL (Figura en preparación), así también con la llegada y morfología de los macrófagos (Figura 18).

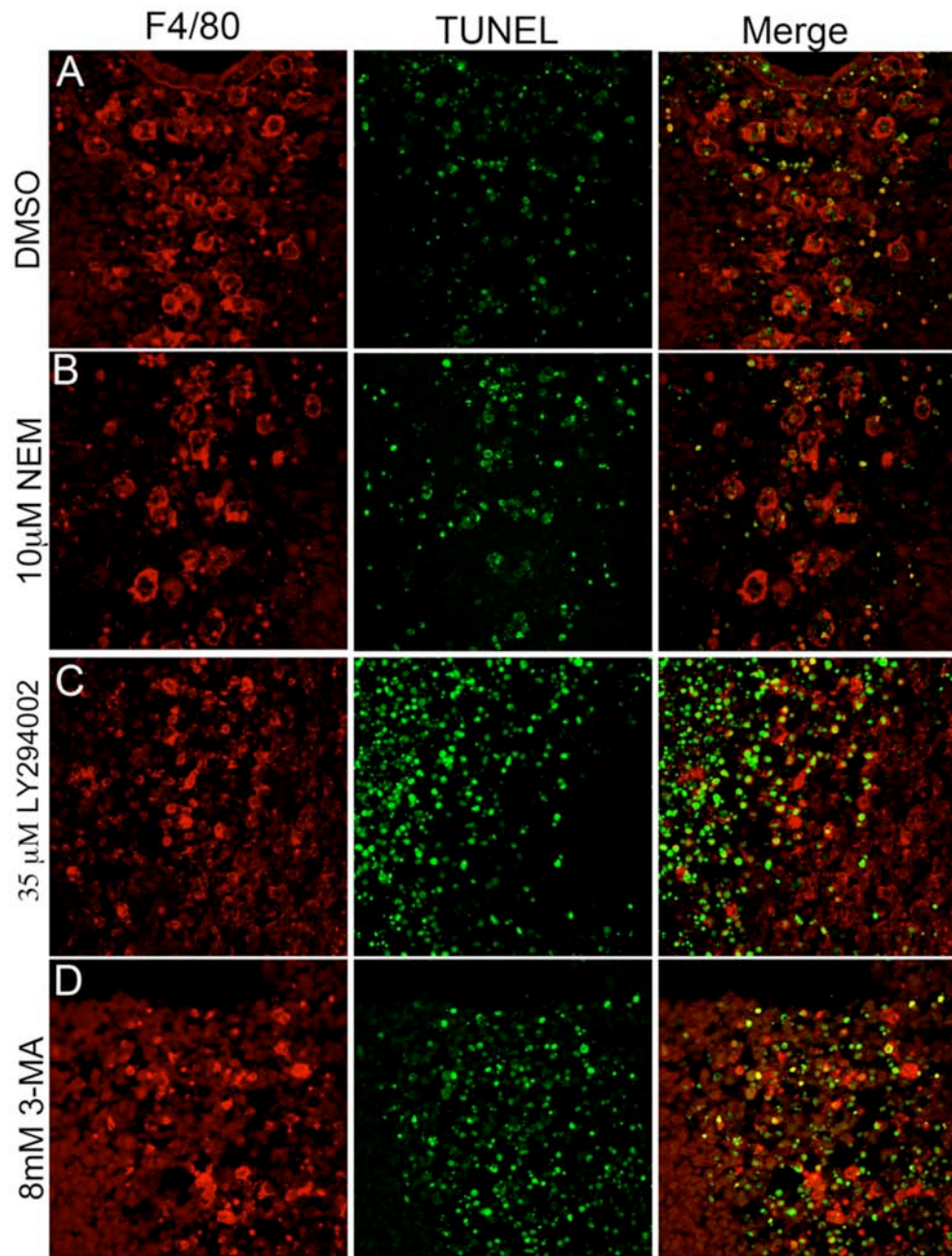


Figura 18. Los efectos de diferentes fármacos en la morfología y cantidad de los macrófagos así como en la apoptosis que ocurre en la ICD. (A-D) Las extremidades de la etapa S9 se cultivaron durante 8 horas con DMSO (A), NEM (B), LY294002 (C) ó bien 3-MA (D). Al término del cultivo las extremidades se seccionaron y se realizó una inmunohistoquímica para detectar a la proteína F4/80 de los macrófagos (rojo) o la fragmentación del DNA mediante el TUNEL (verde). Se observa que con el tratamiento con NEM los macrófagos ingieren un mayor número de cuerpos apoptóticos, y en consecuencia, los macrófagos son más grandes, mientras que el LY294002 y el 3-MA impiden la fagocitosis y por tanto el tamaño de los mismos es menor (merge). La fragmentacion del DNA incrementa por el tratamiento con LY294002 y la 3-MA.

5.7.2. La dinamina participa en la fagocitosis de las células del interdígito.

Un estudio reveló que la Pi3k tipo III también conocida como Vps34 interactúa con la molécula Dinamina (Kinchen et al., 2008). Es posible que el mecanismo de fagocitosis que opera en *C. elegans* se asemeje al que ocurre en el ratón. Para analizar esta posibilidad, se cultivaron las extremidades de la etapa de S9 en medio de cultivo con un inhibidor de la Dinamina (Dynasore) en diferentes concentraciones y se tiñeron con los diferentes colorantes. Se observó que a la concentración de 60 μ M disminuye la tinción con el AO, con el LT y con el NR en las extremidades tratadas. Por otro lado, el efecto sobre la fragmentación del DNA es semejante a lo que ocurre con el inhibidor de la LY294002, es decir, se incrementa la detección con TUNEL (Figura 19). Hasta el momento no sabemos si Pi3k y dinamina actúan en una ruta en común o funcionan en diferentes vías, convergiendo en la regulación de la fagocitosis.

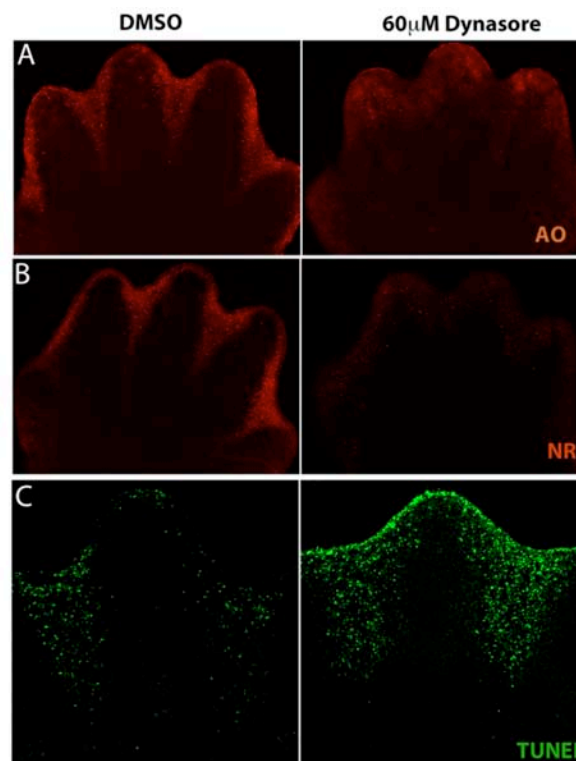


Figura 19. Las funciones de la dinamina durante la fagocitosis de la ICD. (A-C) Las extremidades de la etapa de S9 se cultivaron por 8 horas con un inhibidor de la dinamina (Dynasore) ó con DMSO. Al término del cultivo se analizó la fagocitosis mediante AO (A), NR (B) ó se procesaron para TUNEL (C). Se observa que el AO y el NR disminuyen mientras que la fragmentación del DNA incrementa.

6. DISCUSIÓN

6.1. El *Fgf8* es un factor de supervivencia

El trabajo que realizamos describe un mecanismo mediante el cual se activa la ICD. Nuestros experimentos muestran que la regulación negativa de *Fgf8* es el evento que activa la ICD y que el RA es un inductor esencial de la muerte celular.

Cuatro de los 22 genes de Fgfs que existen en mamíferos se expresan en la AER, el *Fgf4*, el *Fgf9*, el *Fgf17* y el *Fgf8*; no obstante, solo uno de ellos cumple funciones esenciales en el desarrollo de la extremidad, mientras que los otros, al parecer tienen un papel redundante (Mariani et al., 2008). De los Fgfs que se expresan en la AER, el *Fgf8* es el único gen esencial durante la embriogénesis de la extremidad, es el primero en expresarse en las células que formarán la AER y el único cuya desaparición de su expresión ocurre tiempo después de la regresión morfológica de la AER (Fernandez-Teran and Ros, 2008; Mariani et al., 2008). Cuando se realiza la eliminación selectiva de cada uno de los Fgfs de la AER se observa que el patrón del esqueleto de la extremidad solo se altera en los embriones mutantes que no expresan el *Fgf8* (Mariani et al., 2008). Desde hace tiempo se conoce que los Fgfs promueven la supervivencia de diferentes tipos de líneas celulares (Rosfjord and Dickson, 1999; Tamm et al., 1991); durante el desarrollo de la extremidad se observó que la eliminación de la AER provoca que las células del mesénquima se mueran y ésta se evita por la aplicación de *Fgf4* en el mesénquima (Niswander et al., 1993). Sin embargo, recientemente se observó que la eliminación simultánea del *Fgf4* y de *Fgf8* de la AER mata a las células del mesénquima de la extremidad embrionaria (Boulet et al., 2004; Sun et al., 2002). Para mostrar una asociación entre la desaparición de la expresión de *Fgf8* de las regiones interdigitales y el inicio de la ICD hicimos la superposición de dos detecciones, el RNAm de *Fgf8* y el Lysotracker. Ambos se realizaron en la misma muestra para evaluar con mayor precisión la asociación entre los dos fenómenos. La correlación que existe entre la regulación negativa de la expresión de *Fgf8* en el ectodermo del interdígito y la aparición de las células muertas en el mesénquima es evidente. Los límites en donde termina uno y empieza el otro coinciden cercanamente. Para determinar si ocurre lo mismo con la

proteína de *Fgf8* y con las células en apoptosis, se realizó una doble inmunohistoquímica, observando que ambos son excluyentes, es decir, cuando empiezan a disminuir los niveles de *Fgf8* aparecen las primeras células positivas para la caspasa-3. El experimento anterior se realizó para corroborar que la proteína se comporta de forma similar al RNAm, porque en algunos casos se ha detectado que la proteína es capaz de viajar a sitios más lejanos de donde se sintetiza el mensajero. El análisis también se realizó para excluir la posibilidad de que únicamente se estuviera detectando la fagocitosis con el lysotracker (Ver discusión abajo).

Los siguientes experimentos estuvieron encaminados a mostrar que la presencia de *Fgf8* es suficiente para inhibir la activación de la ICD. Aunque ya se reportó que el *Fgf2* y el *Fgf4* son capaces de inhibir la ICD, esto se realizó en la extremidad del pollo y por tanto era necesario probar que el *Fgf8* inhibe la ICD de la extremidad del embrión de ratón. Por otra parte, algunos estudios muestran que sus efectos pueden ser opuestos al modificar el tiempo de incubación (Montero et al., 2001). Por ello, se aplicó el *Fgf8* de forma local en los interdígitos de la extremidad embrionaria del ratón. La inhibición de la ICD que logra el *Fgf8* se detecta desde las 6 horas de cultivo, sin embargo, en este intervalo de tiempo la cantidad de células que se mueren es menor, lo que hace menos evidente el efecto. Cuando se aplican las esferas poco tiempo después de haberse iniciado la ICD se observa que el *Fgf8* ya no protege de la muerte del mesénquima, lo que indica su papel en regular negativamente la activación del proceso.

El *Fgf8* se expresa en el ectodermo pero señala hacia las células del mesénquima, sin embargo, se desconoce como es que llega a éstas células y si la proteína tiene capacidad de difundir. La inmunohistoquímica mostró que la proteína está en la lámina basal del ectodermo; en ninguna etapa analizada se detectó en el mesénquima por lo que, aunque es probable que difunda hacia el mesénquima, esto debe ser en cantidades bajas para ser detectadas por inmunohistoquímica. Los mejores indicadores del área en la cual señalizan los Fgfs y particularmente el *Fgf8* son los patrones de expresión de los genes que codifican para reguladores negativos

de su vía de señalización como son *Mkp3*, *Sprouty* y *Erm*. La expresión de éstos incrementa frente a estímulos de los Fgfs ó bien se disminuye al inhibir su señalización (Tsang and Dawid, 2004). Nosotros analizamos la expresión de la *Mkp3* en las etapas de S8 y de S9 de la extremidad del ratón. Considerando el rango de la expresión de la *Mkp3* como un indicador de la región hasta donde el *Fgf8* señala, se puede concluir que necesariamente tiene que difundir, ya que cubre la región distal del mesénquima. En los estudios en los que se observó que se mueren las células del mesénquima al eliminar la AER se sugiere que la señalización de los Fgfs abarca un rango de 100 μ M por debajo de la AER (Tabin and Wolpert, 2007); otros estudios indican que podrían ser hasta 200 μ M (Dudley et al., 2002). Existe cierta controversia respecto a las células que se mueren cuando se elimina selectivamente a los Fgfs de la que ocurre al extirpar a la AER. La eliminación de la AER produce la muerte de las células del mesénquima distal (Dudley et al., 2002), mientras que al anular la expresión de *Fgf4* y de *Fgf8* aparentemente se mueren células del mesénquima proximal (Sun et al., 2002). En nuestros experimentos las células que se mueren siempre son las distales y la hipótesis de nuestro trabajo no podría sustentarse si la muerte se iniciara en la región proximal. Pensamos que en los embriones mutantes las células que se mueren también son las distales, sin embargo, la ubicación de éstas en la región proximal podría deberse a un efecto de la proliferación y de la compensación de los otros Fgfs de la AER. La explicación sería la siguiente: en el embrión doble mutante *Fgf8*^{-/-}; *Fgf4*^{-/-} las células distales de la extremidad son sensibles a la ausencia de ambos genes y se mueren, sin embargo, en ese momento los otros Fgfs de la AER suplen sus funciones permitiendo que la extremidad siga proliferando. Como resultado las células muertas se ubican en una posición proximal.

Otro punto a discusión es la vía de señalización que el *Fgf8* enciende para provocar sus diferentes respuestas durante el desarrollo de la extremidad. Se ha reportado que el *Fgf8* puede activar dos vías: la ruta clásica depende de las Mapk las cuales inician una serie de fosforilaciones de proteínas siendo uno de los blancos en ésta vía la cinasa Erk1/2, la cual media la inducción de la expresión de *Mkp3*, que es un

regulador negativo de la vía (Tsang and Dawid, 2004). La otra propuesta es más controversial, y sugiere que por el contrario, la activación de Erk1/2 en el mesénquima mata a las células y para que esto no ocurra el Fgf8 a través de la vía de la Pi3k promueve la expresión de la fosfatasa *Mkp3*, quien se encargaría de desfosforilar a Erk1/2 en el mesénquima (Kawakami et al., 2003). Esta teoría presenta ciertos puntos débiles que dificultan su sustento aún en la extremidad del pollo donde fue analizada. Por ejemplo, suponen que la forma fosforilada de Erk1/2 mata, sin embargo, se ha observado que dicha versión de la proteína se encuentra en el mesénquima distal en la zona que prolifera activamente (Li et al., 2007). Por otra parte, el sustento de la activación de la Pi3k hacia la *Mkp3* es solo a nivel transcripcional y no explican que otros blancos serían los que regularan esta acción. Ambas vías la de Mapk y de Pi3k funcionan durante el desarrollo de la extremidad, pero solo la segunda se involucró directamente en la supervivencia del mesénquima mediada por el Fgf8. Fue sorprendente observar que la expresión de la *Mkp3* no se disminuye, sino que se incrementa ligeramente al inhibir a la Pi3k en las extremidades de S8 y de S9, siendo el incremento mayor por la combinación de Fgf8 exógeno más el inhibidor de la Pi3k. A pesar de ello, se analizaron los efectos que éste compuesto genera en la muerte celular del mesénquima y en la regulación de la supervivencia por el Fgf8 exógeno. Pensamos que los efectos de la inhibición de Pi3k no se explican por un requerimiento de esta molécula dentro de la señalización de Fgf8; se deben más bien, a la participación de ésta en la regulación de la fagocitosis. Una discusión más detallada se encontrará más adelante.

Contrario a lo que ocurre al inhibir a la Pi3k, el U0126 si disminuye la fosforilación de Erk1/2 y también la expresión de la *Mkp3*, lo cual sugiere que esta es la vía que utiliza el Fgf8 para regular la expresión de esta fosfatasa. El punto más importante a analizar es si esta ruta se requiere para impedir la muerte de las células. Observamos que la inhibición de Mek provoca que se muera el mesénquima que es responsivo al Fgf8 de las extremidades de la etapa de S8 y de S9. Además resalta el hecho de que el Fgf8 exógeno se comporta de la misma forma que el endógeno, ya que para fomentar la supervivencia del mesénquima interdigital depende de la fosforilación de Erk1/2. Una observación importante es que el número de células

que se mueren al inhibir la fosforilación de Erk1/2 es menor respecto a las que se mueren con el inhibidor de los Fgfr. Sin embargo, es preciso considerar que el compuesto SU5402 inhibe a todos los receptores a Fgf con lo cual se incluyen no solamente la señalización de Fgf8, sino también la de otros Fgfs que provienen de la AER o directamente del mesénquima. En este sentido, es más específico el efecto que produce la inhibición de Mek, incluso pudiera ser un indicativo de que la señalización detectada de esta forma proviene exclusivamente de Fgf8.

Nuestras observaciones no sustentan el modelo tal y como ha sido descrito de la activación de la supervivencia de Fgf8 por la vía de la Pi3k. Este modelo predice que donde hay expresión de la *Mkp3* no debe de encontrarse Erk1/2 fosforilado; nosotros observamos que ambas señales coinciden. Además contempla que la forma fosforilada de Erk1/2 en el mesénquima mata a las células; por el contrario, nosotros observamos que la inhibición de la fosforilación activa la muerte del mesénquima distal.

El Fgf8 es un gen singular, no solamente para el desarrollo de la extremidad. Se expresa y realiza diferentes funciones en regiones del embrión que se reconocen como centros organizadores. Por ejemplo, la expresión de Fgf8 en las células precursoras del sistema cardiovascular promueve su diferenciación, su proliferación y su supervivencia (Park et al., 2006); mientras que en el istmo romboencefálico, el Fgf8 permite que las células del neuroepitelio sobrevivan y que se formen las estructuras derivadas del metencéfalo y del mesencéfalo (Chi et al., 2003).

6.2.El RA y su participación en la ICD.

El RA es un compuesto que se requiere durante el desarrollo del embrión de ratón para promover la adquisición de diferentes destinos celulares (Duester, 2008). Su señalización se regula a través de promover su síntesis en el lugar y momento en que se requiera, y también vía la activación de su degradación en las zonas que son sensibles a este compuesto (Niederreither and Dolle, 2008). Particularmente durante el desarrollo de la extremidad, la enzima *Raldh2* se requiere para la síntesis del RA en los sitios en que su gen se expresa, como son la PLM y el mesodermo

somítico (Niederreither et al., 2002). Por el contrario, la enzima *Cyp26b1* inactiva el RA en el mesénquima distal (Yashiro et al., 2004), ambas actividades enzimáticas generan una distribución del RA en forma de gradiente en todo el eje próximo-distal. En la extremidad embrionaria la zona más sensible a la muerte inducida por el RA es el mesénquima distal (Alles and Sulik, 1989). Este efecto se considera como teratogénico y está relacionado con altas concentraciones de esta molécula. Esto es lo que se observa en nuestros experimentos, las células que se mueren se encuentran en los sitios de proliferación activa donde el Fgf8 señala, como es el mesénquima que subyace al ectodermo distal y más tarde el de la punta de los dedos.

Es difícil determinar el tejido que sintetiza activamente el RA. En embriología para inferir la presencia de este compuesto se utilizan herramientas indirectas como la expresión de las enzimas que se encuentran en la última fase de su síntesis y genes reporteros fusionados a secuencias RARE (Niederreither and Dolle, 2008). En el autópodo en la etapa de S6 (11,5dpc) se reportó que el RA se distribuye de forma homogénea, sin embargo, no se ha estudiado como pudiera distribuirse en etapas posteriores. Nosotros observamos que *Raldh2* se expresa en el mesénquima proximal y en los interdígitos en la etapa S9, mientras que parte de la expresión de los receptores de *Rar α* , y de *Rar γ* se localiza en las regiones interdigitales.; por otra parte la enzima *Cyp26b1* se expresa en las condensaciones condrogénicas del mesénquima distal. Estos patrones de expresión indirectamente sugieren una distribución no homogénea del RA, al parecer sería más abundante en las regiones interdigitales y proximales mientras que las regiones distales serían las susceptibles a su señalización. En nuestros experimentos mostramos que se requiere del RA para regular la ICD de la extremidad del ratón ya que el antagonista de los receptores Rar la disminuye. Por otra parte, realizamos una serie de experimentos utilizando fármacos que inhiben a cada una de las isoformas de los receptores al RA, observando que ninguno de ellos inhibe la ICD; lamentablemente no pudimos probar el inhibidor del receptor Rar γ . Sin embargo, como los otros fármacos no

tuvieron efecto, proponemos que este es el receptor que media las acciones de RA en el interdígito, tal y como otros reportes lo han propuesto basados en los fenotipos de los embriones mutantes que carecen conjuntamente de los receptores Rar β y Rar γ (Dupe et al., 1999) .

Existen una serie de antecedentes en los que se propone que el RA activa la ICD de la extremidad a través de inducir la expresión de los *Bmps*, particularmente de *Bmp4* y de *Bmp7*. Ambos genes a su vez incrementan la expresión de los genes *Msx1/2* (Rodriguez-Leon et al., 1999). Nuestros experimentos no corroboran esta vía de activación de la ICD. Si bien es cierto, que la expresión de *Bmp7* se incrementa por el RA en las extremidades de las etapas de S8 y de S9, la regulación positiva de su expresión no ocurre en las regiones que se mueren por la acción del RA. Asimismo, la aplicación local de Noggin, un antagonista de los *Bmps*, no evita la ICD fisiológica ni tampoco la que se incrementa por el RA añadido. Ambas observaciones invitan a pensar que el RA mata a las células directamente ó a través de otras moléculas diferentes a los *Bmps*. Una de las moléculas dependientes del RA podría ser *Bax*. En diferentes contextos y tipos celulares, se ha observado que la activación de *Bax* produce la entrada inevitable de la célula hacia la apoptosis (Keeble and Gilmore, 2007). En nuestros experimentos observamos que contrario a lo que sucede con la expresión de *Bmp7*, la de *Bax* se incrementa en los mismos sitios en los cuales el RA provoca la muerte del mesénquima, además observamos que la expresión endógena de *Bax* en los interdígitos de las extremidades de la etapa de S9 requiere de la señalización del RA través de los receptores del tipo RAR. Suponemos que el incremento en la expresión de *Bax* es suficiente para activar la expresión de los genes pro-apoptóticos de la familia de *Bcl2*, lo que modificaría la balanza hacia un destino apoptótico. Este aumento de la expresión de *Bax* por el RA podría ser directo, ya que su promotor tiene elementos de respuesta a los RAR. Es probable que la activación de *Bax* y de *Bak* sean de los últimos eventos que se requieran para la degeneración del tejido interdigital, ya que en los ratones mutantes adultos que no se expresan ambos se observa sindactilia (Lindsten et al., 2000). Sin embargo,

aún sería necesario evaluar directamente la ICD en éstos embriones mutantes. También analizamos una posible regulación transcripcional del RA hacia algunos miembros anti-apoptóticos de la familia de Bcl2 como son *Bcl2* y *Bclxl*. Considerando el patrón de expresión, el único que podría regular negativamente la ICD es *Bclxl*; sin embargo, no observamos ninguna modificación en su expresión cuando se adicionó el RA. Por otra parte, se ha reportado que algunos miembros de la familia de Bcl2 necesitan estar fosforilados en residuos de aminoácidos particulares para proteger de la muerte celular (Ruvolo et al., 2001), por lo que no se descarta una posible regulación en este nivel.

Recientemente se reportó que el RA se necesita para que la extremidad delantera inicie su formación, no obstante, el RA es dispensable para la especificación de los tipos celulares, ya que la extremidad trasera se desarrolla normalmente (Zhao et al., 2009). Adicionalmente, se propone que el RA tiene que inhibir la expresión de Fgf8 del Mesodermo Intermedio (IM) para iniciar la formación de la extremidad delantera. Esta observación es un indicio más a nuestro favor del antagonismo entre las moléculas. Si bien no ocurre al nivel que nosotros lo analizamos se resalta la necesidad de funciones contrapuestas entre éstas moléculas. Por otra parte, en otro reporte se muestra que la ICD se reduce en la extremidad trasera de los embriones que no expresan la *Raldh2* en las regiones interdigitales (Zhao et al., 2010). Esta publicación apoya fuertemente nuestra teoría, además también muestran datos que coinciden con nuestras observaciones como el hecho de que la expresión de Fgf8 en la AER no se modifica y que disminuye la expresión de *Bmp7* en los interdígitos. Hubiera sido interesante analizar en su conjunto las otras moléculas que nosotros reportamos, como la expresión de la *Cyp26b1* y de *Bax* en el mesénquima interdigital así como el estado de fosforilación de Erk1/2.

6.3. La señalización antagónica entre el RA y el Fgf8 en la ICD.

Una vez que revelamos las funciones que tenían el Fgf8 y el RA en el mesénquima interdigital, formulamos la hipótesis de que ambas podrían estar actuando en una

vía en común de regulación de la activación de la ICD. El modelo es el siguiente: el *Fgf8* regula negativamente la señalización del RA en el mesénquima interdigital y a causa de la progresión en el desarrollo (o debido a la represión transcripcional controlada por otra molécula, i.e. Bmps) cesa la expresión de éste en el interdígito. Este evento libera la inhibición que ejerce el Fgf8 hacia el RA, este último señala en el interdígito y provoca que las células se mueran. Para probar experimentalmente el modelo se cultivaron las extremidades en presencia de ambos compuestos. Observamos que el Fgf8 es suficiente para inhibir la muerte celular inducida por el RA, hecho que lo ubica por arriba de la cascada de señalización y como uno de los principales reguladores negativos de la ICD. Surge entonces la necesidad de explicar como es que el Fgf8 logra regular la señalización del RA. Pensamos que el Fgf8 podría crear zonas libres del RA a través de regular negativamente su concentración, tal y como se ha postulado que lo hace para permitir el desarrollo distal de la extremidad (Mercader et al., 2000). Observamos que el Fgf8 controla negativamente la síntesis del RA a través de reprimir la expresión de la *Raldh2* en las regiones interdigitales. Además, el Fgf8 promueve la degradación de esta molécula, vía la inducción de la expresión de la *Cyp26b1* en el mesénquima. Se ha visto que la sola inducción de la expresión de la *Cyp26a1* produce que diferentes tipos celulares sean resistentes a una variedad de estímulos apoptóticos (Osanai and Petkovich, 2005). Advertimos que los efectos antagónicos de Fgf8 hacia el RA son dependientes de la dosis. Frente a altas concentraciones del RA, el Fgf8 es incapaz de proteger a las células del mesénquima. ¿Cómo mata el RA en éstas condiciones a las células?. Consideramos que el antagonismo podría también ocurrir en la dirección opuesta. Analizamos algunos de los elementos de la señalización de Fgf8 y observamos que el RA los reprime. En las extremidades cultivadas con el RA la expresión de Fgf8 no se modifica pero se regulan negativamente la expresión del *Fgfr1* y también la fosforilación de Erk1/2. Lo anterior indica que el antagonismo ocurre en ambas direcciones.

No solamente durante la activación de la ICD el RA y el Fgf8 realizan funciones opuestas. Se observó que en la morfogénesis de la extremidad el RA inhibe la

proliferación y la condrogénesis de los precursores mesenquimales (Rodriguez-Leon et al., 1999), mientras que el Fgf8 estimula ambos procesos (Yu and Ornitz, 2008). Además el RA induce la adquisición de fenotipos proximales a través de regular positivamente la expresión de los genes *Meis1/2*, mientras que el Fgf8 además de ser un factor de supervivencia y de proliferación, también instruye a las células de la extremidad para que adquieran una identidad distal reprimiendo a los genes *Meis1/2* (Mariani et al., 2008; Mercader et al., 2000). La suma de éstas observaciones destacan la relevancia fisiológica del antagonismo entre el RA y el Fgf8 en el control de la activación de la ICD. Asimismo una señalización antagónica entre el Fgf8 y el RA ocurre durante la formación de otras estructuras del embrión. Se ha visto que durante la formación del eje antero-posterior del tronco del embrión, el RA especifica los fenotipos posteriores e inhibe a los factores que dictan el destino anterior como el Fgf8 (Abu-Abed et al., 2001).

6.4. La participación de los *Bmps* en la ICD.

A pesar de que existen muchas evidencias que involucran a los *Bmps* como activadores de la ICD nuestros experimentos indican que no lo hacen en el mesénquima directamente. Observamos que Noggin aplicado en el interdígito aún después de 12 horas de cultivo no evita la ICD. Adicionalmente se cultivaron las extremidades con un fármaco recientemente descrito de nombre Dorsomorphin el cual disminuye la fosforilación de las Smad1/5/8 de los interdígitos pero no afecta la ICD. Lo anterior se puede explicar si se consideran los patrones de expresión de los elementos de señalización de los *Bmps*. Contrario a lo que se piensa, solo algunos de los genes de respuesta de los *Bmps* se expresan en el interdígito. Por ejemplo, el receptor *Bmpr1a* se expresa en el ectodermo desde que inicia el desarrollo de la extremidad y el receptor *Bmpr1b* en las condensaciones condrogénicas (Ahn et al., 2001; Zou et al., 1997). Además no es real que exista una co-localización entre las células que se mueren y la expresión de los *Bmps*, ya que como nuestro análisis muestra, las primeras células en morirse se localizan en la región distal y cuando

esto ocurre *Bmp7* y *Bmp2* se expresan en la región proximal, en tanto que *Bmp4* se expresa en el mesénquima de los dedos y el ectodermo distal. Por otra parte, la disminución de la ICD que se observa en los embriones mutantes de los elementos de los Bmps sólo se genera cuando la expresión de éstas moléculas se eliminan del ectodermo. Es así que los embriones mutantes en los que se anuló la expresión del *Bmpr1a* (*Bmpr1a*^{-/-}), ó la de *Bmp2* y de *Bmp4* (*Bmp2*^{-/-}; *Bmp4*^{-/-}) en el ectodermo tienen una menor ICD (Maatouk et al., 2009; Pajni-Underwood et al., 2007). Esto también se observa en los embriones transgénicos en los que se sobre-expresa Noggin en el ectodermo (Guha et al., 2002; Wang et al., 2004). Asimismo en todos éstos embriones mutantes y transgénicos siempre se detectó la persistencia de la expresión de *Fgf8* en el ectodermo interdigital. Meditamos que esta era la causa de la menor ICD, ya que en etapas tempranas del desarrollo de la extremidad, los Bmps regulan negativamente la actividad de la AER y promueven su regresión (Pizette and Niswander, 1999). Sin embargo, la persistencia de la expresión de *Fgf8* podría ser un evento secundario, producto de alterar una serie de moléculas antes que este gen. Por ello fue necesario mostrar dentro de una ventana de tiempo limitada la asociación entre los tres procesos, la disminución de la señal de los Bmps en el ectodermo, la permanencia de la expresión de *Fgf8* en el ectodermo interdigital y la disminución en la ICD. Para probarlo utilizamos dos estrategias la infección del ectodermo con un adenovirus que sobre-expresa Noggin acoplado a un reportero y la de cultivar la extremidades con el fármaco Dorsomorphin. Bajo ambas condiciones observamos que la expresión de *Fgf8* se mantiene y con ello se reduce la ICD. Esto indica que los Bmps señalizan negativamente sobre el *Fgf8* para promover la ICD. El receptor que mediría éstas señales es el *Bmpr1a* en el ectodermo y los únicos Bmps que aquí se expresan y que podrían funcionar como sus ligandos son *Bmp2* y *Bmp4*. Algunos estudios argumentan que los Bmps que se sintetizan en el mesénquima podrían llegar al ectodermo, unirse al receptor e inhibir la ICD. En nuestros experimentos en ratón, esta posibilidad queda descartada ya que aún bloqueando la señalización con Noggin en el mesénquima, la ICD no se disminuye. Los experimentos con Dorsomorphin generaron cierta controversia ya que al ser añadida al medio de cultivo se pueden inhibir a los Bmps del ectodermo y a los del

mesénquima; sin embargo solamente en la etapa de S8+ observamos que se disminuye la ICD, fenómeno que no ocurre en la etapa de S9. La explicación para este resultado se encuentra en el estado de expresión de *Fgf8* debido a la etapa de desarrollo; en la etapa de S8+ el *Fgf8* se sigue expresando en el ectodermo interdigital y esta a punto de iniciar su regresión, en este momento todavía puede actuar la dorsomorphin para inhibir a las Smad1/5/8 e impedir la disminución de *Fgf8*. En la etapa de S9 la regulación negativa de *Fgf8* ya ocurrió y mecanismos epigenéticos pudieran impedir que se revierta su represión.

Es muy interesante observar que el mecanismo de regulación negativa de la ICD por el *Fgf8* podría estar conservado. El tejido interdigital de la extremidad del pollo es más grande y para que se degeneren necesitan ocurrir dos regiones de ICD, una que inicia en la región proximal y otra en la distal convergiendo al final ambas (Fernandez-Teran et al., 2006). Nosotros observamos que en la extremidad del pollo la administración local de *Noggin* bloquea la ICD del mesénquima distal pero al mismo tiempo se observa una regulación positiva de la expresión de *Fgf8* en el ectodermo. Mientras que la ICD proximal si requiere de los Bmps (i.e., se inhibe por *Noggin*), pero es independiente de la señalización de *Fgf8*. Estas diferencias podrían estar relacionadas con el tamaño de la extremidad; talvez y la ola de muerte de la región proximal es independiente de la regulación por este factor porque esta más lejos del ectodermo. Es probable que en el curso de la evolución se haya perdido la muerte proximal en la extremidad del ratón. En otros organismos se ha visto que se requiere de dos tipos de señales de supervivencia para mantener las membranas interdigitales. Por ejemplo, en el ala del embrión de murciélago se observó que es sensible a la muerte del mesénquima interdigital mediada por los Bmps, sin embargo, este tejido no se muere debido a una fuerte e inusual expresión de *Fgf8* en el mesénquima interdigital además de la conocida expresión de este factor en el ectodermo. Asimismo en éstas regiones se detecta una expresión abundante de *Gremlin*, ambas moléculas, el *Fgf8* y *Gremlin* en el mesénquima interdigital del ala del murciélago impiden su muerte (Weatherbee et al., 2006). En el embrión de pato se reportó que la expresión de *Gremlin* se mantiene por más tiempo en el interdígito

a diferencia de la extremidad del embrión de pollo (Merino et al., 1998). Resultaría interesante analizar que ocurre con la expresión de *Fgf8* en éstas extremidades y si puede asociarse a ello la menor ICD que se observa.

Cuando se describen los embriones mutantes en los que no se separaron los dedos se utiliza el término de sindactilia. Pensamos que el uso de este término es ambiguo. Algunos autores utilizan el término de sindactilia para hacer alusión a los dedos unidos por un cartílago o bien por hueso; mientras que otros lo usan para referirse a la presencia de una membrana interdigital. Consideramos que es importante no referirse al mismo concepto cuando el fenotipo generado se deben a la inhibición de diferentes procesos. Por ejemplo, en los ratones adultos mutantes en *Bax*^{-/-}; *Bak*^{-/-} los dedos están separados pero conservan una pequeña porción de tejido similar a una membrana interdigital, mientras que en los ratones en los que se sobre-expresa *Noggin* en el ectodermo, los dedos están unidos en sus regiones laterales (Wang et al., 2004). La sindactilia que pensamos debiera observarse al inhibir solamente la ICD sería más parecida a la primera, mientras que la segunda también podría explicarse por la continua proliferación de las células del interdígito y del dedo debido a la persistencia de *Fgf8*.

6.5. La formación del Interdígito de la extremidad embrionaria.

Los datos generados por nuestros experimentos no se explican por el modelo clásico de formación del interdígito. Las células que se mueren del mesénquima interdigital forman un triángulo invertido (Salas-Vidal et al., 2001). Como se mostró, el *Fgf8* señala solo en el área distal cubriendo una región muy pequeña. Esto llevaría a considerar que un área muy grande del interdígito estaría fuera del alcance de la señalización de *Fgf8* y, por tanto, la muerte en esta región requeriría un mecanismo diferente al propuesto. Para explicarlo formulamos la hipótesis de que el interdígito con su forma de triángulo invertido no existe *per se* en un momento dado, sino más bien es producto de una serie de procesos que incluyen la proliferación, el crecimiento diferencial de los dedos y de la acumulación de las células muertas. La

contribución que hace el crecimiento de los dedos para la separación de los mismos, ya fue reportada con anterioridad (Salas-Vidal et al., 2001). Sin embargo, el hecho de que son pocas las células del interdígito que se mueren y que todas se originan de la región distal es una nueva contribución a la propuesta anterior. Para determinar el origen de las células del interdígito, se observó la formación del mismo en la extremidad del ratón y del pollo en diferentes intervalos en un periodo de 24 y 48 horas respectivamente. Para determinar cual fue el crecimiento respecto al principio se marco la posición inicial con una esfera, la cual permanece estática en el lugar insertado. Los resultados indican que hay más células por arriba de la esfera en el interdígito en las primeras horas analizadas y en las últimas etapas que coinciden con la desaparición del interdígito estas células ya no están. En conjunto estas observaciones sugieren que el interdígito se va formando en un periodo de 24 horas para la extremidad del ratón y de 48 para la del pollo. Debido a que las células se acumularon por arriba de la esfera es probable que éstas provengan de la región distal. Para probarlo y determinar el destino de éstas células, se realizó un doble marcaje con el BrdU y el TUNEL. Observamos que las células que incorporaron el BrdU en un inicio (primera hora), son las que posteriormente se mueren y se acumulan en el interdígito. Las primeras en morir tendrían una posición más proximal respecto a las que se mueren después, y de esta manera el interdígito se va formando producto de la acumulación de las células muertas. Para obtener más evidencias al respecto, se marcaron las células del interdígito y la punta de los dedos con el compuesto CCSFE. Después de 12 horas se observaron dos eventos importantes, el marcaje en el interdígito se va haciendo proximal mientras que el de la punta de los dedos se va perdiendo. Algo similar ocurre con el BrdU. Posterior a las 12 horas la marca de las células de la punta de los dedos ya no es tan fuerte. Está reportado que ambas marcas se retienen en las células pero su intensidad disminuye conforme las células se dividen; en nuestros experimentos esto significaría que las células de la punta de los dedos proliferan en periodos no mayores a las 12 horas. Nuestro grupo de trabajo se encuentra realizando una serie de experimentos para analizar si ocurre un acortamiento del ciclo celular en las células del mesénquima de la extremidad.

Consideramos que es necesario modificar el modelo clásico donde un tejido interdigital pre-formado degenera por la muerte de las células. Nuestra propuesta es un modelo dinámico que describe como la formación del interdígito se acopla a la morfogénesis de la extremidad. Este nuevo modelo implica que se deben analizar nuevamente los patrones de expresión de los genes que se suponen activadores de la ICD, ya que deberían de coincidir con esa pequeña franja de células que son protegidas por el Fgf8. Nuestros resultados sustentan la idea de una señal que promueve directamente la muerte de las células (i.e. RA), sin embargo, adicionalmente se requiere de la regulación negativa de las señales de supervivencia para que se inicie la ICD (i.e. Fgf8) (Figura 20). Se ha propuesto que el destino de las células en general es morirse y que para evitar este destino las células deben de proveerse de señales de supervivencia (Finegan et al., 2009). Esta idea puede ser retomada y se aplica muy bien en nuestro modelo de activación de la ICD. La señal constante de la muerte es el RA y se neutraliza por acción de Fgf8; solo en ausencia de éste es posible que se active la ICD.

El modelo de la morfogénesis próximo-distal al que mejor se adaptan nuestras observaciones es el de las dos señales. Este establece que el RA proveniente de la región proximal promueve la adquisición de este fenotipo a través de antagonizar a la señal distal de los Fgfs que se sintetizan en la AER (Mariani et al., 2008). Nuestra hipótesis señala que el RA responsable de la ICD proviene de las regiones interdigitales proximales. En el caso de Fgf8, el modelo sugiere que actúa contraponiéndose a este agente proximalizante a través de promover la supervivencia y la distalización de las células del mesénquima. Nosotros observamos que cuando el RNAm de Fgf8 se regula negativamente, las células del mesénquima se mueren y, además, ya no forman parte de los elementos distales, acumulándose en el interdígito proximal. Ambas observaciones coinciden perfectamente con lo que el modelo predice.

6.6. La regulación de la fagocitosis de las células del interdígito.

Un evento inseparable del proceso apoptótico es la fagocitosis de las células apoptóticas por los macrófagos o bien por células vecinas; este evento impide que se generen respuestas inflamatorias (Ravichandran and Lorenz, 2007). Los mismos mecanismos que dirigen el proceso de fagocitosis de las células apoptóticas en otros tejidos debieran operar para regular el engullimiento de los cuerpos apoptóticos del interdígito. Fue casual el observar que la inhibición de la Pi3k producía la acumulación de las células positivas para el TUNEL y disminuía la tinción con el AO; sin embargo, nuestros experimentos demuestran que claramente esta enzima tiene un papel en la regulación de la fagocitosis. Debido a que el LY294002 actúa de manera general no provee datos a acerca de la Pi3k que potencialmente se está inhibiendo. Actualmente nos encontramos realizando experimentos con diferentes fármacos a fin de encontrar la isoforma de la Pi3k catalítica responsable de los efectos en la fagocitosis.

Algunos autores han observado que al inhibir a ciertas moléculas de la autofagia como Atg12, Beclina ó Vps34 se produce un fenotipo similar al que nosotros observamos, consistente en la acumulación de los cuerpos apoptóticos y la ausencia de engullimiento en diferentes modelos del desarrollo, como los cuerpos embrionarios ó bien durante la muerte de las células de la retina en desarrollo (Mellen et al., 2008; Qu et al., 2007). En ambos casos no se producen las señales de engullimiento, como la producción del lípido liso-fosfatidil-colina ni la exposición de Anexina-V en la membrana de los cuerpos apoptóticos. Estos datos indican que la autofagia es un evento necesario para generar la energía en forma de ATP que se requiere para señalizar y promover el engullimiento. La estrategia que siguió uno de los estudios fue genética vía la eliminación de la expresión de Beclina y de Atg12, mientras que el otro fue farmacológico utilizando la 3-Metil-adenina (3-MA). Intentamos seguir esta hipótesis en nuestro sistema y observamos que el compuesto 3-MA produce resultados similares a los que provoca el LY294002. Adicionalmente ambos estudios utilizan el compuesto methyl piruvate (MP) para sobrepasar la formación de ATP. En ambos casos se observa el rescate del fenotipo, es decir, se

promueve la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos. Nosotros, utilizamos el MP y no se promovió el engullimiento de los cuerpos apoptóticos en las regiones interdigitales. Esto sugiere que tal vez el evento molecular asociado al fenotipo que ellos observan es diferente del nuestro. Sin embargo, sus observaciones también podrían explicarse a través de las nuestras. Existen datos que muestran que la apoptosis es dependiente del ATP, no obstante, el incremento de éste compuesto ocurre mucho antes de que la célula inicie las modificaciones bioquímicas de la apoptosis (Zamaraeva et al., 2005).

Aún permanece sin resolverse si la Dinamina funciona en la misma vía de la Pi3k para engullir a los cuerpos apoptóticos. No obstante, es claro es que ésta molécula realiza la misma función en otros organismos que han aportado mucha información para entender el proceso apoptótico como *Caenorhabditis elegans*. Actualmente se siguen realizando cultivos de las extremidades de la etapa de S9 con los diferentes fármacos que inhiben a las otros miembros de las Pi3k clase I; es probable que en corto tiempo podamos encontrar cual de los miembros de la Pi3k es el responsable de la regulación de la fagocitosis.

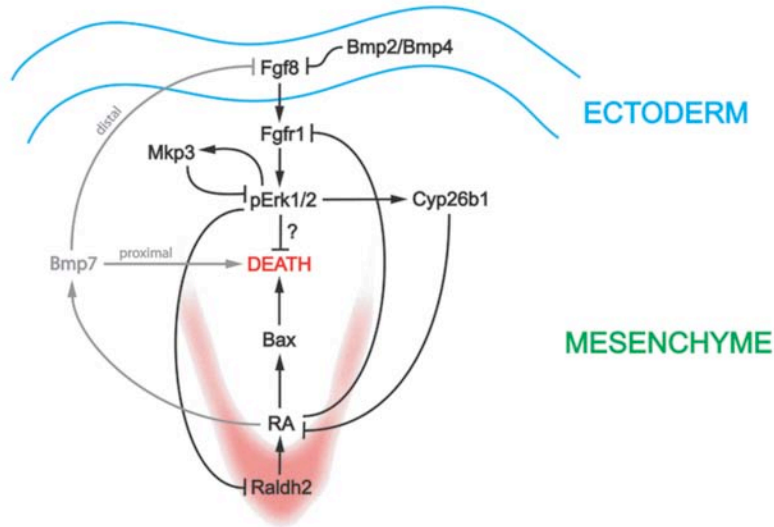
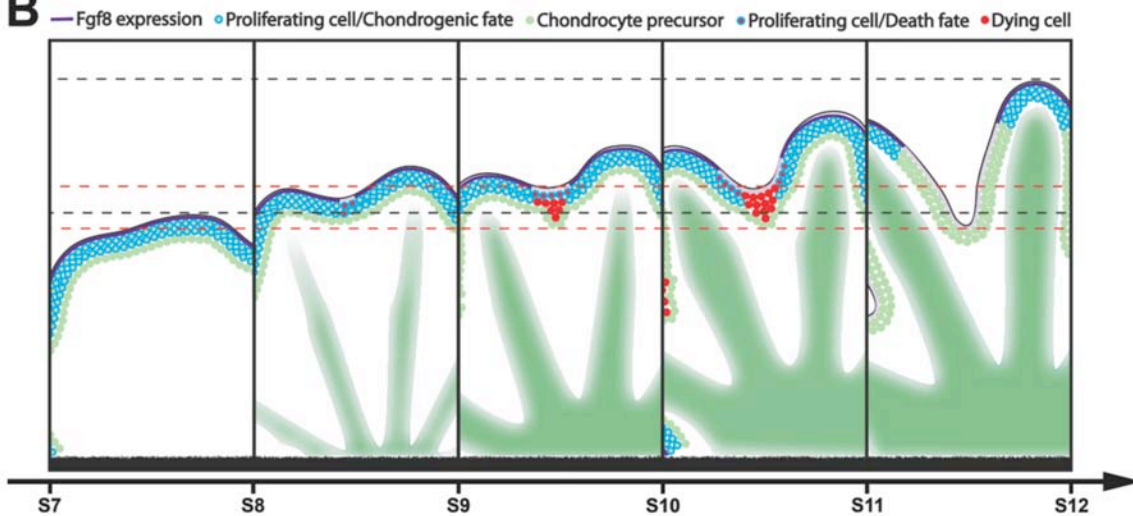
A**B**

Figura 20. Modelos moleculares y celulares del proceso de ICD. (A) Interacción antagónica entre el Fgf8 y el RA al momento de la ICD. El RA en este modelo es la señal persistente de muerte que actúa continuamente en el mesénquima distal, mientras el Fgf8 es el factor de supervivencia que se requiere para promover el crecimiento distal. El Fgf8 mantiene los niveles del RA bajos y mantiene la supervivencia y proliferación del mesénquima distal a través de activar la vía de las Mapk. Cuando la extremidad llega a la etapa en la cual inicia la ICD la expresión del *Fgf8* se regula-negativamente posiblemente debido a un incremento en la actividad de los Bmps en el ectodermo distal y como consecuencia los niveles del RA se incrementan. El RA antagoniza la vía de supervivencia de las Mapk a través de reducir los niveles del *Fgfr1* de Erk1/2 fosforilado y de activar la expresión de *Bax*. En el pollo, el *Bmp7* del mesénquima también regula negativamente la expresión del *Fgf8* activando la ICD distal, pero sus funciones en el control de la ICD proximal son independientes del Fgf8. (B) La ICD es progresiva. Contrario a la idea de que la ICD ocurre en un tejido pre-formado, nosotros proponemos que la ICD ocurre progresivamente conforme la extremidad crece, permitiendo la proyección distal de los dedos. Después de la regulación negativa del *Fgf8* (de púrpura oscuro a púrpura claro), las células interdigitales que proliferan están destinadas a morir, mientras que las células del dedo que sobreviven siguen el destino condrogénico. Las líneas negras y rojas punteadas son referencias para visualizar el crecimiento del dedo y del interdígito respectivamente.

7. CONCLUSIONES

- La regulación negativa de la expresión de *Fgf8* es el evento que activa la ICD de la extremidad del ratón.
- El *Fgf8* es un factor de supervivencia del tejido interdigital, señala a través de la vía de las Mapk.
- El *Fgf8* inhibe la ICD a través de regular negativamente las concentraciones del RA; este factor reprime la expresión de *Raldh2* y de *Cyp26b1* en el mesénquima interdigital.
- El RA promueve la muerte de las células del mesénquima distal e interdigital de la extremidad del ratón, por lo menos, a través de la inducción de la expresión de *Bax*.
- El RA se opone a la señalización de *Fgf8* en la extremidad del ratón, vía la regulación negativa de la expresión del *Fgfr1* y de la fosforilación de Erk1/2.
- La señalización de los Bmps en el mesénquima interdigital no se requiere para la activación de la ICD de la extremidad del ratón.
- Los Bmps, particularmente *Bmp2* y *Bmp4* regulan la ICD a través de promover la represión de la expresión de *Fgf8* en el ectodermo interdigital.
- La ICD distal de la extremidad del pollo se activa por la regulación negativa de *Fgf8* del ectodermo interdigital por los Bmps; mientras que la ICD proximal de la extremidad del pollo requiere de la señalización de los Bmps en el mesénquima interdigital y es independiente de la señalización de *Fgf8*.
- El *Fgf8* promueve la supervivencia del mesénquima interdigital del pollo y del ratón y a ello se asocia un incremento en la expresión del gen de *Msx2*.
- Las células que se mueren en el interdígito provienen del mesénquima distal de la extremidad.
- Las células interdigitales que se mueren se acumulan en las regiones proximales del interdígito y provienen de la región distal, es decir, son las mismas que eran responsivas a la señalización por el *Fgf8*.
- La Pi3k participa en la fagocitosis de las células del interdígito.
- La proteína Dinamina regula la fagocitosis del tejido interdigital.

8. PERSPECTIVAS.

- Analizar mediante ensayos de inmuno-precipitación de la cromatina si ocurre in vivo la interacción del RA con la región promotora de *Bax*, como lo predice el programa MatInspector.
- Analizar la probable regulación de la expresión endógena de *Bak* por el RA.
- Determinar si el *Fgf8* regula la expresión de los receptores al RA tipo RAR, principalmente el *Rarg*.
- Observar si algunos otros elementos de la familia de *Bcl2* (e.g. *Bim*) pudieran ser regulados por el *Fgf8* y el RA.
- Determinar si la expresión del receptor *Bmpr1a* se modifica por el *Fgf8* ó bien por el RA.
- Analizar si alguno de los genes de la familia de *Wnt* por su patrón de expresión pudieran ser participes en la ICD.
- Determinar cual de las isoformas catalíticas de la *Pi3k* (*Pi3k α* , *Pi3k β* , *Pi3k γ* ó *Vps34*) regula la fagocitosis durante la ICD.
- Determinar si la molécula de *Pi3k* y la molécula de *Dinamina* participan en una vía en común de la regulación de la fagocitosis interdigital.

9. Bibliografía.

- Abu-Abed, S., Dolle, P., Metzger, D., Beckett, B., Chambon, P. and Petkovich, M.** (2001). The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. *Genes Dev* **15**, 226-40.
- Acevedo, V. D., Ittmann, M. and Spencer, D. M.** (2009). Paths of FGFR-driven tumorigenesis. *Cell Cycle* **8**, 580-8.
- Agarwal, P., Wylie, J. N., Galceran, J., Arkhitko, O., Li, C., Deng, C., Grosschedl, R. and Bruneau, B. G.** (2003). Tbx5 is essential for forelimb bud initiation following patterning of the limb field in the mouse embryo. *Development* **130**, 623-33.
- Ahn, K., Mishina, Y., Hanks, M. C., Behringer, R. R. and Crenshaw, E. B., 3rd.** (2001). BMPR-IA signaling is required for the formation of the apical ectodermal ridge and dorsal-ventral patterning of the limb. *Development* **128**, 4449-61.
- Alles, A. J. and Sulik, K. K.** (1989). Retinoic-acid-induced limb-reduction defects: perturbation of zones of programmed cell death as a pathogenetic mechanism. *Teratology* **40**, 163-71.
- Bandyopadhyay, A., Tsuji, K., Cox, K., Harfe, B. D., Rosen, V. and Tabin, C. J.** (2006). Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet* **2**, e216.
- Barrow, J. R., Thomas, K. R., Bousadia-Zahui, O., Moore, R., Kemler, R., Capecchi, M. R. and McMahon, A. P.** (2003). Ectodermal Wnt3/beta-catenin signaling is required for the establishment and maintenance of the apical ectodermal ridge. *Genes Dev* **17**, 394-409.
- Bell, E., Saunders, J. W., Jr. and Zwilling, E.** (1959). Limb development in the absence of ectodermal ridge. *Nature* **184(Suppl 22)**, 1736-7.
- Boisvert, C. A.** (2005). The pelvic fin and girdle of Panderichthys and the origin of tetrapod locomotion. *Nature* **438**, 1145-7.
- Boulet, A. M., Moon, A. M., Arenkiel, B. R. and Capecchi, M. R.** (2004). The roles of Fgf4 and Fgf8 in limb bud initiation and outgrowth. *Dev Biol* **273**, 361-72.
- Capdevila, J. and Izpisua Belmonte, J. C.** (2001). Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 87-132.
- Charite, J., McFadden, D. G. and Olson, E. N.** (2000). The bHLH transcription factor dHAND controls Sonic hedgehog expression and establishment of the zone of polarizing activity during limb development. *Development* **127**, 2461-70.
- Chautan, M., Chazal, G., Cecconi, F., Gruss, P. and Golstein, P.** (1999). Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr Biol* **9**, 967-70.
- Chi, C. L., Martinez, S., Wurst, W. and Martin, G. R.** (2003). The isthmus organizer signal FGF8 is required for cell survival in the prospective midbrain and cerebellum. *Development* **130**, 2633-44.
- Chipuk, J. E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. J. and Green, D. R.** (2010). The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* **37**, 299-310.

- Christofori, G.** (2003). Split personalities: the agonistic antagonist Sprouty. *Nat Cell Biol* **5**, 377-9.
- Clarke, P. G.** (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* **181**, 195-213.
- Conradt, B.** (2009). Genetic control of programmed cell death during animal development. *Annu Rev Genet* **43**, 493-523.
- Corson, L. B., Yamanaka, Y., Lai, K. M. and Rossant, J.** (2003). Spatial and temporal patterns of ERK signaling during mouse embryogenesis. *Development* **130**, 4527-37.
- Dahn, R. D. and Fallon, J. F.** (2000). Interdigital regulation of digit identity and homeotic transformation by modulated BMP signaling. *Science* **289**, 438-41.
- Dolle, P., Ruberte, E., Leroy, P., Morriss-Kay, G. and Chambon, P.** (1990). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. *Development* **110**, 1133-51.
- Dudley, A. T., Ros, M. A. and Tabin, C. J.** (2002). A re-examination of proximodistal patterning during vertebrate limb development. *Nature* **418**, 539-44.
- Duester, G.** (2008). Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* **134**, 921-31.
- Dupe, V., Ghyselinck, N. B., Thomazy, V., Nagy, L., Davies, P. J., Chambon, P. and Mark, M.** (1999). Essential roles of retinoic acid signaling in interdigital apoptosis and control of BMP-7 expression in mouse autopods. *Dev Biol* **208**, 30-43.
- Eblaghie, M. C., Lunn, J. S., Dickinson, R. J., Munsterberg, A. E., Sanz-Ezquerro, J. J., Farrell, E. R., Mathers, J., Keyse, S. M., Storey, K. and Tickle, C.** (2003). Negative feedback regulation of FGF signaling levels by Pyst1/MKP3 in chick embryos. *Curr Biol* **13**, 1009-18.
- Elnemr, A., Ohta, T., Yachie, A., Fushida, S., Ninomiya, I., Nishimura, G. I., Yamamoto, M., Ohkuma, S. and Miwa, K.** (2000). N-ethylmaleimide-enhanced phosphatidylserine externalization of human pancreatic cancer cells and immediate phosphatidylserine-mediated phagocytosis by macrophages. *Int J Oncol* **16**, 1111-6.
- Fallon, J. F., Lopez, A., Ros, M. A., Savage, M. P., Olwin, B. B. and Simandl, B. K.** (1994). FGF-2: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. *Science* **264**, 104-7.
- Fernandez-Teran, M. and Ros, M. A.** (2008). The Apical Ectodermal Ridge: morphological aspects and signaling pathways. *Int J Dev Biol* **52**, 857-71.
- Fernandez-Teran, M. A., Hinchliffe, J. R. and Ros, M. A.** (2006). Birth and death of cells in limb development: a mapping study. *Dev Dyn* **235**, 2521-37.
- Ferrari, D., Lichtler, A. C., Pan, Z. Z., Dealy, C. N., Upholt, W. B. and Koshier, R. A.** (1998). Ectopic expression of Msx-2 in posterior limb bud mesoderm impairs limb morphogenesis while inducing BMP-4 expression, inhibiting cell proliferation, and promoting apoptosis. *Dev Biol* **197**, 12-24.
- Finegan, K. G., Wang, X., Lee, E. J., Robinson, A. C. and Tournier, C.** (2009). Regulation of neuronal survival by the extracellular signal-regulated protein kinase 5. *Cell Death Differ* **16**, 674-83.

Freitas, R., Zhang, G. and Cohn, M. J. (2007). Biphasic Hoxd gene expression in shark paired fins reveals an ancient origin of the distal limb domain. *PLoS One* **2**, e754.

Galli, A., Robay, D., Osterwalder, M., Bao, X., Benazet, J. D., Tariq, M., Paro, R., Mackem, S. and Zeller, R. (2010). Distinct roles of Hand2 in initiating polarity and posterior Shh expression during the onset of mouse limb bud development. *PLoS Genet* **6**, e1000901.

Grotewold, L., Plum, M., Dildrop, R., Peters, T. and Ruther, U. (2001). Bambi is coexpressed with Bmp-4 during mouse embryogenesis. *Mech Dev* **100**, 327-30.

Guha, U., Gomes, W. A., Kobayashi, T., Pestell, R. G. and Kessler, J. A. (2002). In vivo evidence that BMP signaling is necessary for apoptosis in the mouse limb. *Dev Biol* **249**, 108-20.

Hasson, P., Del Buono, J. and Logan, M. P. (2007). Tbx5 is dispensable for forelimb outgrowth. *Development* **134**, 85-92.

Hernandez-Martinez, R., Castro-Obregon, S. and Covarrubias, L. (2009). Progressive interdigital cell death: regulation by the antagonistic interaction between fibroblast growth factor 8 and retinoic acid. *Development* **136**, 3669-78.

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

Hinchliffe, J. R. and Ede, D. A. (1973). Cell death and the development of limb form and skeletal pattern in normal and wingless (ws) chick embryos. *J Embryol Exp Morphol* **30**, 753-72.

Hutcheson, J., Scatizzi, J. C., Bickel, E., Brown, N. J., Bouillet, P., Strasser, A. and Perlman, H. (2005). Combined loss of proapoptotic genes Bak or Bax with Bim synergizes to cause defects in hematopoiesis and in thymocyte apoptosis. *J Exp Med* **201**, 1949-60.

Itoh, N. and Ornitz, D. M. (2004). Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet* **20**, 563-9.

Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., Sasaki, T., Elia, A. J., Cheng, H. Y., Ravagnan, L. et al. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**, 549-54.

Kawakami, Y., Capdevila, J., Buscher, D., Itoh, T., Rodriguez Esteban, C. and Izpisua Belmonte, J. C. (2001). WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. *Cell* **104**, 891-900.

Kawakami, Y., Rodriguez-Leon, J., Koth, C. M., Buscher, D., Itoh, T., Raya, A., Ng, J. K., Esteban, C. R., Takahashi, S., Henrique, D. et al. (2003). MKP3 mediates the cellular response to FGF8 signalling in the vertebrate limb. *Nat Cell Biol* **5**, 513-9.

Keeble, J. A. and Gilmore, A. P. (2007). Apoptosis commitment--translating survival signals into decisions on mitochondria. *Cell Res* **17**, 976-84.

Kinchen, J. M., Doukometzidis, K., Almendinger, J., Stergiou, L., Tosello-Tramont, A., Sifri, C. D., Hengartner, M. O. and Ravichandran, K. S. (2008). A pathway for phagosome maturation during engulfment of apoptotic cells. *Nat Cell Biol* **10**, 556-66.

Kurose, H., Bito, T., Adachi, T., Shimizu, M., Noji, S. and Ohuchi, H. (2004). Expression of Fibroblast growth factor 19 (Fgf19) during chicken embryogenesis

and eye development, compared with Fgf15 expression in the mouse. *Gene Expr Patterns* **4**, 687-93.

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

Lewandoski, M., Sun, X. and Martin, G. R. (2000). Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nat Genet* **26**, 460-3.

Li, C., Scott, D. A., Hatch, E., Tian, X. and Mansour, S. L. (2007). Dusp6 (Mkp3) is a negative feedback regulator of FGF-stimulated ERK signaling during mouse development. *Development* **134**, 167-76.

Li, C., Xu, X., Nelson, D. K., Williams, T., Kuehn, M. R. and Deng, C. X. (2005). FGFR1 function at the earliest stages of mouse limb development plays an indispensable role in subsequent autopod morphogenesis. *Development* **132**, 4755-64.

Li, L. Y., Luo, X. and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95-9.

Lindsten, T., Ross, A. J., King, A., Zong, W. X., Rathmell, J. C., Shiels, H. A., Ulrich, E., Waymire, K. G., Mahar, P., Frauwirth, K. et al. (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* **6**, 1389-99.

Loomis, C. A., Kimmel, R. A., Tong, C. X., Michaud, J. and Joyner, A. L. (1998). Analysis of the genetic pathway leading to formation of ectopic apical ectodermal ridges in mouse Engrailed-1 mutant limbs. *Development* **125**, 1137-48.

Lu, P., Yu, Y., Perdue, Y. and Werb, Z. (2008). The apical ectodermal ridge is a timer for generating distal limb progenitors. *Development* **135**, 1395-405.

Maatouk, D. M., Choi, K. S., Bouldin, C. M. and Harfe, B. D. (2009). In the limb AER Bmp2 and Bmp4 are required for dorsal-ventral patterning and interdigital cell death but not limb outgrowth. *Dev Biol* **327**, 516-23.

Macias, D., Ganan, Y., Ros, M. A. and Hurle, J. M. (1996). In vivo inhibition of programmed cell death by local administration of FGF-2 and FGF-4 in the interdigital areas of the embryonic chick leg bud. *Anat Embryol (Berl)* **193**, 533-41.

MacLean, G., Abu-Abed, S., Dolle, P., Tahayato, A., Chambon, P. and Petkovich, M. (2001). Cloning of a novel retinoic-acid metabolizing cytochrome P450, Cyp26B1, and comparative expression analysis with Cyp26A1 during early murine development. *Mech Dev* **107**, 195-201.

Maden, M. (1982). Vitamin A and pattern formation in the regenerating limb. *Nature* **295**, 672-5.

Mann, R. K. and Beachy, P. A. (2004). Novel lipid modifications of secreted protein signals. *Annu Rev Biochem* **73**, 891-923.

Mariani, F. V., Ahn, C. P. and Martin, G. R. (2008). Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning. *Nature* **453**, 401-5.

Mariani, F. V. and Martin, G. R. (2003). Deciphering skeletal patterning: clues from the limb. *Nature* **423**, 319-25.

Mark, M., Ghyselinck, N. B. and Chambon, P. (2006). Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid

signaling pathway during mouse embryogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**, 451-80.

Martin, G. R. (1998). The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes Dev* **12**, 1571-86.

Matsuzawa, A. and Ichijo, H. (2001). Molecular mechanisms of the decision between life and death: regulation of apoptosis by apoptosis signal-regulating kinase 1. *J Biochem* **130**, 1-8.

McFadden, D. G., McAnally, J., Richardson, J. A., Charite, J. and Olson, E. N. (2002). Misexpression of dHAND induces ectopic digits in the developing limb bud in the absence of direct DNA binding. *Development* **129**, 3077-88.

Melendez, A. and Neufeld, T. P. (2008). The cell biology of autophagy in metazoans: a developing story. *Development* **135**, 2347-60.

Mellen, M. A., de la Rosa, E. J. and Boya, P. (2008). The autophagic machinery is necessary for removal of cell corpses from the developing retinal neuroepithelium. *Cell Death Differ* **15**, 1279-90.

Mercader, N. (2007). Early steps of paired fin development in zebrafish compared with tetrapod limb development. *Dev Growth Differ* **49**, 421-37.

Mercader, N., Leonardo, E., Piedra, M. E., Martinez, A. C., Ros, M. A. and Torres, M. (2000). Opposing RA and FGF signals control proximodistal vertebrate limb development through regulation of Meis genes. *Development* **127**, 3961-70.

Merino, R., Ganan, Y., Macias, D., Economides, A. N., Sampath, K. T. and Hurle, J. M. (1998). Morphogenesis of digits in the avian limb is controlled by FGFs, TGFbetas, and noggin through BMP signaling. *Dev Biol* **200**, 35-45.

Merino, R., Ganan, Y., Macias, D., Rodriguez-Leon, J. and Hurle, J. M. (1999). Bone morphogenetic proteins regulate interdigital cell death in the avian embryo. *Ann N Y Acad Sci* **887**, 120-32.

Meyer, N., Kim, S. S. and Penn, L. Z. (2006). The Oscar-worthy role of Myc in apoptosis. *Semin Cancer Biol* **16**, 275-87.

Michaud, J. L., Lapointe, F. and Le Douarin, N. M. (1997). The dorsoventral polarity of the presumptive limb is determined by signals produced by the somites and by the lateral somatopleure. *Development* **124**, 1453-63.

Miller, S., Tavshanjian, B., Oleksy, A., Perisic, O., Houseman, B. T., Shokat, K. M. and Williams, R. L. (2010). Shaping development of autophagy inhibitors with the structure of the lipid kinase Vps34. *Science* **327**, 1638-42.

Min, H., Danilenko, D. M., Scully, S. A., Bolon, B., Ring, B. D., Tarpley, J. E., DeRose, M. and Simonet, W. S. (1998). Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to *Drosophila* branchless. *Genes Dev* **12**, 3156-61.

Minguillon, C., Del Buono, J. and Logan, M. P. (2005). Tbx5 and Tbx4 are not sufficient to determine limb-specific morphologies but have common roles in initiating limb outgrowth. *Dev Cell* **8**, 75-84.

Montero, J. A., Ganan, Y., Macias, D., Rodriguez-Leon, J., Sanz-Ezquerro, J. J., Merino, R., Chimal-Monroy, J., Nieto, M. A. and Hurle, J. M. (2001). Role of FGFs in the control of programmed cell death during limb development. *Development* **128**, 2075-84.

Montero, J. A. and Hurle, J. M. (2010). Sculpturing digit shape by cell death. *Apoptosis* **15**, 365-75.

Moon, A. M., Boulet, A. M. and Capecchi, M. R. (2000). Normal limb development in conditional mutants of *Fgf4*. *Development* **127**, 989-96.

Moon, A. M. and Capecchi, M. R. (2000). *Fgf8* is required for outgrowth and patterning of the limbs. *Nat Genet* **26**, 455-9.

Naiche, L. A. and Papaioannou, V. E. (2003). Loss of *Tbx4* blocks hindlimb development and affects vascularization and fusion of the allantois. *Development* **130**, 2681-93.

Ng, J. K., Kawakami, Y., Buscher, D., Raya, A., Itoh, T., Koth, C. M., Rodriguez Esteban, C., Rodriguez-Leon, J., Garrity, D. M., Fishman, M. C. et al. (2002). The limb identity gene *Tbx5* promotes limb initiation by interacting with *Wnt2b* and *Fgf10*. *Development* **129**, 5161-70.

Niederreither, K. and Dolle, P. (2008). Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nat Rev Genet* **9**, 541-53.

Niederreither, K., Vermot, J., Schuhbaur, B., Chambon, P. and Dolle, P. (2002). Embryonic retinoic acid synthesis is required for forelimb growth and anteroposterior patterning in the mouse. *Development* **129**, 3563-74.

Niswander, L., Tickle, C., Vogel, A., Booth, I. and Martin, G. R. (1993). FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell* **75**, 579-87.

Ohkubo, Y., Chiang, C. and Rubenstein, J. L. (2002). Coordinate regulation and synergistic actions of BMP4, SHH and FGF8 in the rostral prosencephalon regulate morphogenesis of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience* **111**, 1-17.

Osanai, M. and Petkovich, M. (2005). Expression of the retinoic acid-metabolizing enzyme CYP26A1 limits programmed cell death. *Mol Pharmacol* **67**, 1808-17.

Pajni-Underwood, S., Wilson, C. P., Elder, C., Mishina, Y. and Lewandoski, M. (2007). BMP signals control limb bud interdigital programmed cell death by regulating FGF signaling. *Development* **134**, 2359-68.

Park, E. J., Ogden, L. A., Talbot, A., Evans, S., Cai, C. L., Black, B. L., Frank, D. U. and Moon, A. M. (2006). Required, tissue-specific roles for *Fgf8* in outflow tract formation and remodeling. *Development* **133**, 2419-33.

Penalosa, C., Orlanski, S., Ye, Y., Entezari-Zaher, T., Javdan, M. and Zakeri, Z. (2008). Cell death in mammalian development. *Curr Pharm Des* **14**, 184-96.

Pennimpede, T., Cameron, D. A., MacLean, G. A. and Petkovich, M. (2010). Analysis of *Cyp26b1/Rarg* compound-null mice reveals two genetically separable effects of retinoic acid on limb outgrowth. *Dev Biol* **339**, 179-86.

Pizette, S. and Niswander, L. (1999). BMPs negatively regulate structure and function of the limb apical ectodermal ridge. *Development* **126**, 883-94.

Qiu, Q., Chen, H. and Johnson, R. L. (2009). *Lmx1b*-expressing cells in the mouse limb bud define a dorsal mesenchymal lineage compartment. *Genesis* **47**, 224-33.

Qu, X., Zou, Z., Sun, Q., Luby-Phelps, K., Cheng, P., Hogan, R. N., Gilpin, C. and Levine, B. (2007). Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell* **128**, 931-46.

Ravichandran, K. S. and Lorenz, U. (2007). Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat Rev Immunol* **7**, 964-74.

Revest, J. M., Spencer-Dene, B., Kerr, K., De Moerlooze, L., Rosewell, I. and Dickson, C. (2001). Fibroblast growth factor receptor 2-IIIb acts upstream of Shh and Fgf4 and is required for limb bud maintenance but not for the induction of Fgf8, Fgf10, Msx1, or Bmp4. *Dev Biol* **231**, 47-62.

Riedl, S. J. and Salvesen, G. S. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 405-13.

Robert, B. (2007). Bone morphogenetic protein signaling in limb outgrowth and patterning. *Dev Growth Differ* **49**, 455-68.

Robert, B. and Lallemand, Y. (2006). Anteroposterior patterning in the limb and digit specification: contribution of mouse genetics. *Dev Dyn* **235**, 2337-52.

Rodriguez-Esteban, C., Tsukui, T., Yonei, S., Magallon, J., Tamura, K. and Izpisua Belmonte, J. C. (1999). The T-box genes Tbx4 and Tbx5 regulate limb outgrowth and identity. *Nature* **398**, 814-8.

Rodriguez-Leon, J., Merino, R., Macias, D., Ganan, Y., Santesteban, E. and Hurle, J. M. (1999). Retinoic acid regulates programmed cell death through BMP signalling. *Nat Cell Biol* **1**, 125-6.

Rosfjord, E. C. and Dickson, R. B. (1999). Growth factors, apoptosis, and survival of mammary epithelial cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **4**, 229-37.

Rossant, J., Zirngibl, R., Cado, D., Shago, M. and Giguere, V. (1991). Expression of a retinoic acid response element-hsplacZ transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. *Genes Dev* **5**, 1333-44.

Rowe, D. A., Cairns, J. M. and Fallon, J. F. (1982). Spatial and temporal patterns of cell death in limb bud mesoderm after apical ectodermal ridge removal. *Dev Biol* **93**, 83-91.

Ruvolo, P. P., Deng, X. and May, W. S. (2001). Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia* **15**, 515-22.

Salas-Vidal, E., Valencia, C. and Covarrubias, L. (2001). Differential tissue growth and patterns of cell death in mouse limb autopod morphogenesis. *Dev Dyn* **220**, 295-306.

Sato, T. and Joyner, A. L. (2009). The duration of Fgf8 isthmic organizer expression is key to patterning different tectal-isthmo-cerebellum structures. *Development* **136**, 3617-26.

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**, 628-68.

Savage, M. P., Hart, C. E., Riley, B. B., Sasse, J., Olwin, B. B. and Fallon, J. F. (1993). Distribution of FGF-2 suggests it has a role in chick limb bud growth. *Dev Dyn* **198**, 159-70.

Sekine, K., Ohuchi, H., Fujiwara, M., Yamasaki, M., Yoshizawa, T., Sato, T., Yagishita, N., Matsui, D., Koga, Y., Itoh, N. et al. (1999). Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat Genet* **21**, 138-41.

Sieber, C., Kopf, J., Hiepen, C. and Knaus, P. (2009). Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* **20**, 343-55.

Soshnikova, N., Zechner, D., Huelsken, J., Mishina, Y., Behringer, R. R., Taketo, M. M., Crenshaw, E. B., 3rd and Birchmeier, W. (2003). Genetic interaction between Wnt/beta-catenin and BMP receptor signaling during formation of the AER and the dorsal-ventral axis in the limb. *Genes Dev* **17**, 1963-8.

Summerbell, D. (1974). Interaction between the proximo-distal and antero-posterior co-ordinates of positional value during the specification of positional information in the early development of the chick limb-bud. *J Embryol Exp Morphol* **32**, 227-37.

Sun, D., Griffith, C. M. and Hay, E. D. (2000a). Carboxyfluorescein as a marker at both light and electron microscope levels to follow cell lineage in the embryo. *Methods Mol Biol* **135**, 357-63.

Sun, X., Lewandoski, M., Meyers, E. N., Liu, Y. H., Maxson, R. E., Jr. and Martin, G. R. (2000b). Conditional inactivation of *Fgf4* reveals complexity of signalling during limb bud development. *Nat Genet* **25**, 83-6.

Sun, X., Mariani, F. V. and Martin, G. R. (2002). Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature* **418**, 501-8.

Suzuki, T., Hasso, S. M. and Fallon, J. F. (2008). Unique SMAD1/5/8 activity at the phalanx-forming region determines digit identity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 4185-90.

Tabin, C. and Wolpert, L. (2007). Rethinking the proximodistal axis of the vertebrate limb in the molecular era. *Genes Dev* **21**, 1433-42.

Takeuchi, J. K., Koshiba-Takeuchi, K., Matsumoto, K., Vogel-Hopker, A., Naitoh-Matsuo, M., Ogura, K., Takahashi, N., Yasuda, K. and Ogura, T. (1999). *Tbx5* and *Tbx4* genes determine the wing/leg identity of limb buds. *Nature* **398**, 810-4.

Tamm, I., Kikuchi, T. and Zychlinsky, A. (1991). Acidic and basic fibroblast growth factors are survival factors with distinctive activity in quiescent BALB/c 3T3 murine fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 3372-6.

Tamura, K., Yokouchi, Y., Kuroiwa, A. and Ide, H. (1997). Retinoic acid changes the proximodistal developmental competence and affinity of distal cells in the developing chick limb bud. *Dev Biol* **188**, 224-34.

Thatcher, J. E. and Isoherranen, N. (2009). The role of CYP26 enzymes in retinoic acid clearance. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **5**, 875-86.

Tickle, C., Summerbell, D. and Wolpert, L. (1975). Positional signalling and specification of digits in chick limb morphogenesis. *Nature* **254**, 199-202.

Towers, M., Mahood, R., Yin, Y. and Tickle, C. (2008). Integration of growth and specification in chick wing digit-patterning. *Nature* **452**, 882-6.

Treichel, D., Schock, F., Jackle, H., Gruss, P. and Mansouri, A. (2003). *mBtd* is required to maintain signaling during murine limb development. *Genes Dev* **17**, 2630-5.

Tsang, M. and Dawid, I. B. (2004). Promotion and attenuation of FGF signaling through the Ras-MAPK pathway. *Sci STKE* **2004**, pe17.

Tschopp, P., Tarchini, B., Spitz, F., Zakany, J. and Duboule, D. (2009). Uncoupling time and space in the collinear regulation of Hox genes. *PLoS Genet* **5**, e1000398.

Turner, N. and Grose, R. (2010). Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* **10**, 116-29.

van den Eijnde, S. M., Luijsterburg, A. J., Boshart, L., De Zeeuw, C. I., van Dierendonck, J. H., Reutelingsperger, C. P. and Vermeij-Keers, C. (1997). In situ detection of apoptosis during embryogenesis with annexin V: from whole mount to ultrastructure. *Cytometry* **29**, 313-20.

Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M. and Bilanges, B. (2010). The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 329-41.

Verheyden, J. M. and Sun, X. (2008). An Fgf/Gremlin inhibitory feedback loop triggers termination of limb bud outgrowth. *Nature* **454**, 638-41.

Wanek, N., Muneoka, K., Holler-Dinsmore, G., Burton, R. and Bryant, S. V. (1989). A staging system for mouse limb development. *J Exp Zool* **249**, 41-9.

Wang, C. K., Omi, M., Ferrari, D., Cheng, H. C., Lizarraga, G., Chin, H. J., Upholt, W. B., Dealy, C. N. and Kosher, R. A. (2004). Function of BMPs in the apical ectoderm of the developing mouse limb. *Dev Biol* **269**, 109-22.

Weatherbee, S. D., Behringer, R. R., Rasweiler, J. J. t. and Niswander, L. A. (2006). Interdigital webbing retention in bat wings illustrates genetic changes underlying amniote limb diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15103-7.

Widlak, P. and Garrard, W. T. (2009). Roles of the major apoptotic nuclease-DNA fragmentation factor-in biology and disease. *Cell Mol Life Sci* **66**, 263-74.

Wilkinson, D. G. and Nieto, M. A. (1993). Detection of messenger RNA by in situ hybridization to tissue sections and whole mounts. *Methods Enzymol* **225**, 361-73.

Wolpert, L. (1969). Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J Theor Biol* **25**, 1-47.

Xu, J., Liu, Z. and Ornitz, D. M. (2000). Temporal and spatial gradients of Fgf8 and Fgf17 regulate proliferation and differentiation of midline cerebellar structures. *Development* **127**, 1833-43.

Xu, X., Weinstein, M., Li, C., Naski, M., Cohen, R. I., Ornitz, D. M., Leder, P. and Deng, C. (1998). Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development* **125**, 753-65.

Yashiro, K., Zhao, X., Uehara, M., Yamashita, K., Nishijima, M., Nishino, J., Saijoh, Y., Sakai, Y. and Hamada, H. (2004). Regulation of retinoic acid distribution is required for proximodistal patterning and outgrowth of the developing mouse limb. *Dev Cell* **6**, 411-22.

Yu, K. and Ornitz, D. M. (2008). FGF signaling regulates mesenchymal differentiation and skeletal patterning along the limb bud proximodistal axis. *Development* **135**, 483-91.

Yu, K., Xu, J., Liu, Z., Sosic, D., Shao, J., Olson, E. N., Towler, D. A. and Ornitz, D. M. (2003). Conditional inactivation of FGF receptor 2 reveals an essential role for FGF signaling in the regulation of osteoblast function and bone growth. *Development* **130**, 3063-74.

Yu, P. B., Hong, C. C., Sachidanandan, C., Babitt, J. L., Deng, D. Y., Hoyng, S. A., Lin, H. Y., Bloch, K. D. and Peterson, R. T. (2008). Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol* **4**, 33-41.

Zakany, J. and Duboule, D. (2007). The role of Hox genes during vertebrate limb development. *Curr Opin Genet Dev* **17**, 359-66.

Zamaraeva, M. V., Sabirov, R. Z., Maeno, E., Ando-Akatsuka, Y., Bessonova, S. V. and Okada, Y. (2005). Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: a bioluminescence study with intracellular luciferase. *Cell Death Differ* **12**, 1390-7.

- Zeller, R., Lopez-Rios, J. and Zuniga, A.** (2009). Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis. *Nat Rev Genet* **10**, 845-58.
- Zhang, R. L., Zhang, Z. G., Lu, M., Wang, Y., Yang, J. J. and Chopp, M.** (2006). Reduction of the cell cycle length by decreasing G1 phase and cell cycle reentry expand neuronal progenitor cells in the subventricular zone of adult rat after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* **26**, 857-63.
- Zhang, S., Lin, Y., Itaranta, P., Yagi, A. and Vainio, S.** (2001). Expression of Sprouty genes 1, 2 and 4 during mouse organogenesis. *Mech Dev* **109**, 367-70.
- Zhao, X., Brade, T., Cunningham, T. J. and Duester, G.** (2010). Retinoic acid controls expression of tissue remodeling genes Hmgn1 and Fgf18 at the digit-interdigit junction. *Dev Dyn* **239**, 665-71.
- Zhao, X., Sirbu, I. O., Mic, F. A., Molotkova, N., Molotkov, A., Kumar, S. and Duester, G.** (2009). Retinoic acid promotes limb induction through effects on body axis extension but is unnecessary for limb patterning. *Curr Biol* **19**, 1050-7.
- Zhu, J., Nakamura, E., Nguyen, M. T., Bao, X., Akiyama, H. and Mackem, S.** (2008). Uncoupling Sonic hedgehog control of pattern and expansion of the developing limb bud. *Dev Cell* **14**, 624-32.
- Zou, H. and Niswander, L.** (1996). Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science* **272**, 738-41.
- Zou, H., Wieser, R., Massague, J. and Niswander, L.** (1997). Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev* **11**, 2191-203.
- Zucker, R. M., Hunter, E. S., 3rd and Rogers, J. M.** (1999). Apoptosis and morphology in mouse embryos by confocal laser scanning microscopy. *Methods* **18**, 473-80.
- Zucker, R. M., Hunter, S. and Rogers, J. M.** (1998). Confocal laser scanning microscopy of apoptosis in organogenesis-stage mouse embryos. *Cytometry* **33**, 348-54.

10. Abreviaturas y siglas.

- 3-MA- ('3-Methyl-adenine')
- AER- Cresta Ectodérmica Apical ('Apical Ectodermal Ridge')
- Adh- Alcohol deshidrogenasas ('Alcohol deshidrogenases')
- AIF- Factor Inductor de Apoptosis ('Apoptosis Inducing Factor')
- ANZ- Zona Apoptótica Anterior ('Anterior Necrotic Zone')
- AO- anaranjado de acridina ('Acridine Orange')
- Atg- genes que participan en la muerte celular autofágica ('Autophagy-related genes')
- ATP-Tri-fosfato de adenosina ('Adenosin triphosphate')
- Bmp- Proteínas Morfogenéticas del Hueso ('Bone Morphogenetic Proteins')
- Bmps-Plural de Proteína Morfogenéticas del Hueso ('Bone Morphogenetic Proteins')
- Bmpr1a- Receptor a los Bmps tipo a ('Bmp receptor 1a')
- dpc- se refiere a los días que han transcurrido después del coito de los ratones ('days post coitum')
- CAD-DNAsa Activada por Caspasas ('Caspase Activated Dnase')
- Dusp6/Mkp3- Mkp3 fosfatasa ('Dual specific phosphatase 6')
- Erk- Erk cinasa ('Extracellular signal-regulated kinase')
- Fgf- Factores de Crecimiento de Fibroblasto ('Fibroblast Growth Factor')
- Fgfs-Plural de Factores de Crecimiento de Fibroblasto ('Fibroblast Growth Factor')
- Fgfr- receptor de los Fgfs ('Fibroblast Growth Factor Receptor')
- GLI3A- se refiere a la proteína de Gli3 activadora ('Gli3 Activator')
- GLI3R- se refiere a la proteína de Gli3 represora ('Gli3 Repressor')
- HH- Hace referencia al sistema de clasificación de Hamilton y Hamburger ('Hamilton and Hamburger')
- ICD- Muerte Celular Interdigital ('Interdigital Cell Death')
- LPC- lisofosfatidil-colina ('Lysophosphatidylcholine')
- LPM- Placa lateral del Mesodermo ('Lateral Plate Mesoderm')
- LT- Lysotracker ('Lysotracker')
- Mapk- vía de las Map cinasas ('Mitogen activated phospho-kinase')
- MOMP- indica la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria ('Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization')
- MP- Metil piruvato ('Methyl-pyruvate')
- NEM- ('N-ethyl-maleimide')
- PCD- Muerte Celular Programada ('Programmed Cell Death')
- Pi3k- vía de la Fosfatidil-inositol- cinasa ('Phosphatidil-inositol-3-kinase')
- PNZ - Zona Apoptótica Posterior ('Posterior Necrotic Zone')
- PFR- Región Formadora de Falanges ('Phalanges Forming Region')
- Ptch- se refiere al gen de Patched ('Patched')
- PZ- Zona de Progresión ('Progression Zone')
- RA-Acido Retinoico ('Retinoic acid')
- Raldh- Retinaldehído deshidrogenasas ('Retinaldehyde deshidrogenases')

- RARE- secuencias del DNA a las cuales los receptores del RA se unen ('Retinoic Acid Response Element')
- RN- Rojo neutro ('Neutral Red')
- RNAm- Acido Ribonucleico mensajero ('Ribonucleic Acid messenger')
- Roldh- Retinol deshidrogenasas ('Retinol deshidrogenases')
- Sef- se refiere al gen de Sef ('Similar expression to Fgf')
- Smo- se refiere al gen de Smo ('Smoothed')
- Shh- se refiere al gen de Sonic hedgehog
- UTP-Tri-fosfato de uridina ('Uridine Triphosphate')
- Vegf- Factor de Crecimiento Vascular Endotelial ('Vascular endothelial Growth Factor')
- ZPA- Zona de Actividad Polarizante ('Zone Polarizing Activity')