



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“EXPRESION DE LAS *Smads* DURANTE LA
MORFOGENESIS DE LA EXTREMIDAD DE POLLO
Y SU PAPEL EN LA CONDROGENESIS”.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
RENE FERNANDO ABARCA BUIS

DIRECTOR DE TESIS: JESUS CHIMAL MONROY.

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2002.





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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Expresión de las Smads durante la morfogénesis de la extremidad de pollo y su papel en la condrogénesis"

realizado por René Fernando Abarca Buis

con número de cuenta 9550417-3 , quien cubrió los créditos de la carrera de Biología

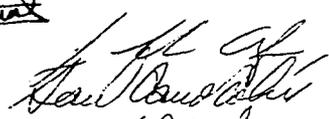
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

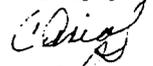
Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Jesús Chimal Monroy. 

Propietario Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

Propietario M. en I.B.B. Saúl Cano Colín. 

Suplente Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Alvarez. 

Suplente M. en C. Alfesha Araceli González Arenas. 

FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

Consejo Departamental de Biología. 

Dra. Patricia Ramos Morales 

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Este trabajo fue realizado en el laboratorio del Dr. Jesús Chimal Monroy del departamento de Biología y Fisiología Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo su asesoría y dirección y fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología mediante el proyecto 34334N.

Se recibió beca a través del proyecto 34334N y el 30717 M del CONACYT, este último durante una estancia de 2 meses en el laboratorio del Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Además fue apoyado por el programa beca-tesis de fundación UNAM.

Agradecimientos:

Agradezco al Dr. Jesús Chimal Monroy por proporcionar sus conocimientos, orientación teórica, reactivos, materiales, métodos y revisiones durante la realización de éste trabajo. A los Doctores Kohei Miyazono y Makiko Fujii por donar amablemente los adenovirus recombinantes. Al Dr. Luis Covarrubias por la asesoría dada para la propagación de adenovirus recombinantes. Al Dr. Juan Hurlé por la donación de los plásmidos con *smad1*, *smad3*, *smad5* y *smad6* usados para las hibridaciones *in situ*. A la Dra. Clorinda Arias, al Dr. Ignacio Camacho, al Profesor Saúl Cano y a la maestra Aliesha González por las revisiones hechas a este trabajo.

A mi madre María Esther Abarca Buis por su financiamiento y apoyo durante todos mis estudios y realización de esta tesis.

Y finalmente a todas las personas que han logrado que la Universidad Nacional Autónoma de México sea Nacional, Autónoma, Pública y Gratuita.

Notas:

Debido a que el nombre de un gen es el mismo que el de una proteína, se requiere de una nomenclatura especial para poder diferenciar ambos casos. La nomenclatura usada en este escrito es la siguiente: las letras están escritas en cursivas -*smad5*, *wnt7a*- cuando se mencionen nombres de genes y están con letra lineal geométrica con la primer letra en mayúscula -*Smad5*, *Wnt7a*- cuando sean referidos nombres de proteínas.

Se ha adicionado un apéndice en la penúltima sección de este escrito en el que se describen los reactivos usados en los métodos experimentales de este trabajo.

Además, al inicio se muestra una lista del significado de las abreviaturas más citadas durante este escrito.

Índice.

Lista de abreviaturas	7
Resumen	8
Introducción	9
La extremidad embrionaria de los vertebrados.....	9
Inducción de la extremidad.....	11
Establecimiento del eje próximo-distal.....	12
Establecimiento del eje antero-posterior.....	16
Establecimiento del eje dorso-ventral.....	19
Formación del cartilago en la extremidad.....	23
Miembros de la superfamilia del TGF- β en la condrogénesis y Morfogénesis de la extremidad.....	28
Vía de transducción de señales de la superfamilia del TGF- β	34
Justificación del trabajo	43
Hipótesis	44
Objetivos	44
Objetivo general.....	44
Objetivos particulares.....	44
Materiales y Métodos	45
Clonación del gen <i>smad8</i>	45
Preparación de la sonda.....	46
Hibridaciones <i>in situ</i>	46
Amplificación de Adenovirus recombinantes.....	47
Cultivos de micromasas e infección con adenovirus recombinantes.....	48
Tinción con azul alciano.....	48
Resultados	49

Expresión genética de las R-smads de BMP en la extremidad posterior del pollo.....	49
Expresión genética de <i>smad3</i> en la extremidad posterior del pollo.....	50
Expresión genética de <i>smad6</i> en la extremidad posterior del pollo.....	50
Efecto de las Smads en cultivos de micromasas.....	51
Discusión.....	54
Conclusiones.....	64
Anexo.....	65
Referencias.....	60

Lista de abreviaturas:

AER = Cresta del Ectodermo Apical.

AR = Ácido retinoico

BMP = Proteína Morfogenética del Hueso.

Co-smad = Smad acompañante.

FGF = Factor de Crecimiento Fibroblástico.

GDF = Factor de Crecimiento y Diferenciación.

I-Smad = Smad inhibidora.

R-smad = Smad regulada por los receptores.

TGF- β = Factor de Crecimiento Transformante Beta.

ZPA = Zona de Actividad Polarizante.

Resumen.

Durante la formación de la extremidad de los vertebrados suceden varios procesos morfogenéticos importantes, tales como la formación de los elementos cartilaginosos, la muerte interdigital, y la formación de los tendones y articulaciones. Se ha demostrado que miembros de la superfamilia del TGF- β participan en estos procesos. En este trabajo evidenciamos la expresión genética de las proteínas transductoras de la señal de estos miembros, las *smads*. Además de que se evaluó su participación durante la condrogénesis *in vitro*. *Smad1* y *smad5*, ambas transductoras de BMPs, se expresaron igualmente en las articulaciones, pericondrio e interdígito. *Smad8*, otra molécula transductora de BMPs, se expresó en los radios digitales y en la cresta apical del ectodermo. *Smad6*, que bloquea la acción de las Smads transductoras, se expresó en el cartílago y la *smad3*, transductora de TGF- β s y Activinas, se localizó en los tendones en desarrollo. Para evaluar la posible participación de las Smads durante la condrogénesis, realizamos infecciones con adenovirus recombinantes que sobreexpresan las distintas Smads en células de mesénquima *in vitro*. Estos experimentos demostraron que *Smad1*, *Smad2* y *Smad3*, todas junto con *Smad4*, indujeron condrogénesis, mientras que *Smad 5* y *8* en presencia de *Smad4* alteraron la adhesión de las células en cultivo. Además se observó que se requiere de ambas Smads inhibitoras, Smads 6 y 7 para bloquear la condrogénesis. En conclusión, se demostró en este trabajo que algunas *smads* son expresadas diferencialmente, y otras de forma similar durante la morfogénesis de la extremidad, además de que participan en la diferenciación del cartílago *in vitro*.

Introducción.

La extremidad embrionaria de los vertebrados.

Las extremidades de los vertebrados son órganos extremadamente complejos, compuestos de distintos tejidos en los que se incluye el esqueleto, el músculo, los tendones, los ligamentos, la piel y las articulaciones. Estas presentan una organización asimétrica que consta de tres ejes: el eje próximo-distal, el eje antero-posterior y el eje dorso-ventral (Gilbert, 2000) (figura 1).

Durante la embriogénesis de los vertebrados, la extremidad surge cómo una pequeña protuberancia compuesta de células mesenquimatosas, cubierta por ectodermo. Esta protuberancia o primordio de la extremidad va creciendo conforme el desarrollo del organismo avanza y, durante este proceso, las células en la parte proximal de la extremidad anterior, cercanas a la pared del cuerpo, forman el húmero y en la extremidad posterior, el fémur. A medida que el primordio continúa creciendo, las partes medias y distales se establecen y dan origen a la ulna y al radio, en la extremidad anterior y a la tibia y fibula en la posterior, hasta la formación de los dígitos en último lugar (Sanz-Ezquerro y Tickle; 2001).

La morfogénesis de la extremidad depende de la interacción entre tres centros de inducción que establecen las polaridades de la extremidad: a lo largo del eje próximo-distal se reconocen tres regiones; la proximal, llamada estilópodo, que forma el húmero, o el fémur, la región media llamada zeugópodo que forma el radio y la ulna, o la tibia y la fibula, y un autópedo; la región más distal, que forma los carpales y los dedos de las extremidades anteriores o los tarsales y los dedos de las extremidades posteriores (figura 1). Originalmente, esas estructuras son

cartilagosas, pero eventualmente son reemplazadas por hueso. En el eje antero-posterior se identifican a los diferentes dedos. Por ejemplo, en la mano de los humanos, el dedo meñique es el dedo posterior y el pulgar es el dedo anterior. En el eje dorso-ventral, la palma de la mano se encuentra ventralmente, mientras que los nudillos se localizan dorsalmente (Gilbert, 2000). El control de las tres polaridades o ejes está determinado por tres centros o regiones organizadoras:

1. La cresta del ectodermo apical (AER) que es un epitelio engrosado localizado en la parte más distal de la extremidad, que controla la proliferación del mesénquima que lleva al crecimiento de la extremidad a lo largo del eje próximo-distal (figura 2).
2. La zona de actividad polarizante (ZPA) que es un área especializada de mesénquima localizada en la parte posterior del primordio de la extremidad, que controla el eje antero-posterior (figura 3). Este centro organizador del eje antero-posterior está recíprocamente mantenido por señales que provienen de la AER y del ectodermo dorsal.
3. El ectodermo que no corresponde a la AER y que cubre la zona dorsal y ventral del primordio de la extremidad. Este ectodermo especializado se encarga de establecer el eje dorso-ventral (figura 4).

Las señales de estos centros organizadores (la AER, la ZPA y el resto del ectodermo que no incluye la AER) convergen en la parte más distal del mesénquima de la extremidad subyacente a la AER. A esta región se le denomina la zona de progreso (figura 2a). Se piensa que las señales de los centros organizadores coordinan la adquisición de una información

tridimensional en las células en proliferación de la zona de progreso (Niswander, 2001; Sanz-Ezquerro y Tickle; 2001).

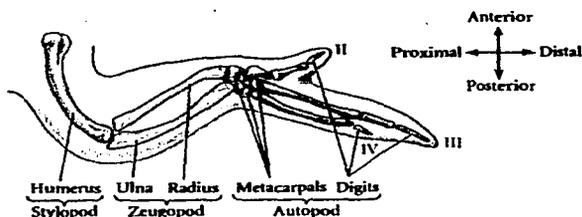


Fig.1. Partes del esqueleto que forman el eje próximo-distal y antero-posterior. Por convención los dígitos están numerados como II, III y IV. Los dígitos I y V no se encuentran en el ala del pollo. (Gilbert; 2000).

Actualmente, se han descubierto una serie de moléculas involucradas en la formación de estos ejes, sin embargo, aún quedan muchas cuestiones que esclarecer sobre su organización (Gilbert, 2000). A continuación se describirá brevemente cómo se induce la formación de la extremidad y cómo se establecen estos tres ejes, considerando a las moléculas morfogenéticas secretadas por dichos centros organizadores.

Inducción de la extremidad.

En las primeras etapas de la formación de la extremidad de los vertebrados, hay una alta actividad proliferativa de las células de la placa lateral, en las regiones en donde se formará la extremidad, mientras que en las zonas en donde no se forma, llamadas regiones interperpendiculares, esta actividad es baja. Dicha proliferación diferencial da como resultado la formación de primordios de la extremidad, que en el caso del pollo aparecen en forma de protuberancias al cuarto día de

incubación (estadio 17) entre la somita 15 y 20 para la extremidad anterior (ala) y la somita 26 y 30 para la extremidad posterior (pata) (Kawakami *et al.*, 2001). Varios estudios experimentales sugieren que hay una cascada de señales que controlan la proliferación de las células de la extremidad, la cual inicia en el mesonefros y progresa al mesénquima de la placa lateral y a la superficie del ectodermo que formará a la AER (figura 2d). Algunos miembros de la familia del Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF) se han identificado cómo señales necesarias para iniciar y mantener la proliferación de las células, a lo largo del eje próximo-distal (figura 2d; Martín, 1998). También se sabe que los FGFs estimulan la proliferación celular y que su aplicación local en la región interapendicular es suficiente para inducir la formación de una extremidad ectópica (Cohn y Tickle, 1996). Se ha considerado a Fgf8 y a Fgf10 cómo las señales que inducen la formación de la extremidad, ya que sus genes se expresan en el mesonefros temprano.

Establecimiento del eje próximo-distal.

El crecimiento próximo-distal y el establecimiento del eje está controlado directamente por la AER, la cual se extiende a lo largo de la parte más distal del primordio de la extremidad, en la zona donde se fusiona el ectodermo ventral con el dorsal (figura 2a y 4b). La extirpación quirúrgica de la AER del primordio de la extremidad en desarrollo del pollo, provoca el truncamiento de la extremidad, a lo largo del eje próximo-distal (Saunders; 1948). Si la extirpación de la AER se realiza en estadios más avanzados ocurre el truncamiento de elementos esqueléticos más distales, lo que sugiere que el patrón próximo-distal se establece secuencialmente (figura 2b y 2c). Sin embargo, la cintura pélvica y/o la pectoral y la parte más proximal del fémur y/o del húmero se forman incluso si la AER es extirpada unas horas después de su

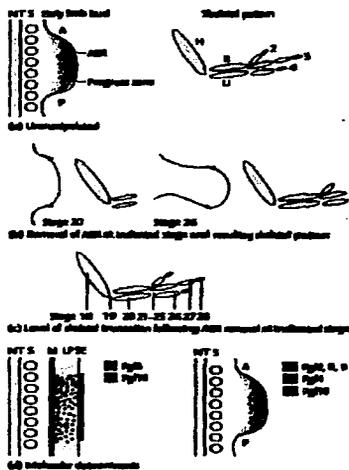


Figura 2. (a) El centro de señalamiento próximo-distal: La cresta apical del ectodermo (AER). En la izquierda se encuentra un diagrama del primordio de la extremidad de pollo en estado 20 y a la derecha el patrón normal de los elementos esqueléticos. Las señales de la AER se dirigen al mesénquima de la zona de progreso (rojo) y la mantienen en un estado indiferenciado y en proliferación. El patrón de los elementos esqueléticos de la parte proximal ala distal se organiza de la siguiente manera húmero (H), radio (R) y ulna (U), y dígitos (2, 3, 4 de la parte anterior a la posterior).

(b,c) Determinación experimental del centro de señalamiento próximo-distal. (b) La extirpación de la AER resulta en el

truncamiento de la extremidad a lo largo del eje próximo-distal. (c) Nivel aproximado del truncamiento seguido de la extirpación de la AER en los estadios indicados.

(d) Determinantes moleculares del centro de señalamiento próximo-distal. A la izquierda se muestra la cascada de señalamiento de FGFs que inician el desarrollo de la extremidad. *Fgf8* (rojo) y *Fgf10* (morado) que provienen del mesénquima (M) inducen a *fgf10* en el mesénquima de la placa lateral (LP), cuyo producto a su vez induce a *fgf8* en la superficie del ectodermo (SE). Derecha: el señalamiento de FGF de la AER. FGFs son expresados en la AER y pueden sustituir a la AER permitiendo el crecimiento próximo-distal de la extremidad. *fgf4* se expresa en la mitad posterior de la AER (verde) mientras que *fgf8* y *fgf9* se expresan a lo largo de la AER (rojo). *fgf2* está presente en la AER y en el mesénquima. *Fgf10* se expresa en el mesénquima de la zona de progreso.

A, anterior; Fgf, Factor de Crecimiento Fibroblástico; H, húmero; LP, Mesénquima de la placa lateral; M, mesenchima; NT, tubo neural; P, posterior; R, radio; S, somita; SE, ectodermo superficial; U, ulna; 2,3,4, dígitos 2,3 y 4 respectivamente. (Niswander, 2001).

formación, lo que indica que esas estructuras están ya especificadas antes de que la AER se forme (Niswander; 2001).

Se sabe que la AER se forma y se localiza en la región en donde el ectodermo ventral y el dorsal se fusionan. En el ectodermo dorsal se expresa el gen *radical-fringe* (*r-fng*) mientras que en el ventral se expresa *Engrailed-1* (*en-1*) cuyo producto es un factor de transcripción. La AER se forma en la zona en que *r-fng* y *en-1* convergen. La expresión ectópica de *r-fng* en el ectodermo ventral de la extremidad de pollo induce la formación de AERs ectópicas (Niswander, 2001). Por otro lado, la expresión ectópica de *en-1* en el ectodermo dorsal induce de igual manera que se formen AERs ectópicas (Loomis *et al.*, 1998). En ambos casos, las AERs se forman en las zonas de convergencia entre las zonas de expresión de *R-fng* y *En-1*.

La formación de la AER se inicia por una señal o señales que provienen del mesénquima de la extremidad. El mesénquima de la extremidad puede inducir al ectodermo que lo rodea para que forme la AER. Aunque la identidad molecular de la señal proveniente del mesénquima se desconoce, se ha propuesto al *Fgf10* cómo la molécula que induce la formación de la AER. El *Fgf10* se expresa en el mesénquima de la placa lateral, en las zonas donde se formará la extremidad, por lo que es un buen candidato para ser la señal proveniente del mesénquima. (Niswander, 2001).

Una vez establecida la AER se sabe que *Fgf4* y *Fgf8* se expresan y sus productos son capaces de dirigir el crecimiento próximo-distal ya que su aplicación puede reemplazar funcionalmente a la AER. *Fgf8* y *Fgf10* se expresan en el mesonefros temprano, *Fgf10* en el mesénquima de la

placa lateral, *Fgf8* en la superficie del ectodermo que prefigura a la AER y posteriormente *Fgf2*, *Fgf4*, *Fgf8* y *Fgf9* en la AER madura. De esta manera, las señales de varias isoformas del Fgf parecen mediar la cascada de señales necesarias para el crecimiento próximo-distal de la extremidad (figura 2).

Otro factor importante que controla el crecimiento próximo-distal en la extremidad es *Meis2*. *Meis2* es un gen homeótico que se expresa en las regiones más proximales en el primordio de la extremidad y es esencial para el establecimiento de la polaridad próximo-distal, ya que la expresión ectópica de *Meis2* inhibe severamente el crecimiento de las zonas más distales, lo que indica que *Meis2* es un determinante de las zonas proximales, además de que reprime la actividad de genes involucrados en la determinación de las zonas más distales tal cómo lo son las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs) y los genes *Hoxd*. Las BMPs mantienen el crecimiento próximo-distal de la extremidad regulada por FGFs y junto con estos determinan la formación de las estructuras más distales, ya que con la sobreexpresión de Gremlin, un antagonista de BMPs, se produce el truncamiento de aquellas, además de que altera la regulación genética de *Fgfs* y de sonic hedgehog (*Shh*), un factor involucrado en el establecimiento de la polaridad antero-posterior. Por lo consiguiente, se ha considerado que estos factores proximales y distales presentan actividades coordinadas: *Meis2* puede reprimir genes distales y BMPs y los productos de los genes *Hoxd* restringen la expresión de *Meis2* en la parte proximal de la extremidad en desarrollo (Capdevila, et al. 1999).

La AER actúa en el mesénquima de la zona de progreso subyacente, manteniéndola en un estado proliferativo e indiferenciado.

Se sugiere que el carácter posicional próximo-distal está especificado por el tiempo en que una célula o un grupo de células se mantiene en la zona de progreso. De esta manera los elementos más distales se originan de células que han pasado más tiempo en la zona de progreso, mientras que las estructuras proximales se originan de células que han dejado la zona de progreso más temprano durante el desarrollo de la extremidad. Sin embargo, este modelo no se ha podido confirmar por la falta de un marcador molecular que defina claramente el mesénquima de la zona de progreso en estado indiferenciado (Summerbell et al., 1973).

Establecimiento del eje antero-posterior.

La polaridad antero-posterior de la extremidad está dirigida por el mesénquima ubicado en la zona posterior del primordio de la extremidad. El trasplante del mesénquima de la región posterior de un primordio de la extremidad donadora a una región anterior de un primordio del ala de pollo hospedero subyacente a la AER, lleva a la duplicación, en imagen especular, de los elementos esqueléticos más distales, en donde el patrón de los dígitos que normalmente es 2-3-4 (de la porción anterior a la posterior) se vuelve 4-3-2-2-3-4 (figura 3a; Saunders y Gasseling, 1968). A la región donadora del primordio de la extremidad que tiene la capacidad de alterar la polaridad antero-posterior de la extremidad del hospedero se le ha denominado región polarizante o Zona de Actividad Polarizante (ZPA).

Se sabe que la expresión del gen *Sonic hedgehog* (*Shh*) coincide espacial y temporalmente con la ZPA, funcionalmente definida (Riddle et al., 1993). Además, la aplicación ectópica de la proteína *Shh* en la región anterior del primordio de la extremidad resulta en duplicaciones de los dígitos en imagen especular similares a los producidos por los injertos de la

ZPA (Riddle *et al.*, 1993) (figura 3a). Estos resultados sugieren fuertemente que *Shh* es una señal clave que dirige el patrón antero-posterior de la extremidad (figura 3b).

El hecho de que los dígitos duplicados están proximodistalmente completos sugiere que existe una interacción entre el patrón próximo-distal y el antero-posterior. Esta interacción se ha estudiado a nivel molecular. Estos estudios han definido un asa de retroalimentación positiva entre *Shh* y FGFs (presentes en la AER) en la cual *Shh* regula positivamente la expresión de *Fgf4*. De igual manera, *Fgf4* y *Fgf8* de la AER se requieren para la expresión de *Shh* en el mesénquima de la ZPA.

Por otro lado, cuando se hicieron los estudios con ratones knockout del gen *Shh*, se confirmó la importancia de este gen en el desarrollo de la extremidad embrionaria, al igual que en otros procesos embrionarios (Chiang *et al.*, 1996). Cómo se predijo, las extremidades del ratón mutante en *Shh* presentaron pérdida de estructuras a lo largo del eje antero-posterior. Además, las extremidades estaban distalmente truncadas, lo que sugirió que la pérdida de *Shh* afectó la interrelación existente entre los centros de polaridad antero-posterior y el próximo-distal. La pérdida de *Shh* no sólo afectó la polaridad antero-posterior, sino que además afectó el señalamiento a lo largo del eje próximo-distal, cómo lo mostraron la ausencia de las señales de la AER cómo son *Fgf4* y *Fgf8*.

Así mismo, antes del descubrimiento de *Shh* se había identificado al ácido retinoico (AR) cómo la señal morfogenética de la ZPA. Sin embargo, ahora se conoce que el AR induce la expresión de los genes *hoxb8* y *d-hand* que controlan la expresión de *Shh* en la ZPA (Charité *et*

al., 1994). Estos resultados sugieren que el señalamiento del ácido retinoico establece, de forma temprana, el dominio de expresión de *Shh* en la región posterior de la extremidad.

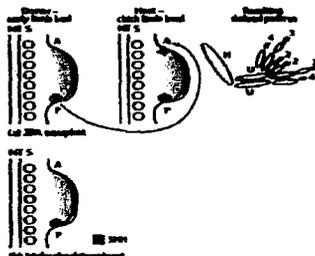


Figura 3. (a) Determinación experimental del centro de señalización antero-posterior: La zona de actividad polarizante (ZPA). El trasplante de la ZPA de un primordio de la extremidad de pollo a otro en la región anterior, ambos en estadio 20, conduce a una repolarización de la extremidad hospedera ya que se forman dígitos adicionales en imagen especular con respecto a los normales.

(b) Determinantes moleculares de la ZPA. *Sonic Hedgehog* (*Shh*) se expresa en la región posterior del primordio de la extremidad, correspondiente a la ZPA. pero cuando se aplica anteriormente, causa una repolarización con una duplicación en imagen especular de los dígitos.

A, anterior; H, húmero; NT, tubo neurático; P, posterior; S, somita; SHH, *Sonic Hedgehog*; U, uña; 2,3,4, dígitos 2,3 y 4 respectivamente (Niswander, 2001).

Establecimiento del eje dorso-ventral.

El establecimiento del eje dorso-ventral es el resultado de una compleja interacción entre el ectodermo y el mesénquima de la extremidad, cómo se ha demostrado con los experimentos al invertir el ectodermo de la región dorsal hacia la ventral, en distintas fases del desarrollo (figura 4a y 4b). La información dorso-ventral reside en el mesénquima, desde antes de que se inicie el crecimiento del primordio de la extremidad. La polaridad dorso-ventral de los elementos esqueléticos proximales parece estar ya especificada desde ese momento, ya que la polaridad de esas estructuras no se altera al invertir la polaridad del ectodermo (figura 4b). Por lo tanto, el mesénquima confiere la información dorsal al ectodermo desde el estadio 15 del desarrollo embrionario del pollo, mientras que la formación del primordio de la extremidad ocurre en el estadio 17. Así mismo, en estadios subsecuentes el ectodermo instruye al mesénquima para que éste adquiera su polaridad dorso-ventral (Geduspan y MacCabe, 1989) como se demuestra al invertir la polaridad dorso-ventral de las estructuras del mesénquima al transplantar el ectodermo dorsal hacia la región ventral. (figura 4b).

La naturaleza molecular de las señales del mesénquima que instruyen al ectodermo para adquirir su polaridad dorso-ventral se desconoce, sin embargo, sí se conocen algunas señales del ectodermo que especifican la polaridad dorso-ventral del mesénquima. Tanto en el ratón cómo en el pollo, *Wnt7a* se expresa en el ectodermo dorsal desde antes y durante el crecimiento de la extremidad (figura 4c). En el pollo, el tiempo que dura esta expresión en el ectodermo dorsal corresponde al periodo en el que la información dorso-ventral es transferida del mesénquima al ectodermo. En ratones Knock out para el gen *wnt7a* se -

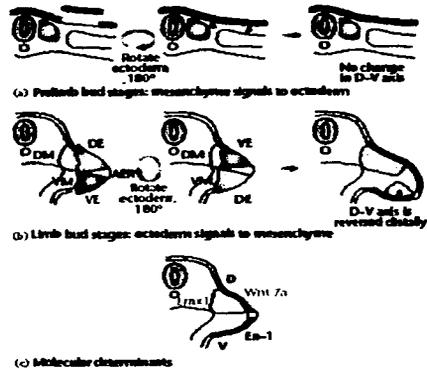


Figura 4. Establecimiento del eje dorso-ventral. (a) La rotación experimental del ectodermo en 180° en estadio 14 del desarrollo embrionario del pollo en la zona donde se formará la extremidad, resulta en una extremidad con una polaridad dorso-ventral que corresponde al mesénquima, lo que indica que la información dorsoventral se encuentra en el mesénquima en este estadio.

(b) En estadio 20 la rotación del ectodermo en 180° a nivel del mesénquima del primordio de la extremidad resulta en la formación de elementos esqueléticos distales con una polaridad dorso-ventral invertida por la rotación experimental del ectodermo. Esto indica que en este estadio, que el ectodermo instruye al mesénquima para que establezca su polaridad dorso-ventral.

(c) Determinantes moleculares del señalamiento dorso-ventral. Después del estadio 15 el ectodermo dorsal expresa *wnt7a* (morado). La proteína *Wnt7a* induce a *lmx1* (verde) en el mesénquima. *Wnt7a* y *Lmx1* son requeridos para la especificación dorsal en la extremidad. *Engrailed-1* (*En-1*, en azul) se expresa en el ectodermo ventral y dirige el desarrollo de las estructuras ventrales.

AER, Cresta apical del ectodermo; D, Dorsal; DE, ectodermo dorsal; DM, mesénquima dorsal; V, ventral; VE, ectodermo ventral; VM, mesénquima ventral (Niswander, 2001).

demonstró que este gen participa en el establecimiento de los elementos dorsales. Las extremidades de estos ratones presentaron una polaridad biventral con pérdida de pelo y formación de estructuras ventrales en la parte dorsal sobre la parte más distal de la extremidad (Parr y McMahon, 1995).

Por otro lado, el análisis molecular de las extremidades de ratones nulos para *Wnt7a*, mostraron que la expresión de *Shh* en la ZPA estaba disminuida, por lo que no presentaron elementos esqueléticos más posteriores (Parr y McMahon, 1995). Este resultado es similar al obtenido en la extremidad del pollo después de que es extirpado el ectodermo dorsal, en el que hay una expresión reducida de *Shh* y pérdida de los elementos esqueléticos posteriores (Niswander, 2001). Estos defectos pueden revertirse al aplicar *Wnt7a* en la zona carente del ectodermo dorsal. Todos estos estudios han demostrado la interacción existente entre los centros organizadores, en donde *Wnt7a*, secretado por el ectodermo dorsal actúa, en conjunto con el *Fgf4* y el *Fgf8* secretados por la AER manteniendo la expresión de *Shh* en la ZPA. Estas interacciones podrían coordinar el patrón tridimensional durante el desarrollo de la extremidad.

El gen *Imx1* es un gen blanco de *Wnt7a* y se expresa en el mesénquima dorsal. Las manipulaciones experimentales que alteran la expresión de *wnt7a* en el pollo, también alteran la expresión de *Imx1*. Por ejemplo, la expresión ectópica de *Wnt7a* en el ectodermo ventral resulta en la expresión de *Imx1* en el mesénquima ventral. Además, la expresión ectópica de *Imx1* en todo el primordio de la extremidad origina una extremidad "bidorsal", la cual exhibe características dorsales en las zonas ventrales. Lo anterior indica que la expresión del factor de transcripción *Imx1* inducido por *Wnt7a* es suficiente para la especificación de la zona

dorsal (Chen *et al.*, 1998; Loomis *et al.*, 1996; Parr y McMahon, 1955; Riddle *et al.*, 1995; Vogel *et al.*, 1995).

Cómo se ha mencionado anteriormente, *en-1* se expresa en el ectodermo ventral y participa en la formación de la AER (figura 4c). Sin embargo *en-1* también se requiere para el desarrollo de estructuras ventrales. Ratones nulos del gen *en-1* tienen extremidades que presentan un patrón bidorsal. Al parecer *En-1* reprime la expresión de *wnt7a* restringiéndolo sólo en el ectodermo dorsal. En extremidades que no expresan *en-1*, *wnt7a* se expresa ectópicamente en el lado ventral, lo que resulta en la formación de estructuras dorsales. De esta manera, el patrón dorso-ventral está controlado por la expresión regionalizada de *wnt7a* y de *en-1* (Loomis *et al.*, 1998).

En experimentos de sobreexpresión del antagonista de las BMPs; Nogina, y del receptor de BMPs en su forma activada, demuestran que las BMPs juegan un papel importante, tanto en el establecimiento de la polaridad dorso-ventral como en la inducción de la AER, indicando que la polaridad dorso-ventral y la próximo-distal están relacionadas por esta señal común. Estos experimentos de pérdida y ganancia de función de las BMPs muestran que son necesarias y suficientes para regular la expresión de *en-1*, además de que también se requieren para inducir la formación de la AER, ya que con la sobreexpresión de Nogina se reprime la expresión de *en-1* y se induce la formación de AERs ectópicas que pueden dirigir el crecimiento de la extremidad y, con la sobreexpresión de los receptores de BMPs se expresa ectópicamente *en-1* llevando a una dorsalización de la extremidad y alterando la formación de la AER endógena, resultando en extremidades truncadas. Además las BMPs controlan negativamente la expresión de los factores de transcripción de

la familia MSX, que son factores necesarios para la formación de la AER. Se propone que la señal de las BMPs se bifurca para regular la expresión de *en-1* y de *msx1* y *msx2* para contribuir, tanto al establecimiento de la polaridad dorso-ventral, cómo en la inducción de la AER, respectivamente (Pizzete *et al.*, 2001).

Cómo se ha descrito anteriormente, las interacciones de las señales que provienen de los distintos centros organizadores localizados en la extremidad establecen las polaridades próximo-distal, antero-posterior y dorso-ventral. Dichas interacciones también involucran, de manera esencial, la formación y el establecimiento del esqueleto de la extremidad, de tal manera que los elementos esqueléticos logren organizarse de una forma adecuada y correcta para que la extremidad cumpla con su función. A continuación se describirá el proceso de condrogénesis, que es un fenómeno importantísimo no sólo en la formación de la extremidad, sino también en la formación del cráneo y del esqueleto axial de todos los vertebrados.

Formación del cartilago en la extremidad.

El esqueleto de los vertebrados, compuesto de cartilago y hueso, tiene tres distintos orígenes: las células de la cresta neural forman el esqueleto craneofacial, las células del mesodermo paraxial (somitas) forman el esqueleto axial y las células del mesodermo de la placa lateral se encargan del esqueleto apendicular. Las células migran hacia las zonas del embrión en donde se desarrollarán los distintos elementos esqueléticos y formarán condensaciones de alta densidad celular que se diferenciarán en osteoblastos o condrocitos (Hall y Miyake, 1992; Olson *et al.*, 1996). En las regiones del esqueleto craneofacial y de la clavícula, las células condensadas se diferencian a osteoblastos formándose

directamente un esqueleto óseo. A este proceso se le conoce como osificación intramembranosa, contrariamente a la osificación endocondral, en el que las condensaciones de células mesenquimatosas se diferencian a condrocitos, los cuales se organizarán de tal manera que formarán un molde cartilaginoso con la forma de los futuros huesos. Este molde de cartilago será reemplazado progresivamente por osteoblastos para formar los huesos definitivos. A este proceso se le conoce como osificación endocondral y se lleva a cabo en la formación del esqueleto axial y el apendicular (figura 5) (Olsen *et al.*, 2000; Pizette y Niswander, 2000).

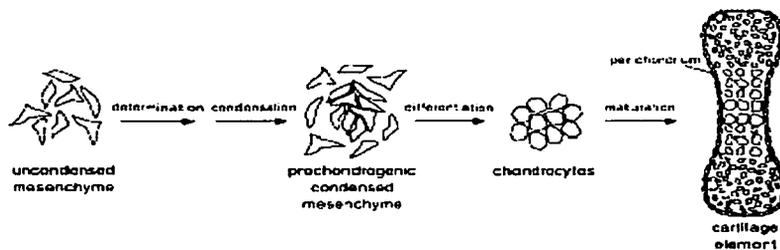


Figura 5. Esquema de los distintas fases de la condrogénesis. Las células de cartilago se organizan de tal manera que forman el molde del elemento esquelético. Este cartilago será sustituido por hueso en la osificación endocondral.

En la extremidad de los vertebrados, la condrogénesis inicia con la agregación de células mesenquimatosas provenientes de la placa lateral del mesodermo que formarán, posteriormente, condensaciones precartilaginosas. Algunos de los factores que dirigen la condensación de las células mesenquimatosas es el factor de crecimiento BMP2 y los miembros del Factor de crecimiento Transformante- β (TGF- β), también se reconoce la participación del síndecano-1 y los genes *Hox*; *Hoxa4* y *Barx1*,

además de los factores de transcripción *Msx-1* y *Msx-2* (Hall y Miyake; 1995). Fuera de su estado agregado, las células progenitoras del cartílago, son morfológicamente indistinguibles de las demás células mesenquimatosas, sin embargo estas células empiezan a expresar marcadores específicos del linaje condrogénico. La concentración de las moléculas versicano, el sindecano-3 y tenacina incrementa, ya que antes de que se lleve a cabo la condensación se presentan en bajas cantidades. Los genes homeóticos *hoxd-3*, *hoxd13*, *hox-2*, *chox-4*, *mhox*, *ck-erg* y *cart-1* y los factores de crecimiento *activina*, *Bmp4*, *Bmp5* y el factor de crecimiento y diferenciación-5 (*Gdf5*) se expresan en esta etapa de condensación. Las moléculas de adhesión celular N-cam y N-caderina aparecen cuando la condensación inicia, pero baja su expresión durante el tiempo que dura ésta. Se empiezan a sintetizar el agregcano, que va incrementando su concentración en esta etapa, y las moléculas de la matriz extracelular fibronectina y hialuronato (Hall y Miyake; 1995). Las células mesenquimatosas que se encuentran condensadas se diferenciarán en condrocitos inmaduros. Un cambio en la forma celular, en la expresión genética y un incremento en el depósito de matriz extracelular característica de cartílago son eventos característicos de esta etapa de diferenciación. La colágena tipo II y IX, y los proteoglicanos característicos del cartílago como el agregcano y la fibronectina; además del factor transcripcional *Pax-1*, son algunas de las moléculas que se expresan y se sintetizan en esta etapa de diferenciación. Los condrocitos en esta etapa se organizan para formar un molde de cartílago que corresponderá a la forma del elemento esquelético definitivo (figura 5) (Hall y Miyake, 1995, Pizette y Niswander; 2000).

Durante la diferenciación de los condrocitos, un conjunto de células de mesénquima rodea el elemento cartilaginoso y forma el pericondrio,

que es un centro inductor importante para el crecimiento de los huesos. Los elementos cartilagosos de la extremidad se forman en una secuencia temporal próximo-distal a través de un reclutamiento gradual de las células que forman la condensación inicial. La condensación inicial se bifurcará a través del eje antero-posterior para formar el zeugópodo (radio-ulna/tibia-fibula), y la condensación posterior que formará a la ulna o a la fibula seguirá bifurcándose para formar los elementos del autópedo (carpos-metacarpos/tarsos-metatarsos y dígitos). Algunas células de la condensación inicial formarán el elemento estilopoidal que constituirá al húmero o al fémur (Olsen *et al.*, 2000) (figura 6).

Los elementos esqueléticos individuales se generan por la separación de la condensación inicial en las zonas en donde se formarán las articulaciones (Fell y Canti, 1934). Las células precondrogénicas que se encuentren en las regiones de la condensación donde se formarán las articulaciones no se diferenciarán en condrocitos, sino que expresarán genes necesarios para la inducción de las articulaciones (Haines, 1947).

Existen moléculas a las que se les ha reconocido su importancia en el proceso de condrogénesis, una de ellas es Sox9. El papel del factor de transcripción Sox9 en la condrogénesis se ha reconocido en humanos que presentan una enfermedad llamada displasia campomélica (CD). La CD es un tipo de enanismo severo en el que los huesos largos se presentan arqueados, con hipoplasia de la cintura pélvica y escapular, anomalías de la columna vertebral, decremento en el número de costillas y anomalías craneofaciales severas (Foster *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994). La CD se debe a mutaciones en el gen Sox9 que no

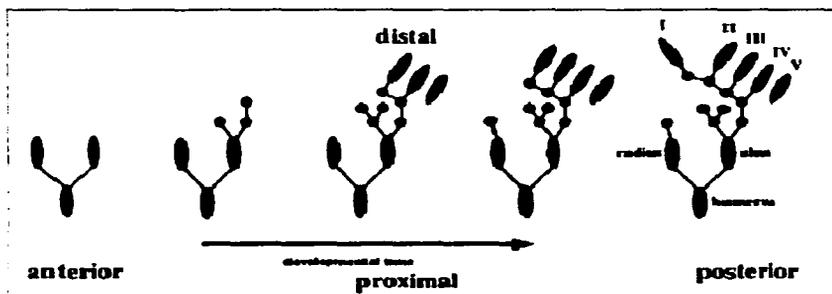


Figura 6. Formación de los elementos cartilagosos durante el desarrollo de la extremidad. Estos elementos se forman en una secuencia próximo-distal cuando avanza el tiempo de desarrollo, de tal manera que se forma primero el húmero y al final los dígitos. Los elementos se forman por medio de una serie de bifurcaciones y segmentaciones de las condensaciones de células mesenquimatosas que originalmente se forman de una condensación inicial.

permiten la expresión de componentes de la matriz extracelular característicos del cartilago, tales como la colágena II, las colágenas IX y XI y el agregano (Bi *et al.*, 1999; Lefebvre y de Crombrughe, 1998). Por lo tanto, Sox9 participa en la síntesis de la matriz extracelular necesaria para que se lleve a cabo la diferenciación de las células mesenquimatosas a condrocitos. Otros dos miembros de la familia Sox, L-sox5 y Sox6 también están involucrados en la condrogénesis, ya que al igual que Sox9 regulan la expresión de genes que codifican componentes esenciales de la matriz extracelular, sólo que estos se expresan en la fase de condensación del mesénquima y Sox9 se expresa en las células mesenquimatosas antes de que formen la condensación, lo que sugiere que Sox9 también es necesario para que se formen las condensaciones de mesénquima (Smits *et al.*, 2001; de Crombrughe *et al.*, 2001 y 2000).

Otros factores que juegan un papel importante en la condrogénesis son las citocinas que pertenecen a la superfamilia del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), sin embargo, estos factores no sólo están involucrados en la condrogénesis, sino también regulan de manera importante la formación de otros elementos presentes en las extremidades tales como las articulaciones y los tendones. A continuación se describirán algunos de los procesos morfogenéticos en los que están involucrados estos factores.

Miembros de la superfamilia del TGF- β en la condrogénesis y morfogénesis de la extremidad.

Entre los distintos miembros que pertenecen a la superfamilia del TGF- β se encuentran las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs), denominadas así por su capacidad de inducir cartilago y hueso cuando son aplicadas en sitios ectópicos en animales adultos (Urist *et al.*, 1979, Hogan, 1996). En la extremidad de pollo en desarrollo, *bmp2*, *bmp4*, y *bmp7* se expresan en el mesénquima que aún no se ha condensado y durante la fase de agregación en las células adyacentes a las condensaciones que posteriormente formarán el pericondrio. El RNAm de los receptores *bmpRII* y *bmpRIA* para BMPs se encuentran en todo el mesénquima, durante la morfogénesis de la extremidad, mientras que el receptor *bmpRIb* se expresa más específicamente en los agregados precondrogénicos, condrocitos inmaduros y pericondrio (Macías *et al.*, 1999). Esos patrones de expresión son compatibles con el señalamiento de las BMPs durante las múltiples fases de la condrogénesis de la extremidad.

Los primeros esfuerzos para determinar el papel de las BMPs en la condrogénesis de la extremidad *in vivo* dieron pocos frutos, debido a que

los fetos de ratones nulos para las distintas isoformas de la BMP o sus receptores morían de manera temprana y por lo tanto no se lograba obtener un fenotipo directamente relacionado a la formación del cartilago (Hogan, 1996; Zhang y Bradley, 1996; Dunn *et al.*, 1997; Katagiri *et al.*, 1998). Sólo se logró obtener un ratón nulo de *bmp5*; el *short ear*, el fenotipo de este ratón indicó que *Bmp5* está involucrado en la condensación del mesénquima precartilaginoso (King *et al.*, 1994). Algunos experimentos de sobreexpresión de receptores dominantes negativos de BMPs o de Nogina, un antagonista de *Bmp2*, *Bmp4* y *Bmp7*, que impide que estos factores interactúen con su receptor, produjo extremidades que carecían de elementos cartilaginosos (Kawakami *et al.*, 1996; Zou *et al.*, 1997; Capdevila y Johnson, 1998).

Se ha demostrado que las BMPs actúan en las fases finales de la condrogénesis ya que la adición de BMP en cultivo de células mesenquimatosas *in vitro* incrementa la condrogénesis después de la fase de condensación (Roark y Greer, 1994). La transfección de los genes *bmp2*, *bmp4*, o receptores tipo I de BMPs activados aceleran la maduración de los condrocitos y lleva a la fusión e hiperplasia de los elementos cartilaginosos de la extremidad (Duprez *et al.*, 1996; Zou *et al.*, 1997). La aplicación de perlas que contienen BMP en los interdigitos de la extremidad en desarrollo, aceleran la apoptosis y la separación temprana de los dígitos. De la misma manera, la implantación de perlas que contienen *Bmp4* en la punta de los dígitos en desarrollo resultó en una bifurcación de estos, acompañados de la formación de un área ectópica parecida a un interdígito extra tanto morfológica como molecularmente. Estos datos indican que la distribución espacial de los espacios interdigitales está controlada por la distribución de las BMPs en el mesoderma subyacente a la zona de progreso (Gañan *et al.*, 1996);

además de que se ha demostrado que las Bmp2, Bmp4 y Bmp7 son potentes señales apoptóticas para el mesodermo indiferenciado de la extremidad.

La pérdida de la función de *Nogina* hace que no exista un efecto antagónico contra las BMPs; presentándose altos niveles de estas durante el desarrollo embrionario de los vertebrados. En ratones knockout de *Nogina*, los elementos cartilagosos están engrosados y la formación de las articulaciones no se llevan a cabo. Debido a que la condensación inicial y la proliferación celular en la zona de la epífisis parece ser normal, se sugiere que el engrosamiento de los elementos cartilagosos se debe al aumento en células que responden a BMP (Brunet *et al*, 1998). Por otra parte, la sobreexpresión de *Nogina* resulta en la ausencia de los elementos cartilagosos debido a la inhibición de la formación de las condensaciones precartilagosas y a la diferenciación de los condrocitos (Pizette y Niswander; 2000).

A las BMPs también se les ha reconocido cómo factores que controlan la distribución espacial de las articulaciones. Dos isoformas de la familia de las BMPs están involucradas en la formación de las articulaciones: la Bmp2 y la Bmp7. Se ha encontrado que el efecto predominante de la Bmp2 es la alteración en la morfología de la articulación, mientras que Bmp7 es un potente factor que inhibe la formación de la articulación, de hecho la expresión de sus genes reveló un patrón que es complementario durante la formación de las articulaciones, es decir; *Bmp7* se expresa intensamente en el pericondrio de los elementos cartilagosos, pero de manera interrumpida, ya que en las zonas en donde están formándose las articulaciones no hay expresión de este gen, mientras que *Bmp2* se restringe a las zonas de las

articulaciones. Estos resultados sugieren que la *Bmp2* y la *Bmp7* establecen el lugar donde las articulaciones se formarán (Macias *et al.*, 1997).

Otro miembro de la familia de las BMPs involucrado en el desarrollo de las articulaciones es el factor de crecimiento y diferenciación-5 (*Gdf5*). Se sabe que mutaciones en el gen *Gdf5* causan braquiopodismo en el ratón, que es una alteración caracterizada por el acortamiento de las extremidades y ausencia de las articulaciones en los dígitos (Storm *et al.*, 1994). El gen *Gdf5* se expresa, al igual que *Bmp2*, en las regiones donde se formarán las articulaciones; sin embargo cuando se aplica *Gdf5* en la punta de los dígitos de la extremidad posterior de pollo, se promueve el crecimiento del cartílago, pero no se inducen señales moleculares ni se presenta la morfología característica de las articulaciones. Además, *Gdf5* aplicado en los interdígitos inhibe la formación de articulaciones en los dígitos adyacentes, estos datos lo que sugieren es que *Gdf5* no forma directamente las articulaciones, sino que más bien controla el crecimiento y la diferenciación del cartílago epifisial de las falanges de los dígitos, que es necesario para que ocurran los procesos involucrados en la formación de las articulaciones. Sin embargo, su papel aún se estudia. El engrosamiento del cartílago en la punta de los dígitos por efecto de *Gdf5* produce una duplicación de los tendones; sin embargo otras citocinas que son capaces de engrosar y formar cartílago ectópico no presentan este fenotipo (Tabla 1) (Merino, *et al.*, 1999).

Otro factor que influye en la formación del cartílago durante la embriogénesis temprana es el factor de crecimiento transformante- β (*Tgf- β*). El *Tgf- β* ejerce tanto efectos estimuladores como inhibidores durante la diferenciación del cartílago. Estos efectos dependen del estadio del

desarrollo en que se encuentre el embrión (Kulyk *et al.*, 1989; Carrington y Reddi, 1990; Schofield y Wolpert, 1990; Leonard *et al.*, 1991; Roark y Greer, 1994). La aplicación de Tgf- β en cultivos *in vitro* de células precondrogénicas incrementa la biosíntesis de proteoglicanos, además de que estimula la expresión de N-cadherina, N-CAM, fibronectina y tenascina (Chimal-Monroy y Lino Díaz de Leon; 1999). *tgf β 2*, una isoforma del Tgf- β , se expresa en las condensaciones cartilaginosas en la extremidad de pollo en desarrollo e induce la expresión de *bmpR-1b*, además de promover condrogénesis ectópica. Se ha propuesto que el Tgf- β regula la formación del cartílago por BMPs a través del receptor *bmpR-1b*, que se expresa en las condensaciones que formarán las falanges de los dígitos (Merino, *et al.*, 1998). El Tgf- β es capaz de revertir la muerte programada regulada por BMPs en las zonas interdigitales, ya que puede inducir diferenciación de estas células a cartílago, formándose dígitos extras (Gañan *et al.*, 1996). Por otro lado, el *Tgf- β 2* también se expresa en las zonas de las articulaciones y en los tendones en formación; sin embargo, aún no hay pruebas suficientes que indiquen su papel en la formación de dichas estructuras (Tabla 1) (Merino, 1998).

Las Activinas son otros miembros de la superfamilia de los TGF- β s que juegan un papel fundamental durante el desarrollo embrionario (Stern *et al.*, 1995) y están implicadas en el desarrollo temprano de la extremidad y en la diferenciación del músculo esquelético (Link y Nishi, 1997). La administración *in vitro* de la Activina promueve la condrogénesis de células de mésoquima de la extremidad de pollo (Jiang *et al.*, 1993). Estudios *in vivo* han demostrado que la Activina es una señal involucrada en la formación del esqueleto. La expresión genética de la subunidad βA de la Activina se correlaciona con el inicio de la condrogénesis de los dígitos en la pata de pollo, mientras que la

subunidad βB se expresa en la última falange de los dígitos en desarrollo. La administración exógena de la Activina en las regiones interdigitales induce la formación de dígitos extras, de la misma manera, el uso de la Follistatina, un antagonista natural de la Activina, inhibe la formación de los dígitos, lo que sugiere que la formación de los dígitos está mediada por la acción de la Activina. Se ha observado que la inducción de las subunidades de la Activina es llevada a cabo por BMPs durante la formación de las condensaciones de los dígitos (Merino *et al.*, 1999). Los transcritos de la subunidad βA de la activina aparecen desde etapas muy tempranas en las zonas en donde se formarán las articulaciones y se mantienen durante el desarrollo de la extremidad posterior de pollo. De la misma manera que la subunidad βA el RNA mensajero de la subunidad βB de la activina se localiza en las zonas de las articulaciones, pero la diferencia radica en que βB se encuentra en estadios relativamente más avanzados. No existen aún experimentos que demuestren la participación de la activina en la formación de las articulaciones (Tabla 1).

Los factores de crecimiento pertenecientes a la superfamilia de los Tgf- β s presentan una amplia gama de actividades biológicas involucradas no sólo en la morfogénesis de la extremidad, sino en otros procesos de desarrollo embrionario de vertebrados e invertebrados, tales como el crecimiento celular, la diferenciación, la migración, el establecimiento de contactos célula-célula y célula-matriz, el establecimiento de la forma celular, y la formación de muchos otros órganos (Masaje, 1998; Miyazono; 2000). Pero ¿por qué estos factores son capaces de inducir distintas respuestas celulares? ¿Qué es lo que hace que las células respondan de diferente manera a un solo factor?. La respuesta parece radicar, desde un punto de vista celular, en los tipos de moléculas que son reclutadas para transducir las señales dirigidas por

estos factores. A continuación se describirá de forma general, cómo se lleva a cabo la transducción de las señales de los miembros de la superfamilia de los TGF- β s y las principales moléculas involucradas en este mecanismo.

Vía de transducción de señales de la superfamilia del TGF- β

La superfamilia de los TGF- β consiste de aproximadamente 30 miembros encontrados en mamíferos, además de otros en *Drosophila melanogaster* y *Caenorabditis elegans* (Kingsley, 1994). Estos factores se agrupan en familias, de acuerdo a sus características estructurales. Estas familias son: la familia de los TGF- β s, la familia de las Activinas/Inhibinas, la familia de las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs), la sustancia inhibidora Müllleriana y la miostatina. La familia de los TGF- β s consiste de tres isoformas en mamíferos: Tgf- β 1, Tgf- β 2 y Tgf- β 3. El Tgf- β 2 y TGF- β 4 se encuentran en el pollo y TGF- β 5 en *Xenopus laevis*. El Tgf- β 1 puede sustituir la función del Tgf- β 5, ya que células de ratón *in vitro* responden biológicamente al Tgf- β 5 de *X. laevis* (Conidia *et al.*, 1990; Burt y Paton, 1992; Chimal- Monroy y Díaz de Leon; 1997). Existe un amplio espectro de actividades biológicas ejercidas por los miembros de esta familia, ya que participan en la regulación de la proliferación, la diferenciación, la adhesión y la apoptosis de distintos tipos celulares, en los que se incluyen las células endoteliales, epiteliales y hematopoiéticas (Roberts y Sporn, 1990; Miyazono *et al.*, 1994). Los TGF- β s participan también en la activación de la síntesis de moléculas de la matriz extracelular y en la inhibición de las enzimas que la degradan, estimula los contactos célula-matriz extracelular y célula-célula al promover la expresión de las integrinas y proteínas de adhesión celular (Coffman *et al.*, 1989; Sonoda *et al.*, 1989). Así mismo, participan en el proceso de diferenciación celular de las células de Schwann en el sistema nervioso, y en la diferenciación del

Familia.	Factor de crecimiento.	Patrón de expresión genética en la extremidad embrionaria.	Participación durante la morfogénesis de la extremidad
BMPs	<u>Bmp2</u>	Mesénquima, interdígito y articulaciones.	Formación de elementos cartilagosos, apoptosis en interdígito y mesodermo indiferenciado, regula la formación de las articulaciones.
	<u>Bmp4</u>	Mesénquima e interdígito.	Formación de elementos cartilagosos y apoptosis
	<u>BMP7</u>	Mesénquima, interdígito y articulaciones.	Formación de elementos cartilagosos, apoptosis en interdígito y mesodermo indiferenciado, regula la formación de las articulaciones.
TGF- β s	<u>Tgfb2</u>	Condensaciones cartilagosas, tendones y articulaciones	Formación de los elementos cartilagosos.
Activinas	<u>Activina A</u>	Subunidad β a: Condensaciones cartilagosas de falanges en desarrollo y articulaciones.	Formación de los digitos.
	<u>Activina ΔB</u>		Formación de los digitos.
	<u>Activina B</u>	Subunidad β b: última falange en desarrollo y articulaciones.	Formación de los digitos.

Tabla 1. Patrones de expresión y participación en la morfogénesis de la extremidad del pollo de los principales miembros de la superfamilia del TGF- β .

del Hueso, cartilago y músculo (Moses y Serra, 1996; Kingsley, 1994; Masaje, 1990; Sporn y Roberts, 1992). En la mayoría de las células, los TGF- β s detienen la proliferación celular.

Las Activinas, otros miembros de esta superfamilia de los TGF- β s se descubrieron como factores que estimulan la secreción de la hormona estimulante del folículo (FSH) en la hipófisis. Las Activinas están formadas por dos subunidades denominadas β . Existen cuatro isoformas de las

cadena monomérica β : βA , βB , βC y βE . Dependiendo de las isoformas que formen el dímero de la activina, se obtiene una nomenclatura; si el dímero se forma de 2 cadenas βA , se le da el nombre de Activina A, si está formada por una cadena βA y una βB se le denomina Activina AB y así sucesivamente (Pangas y Woodruff, 2000). Las Activinas en las etapas embrionarias de *X. laevis* inducen la formación del mesodermo dorsal. Además, estimulan la diferenciación de células eritroides, la proliferación de las células T y participan en la condrogénesis durante la formación de la pata del pollo (Hedger, 1989; Chen, 1993; Mathews, 1994; Merino *et al.*, 1999).

La familia de las BMPs se han subdividido en distintos grupos de acuerdo a sus estructuras. La Bmp2 y la Bmp4 son similares entre ellas y, con la proteína Decapentaplégico encontrada en *Drosophila*, forman un grupo. La Bmp5, la Bmp6, la Bmp7 y la Bmp8, estructuralmente similares, forman otro grupo. El Gdf5, el Gdf6 y el Gdf7 forman uno más. (Kawabata *et al.* 1998). Las BMPs al igual que los TGF- β s son reguladores del crecimiento, la diferenciación y la apoptosis celulares. Son proteínas que inducen la formación de hueso y cartilago *in vivo* (Wozney *et al.* 1988), además de que juegan un papel crítico en la morfogénesis, durante el desarrollo embrionario de vertebrados e invertebrados. Se ha demostrado que las BMPs inducen la diferenciación de células mesenquimatosas en osteoblastos y condroblastos (Katagiri *et al.* 1994; Luyten *et al.* 1994), regulan el desarrollo de células troncales hematopoiéticas, participan en la inducción de tejidos neurales, y estimulan la formación del mesodermo ventral en embriones de *Xenopus* (Bhatia *et al.*, 1999).

Los miembros de la superfamilia de los TGF- β s llevan a cabo su acción uniéndose a los receptores tipo I y tipo II del tipo serina-treonina

cinastas (Masaje, 1998). La unión al ligando induce la formación de oligómeros de estos receptores. Se piensa que este oligómero se compone de dos receptores tipo I, dos receptores tipo II y el ligando (figura 7).

Los ligandos se unen a los receptores tipo II que a su vez fosforilan al receptor tipo I en el dominio GS, que se localiza estructuralmente en la parte superior del dominio serina-treonina cinasa, considerándose la parte superior del receptor como la más próxima al dominio extracelular y la inferior en el dominio citoplasmático (Heldin et al., 1997). Una vez fosforilado el receptor tipo I en su dominio GS, puede activar la vía de transducción por las proteínas Smad y llevar a cabo la actividad biológica del ligando regulando la expresión genética en células blanco (figura 7). La sustitución del residuo Treonina-204 en el dominio GS del receptor tipo I de TGF- β s por el ácido aspártico resulta en la activación constitutiva del receptor (al receptor mutado se le denomina Alk-5 TD o T β R1 TD). De la misma manera la sustitución del residuo treonina o de la glutamina en el dominio GS en otros tipos de receptores tipo I da como resultado la activación constitutiva de los mismos. De esta manera los receptores mutados transducen la señal en ausencia de ligandos y de receptores tipo II (Miyazono; 2000). Se han identificado siete receptores tipo I en mamíferos y se denominaron, originalmente Alk1, Alk2, Alk3, Alk4, Alk5, Alk6 y Alk7 (ten Dijke et al., 1994a, b). Estos receptores están agrupados en tres subgrupos basados en sus similitudes estructurales. Alk5, Alk4 y Alk7 forman el grupo T β R-I (figura 8). Alk5 es el receptor tipo I para TGF- β s, Alk4 es el receptor tipo I para Activinas y Alk7 no se conoce aún su ligando. El grupo BmpR-I se compone de los receptores para BMPs; Alk3 y Alk6 o BmpR-Ia y BmpR-Ib -

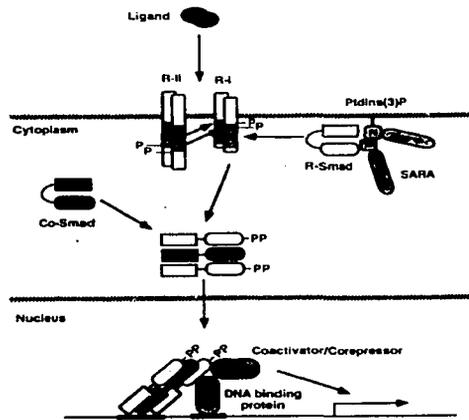


figura 7. La activación de las R-Smads, por los receptores serina-treonina cinasas, hace que se forme un complejo R-Smad/co-Smad que es transportado al núcleo: Las R-Smads se anclan a la membrana por medio de la proteína SARA antes de su activación. La unión del ligando con los receptores dirige la fosforilación del dominio GS del receptor tipo I (R-I) por el receptor tipo II (R-II). El receptor tipo I fosforila a la R-Smad en la región SSXS carboxilo terminal. La R-Smad forma entonces un complejo con la co-Smad (en forma de heterotrímero) y se transporta al núcleo, en donde el complejo Smad se asocia con otras proteínas de unión al DNA, así como a coactivadores o corepresores para regular la transcripción de genes blanco (Miyazono, 2000).

respectivamente. El tercer subgrupo lo forma el receptor Alk1 y Alk2. El receptor Alk2 une activina; sin embargo, parece que transduce señales de ciertas BMPs específicas, tales como Bmp6 y Bmp7 (ten Dijke *et al.*, 1994b; Macías-Silva *et al.*, 1998). El ligando fisiológico de Alk1 se desconoce, pero se ha descubierto que en ciertos tipos celulares incluidas las células endoteliales, el Tgf- β se une a este receptor (Lux *et al.*, 1999).

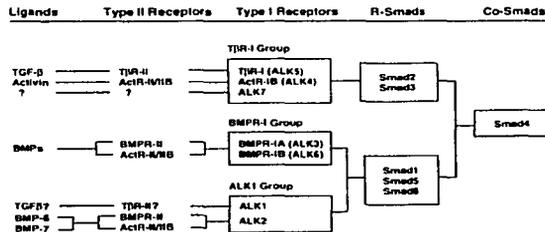


figura 8. Componentes de la vía de transducción de señales de las distintas familias que agrupa la superfamilia de los TGF- β (Miyazono, 2000).

Una vez activado el receptor tipo I por el tipo II, el asa L45 del receptor tipo I interactúa con los substratos intracelulares que son las proteínas Smad. Dada esta interacción, el receptor cinasa tipo I activa a las R-Smads fosforilándolas en la región SSXS, estas R-Smads forman un complejo con las co-smads. Este oligómero se transporta al núcleo y se une al DNA y a otras proteínas que se unen al DNA regulando la transcripción de genes blanco (figura 7) (Miyazono, 2000).

Las proteínas Smad tienen pesos moleculares de 42 a 65 KDa. Hay ocho distintas proteínas que se han identificado en los mamíferos y que se agrupan en tres subclases: las smads reguladas por los receptores (R-Smads), las Smads comunes (Co-Smads) y las Smads inhibitoras (I-smads) (Heldin *et al.*, 1997). Las R-Smads se pueden dividir, a su vez, en dos subtipos: la Smad2 y la Smad3 forman uno y transducen vías de señalamiento de TGF- β s y Activinas; mientras que el otro grupo formado por la Smad 1, 5 y 8 transducen el señalamiento de BMPs. Una única co-Smad se ha encontrado en mamíferos; la Smad 4 que participa tanto en

vías de señalamiento de TGF- β s y Activinas cómo en las de BMPs. La Smad 6 y 7 forman el grupo de las I-Smads o Smads inhibitoras, que antagonizan la actividad de las R-Smads.

Las Smads tienen regiones amino y carboxilo terminal altamente conservadas denominadas MH-1 y MH-2 respectivamente, que son conectadas por una región de unión para cada Smad, distinta en número y tipo de residuos de aminoácidos. Las tres clases de smad presentan el dominio MH-2, mientras que el dominio MH-1 se encuentra en las R-Smads y la Co-Smad, ya que la región amino terminal de las I-Smads es difiere de los otros dos grupos. Estudios cristalográficos revelaron que el dominio MH-1 de Smad 3 interaccionan directamente con el DNA (Shi, 2001), además de que es requerido para que la proteína pueda dirigirse al núcleo e interaccione con otros factores de transcripción, tales cómo Jun, Tfe3, Sp1 y Runx (Xiao *et al.*, 2000; Attisano y Lee-Hoeflich, 2001). El dominio MH-2 al igual que el MH-1 también es requerido para que esta asociación se lleve a cabo. Además la región MH2 media la asociación de las Smads con otro tipo de proteínas, tales cómo SARA, una proteína anclada a la membrana celular que interacciona con las R-smads para presentarlas al receptor tipo I y este pueda fosforilarlas (Shi, 2001; Wu *et al.*, 2000). De hecho en la parte más extrema de la región carboxilo terminal de las R-Smads hay una secuencia Ser-Ser-Val/Met-Ser (región SSXS) que es fosforilada por los receptores (Macías-Silva *et al.*, 1996; Kretschmar *et al.*, 1997; Abdollah *et al.*, 1997; Souchelnytskyi *et al.*, 1997). La región que une los dominios MH-1 y MH-2 de las Smads, llamada región de unión, presenta sitios potenciales de fosforilación por las MAP-quinasas que bloquean la acción de las R-smads y la exportación de la Co-smad del núcleo (Wrana, 2000; Zhang y Derynck, 1999; Watanabe *et al.*, 2000).

En la mayoría de los tipos celulares Smad 2 y 3 son activadas por TGF- β . En los queratinocitos, las Activinas activan a Smad3, mientras que el TGF- β s activa tanto a smad2 cómo a Smad3 (Shimizu *et al.*, 1998). En estadios muy tempranos del desarrollo la Activina, a través de Smad2 tiene un papel en la inducción del mesodermo dorsal. En este proceso también se involucra al factor Fast1, que forma un complejo con smad2 que también se une al DNA. No se conoce si las Co-Smads son esenciales para que se lleve a cabo la transducción de TGF- β s, Activinas y BMPs, aunque se ha reportado que la pérdida de expresión de Smad4 en células cancerosas provoca que no exista respuesta a los ligandos (Zhou *et al.*, 1998; Jonk *et al.*, 1998). Sin embargo, ya que algunas R-smads pueden unirse al DNA en ausencia de Co-smads, existe la posibilidad de que algunos genes puedan ser regulados sin la presencia de Co-Smads. Alternativamente, puede que aún no se hayan identificado otros tipos de Co-Smads en células de mamífero.

Smad1, 5 y 8 son activadas por BMPs, sin embargo, se ha descubierto que los TGF- β s pueden inducir la activación de Smad1 y 5 en ciertos tipos celulares. Por ejemplo, el TGF- β activa a smad1 en células tumorales de mama y en células epiteliales intestinales de rata (X. Liu *et al.*, 1998; Yue *et al.*, 1999a). También se ha demostrado que smad5 induce las mismas respuestas celulares que TGF- β en células hematopoiéticas (Bruno *et al.*, 1998) a través del receptor Alk1. Se sabe que Alk1 induce la fosforilación de Smad1 o Smad5, y es posible que la activación de estas Smads ocurra vía ALK1 (Attisano *et al.*, 1998).

Se ha demostrado que, con la sobreexpresión de ciertas Smads, se obtienen respuestas fisiológicas iguales a las producidas por los ligandos.

En células de mamífero la sobreexpresión de *Smad2* y *Smad3* induce la inhibición del crecimiento y la detención de las células en la fase G1 del ciclo celular, además de la apoptosis (Alfi *et al.*, 1997; Hunt *et al.*, 1998; Le Dai *et al.*, 1999).

En las células epiteliales, las *Smad2* y *Smad3* pueden inducir la apoptosis *in vitro* (Yanagisawa *et al.*, 1998). El TGF- β induce la activación transcripcional de ciertos genes, regulados por *Smad3/4* y *Smad2/4*, tal es el caso de *p21*, el cual juega un papel crítico en la inhibición del crecimiento celular. La expresión de proteínas de la matriz extracelular también está regulada por la acción de *Smad3/Smad4*.

También se ha observado que la sobreexpresión de *Smad1* y de *Smad5* induce la diferenciación de osteoblastos, a partir de células osteoprogenitoras, de manera similar que con la utilización de BMPs o formas constitutivamente activas de los receptores tipo I de BMPs; sin embargo, ni *Smad1* ni *Smad5* indujeron la formación de cartílago, aunque las *Smads* inhibitoras sí la bloquearon. Estos resultados sugieren que la diferenciación de los osteoblastos está conducida principalmente por la vía de las *Smads*, mientras que la condrogénesis puede ser regulada o no por esta vía (Fuji *et al.*, 1999).

Hasta este momento se han alterado cinco *smads* por recombinación homóloga en el ratón (Weinstein *et al.*, 2000). Ratones que carecen de *smad2*, *smad4* o *smad5* mueren durante su desarrollo embrionario. En el caso de los ratones nulos de *smad2* y *smad4* hay defectos en la inducción del mesodermo y en la formación del eje antero-posterior del embrión. Los ratones nulos para *smad5* presentan defectos en la angiogénesis. Los ratones deficientes en *smad3* son viables

pero con alteraciones en la respuesta de las células T, cáncer colorectal y degeneración en las articulaciones, parecidas a la osteoartritis. Ratones alterados en el gen *smad6* presentan anomalías cardiovasculares, en los que se incluye hiperplasia en las válvulas cardíacas, osificación de la aorta y elevada presión sanguínea (Affisano y Lee-Hoeflich, 2000).

En general todas las Smads son expresadas a través del desarrollo embrionario, en la mayoría de los tejidos adultos y tipos celulares. Análisis de embriones de ratón han revelado que hay una variación en el patrón, tiempo y nivel de expresión de cada Smad (Luukko *et al.*, 2001, Flanders, 2001). Por ejemplo las Smads inhibitoras, *Smad6* y *Smad7*, presentan el mismo patrón de expresión en el sistema cardiovascular en desarrollo, pero cada una exhibe patrones de expresión diferentes en otros tejidos tales como el hueso intramembranoso y los testículos. La *Smad4* se expresa de forma cosmopolita durante el desarrollo embrionario con niveles particularmente altos en el epitelio del intestino. De manera interesante las R-smads presentan expresiones superpuestas al menos entre una Smad regulada por BMPs y otra regulada por TGF- β s y Activinas.

Justificación del trabajo

Con base en los experimentos que demuestran el papel de los miembros de la superfamilia de los TGF- β s en la morfogénesis de la extremidad, en este trabajo se determinó la expresión genética de distintas *smads* en varias etapas del desarrollo de la extremidad de pollo, de tal manera, que se pudiera observar una correlación entre la expresión de ambos tipos de moléculas. Por otra parte, para saber cuáles *smads* están regulando el proceso de condrogénesis se sobreexpresaron las distintas Smads en células de mesénquima de la extremidad embrionaria de pollo.

Hipótesis

Algunos de los miembros pertenecientes a la superfamilia de los TGF- β s se expresan y participan en la morfogénesis (formación de articulaciones, formación de los tendones, muerte interdigital, etc.) de la extremidad de los vertebrados. Además, se sabe que el efecto de estos factores se transmite intracelularmente a través de la vía las Smads. Por lo tanto, se propone que las *smads* se expresarán diferencialmente durante los distintos procesos morfogenéticos que involucran la formación de la extremidad embrionaria, y participarán regulando la formación del cartilago.

Objetivos

Objetivo general

Determinar la expresión de distintas *smads* y su participación en la condrogénesis, durante la formación de la extremidad posterior del pollo.

Objetivos particulares

Clonar una región codificante del gen *smad8* para localizar su expresión por hibridación *in situ* durante la morfogénesis de la extremidad posterior del pollo.

Correlacionar, por hibridación *in situ*, la expresión genética de los distintos miembros de la superfamilia de los TGF- β s con la de las *smads* durante el desarrollo embrionario de la extremidad posterior del pollo.

Amplificar adenovirus cuyos genomas tienen insertados genes de las *smads* para infectar células de mesénquima de extremidad posterior del pollo y sobreexpresarlos.

Evaluar cualitativamente, con tinción de azul-alciano, la síntesis de glucosaminglucanos (GAGs) sulfatados por células mesenquimatosas de la extremidad posterior del pollo transfectadas con los genes de las *smad*.

Materiales y Métodos

Clonación del gen *smad8*

Se consultó en el banco de datos de secuencias de genes (Gen Bank, <http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/>) la secuencia completa de *smad8* y se diseñó un oligonucleótido sentido con la secuencia **cactggaatggttgagttcc**, localizado en la posición 212 y un antisentido **cacattcagcatcacattctcc**, en la posición 961, de tal manera que se obtuviera un fragmento de 750 pares de bases. Se aisló RNA de extremidad de pollo en diferentes estadios de desarrollo y, se obtuvo un cDNA por reverso transcripción correspondiente al fragmento de *smad8*. Los oligonucleótidos se hibridaron a la secuencia del fragmento y se amplificó mediante PCR. El fragmento del gen se insertó en el plásmido TOPO de 3.9 Kb por ligación para utilizarlo como vector. Después se llevó a cabo la transformación de bacterias competentes *Escherichia coli*, DH5 α , introduciéndoles el vector TOPO mediante choque térmico. Las bacterias fueron cultivadas en placas LB agar con IPTG, X-gal y ampicilina para llevar a cabo la selección. Las colonias blancas se aislaron y se hicieron crecer en medio LB líquido con ampicilina (10 μ g/ml) a 37 °C toda la noche en agitación. Se realizaron minipreparaciones del fragmento clonado y se liberó por un ensayo de restricción con EcoR1. Las minipreparaciones que presentaron el tamaño de la inserción se secuenciaron y la secuencia se analizó en BLAST, demostrándose así que el fragmento del gen de pollo *smad8* estaba clonado.

Preparación de la sonda

De las minipreparaciones obtenidas de la clonación de *smad8* y de los plásmidos con los genes *smad1*, *smad3*, *smad5* y *smad6*, donadas por el Dr. Juan Hurlé de la Universidad de Cantabria España, se realizaron linearizaciones con el objeto de transcribir dichos fragmentos. Se utilizó la enzima PstI, para linearizar el plásmido con *Smad1*, Sall, para los plásmidos con *smad3* y *smad5*, XbaI para *smad6* y ApaI para *smad8*. La transcripción se llevó a cabo utilizando la RNA polimerasa T7 para las *smads* 1, 3 y 5 y la SP6 para la *smad6* y 8 con UTP-digoxigenina como marcador de RNA.

Hibridación in situ

Se aislaron extremidades posteriores de pollo en distintas etapas del desarrollo y se fijaron en paraformaldehído al 4% a 4°C toda la noche. Se deshidrataron en concentraciones graduales metanol (50%, 75% y 100%) en PBT (ver anexo) y se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento. Para empezar la hibridación, las extremidades se hidrataron y se lavaron en PBS. Las muestras se incubaron con peróxido de hidrógeno al 6% en PBT durante una hora en la oscuridad. Posteriormente las extremidades se lavaron con PBT y se incubaron con proteinasa K a una concentración de 10 µg/ml por 25 minutos. Se fijaron en paraformaldehído 4%-glutaraldehído 0.2% durante 20 minutos. Después de otros lavados en PBT, se incubaron con un amortiguador de hibridación (ver anexo) durante 2 a 3 horas a 65 °C. Al término de la incubación, se desnaturalizaron las sondas por 2 minutos a 80°C y se colocaron inmediatamente en hielo. La sonda se añadió a las extremidades y se dejaron hibridando en baño seco toda la noche de 65 a 68°C. Se realizaron diferentes lavados a las extremidades: dos veces durante 60 minutos con la solución I a 65°C (ver anexo), una vez durante 10 minutos en una mezcla de la solución 1/2 (dilución 1:2) a 70°C, tres veces durante 10 minutos con la solución II a

temperatura ambiente (ver anexo), una vez durante 60 minutos con la solución II a 37°C, una vez durante 10 minutos con la solución II a temperatura ambiente, una vez durante 10 minutos con la solución III (ver anexo) a temperatura ambiente, 1 vez durante 30 minutos con la solución III a 65°C y tres veces durante 10 minutos con TBST-2mM de levamisol (ver anexo) a temperatura ambiente. Después de estos lavados, las muestras se prebloquearon con 10% de suero de cabra de 2 a 3 horas en el agitador horizontal. Se dejó incubando a 4°C toda la noche con un anticuerpo antidigoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina (Boehringer; Roche) con una dilución 1/2000. Se realizaron varios lavados con TBST + 2mM de levamisol. Por último, se hicieron dos últimos lavados con NTMT y la marca se reveló con substrato para fosfatasa alcalina que muestra las zonas hibridadas en color azul-morado.

Amplificación de Adenovirus recombinantes.

Se infectaron células de riñón embrionario humano modificadas genéticamente (células Q293T10) con adenovirus recombinantes que portan los genes de las distintas *smads*. Estas células se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en medio DMEM al 5% de SFB. Una vez desprendidas de las placas de cultivo en aproximadamente 4 días, las células se recolectaron en tubos de 15 ml y se sometieron a 6 ciclos de congelación-descongelación con N₂ líquido para liberar a los virus. Las células lisadas se centrifugaron a 1,500 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C y se recolectó el sobrenadante. El sobrenadante con el adenovirus se almacenó a -70°C hasta su utilización. Los adenovirus recombinantes fueron donados por los doctores Makiko Fujii y Mohei Miyazono del Instituto de cáncer del Japón y fueron mandados con un título de 10⁸ o mas unidades formadoras de placas por mililitro (p.f.u./ml).

Cultivos de micromasas e infección con adenovirus recombinantes.

Se recolectaron extremidades posteriores de pollo de 4.5 días de desarrollo. Estas extremidades se lavaron en PBS y sus células fueron disgregadas con tripsina al 0.25% y colagenasa al 0.3%. Se neutralizaron las enzimas con medio DMEM con SFB al 10%. Las células disgregadas fueron sembradas en placas de 48 pozos a una densidad de 2×10^5 células en 10 μ l de DMEM con SFB al 5%. Estas células se dejaron adherirse a los pozos de 1 a 2 horas a 37°C con 5% de CO₂. Después se les agregaron 100 μ l de medio con virus y se complementó con 150 μ l de DMEM y se dejaron durante 3 días de cultivo.

Tinción con Azul Alciano.

Para evidenciar la formación del cartílago, los cultivos se fijaron con fijador Khale (ver anexo) por 20 minutos y teñidos con azul alciano al 0.5% en HCl 0.1N (pH1) toda la noche. Este colorante tiñe glucosaminglicanos sulfatados, característicos del cartílago, por lo que es utilizado para evaluar diferenciación de células mesenquimatosas a condrocitos. Los cultivos teñidos se contrastaron al día siguiente con HCl 0.1N dos veces por espacio de 5 minutos cada una. Se lavaron en PBS frío y se observaron en un microscopio estereoscópico para ver si el cultivo se tiñó con azul alciano .

Resultados

Expresión genética de las R-Smads de BMPs en la extremidad posterior del pollo.

Para determinar la expresión de las R-Smads de BMPs; *smad1*, *smad3* y *smad5*, durante la morfogénesis de la extremidad del pollo se realizaron hibridaciones *in situ* en extremidades posteriores de pollo del estadio 25 al 32. La figura 8 muestra la expresión de estos genes. En el estadio 25-26 la *smad1* se localizó en el mesénquima subyacente al ectodermo, que corresponde a la zona de progreso que bordea la parte más distal de la extremidad, esta expresión se identificó en estadios posteriores en la zona interdigital y en el pericondrio que rodea las falanges de los dígitos (figura 8). *Smad1* también se encontró en las articulaciones de extremidades en etapas posteriores, desde el estadio 30 al 32. La expresión de *smad5*, al igual que la de *smad1*, se presentó en articulaciones, pericondrio e interdígito en los mismos estadios de desarrollo, solo que en etapas más tempranas; del estadio 25 al 28, *smad5* se localizó en las condensaciones cartilagosas. *smad8* mantuvo su expresión a lo largo de la cresta apical del ectodermo, durante el desarrollo de la extremidad. El RNAm de *smad8* también se localizo en las condensaciones de cartilago ya formado; y en etapas posteriores la expresión se localizo en interdígito y se mantuvo en la AER y zona de progreso (figura 9).

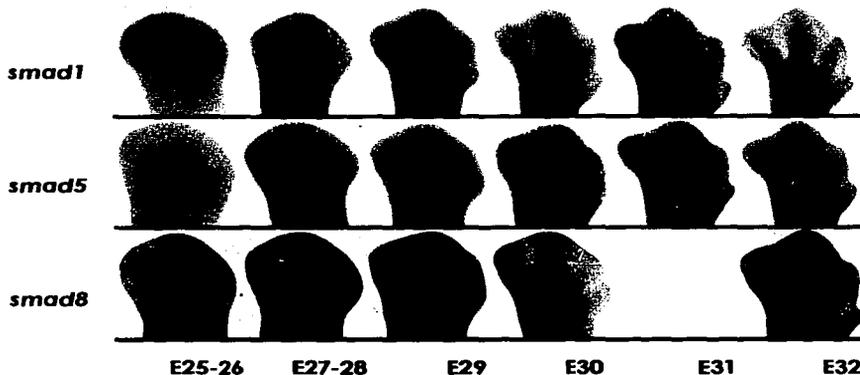


Figura 9. Hibridaciones *in situ* que muestran la expresión genética de las R-Smads de BMPs: *smad1*, *smad5* y *smad8*. En la parte inferior se indica el estadio de desarrollo en que se encuentran las extremidades (según Hamburger, 1951). E = Estadio

Expresión genética de smad3 en la extremidad posterior del pollo

Smad3 es una R-smad que transduce señales de TGF- β s y Activinas. Para localizar los transcritos de este gen se realizaron hibridaciones *in situ* en extremidades embrionarias del pollo desde el estadio 25 al 32. Este gen se expresó en condensaciones cartilaginosas en los estadios del 25 al 28 y a medida que avanzó el desarrollo de las extremidades se restringió a los tendones (a partir del estadio 29 al 32) (figura 10).

Expresión genética de smad6 en la extremidad posterior del pollo.

Se observó también por hibridación *in situ* la expresión de la smad inhibidora; *smad6*. Interesantemente, este gen se expresó en el cartilago

desde el estadio 25 y se mantuvo durante el desarrollo de la extremidad (figura 11).



Figura 10. Hibridaciones *in situ* que muestran la expresión de *smad3*. *Smad3* es un factor que transduce el señalamiento de TGF- β y Activina. En la parte inferior se señala el estadio de desarrollo de las extremidades (Según Hamburger, 1951).

La *smad6* también se observó en la AER de forma discontinua ya que se marco sólo en el epitelio que rodea la punta de los dígitos. Al igual que *smad8*, *smad6* se localizó en la zona de progreso (figura 11).



Figura 11. Hibridación *in situ* que muestra la expresión de *smad6*. *Smad6* es un inhibidor de la vía de señalamiento de las R-smads. En la parte inferior se señala el estadio de desarrollo de las extremidades (Según Hamburger, 1951).

Efecto de las Smads en cultivos de micromasas.

Para determinar el efecto de las Smads en la condrogénesis *in vitro* de células de mesénquima de extremidad de pollo se realizaron cultivos de micromasas que se infectaron con adenovirus recombinantes que

portan estos genes. Los controles fueron cultivos que sobreexpresaron Lac Z usando también vectores adenovirales.

Ni la sobreexpresión de las *R-Smads*, ni la de *smad4* (co-Smad); ni tampoco de las *smads* inhibitoras en cultivos de micromasas por sí solas mostraron diferencias en la condrogénesis (Figura 12).

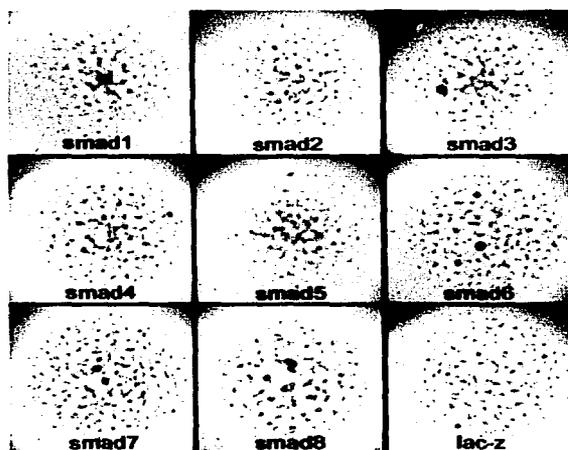


Figura 12. La sobreexpresión de las Smads por sí solas en cultivos de micromasas no tuvo ningún efecto. Células de mesénquima de la extremidad posterior de pollo de 4.5 días de desarrollo fueron disgregadas y sembradas a una concentración de 2×10^5 células en $10 \mu\text{l}$ de D-MEM con 10% de SFB. Se dejaron incubar de 1 a 2 horas y se infectaron con adenovirus recombinantes que portan las distintas *smads* y a *lac Z*, éste último usado como control. Después de 3 días de cultivo se fijaron y tiñeron con azul alciano para observar matriz extracelular característica de cartilago. No se observan cambios evidentes en la tinción.

Debido a que las R-smads requieren de la Co-smad para transportarse al núcleo y encender genes blanco se realizaron co-transfecciones y, se lograron obtener diferencias con los distintos tratamientos, ya que se presentaron diferencias en la síntesis de GAGs (figura 13).

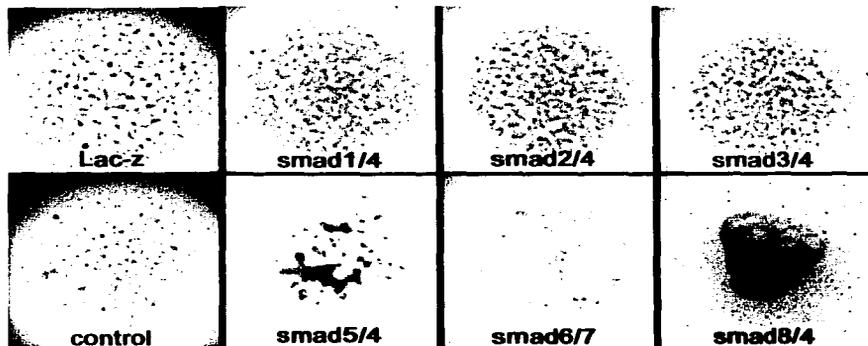


figura 13. Células tratadas igual que en la figura 11, solo que aquí se realizaron dobles infecciones. La sobreexpresión de *smad1* con *smad4* (*smad1/4*), *smad2* con *smad4* (*smad2/4*) y *smad3* con *smad4* (*smad3/4*) indujo condrogénesis. Cultivos que sobreexpresaron *smad5* con *smad4* (*smad5/4*) y *smad8* con *smad4* (*smad8/4*) alteraron la adhesión celular por lo que no se logra evaluar la condrogénesis. La presencia de ambas smads inhibitoras, *smad6* y *smad7*, interrumpen la formación de matriz extracelular característica del cartilago ya que estos cultivos no se tiñeron con azul alciano (*smad6/7*).

Estas co-transfecciones consistieron en sobreexpresar una R-smad (*smad1*, *smad2*, *smad3*, *smad5* y *smad8*) con la Co-Smad (*smad4*) para ver si con la sobreexpresión de estas dos proteínas se inducía un efecto en la condrogénesis. La co-transfección de *smad1/smad4*, *smad2/smad4* y *smad3/smad4* en los cultivos de micromasa indujeron condrogénesis, en comparación con los cultivos control (infectados con adenovirus que

expresaban Lac Z, y sin infecciones). En el caso de *smad5/smاد4* y *smad8/smاد4* la mayoría de las células se desprendieron del pozo después de 2 días de cultivo; aunque las células que permanecieron adheridas a la superficie del pozo mostraron producción de matriz extracelular característica de cartilago, ya que al tercer día de cultivo fueron positivos a azul alciano (figura 13).

Cuando se sobreexpresó alguna de las smads inhibidoras, ya fuera *Smad6* o *Smad7* no se presentó efecto alguno en los cultivos de micromasas; sin embargo, cuando ambas smads inhibidoras estuvieron presentes, los cultivos no se tiñeron con azul alciano, indicando la ausencia de matriz extracelular característica del cartilago y por lo tanto inhibición en la condrogénesis.

Estos resultados sugieren que al expresarse las *Smads* en la extremidad en desarrollo, podrían tener un papel importante en la morfogénesis de ésta, además de que las células mesenquimatosas de la extremidad responden ante estos factores a nivel de la condrogénesis.

Discusión.

En este trabajo se identificó la expresión genética de las R-smads de BMPs, de la *smad3* que es una de las dos R-smads de TGF- β y Activinas y, de una I-smad; la *Smad6* en distintas etapas del desarrollo embrionario de la extremidad posterior del pollo (figura 9, 10 y 11). Se ha comprobado que TGF- β s, Activinas y BMPs son factores necesarios para que la extremidad se desarrolle correctamente y pueda ser funcional. Los TGF- β s y las Activinas pueden inducir dígitos ectópicos en la zona interdigital, además de que *tgf β 2* se expresa en las condensaciones cartilaginosas, tendones y en la punta de las falanges de los dígitos en desarrollo.

(Gañan *et al.*, 1996; Merino *et al.*, 1999). La *smad3*, similar a Tgf β 2, aparece en los tendones en formación, lo que nos sugiere que posiblemente Tgf- β s estén involucradas en la morfogénesis de los tendones vía *smad3*. De la misma manera que Tgf- β , los transcritos de *smad3* aparecieron durante las condensaciones cartilagosas, por lo que probablemente *smad3* sea la *smad* transdutora para que se lleve a cabo la condrogénesis. Esto se comprobó sobreexpresando la *smad3* en cultivos de micromasas, ya que al igual que Smad2 y Smad3, indujo la condrogénesis sólo si se sobreexpresaba conjuntamente la co-*smad*, *smad4*. Por otro lado, la co-transfección de *smad2* con *smad4* indujo también condrogénesis, lo que sugiere que Tgf- β también mediaría este proceso por medio de Smad2. Sin embargo la Smad2 y la Smad3 son transductores también de Activinas que inducen condrogénesis, posiblemente a través de estos factores de transcripción. La subunidad β A de la activina se expresa en la punta de los dígitos en desarrollo y articulaciones, y los transcritos de la subunidad β B aparecen primero en las articulaciones en formación y en la punta de la última falange en desarrollo, pero en este trabajo solo se observó la expresión de *smad3* que no corresponde al patrón de expresión de las Activinas, por lo que *smad2* podría transducir tanto señales de TGF- β s y Activinas para la formación de articulaciones, siempre y cuando *smad2* se exprese en las articulaciones en desarrollo y en los elementos cartilagosos en formación, aunque esto debe comprobarse ya que no se conoce la expresión *smad2* durante el desarrollo de la extremidad. Sin embargo, las células mesenquimatosas que forman el primordio de la extremidad son competentes ante Smad2 y Smad3, ya que la sobreexpresión de estas *smads* junto con Smad4 se indujo el aumento en la condrogénesis. Estos resultados concuerdan con los experimentos *in vivo* en donde la aplicación de Tgf- β y Activina en la pata de pollo en desarrollo provocan

el engrosamiento del cartilago o la formación de nuevos elementos cartilaginosos (Gañan *et al.*, 1996; Merino *et al.*, 1999). Por lo consiguiente, se propone que Tgf- β y Activina están induciendo la formación del cartilago via Smad2 y Smad3 en células de mesénquima de la extremidad.

Se conoce que las BMPs están involucradas en la formación y mantenimiento de la AER, en la formación del cartilago, en la muerte interdigital y en la regulación de la formación de las articulaciones (Gañan *et al.*, 1996; Macías *et al.*, 1997; Merino *et al.*, 1998; Pizette y Niswanser, 2000). Se ha observado que *bmp2* se expresa en la zona interdigital y en las zonas de las articulaciones en desarrollo y, *bmp7* en la zona interdigital y en el pericondrio de forma interrumpida, además de que ambas BMPs son potentes señales apoptóticas para las células del mesodermo indiferenciado (ver introducción, Macías *et al.*, 1997). De las hibridaciones *in situ* para las R-Smads transductoras de BMPs realizadas en el presente trabajo, se encontraron los transcritos de *smad1* y *smad5* en las zonas de las articulaciones, el pericondrio y el espacio del interdígito. Estos resultados indicarían que la actividad biológica de Bmp2 relacionada a la formación de las articulaciones sería transducida vía Smad1 y/o Smad5, ya que estas tres moléculas se expresan en las zonas de las articulaciones. Por otro lado, Bmp2, Bmp4 y Bmp7, que se expresan en interdígito, son capaces de inducir la muerte celular por apoptosis en esta zona. El efecto de esta respuesta celular podría ser transducida por Smad1 y/o Sma5, ya que los genes de ambos transductores se expresan en interdígito similarmente. De la misma manera *smad1* y *smad5* se expresan en el pericondrio, lo que nos indicaría que estas proteínas dirigirían la actividad de Bmp7, ya sea para establecer al pericondrio cómo un importante centro inductor de regulación del crecimiento de los

huesos largos o para inducir la expresión de genes que modulan directamente la organización de la placa de crecimiento que es también esencial para el crecimiento de estos huesos. Las BMPs también son importantes reguladoras e inductoras de la formación del cartilago, que aunque no se expresen en los elementos cartilaginosos (pero sí en las condensaciones precondrogénicas), son capaces de generar hueso ectópico, incluso en animales adultos (Urist *et al.*, 1979). El receptor tipo I para BMPs el *bmpr-1b* (*alk6*) y la proteína transdutora *smad8* se expresan en el cartilago en formación, lo que sugiere que las BMPs inducirían la formación del cartilago vía BmpR-1b y Smad8 en etapas relativamente tardías y por Smad5 y Smad8 en la formación de condensaciones precartilaginosas en estadios más tempranos. Sin embargo, estas posibilidades no se apoyan por los experimentos *in vitro* de cultivos de micromasas realizados en el presente trabajo, ya que la sobreexpresión de *smad5* y *smad8* afectó la capacidad de las células para adherirse a las placas de cultivo. De hecho, el efecto fue más dramático sobreexpresando *smad 8*, ya que hubo más células desprendidas y poca producción de moléculas afines al colorante azul Alciano. En el caso de sobreexpresión de *smad5*, las células que lograron adherirse produjeron algunos componentes de matriz extracelular positivos a la tinción con azul-alciano, lo que no descarta completamente la posibilidad de que Smad5 más que Smad8 este involucrada en la condrogénesis durante la morfogénesis de la extremidad. Otra posibilidad es que Smad1 sea la proteína transdutora de BMPs para inducir condrogénesis, de acuerdo con los experimentos *in vitro* presentados aquí; sin embargo no concuerdan con la expresión de *smad1*, ya que éste no se expresó en las condensaciones de cartilago, pero sí para *smad8* que presentó una expresión en los elementos cartilaginosos en formación.

Se ha sugerido que la señalización de las BMPs para la formación del cartilago podría ser independiente de la señalización por las proteínas Smad, una posibilidad que se comprobó con los experimentos de sobreexpresión de las proteínas Smads en células ATDC5 (que son células de mesénquima progenitoras de cartilago) en las que no se logro inducir la formación de nódulos de cartilago (Fujii *et al.*, 1999). Sin embargo, esta posibilidad puede descartarse debido a la expresión de la *smad6*, que es una Smad inhibidora que impide el transporte de las R-smads al núcleo. La presencia de *smad6* en los elementos de cartilago indica que este factor está regulando alguna de las R-smads y que podría ser Smad8 por la expresión presentada. Dados dichos resultados, es difícil considerar que las formación del cartilago sea independiente de la vía de las smads.

Aunque *smad1* no se expresó en las condensaciones de cartilago ni en el cartilago ya formado, si es capaz de inducir condrogénesis en células de mesénquima de la extremidad en cultivos de micromasas, siempre y cuando se encuentre también la presencia de Smad4. Esto indica que las células de mesénquima del primordio de la extremidad son capaces de activar a Smad1 y responder ante esta molécula de señalamiento junto con Smad4 para inducir condrogénesis. Estos experimentos *in vitro* concuerdan con otros estudios realizados anteriormente con el mismo sistema pero aplicando BMP, ya que en estos cultivos celulares de micromasas a los que se les aplica BMP también inducen la formación del cartilago (Pizette y Niswander, 2000).

Cómo se ha mencionado anteriormente la Bmp2, la Bmp4 y la Bmp7 son potentes señales apoptoticas para las células del mesodermo de la extremidad que se encuentran en interdígito, ya que la implantación de perlas que contienen a estos factores aceleran la

muerte celular interdigital (Macías *et. Al.*, 1997; Merino *et. al.*, 1998). Este importante proceso de acuerdo con los transcritos encontrados en el presente trabajo podría estar mediado por la Smad1, la Smad5, y la Smad8, sin embargo como ya se mencionó la sobreexpresión de *smad5* y *smad8* indujo el desprendimiento de algunas células de las placas de cultivo pocas horas después de sembrarlas (aproximadamente 2 horas). Aunque no lo comprobamos experimentalmente, especulamos que posiblemente las células desprendidas murieron, sugiriéndonos que quizás Smad5 y Smad8 transducen la señalización relacionada a apoptosis por BMPs. Quizás la Smad5 y la Smad8 puedan ser activadas por los receptores tipo I para llevar a cabo su efecto apoptótico de forma rápida. Sin embargo, no todas las células se desprendieron como respuesta a la Smad5 y a la Smad8, ya que otras sobrevivieron e incluso secretaron glucosaminoglucanos sulfatados lo que indica que lograron diferenciarse a cartilago. De hecho, el patrón de los nódulos de cartilago en células que sobreexpresaron *smad5* fue notablemente distinto al de los otros cultivos tratados y a los del control (figura 13). Esto da una mayor evidencia de que *smad5* está actuando en la organización de los condrocitos y en la morfogénesis de las células que conforman la extremidad.

Es muy probable que Smad8 este involucrada en la inducción y el mantenimiento de la AER por BMPs, ya que su expresión se mantiene a lo largo de ésta durante el desarrollo de la extremidad y concuerda con la expresión de las BMPs descritas por Pizette y col. (Pizette *et. al.* 2001). Las BMPs reprimen la expresión de los genes *msx* en las células del ectodermo para que se forme la AER. De esta manera, las BMPs controlarían la expresión de estos factores vía Smad8. Posiblemente Smad8 induce la expresión de algún factor que reprima intracelularmente la expresión de

los factores *msx*. Ya que el establecimiento del eje antero-posterior y dorso-ventral está interrelacionado por BMP sería interesante saber que *smad* se expresa en el ectodermo ventral que induciría directamente la expresión de *en-1* para que se lleve a cabo la ventralización de la extremidad.

Se realizaron hibridaciones de la *smad* inhibidora *smad6*, con el objeto de conocer la participación de esta Smad en la regulación de las R-smads. *smad6* se expresó en las condensaciones cartilagosas desde estadios tempranos a estadios más avanzados. Smad6 evita el transporte de las R-smads hacia el núcleo, por lo que impide que exista respuesta biológica de las células ante los miembros pertenecientes a la superfamilia de los TGF- β . La presencia de los transcritos de *smad6* en las condensaciones cartilagosas indicarían que Smad6 está regulando la señalización de BMPs por Smad8 para la formación del cartilago. Como anteriormente se demostró, la sobreexpresión de *smad8* en cultivos de micromasas alteró la adhesión celular haciendo que las células no se adhirieran o se desprendieran de las placas de cultivo impidiéndonos observar una respuesta fenotípica con la tinción de azul alciano y, por lo tanto, no se pudo comprobar *in vitro* lo que se observo con las hibridaciones *in situ*. Por lo tanto, existen dos posibilidades: Smad6 puede impedir un sobrecrecimiento del cartilago regulando la diferenciación de células competentes a TGF- β , Activina o BMP o impediría que las células que forman los elementos cartilagosos presenten apoptosis por acción de BMPs. Por otro lado una proteína antagonista natural de las BMPs, Nogina, se expresa en los radios digitales impidiendo que las BMPs presenten sus efectos apoptóticos sobre estas células, aunque paradójicamente estas células logran responder a las BMPs para diferenciarse a cartilago. Al parecer el tipo de receptor que presentan las

células es el responsable de que respondan de una u otra manera ante un mismo factor de crecimiento, así, se cree que el receptor BmpR1b es la molécula responsable para que las células se diferencien a cartilago y no se vayan a apoptosis (Merino *et al.*, 1998). Smad6 estaría al igual que Nogina bloqueando la respuesta apoptótica de BMPs en células presentes en las condensaciones de cartilago. Si esta posibilidad fuera cierta, los vertebrados desarrollarían a través de su evolución varios mecanismos de regulación que evitarían estragos durante el desarrollo de la extremidad y que además garantizarían un órgano que fuera altamente funcional.

Al sobreexpresar los diferentes tipos de *Smads* en cultivos de micromasas para ver su efecto a nivel de condrogénesis no se pudo observar cambio alguno cuando se sobreexpresaron por sí solas (figura 12), pero cuando se co-transfectaron las R-smads junto con la Co-smad (*smad4*) se lograron observar cambios significativos en los cultivos, en donde la sobreexpresión de *smad1/smاد4*, *smad2/smاد4*, *smad3/smاد4* indujeron condrogénesis, la cual puede ser evaluada por la tinción de Azul-Alciano que tiñe glucosaminglucanos sulfatados, y *smad5/smاد4* y *smad8/smاد4* afectaron la adhesión celular, ya que las algunas células no pudieron adherirse a las placas de cultivo o se desprendieron durante el tiempo de cultivo, aunque las células sobrevivientes lograron producir una matriz rica en glucosaminglucanos sulfatados (Figura 13). Estos resultados indican que es necesaria la presencia de Smad4 para que las R-Smads logren efectuar su acción al menos en este sistema. En otros experimentos utilizando células ATDC5, la sobreexpresión de las R-Smads por sí solas, y usando los mismos vectores adenovirales que aquí se utilizaron no lograron que estas células pudieran diferenciarse ni formar nódulos de cartilago, solo las I-smads pudieron inhibir la condrogénesis en

este sistema (Fujii, 1999). Sin embargo, en estos estudios no se realizaron co-transfecciones para sobreexpresar a la Co-smad junto con las R-smads.

Interesantemente, cuando se sobreexpresó *smad6* no se logró inhibir la condrogénesis y lo mismo sucedió con la *smad7*. Pero cuando ambas se sobreexpresaron, la inhibición de la condrogénesis observando la síntesis de glucosaminglicanos sulfatados fue evidente (Figura 13). Estos datos propondrían que ambas I-smads son necesarias para ejercer su efecto inhibitor en este sistema; sin embargo, no hay aún datos suficientes que apoyen esta suposición. De comprobarse la interdependencia de ambas I-smads se plantearía un novedoso modelo que integraría nuevos elementos en la transducción de la señal y su regulación por vía de las Smads.

Los diferentes miembros de la Superfamilia de los TGF- β s muestran una gran gama de actividades biológicas, entre las más conocidas, la diferenciación y crecimiento de las células, la respuesta inmune, la producción de matriz extracelular y, la regulación de la adhesión celular (Masaje, 1998). Se ha propuesto que las células responden ante estos factores de crecimiento de diferente manera por la presencia de moléculas que intervienen en la transducción de sus señales. Por ejemplo, las células que forman los radios digitales del autópodo de la extremidad pueden diferenciarse a condorcitos, ya que solo expresan el receptor *bmpr-1b* y no otros receptores que quizás estén involucrados en las respuestas apoptóticas. En el presente trabajo se logró observar que, en algunos de los casos, las expresiones de las *smads* fueron diferenciales, es decir, el patrón de expresión de *smad1* fue diferente al de *smad3*, *smad8* y *smad6* en estadios relativamente tardíos, y el patrón de *smad3* fue

diferente al de *smad1*, *smad5*, *smad8* y *smad6*, y así si comparamos el patrón de expresión de cada una de las *smads* con el de las otras. Las diferencias en el patrón de expresión sugieren que cada *smad* está participando en la morfogénesis de los distintos elementos que componen la extremidad, por ejemplo *Smad3* podría estar regulando la formación de los tendones, *Smad1* y *5* las articulaciones, la muerte interdigital y el pericondrio, *Smad8* la condrogénesis y el establecimiento de la AER y la *smad6* la condrogénesis. Esta diferencia de expresión de las distintas *smads* ejemplifica claramente que la respuesta de las células ante un factor con un amplio potencial inductor depende (entre otras) de la presencia o ausencia de ciertas moléculas que participan en la transducción de la señal, haciendo competentes a un grupo de células ante el estímulo de estos factores de crecimiento. Por lo tanto, cierta respuesta específica de un grupo de células dependerá entre otros factores de la presencia de ciertos tipos de *smads* en la extremidad en formación.

Pero está también la contraparte a lo mencionado anteriormente, ya que también existen expresiones sobrepuestas, ejemplificadas claramente en la expresión de *smad1* y *smad5* en estadios más tardíos, ya que ambos presentan el mismo patrón de expresión. Esta condición abre la interrogante de la existencia de una redundancia funcional, es decir ¿*Smad1* podría suplir a *Smad5* para obtener una misma respuesta celular o viceversa? Existen condiciones naturales en el que la redundancia de funciones existe, por ejemplo el factor de transcripción *L-sox5* puede suplir al factor *Sox 6* y viceversa, para que se lleve a cabo la diferenciación de los condrocitos (Crombrugge; *et al.*, 2002). Sin embargo, no se han realizado estudios aún para contestar esta interrogante que podría arrojar resultados interesantes.

Conclusiones

Las R-smads de BMPs, *smad1*, *smad5* y *smad8*; la R-smad de TGF- β s y Activinas, *smad3*, y la *smad* inhibidora, *smad6*, se expresaron, algunas de forma diferencial y otras de forma muy parecida, durante los distintos procesos morfogenéticos presentes en el desarrollo de la extremidad del pollo.

Hay una correlación de expresión de las R-smads y los miembros de la superfamilia del TGF- β s en los procesos morfogenéticos de la extremidad, así, *smad3* y *tgfb2* se expresan en tendones y condensaciones tempranas, *smad1* y *smad5* al igual que *bmp2* y *bmp7* se expresan en pericondrío, articulaciones y zona interdigital, y *smad8* y *bmpr1b* se expresan en las condensaciones y radios digitales.

Las R-smads requieren de la Co-smad para regular el proceso de condrogénesis debido a que la sobreexpresión de las R-smads por sí solas no lograron inducir una respuesta de las células de mesénquima *in vitro*.

Las células de mesénquima *in vitro* responden dependiendo la proteína Smad sobreexpresada, así, Smad1 con Smad4, Smad2 con Smad4 y *smad3* con Smad4 indujeron condrogénesis, mientras que Smad6 con Smad7 la inhibieron. Por otro lado, Smad5 con Smad4 y *smad8* con Smad4 afectaron la adhesión celular.

Las proteínas Smad son importantes reguladores de la condrogénesis y podrían participar de forma importante en la morfogénesis de la extremidad.

Anexo.

PBT:

PBS 1X
Tween 20 1%

PBS 10X para 1 litro:

80 g de NaC
2g de KCl
14.4 g de Na_2HPO_4
2.4 g de KH_2PO_4
Aforar a 1 litro con agua destilada.

Amortiguador de hibridación:

5 ml de Formamida 50%
2.5 ml de SSC 5 X
1 ml de SDS 1%
50 μl de tRNA 50 $\mu\text{g/ml}$
10 μl de heparina 50 $\mu\text{g/ml}$

TBST + levamisol 2 mM para 100 ml:

5 ml de TrisHCl pH 7.5 1M
3.75 ml NaCl 5M
1 ml KCl 1 M
1 ml tritón 1%
Aforar a 100 ml de agua destilada
Agregar 1 ml de levamisol 2mM

Solución I para 40 ml:

20 ml de Formamida
8 ml de SSC 20X pH 4.5
4 ml de SDS 10%
8 ml de agua destilada

Solución II para 100 ml:

10 ml de NaCl 5M
1 ml de Tris 1M pH 7.5
100 μl de tween 20

Solución III para 40 ml:

20 ml de Formamida
4ml de SSC 20X pH 4.5
16 ml de agua destilada

NTMT para 10 ml:

10 ml de TrisHCl pH 9.5 1M
5 ml de MgCl_2 1M
2 ml de NaCl 5M
100 μl de Tween 20
Aforar a 100 ml de agua

Fijador de Khale:

10 ml ácido acético glacial
150 ml Etanol 95%
60 ml Formol
300 ml Agua destilada

Referencias:

- Abdollah, S., Macías-Silva, M., Tsukazaki, T., Hayashi, H., Attisano, L., and Wrana, J. L. (1997). T β R1 phosphorylation of Smad2 on Ser⁴⁶¹ and Ser⁴⁶⁷ is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling. *J. Biol. Chem.* 272: 27678-27685.
- Alfi, A., Buisine, M., Mazars, A., and Gespach, C. (1997). Induction of apoptosis by DPC4, a transcriptional factor regulated by transforming growth factor- β through stress-activated protein Kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 272: 24731-24734.
- Attisano, L., and Wrana, J. L. (1998). Mads and Smads in TGF- β signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 188-194.
- Bhatia, M., Bonnet, D., Wu, D., Murdoch, B., Wrana, J., Gallacher, L., and Dick, J. E. (1999). Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 189, 1139-1148.
- Bi W., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R., de Crombrughe, B. 1999. Sox 9 is required for cartilage formation. *Nat. Genet.* 22: 85-89.
- Brunet, L. J., McMahon, J. A., Mc Mahon, A. P., and Harland, R. M. (1998). Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science.* 280: 1455-1457.
- Bruno, E., Horrigan, S. K., Van Den Berg, D., Rozler, E., Fitting, P. R., moss, S. T., Westbrook, C., and Hoffman, R. (1998). The *Smad5* gene is involved in the intracellular signaling pathways that mediate the inhibitory effects of transforming growth factor- β on human hematopoiesis. *Blood.* 91: 1917-1923.
- Burt, D. W., and Paton, I. R. (1992). Evolutionary origins of the transforming growth factor- β gene family. *DNA Cell Biol.* 11: 497-510.
- Capdevila, J., Tsukui, T., Rodriguez-Esteban, C., Zappavigna, V. and Izpisua-Belmonte, J., C. (1999). Control of vertebrate limb outgrowth by the proximal factor *meis2* and distal antagonism of BMPs Gremlin. *Molecular Cell.* 4: 839-849.
- Capdevila, J. and Johnson, R. L. (1998). Endogenous and ectopic expression of Noggin suggest a conserved mechanism for regulation of Bmp function during limb and somite patterning. *Dev. Biol.* 197: 205-217.
- Carrington, J. L. and Reddi, A. H. (1990). Parallels between development of temporal changes in the response of chick limb bud mesodermal cells to transforming growth factor β -type 1. *Exp. Cell. Res.* 186: 368-373.
- Charite, J., de Graaff, W., Shen, S. And Deschamps, J. (1994). Ectopic expression of *Hoxb-8* causes duplication of the *Zpa* in the forelimb and homeotic transformation of axial structures. *Cell.* 78: 589-601.
- Chen, H., Lun, Y., Ovchinnikov, D., Kokubo, H., Oberg, K., C., Pepicelli, C.V., Gan, L., Lee, B. and Johnson, R. L. (1998). Limb and kidney defects in *Inxb1* mutant mice suggest an involvement of *Inxb1* in human nail patella syndrome. *Nat. Genet.* 19, 51-55.
- Chen, P. (1993). Chondrogenesis in chick limb bud mesodermal cells: reciprocal modulation by activin and inhibin. *Exp. Cell. Res.* 206: 119-127).
- Chiang, V., Litingtung, Y., Lee, E. *Et al.* (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking *Sonic hedgehog* gene function. *Nature.* 383: 404-413.

- Chimal-Monroy, J. and Díaz de Leon, L. (1999). Expression of N-cadherin, N-cam, fibronectin and tenascin is stimulated by TGF- β 1, β 2, β 3 and β 5 during the formation of precartilaginous condensations. *Int. J. Dev. Biol.* 43: 59-67.
- Chimal, J., and Díaz de Leon, L. (1997). Differential effects of transforming growth factors β 1, β 2, β 3 and β 5 on chondrogenesis in mouse limb bud mesenchymal cells. *Int. J. Dev. Biol.* 41: 91-102 (1997).
- Coffman, R. L., Leberman, D.A., and Shrader, B. (1989). Transforming growth factor β specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 170, 1039-1044.
- Cohn, M. J. and Tickle C. (1996) Limbs: a model of pattern formation within the vertebrate body plan. *Trends in Genetics.* 12: 253-257.
- De Crombrugge, B., Lefebvre, V. and Nakashima, K. (2001). Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr. Op. Cell Biol.* 13: 721-727.
- De Crombrugge, B. Lefebvre, V. Behringer, R. R., Bi Weimin, Murakami, S. and Huang, W. (2000). Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biol.* 19: 389-394.
- Dunn, N. R., Winnier, G. E., Hargett, L. K., Schrick, J. J., Fogo, A. B. and Hogan, B. L. (1997). Haploinsufficient phenotypes in *bmp4* heterozygous null mice and modification by mutations in *gli3* and *alx4*. *Dev. Biol.* 188: 235-247.
- Duprez, D., Bell, E. J., Richardson, M. K., Archer, C. M., Wolpert, L., Brickell, P. M., and Francis-West, P. H. (1996). Overexpression of *Bmp2* and *Bmp4* alters the size and shape of developing skeletal elements in the chick limb. *Mech. Dev.* 57: 145-157.
- Fell, H. B., and Canti, R. B. (1934). Experiments on the development *in vitro* of the avian knee-joint. *Proc. R. Soc. London Ser. B.* 116: 316-349.
- Flanders, K. C., Kim, E. S. and Roberts, A. B. (2001). Immunohistochemical expression of Smads1-6 in the 15-day gestation mouse embryo: signaling by BMPs and TGF- β s. *Dev Dyn.* 220:141-154.
- Fujii, M., Akeda, K., Imamura, T., Aoki, H., Sampath, T. K., Enomoto, S., Kawabata, M., Kato, M., Ichijo, H., Miyazono, K. (1999). Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation. *Mol. Biol. Cell.* 10: 3801-3813.
- Foster, J. W., Domínguez-Steglich, M. A., Guiol, S., Kowk, G., Weller, P.A. *et al.* (1994). Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature.* 372: 525-530.
- Gañan, Y., Macías, D., Duterque-Coquillaud, M., Ros, M. A., and Hurlé, J. M. (1996). Role of TGF- β s and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in developing chick limb autopod. *Development.* 122: 2349-2357.
- Gilbert S. F. (2000) *Developmental Biology*. Sixth Edition. Chapter 16; "Development of the tetrapod limb". Sinauer Associates, Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts. 503-519.
- Geduspan, J. S. and Mac Cabe, J. A. (1989). Transfer of dorsoventral information from mesoderm to ectoderm at the onset of limb development. *Anatomical Record.* 224: 79-87.
- Haines, R. W. (1947). The development of joints. *J. Anat.* 81, 33-55.
- Hall, B. K. and Miyake, T. (1995). Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. *Int. J. Dev. Biol.* 39: 881-893.
- Hedger, M. P. *et al.* (1989). Inhibin and activin regulate [3 H] thymidine uptake by rat thymocytes and 3T3 cells *in vitro*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 61, 133-138.

- Heldin, C.-H., Miyazono, K., and ten Dijke, P. (1997). TGF- β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. 390, 465-471.
- Hogan, B.L. (1996). Bone morphogenetic proteins: Multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* 10: 1580-1594.
- Hunt, K. K., Fleming, J. B., Abramian, A., Zhang, L., Evans, D. B., and Chiao, P. J. (1998). Overexpression of the tumor suppressor gene *Smad4/DPC4* induces *p21^{waf1}* expression and growth inhibition in human carcinoma cells. *Cancer Res.* 58, 5656-5661.
- Jiang, T. X., Yi, J. R., Ying, S. Y. and Chuong, C. M. (1993). Activin enhances chondrogenesis of limb bud cells: stimulation of precartilaginous mesenchymal condensations and expression of N-cam. *Dev. Biol.* 155, 545-557.
- Jonk, L. J., Itoh, S., Heldin, C.-H., ten Dijke, P., and Kruijer, W. (1998). Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the *JunB* promoter that acts as a transforming growth factor- β , activin, and bone morphogenetic protein-inducible enhancer. *J. Biol. Chem.* 273: 21145-21152.
- Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J. M., Fujisawa-Sehara, A., and Suda T. (1994). Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into osteoblast lineage. *J. Cell Biol.* 127, 1755-1766.
- Katagiri, T., Borla, S., Frenndo, J. L., Hogan, B. L., and Karsenty, G. (1998). Skeletal abnormalities in doubly heterozygous *bmp4* and *bmp7* mice. *Dev. Genetic.* 22, 340-348.
- Kawabata, M., Imamura, T., and Miyazono, K. (1998). Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9, 49-61.
- Kawakami, Y., Ishikawa, T., Shimabara, M., Tanda, N., Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M., Kuwana, T., Ueki, A., Noji, S., and Nohno, T. (1996). BMP signaling during bone pattern determination in the developing limb. *Development.* 122: 3557-3566.
- Kawakami 2001.
- King, J. A., Marker, P. C., Seung, K. J., and Kingsley, D. M. (1994). BMP5 and the molecular, skeletal, and soft-tissue alterations in *short ear* mice. *Dev. Biol.* 166: 112-122.
- Kingsley, D. M. (1994). The TGF-b superfamily: New members, new receptors and new genetic test of function in different organisms. *Genes Dev.* 8: 133-146.
- Kondaiah, P., Sands, M. J., Smith, J. M., Fields, A., Roberts, A. B., Sporn, M. B., and Melton, D. A. (1990). Identification of a novel transforming growth factor- β (TGF- β 5) mRNA in *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 265: 1089-1093.
- Kretzschmar, M., Lui, F., Hata, A., Doody, J., and Massagué, J. (1997). The TGF-b family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev.* 11: 984-995.
- Kulyk, W. M., Rodgers, B. J., Greer, K. and Kosher, R. A. (1989). Promotion of embryonic chick cartilage differentiation by transforming growth factor- β . *Dev. Biol.* 135: 424-430.
- Le Dai, J., Bansal, R. K., and Kern, S. E. (1999). G1 cell cycle arrest and apoptosis induction by nuclear Smad4/Dpc4: Phenotypes reversed by a tumorigenic mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1427-1432.
- Lefebvre, V., de Crombrughe, B. (1998). Toward understanding Sox 9 function in chondrocyte differentiation. *Matrix Biol.* 16: 529-540.

- Link, B. A. and Nishi, R. (1997). Opposing effects of activin A and Follistatin on developing skeletal muscle cells. *Exp. Cell. Res.* 233: 350-362.
- 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: 1137-1148.
- Loomis, C. A., Harris, E., Michaud, J., Wrust, W., Hanks, M. and Joyner, A. L. (1996). The mouse *engrailed-1* gene and ventral limb patterning. *Nature.* 382: 360-363.
- Luukko, K., Ylikorkala, A., Mäkelä, T. P. (2001). Developmentally regulated expression of Smad3, Smad4, Smad6 and Smad7 involved in TGF- β signaling. *Mech. Dev.* 101:209-212.
- Luyten, F. P., Chen, P., Paralkar, V., and Reddi, A. H. (1994). Recombinant bone morphogenetic protein-4, transforming growth factor- β and activin A enhance the cartilage phenotype of articular chondrogenesis *in vitro*. *Exp. Cell Res.* 210: 224-229).
- Lux, A., Attisano, L., and Marchuk, D. A. (1999). Assignment of transforming growth factor β 1 and β 3 and tirad new ligand to the type I receptor ALK-1. *J. Biol. Chem.* 274: 9984-9992.
- Macías, D., Gañan, Y., Sampath, T. K., Piedra, M. E., Ros, M. A., and Hurler, J. M. (1997). Role of BMP2 and Op-1 (BMP7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development.* 124, 1109-1117.
- Macías-Silva, M., Abdollah, S., Hoodless, P. a., Pirone, R., Attisano, L., and Wrana, J. L. (1996). MADR2 is a substance of the TGF- β receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* 87: 1251-1224.
- Macías-Silva, M., Hoodless, P. a., Tang, S. J., Buchwald, M., and Wrana, J. L. (1998). Specific activation of smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *J. Biol. Chem.* 273: 25628-25636.
- Macias, D. Gañan, Y., Rodríguez-Leon, J., Merino, R., and Hurler, J. M. (1999). Regulation by members of the transforming growth factor beta superfamily of the digital and interdigital fates of the autopodal limb mesoderm. *Cell Tissue Res.* 296: 95-102.
- Martín, G. R. (1998). The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes and Development.* 12: 1571-1586.
- Massagué, J. (1998). TGF- β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 753-791.
- Massagué, J. (1990). The transforming growth factor- β family. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6: 597-641.
- Mathews, L. S. (1994). Activin receptors and cellular signaling by the receptor serine kinase family. *Endocr. Rev.* 15, 310- 325.
- Merino, R., Gañan, Y., Macias D., Economides, A. N., Sampath, T. K., and Hurler, J. M. (1998). Morphogenesis of digits in the avian limb is controlled by FGFs, TGF- β s, and Noggin through BMP signaling. *Developmental Biology.* 200: 35-45.
- Merino, R., Macias, D., Gañan Y., Rodríguez-Leon, J., Economides, A. N., Rodríguez-Esteban C., Izpisua-Belmonte, J. C., and Hurler, J. M. (1999). Control of digit formation by activin signalling. *Development.* 126: 2161-2170.
- Merino, R, Macias, D., Gañan, Y., Economides, A. N., Wang, X, Wu, Q., Stahl, N., Sampath, K. T., Varona, P. And Hurler, J. M. (1999). Expression and function of Gdf5 during digit skeletogenesis in the embryonic chick leg bud. *Develop. Biol.* 206: 33-45.

- Miyazono, K., ten Dijke, P., and Heldin, C. H. (2000). TGF- β signaling by Smad Proteins. *Advances in Immunology*. 75: 115-157.
- Miyazono, K; ten Dijke, P., Ichijo, H., and Heldin, C.-H. (1994). Receptors for transforming growth factor- β . *Adv. Immunol.* 55, 181-220.
- Moses, H., and Serra, R. (1996). Regulation of differentiation by TGF- β . *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6: 581-586.
- Niswander, L. A. (2001). Vertebrate embryo: Limb Development. Encyclopedia of life sciences. Nature Publishing Group/ www. Els. Net
- Olsen, B. R., Reginato, M. A., and Wang, W. (2000). Bone Development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 191-220.
- Padgett R., and Patterson G. (2001). New Developments for TGF-b. *Developmental Cell*. 343-349.
- Parr, B. A. And Mc Mahon, A. P. (1995). Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature*. 374: 350-353.
- Pangas, S. A., and Woodruff, T. K. (2000). Activin signal transduction pathways. *TeM*. 11: 309-314.
- Parr, B. A. and Mc Mahon, A.P. (1995). Dorsalizing signal *wnt-7a* required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature*. 374: 350-353.
- Pizette, S. and Niswander, L. (2000). BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis: formation of prechondrogenic condensations and their differentiation into chondrocytes. *Developmental Biology*. 219: 237-249.
- Pizette, S., Abate-Shen, C., and Niswander, L. (2001). BMP controls proximodistal outgrowth, via induction of the apical ectodermal ridge, and dorsoventral patterning in the vertebrate limb. *Development*. 128: 4463-4474.
- Riddle, R. D., Jonson, R. L., Laufer, E., and Tabin, C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*. 75: 1401-1416.
- Riddle, R. D., Ensini, M., Nelson, C., Tsuchida, T., Jessell, T. M. and Tabin, C. (1995). Induction of the homeobox gene *lhx1* by *wnt7a* establishes dorso-ventral pattern in the vertebrate limb. *Cell*. 83: 631-640.
- Roark, E. F. And Greer, K. (1994). Transforming growth factor-b and bone morphogenetic protein-2 act by distinct mechanisms to promote chick limb cartilage differentiation in vitro. *Dev. Dyn.* 200: 103-116.
- Roberts, A. B., and Sporn, M.B. (1990). The transforming growth factor- β s. In "Peptide growth factors and their receptors, part I". (M. B. Sporn and A. B. Roberts, eds.), pp. 419-472. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Saunders, J. W. Jr. (1948). The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *Journal of experimental Zoology*. 108: 363-403.
- Saunders, J. W. Jr. And Gasseling, M. T. (1968). Ectoderm-mesenchymal interactions in the origin of wing symmetry. In: Fleischmajer, R. And Billingham, R. E. (eds.) Epithelial-mesenchymal Interactions, pp. 78-97. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Schofield, J. L and Wolpert, L. (1990). Effect of Tgf-b1, Tgfb2 and bFGF on chick cartilage and muscle differentiation. *Exp. Cell. Res.* 191: 144-148.
- Shi, Y. (2001) Structural insights on Smad function in TGF- β signaling. *Bioessays*. 23:223-232.

Shimizu, A., Kato, M., Nakao, A., Imamura, T., ten Dijke, P., Heldin, C.-H., Kawabata, M., Shimada, S., and Miyazono, K. (1998). Identification of receptors and Smad proteins involved in activin signalling in human epidermal keratinocyte cell line. *Genes Cells*. 3: 125-134.

Shukunami, C., Shigeno, C., Atsumi, T., Ishizeki, K., Susuki, F., and Hiraki, Y. (1996). Chondrogenic differentiation of clonal mouse embryonic cell line ATDC5 *in vitro*: differentiation dependent gene expression of parathyroid hormone (PTH)/PTH/related peptide receptor. *J. Cell Biol.* 133, 457-468.

Smits, P., Li Ping, Mandel, J., Zhang, Z., Ming Deng, J., Behringer, R., de Crombrughe, B. and Lefebvre V. (2001). The transcription factors L-sox-5 and Sox-6 are essential for cartilage formation. *Developmental Cell*. 1: 277-290.

Sonoda, E., Matsumoto, R., Hitoshi, Y., Ishii, T., Sugimoto, M., Araki, S., Tominaga, A., Yamaguchi, N., and Takatsu, K. (1989). Transforming growth factor β induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. *J. Exp. Med.* 170; 1415-1420.

Souchelnyski, S., Tamaki, K., Engström, U., Wernstedt, C., ten Dijke, P., and Heldin, C.-H. (1997). Phosphorylation of Ser⁴⁶⁵ and Ser⁴⁶⁷ in C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor- β signaling. *J. Biol. Chem.* 272: 28107-28115.

Stern, C. D., Yu, R. T., Kakizuka, A., Kinter, C. R., Mathews, L.S., Vale, W. W., Evans, R. M. and Umesonu, K. (1995). Activin and its receptors during gastrulation and the later phases of mesoderm development in the chick embryo. *Dev. Biol.* 172, 192-205.

Storm, E., Huynh, T.V., Coperland, N. G., Jenkins, N. A., Kingsley, D. M., and Lee, S. J. (1994). Limb alterations in brachyopodism mice due to mutations in a new member of the TGF- β superfamily. *Development*. 122: 3969-3979.

Summerbell, D., Lewis, J. H., and Wolpert, L. (1973). Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature*. 224: 492-496.

Ten Dijke, P., Yamashita, H., Ichijo, H., Franzén, P., Laiho, M., Miyazono, K., and Heldin, C.-H. (1994b). Characterization of type I receptors for transforming growth factor- β and activin. *Science*. 264: 101-104.

Ten Dijke, P., Yamashita, H., Sampath, T. K., Reddi, A. H., Estévez, M., Riddle, D. L., Ichijo, H., Heldin, C.-H., and Miyazono, K. (1994a). Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J. Biol. Chem.* 269: 16985-16988.

Urist, M. R., Mikulski, A., and Lietze, A. (1979). Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76: 1828-1832.

Vogel, A., Rodriguez, C., Warnken, W. and Izpisua-Belmonte, J. C. (1995). Dorsal cell fate specified by chick *lhx1* during vertebrate limb development. *Nature*. 378: 716-720.

Wagner, T., Wirth, J., Meyer, J., Zabel, B, Held, M., Zimmer, J. Pasantes J., Bricarelli, F. D., Keutel, J., Hustert, E. *et al.* (1994). Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene *sox9*. *Cell*. 79: 1111-1120.

Watanabe, M., Masuyama, N., Fukuda, M. and Nishida, E. (2000). Regulation of intracellular dynamics of Smad4 by its leucine-rich nuclear export signal. *EMBO. Rep.* 1:176-182.

Weinstein, M., Yang, X. and Deng, C.-X. (2000). Functions of mammalian Smad genes as revealed by targeted gene disruption in mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11:49-58.

Wrana, J. L. (2000). Regulation of Smad activity. *Cell*. 100: 189-192.

Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitscock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewicj, R. M., and Wang, E.A. (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242, 1528-1534.

Wu, G., Chen, Y. G., Ozdamar, B., Cyuricza, C. A., Chong, P. A., Wrana, J. L., Massagué, J. and Shi, Y. (2000). Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science* 287:92-97.

Xiao, Z., Liu, X., Henis, Y. I., Lodish, H. F. (2000). A distinct nuclear localization signal in the N terminus of Smad3 determines its ligand-induced translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97:7853-7858.

Xu Liu, Yin, Z., Hudson, J. B., Ferguson, E. L., and Frasch, M. (1998). Smad proteins act in combination with synergistic and antagonistic regulators to target Dpp responses to *Drosophila* mesoderm. *Genes. Dev.* 12: 2354-2370.

Yanagisawa, K., Osada, H., Masuda, A., Kondo, M., Saito, T., Yatabe, Y., Takagi, K., and Takahashi, T. (1998). Induction of apoptosis by *Smad3* and down-regulation of *Smad3* expression in response to TGF- β in human normal lung epithelial cells. *Oncogene*. 17: 1743-1747.

Yue, J., Hartsough, M. T., Frey, R. S., Frielle, T., and Mulder, K. M. (1999). Cloning and expression of rat Smad1: Regulation by TGF β and modulation by the Ras/Mek pathway. *J. Cell. Physiol.* 178: 387-396.

Zhang, H., and Bradley, A. (1996). Mice deficient for *Bmp2* are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development*. 122: 2977-2986.

Zhang, Y. and Derynck, R. (1999). Regulation of Smad signaling by protein associations and signaling cross talk. *Trends Cell Biol.* 9:274-279.

Zhou, S., Buckhaults, P., Zawel, L., Bunz, F., Riggins, G., Le Dai, J., Kern, S. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). Targeted deletion of *Smad4* shows it is required for transforming growth factor β and activin signaling in colorectal cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 2412-2416.

Zou, H., Wieser, R., Massagué, J., and Niswander, L. (1997). Distinct roles of type I BMP receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev.* 11: 2191-2203.