

11216
5



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO O.D.

[Handwritten signature]

"ANALISIS MOLECULAR DEL GEN P63 EN PACIENTES CON
ECTRODACTILIA SINDROMATICA"

SECRETARIA DE SALUD
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO
ORDENADO EN EL DIA 11 DE SEPTIEMBRE DE 2003



DIRECCION DE ENSEÑANZA
[Handwritten signature]

TESIS DE POSTGRADO

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO ESPECIALISTA EN
GENETICA MEDICA
P R E S E N T A :

JOSE GLUSTEIN POZO MOLINA

[Handwritten signature]
TUTOR: DR. JUAN CARLOS ZENTENO R.



MEXICO, D. F.

SEPTIEMBRE 2003.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A MIS PADRES Y HERMANOS
A DAVID, DESCANSA EN PAZ

ES MEJOR ENCENDER UNA VELA QUE MALDECIR
LA OSCURIDAD.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE GENERAL

1. RESUMEN.....	4
2. ANTECEDENTES.....	6
2.1.- DESARROLLO EMBRIOLÓGICO DE LAS EXTREMIDADES.....	8
2.2.- DESARROLLO DE LAS EXTREMIDADES	11
2.2.1.- Cresta ectodérmica apical.....	14
2.2.2.- Zona de progreso.....	19
2.2.3.- Zona de actividad polarizante (ZAP).....	20
2.3.- GENES RELACIONADOS CON LOS EJES DE DESARROLLO DE LAS EXTREMIDADES.....	22
2.3.1.- EJE PROXIMO-DISTAL.....	23
2.3.2.- EJE DORSO-VENTRAL.....	27
2.3.3.- EJE ANTERO-POSTERIOR.....	30
2.4.- ESTABLECIMIENTO DE PATRONES ADICIONALES.....	33
2.5.- GENÉTICA Y EVOLUCIÓN DE LAS EXTREMIDADES.....	37
2.6.- P63.....	41
2.6.1.- p63 EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE LOS MAMÍFEROS	46
2.7.- MALFORMACIONES DE EXTREMIDADES.....	49
2.8.- MALFORMACIONES DE EXTREMIDADES ASOCIADAS AL GEN TP63.....	54
2.9.- SÍNDROME EEC.....	55

INDICE GENERAL

3.- OBJETIVOS.....	60
4.- SUJETOS Y METODOS.....	60
4.1.- SUJETOS.....	60
4.2.- METODOS.....	64
4.2.1.- EXTRACCIÓN DE DNA DE SANGRE PERIFÉRICA.....	66
4.2.2.- ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA CUANTIFICACIÓN DE DNA.....	66
4.2.3.- AMPLIFICACIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) DEL GEN p63.....	67
4.2.4.- ELECTROFORESIS DE DNA.....	70
4.2.5.- PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR PARA SECUENCIACIÓN NUCLEOTIDICA AUTOMATIZADA.....	71
4.2.6.- CUANTIFICACIÓN DEL DNA PURIFICADO.....	72
4.2.7.- SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA DE LOS PRODUCTOS DE PCR.....	72
5.- RESULTADOS	74
5.1.- PACIENTES.....	74
5.2.- ANALISIS MOLECULAR.....	74
6.- DISCUSIÓN.....	79
7.- BIBLIOGRAFIA.....	86

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Desarrollo embriológico de las extremidades.....	10
FIGURA 2. Estructura ósea de las extremidades en los vertebrados.....	11
FIGURA 3. Campos de desarrollo de los primordios de las extremidades superiores e inferiores.....	12
FIGURA 4. Vista dorsal del primordio.....	13
FIGURA 5. Micrografías de la cresta ectodérmica apical.....	15
FIGURA 6. Origen de la información e interacciones dorso-ventrales que asignan a la CEA en el primordio.....	18
FIGURA 7. Ejes de desarrollo de las extremidades.....	23
FIGURA 8. Cascada de expresión de los genes HOX.....	25
FIGURA 9. Patrón de expresión de la familia de genes HOX en la formación de las extremidades.....	26
FIGURA 10. Genes implicados en el establecimiento del patrón dorso-ventral.....	29
FIGURA 11. Vía de señalización de Shh en el primordio de la extremidad superior.....	31
FIGURA 12. Modelo genético para la especificación de la iniciación y posición del crecimiento del primordio.....	34
FIGURA 13. Relaciones filogenéticas entre las principales líneas de cordados	38
FIGURA 14. Cromosoma 3 humano mostrando la localización del gen p63 en la región 3q27-29.....	42
FIGURA 15. Modelo del dominio de unión a DNA de p63	43
FIGURA 16. Estructura del gen p63 y sus transcritos.....	44
FIGURA 17. Fenotipo en el ratón "knockout" para el gen p63.....	48
FIGURA 18. Distribución de mutaciones en p63.....	59
FIGURA 19. Fotografías de la paciente #4.....	62
FIGURA 20. Fotografías de las extremidades de la paciente # 5.....	63
FIGURA 21. Fotografía de la cara de la paciente #5.....	63
FIGURA 22. Fotografías de la paciente # 6.....	64
FIGURA 23. Metodología utilizada para el análisis molecular del gen p63.....	65
FIGURA 24. Fotografía de la electroforesis en gel de agarosa de los exones 5 y 7.....	75
FIGURA 25. Resultado del estudio molecular en los pacientes 4 y 5.....	76
FIGURA 26. Resultado del estudio molecular del pacientes 6.....	77

1.- RESUMEN

En los últimos años se ha reconocido que el desarrollo adecuado de las extremidades requiere la interacción de diversos genes que especifican la identidad de estas estructuras. Entre otros, miembros de las familias génicas HOX, TBX, GLI, SHH, FGF, etc. han demostrado ser indispensables para el desarrollo correcto de los miembros y se han identificado mutaciones de éstos en síndromes genéticos bien definidos. Sin embargo, en un número importante de casos, el origen de una malformación de extremidades es desconocido y se requiere de un mayor número de estudios clínico-moleculares que permitan aumentar el conocimiento de esta intrincada vía morfogénica.

Recientemente se identificó el gen P63, homólogo del gen supresor de tumor P53, como un nuevo gen participante en el desarrollo de las extremidades. En un principio se demostró en modelos animales que P63 era indispensable para la formación de extremidades y de derivados ectodérmicos. Posteriormente se identificaron mutaciones de este gen en sujetos con síndromes genéticos que asociaban defectos de extremidades con alteraciones en estructuras derivadas del ectodermo. Se han identificado 5 entidades hereditarias autosómicas dominantes secundarias a mutaciones en P63: síndrome EEC (ectrodactilia, labio hendido con o sin paladar hendido y displasia ectodérmica), síndrome AEC o Hay-Wells (anquiloblefaron, displasia ectodérmica y labio hendido con o sin paladar hendido), síndrome extremidad-mamario (LMS) (anomalías en extremidades y glándulas mamarias), síndrome ADULT (defectos en extremidades, piel, uñas, conductos

lagrimales y dientes), y al síndrome de Rapp-Hodgkin; además, la ectrodactilia aislada en manos y/o pies (SIHM) también es debida a mutaciones en este gen.

El objetivo de este estudio fue realizar el análisis molecular del gen P63 en sujetos con síndrome EEC y determinar el tipo y localización de mutaciones en sujetos Mexicanos con esta enfermedad. Con esta finalidad, fueron estudiados 6 pacientes y se realizó extracción de DNA genómico a partir de sangre periférica, amplificación por PCR de los 16 exones del gen p63 y secuenciación automatizada de los productos amplificados.

Tres pacientes con ectrodactilia sindrómica tuvieron mutaciones puntuales heterocigotas en p63: en dos pacientes (madre con fenotipo EE y su hija con síndrome EEC) se detectó una transición heterocigota de CGG a TGG (C→T) en el codón 204 en el exón 5 del gen, el cual produce un cambio de aminoácidos de arginina a triptófano (R204W), localizado en el dominio de unión a DNA. En el tercer paciente (fenotipo EE) se identificó una transición heterocigota de guanina a adenina (G→A) en el nucleótido 953 situado en el exón 7 del gen; esta mutación originó que el aminoácido arginina cambiara a histidina (R279H). Este cambio afecta también el dominio de unión a DNA de la proteína p63.

Por último, se discute la correlación genotipo-fenotipo observada en este estudio y en trabajos previos. En conclusión, el trabajo representa el primer análisis mutacional del gen p63 en sujetos mexicanos con ectrodactilia y displasia ectodérmica asociadas o no a hendiduras faciales.

2.- ANTECEDENTES

Hace aproximadamente 360 millones de años nuestros ancestros comenzaron a desplazarse en la tierra con ayuda de apéndices corporales pareados y desde entonces la evolución ha producido extremidades que permiten distintos modos de locomoción como correr, volar o balancearse de árbol en árbol. Sin embargo, a pesar de los cambios adaptativos, la organización fundamental del esqueleto de la extremidad en los tetrápodos (vertebrados de 4 extremidades) se ha conservado de manera sorprendente a través del tiempo.

Durante la última década se ha generado un creciente interés acerca de los cambios morfológicos que se producen en el embrión durante la formación de las extremidades y cómo estos cambios han sido influenciados por el proceso evolutivo.

La extremidad de los vertebrados ha sido uno de los sistemas favoritos de los biólogos del desarrollo desde hace mucho tiempo ya que no es indispensable para la viabilidad del embrión y también por su fácil accesibilidad para la manipulación experimental. Mucho del conocimiento actual en el campo del desarrollo de las extremidades se ha logrado mediante la comparación de los patrones de expresión y función de los genes homólogos del desarrollo entre diferentes especies y en modelos animales. Además, el estudio genético de diversas enfermedades que afectan la formación de las extremidades está proporcionando conocimientos invaluable acerca de las funciones, no solo de genes individuales, sino también de vías completas de desarrollo.

Diferentes mutaciones en un mismo gen pueden ocasionar un espectro amplio de anomalías y es frecuente que “familias” de enfermedades sean causadas por mutaciones en componentes de la misma vía. Estos estudios han permitido reconocer que el desarrollo adecuado de las extremidades requiere la intervención de numerosos genes que actúan en diversas vías de señalización para especificar la identidad de estas estructuras (Innis y Mortlock, 1998; Sifakis et al. 2001). La formación de los miembros involucra numerosos factores genéticos y no obstante que la función de cada uno de ellos se circunscribe predominantemente a un aspecto en particular del desarrollo de la extremidad, existe una sorprendente interrelación entre la mayoría de estos genes (Schwabe et al, 1998). La integración de conocimientos de disciplinas como la genética médica y molecular, la biología del desarrollo y la paleontología ha permitido dilucidar los mecanismos que permitieron la especialización de las extremidades en el humano y está explicando un número creciente de anomalías en el desarrollo de estas estructuras.

La extremidad es una estructura que se desarrolla en 4 dimensiones: 3 dimensiones espaciales y una temporal. Como se verá mas adelante, la concentración de moléculas que se difunden a partir de centros de control en el primordio de la extremidad coordinan el desarrollo de los miembros al proporcionar a cada célula del primordio la información acerca de donde está ubicada en este espacio de 4 dimensiones. El mecanismo básico opera con algunas variaciones en la mayoría de los tetrápodos y resulta en la producción de una gran variabilidad morfológica y funcional de las extremidades en los vertebrados adultos.

2.1.- DESARROLLO EMBRIOLÓGICO DE LAS EXTREMIDADES

El desarrollo de extremidades se caracteriza por un equilibrio constante entre los procesos de proliferación y muerte celular. En los humanos, este proceso se realiza en un periodo aproximado de 28 días que comprende de la 5ª a la 8ª semana de gestación. Las extremidades superiores se forman ligeramente antes que las inferiores, aunque para el final del periodo de embriogénesis de los miembros, el desarrollo de ambas extremidades está sincronizada. A continuación se describen los eventos más importantes de este proceso (figura 1).

DÍA 33: Las regiones de la placa de la mano, antebrazo, brazo y hombro pueden ser distinguidas en la extremidad superior. En las extremidades inferiores puede distinguirse una parte cefálica redondeada y una parte caudal menos desarrollada; la porción distal de esta región menos desarrollada formará el pie.

DÍA 37: En la placa de la mano se forma la placa digital, una región del carpo central rodeada por un engrosamiento semicircular a partir de la que se constituirán los dedos. En la extremidad inferior, el muslo, la pierna y el pie inician su formación.

DÍA 38: Los rayos de los dedos o rayos digitales son visibles como engrosamientos radiales en la placa digital de la extremidad superior. La punta de los rayos digitales protruyen ligeramente, produciendo un borde crenado en la placa digital. El proceso de muerte celular programada esculpirá gradualmente los rayos digitales fuera de la placa digital para formar los dedos de manos y pies. El primordio de las extremidades inferiores ha aumentado en longitud, se ha demarcado del tronco y se hace aparente la placa de pie en el lado caudal del extremo distal del primordio.

DÍA 44: En la extremidad superior. el margen de la placa digital presenta muescas profundas, los surcos entre los rayos digitales son profundos y el codo se hace aparente. Los rayos de los dedos de los pies son visibles en la placa digital del pie, pero el borde de la placa todavía no está crenado.

DÍA 47: La extremidad superior ha experimentado una flexión horizontal situándose en un plano parasagital. La extremidad inferior ha comenzado a flexionarse hacia un plano parasagital y los rayos de los dedos de los pies son más prominentes, aunque el margen de la placa digital es todavía liso.

DÍA 52: Las extremidades superiores están ligeramente dobladas a nivel del codo y los dedos han desarrollado engrosamientos distales llamadas pulpejos táctiles. Las manos están ligeramente flexionadas a nivel de las muñecas y se reúnen en la línea media en frente de la eminencia cardíaca. Las piernas son largas y los pies han comenzado a aproximarse a la línea media.

DÍA 56. Todas las regiones de los brazos y piernas están bien definidas, incluyendo los dedos de los pies. Los dedos de las dos manos se superponen en la línea media.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

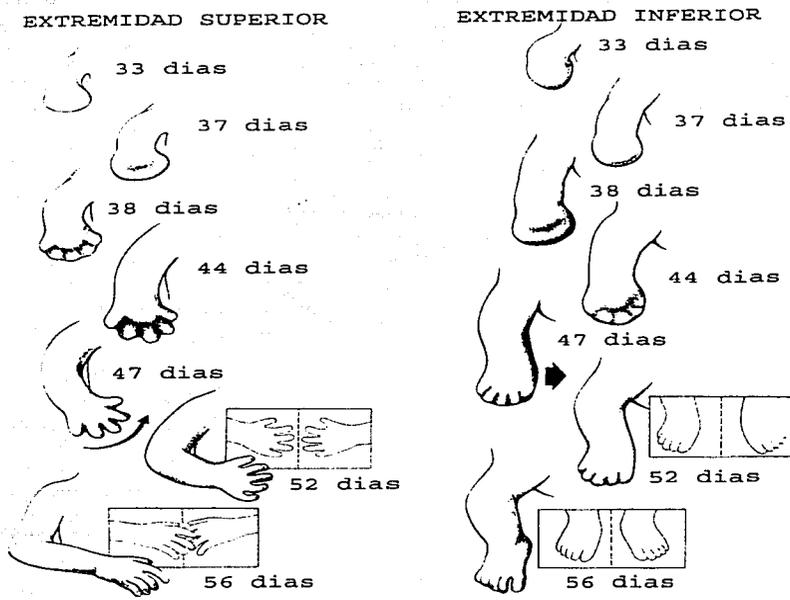


FIGURA 1. Esquema que representa el desarrollo embriológico de las extremidades. Cada etapa del desarrollo de las extremidades superiores antecede al de las extremidades inferiores (tomada de Larsen, 1998).

2.2 DESARROLLO DE LAS EXTREMIDADES

La extremidad en el humano consiste de cuatro segmentos: 1) una raíz (zonoesqueleto); 2) un segmento proximal o rizomélico (estilópodo) que consiste de un solo hueso (húmero o fémur); 3) un segmento medial o mesomélico (zeugópodo) que presenta dos huesos (radio y cúbito o tibia y peroné); y 4) una parte distal o segmento acromélico (autópodo) constituido por manos y pies (figura 2).

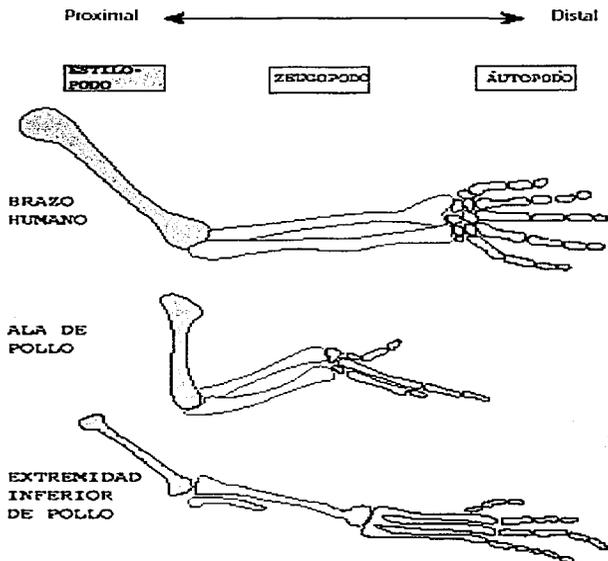


FIGURA 2. A) Representación esquemática de la estructura ósea de las extremidades en los vertebrados. Se distinguen el estilópodo, el zeugópodo y el autópodo. Estos 3 elementos

se encuentran conservados evolutivamente en los vertebrados tetrápodos (tomado de Mariani y Martin, 2003).

El primer evento en el desarrollo de una extremidad en vertebrados es la inducción de un grupo de células que determinarán la aparición de un primordio de extremidad en un lugar y tiempo específicos durante el desarrollo del embrión. Estos campos de las extremidades están inicialmente compuestos de células pertenecientes a una estructura conocida como placa lateral de mesodermo (PLM) que se localiza en una posición específica en el flanco del embrión (figura 3). Más tarde, el primordio (que está formado de células mesenquimales cubiertas por ectodermo) comenzará a proyectarse hacia afuera de la pared corporal y se establecen interacciones específicas epitelio-mesénquima que coordinarán el patrón de crecimiento a través de señales provenientes de regiones especializadas del propio primordio.



FIGURA 3. Las extremidades en los vertebrados se originan a partir de dos campos anatómicos de desarrollo que aparecen en niveles específicos en el flanco del embrión. La protrusión de estas zonas originará los primordios de las extremidades superiores e inferiores (Mariani y Martin, 2003).

En este caso, el desarrollo de las extremidades no es diferente del que ocurre en cualquier otra estructura u órgano, donde el primer paso es la selección de un grupo de células competentes para formar un primordio.

Después que los campos de crecimiento (superior e inferior) han sido especificados en puntos precisos en la PLM, se inicia dentro de ésta una intensa división celular que contrasta con la división celular lenta observada en los alrededores de la placa (Searls et al, 1971). Este patrón diferencial de división celular resulta en el desarrollo de un primordio que es una masa de células mesenquimatosas envueltas por una cubierta ectodérmica. La población celular mesodérmica comprende todos los progenitores de los condrocitos y tejidos conectivos como tendones y hojas musculares. Otros tejidos como músculo y vasos sanguíneos se desarrollarán a partir de células que migran tempranamente al primordio de la extremidad.

Una vez que se ha iniciado la formación del primordio de la extremidad, pueden reconocerse 3 regiones o centros de control del desarrollo subsiguiente: la cresta apical ectodérmica, la zona de progreso y la zona de actividad polarizante (Figura 4).

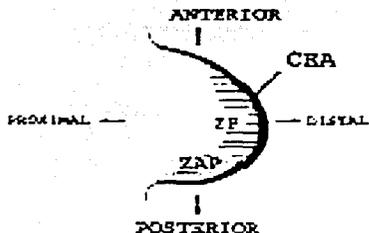


FIGURA 4. Vista dorsal del primordio, la cual muestra la localización de la zona de actividad polarizante (ZAP) y la cresta ectodérmica apical (CEA) que mantiene el crecimiento del primordio, manteniendo las células mesenquimales subyacentes en la zona de progreso (ZP) en estado indiferenciado (tomada de Capdevila e Izpizua, 2001).

2.2.1.- Cresta ectodérmica apical: Durante los estadios iniciales de desarrollo del primordio, se originan señales de inducción de las células del PLM de la zona de progresión que originan el solapamiento del ectodermo para formar una estructura conocida como cresta ectodérmica apical (CEA). La CEA se identifica como un engrosamiento ectodérmico que corre a lo largo del eje antero-posterior del primordio.

La CEA es un ectodermo especializado y distinto morfológicamente que bordea el extremo distal del primordio, separando el lado ventral del dorsal de la extremidad (figura 5). El interés en la función de la CEA inició en 1948 cuando Saunders realizó experimentos de remoción de esta zona en estadios sucesivos de desarrollo del primordio del pollo y encontró que las extremidades se truncaban a diferentes distancias a partir del hombro: cuando la CEA era removida tempranamente, el zeugópodo y el autómodo no se desarrollaban, pero cuando se removía tardíamente, solo el autómodo estaba ausente (Saunders, 1948; Todt y Fallon, 1984). Estos experimentos demostraron que las señales de la CEA son esenciales para el desarrollo esquelético y que existe un requerimiento diferencial temporal para esta estructura durante el desarrollo de la extremidad.

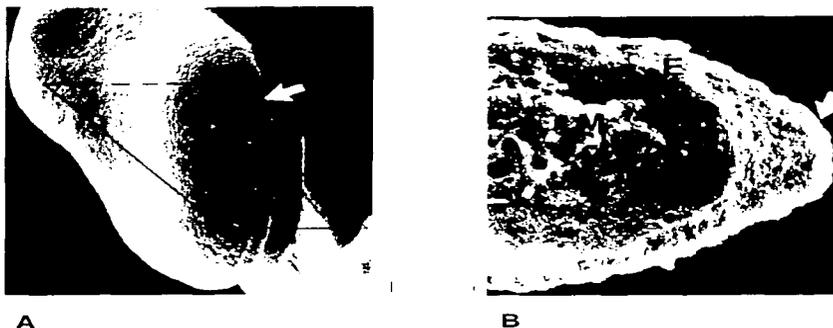


FIGURA 5. Microfotografías que muestran la cresta ectodérmica apical. A) En el día 32 de desarrollo en el humano, la CEA (flecha) se aprecia como un engrosamiento de ectodermo situado en el borde del primordio. B) Corte longitudinal del primordio en el que se aprecia la relación entre la CEA (flecha), la capa externa de ectodermo (E) y el núcleo mesodérmico (M) (tomado de Mariani y Martin, 2003).

En esta estructura altamente especializada del primordio de la extremidad se expresan varios miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y también de la familia de las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP) (Panman y Zeller, 2003). La CEA es responsable de mantener a las células mesenquimatosas adyacentes en un estado indiferenciado y de proliferación rápida, dando lugar a la llamada zona de progreso. Los transcritos más importantes a este nivel son FGF4 y FGF8 (Ying Liu et al, 2002) como se demostró al observarse que es posible inducir el desarrollo experimental de extremidades mediante la aplicación de FGFs en el flanco del embrión (Martin, 1998).

En el embrión de pollo, donde sus propiedades se han estudiado extensamente, la integridad de la CEA es esencial para mantener la proliferación celular después de la iniciación de la formación del primordio (Saunders, 1948; Todt y Fallon, 1984). Experimentos que involucran la localización del ectodermo dorsal y ventral de las extremidades han mostrado que antes de la inducción de las extremidades las células ectodérmicas que cubren la PLM son englobadas para formar la CEA (Altabel y Clarke, 1997). Los requerimientos específicos para la inducción de la CEA en el ectodermo de las extremidades no son totalmente conocidos, pero el factor codificado por el gen Wnt-3a parece jugar un papel importante en este proceso. La expresión de Wnt-3a es detectada en el ectodermo alrededor del tiempo en el cual se activa también la expresión de FGF-8 en el ectodermo, en respuesta a la expresión de FGF-10 (ambos miembros de la superfamilia génica de factores de crecimiento de fibroblastos), localizada igualmente en el PLM.

La integridad de la lámina basal es también un requisito para el desarrollo normal de la CEA. La superficie basal de las células epiteliales del primordio está revestida por una laminina basal rica en laminina α -5, que separa al ectodermo del mesénquima. Recientemente se demostró que ratones con delección homocigota del gen de la cadena α -5 de la laminina (la principal glicoproteína de toda la lámina basal) presentan sindactilia secundaria a disrupción de la superficie del ectodermo con alteración local de la CEA (Míner et al, 1998).

Además, existe evidencia genética reciente de que la señalización de Wnt3/ β -catenina es requerida en el ectodermo para establecer y mantener la presencia de la CEA. Esta vía de señalización se encuentra río arriba de otros genes expresados en la CEA

como los ligandos de Bmp (proteínas morfogenéticas de hueso) o Fgf 8 (Barrow et al, 2003). Varios estudios han establecido que si bien las señales derivadas de la CEA son requeridas para el crecimiento continuo de las extremidades, las señales provenientes del mesénquima son requeridas a su vez para el mantenimiento de la CEA. Sin embargo, los mecanismos precisos de estas interacciones apenas comienzan a descubrirse. El ectodermo que dará origen al ectodermo dorsal de las extremidades descansa sobre los somitas, mientras que las células ectodérmicas localizadas arriba del mesodermo lateral somatopleural darán origen al ectodermo ventral de las extremidades (Altabef y Clarke, 1997; Michaud et al, 1997). Conforme el primordio va creciendo, las células ectodérmicas migran lateralmente para cubrir el mesénquima. Estudios recientes han demostrado que existen dos límites diferentes anteriores al primordio en el ectodermo de la extremidad del ratón: el primero corresponde a la línea media dorsoventral de la CEA y el segundo al margen dorsal de la CEA (Kimmel et al, 2000) (figura 6).

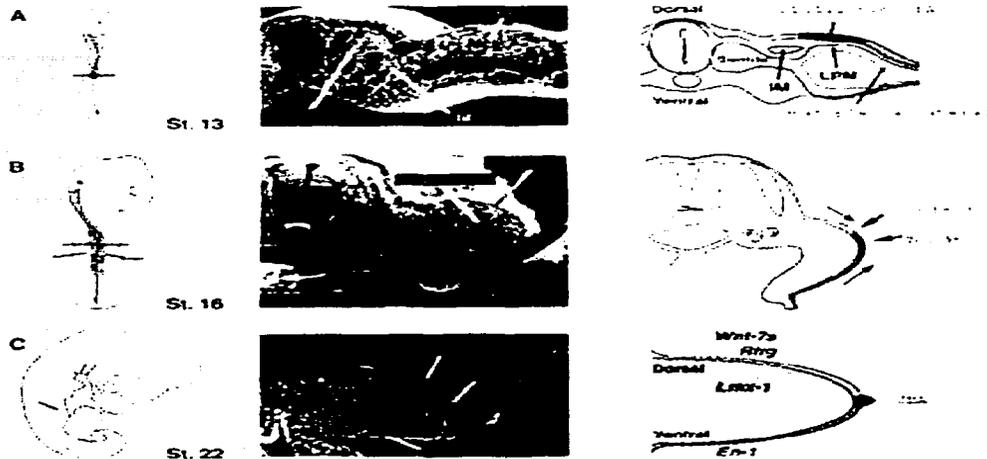


FIGURA 6. El origen de la información e interacciones dorso-ventrales que asignan a la CEA en el primordio. Cada panel muestra un embrión de pollo en diferentes estadios de desarrollo, seguidos de micrografías electrónicas de cortes transversales (realizados en los niveles indicados por la línea negra) y esquemas que representan el destino de las células ectodérmicas en cada etapa. En el esquema B, las flechas delgadas indican a las células del ectodermo que migran para cubrir el mesénquima en desarrollo, las flechas gruesas representan los dos bordes dorso-ventrales que existe en el ectodermo en desarrollo. En el esquema C, el gris claro indica células que se convierten en ectodermo dorsal, el negro células que se convierten en la CEA y el gris oscuro células que serán el ectodermo ventral. MI mesodermo intermedio, PLM placa lateral mesodérmica, CEA: cresta ectodérmica apical (tomada de Capdevila e Izpisúa, 2001).

Como se verá más adelante, el desarrollo de la CEA es también afectado por mutaciones en el gen *p63* que codifica para un homólogo de la proteína supresora de tumor p53. *p63* es altamente expresado en las placas basales o progenitoras de muchos tejidos

epiteliales, incluyendo el ectodermo de las extremidades (Mills et al, 1999; Yang et al, 1999).

2.2.2- Zona de progreso: Las células de la CEA secretan moléculas que mantienen a las células del mesodermo subyacente en estado de crecimiento e indiferenciación. Esta población de células es llamada la zona de progreso. Esta área contiene células mesenquimatosas en proliferación que representan una fuente de unidades encargadas de alcanzar una posición final determinada en la extremidad adulta. Mientras más tiempo permanezca una célula en la zona de progreso, su localización será más distal en la extremidad final (Summerbell et al, 1973). Las células en la zona de progresión originan la mayoría de los elementos mesenquimales en las extremidades. Conforme la extremidad crece, estas células salen de la zona de progreso moviéndose proximalmente y adquiriendo información posicional para dar origen a los apéndices maduros que desplegarán un patrón reproducible de elementos anatómicos tales como hueso, músculo y nervios. Del mismo modo, los elementos óseos más proximales se determinan en primer lugar y están formados por células mesenquimales que abandonan primero la zona de progresión, mientras que las células mesenquimales que dejan esta zona en etapas más tardías formarán las estructuras esqueléticas más distales (Summerbell et al, 1973).

Después de la iniciación del primordio y la inducción de la CEA, las células mesodérmicas que abandonan la ZP (y que presumiblemente salen del alcance de los factores producidos por la CEA) se agregan para formar las condensaciones precartilaginosas que darán origen a los componentes del esqueleto. Concomitantemente, algunas células localizadas alrededor o entre el primordio de los elementos óseos sufren apoptosis, lo cual contribuye a dar forma a las extremidades.

Las etapas posteriores del desarrollo óseo incluyen el reemplazo de cartílago por hueso por medio de osificación endocondral, el crecimiento de los huesos largos a través de la proliferación y diferenciación de los condrocitos en las placas de crecimiento y la formación de hueso por diferenciación de los osteoblastos a partir de las células mesenquimales en áreas de osificación intramembranosa. Aunque los mecanismos exactos que dirigen la diferenciación de los tipos celulares presentes en el primordio (incluyendo tipos celulares condrogénicos) son todavía desconocidos, se ha propuesto un modelo para explicar como las células que abandonan la zona de progresión y dan lugar al autópodo deciden entre dos destinos opuestos: elementos formadores de esqueleto o conversión en tejido interdigital que eventualmente será removido por apoptosis (Niswander, 2002). Varias líneas de evidencia indican que los miembros de la superfamilia TGF- β , sus receptores, moduladores extracelulares y transductores intracelulares, controlan la elección entre los destinos digital e interdigital en el autópodo (Macias et al, 1999).

El hecho de que el mesénquima formado tardíamente se diferencie en los segmentos distales de la extremidad y que el mesénquima formado tempranamente origine los elementos proximales ha llevado a concluir que existe un mecanismo que reconoce el tiempo que el mesénquima ha pasado bajo la influencia de la CEA y que las células mesenquimatosas pueden medir este tiempo por el número de divisiones celulares que han experimentado desde el inicio de la CEA.

2.2.3.- Zona de actividad polarizante (ZAP): Esta zona especializada reside en margen posterior distal del mesénquima del primordio de la extremidad y actúa como fuente de una señal “posteriorizante” ya que cuando es transplantada a una localización

anterior induce la formación de estructuras posteriores ectópicas. Es probable que la ZAP y la CEA sean interdependientes ya que se ha observado que una no puede llevar a cabo su función sin la otra (Winter y Tickle, 1993). La proteína Sonic hedgehog (SHH) es producida en la ZAP y se ha demostrado que su expresión puede mimetizar los efectos de la ZAP. Se considera que SHH funciona como un morfógeno, posiblemente a través de un efecto inductivo en la expresión de Bmp2. (Wozney, 2002).

La inducción de la extremidad es la serie de eventos celulares que culminan en la formación del primordio, y que implica una transferencia direccional de información posicional en el eje y flanco embrionario que se encuentra entre varias estructuras y tejidos clave. Subsecuentemente, esta información posicional necesita ser interpretada por los tejidos que participan en la inducción del primordio. Es importante señalar que el mecanismo exacto de la inducción de las extremidades aun es materia de controversia (Martin, 1998). Como se ha señalado, una variedad de factores determina los pre-patronos que especifican los niveles en los que se desarrollarán los primordios.

La interacción de señales genéticas y celulares emanadas de las estructuras del primordio señaladas anteriormente culmina con la formación y diferenciación del primordio en cuatro locaciones específicas del flanco embrionario, dando lugar a un par de extremidades superiores y a un par de extremidades inferiores. A pesar de que estos primordios lucen muy similares en las etapas tempranas del desarrollo, algunas diferencias morfológicas comienzan a originarse poco después condicionando las diferencias anatómicas y funcionales observadas en las extremidades de los tetrápodos adultos.

La decisión del primordio de convertirse en extremidad superior o inferior parece ser tomada en los estadios tempranos de la iniciación de las extremidades, antes de la aparición

del primordio, como se demostró en experimentos de trasplantes realizados en embriones de pollo. Por ejemplo, cuando células pre- PLM pertenecientes al campo de miembro superior son transplantadas a una localización ectópica, la extremidad siempre se desarrolla como miembro superior, indicando que la identidad de las extremidades reside en el mesodermo (y no en el ectodermo) y está determinada incluso antes de que comience la formación del primordio (Zwilling, 1955).

2.3.- GENES RELACIONADOS CON LOS EJES DE DESARROLLO DE LAS EXTREMIDADES

El desarrollo de una extremidad se realiza a través de 3 ejes de simetría espacial que incluyen el **eje próximo-distal** (por ejemplo, como referencia, del hombro a la punta de los dedos), el **eje antero-posterior** (del pulgar al quinto dedo) y el **eje dorso-ventral** (de los nudillos que son dorsales a la palma de la mano de localización ventral) (figura 7). La especificación correcta de cada eje implica la expresión de numerosos genes y aunque el papel de cada uno de ellos es particular para cada estadio del desarrollo, sus funciones están íntimamente relacionadas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

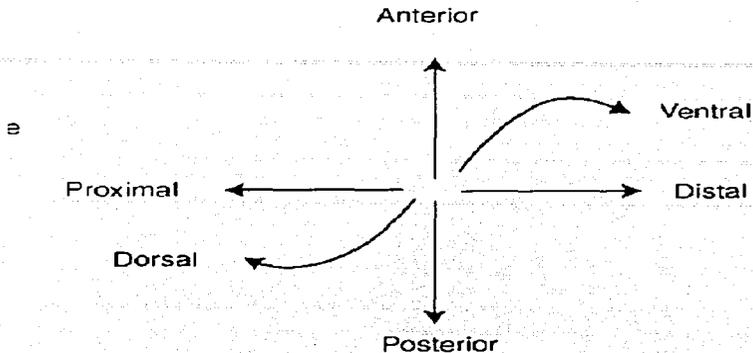


FIGURA 7. Ejes de desarrollo de las extremidades.

2.3.1.- EJE PROXIMO-DISTAL

En los vertebrados, los primordios de las extremidades son formados a partir de células provenientes de la placa lateral del mesodermo. Este mesodermo posteriormente induce al ectodermo subyacente para que forme un engrosamiento conocido como cresta ectodérmica apical que proveerá las señales que dirigirán el crecimiento próximo-distal de las extremidades. Las señales responsables de estas actividades han sido identificadas utilizando diversos modelos animales. (Martin, 1998). Los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) controlan el crecimiento próximo-distal del primordio de las extremidades y se estima que FGF-8 (expresado en el mesodermo somático e intermedio) es el responsable de la señal de iniciación. Fgf-8 mantiene el estado mitótico de las células

de la zona de progreso (Crossley et al, 1996) y el raton knockout condicional de Fgf-8 muestra afectación de las estructuras proximales principalmente (Moon y Capecchi, 2000).

FGF-10 dispara la síntesis de FGF-8 en el ectodermo subyacente y mantiene la expresión de Sonic Hedgehog en el mesodermo de la zona de actividad polarizante. Al menos 4 miembros de la familia FGF (Fgf-2, Fgf-4, Fgf-8 y Fgf-10) son producidos en la cresta apical ectodérmica y cada uno de ellos tiene la capacidad de inducir el crecimiento A-P de la extremidad (Fallon et al. 1986). Estos FGFs también pueden dirigir la proliferación la placa mesodérmica lateral en las extremidades para iniciar su desarrollo temprano (Cohn et al, 1995; Vogel et al, 1996).

En una regulación recíproca sorprendente en el mesénquima de las extremidades, Fgf-10 induce a Fgf-8 que es específico de la CEA mientras que (Sekine et al, 1999) en la CEA la señal de Fgf-8 mantiene la expresión de Fgf-10 en el mesodermo (Mahmood et al, 1995; Moon y Capecchi, 2000). Esta retroregulación Fgf-8/Fgf-10 es una de las interacciones mutuas documentadas entre el mesénquima y la CEA para estimular el crecimiento proximal-distal de las extremidades y generar la cantidad apropiada de masa celular para la formación de todos los elementos óseos de las extremidades. Recientemente, Sun et al. crearon ratones knockout condicionales que no expresaban Fgf4 ni Fgf8 en la CEA en los que no se desarrollaron las extremidades debido a una deficiencia severa en el número de células del mesénquima (Sun et al, 2002).

Además, Fgf-4, Fgf-9 y Fgf-17 son expresados en la región posterior de la CEA y probablemente unen actividades con Fgf-8 para inducir el crecimiento del mesénquima (Lewandoski et al, 2000).

Parte del establecimiento del patrón próximo-distal de las extremidades incluye la especificación de la identidad segmentaria (estilópodo, zeugópodo, autópodo). Los factores de transcripción HOX, específicamente aquellos que pertenecen a los complejos A y D, juegan un papel importante en el desarrollo de las extremidades de una manera secuencial y concertada. Esta coordinación involucra la noción de espacio, tiempo y dosis. La expresión de los genes HOX A y HOX D en el embrión sigue tres fases sucesivas, que corresponden al establecimiento de los patrones en las tres partes de las extremidades (figura 8).

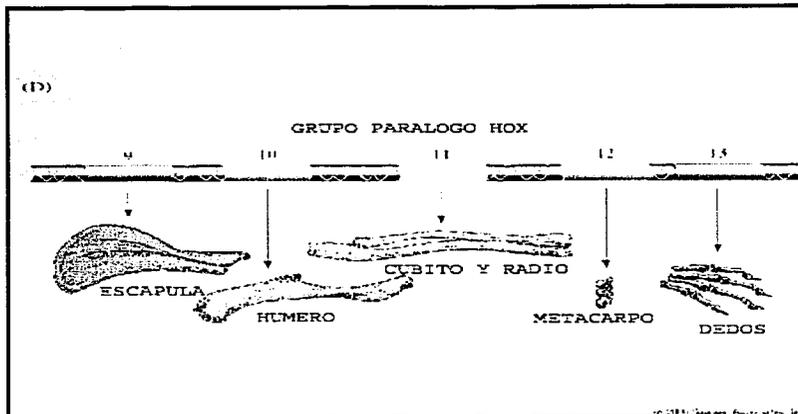


FIGURA 8. Esquema que muestra la cascada de expresión de los genes HOX que da origen a cada segmento de una extremidad en formación (tomada de Mike Webster).

Los patrones de expresión de los genes HOX cambian a medida que se desarrollan las extremidades. De este modo, durante la formación del estilópodo se expresan los genes Hoxd 9 y Hoxd 10, en la formación del zeugópodo el gen Hoxd 9 es expresado en la región anterior y todos los genes Hox en la región posterior de las extremidades. En contraste,

durante la formación del autópodo Hoxa 13 y Hoxd 13 son expresados en la región anterior y en la unión anteroposterior respectivamente, mientras que Hoxa 12 y Hoxd 10-12 se expresan en la región posterior del autópodo (figura 9).

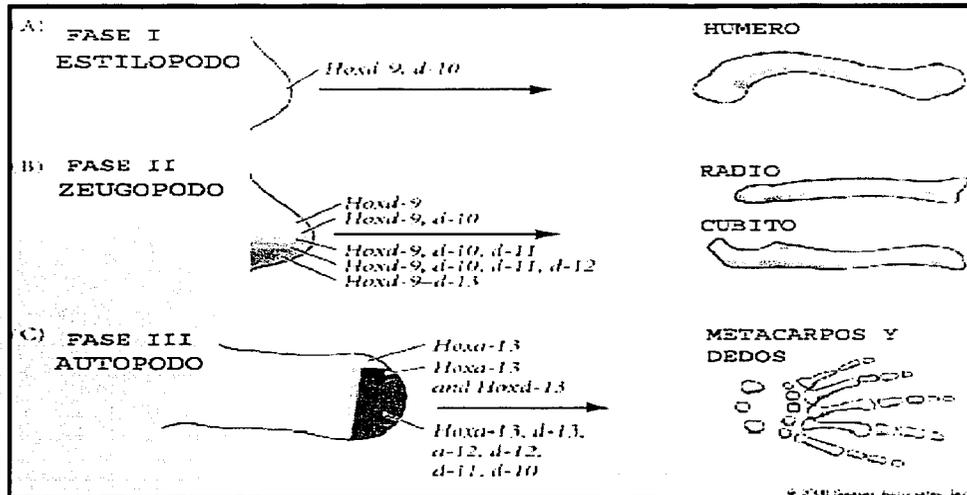


FIGURA 9. Patrón de expresión de la familia de genes HOX en la formación de las extremidades (tomada de Mike Webster).

En el ratón, la eliminación de Hoxd13 resulta en anomalías restringidas al autópodo. Aunque Hoxa y Hoxd son activados inicialmente en la región posterior del primordio, sus perfiles de expresión difieren en que la expresión de Hoxa está restringida a la región distal del primordio, mientras que la expresión de Hoxd está polarizada en el extremo posterior y

distal del primordio. De acuerdo al patrón de expresión de Hoxd, esta región puede dividirse en cinco dominios o sectores que corresponden a los cinco dominios digitales de la mano (Zakany y Duboule, 1999). En humanos como en otros vertebrados HOXD13 y HOXA13 son críticos para la formación del autópodo. HOXD13 está mutado en una enfermedad autosómica dominante llamada sinpolidactilia (Muragaki et al, 1996), mientras que HOXA13 ha sido implicado en el síndrome autosómico dominante mano-pie-genital (Mortlock e Innis, 1997).

En contraste, la expresión de los complejos Hoxc y Hoxb está restringida a la parte proximal del primordio y es diferente para las regiones anterior y posterior de las extremidades (Zakany et al, 1997). Hoxb5 puede intervenir en el posicionamiento de la región superior del primordio. En el ratón, la inactivación de este gen resulta en el desplazamiento rostral del hombro, que asemeja a la deformidad de Sprengel en el humano (Rancourt et al, 1995). Varios hallazgos han demostrado el papel de Hoxb8 en el establecimiento de la polaridad en la parte anterior de las extremidades. Su actividad es identificada tan pronto como el primordio aparece en la región correspondiente a la futura ZAP (Stratford et al, 1997).

2.3.2.- EJE DORSO-VENTRAL

En numerosas extremidades de vertebrados se observan diferencias marcadas a lo largo del eje dorsoventral. Un ejemplo de esto es la mano de los humanos, en la que la palma es la región ventral, el reverso es la región dorsal y los músculos, tendones y otras estructuras muestran una disposición ordenada a lo largo de este eje.

El mesénquima contiene la información para el establecimiento del patrón dorso-ventral de la extremidad que ocurre antes del inicio del primordio. Justo antes de que se forme el primordio, el mesénquima transfiere esta información al ectodermo suprayacente. El patrón D-V subsiguiente es regulado por el ectodermo, como lo demuestran experimentos en los que el ectodermo fue rotado 180° con respecto al mesodermo originando que las estructuras mesenquimatosas (esqueleto, músculo y tendones) se invirtieran (Maccabe et al, 1974).

El establecimiento del patrón D-V requiere la expresión de al menos tres factores de transcripción: Wnt7a, En1 y Lmx1 (Logan et al, 1997). El factor de transcripción codificado por el gen Wnt-7a es expresado en el ectodermo dorsal (Dealy et al, 1993; Parr y McMahon, 1995) y es uno de los factores que lleva a cabo la función de especificación dorso-ventral al inducir la expresión en el mesénquima del gen "dorsalizante" LMX-1 (Parr y McMahon, 1995; Riddle et al, 1995).

Otro factor que interviene en la especificación dorso-ventral es En1. Este gen se expresa en el ectodermo ventral y restringe la expresión de Wnt7a y de Radical fringe (Rfng) al ectodermo dorsal (Rodríguez-Esteban et al, 1997). En ratones knockout para En1, Wnt7a se expresa de manera ectópica en el ectodermo ventral y las estructuras dorsales se desarrollan con un carácter bi-dorsal caracterizado por la transformación dorsal de estructuras ventrales de las garras (Loomis et al, 1996). En1 es un factor de transcripción con homeodominio que es inducido en el ectodermo ventral por la señalización de BMP a través del receptor Bmpr1a. La pérdida de la señal de BMP también lleva a una expresión ectópica de Wnt7a y a un fenotipo bi-dorsal (Pizette et al, 2001).

En este escenario, WNT-7A actúa como un factor formador del dorso expresado en el ectodermo dorsal, y que controla la expresión de Lmx-1 en el mesénquima dorsal subyacente mientras que En-1 se comporta como un factor ventralizante expresado en el

ectodermo ventral, donde previene la expresión de WNT-7A (Cygan et al, 1997; Logan et al. 1997; Loomis et al. 1998). En ratones mutantes para *Wnt7A* o *Lmx1b* se observa un fenotipo bi-ventral (Chen et al. 1998) (figura 10).

El patrón dorsoventral distal parece ser controlado por el ectodermo y el patrón dorsoventral proximal por el mesodermo. Las interacciones ectodermo-mesodermo son muy importantes durante las etapas iniciales del desarrollo de tendones y músculos, estructuras que muestran una polaridad dorsoventral y que se desarrollan directamente por debajo del ectodermo dorsal y ventral (Blagden y Hughes, 1999; Buscher e Izpisua Belmonte, 1999). En humanos se han identificado recientemente mutaciones de *LMX1B* en una enfermedad autosómica dominante denominada síndrome uña-rótula y que se caracteriza por anomalías de las uñas, rótula, codos y parénquima renal (Vollrath et al, 1998).

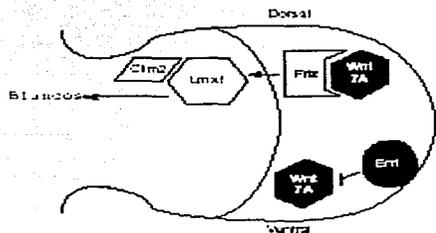


FIGURA 10: Genes implicados en el establecimiento del patrón dorso-ventral. En1 es secretado por células del ectodermo ventral del primordio en donde reprime la expresión de Wnt7A. Wnt7a es secretado sólo en el ectodermo dorsal e induce, por mediación de su receptor Frizzled (Fz), la secreción del factor de transcripción con homeodominio, Lmx1 en el mesodermo. Lmx1 (junto con su cofactor Clim2) ejerce un efecto homeodominio en el mesénquima precondrogénico. (tomada de Manouvrier-Hanu et al., Genetics of limb anomalies in humans).

2.3.3.- EJE ANTERO-POSTERIOR

En numerosos tetrápodos existen características distintivas en el eje antero-posterior de las extremidades, incluyendo la longitud, forma y funciones de los dedos y otros elementos óseos. El crecimiento a lo largo del eje antero-posterior parece estar estrechamente coordinado con el desarrollo del eje proximal-distal, en un proceso mediado por las interacciones específicas entre el organizador antero-posterior (zona de actividad polarizante).

La ZAP está constituida por un grupo de células localizadas en la región posterior del mesénquima del primordio y actúa como el centro organizador de la polaridad AP del primordio (Saunders y Gasseling, 1963). En 1993, fue demostrado que la actividad polarizante de la ZAP es mediada por el gen Sonic Hedgehog (*Shh*) (Riddle et al, 1993; Chang et al, 1994; López Martínez et al, 1995), que codifica para un factor homólogo al producto hedgehog (*hh*) de polaridad segmentaria en *Drosophila* e implicado en varios procesos de patrones de desarrollo en el embrión.

SHH no participa en la inducción de la CEA, pero si es esencial para el mantenimiento de ésta. Al mismo tiempo, el mantenimiento de la expresión de *Shh* en el margen posterior del primordio requiere de la integridad de la CEA, lo cual ilustra la importancia de las interacciones epitelio-mesénquima y de las retroalimentaciones recíprocas durante el desarrollo del primordio. Estudios en modelos murinos han demostrado sin embargo que *Shh* no es requerido para el desarrollo de las estructuras más proximales de las extremidades (Chiang et al, 1996; Kraus et al, 2001).

En el primordio de las extremidades, la síntesis de SHH está confinada a la zona polarizante posterior (ZPP), debido a que es reprimida en la región anterior por la acción conjunta de *Aristaless-like 4* (*ALX4*) y la forma represora de *GLI 3N* (Takahashi et al,

1998; Zuniga y Zeller, 1999). SHH es el único factor conocido a la fecha capaz de mediar la actividad polarizante de la ZPP, por lo que es de particular importancia entender los mecanismos genéticos que controlan su expresión y modulan sus actividades de señalización. Varios genes Hox parecen ser importantes en la delimitación de la región del mesénquima del primordio donde se va a transcribir el gen Shh. En particular, se ha observado expresión del transcrito de Hoxb8 en el flanco del pollo y la parte anterior de las extremidades tempranas (Stratford et al, 1997). lo que sugiere que Hoxb8 puede ser un regulador río arriba de Shh (figura 11).

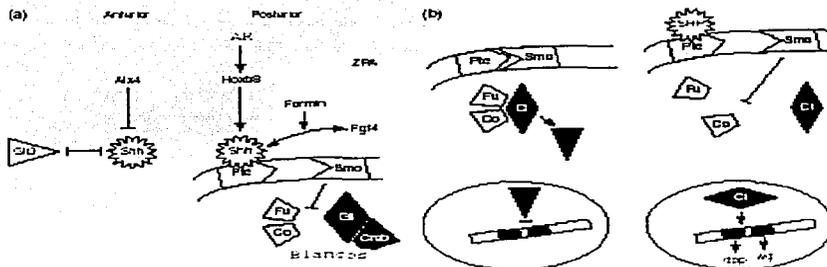


FIGURA 11. VIA DE SEÑALIZACIÓN DE SHH EN EL PRIMORDIO DE LA EXTREMIDAD SUPERIOR. A) Restricción de la activación de Shh en la zona de actividad polarizante. La activación de *Gli3* precede al inicio del crecimiento del primordio. Posteriormente la expresión de *Gli3* persiste en todas las células mesenquimales, con la excepción de las células que expresan *Shh*. El ácido retinoico (AR) es un determinante clave de ZPA induciendo la expresión de *HoxB8* en las células mesenquimales anteriores. *HoxB8* es uno de los factores mesenquimales que limitan la expresión de *Shh* al mesénquima posterior del primordio, donde existe retroalimentación positiva entre *Shh* y *Fgf4*. La activación de *Shh* está restringida a la región polarizante por la acción sinérgica de varios factores: formina, expresado en el primordio en las células mesenquimales posteriores, esencial para establecer esta retroalimentación positiva; el gen represor *Gli3*, que en el primordio es expresado en las células mesenquimales anteriores, al igual que el gen *Aristaless 4 (Alx4)* que es represor de *Shh*, probablemente en forma independiente de *Gli3*. B) Mecanismo de acción de *cubitus interruptus (ci)*, el homólogo de *Gli3* en *Drosophila*. Los receptores *Patched (Ptc)* y *Smoothened (Smo)* son proteínas transmembranales. En la ausencia de *Shh* (izquierda), *Ptc* reprime la actividad estimuladora constitutiva que *Smo* ejerce sobre sus genes blanco, a través de su acción sobre *ci*. En los microtúbulos, *ci* forma un complejo con *costal2 (Cos2)* y *fused (Fu)* (responsables de la división de su extremo carboxilo) ejerciendo una actividad represora sobre: *Dpp* (homólogo de *Bmp4*) y *wingless (Wg)*. En la presencia de *Shh* (derecha), *Ptc* pierde su acción sobre *Smo* previniendo la formación del complejo *Gli-Cos2-Fu*, y la proteína *ci* no modificada tiene una actividad estimuladora sobre sus genes blanco. La vía de señalización de *Shh* en los miembros inferiores es muy similar, aunque presenta algunas diferencias (tomada de Manouvrier-Hanu et al, 1999).

Sin embargo, Hoxb8 no debe ser el único regulador de Shh ya que este gen sólo es activado en las células más distales y además no es requerido para el establecimiento de la polaridad antero-posterior en el primordio del ratón (van den Akker et al, 1999).

El factor de transcripción tipo hélice-vuelta-hélice denominado dHAND también parece controlar la expresión de Shh ya que los ratones deficientes en dHAND tienen extremidades pequeñas sin expresión detectable de Shh en la zona de actividad polarizante (Charite et al, 2000). La expresión de Shh está también bajo regulación transcripcional negativa. El análisis de varios mutantes con polidactilia revela que la transcripción de este gen es regulada negativamente en el margen anterior del primordio por varios genes expresados en el mesénquima anterior. Estos genes incluyen al Aristaless Alx4 que interactúa con el gen Cart1 y el gen Gli-3. El gen Patched 1, que codifica para el receptor de SHH, también parece reprimir la expresión de Shh en el margen anterior del primordio en el ratón (Milenkovic et al, 1999). Por otra parte, los factores de transcripción con dedos de zinc GLI1, GLI2 y GLI3 regulan las señales de transducción de SHH en la zona de actividad polarizante. Se ha demostrado que GLI3, el cual es procesado en una forma represora GLI3N y una forma activadora de longitud completa (no procesada), interviene en la represión de SHH.

Aunque SHH es capaz de mimetizar la actividad de la ZPA, parece poco probable que la proteína SHH por sí misma brinde información posicional a todas las células del primordio, por lo que su actividad organizadora estaría apoyada en parte por señales secundarias. SHH actúa en el mesodermo indirectamente a través de FGF4 producido por la CEA. FGF4 induce la competencia del mesodermo para responder a SHH lo cual a su vez origina la expresión de Bmp2 que determina elementos esqueléticos específicos. La

expresión de Shh es dependiente de la CEA y de Wnt7a ya que la ausencia de la expresión de Wnt7a en el ectodermo dorsal del primordio de la extremidad reduce el dominio de expresión de Shh originando una pérdida de los elementos esqueléticos posteriores (Yang y Niswander, 1995).

2.4.- ESTABLECIMIENTO DE PATRONES ADICIONALES

Además de la polarización y crecimiento del primordio de las extremidades, se requieren mecanismos que permitan la generación de elementos como músculo, hueso, vasos sanguíneos y apéndices epiteliales. Algunos de los genes que participan en la adquisición de estos patrones secundarios han sido identificados por su participación en diversas malformaciones de miembros en los humanos. Entre estos se incluyen los genes que codifican para factores de transcripción de caja-T (TBX), proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs), proteína morfogenética derivada de cartilago (CDMP) y genes HOX (figura 12).

Los genes TBX son expresados diferencialmente en piernas y brazos en desarrollo y están implicados probablemente en la especificación de la identidad de las extremidades. Las mutaciones de TBX5 originan el síndrome de Holt-Oram caracterizado por deficiencia de miembros superiores y cardiopatía congénita, mientras que las mutaciones en TBX-3 se asocian al síndrome cúbito-mamario. La expresión de TBX-4 está restringida a las extremidades inferiores y en ratones mutantes para este gen, la inducción y el establecimiento inicial de patrones del primordio de los miembros inferiores son aparentemente normales, pero posteriormente se produce una falla en el desarrollo de los mismos debido a que no se mantiene la expresión de Fgf-10 en el mesénquima (Naiche y Papaioannou, 2003).

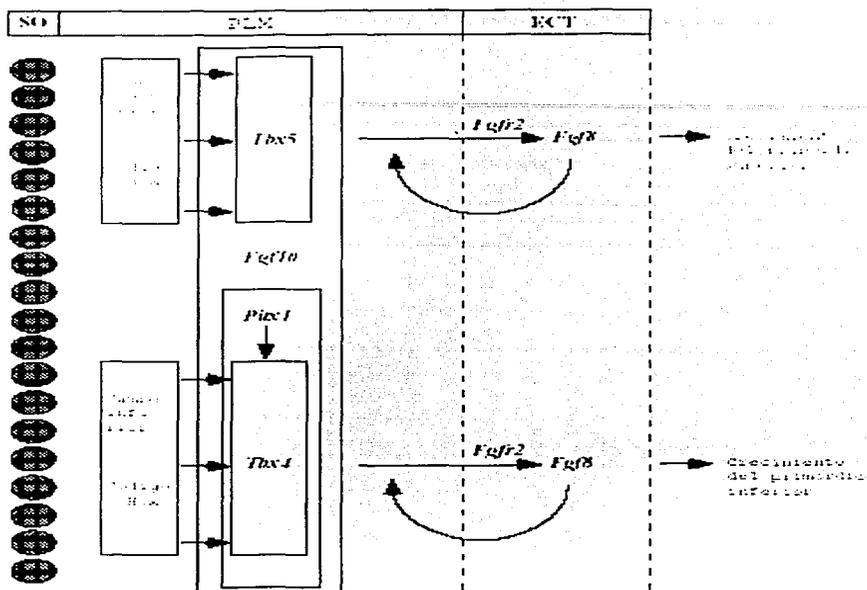


FIGURA 12. Modelo genético para la especificación de la iniciación y posición del crecimiento del primordio. Los genes Hox expresados dentro de la placa lateral del mesodermo (PLM) especifican la posición a la cual las extremidades se desarrollarán. Esta información posicional (ejes) dirige la expresión extremidad específica de los genes T-box dentro de los respectivos campos del desarrollo. Inicialmente, Fgf10 es expresado por células de la PLM. Subsecuentemente, Tbx4 y Tbx5 son activados en los campos respectivos, donde su interacción con la retroalimentación positiva de Fgf10/Fgf8, inicia el crecimiento del primordio. Fgf10 es posteriormente requerido para mantener la expresión en los primordios en crecimiento. La expresión de Pitx1 en el flanco posterior del mesodermo es inducida independientemente y se extiende en un amplio dominio rostrocaudal. Este gen interactúa positivamente con Tbx4 y mantiene su expresión. SO: somitas, ECT: ectodermo (tomada de Ruvinsky y Gibson-Brown, 2000).

Las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP) pertenecen a la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF β). Estas moléculas de señalización tienen su efecto en células blanco a través de receptores de membrana específicos (que tiene una actividad serina-treonina cinasa) y de proteínas SMAD las cuales conducen la señal desde la superficie celular al núcleo. Aunque estas proteínas fueron identificadas inicialmente por su capacidad de promover la formación de hueso endocondral, ahora son consideradas como componentes de una vía de señalización conservada evolutivamente y que es responsable de muchos procesos durante el desarrollo. Como otros miembros de la superfamilia TGF- β , las BMPs realizan sus funciones biológicas al interactuar con receptores en la superficie celular que son heterodímeros de receptores tipo I y tipo II con dominios intracelulares cinasas de serina/treonina. Varios miembros de la familia BMP exhiben un patrón de expresión regulado durante el desarrollo embrológico de las extremidades. Por ejemplo, *Bmp2*, *Bmp4* y *Bmp7* son expresados en el mesodermo indiferenciado de la extremidad en la CEA y en el mesénquima interdigital. Entre las funciones asignadas a estas *Bmps* están el control de la proliferación celular mesodérmica, regulación del crecimiento y regresión de la CEA, diferenciación condrogénica, control de la formación muscular, inducción de apoptosis y posiblemente del eje antero-posterior del primordio temprano de la extremidad (Merino et al, 1999). El polipéptido *Noggin* (NOG) antagoniza las señales de los BMPs compitiendo por los receptores serina-treonina cinasa. *Noggin* es expresado en el cartilago condensado y en los condrocitos inmaduros. En humanos, se han identificado mutaciones heterocigotas en NOG en los síndromes de sinfalangismo proximal y sinostosis múltiple, ambos de herencia autosómica dominante (Gong et al, 1999).

La proteína CDMP, también conocida como factor de diferenciación del crecimiento 5 (Gdf5), participa en los procesos de condrogénesis y posicionamiento de las articulaciones. En el humano, la alteración del gen CDMP origina que los huesos del autópodo sean anormales en longitud y número (Thomas et al, 1996).

SALL1 es un factor de transcripción que interactúa con BMP4 en la especificación del pulgar. Se han identificados mutaciones en SALL1 en sujetos con el síndrome de Townes-Brocks, padecimiento de herencia autosómica dominante y caracterizado por pulgar trifalángico, defectos urogenitales y ano imperforado (Kohlhase et al. 1998).

Además de los genes mencionados, hay otros genes o vías de transducción que también están involucrados en las diferentes etapas del desarrollo óseo de las extremidades. Por ejemplo, el gen SOX 9 (que posee un dominio de transcripción HMG) desempeña una función crítica en la formación del cartilago. Este gen se expresa en las condensaciones mesenquimales en todo el embrión antes y durante la formación del cartilago (Wright et al, 1995). La expresión anormal de Sox 9 en las extremidades se traduce en la formación de cartilago ectópico. Sox 9 es capaz de cambiar las propiedades de agregación de las células mesenquimales in vitro, lo que sugiere que este gen actúa a nivel de la condensación de células mesenquimatosas, probablemente río abajo de las BMPs (Healy et al, 1999).

Por otra parte, las proteínas BMP expresadas en el mesodermo interdigital parecen ser requeridas también para la asignación correcta de la identidad digital, debido a que la inhibición en su señalización en esta región causa transformación de la identidad de los dedos (Dahn y Fallon, 2000). También se ha propuesto que el receptor-1a de BMP (codificado por BmpR-1a y expresado en el mesénquima distal) media la inducción de la apoptosis y que el receptor-1b (codificado por BmpR-1b y expresado en las condensaciones

precondrogénicas) primariamente media el crecimiento del cartílago, aunque también puede inducir apoptosis en otros estudios del desarrollo (Zou et al, 1997).

En suma, el estudio de los mecanismos básicos del control genético del crecimiento y establecimiento de patrones durante el desarrollo de las extremidades se ha beneficiado enormemente de la síntesis que integra los métodos y visiones derivadas de la biología molecular y celular, la embriología clásica y la biología evolutiva. En este contexto, es claro que el estudio de las interacciones genéticas continuará proporcionando conocimientos invaluable acerca de las interacciones epitelio-mesénquima y otros mecanismos morfogénicos que intervienen en el desarrollo de las extremidades en el embrión.

2.5.- GENETICA Y EVOLUCIÓN DE LAS EXTREMIDADES

Los vertebrados terrestres incluyen a los anfibios, reptiles, pájaros y mamíferos. La característica adaptativa común de este linaje llamado tetrápodo es la presencia de dos pares de extremidades. Esta estructura distinguió a los tetrápodos tempranos de los peces y les permitió desplazarse en la tierra. Después, esta innovación fue modificada hasta lograr una enorme variedad de apariencias y tamaños, con funciones tan variadas como cavar o volar. Sin embargo, las extremidades en los tetrápodos son variaciones de un mismo tema ya que en todos ellos la disposición y número de huesos de la extremidad es similar. La evidencia actual indica que las extremidades de los tetrápodos se originaron a partir de las aletas de los peces, posiblemente a partir del período devoniano.

Durante la última década se ha producido un gran avance en la comparación de los patrones de expresión y funciones de los genes homólogos del desarrollo entre los

diferentes taxa. Estas investigaciones enfatizan la “reutilización” de los genes pre-existentes en la evolución de nuevas rutas de desarrollo, partiendo de la idea clásica que los cambios regulatorios en lugar de los cambios bioquímicos en las proteínas, son una fuerza mayor en el proceso de la evolución morfológica (Wilson et al, 1974; King y Wilson, 1975). Evidentemente la duplicación de genes preexistentes tuvo profundas implicaciones evolutivas y este proceso parece haber sido de particular importancia para la evolución en vertebrados (Ruvinsky et al, 2000) (figura 13).

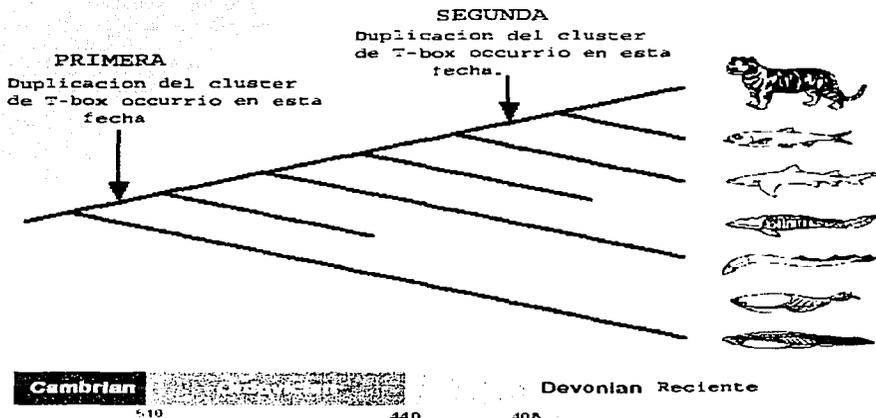


FIGURA 13. Representación esquemática de las relaciones filogenéticas aceptadas en la actualidad y que establece la divergencia entre las principales líneas de cordados inferida de los registros fósiles. Las ramas truncadas significan taxones extintos. La escala en tiempo está dada en millones de años (tomada de Ruvinsky y Gibson-Brown, 2000).

Cualquier modelo molecular que trate de explicar una transformación morfológica en la evolución tiene que satisfacer tres criterios básicos. Primero, los componentes moleculares propuestos como responsables de la evolución de algunos aspectos deben estar

implicados en la especificación de ciertos rasgos en todos los organismos. Segundo, las formas transicionales a través de las cuales se ha propuesto que dicho rasgo haya evolucionado deben ser consistentes con la evidencia derivada del registro fósil, y finalmente, la escala de tiempo inferida para la evolución de los eventos moleculares propuesta tiene que ser consistente con la evidencia paleontológica (Ruvinsky y Gibson-Brown, 2000).

El esquema más comúnmente aceptado de la evolución de los cordados establece que los vertebrados modernos evolucionaron de un cordado invertebrado basal, morfológicamente similar al céfalo-cordado llamado anfioxo que aún existe en la actualidad (Carroll, 1998). El patrón corporal de estos animales primitivos es la pérdida de los apéndices pareados. La interpretación actual del registro fósil sugiere que el origen de los dos pares de apéndices en los gnatostomos (vertebrados con mandíbula) procede vía dos pasos diferentes. Primero, un juego anterior de aletas pareadas evolucionó a nivel de pectoral en agnatos sin extremidades. Después, un segundo juego evolucionó a un nivel axial más posterior para producir un par de aletas pélvicas. Las edades de los fósiles clave implican que estos dos pasos deben haber ocurrido dentro de un periodo relativamente corto de tiempo geológico.

Entre los genes importantes que participan en los procesos embrionarios están los genes T-box los cuales codifican una familia de factores de transcripción con un dominio conservado universalmente conocido como dominio T constituido por 160 a 180 aminoácidos (Papaioannou y Silver, 1998). El dominio-T, se une al DNA de una manera específica permitiendo a estas proteínas funcionar como activadores o represores de la transcripción de genes blanco río abajo. Dos miembros de la familia de factores de transcripción T-box, Tbx5 y Tbx4, exhiben patrones de expresión específicos de

extremidad y son considerados reguladores de la identidad antero-posterior de los vertebrados. Sus parálogos, Tbx2 y Tbx3, son expresados en los márgenes anterior y posterior de las extremidades y probablemente juegan papeles importantes en el establecimiento de patrones de desarrollo (Rodríguez-Esteban et al. 1999).

Los patrones de expresión de estos genes son esencialmente idénticos en el ratón, pollo, *Xenopus* y zebrafish, lo que sugiere que el ancestro común de todos los vertebrados presentaba estos 4 genes y los usaba para especificar la identidad y regular el establecimiento de patrones de desarrollo (Tamura et al, 1999; Takabatake et al, 2000).

Otro aspecto evolutivo de gran interés es que a pesar de que los peces actuales presentan estructuras óseas en sus aletas que pueden ser equiparadas con el estilópodo y el zeugópodo de los vertebrados terrestres, las manos y pies en humanos son añadidos evolutivos que no tienen estructuras homólogas en peces. Estudios recientes han demostrado que tempranamente en el desarrollo, la expresión génica de Shh y de algunos miembros de la familia Hox en tetrápodos y peces es similar. Por ejemplo, los transcritos Hox se localizan en el margen posterior tanto del primordio de la extremidad como del primordio de la aleta. Sin embargo, en los tetrápodos ocurre un cambio en la expresión ya que en etapas tardías del desarrollo los transcritos Hox son encontrados en la parte distal y anterior de la extremidad en el ratón y existe una expresión tardía de Shh, cambios que no son observados en peces. En zebrafish, por ejemplo no existe este patrón de expresión tardía de Shh o Hox; en cambio, en este pez, el ectodermo se pliega y el desarrollo cesa después de la formación de la tibia y el peroné (el zeugópodo en el pez). La expresión tardía de Hox y Shh es una novedad evolutiva y puede haber originado la producción de

tejidos que se convirtieron en las primeras manos y pies de la historia de la vida (Cohn, 2001).

2.6.- P63

Recientemente se identificaron dos genes relacionados con el gen tumor supresor TP53, denominados TP73 y TP63 (Jost et al. 1997; Kaghad et al, 1997; Schmale y Bamberger, 1997; Yang et al, 1998). TP73 y TP63 no representan genes tumor-supresores clásicos sino que actúan como reguladores clave en el desarrollo: p73 en el desarrollo neuronal y vías de feromonas (Yang et al, 2000) y p63 en el desarrollo de extremidades, epitelio y estructuras craneofaciales (Mills et al, 1999; Yang et al, 1999).

La organización genómica general de todos los miembros de la familia p53 presenta similitudes importantes que incluyen organización exón/intrón, inclusión de un primer intrón extenso y la presencia de un primer exón no codificante. P63 se extiende aproximadamente 60kb en el genoma y en el humano se localiza en 3q27-29 (figura 14), está conformado por 16 exones y codifica para una proteína de 448 aminoácidos. (Yang et al, 1998).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

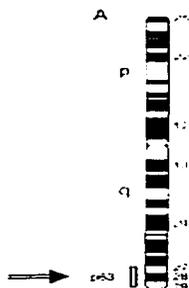


FIGURA 14. Esquema del cromosoma 3 humano mostrando la localización del gen p63 en la región 3q27-29 (tomada de Yang a et al, 1998).

p63 y p73 exhiben una alta homología aminoacídica con respecto a p53, especialmente en los dominios de transactivación (TA), de unión a DNA (DBD) y de tetramerización (ISO). El dominio de unión a DNA le permite a TP63 promover la transcripción de sus genes blanco localizados en otras regiones del genoma (Figura 15). TP63 y TP73 contienen dos sitios de transcripción, uno que origina isoformas de la proteína que contienen el dominio TA (isotipos TA) y otro que produce isoformas sin este dominio (isotipos ΔN). Por otro lado, en humanos y roedores se han demostrado transcritos adicionales de TP63 que resultan del uso de cuatro sitios de iniciación de la transcripción y de "splicing" alternativo del extremo 5' del gen (Bamberger y Schmale, 2001).

Adicionalmente, se produce "splicing" alternativo en el extremo 3' del gen resultando en tres diferentes dominios C-terminales para p63 y seis para p73 (figura 16).

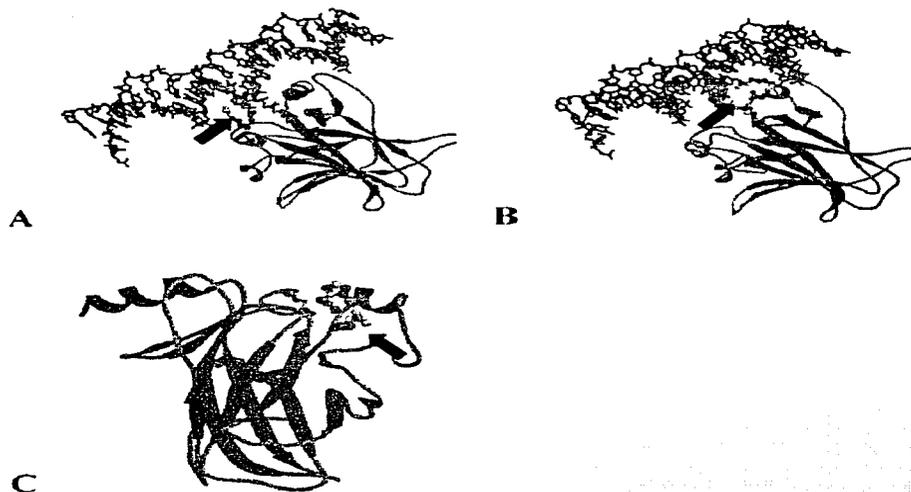


FIGURA 15. Modelo del dominio de unión a DNA de p63 (flecha negra) (tomada de Celli et al. 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

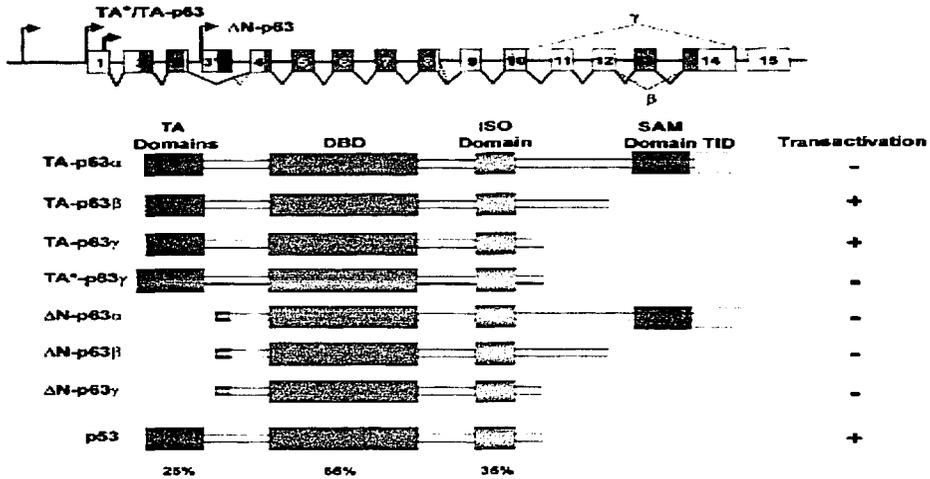


FIGURA 16. Estructura del gen p63 y sus transcritos. En el panel superior se representan los 16 exones del gen y se muestran los sitios alternativos de inicio de la transcripción; los sitios de "splicing" alternativo producen al menos 6 diferentes isotipos de p63. La estructura de los isotipos TAp63 γ es más similar a la de p53 e incluye un dominio de transactivación (TA), un dominio de unión a DNA (DBD) y un dominio de tetramerización (ISO). Los isotipos α contienen un dominio adicional SAM y un dominio que inhibe la transactivación (TID) en el extremo C-terminal (tomada de van Bokhoven y Brunner, 2002).

La secuencia del extremo 3' de los isotipos α de TP63 y TP73 codifican un motivo de interacción proteína-proteína que se asemeja a los motivos α -estéril llamado también motivo SAM (Schultz et al, 1997) ausente en p53. Los dominios SAM pueden homo y hetero oligomerizar con otros dominios SAM aunque se ha demostrado que no tienen la capacidad de oligomerizar con dominios diferentes. Además de estos motivos proteínicos, TP63 contiene dominios ricos en prolina, que están involucrados en la actividad pro-

apoptótica y en la capacidad para activar secuencias blanco. Una segunda región rica en prolina se localiza entre los dominios ISO y SAM en p63 y p73, pero no en p53.

Los varios isotipos de p63 pueden tener propiedades opuestas. La actividad represora se ha mapeado a la región localizada río abajo del dominio SAM, que ha sido denominado como dominio inhibitorio de transactivación (TID) Existen además algunas evidencias que sugiere la presencia de otras regiones dentro de p63 que promueven o reprimen la actividad de transactivación. (Ozaki et al. 1999).

Recientemente se identificaron algunos factores que controlan la expresión de TP63 actuando corriente arriba fueron establecidos en una búsqueda de genes regulados positivamente por las proteínas morfogenéticas de hueso durante la gastrulación del *zebrafish*. En estos estudios se identificó que ΔN -p63 α como un blanco transcripcional directo de la señalización de Bmp (Bakkers et al, 2002). La expresión temprana de ΔN -p63 α parece ser conducida por Smad4 y Smad5, los cuales son mediadores de la señalización de Bmp. Bmp promueve la especificación de las células ventrales en mesodermo y ectodermo, a través del eje dorso-ventral de los embriones de vertebrados. En contraste, las células dorsales tales como las que forman el mesodermo dorsal y el neuroectodermo son formadas a menos que sean instruidas por Bmps a no hacerlo. Este proceso ha sido llamado el modelo neural por default. Los estudios en *zebrafish* revelan que el efecto que los Bmps tienen para contrarrestar esta vía neural por default ocurre a través de ΔN -p63 α , el cual actúa como el represor neural (Bakkers et al, 2002).

Poco después de la identificación de TP63 se estableció que las proteínas p63 eran capaces de unirse a PG13 un elemento de respuesta de p53. La sobre-expresión de p63 en

líneas celulares de mamíferos o de levadura puede activar o reprimir los promotores de varios genes de respuesta p53. aunque no esta claro si estos genes también son regulados por p63 bajo condiciones fisiológicas. p63 puede disparar la vía de señalización *Notch* posiblemente por la inducción de JAG1 y JAG2 que codifican ligandos para los receptores *Notch*. Los ligandos *Notch*, JAG1 y JAG2. son selectivamente inducidos por p73 y p63. respectivamente, pero no por p53. Hay un sitio de unión específico para la proteína p63 en el segundo intrón del gen JAG1, lo que evidencia que p63 puede activar la señalización de *Notch* en células vecinas y sugiere que p63 y p73 tienen participación en el desarrollo normal y en la regulación celular mediada por la vía de señalización *Notch* (Sasaki et al, 2002).

2.6.1.- p63 EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE LOS MAMÍFEROS

La expresión tiempo-espacio de los transcritos de TP63 no ha sido aún explorada a detalle. Estudios inmuno-histoquímicos en embriones de ratón han demostrado niveles elevados de p63 en las células epiteliales de las poblaciones progenitoras o células totipotenciales del tejido epitelial (Yang et al, 1999; Mills et al, 1999). El principal isotipo detectado en estas células es el isotipo dominante negativo ΔN -p63 α , que actúa probablemente manteniendo la capacidad proliferativa de estas células. Conforme estas células comienzan su diferenciación, los niveles de este isotipo descienden gradualmente y los niveles de la isoforma TA-p63 α aumentan.

Aparentemente el efecto dominante negativo de ΔN -p63 α es crucial para el mantenimiento de la capacidad de proliferación regenerativa de las células madre

epiteliales. Las células que no expresan este isotipo pierden esta capacidad y son llevadas a diferenciación hasta lograr una diferenciación terminal (Yang y Mckeon, 2002). De hecho, la aplicación de ácido retinoico (que previene la degradación de ΔN -p63 α) bloquea la diferenciación de las células madre epiteliales cutáneas en cultivo (Bamberger et al, 2002).

En los embriones de ratón, la expresión de TP63 es evidente inicialmente en el núcleo de las células de la placa basal que después se transformará en las células progenitoras de la epidermis y derivados relacionados como pelo y glándulas sudoríparas. También se identifican niveles elevados de p63 en las células basales del cérvix, lengua, esófago, glándulas mamarias, próstata y urotelio. La expresión temprana de TP63 también es evidente en células del ectodermo del primordio de las extremidades, arcos branquiales y el epitelio oral. En el desarrollo del primordio la expresión de TP63 está limitado a la cresta ectodérmica apical.

Como se señaló en secciones anteriores, la señalización apropiada a través del eje antero-posterior entre la CEA y el mesodermo subyacente es crucial para la formación de la región distal de la extremidad. Los sitios de expresión de TP63 están en concordancia con las consecuencias fenotípicas de la inactivación homocigota de TP63 en ratón. Estos ratones deficientes en p63 exhiben defectos severos en extremidades. Las extremidades superiores están truncadas y las inferiores se pierden. La piel en los animales “knockout” está ausente y los animales recién nacidos mueren por deshidratación poco después del nacimiento. Otros derivados de piel, tales como el tallo del pelo y los folículos no se desarrollan. Finalmente, los animales deficientes en p63 pierden los primordios dentales y las pestañas, el maxilar y la mandíbula están truncados y el paladar secundario no cierra originando un paladar hendido. En conjunto todos estos defectos observados en ratones

deficientes para p63 se consideran como cuadros severos de displasia ectodérmica, desarrollo anormal de las extremidades y hendiduras o dismorfias faciales (figura 17).

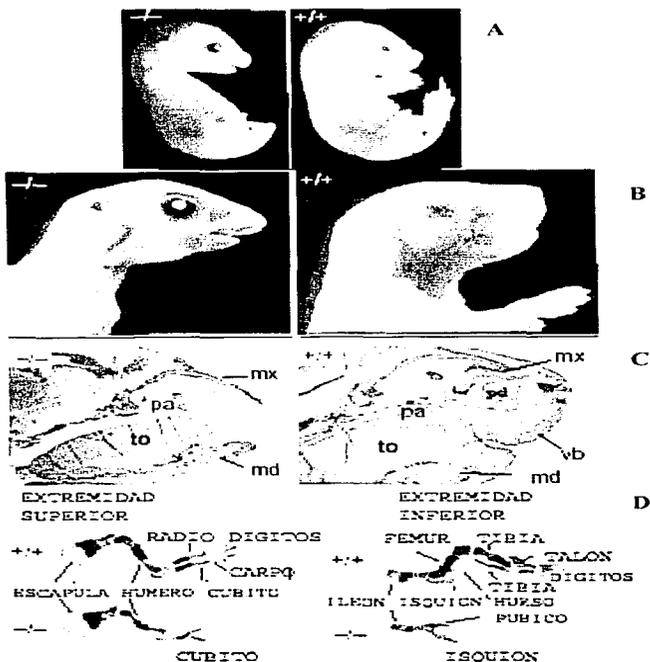


FIGURA 17. Fenotipo en el ratón “knockout” para el gen p63. A, B) Vista lateral de un ratón normal $+/-$ (derecha) y un ratón mutante $p63^{-/-}$ (izquierda). En el ratón mutante se observa el truncamiento de las extremidades superiores e inferiores (A) hipoplasia de los maxilares, ablesfaron, (B) ausencia de bigote, de piel y de apéndices relacionados como vibrisas, folículos pilosos y tallo del pelo. C) Sección sagital de la región cráneo-facial del ratón $p63^{-/-}$ en la que se observan anomalías del maxilar (mx), mandíbula (md) y el paladar secundario (pa) y ausencia de los primordios de los dientes (pd). D) El mutante homocigoto pierde los componentes distales del miembro superior, incluyendo radio, carpo y dedos, al igual que los componentes del miembro inferior (tomada de Yang et al. 1999).

2.7.- MALFORMACIONES DE EXTREMIDADES

Cuando el desarrollo esquelético embrionario o fetal sufre una alteración intrínseca pueden originarse diversas anomalías de las extremidades. Las malformaciones congénitas de extremidades constituyen un grupo de padecimientos con severo potencial incapacitante y se presentan en 1 en cada 800 recién nacidos vivos. En el humano, un número significativo de estas malformaciones son originadas por alteraciones en alguno de los genes o vías de señalización implicadas en la formación de las extremidades causando un amplio espectro fenotípico de formas hereditarias de desarrollo anormal de las extremidades. A pesar que los estudios genéticos en modelos animales y en humanos han permitido identificar muchas de las moléculas clave implicadas en el crecimiento y establecimiento de patrones en el primordio de la extremidad y de reconocer diversos genes responsables de anomalías en las extremidades, aún es difícil establecer correlaciones genotipo-fenotipo debido a la complicada interconexión de señales genéticas en las extremidades en formación.

Existen varias clasificaciones de malformaciones de extremidades; la propuesta por Swanson y col. (1976) y aceptada por la *American Society for Surgery of the Hand and the International Federation of Societies for Surgery of the Hand*, considera 7 categorías generales de defectos en los miembros (Canale: *Campbell's Operative Orthopaedics*. 1998 pp3816-3818):

1.- Defectos por fallas en la formación:

- a) Defectos transversos (Amputaciones congénitas)
- b) Defectos longitudinales (Defectos radiales/cubitales o tibiales/peronéos)

2. Errores en la diferenciación

- a) Displasias: Sinostosis, Sindactilias:(ósea, cutánea)
- b) Acortamientos (rizomélico, mesomélico, acromélico)
- c) Fragilidad ósea.

3. Duplicaciones (Polidactilias):

- a) Preaxial
- b) Postaxial
- c) Centroaxial
- d) Manos en espejo

4. Sobrecrecimiento

- a) Macrodactilia
- b) Alargamiento diafisiario, metafisiario,
- c) Exostosis.
- d) Pseudoartrosis

5. Subcrecimiento

- a) Braquidactilias
- b) Pulgar/primer orjejo hipoplásico
- c) Disrupciones: Bandas de constricción
- d) Deformaciones: Incurvamientos

6. Síndromes de bandas de constricción: Consideradas no genéticas

7. Anormalidades esqueléticas generalizadas

El análisis de las malformaciones de extremidades humanas heredadas ha promovido el entendimiento del desarrollo de las extremidades como un modelo para las interacciones genéticas reguladoras. Basados en los fundamentos del proyecto genoma humano, el mapeo y la identificación de nuevos genes asociados con defectos en las extremidades extiende considerablemente el rango de candidatos más allá del repertorio de genes del desarrollo y vías conocidas. Los intentos para correlacionar el genotipo con el fenotipo se ven limitados por el amplio rango de heterogeneidad genética (diferentes genes

que producen un mismo fenotipo) o de heterogeneidad alélica (fenotipos clínicamente diferentes asociados con mutaciones que afectan el mismo gen). Además, se deben tomar en cuenta otros mecanismos a parte de la herencia mendeliana. Por ejemplo, la variabilidad fenotípica dentro de las familias puede ser explicada por la acción de diferentes genes modificadores o a factores como mosaïcismo somático o inactivación del cromosoma X o de agentes no genéticos como la influencia ambiental.

El conocimiento integral de los factores genéticos que rigen el desarrollo normal y anormal de las extremidades en los humanos permitirá proponer blancos para medidas preventivas y nuevos acercamientos para la intervención terapéutica en la nueva era de la medicina molecular.

En la Tabla 1 se enlistan las malformaciones congénitas de extremidades en las que se conoce el defecto genético causante de la enfermedad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GEN	SÍNDROME HUMANO	FENOTIPO	LOCUS
HOXA 11	Sinostosis cúbito-radial con Trombocitopenia amegacariocítica	ES: Fusión proximal del cúbito y radio	7p15-p14.2
HOXA 13	Síndrome mano-pie-genital	ES: 1er metacarpo corto, falanges distales cortas, fusión o retardo de la osificación de la muñeca. EI: acortamiento del 1er metatarso y 1ra falange distal.	7p14-p15
HOXD 13	Sinpolidactilia	ES: Pulgar corto, duplicación del 2º o 3er dígitos, sindactilia 3/4 o 4/5. EI: Duplicación del 3er orjejo, sindactilia 4/5, polidactilia postaxial.	2q31-q32
TBX 3	Síndrome cúbito-mama	Deficiencias postaxiales o duplicaciones	12q24.1
TBX5	Síndrome Holt-Oram	ES: Aplasia/hipoplasia del brazo y pulgares	12q24.1
ROR 2	Braquidactilia tipo B1	Acortamiento mesodistal de los huesos endocondrales	9q22
EVC	Síndrome de Ellis-van Creveld; disostosis acrodental de Weyers	Acortamiento de extremidades, polidactilia postaxial y uñas displásicas.	4p16
MKKS	Síndrome de McKusick-Kaufman; síndrome de Bardet-Biedel	Polidactilia postaxial	20p12
TP63	Síndromes EEC3, ADULT, LMS, AEC y Rapp-Hodgkin; ectrodactilia aislada.	Ectrodactilia, sindactilia, aplasia y/o hipoplasia de falanges, metacarpos y metatarsos.	3q27-q29
SALL1	Síndrome de Townes-Brocks	Hipoplasia de pulgar, pulgar trifalángico o bífido, polidactilia preaxial	16q12.1
GLI3	Polidactilia postaxial tipo A, síndrome de Pallister-Hall; cefalopolisindactilia de Grieg, polidactilia preaxial tipo 4	Polidactilia postaxial y polidactilia preaxial	7p13
IHH	Braquidactilia tipo A1	ES: Acortamiento de la falange proximal del 1er dedo y falanges mediales (2º-5º). EI: Acortamiento de la falange proximal del 1er orjejo	2q33-q35

GEN	SÍNDROME HUMANO	FENOTIPO	LOCUS
CDMP1	Braquidactilia tipo C. condrodisplasia tipo Hunter- Thompson	ES: Acortamiento de las falanges 2ª, 3ª y 5ª, acortamiento severo de toda la extremidad terminando en dedos pequeños, polidactilia postaxial, braquidactilia, edad ósea retrasada, metatarsus adductus. EI: Similar a las extremidades superiores	20q11.2
C70RF2	Aqueiropodia	Deficiencias severas de extremidades superiores e inferiores, aplasia de manos y pies.	7q36
FGFR1	Síndrome de Pfeiffer	Craniosinostosis, anomalías digitales de manos y pies	8p11.2-p11.1
FGFR2	Síndromes de Pfeiffer, Jackson-Weiss, Apert, Antley-Bixler	Sindactilia en Apert; 1er metatarso/dedo alargado en Pfeiffer y Jackson-Weiss; sinostosis radiohumeral y fracturas neonatales en Antley-Bixler	10q26
FGFR3	Displasia tipo SADDAN, síndrome de Saethre-Chotzen	Encurvamiento tibial y talla baja corta en SADDAN; braquidactilia y sindactilia en Saethre-Chotzen	4p16.3
TWIST	Síndrome de Saethre- Chotzen	Acrocefalo-sindactilia de manos y pies	7p21
CBP	Síndrome de Rubinstein- Taybi	Talla baja, pulgares anchos, retraso mental	16p13.3
OFDI	Síndrome oro-facio-digital	Polidactilia	Xp22.3-p22.2

ES: extremidades superiores

EI: extremidades inferiores

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.8.- MALFORMACIONES DE EXTREMIDADES ASOCIADAS AL GEN TP63

Se han identificado mutaciones en el gen p63 en individuos con algunos síndromes genéticos autosómicos dominantes que asocian malformaciones de extremidades y defectos en estructuras derivadas del ectodermo. Estas enfermedades incluyen al síndrome EEC (ectrodactilia, labio hendido con o sin paladar hendido y displasia ectodérmica), al síndrome AEC o Hay-Wells (anquilobefaron, displasia ectodérmica y labio hendido con o sin paladar hendido), al síndrome extremidad-mamario (LMS) (anomalías en extremidades y glándulas mamarias), al síndrome ADULT (defectos en extremidades, piel, uñas, conductos lagrimales y dientes), a la ectrodactilia aislada en manos y/o pies (SHFM) y al síndrome de Rapp-Hodgkin (van Bokhoven y Brunner, 2002; Kantaputra et al, 2003).

Los pacientes con el síndrome AEC, también conocido como síndrome de Hay-Wells, exhiben anquilobefaron, anomalía caracterizada por fusión congénita de los párpados, además de displasia ectodérmica y labio hendido con o sin paladar hendido. En este síndrome, la displasia ectodérmica es más severa que en las otras enfermedades de este grupo. Las anomalías descritas en las extremidades son mínimas (sindactilia cutánea principalmente entre el segundo y tercer orjejos) o ausentes. Son frecuentes las infecciones severas del cuero cabelludo que se presentan principalmente durante los primeros años de vida (van Bokhoven y Brunner, 2002).

En el síndrome extremidad-mamario (LMS) se presenta hipoplasia de la glándula mamaria y el pezón, ectrodactilia en manos y/o pies y paladar hendido. En este síndrome las alteraciones ectodérmicas son leves y solo se presentan en algunos pacientes. Los pacientes presentan comúnmente paladar hendido sin afectación de las estructuras labiales (van Bokhoven y Brunner, 2002; Barrow et al, 2002).

El síndrome ADULT (por *acro-dermato-ungual-lacrimal-teeth*) se caracteriza por la presencia de ectrodactilia, sindactilia, hipoplasia de glándulas mamarias y pezón y anomalías ectodérmicas como displasia de uñas, hipodoncia, obstrucción del conducto lagrimal, pelo ralo, alopecia frontal, piel delgada y múltiples pecas. Una diferencia importante con los otros miembros de este grupo de enfermedades es la ausencia de hendiduras faciales (Amiel et al. 2001; Duijf et al. 2002).

El síndrome Rapp-Hodgkin presenta características clásicas como nariz estrecha, microstomía, pelo tieso de lento crecimiento (*pili torti* o *pili canaliculi*), cejas y pestañas escasas, obstrucción del conducto lagrimal, estenosis bilateral de conductos auditivos externos, hipodoncia con incisivos en forma de cono, uñas distróficas y labio y paladar hendido (Kantaputra et al, 2003).

2.9.- SÍNDROME EEC

El último miembro de este grupo de enfermedades asociadas a mutaciones en P63 es el síndrome EEC, definido por la asociación de ectrodactilia, displasia ectodérmica y hendiduras faciales. Aunque la relación entre ectrodactilia y labio hendido con o sin paladar hendido había sido descrita hace largo tiempo, fue hasta 1970 cuando Rudiger y cols. notaron que al menos algunos de los pacientes con esta asociación presentaban además displasia ectodérmica y nombraron a la enfermedad síndrome EEC (Rudiger et al. 1970).

El síndrome EEC está caracterizado por la triada de ectrodactilia (malformación de las extremidades que involucra defectos en los rayos centrales del autópodo), displasia ectodérmica (que puede afectar piel, pelo, dientes o uñas) y hendidura facial (labio hendido y/o paladar hendido). Varias anomalías se encuentran asociadas a este padecimiento, principalmente defectos de los conductos lagrimales, anomalías urogenitales y pérdida

conductiva de la audición. Es frecuente la presencia de expresividad variable y la penetrancia es incompleta (Roelfsema y Cobben, 1996).

Las características clínicas de este síndrome son las siguientes:

Piel: hipopigmentada, delgada y con hiperqueratosis leve.

Pelo: hipopigmentado, escaso, delgado y tieso.

Ojos: hipopigmentación del iris, fotofobia, blefarofimosis, defectos en el conducto lagrimal y dacriocistitis.

Cara: labio hendido con o sin paladar hendido, hipoplasia maxilar e hipoplasia malar leve.

Dientes: anodoncia parcial, microdoncia, caries y dientes cónicos.

Extremidades: defectos en manos y pies que puede variar desde sindactilia hasta ectrodactilia, displasia de uñas y braquidactilia.

Genitourinario: megaureter, duplicación del sistema colector, reflujo vesicoureteral, ureterocele, displasia/agenesia renal, micropene y criptorquidia.

Anomalías ocasionales: sordera, retraso mental, atresia de coanas, holoprosencefalia, deficiencia de hormona de crecimiento e hipogonadismo hipogonadotrópico.

En la tabla 2 se muestran las mutaciones que se han identificado en el gen p63 y el fenotipo al que se han asociado (figura 18).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

EXON	CAMBIO DE AMINOÁCIDO	No. DE FAMILIAS (n=80)	Islas CpG	ENFERMEDAD
3	N6H	1	-	ADULT
4	G76W	1	-	LMS
5	IVS4-2A→C ^b	1	-	SHFM
	Y163C	1	-	EEC
	Y192C	2	-	EE
	K193E	1	-	SHFM
	K194E	1	-	SHFM
	V202M	1	-	EE
6	R204W	6	+	EEC
	R204Q	4	+	EEC
	R227Q	4	+	EEC
7	C269Y	1	-	EEC
	S272N	1	-	EEC
	C273Y	1	-	EEC
	R279H	8	+	EEC
	R279C	3	+	EEC
	R279Q	1	-	EEC
	R280C	5	+	EEC, SHFM
	R280S	1	+	EEC
	R280H	2	+	EEC, SHFM
	R298Q	2	+	ADULT
8	R304W	4	+	EEC
	R304Q	6	+	EEC
	C306R	1	-	EEC
	C308S	1	-	EEC
	P309S	1	-	EEC
	D312H	1	-	EEC
11	IVS10-2A→G ^b	1	-	AEC
13	L518V	1	-	AEC
	L518F	1	-	AEC
	C526G	1	-	AEC
	C526W	1	-	AEC
	1572Ins A	1	-	EEC
	1689InsA	1	-	EEC
	1693-1694Del TT	1	-	LMS
	G534V	1	-	AEC
	T537P	1	-	AEC
	Q540L	1	-	AEC
	I541T	2	-	AEC
	S545P	1	-	Rapp-Hodgkin
14	1859Del C	1	-	AEC
	1860-1861Del AA	1	-	LMS
	Q634X	1	-	SHFM
	E639X	1	-	SHFM

+Mutaciones en islas CpG (n=45): -= mutaciones fuera de islas CpG (n=35)

b Mutaciones intrónicas detectadas en el análisis de los exones indicados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En un análisis reciente de pacientes con síndrome EEC se encontraron mutaciones heterocigotas en p63 en 40 de 43 familias no relacionadas (van Bokhoven et al, 2001). En la figura 18 se muestra un esquema de la proteína p63 en el que se indica la localización de las mutaciones descritas en los síndromes mencionados arriba. Es importante señalar que la distribución de mutaciones en los diversos dominios de p63 y las implicaciones estructurales y funcionales de cada una de las mutaciones descritas ha permitido establecer una correlación genotipo-fenotipo ya que, en general, el patrón de mutaciones es distinto en cada uno de estos síndromes (van Bokhoven et al. 2001).

La mayoría de las mutaciones en los pacientes con síndrome EEC originaron la sustitución de un aminoácido en el dominio de unión a DNA, región común a todas las isoformas conocidas de p63. El codón de arginina en las posiciones 204, 227, 279, 280 y 304 fue el más frecuentemente mutado. Las mutaciones en estos aminoácidos representaron el 75% de todos los casos del síndrome. De esta manera, mutaciones en p63 son responsables al menos del 90% de los casos de síndrome EEC (Celli et al, 1999; van Bokhoven et al, 2001; van Bokhoven y Brunner, 2002; Brunner et al, 2002).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Mutaciones con proteína truncada

Cambios de aminoácidos

**ECTRODACTILIA HENDIDURA OROFACIAL
CLP CP**

**ECTRODACTILIA HENDIDURA OROFACIAL
CLP CP**

InsA, DelTT

InsA

DelTT

DelAA
DelTT
S545P

DelC

DelAA

IVS10-2A → G



N6H
G76W

Y163C
Y192C

V202M
R204W.Q
R227Q
C269Y
S272N
C273Y
R279H.C.S
R280H.C.S
R294C
R304W.Q
C306R
C308S
P309S
O312H

G76W

Y163C

R204W.Q
R227Q
C269Y
S272N
C273Y
R279H.C.Q
R280H.C.S
R304W.Q
C306H
C308S
P309S
O312H

L518F.V
C526W.G
G534V
I541T
S545P

T537P
G540L
I541T

SINDROME SINDROME SINDROME SINDROME SINDROME SINDROME
EEC AEC LMS ADULT SHFM RAPP-HODGKIN

FIGURA 18. Distribución de mutaciones en p63 (tomada de van Bokhoven y Brunner 2002).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.- OBJETIVOS

Realizar análisis molecular del gen P63 en sujetos con síndrome EEC y determinar el tipo y localización de mutaciones en sujetos Mexicanos con esta enfermedad.

Correlacionar los posibles defectos moleculares con el fenotipo de los afectados.

4.- SUJETOS Y METODOS

4.1- SUJETOS

Se estudiaron 6 pacientes mexicanos que presentaban diversos grados de ectrodactilia en manos y/o pies asociada a displasia ectodérmica y/o fisuras faciales.

Paciente # 1 Masculino de 25 años de edad quién presentó un fenotipo de malformaciones congénitas en extremidad inferior derecha caracterizado por ectrodactilia completa, sindactilia cutánea completa entre el primer y segundo orjeos e hipoplasia del cuarto orjejo. El paciente además presentó labio hendido bilateral y paladar hendido derecho y criptorquidia derecha. El paciente fue diagnosticado con el fenotipo de ectrodactilia y labio y paladar hendidos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Paciente # 2 Femenino de 1 año de edad quien presentó anomalías congénitas de las cuatro extremidades consistentes en ectrodactilia de manos y pies, sindactilia bilateral entre tercero y cuarto orjejos y segundo orjejo de pie izquierdo hipoplásico. Además la paciente presentó labio y paladar hendido bilateral, acompañados de cabello fino, cejas escasas, pestañas ausentes y piel seca. Con estos datos clínicos se integró al diagnóstico de síndrome EEC.

Paciente # 3 Masculino de 2 meses de edad con anomalías congénitas en extremidades inferiores caracterizadas por ectrodactilia bilateral, anoniquia bilateral de todos los orjejos, en ambas manos presenta clinodactilia del 5º dedo y uñas hipoplásicas e hiperconvexas. Además presentó labio y paladar hendido bilateral. El diagnóstico del paciente fue de ectrodactilia con labio y paladar hendido bilateral.

Paciente # 4 (mamá): Femenina de 26 años de edad quien presentó un fenotipo de malformaciones congénitas en extremidades caracterizado por hipoplasia del segundo dedo de la mano izquierda, braquidactilia en manos y pies, displasia ungueal en manos y pies y ectrodactilia incompleta en pies. El cabello era grueso y tieso, hipopigmentado y las cejas y pestañas eran escasas; no se observaron fisuras faciales aunque fue evidente la hipoplasia del tercio medio facial (Figura 19). La paciente fue diagnosticada con un fenotipo EE (ectrodactilia/displasia ectodérmica).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 19. Fotografías de la paciente #4. A) Cabello grueso e hipopigmentado, cejas y pestañas escasas, e hipoplasia medio facial. B) Hipoplasia del 2º dedo de mano izquierda, braquidactilia y displasia de uñas en ambas manos. C) Ectrodactilia incompleta, primer orjejo ancho, braquidactilia y displasia ungueal.

Paciente # 5 (Hija): Femenina de 5 años de edad, hija única de la paciente # 4. presentó anomalías congénitas en las cuatro extremidades caracterizadas por ectrodactilia, hipoplasia del pulgar y sindactilia en mano derecha, sindactilia entre tercero y cuarto dedos y polidactilia preaxial en mano izquierda, ectrodactilia bilateral en pies y displasia ungueal en manos y pies (figura 20). La paciente también demostró pelo hipopigmentado, escaso y grueso, piel hipopigmentada y labio y paladar hendido bilateral corregido (figura 21). El diagnóstico en esta paciente fue de síndrome EEC.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

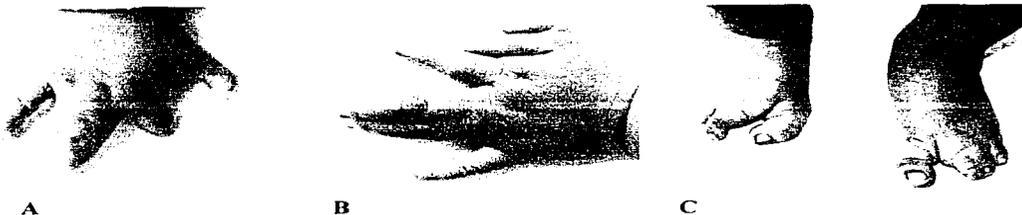


Figura 20. Fotografías de las extremidades de la paciente # 5. A) Mano derecha: ectrodactilia, hipoplasia del pulgar y sindactilia. B) Mano izquierda: sindactilia entre tercero y cuarto dedos y polidactilia preaxial. C) Pies: ectrodactilia bilateral.



Figura 21. Fotografía de la cara de la paciente #5. Se aprecian la hipopigmentación del pelo que es escaso y grueso, piel hipopigmentada y labio y paladar hendido bilateral corregido.

Paciente 6 Femenina de 12 años de edad con anomalías congénitas de extremidades consistentes en ectrodactilia completa de manos y pies asociadas a displasia ectodérmica caracterizada por pelo escaso e hipopigmentado, cejas y pestañas escasas y uñas displásicas en manos y pies (Figura 22). La paciente tenía el antecedente de obstrucciones repetitivas de los conductos lagrimales. No se observaron fisuras faciales. El diagnóstico en esta paciente fue de fenotipo EE.



Figura 22. Fotografías de la paciente # 6 se observa ectrodactilia completa de manos y pies.

4.2.- METODOS

La metodología utilizada para el análisis genético del gen P63 en los sujetos incluidos en este estudio se resume en la figura 23.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

METODOLOGÍA

Muestra de
sangre periférica

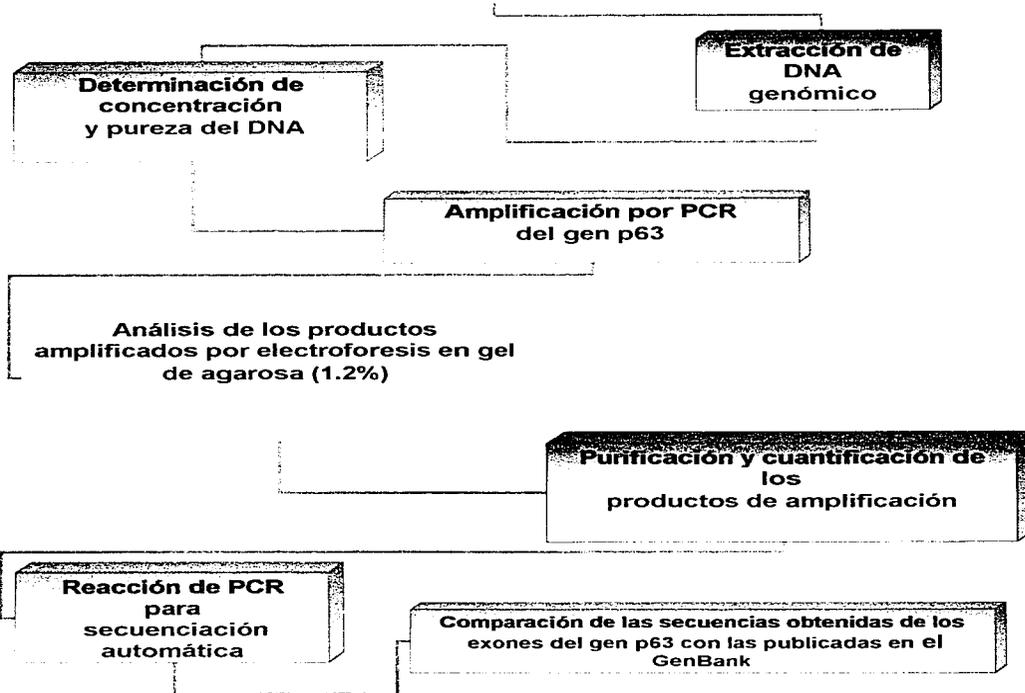


Figura 23. Metodología utilizada para el análisis molecular del gen p63.

4.2.1.- EXTRACCIÓN DE DNA DE SANGRE PERIFÉRICA

Después de obtener el consentimiento informado de los pacientes (o de sus padres) se extrajeron por punción venosa 3ml de sangre periférica a cada uno de los 6 sujetos. Una vez obtenida la muestra se procedió a extraer DNA genómico a partir de los leucocitos utilizando el reactivo DNAzol BD (GIBCO). Se transfirieron 500 µl de sangre total a un microtubo eppendorf de 2 ml, se mezcló con 1 ml del reactivo DNAzol BD y se agitó la preparación por 30 segundos. Inmediatamente se agregaron 400 µl de alcohol isopropílico y nuevamente se agitó la mezcla, esta vez por 1 minuto. La mezcla se dejó incubar a temperatura ambiente por 5 minutos y después se centrifugó a 6000 rpm por 6 minutos y se decantó el sobrenadante con cuidado; el botón residual en el tubo fue lavado añadiendo 500 µl de DNAzol BD y se agitó el tubo hasta disolver el botón. Se centrifugó la muestra a 6000 rpm, esta vez por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se lavó el botón con 1 ml de etanol al 75%, agitando el tubo hasta disolver el botón y homogeneizar. La muestra fue centrifugada de nuevo a 6000 rpm por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se retiró el exceso de alcohol con pipeta. Se procedió a añadir 200 µl de hidróxido de sodio (NaOH) 8mM y se incubó el botón por 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, el DNA disuelto en el NaOH se transfirió a tubos eppendorf limpios de 0.5 ml.

4.2.2.- ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA CUANTIFICACIÓN DE DNA

El análisis espectrofotométrico del DNA tuvo la finalidad determinar la absorbancia de una dilución 1:500 de la muestra a dos longitudes de onda (260nm y 280nm). A partir de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

la lectura a 260nm (correspondiente a los ácidos nucleicos), se calculó la concentración del DNA con la fórmula siguiente:

$$[\text{DNA}] (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times (\text{dilución})^{-1} \times 0.05$$

$$I \text{ D.O. }_{260} = 500 \mu\text{g de DNA/ml} = 0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

La cantidad total de DNA (en μg) se calculó como sigue: $\mu\text{g totales de DNA} = [] (\mu\text{g}/\mu\text{l}) \times \text{volumen total } (\mu\text{l})$. Además, la relación 260 nm/280 nm permitió conocer la cantidad de proteínas en la muestra, considerando que la lectura a 280 nm, corresponde a la fracción proteica.

4.2.3.- AMPLIFICACIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) DEL GEN p63

En todos los pacientes se realizó amplificación por PCR de los 16 exones y de las uniones exón/intrón del gen p63. Se utilizaron 16 pares de oligonucleótidos específicos que se adquirieron en una casa comercial (Accesolab) y cuya secuencia se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen P63. Se indica además el tamaño del amplicón, las temperaturas de alineamiento y las concentraciones de cloruro de magnesio utilizadas para la amplificación de cada exón.

EXON	SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS	TAMAÑO DEL PRODUCTO DE PCR (pb)	TEMP. DE ALINEACIÓN (C)	MgCl ₂ (mM)
1	F 5' TC CCG GCT TTA TAT CTA TAT ATA C 3' R 5' GAC ACA TTC ATA ATA CAC AAG GCA C 3'	211	59	2.0
2	F 5' TCC ACT TGG GTT TTC ATG ATA GAG 3' R 5' GTA AGC AAT ATT TTG ACC ACC CAC 3'	300	58	2.5
3	F 5' GCT TGT TGT TAA CAA CAG CAT G 3' R 5' GAA AAG ACA GGT TTA ACA GAG C 3'	281	59	2.5
3'	F 5' CAT ATT GTA AGG GTC TCA GAG G 3' R 5' GAC CGA GAA CCG CAA ATA CG 3'	223	59	1.0

EXÓN	SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS	TAMAÑO DEL PRODUCTO DE PCR pb	TEMP. DE ALINEACIÓN °C	MgCl ₂ mM
4	F 5'GAT CCG TGG CTT CAG CGG 3' R 5'AAG CCC ATC CTT GGA CTT GG 3'	354	58	2.5
5	F 5'GTT GGT TCT CTC CTT CCT TTC 3' R 5'GCC CAC AGA ATC TTG ACC TTC 3'	291	57	3.0
6	F 5'CCA CCA ACA TCC TGT TCA TGC 3' R 5'GTT CTC TCA AGT CTA CTC AGT CC 3'	297	55	2.5
7	F 5'GGG AAG AAC TGA GAA GGA ACA AC 3' R 5'CAG CCA CGA TTT CAC TTT GCC 3'	253	55	2.5
8	F 5'GTA GAT CTT CAG GGG ACT TTC 3' R 5'CCA ACA TCA GGA GAA GGA TTC 3'	260	54	2.5
9	F 5'GCT TTA GAA GTG TTC CCA GG 3' R 5'ACA CCT CCT TTC CCA TTG TC 3'	237	55	2.5
10	F 5'TGA GGA TTG ACC ACA CTT CTA AC 3' R 5'CAT CAA TCA CCC TAT TGC TGA TC 3'	287	61	2.0
11	F 5'TGA NCA TCA TTT CCA TGT TTG TC 3' R 5'TCA CAG AGT CTT GTC CTA AGC 3'	254	57	3.0
12	F 5'GGA CTA TAA CAG TAT CCG CCC 3' R 5'CAA GAT GGA CCA CTG GGA TG 3'	294	60	2.0
13	F 5'CTT ATC TCG CCA ATG CAG TTG G 3' R 5'AAC TAC AAG GCG GTT GTC ATC AG 3'	240	55	2.5
14	F 5'GGG AAT GAT AGG ATG CTG TGG 3' R 5'AAG ATT AAG CAG GAG TGC TT 3'	449	54	2.0
15	F 5'GAT GAA GTC CTA GGC CTT C 3' R 5'GGA AAT ACA ACA CAC ACA CT 3'	205	55	1.0

Todos los oligonucleótidos fueron llevados a una concentración final de 100 μM con agua bidestilada.

Cada reacción de PCR se realizó en un volumen total de 25 μl contenidos en un microtubo de 200 μl . Las concentraciones finales de las reacciones incluyeron: 100-200 ng de DNA genómico, buffer de PCR 1X, MgCl_2 entre de 1-3 mM (tabla 2), 0.2 mM de cada dNTP, 1 mM de cada oligonucleótido (5' y 3') y 2.5 unidades de Taq polimerasa (Tabla # 4).

Tabla 4. Concentraciones finales en las reacciones de PCR.

	DNA	Buffer 10X	MgCl_2	dNTPs	OLIGONUCLEÓTIDO SENTIDO	OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO	Taq polimerasa
REACCIÓN PARA CADA EXON	100 ng	1x1	1-3 mM	0.2 mM	1mM	1mM	2.5 U

Cada exón fue amplificado con un programa de temperaturas descrito a continuación en el que la única variante fue la temperatura de alineamiento (ver Tabla # 2), utilizando un termociclador Applied Biosystems 9600.

1 ciclo a 94°C por 3 minutos (desnaturalización inicial)

35 ciclos: 1 minuto de desnaturalización a 94°C

2 minutos de alineamiento a temperaturas de entre 54°C y 61°C

1 minuto de extensión a 72°C

1 ciclo de extensión final a 72°C durante 10 minutos

4.2.4.- ELECTROFORESIS DE DNA

La electroforesis del DNA es el procedimiento que permite la migración de esta macromolécula a través de un campo eléctrico en un gel de agarosa, en base a su peso molecular. Debido a su carga negativa, el DNA migra desde el polo negativo hacia el polo positivo. Esta técnica permite detectar la presencia de productos amplificados por PCR por medio de la visualización de una banda específica, así como determinar la calidad de la muestra. En nuestro estudio, los productos amplificados del gen p63 se analizaron en geles de agarosa al 1.2% y se compararon con marcadores de peso molecular.

Para la preparación del gel de agarosa se realizó el siguiente procedimiento: se disolvieron 0.75g de agarosa en 50 ml de TAE 1X (Tris, ácido Acético glacial y EDTA) dentro de un matraz Erlenmeyer, se calentó la mezcla en un horno de microondas hasta disolver completamente la agarosa, se restituyó el agua que se pierde por evaporación y se agregó bromuro de etidio (0.625 mg/ml). La mezcla fue vaciada en un porta geles y una vez gelificado, se retiró el peine y se colocó el gel en la cámara de electroforesis añadiéndose buffer TAE 1X hasta cubrir el gel. Se mezclaron 3 μ l de colorante (azul de bromofenol) con los 25 μ l del producto de PCR y se colocó cada muestra en los pozos del gel; en uno de los pozos se colocaron 5 μ l de marcador de peso molecular de 100 pb que fue utilizado como referencia. Una vez llevada a cabo la electroforesis, se observó el gel en el transiluminador de luz ultravioleta y se procedió a recortar cada banda con el producto amplificado.

4.2.5.- PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR PARA SECUENCIACIÓN NUCLEOTIDICA AUTOMATIZADA

Los fragmentos de PCR amplificados presentes en cada banda deben ser purificados antes de la reacción de secuencia para eliminar excesos de dNTPs, oligonucleótidos, o enzima. Las bandas escindidas del gel se purificaron con ayuda del kit QIAEX II (QIAGEN). Inicialmente, se colocó cada banda de agarosa en un tubo de 2ml, se añadieron 800 μ l de amortiguador QX1 más 10–20 μ l de resina QIAEX II y se procedió a mezclar con vórtex. Una vez hecho esto, se incubó cada tubo por 5-10 minutos a 50°C hasta que la agarosa se disolvió completamente. Después se centrifugó cada muestra por 1 minuto a 10.000 rpm decantándose cuidadosamente el sobrenadante. Se agregaron 500 μ l de amortiguador QX1, con los que se lavó y disolvió el botón de resina, se centrifugó otra vez por 1 minuto a 10.000 rpm y se decantó nuevamente. Se continuó con la adición de 500 μ l de amortiguador PE (alcoholes) mezclando mediante vórtex; se centrifugó por 1 minuto a 10.000 rpm y nuevamente se decantó. Este paso se repitió 2 ocasiones y al final se eliminaron los residuos de este buffer con micropipeta.

El botón con la muestra fue secado por efecto de temperatura a 50°C y se le añadieron 20 μ l de agua bidestilada. Se mezcló y se disolvió el botón cuidadosamente con el agua y posteriormente la muestra fue centrifugada por 1 minuto a 10.000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un microtubo limpio de 0.5 ml.

4.2.6.- CUANTIFICACIÓN DEL DNA PURIFICADO

Se realizó la cuantificación del producto de PCR recuperado (templado) mediante comparación con un estándar (DNA low mass ladder, Gibco). Se preparó un gel de agarosa de 20 ml al 1.5% (procedimiento antes descrito). Se mezclaron 4 μ l del producto de PCR purificado con 1 μ l de colorante y se colocó en cada pozo del gel para llevar a cabo la electroforesis. La estimación de la concentración de DNA en cada muestra se realizó por comparación de la intensidad de las bandas de los productos purificados con el estándar mencionado.

4.2.7.- SECUENCIACIÓN AUTOMATIZADA DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Cada templado correspondiente a exones individuales se sometió a una nueva reacción de PCR en la que se utilizó el kit *Big Dye Terminator* (Applied Biosystems), el cual contiene: dideoxinucleótidos marcados por fluorescencia (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP), desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), Tris-HCl (Ph 9.0), $MgCl_2$ y ampliTaq polimerasa. Para este proceso se preparó una reacción de 20 μ l que contenía: ~20 ng del DNA purificado de cada exón, 4 μ l del kit Big Dye Terminator, 1 μ l del oligonucleótido correspondiente a una concentración de 10 μ M y agua bidestilada para un volumen final de 20 μ l.

Esta mezcla se sometió a un programa de temperaturas en un termociclador que incluyó 25 ciclos de: desnaturalización a 97 °C por 30 segundos

alineamiento a 50 °C por 15 segundos

extensión a 60 °C por 4 minutos

Después de esta reacción de PCR se llevó a cabo la purificación de los productos de extensión con el fin de eliminar el exceso de ddNTPs marcados por fluorescencia. Este procedimiento fue realizado con columnas Centri Sep (Applied Biosystems) hidratadas por un periodo mínimo de 2 horas con 800 μ l de agua destilada. Las columnas fueron centrifugadas después por 3 minutos a 3000 rpm para eliminar el exceso de agua. A continuación las columnas fueron colocadas en tubos de 500 μ l y sobre el centro de la columna se añadieron los 20 μ l del producto de PCR de secuencia. Las columnas fueron colocadas en un tubo receptor y centrifugadas por 3 minutos a 3000 rpm. Finalmente, las muestras que se obtuvieron en cada tubo receptor fueron desecadas en una centrifuga de vacío sin aplicar calor y sin secar en exceso.

Posteriormente, cada muestra fue resuspendida en 25 μ l de amortiguador de carga TSR (*Template supression reagent*, Applied Biosystems) y se procedió a desnaturalizar cada muestra a 95°C durante 5 minutos en un termociclador. Finalmente, las muestras se colocaron en el secuenciador automatizado Genetic Analyzer 310 de Applied Biosystems, y se inició el análisis siguiendo las instrucciones del equipo.

Las secuencias obtenidas de los 16 exones de p63 en cada paciente fueron comparadas con las secuencias normales publicadas en la base de datos GeneBank (secuencia No. AF075430).

5.- RESULTADOS

5.1.- PACIENTES

De los 6 sujetos estudiados, 4 (casos 1, 2, 3 y 6) correspondieron a casos esporádicos y 2 (casos 4 y 5) fueron madre e hija. Cuatro pacientes (casos 1, 2, 3 y 5) presentaron criterios clínicos para el diagnóstico de síndrome EEC (ectrodactilia, displasia ectodérmica y fisuras faciales), mientras que los otros 2 (individuos 4 y 6) presentaron ectrodactilia y displasia ectodérmica (sin fisuras faciales) y fueron considerados como fenotipo EE.

Fue interesante la observación de que en el caso familiar la madre presentó un fenotipo EE mientras que la hija fue diagnosticada como síndrome EES. Este caso representa un claro ejemplo de variabilidad clínica intrafamiliar, característica que ha sido descrita previamente en este grupo de enfermedades.

5.2.- ANALISIS MOLECULAR

En todos los sujetos el análisis espectrofotométrico del DNA obtenido indicó que la concentración y la calidad de las muestras eran satisfactorias. En los 6 sujetos se observó la amplificación normal de los 16 exones del gen p63. El tamaño de los productos de PCR obtenidos coincidió con lo esperado al compararlos con los marcadores estándar de peso molecular. Estos hallazgos descartaron la presencia de rearrreglos importantes en la secuencia codificante del gen, como deleciones totales o parciales ó inserciones. Como ejemplo, los productos de amplificación correspondientes a los exones 5 y 7 se muestran en la figura 24.

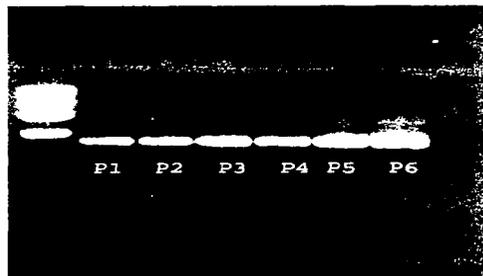
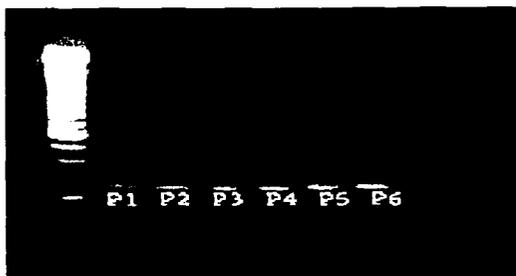


FIGURA 24. Fotografía de la electroforesis en gel de agarosa que muestra los productos amplificados de los exones 7 (izquierda) y 5 (derecha) del gen p63 en los 6 pacientes.

La purificación de cada uno de los productos de PCR a partir del gel de agarosa fue adecuada en todos los casos ya que se obtuvieron templados con concentraciones de entre 5 y 10 ng de DNA por μl . Después de realizar la secuenciación nucleotídica automatizada de los 16 exones del gen p63 en todos los sujetos, se logró la identificación de 3 mutaciones de tipo puntual: en las pacientes 4 y 5 (madre e hija del caso familiar), se detectó una transición heterocigota de citosina a timina (C→T) en el nucleótido 727, localizado en el exón 5 (Figura 25) del gen p63. Este cambio originó que el codon CGG que codifica para el aminoácido Arginina (R) en la posición 204, cambiara a TGG que codifica para el aminoácido Triptófano (W). Como se esquematiza en la figura 24, esta mutación de sentido equivocado R204W afecta el dominio conservado de unión a DNA de la proteína p63. El cambio fue observado en DNA de la madre y de la hija y fue confirmado en al menos dos templados de DNA independientes.

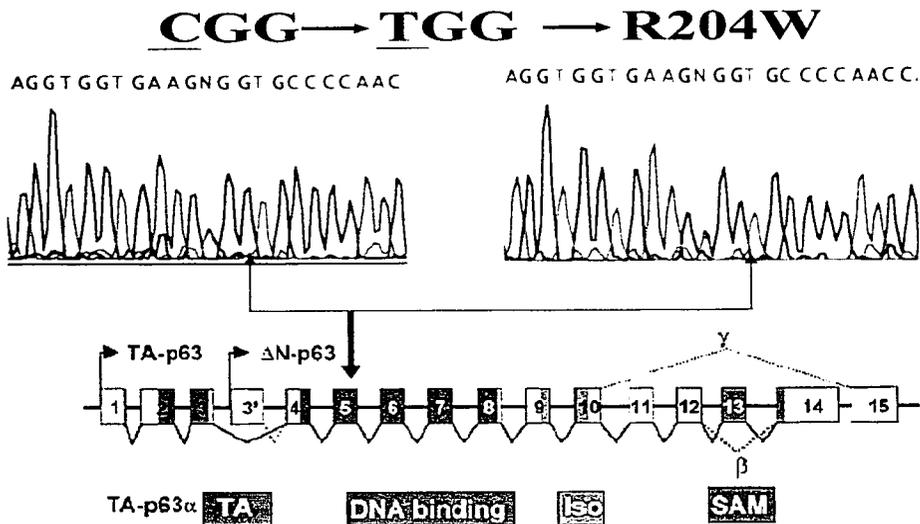


FIGURA 25. Panel superior: secuencia nucleotídica parcial del exón 5 en los pacientes 4 (secuencia de la izquierda) y 5 (secuencia de la derecha) que demuestra una transición heterocigota C→T que convierte un residuo de arginina (CGG) a uno de triptófano (TGG): R204W. Panel inferior: la mutación R204W afecta el dominio de unión a DNA de p63.

La tercera mutación se identificó en el paciente 6 con un fenotipo EE (ectrodactilia + displasia ectodérmica). En este sujeto se documentó una transición heterocigota de guanina a adenina (G→A) en el nucleótido 953 situado en el exón 7 del gen (figura 26). Esta mutación originó que el codon CGC que codifica para Arginina (R) en la posición 279 del polipéptido, cambiara a un codón CAC que codifica para Histidina (H). Este cambio

R279H afecta también el dominio de unión a DNA de la proteína p63 (figura 26). La mutación fue confirmada en al menos 2 templados independientes.

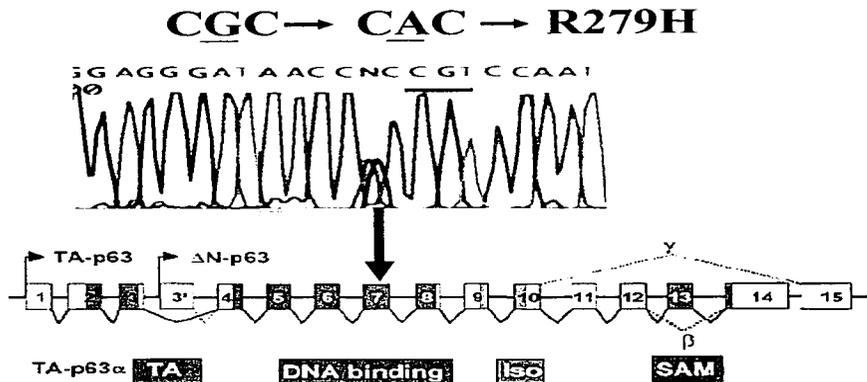


FIGURA 26. Panel superior: secuencia nucleotídica parcial del exón 7 en la paciente 6 que demuestra una transición heterocigota G→A que convierte un residuo de arginina (CGC) a uno de histidina (CAC): R279H. Panel inferior: la mutación R279H afecta el dominio de unión a DNA de p63.

El análisis de la secuencia codificante del resto de los exones en estos tres sujetos no demostró otras alteraciones. De igual manera, después de realizar la secuenciación nucleotídica de los 16 exones de p63 en los tres pacientes restantes, no se demostraron variaciones con respecto a la secuencia normal de p63.

Por otra parte, en los 6 sujetos estudiados se identificó una delección homocigota de una base (adenina) en el intrón 5 y localizada en la posición -4 con respecto al inicio del exón 6. Este cambio (IVS5-4A-del) fue observado también en 20 cromosomas independientes de sujetos sanos por lo que se concluyó que se trata de un polimorfismo sin repercusión fenotípica. También se identificó una transversión homocigota de guanina por citosina en el intrón 10 localizada en la posición +40 con respecto al término del exón 10 en los 6 pacientes. Este cambio fue observado también en 20 cromosomas independientes de sujetos sanos por lo que se concluyó que se trata de otro polimorfismo sin repercusión funcional en el gen.

6.- DISCUSIÓN

La ectrodactilia es una malformación de la parte distal de las extremidades que se presenta con una frecuencia estimada de 1 en cada 18000 recién nacidos y que está caracterizada por diversos grados de hendidura central longitudinal asociada frecuentemente a sindactilia y a aplasia y/o hipoplasia de las falanges, de los metacarpianos y de los metatarsianos. Esta anomalía puede presentarse de manera aislada o como parte de entidades sindrómicas complejas como en los síndromes autosómicos dominantes EEC, LMS, ADULT y Rapp-Hodgkin. Recientemente se demostró que estos síndromes, así como algunos casos de ectrodactilia aislada en manos y/o pies se deben a mutaciones en el gen p63, localizado en 3q27. Los estudios en modelos murinos han demostrado que p63 es indispensable para el desarrollo embrionario de las extremidades, de algunas estructuras craneofaciales y de diversos derivados ectodérmicos como piel, uñas, dientes y pelo. En las extremidades particularmente, p63 permite las interacciones ectodermo-mesénquima indispensables para el mantenimiento de la CEA. El fenotipo observado en sujetos con mutaciones en p63 se correlaciona íntimamente con la función de este gen durante el desarrollo (Mills et al, 1999; van Bokhoven y Brunner, 2002).

El síndrome EEC es una entidad poco frecuente que se define por la triada de ectrodactilia en manos y/o pies, displasia ectodérmica y fisuras faciales. Esta enfermedad tiene un patrón de herencia autosómico dominante con expresividad variable intra e interfamilial así como penetrancia reducida.

El objetivo de nuestro estudio fue analizar el gen p63 en un grupo de seis pacientes Mexicanos con ectrodactilia asociada a displasia ectodérmica y/o a fisuras faciales.

Nuestros resultados demuestran que 3 de los 6 sujetos (50%) con este fenotipo presentan mutaciones puntuales heterocigotas en el gen p63. Las mutaciones identificadas afectan los aminoácidos 204 y 279 (localizados en el dominio de unión a DNA de la proteína p63) y han sido reportadas en estudios previos de pacientes con síndrome EEC (van Bokhoven et al, 2001; van Bokhoven y Brunner, 2002). Estos datos hacen evidente que en las tres poblaciones en las que se han descrito mutaciones de p63, caucásica, asiática e hispana (en este estudio) existe una homogeneidad mutacional interesante en la que se presentan mutaciones con alta recurrencia. De hecho, aproximadamente 47% de las mutaciones descritas en p63 afectan a los nucleótidos localizados en las posiciones 727, 728, 797, 952, 953, 955 y 1028.

El estudio de los cambios nucleotídicos en el gen p63 revela que la mayoría de las mutaciones son cambios de C→T en dinucleótidos CpG, llevando a la consideración de que estos codones sean zonas calientes para la producción de mutaciones. Una explicación para la recurrencia de mutaciones en p63 es la alta tasa de mutación de la 5-metilcitosina en los sitios CpG. Estos sitios son focos de daño a DNA que es reparado deficientemente (Rideout et al, 1990; Tornaletti y Pfeifer, 1994). Una segunda posibilidad es que el espectro mutacional en el síndrome EEC refleje un mecanismo patogénico específico. Esta posibilidad es apoyada por el hallazgo de que diferentes mutaciones sin sentido ocurren en los aminoácidos 204, 279, 280 y 304; existen varios precedentes en la literatura de este tipo de selectividad. Notablemente, casi todas las mutaciones del gen FGFR3 en acondroplasia ocurren en dos aminoácidos, G380R y G375C. Este sesgo para mutaciones específicas refleja un mecanismo de ganancia de función. Una posibilidad adicional es que los fenotipos de pacientes con otras mutaciones en p63 difieran de los fenotipos observados en

el síndrome FEC típico. Estos casos serían excluidos de los análisis mutacionales de p63. Sin embargo, las 3 explicaciones no son mutuamente excluyentes.

La mayoría de las mutaciones descritas en el gen p63 en sujetos con síndrome EEC son mutaciones de sentido equivocado que afectan el dominio de unión a DNA de la proteína. Dentro de este dominio están presentes 4 regiones conservadas evolutivamente referidas como regiones II, III, IV y V y que son importantes para el plegamiento apropiado de la proteína y la creación de la superficie de unión a DNA. La mayoría de las mutaciones de sentido equivocado de p63 se localizan en estas regiones.

Las mutaciones identificadas en nuestros pacientes (R204W y R279H) se localizan también en puntos calientes del gen p63. En condiciones normales, el aminoácido 279 (arginina) se une al surco menor del DNA, donde interactúa con una región rica en A-T de la secuencia consenso que es requerida para el reconocimiento específico del DNA. En este estudio, el caso 6 presentó una mutación que originó el cambio de arginina por histidina en la posición 279 (R279H). Este cambio predice una alteración en la capacidad de unión a DNA de la proteína p63 que a su vez originaría los defectos fenotípicos observados en la paciente. De hecho, estudios de transactivación *in vitro* utilizando diversas mutantes de p63 han demostrado que la capacidad de factor de transcripción de p63 se reduce significativamente debido a la disrupción del dominio de unión a DNA ya sea por el reemplazo directo de aminoácidos que se unen al DNA o indirectamente por la creación de cambios en la conformación estructural del dominio de unión a DNA (Celli et al, 1999). Por otra parte, es notable que las mutaciones de p63 presentes en los pacientes con síndrome EEC ocurren en aminoácidos que se encuentran comúnmente afectados en la proteína p53 de varios tumores humanos (Walker et al, 1999).

En contraste, en tres de nuestros pacientes con diagnóstico de síndrome EEC no se detectaron mutaciones en la secuencia codificante de p63, lo que sugiere la participación de otros loci en la etiología de esta enfermedad. Este hecho confirma que existe heterogeneidad genética para el síndrome EEC ya que mutaciones en genes diferentes a p63 pueden causar cuadros clínicos similares. Estos genes podrían ser reguladores de la expresión de p63 o bien ser genes que participan en vías comunes de desarrollo de extremidades, derivados ectodérmicos y estructuras craneofaciales. En este sentido es importante mencionar que algunos casos de síndrome EEC han sido asociados a rearreglos en la región cromosómica 7q11.2-q21.3 (Qumsiyeh, 1992) y en otros casos los estudios de ligamiento identificaron un locus para la enfermedad en 19p (O'Quinn et al, 1998) De este modo, el brazo largo del cromosoma 7 y el brazo corto del 19 podrían contener genes adicionales responsables del síndrome EEC.

Los 5 síndromes ocasionados por mutaciones en p63 presentan un patrón de herencia autosómico dominante y se han propuesto mecanismos patogénicos como haploinsuficiencia, dominancia negativa o ganancia de función para explicar este mecanismo de transmisión. Más aún, es posible que la constelación completa de los signos observados en el síndrome EEC pudiera estar causada por una combinación de estos mecanismos. La existencia de 6 diferentes isotipos de la proteína con diferentes propiedades complica aún más los efectos de las mutaciones ya que los estudios de expresión in vitro de las formas mutantes de p63 han demostrado efectos complejos en las funciones de transactivación o de represión de cada isotipo. La haploinsuficiencia no parece ser un mecanismo molecular probable en la enfermedad ya que los pacientes con deleciones constitutivas de 3q27 no presentan manifestaciones clínicas compatibles con síndrome EEC o con síndromes relacionados (Chitayat et al, 1996). Del mismo modo, los ratones con

deleción heterocigota de p63 (p63+/-) tienen un desarrollo normal (Yang et al. 1999). Así, parecería que las proteínas mutantes de p63 en los humanos con el síndrome EEC ocasionan un efecto dominante negativo o de ganancia de función. Sin embargo, debido a la capacidad de los diferentes isotipos de p63 para formar complejos homo ó hetero-oligoméricos, algunas mutaciones (por ejemplo la estudiada Cis306Arg) también pueden tener efectos dominantes negativos en otros isotipos (Celli et al. 1999).

En conjunto los datos disponibles sugieren que un incremento o disminución de la capacidad de transactivación de p63 conduce a los defectos en el desarrollo observados en los pacientes con el síndrome EEC. Sin embargo, los efectos in vivo de la regulación transcripcional de los genes blanco de p63 pueden depender de factores adicionales tales como la secuencia de unión a DNA y el ambiente nuclear.

La variabilidad clínica es uno de los aspectos fundamentales en el síndrome EEC y el espectro de anomalías congénitas en manos y pies en los afectados incluye un amplio rango de anomalías que va desde sindactilia hasta defectos severos de los rayos centrales que se manifiestan como ectrodactilia completa. Existen algunas hipótesis para explicar esta variabilidad fenotípica y que consideran que la complejidad de las interacciones entre isotipos mutados y silvestres de p63 podría producir cuadros clínicos de diversa severidad en diferentes individuos; alternativamente se ha propuesto que la severidad de los defectos podría estar determinada por la acción de genes modificadores y/o factores ambientales. Un precedente que apoya esta noción se encuentra en el ratón mutante para *Dactylaplasia (Dac)*, que es considerado un modelo de la ectrodactilia aislada en humanos. El ratón *Dac* presenta defectos de los rayos centrales de las extremidades superiores debido a una tasa alta de muerte celular en la CEA (Seto et al. 1997). La

severidad de los defectos en las extremidades en el ratón *Dac+/-* depende de una mutación recesiva en un gen modificador llamado *mdac* (Johnson et al, 1995).

En el caso familiar descrito en este trabajo se detecto una mutación R204W en el dominio de unión a DNA de p63. Sin embargo, a pesar de portar la misma alteración molecular la expresión fenotípica fue significativamente diferente en ambas pacientes ya que la madre presentó ectrodactilia incompleta en pies, afección mínima en manos y displasia ectodérmica, sin presencia de labio hendido o paladar hendido mientras que la hija exhibió un fenotipo severo caracterizado por labio hendido y paladar hendido bilaterales, displasia ectodérmica y ectrodactilia completa en manos y pies. Como se mencionó antes, esta marcada variabilidad intrafamiliar puede ser atribuida a la acción de genes modificadores.

Por otro lado, la demostración de la mutación R204W en dos de nuestros pacientes nos permitió también establecer un ejemplo de la alta variabilidad interfamiliar aún en presencia de una misma mutación en p63. En el año 2001, van Bokhoven et al. describieron un grupo importante de pacientes con síndrome EEC en los que encontraron diversas mutaciones de sentido equivocado en el dominio de unión a DNA. La mutación R204W fue demostrada en 6 sujetos, dos de los cuales presentaban, además del cuadro clínico típico de la enfermedad, hipoplasia tibial y estenosis vaginal. En nuestras dos pacientes con la mutación R204W no se observaron estas anomalías asociadas lo que nuevamente sugiere la existencia de genes que modifican la expresión fenotípica en cada caso particular.

En conclusión, nuestro trabajo representa el primer análisis mutacional del gen p63 en sujetos mexicanos con ectrodactilia y displasia ectodérmica asociadas o no a hendiduras faciales. Nuestros resultados revelan una homogeneidad mutacional con respecto a las anomalías de p63 descritas en otras poblaciones. Sin embargo, es necesario el estudio

sistematizado de grupos más amplios de pacientes para confirmar o descartar la incipiente correlación genotipo-fenotipo observada en la familia de síndromes genéticos asociados a mutaciones en el gen p63. Finalmente, dada la función esencial de p63 en el desarrollo embriológico de las extremidades, debe considerarse el análisis molecular de este gen en otras anomalías hereditarias de extremidades para las que aún no se ha identificado un gen responsable.

7.- BIBLIOGRAFIA

Altabel M., Clarke C., 1997. Dorsoventral ectodermal compartments and origin of apical ectodermal ridge in developing chick limb. *Development*, 124: 4547-4556.

Amiel J., Bougeard G., Francannet C., Raclin V., Munnich A., Lyonnet S., Et Al, 2001, TP63 gene mutation in ADULT syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.*, 9: 642-645.

Bakkers J., Hild M., Kramer C., Furutani-Seiki M., Hammer-Schmidt M., 2002, Zebrafish ΔN -p63 is a direct target of Bmp signalling and encodes a transcriptional repressor blocking neural specification in the ventral ectoderm. *Dev. Cell*, 6: 617-627.

Bamberger C., Schmale H., 2001, Identification and tissue distribution of novel Ket / p63 splice variants. *Febs. Lett.*, 501: 121-126.

Bamberger C., Pollet D., Schmale H., 2002, Retinoic acid inhibits downregulation of ΔN -p63 α expression during terminal differentiation of human primary keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 118: 133-138.

Barrow L.L., van Bokhoven H., Daack-Hirsh S., Andersen T., van Beersum S.E., Gorlin R., 2002. Analysis of the p63 gene in classical EEC syndrome, related syndromes, and non-syndromic orofacial clefts. *J. Med. Genet.*, 39: 559-566.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Barrow J.R., Thomas K.R., Boussadia-Zahui O., ET AL., 2003, Ectodermal Wnt3/ β -Catenina signaling is required for the establishment and maintenance of the apical ectodermal ridge. *Genes & Development*, 17: 394-409.

Blagden C.S., Hughes S.M., 1999. Extrinsic influences on limb muscle organization. *Cell Tissue Res.*, 296: 141-150.

Brunner H.G., Hamel B.C.J., van Bokhoven H., 2002, The p63 gene in EEC and other syndromes. *J. Med. Genet.*, 39: 377-381.

Buscher D., Izpisúa Belmonte J.C., 1999. Muscle development during vertebrate limb out-growth. *Cell Tissue Res.*, 296: 131-139.

Canale: Campbell's Operative Orthopaedics, Ninth edition. Mosby Inc, 1998, pp3816-3818.

Capdevila J., 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.

Capdevila J. e Izpisúa C., Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001, 17: 87-132.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Carroll R.L., 1998, Vertebrate paleontology and evolution. New York:W.H. Freeman.

Celli J., Duijf P., Hamel B.C., Bamshad M., Et Al. 1999. Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome, Cell, 99: 143-153.

Chang D.T., Lopez A., Von Kessler D.P., Chiang C., Simandl B.K., Et Al. 1994, Products, genetic linkage and limb patterning activity of a murine Hedgehog gene. Development 120: 3339-3353.

Charite J., McFadden D.G., Olson E.N., 2000. The Bhlh transcription factor dHand controls Sonic Hedgehog expression and establishment of the zone of polarizing activity during limb development. Development, 127: 2461-2470.

Chen H., Lun Y., Ovchinnikov D., Kokubo H., Oberg K.C., Pepicelli C.V., Gan L., Lee B., Johnson R.L., 1998, Limb and kidney defects in Lmx1b mutant mice suggest involvement of Lmx1b in human nail patella syndrome. Nat Genet, 19: 51-55.

Chen H., Johnson R.L., 1999, Dorsoventral patterning of the vertebrate limb: A process governed by multiple events. Cell Tissue Res., 296: 67-73.

Chiang C., Litingtung Y., Lee E., Young K.E., Corden J.L., Et Al, 1996, Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic Hedgehog gene function, Nature, 383: 407-413.

Chitayat D., Babul R., Silver M., Jay V., Teshima I., Babyn P., Becker L., 1996, Terminal deletion of the long arm of chromosome 3 [46,XX, Del(3)(q27->qter). *Am. J. Med. Genet.*, 61: 45-48.

Cohn M.J., Izpisua-Belmonte J.C., Abud H., Heath J.K., Tckle C., 1995, Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell*, 80: 739-746.

Cohn M.J., 2001, Developmental mechanisms of vertebrate limb evolution. En: *The molecular basis of skeletogenesis*, pp: 47-57.

Crossley P.H., Minowada G., Macarthur C.A., Martin G.R., 1996, Roles of Fgf-8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell*, 84: 127-136.

Cygan J.A., Johnson R.L., McMahon A.P., 1997, Novel regulatory interactions revealed by studies of murine limb pattern in Wnt-7a and en-1 mutants. *Development*, 124: 5021-5032.

Dahn R.D., Fallon J.F., 2000, Interdigital regulation of digit identity and homeotic transformation by modulated Bmp signaling. *Science*, 289: 438-431.

Dealy C.N., Roth A., Ferrari D., Brown A.M., Kosher R.A., 1993, Wnt-5a and Wnt-7a are expressed in the developing chick limb bud in a manner suggesting roles in pattern formation along the proximodistal and dorsoventral axes. *Mech. Dev.*, 43: 175-186.

Duijf P.H., Vanmolkot K.R., Propping P., Friedl W., Krieger E., McKeon F., 2002, Gain-of-function mutation in ADULT syndrome reveals the presence of a second transactivation domain in p63. *Hum. Mol. Genet.*, 11: 799-804.

Fallon J.F., Boutin E.L., Carrington J.L., 1986, Apical ectodermal ridge maintenance in ovo and in vitro. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 226: 103-113.

Gañan Y., Macías D., Duterque-Coquillaud M., Ros M.A., Hurlé M., 1996, Role of Tgf betas and Bmps as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development*, 122: 2349-2357.

Gong Y., Et Al., 1999, Heterozygous mutations in the gene encoding noggin affect human joint morphogenesis. *Nat. Genet.*, 21: 302-304.

Healy C., Uwanogho D., Sharpe P.T., 1999, Regulation and role on Sox 9 in cartilage formation. *Dev. Dyn.*, 215: 69-78.

Innis J.W. Y Mortlock D.P., 1998, Limb Development: Molecular Dysmorphology Is At Hand. *Clin. Genet.*, 53: 337-348.

Johnson K.R., Lane P.W., Ward-Bailey P., Davisson M.T., 1995, Mapping the mouse Dactylaplasia mutation, Dac, and a gene that controls its expression. *mdac. Genomics*. 29: 457-464.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Jost C.A., Marin M.C., Kaelin W.G., 1997, p73 is a human p53-Related protein that can induce apoptosis. *Nature*, 389: 191-194.

Kaghad M., Bonnet H., Yang A., Creancier L., Biscan J.C., Valent A., Minty A., Chalon P., Lelias J.M., Dumond X., Ferrera P., McKeon F., Caput D., 1997. Monoallelically expressed gene related to P53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*, 90: 809-819.

Kantaputra P.N., Hamada T., Kumchai T., McGrath J.A., 2003, Heterozygous mutation in the SAM domain of p63 underlies Rapp-Hodgkin ectodermal dysplasia. *J. Dent. Res.*, 82: 433-437.

Kawakami Y., Ishikawa T., Shimabara M., Tanda N., Enomoto-Iwamoto M., 1996, Bmp signaling during bone pattern determination in the developing limb. *Development*, 122: 3557-3566.

Kimmel R.A., Turnbull D.H., Blanquet V., Wurst W., Loomis C.A., Joyner A.L., 2000, Two lineage boundaries coordinate vertebrate apical ectodermal ridge formation. *Genes Dev.*, 14: 1377-1389.

King M.C., Wilson A.C., 1975, Evolution at two levels in humans and chimpanzees. *Science*, 188:107-116.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Kohlhase J., Wischermann A., Reichenbach H., Froster U., Engel W., 1998, Mutations in the SALL 1 putative transcription factor gene cause Townes-Brocks syndrome. *Nat Genet.*, 18: 81-83.

Kraus P., Fraidenraich D., Loomis C.A., 2001, Some distal limb structures develop in mice lacking Sonic Hedgehog signaling. *Mech. Dev.*, 100: 45-58.

Kumar S., Hedges S.B., 1998, A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature*, 392: 917-920.

Larsen W., 1998, *Essentials of Human Embryology*, pp: 212.

Lewandoski M., Sun X., Martin G.R., 2000, Fgf-8 signaling from the AER is essential for normal limb development. *Nat. Genet.*, 26: 460-463.

Logan C., Hornbrush A., Campbell I., Lumsden A., 1997, The role of Engrailed in establishing the dorsoventral axis of the chick limb. *Development*, 124: 2317-2324.

Loomis C.A., Harris E., Michaud J., Wurst W., Hanks M., Joyner A.L., 1996, The mouse engrailed-1 gene and ventral limb patterning. *Nature*, 382: 360-363.

Loomis C.A., Kimmel R.A., Tong C.X., Michaud J., 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.

López Martínez A., Chang D.T., Chiang C., Porter J.A., Ros M.A., Et Al. 1995, Limb patterning activity and restricted posterior localization of the amino-terminal product of Sonic Hedgehog cleavage. *Curr. Biol.*, 5: 791-796.

MacCabe J.A., Errick J., Saunders J.W. Jr., 1974. Ectodermal control of the dorsoventral axis in the leg bud of the chick embryo. *Dev. Biol.*, 39: 69-82.

Macias D., Gañan Y., Ros M.A., Hurlé J.M., 1996, In vivo inhibition of programmed cell death by local administration of Fgf2 and Fgf4 in the interdigital areas of the embryonic chick leg bud. *Anat. Embryol.*, 193: 533-541.

Macias D., Gañan D., Rodríguez-Leon J., Merino R., Hurlé J.M., 1999, Regulation by members of the transforming growth factor beta superfamily of the digital and interdigital fates of the autopodial limb mesoderm. *Cell Tissue Res.*, 296: 95-102.

Mahmood R., Bresnick J., Hornbrush A., Mahony C., Morton N., Colquhoun K., Martin P., Lumsden A., Dickson C., Mason I., 1995, A role of Fgf-8 in the initiation and maintenance of vertebrate limb bud outgrowth. *Curr. Biol.*, 5: 797-806.

Manouvrier-Hanu S., Holder-Espinasse M., Lyonnet S., 1999, Genetics of limb anomalies in humans. *Trends Genet.*, 15: 409-417.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Mariani F.V., Martin G.R., 2003, Deciphering skeletal patterning: clues from the limb. *Nature*, 423: 319-325.

Martin G.R., 1998. The roles of Fgfs in the early development of vertebrate limbs. *Genes Dev.* 12: 1571-1586.

Merino R., Rodriguez-Leon J., Macias D., Gañan Y., Economides N., Hurler J.M., 1999. The Bmp antagonist gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. *Development*, 126:5515-5522.

Michaud J.L., Lapointe F., Le Douarin N.M., 1997. The dorsoventral polarity of the presumptive limb is determined by signals produced by the somites and by the lateral somatopleure. *Development*, 124: 1453-1463.

Milenkovic L., Goodrich L.V., Higgins K.M., Scott M.P., 1999. Mouse patched 1 controls body size determination and limb patterning. *Development*, 126: 4431-4440.

Mills A.A., Zheng B., Wang X.J., Vogel H., Roop D.R., Bradley A., 1999. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*. 398: 708-713.

Miner J. H., Cunningham J., Sanes J.R., 1998, Roles of laminin in embryogenesis: encephaly, syndactyly, and placental pathology in mice lacking the laminin alpha5 Chain. *J. Cell Biol.* 143: 1713-1723.

Moon A.M., Capecchi M.R., 2000. Fgf-8 is required for outgrowth and patterning of the limbs. *Nat. Genet.*, 26: 455-459.

Mortlock D.P., Innis J.W., 1997. Mutation of HOXA13 in hand-foot-genital syndrome. *Nat. Gen.*, 15: 179-180.

Muragaki Y, Mundlos S., Upton J., Olsen B.R., 1996. Altered growth and branching patterns in synpolydactyly caused by mutations in HOXD13. *Science*, 272: 548-551.

Naiche L.A., Papaioannou V.E., 2003. Loss of Tbx4 blocks hindlimb development and affects vascularization and fusion of the allantois. *Development*, 130: 2681-2693.

Nelson C.E., Morgan B.A., Burke A.C., Laufer E., Dimambro E., 1996. Analysis on Hox gene expression in the chick limb bud. *Development*, 122: 1449-1466.

Niswander L., 2002. Interplay between the molecular signals that control vertebrate limb development. *Int. J. Dev. Biol.*, 46: 877-81.

O'Quinn J.R., Hennekam R.C., Jorde L.B., Bamshad M., 1997. Syndromic ectrodactyly with severe limb, ectodermal, urogenital, and palatal defects maps to chromosome 19. (Abstract) *Am. J. Hum. Genet.*, 62: 130-135.

Ozaki T., Naka M., Takada N., Tada M., Sakiyama S., Nakawara A., 1999. Deletion of the COOH-terminal region of p73 α enhances both its transactivation function and DNA-

binding activity but inhibits induction of apoptosis in mammalian cells. *Cancer Res.*, 59: 5902-5907.

Panman L., Zeller R., 2003, Patterning the limb before and after SHH signaling. *J. ANAT.*, 202: 3-12.

Papioannou V.E., Silver L.M., 1998. The T-box gene family. *Bioessays*, 20:9-19.

Parr B.A., McMahon A.P., 1995, Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature*, 374: 350-353.

Pizette S., Niswander L., 1999, Bmps negatively regulate structure and function of the limb apical ectodermal ridge. *Development*, 126: 883-894.

Pizette S., Abate-Shen C., 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.

Qumsiyeh M.B., 1992. EEC syndrome (ectrodactyly, ectodermal dysplasia and cleft lip/palate) is on 7p11.2-q21.3. (Letter) *Clin. Genet.* 42: 101.

Rancourt D.E., Tsuzuki T., Capecchi M.R., 1995, Genetic interaction between *hoxb-5* and *hoxb-6* is revealed by nonallelic noncomplementation. *Genes Dev.*, 9: 108-122.

Riddle R.D., Johnson R.L., Laufer E., 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., Tabin C., 1995, Induction of the Lim homeobox gene *Lmx1* by *Wnt7a* establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell* 83: 631-640.

Rideout W. M., Coetzee G.A., Olumi A.F., Jones P.A., 1990, 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science*, 249: 1288-1290.

Rodríguez-Esteban C., Schwabe J.W., De La Peña J., Foys B., Eshelman B., Belmonte J.C., 1997, Radical fringe positions the apical ectodermal ridge at the dorsoventral boundary of the vertebrate limb. *Nature*, 386: 360-366.

Rodríguez-Esteban C., Tsukui T., Yonei S., Magallon J., Tamura K., Izpisua-Belmonte J.C., 1999, The T-box genes *Tbx4* and *Tbx5* regulate limb outgrowth and identity. *Nature*, 398: 814-818.

Roelfsema N.M., Cobben J.M., 1996, The EEC syndrome: A literature study. *Clin. Dysmorphol.*, 5: 115-127.

Rudiger R.A., Haase W., Passarge E., 1970, Association of ectrodactyly, ectodermal dysplasia, and cleft lip-palate. *Am. J. Dis. Child.*, 120: 160.

Ruvinsky I., Gibson-Brown J.J., 2000, Genetic and developmental bases of serial homology in vertebrate limb evolution. *Development*, 127: 5233-5244.

Ruvinsky I., Silver L.M., Gibson-Brown J.J., 2000, Phylogenetic analysis of T-Box genes demonstrates the importance of amphioxus for understanding evolution of the vertebrate genome. *Genetics In Press*.

Sasaki Y., Ishida S., Morimoto I., Yamashita T., Kojima T., Kihara C.H., Tanaka T., Imai K., Nakamura Y., Tokino T., 2002, The P53 family member genes are involved in the Notch signal pathway. *J. Biol. Chem.*, 227: 719-724.

Saunders J. W., 1948, The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *J. Exp. Zool.*, 108: 363-403.

Saunders J.W., Gasseling M.T., 1963, Trans-filter propagation of apical ectoderm maintenance factor in the chick embryo wing bud. *Dev. Biol.*, 7: 64-78.

Schmale H., Bamberger C., 1997, A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53. *Oncogen*, 15: 1363-1367.

Schultz J., Ponting C.P., Hofmann K., Bork P., 1997, SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation. *Protein Sci.*, 6: 249-253.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Schwabe J. W., Rodríguez-Esteban C., Izpisua Belmonte J. C., 1998, Limbs are moving: where are they going?. *Trends Genetics* 14, 229-235.

Searls R. L., Janners M. Y., 1971. The initiation of limb bud outgrowth in the embryonic chick. *Dev. Biol.*, 24:198-213.

Sekine K., Ohiuchi H., Fujiwara M., Yamasaki M., Yoshisawa Y., Sato T., Yagishita N., Matsui D., Koga Y., Itoh N., Kato S., 1999, Fgf-10 is essential for limb and lung formation. *Nat Genet.* 21: 138-141.

Seto M.L., Nunes M.E., McArthur C.G., Cunningham M.L., 1997, Pathogenesis of ectrodactyly in the Dactylaplasia mouse: Aberrant cell death of the apical ectodermal ridge. *Teratology*, 56: 262-270.

Sifakis S., Basel D., Ianakiev P., Kilpatrick M. W., Tspouras P., 2001, Distal limb malformations: underlying mechanism and clinical associations. *Clinical Genetics*, 60: 165-172.

Stratford T.H., Kostakopoulou K., Maden M., 1997, Hoxb-8 has a role in establishing early antero-posterior polarity in chick forelimb but not hindlimb. *Development*, 124: 4225-4234.

Summerbell D., Lewis J.H., Wolpert L., 1973, Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature*, 244: 492-496.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Sun X., Mariani F.V., Martin G.R., 2002, Functions of Fgf signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature*, 418: 501-508.

Takabatake Y., Takabatake T., Takeshima K., 2000, Conserved and divergent expression of T-box genes Tbx2-Tbx5 in *Xenopus*. *Mech. Dev.*, 91: 433-437.

Takahashi M., Tamura K., Buscher D., Masuya H., Yonei-Tamura S., Et Al, 1998. The role of Alx-4 in the establishment of the anteroposterior polarity during vertebrate limb development. *Development*, 125: 4417-4425.

Tamura K., Yonei-Tamura S., Izpisua-Belmonte J.C., 1999, Differential expression of Tbx4 and Tbx5 in Zebrafish fin buds. *Mech. Dev.*, 87: 181-184.

Thomas J.T., Lin K., Nandedkar M., Camargo M., Cervenka J., Luyten F.P., 1996, A human chondrodysplasia due to mutation in a Tgf-Beta superfamily member. *Nat Genet*, 12: 315-317.

Todt W. L., Fallon J. F., 1984, Development of the apical ectodermal ridge in the chick wing bud. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 80: 21-41.

Tornaletti S., Pfeifer G.P., 1994, Slow repair of pyrimidine dimers at p53 mutation hotspots in skin cancer. *Science*, 263: 1436-1438).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

van Bokhoven H., Hamel B.C., Banshad M., Et Al, 2001, P63 gene mutations in EEC syndrome, Limb-Mammary Syndrome, And Isolated Split Hand Split Foot Malformation suggest a genotype-phenotype correlation. *Am. J. Hum. Genet.*, 69: 481-492.

van Bokhoven H., Brunner H.G., 2002. Splitting p63. *Am. J. Hum. Genet.*, 71: 1-13.

van den Akker E., Reijnen M., Korving J., 1999, Targeted inactivation of *hoxb8* affects survival of a spinal ganglion and cause aberrant limb defects. *Mech. Dev.*, 89: 103-114.

Vogel A., Rodriguez C., Izpizua-Belmonte J.C., 1996, Involvement of *Fgf-8* in initiation, outgrowth and patterning of the vertebrate limb. *Development*, 122: 1737-1750.

Vollrath D., Et Al, 1998, Loss of function mutations in the *Lim*-homeodomain gene, *Lmx1b*, in Nail-Patella Syndrome. *Hum Mol Genet*, 7: 1091-1098.

Walker D.R., Bond J., Tarone R.E., Harris C., Makalowski W., Boguski M., Greenblatt M., 1999, Evolutionary conservation and somatic mutation hotspot maps of *p53*: Correlation with *p53* protein structural and functional features, *Oncogen*, 9: 211-219.

Webster Mike, Development of the tetrapod limb.

Wilson A.C., Maxon L.R., Sarich V.M., 1974, Two types of molecular evolution. Evidence from studies of interspecific hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 71:2843-2847.

Winter R.M., Tickle C., 1993, Syndactylies and polydactylies: embryological overview and suggested classification. *Eur. J. Hum. Genet.*, 1: 96-104.

Wozney J. M., 2002, Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine*, 15: 2-8.

Wright E., Hargrave M.R., Christiansen J., Cooper L., Kun J., 1995, The Sry-related gene *Sox 9* is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat. Genet.*, 9: 15-20.

Yang Y., Niswander L., 1995, Interaction between the signaling molecules *Wnt7a* and *Shh* during vertebrate limb development: dorsal signals regulate anteroposterior patterning. *Cell* 80: 939-947.

Yang A., Kaghad M., Wang Y., Gillett E., Fleming M.D., Dotsch V., Andrews N.C., Caput D., Mckeon F., 1998, *P63*, a *P53* homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol. Cell*, 2: 305-316.

Yang A., Schweitzer R., Sun D., Kaghad M., Walker N., Et Al, 1999, *p63* is essential for regenerative proliferation in limbs, craniofacial and epithelial development. *Nature*, 398: 714-718.

Yang A., Walker N., Bronson R., Kaghad M., Oosterwegel M., Bonnin J., Vagner C., Bonnet H., Dikkes P., Sharpe A., Mckeon F., Caput D., 2000, *p73*-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature*, 404: 99-103.

Yang A., Mckeon F., 2002, p63 and p73: p53 mimics, menaces and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1: 199-207.

Ying Liu, Chunqiao Liu, Yamada Y., Chen-Ming Fa, 2002, Growth arrest specific gene acts as a region-specific mediator of the Fgf10/Fgf8 regulatory loop in the limb. *Development*, 129: 5289-5300.

Yokouchi Y., Sakiyama J., Kameda T., Iba H., Suzuki A., 1996, Bmp -2/-4 mediate programmed cell death in chicken limb buds. *Development*, 122: 3725-3734.

Zakany J., Fromental-Ramain C., Warot X., Duboule D., 1997, Regulation of number and size of digits by posterior HOX genes: A dose dependent mechanism with potential evolutionary implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 13695-13700.

Zakany J., Duboule D., 1999, HOX genes in digit development and evolution. *Cell Tissue Res.*, 296: 19-25.

Zouh, Niswander L., 1996. Requirement for Bmp signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science*, 272: 738-741.

Zou H., Wieser R., Massague J., Niswander L., 1997, Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev.*, 11: 2191-2203.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Zuniga A., Zeller R., 1999, Gli3 (Xt) and formin (Id) participate in the positioning of the polarizing region and control of posterior limb-bud identity. *Development*, 126: 13-21.

Zwilling E., 1955. Ectoderm-Mesoderm relationship in the development of the chick embryo limb bud. *J. Exp. Zool.*, 128: 423-441.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN